



Transkriptspezifische Entkopplung von mRNA-Abbau, Translation  
und Assemblierung von *processing bodies*

*Transcript specific uncoupling of mRNA decay, translation and  
processing body assembly*

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

*Doctor rerum naturalium*

(Dr. rer. nat)

vorgelegt von

Ulaş Tenekeci

Gießen, 2018

Angefertigt am  
Fachbereich 08-Biologie und Chemie  
in Zusammenarbeit mit dem  
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht am: 08.01.2018

eingereicht von: Ulaş Tenekeci, geb. am 11.12.1986 in Freudenberg

Disputation am: 16.05.2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann  
Institut für Genetik  
Fachbereich Biologie und Chemie  
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht  
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie  
Fachbereich Medizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Tenekeci U, Poppe M, Beuerlein K, Buro C, Muller H, Weiser H, Kettner-Buhrow D, Porada K, Newel D, Xu M, Chen ZJ, Busch J, Schmitz ML, Kracht M (2016) *K63-Ubiquitylation and TRAF6 Pathways Regulate Mammalian P-Body Formation and mRNA Decapping*. *Molecular Cell* 62: 943-957

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
Zusammenfassung .....	X
<i>Abstract</i> .....	XII
1. Einleitung .....	1
1.1. Die menschliche Immunantwort .....	1
1.2. Zytokine als Bestandteil des Immunsystems .....	2
1.3. IL-1-vermittelter, proinflammatorischer Signalweg .....	3
1.3.1. IL-1-abhängige Signaltransduktion .....	3
1.3.2. IL-8 und IL-6 als IL-1-induzierte proinflammatorische Mediatoren .....	7
1.3.3. Termination des IL-1 <i>signalings</i> .....	7
1.4. Möglichkeiten des mRNA-Abbaus .....	8
1.5. Der <i>Decapping</i> -Komplex und der 5'-3'-Abbau von mRNA .....	11
1.5.1. Die katalytische Untereinheit des <i>Decapping</i> -Komplexes: DCP2.....	12
1.5.2. Die regulatorische Untereinheit des <i>Decapping</i> -Komplexes: DCP1a .....	12
1.5.3. Weitere Regulationsmöglichkeiten der <i>Decapping</i> -Reaktion.....	14
1.5.4. Die Plattform der <i>Decapping</i> -Faktoren: EDC4.....	16
1.5.5. Der abschließende Faktor des 5'-3'-mRNA-Abbaus: XRN1 .....	16
1.6. <i>Processing bodies</i> ( <i>P-Bodies</i> ) .....	18
1.7. <i>P-Bodies</i> als Orte des Abbaus oder der Speicherung von mRNA .....	20
1.8. Interaktion von <i>P-Bodies</i> und anderen zellulären Granula .....	22
1.9. Implikationen von <i>P-Bodies</i> und <i>P-Body</i> -Faktoren bei Krankheitsbildern.....	23
1.10. Regulation von <i>P-Body</i> -Faktoren durch proinflammatorisches <i>signaling</i> .....	24
1.11. Zielsetzung der Arbeit .....	27
2. Material und Methoden .....	30
2.1. Material .....	30
2.1.1. Verbrauchsmaterial .....	30
2.1.2. Geräte .....	30
2.1.3. Chemikalien und Lösungsmittel.....	31
2.1.4. Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien.....	31
2.1.5. Enzyme.....	32

2.1.6. Antikörper .....	33
2.1.7. Inhibitoren .....	35
2.1.8. Expressionsvektoren.....	35
2.1.9. Oligonukleotide .....	36
2.1.10. <i>TaqMan Gene Expression Assays</i> .....	37
2.1.11. Sonden für RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung .....	38
2.1.12. Rekombinante Proteine .....	38
2.1.13. Puffer .....	38
2.1.14. Medien und Zusätze .....	40
2.1.15. Bakterienstämme .....	41
2.1.16. Zelllinien .....	41
2.1.17. Software Programme.....	43
2.2. Methoden.....	44
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	44
2.2.1.1. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren .....	44
2.2.1.2. PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	44
2.2.1.3. Reverse Transkription .....	45
2.2.1.4. Quantitative PCR (qPCR) .....	46
2.2.1.5. Klonierung von CRISPR/Cas9-Vektoren.....	47
2.2.1.6. Sanger-Sequenzierungen .....	49
2.2.1.7. Herstellung eines linearen RNA-Transkripts durch <i>in vitro</i> Transkription.....	49
2.2.1.8. Radioaktives <i>in vitro</i> Capping von RNA .....	51
2.2.1.9. Agarosegelelektrophorese .....	52
2.2.1.10. Kapillarelektrophorese .....	53
2.2.1.11. Dünnschichtchromatographie.....	53
2.2.2. Mikrobiologische Methoden .....	54
2.2.2.1. Kultivierung von Bakterien .....	54
2.2.2.2. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	54
2.2.2.3. Transformation von Bakterien .....	55
2.2.2.4. Dauerkulturen von Bakterien .....	55
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden .....	55
2.2.3.1. Lysate für Immundetektion im Western Blot.....	55
2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten nach Bradford.....	56
2.2.3.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE .....	56

2.2.3.4. Western Blot und Immundetektion von Proteinen .....	57
2.2.3.5. <i>Decapping-Assay</i> .....	58
2.2.4. Zellkultur-Methoden .....	59
2.2.4.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	59
2.2.4.2. Kultivieren, Passagieren, Stimulation und Ernten von Zellen .....	60
2.2.4.3. Transiente Transfektion von Zellen mit der Calciumphosphat-Methode .....	61
2.2.4.4. Stabile Transfektion zur Herstellung von CRISPR/Cas9-Zelllinien.....	62
2.2.5. Zellbiologische Methoden.....	64
2.2.5.1. Indirekte Immunfluoreszenz .....	64
2.2.5.2. Immuno- <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA) .....	65
2.2.5.3. Immuno-RNA- <i>in situ</i> Hybridisierung .....	67
3. Ergebnisse .....	69
3.1. Regulation der zellulären <i>Decapping</i> -Aktivität durch DCP1a, TRAF6 und posttranslationale Modifikationen.....	69
3.2. Regulation der Protein:Protein-Interaktionen von <i>Decapping</i> -Faktoren durch K63-Ubiquitin.....	72
3.3. Etablierung von Zellmodellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem <i>knockdown</i> von <i>P-Body</i> -Proteinen .....	76
3.4. Auswahl der CRISPR/Cas9-Kontrollvektor-Zelllinie für HeLa-Zellen.....	87
3.5. Einfluss von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf den IL-1-abhängigen, proinflammatorischen Signalweg auf Proteinebene.....	88
3.6. Regulation der <i>P-Body</i> -Assemblierung durch DCP1a, EDC4 und XRN1.....	93
3.7. Einfluss der Rekonstitution von DCP1a und EDC4 in CRISPR/Cas9-Zellen auf die <i>P-Body</i> -Assemblierung .....	97
3.8. DCP1a-abhängige Formation von <i>P-Body</i> -ähnlichen Strukturen in EDC4 <i>knockdown</i> Zellen.....	103
3.9. Regulation der Ausbildung von DCP1a-, EDC4- und XRN1-Proteinkomplexen .....	109
3.10. Relevanz von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf den Metabolismus von IL-1-induzierten mRNAs.....	115
3.10.1. Einfluss von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf die Induktion der mRNA-Expression .....	115
3.10.2. Einfluss von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf den mRNA-Abbau .....	117
3.10.3. Zusammenfassende Beurteilung der Relevanz von DCP1a, EDC4 und XRN1 für die <i>steady state level</i> und den Abbau von proinflammatorischen mRNAs.....	120
3.11. Relevanz von EDC4 für die <i>Decapping</i> -Aktivität .....	123

3.12. IL-1-induzierte Expression der <i>IL8</i> -mRNA und Translokation von NFκB p65 in den Zellkern in Einzelzellen mit DCP1a, EDC4 oder XRN1 <i>knockdown</i> .....	124
3.13. Relative, subzelluläre Lokalisation der <i>IL8</i> - und <i>NFKBIA</i> -mRNA zu <i>P-Body</i> -Strukturen in den DCP1a, EDC4 oder XRN1 <i>knockdown</i> Zellen.....	128
3.14. Subzelluläre Lokalisation der <i>IL6</i> -mRNA und <i>P-Bodies</i> in DCP1a, EDC4 und XRN1 <i>knockdown</i> Zellen.....	133
3.15. Manipulation des <i>P-Body remodellings</i> durch pharmakologische Inhibitoren des RNA-Metabolismus und des IL-1 <i>signalings</i> .....	136
3.16. Kolokalisation von <i>NFKBIA</i> -mRNA und <i>P-Bodies</i> in XRN1 <i>knockdown</i> Zellen in Abhängigkeit von pharmakologischen Inhibitoren .....	142
4. Diskussion .....	150
4.1. Die mRNA-Expression als vielschichtiger, zellulärer Prozess .....	150
4.2. Regulation der <i>Decapping</i> -Aktivität und der Interaktion von <i>P-Body</i> -Faktoren durch signalabhängige, posttranslationale Modifikationen.....	152
4.3. Etablierung von Zellsystemen zur CRISPR/Cas9-abhängigen Depletion von <i>P-Body</i> -Faktoren.....	154
4.4. Die Assemblierung von <i>P-Bodies</i> ist von DCP1a, XRN1 und EDC4 abhängig.....	157
4.5. Abhängigkeit der Protein:Protein-Interaktion von DCP1a, EDC4 und XRN1 von der Proteinmenge der einzelnen Faktoren .....	162
4.6. Relevanz von <i>P-Bodies</i> und <i>P-Body</i> -Faktoren für das IL-1-abhängige proinflammatorische <i>signaling</i> .....	165
4.7. DCP1a, EDC4 und XRN1 weisen einen transkriptspezifischen Einfluss auf die mRNA-Stabilität auf .....	169
4.8. <i>P-Bodies</i> ermöglichen die transkriptspezifische Speicherung von mRNAs .....	172
4.9. <i>P-Bodies</i> sorgen durch die Speicherung von mRNAs für die Aufrechterhaltung der Proteinmenge.....	177
4.10. Ausblick .....	183
5. Literaturverzeichnis.....	186
6. Anhang .....	203
Eidesstaatliche Erklärung .....	225
Portfolio.....	226
Danksagung .....	227

## Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1: Schematische Darstellung des IL-1-Signalwegs..	6
Abb.1.2: Schematische Darstellung möglicher RNA-Abbaumechanismen..	10
Abb.1.3: Aktive Proteinkonformation von DCP2 in Hefen.	15
Abb.1.4: Schematische, maßstabsgetreue Darstellung von zentralen Proteinen des 5'-3'-RNA-Abbaus.	17
Abb.1.5: Schematische Darstellung des mRNA-Abbaus durch deadenylierungsabhängiges <i>Decapping</i> ..	19
Abb.1.6: IL-1-abhängige Veränderungen von DCP1a und <i>P-Bodies</i> ..	27
Abb.2.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise der CRISPR/Cas9-Technologie.	63
Abb.3.1: Die endogene <i>Decapping</i> -Aktivität eines GFP-DCP1a-Proteinkomplexes ist von den sechs C-terminalen Lysin-Aminosäuren von DCP1a abhängig.	70
Abb.3.2: Regulation der <i>Decapping</i> -Aktivität eines GFP-DCP2-Proteinkomplexes durch ektopische Koexpression von TRAF6.	72
Abb.3.3: Schematische Darstellung der prinzipiellen Funktionsweise des <i>Proximity-Ligation-Assay</i> ..	73
Abb.3.4: Regulation der endogenen Protein:Protein-Interaktionen von <i>Decapping</i> -Faktoren durch die regulatorische, K63-abhängige Ubiquitynylierung..	74
Abb.3.5: Schematische Darstellung der Strategie zur Herstellung von CRISPR/Cas9- <i>knockdown</i> -Zelllinien.	77
Abb.3.6: Etablierung des DCP1a- <i>knockdowns</i> mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R- und HeLa-Zellen.	79
Abb.3.7: Versuch der Etablierung des DCP2- <i>knockdowns</i> mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R-Zellen.	80
Abb.3.8: Versuch der Etablierung des DCP2- <i>knockdowns</i> mittels CRISPR/Cas9 in HeLa-Zellen.	81
Abb.3.9: Versuch der Etablierung des EDC3- <i>knockdowns</i> mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R-Zellen.	82
Abb.3.10: Etablierung des EDC4- <i>knockdowns</i> mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R-Zellen (A,B,C) und HeLa-Zellen (D).	83
Abb.3.11: Etablierung des XRN1- <i>knockdowns</i> mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R-Zellen.	85
Abb.3.12: Etablierung des XRN1- <i>knockdowns</i> mittels CRISPR/Cas9 in HeLa-Zellen.	86
Abb.3.13: Vergleichende Analyse der px459-Kontrollvektor-Zelllinien.	88
Abb.3.14: Analyse des IL-1 abhängigen proinflammatorischen Signalwegs in CRISPR/Cas9-Zellen.	92
Abb.3.15: Einfluss von DCP1a, XRN1 und EDC4 für die Assemblierung von <i>P-Bodies</i> ..	97
Abb.3.16: Rekonstitution von DCP1a- <i>knockdown</i> -Zellen.	98
Abb.3.17: Rekonstitution von DCP1a- <i>knockdown</i> -Zellen.	100
Abb.3.18: Rekonstitution von EDC4- <i>knockdown</i> -Zellen.	100
Abb.3.19: Die Rekonstitution von EDC4- <i>knockdown</i> -Zellen ermöglicht in Abhängigkeit von der exprimierten EDC4-Proteinmenge die Assemblierung von <i>P-Bodies</i> ..	103
Abb.3.20: Überexprimiertes GFP-DCP1a kolokalisiert in Abwesenheit von EDC4 mit EDC3, aber nicht mit XRN1 in remodellierten zytoplasmatischen <i>foci</i> ..	108
Abb.3.21: Analyse der endogenen Protein:Protein-Interaktionen von <i>Decapping</i> -Faktoren in verschiedenen CRISPR/Cas9- <i>knockdown</i> -Zellen.	114
Abb.3.22: IL-1 induzierte Genexpression von proinflammatorischen Genen in CRISPR-Zellen.	116
Abb.3.23: Veränderte mRNA-Stabilitäten in Abhängigkeit von IL-1 in den verschiedenen CRISPR/Cas9- <i>knockdown</i> -Zellen.	122
Abb.3.24: Die Erfassung der globalen, zellulären <i>Decapping</i> -Aktivität mittels der Isolation eines GFP-DCP1a-Proteinkomplexes zeigt eine direkte Abhängigkeit von EDC4 auf.	124
Abb.3.25: Einzelzellbasierte Analyse der IL-1 vermittelten Translokation von NFκB p65 in den Zellkern sowie der Expression und zelluläre Lokalisation von <i>IL8</i> -mRNA in CRISPR/Cas9-Zellen.	128
Abb.3.26: Analyse der relativen zellulären Lokalisation von <i>IL8</i> -Transkripten, <i>NFKBIA</i> -Transkripten und <i>P-Bodies</i> in verschiedenen CRISPR/Cas9-Zellen.	133
Abb.3.27: Analyse der relativen zellulären Lokalisation der <i>IL6</i> -mRNA und <i>P-Bodies</i> in ausgewählten CRISPR/Cas9-Zellen.	136

Abb.3.28: Einfluss von pharmakologischen Inhibitoren auf den IL-1-abhängigen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmetabolismus und die <i>NFKBIA</i> -mRNA-Expression. ....	142
Abb.3.29: Einfluss von pharmakologischen Inhibitoren auf die relative zelluläre Lokalisation von <i>NFKBIA</i> -mRNA und <i>P-Bodies</i> in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	149
Abb.4.1: Die Assemblierung von <i>P-Bodies</i> erfolgt durch unterschiedliche Regulatoren. ....	160
Abb.4.2: <i>P-Bodies</i> ermöglichen eine transkriptspezifische Speicherung von mRNAs. ....	176
Abb.4.3: <i>P-Bodies</i> gewährleisten durch die Speicherung von RNA-Abbaufaktoren und spezifischen mRNAs die Aufrechterhaltung einer regulierten mRNA- und Proteinexpression. ....	182
Abb.Anh.1: CRISPR/Cas9-vermittelte genomische Sequenzveränderungen. ....	203
Abb.Anh.2: Einfluss des DCP1a <i>knockdowns</i> auf die Assemblierung von <i>P-Bodies</i> in HEK293IL-1R-Zellen. ....	204
Abb.Anh.3: Einfluss des EDC4 <i>knockdowns</i> auf die Assemblierung von <i>P-Bodies</i> . ....	205
Abb.Anh.4: Überexprimiertes HA-DCP1a kolokalisiert mit EDC3 auch in Abwesenheit von EDC4 in zytoplasmatischen <i>foci</i> . ....	208
Abb.Anh.5: Überexprimiertes GFP-DCP1a und dessen Varianten kolokalisieren mit EDC3 auch in Abwesenheit von EDC4 in zytoplasmatischen <i>foci</i> . ....	212
Abb.Anh.6: Analyse der endogenen DCP1a:EDC4-Proteininteraktionen in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	213
Abb.Anh.7: Analyse der endogenen XRN1:DCP1a-Proteininteraktionen in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	214
Abb.Anh.8: Analyse der endogenen XRN1:EDC4-Proteininteraktionen in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	215
Abb.Anh.9: Analyse der endogenen XRN1:XRN1-Proteininteraktionen und Proteinexpression in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	216
Abb.Anh.10: Analyse der endogenen DCP1a:DCP1a-Proteininteraktionen und Proteinexpression in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	217
Abb.Anh.11: Analyse der endogenen EDC4:EDC4-Proteininteraktionen und Proteinexpression in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	218
Abb.Anh.12: Einfluss von Cycloheximid auf die <i>P-Body</i> -Assemblierung in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	219
Abb.Anh.13: Einfluss von MG132 und Actinomycin D auf die relative zelluläre Lokalisation von <i>NFKBIA</i> -Transkripten und <i>P-Bodies</i> in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	220
Abb.Anh.14: Einfluss von Flavopiridol auf die relative zelluläre Lokalisation von <i>NFKBIA</i> -Transkripten und <i>P-Bodies</i> in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	221
Abb.Anh.15: Einfluss von Flavopiridol auf die relative zelluläre Lokalisation von <i>NFKBIA</i> -Transkripten und <i>P-Bodies</i> in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	222
Abb.Anh.16: Einfluss von MG132 und PHA-408 auf die relative zelluläre Lokalisation von <i>NFKBIA</i> -Transkripten und <i>P-Bodies</i> in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	223
Abb.Anh.17: Einfluss von PHA-408 auf die relative zelluläre Lokalisation von <i>NFKBIA</i> -Transkripten und <i>P-Bodies</i> in CRISPR/Cas9-Zellen. ....	224

## Tabellenverzeichnis

Tab.3.1: Halbwertszeiten der untersuchten, prototypischen IL-1-induzierten mRNAs. ....	122
Tab.4.1: Veränderungen der <i>P-Body</i> -Assemblierung durch Depletion oder Überexpression von <i>P-Body</i> -Proteinen. ....	158
Tab.4.2: Veränderungen der <i>P-Body</i> -Assemblierung durch verschiedene Substanzen und Stimuli. ....	180

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	IgG	Immunglobulin G
µl	Mikroliter	l	Liter
µM	Mikromolar	M	Molar
µm	Mikrometer	mA	Milliampere
Abb.	Abbildung	min	Minute
Anh.	Anhang	miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat	ml	Milliliter
ARE	<i>adenin rich elements</i>	mM	Millimolar
AS	Aminosäure	mm	Millimeter
as	<i>antisense</i>	MP	Magermilchpulver
ATP	Adenosintri-phosphat	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
bp	Basenpaare	n	Anzahl
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	ng	Nanogramm
bzw.	beziehungsweise	nm	Nanometer
ca.	zirka	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>	PLA	<i>proximity ligation assay</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>	pmol	Pikomol
Ci	Curie	PNK	Polynukleotidkinase
cm	Zentimeter	PVDF	Polyvinylidenfluorid
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
CTP	Cytosintri-phosphat	rpm	<i>rounds per minute</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>	RT	Reverse Transkriptase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid	se	<i>sense</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	sgRNA	<i>small guide ribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>	siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Tab.	Tabelle
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	TAE	Tris-Acetat-EDTA
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
g	Gramm/ Erdbeschleunigung	TEMED	Tetramethylethylendiamin
GDP	Guanosindiphosphat	U	<i>unit</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>	u.a.	unter anderem
GTP	Guanosintri-phosphat	UTP	Uridintri-phosphat
h	Stunde	UTR	<i>untranslated region</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	UV	Ultraviolett
HEBS	<i>HEPES-buffered saline</i>	V	Volt
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	wt	Wildtyp
IF	Immunfluoreszenz	z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Entzündungsreaktionen sind durch rasche, starke und transiente Veränderungen der zellulären Genexpression gekennzeichnet, welche u.a. durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) vermittelt werden. IL-1 beeinflusst dabei sowohl die Syntheserate, als auch den Abbau der *messenger* (m)RNA Moleküle. Die molekularen Mechanismen, welche die zeitlich koordinierte und dynamische Expression von hunderten von unterschiedlichen IL-1 Zielgenen auf diesen beiden Ebenen des mRNA-Stoffwechsels orchestrieren, sind dabei noch unvollständig verstanden. Beim mRNA-Abbau stellt das *Decapping* einen zentralen, die mRNA Degradation einleitenden Prozess dar. Zunächst erfolgt hierbei die Hydrolyse der 5'-m<sup>7</sup>-Guanosin-Cap-Struktur durch die katalytische Untereinheit des *Decapping*-Komplexes DCP2, wonach die mRNA in 5'-3'-Richtung durch die Exoribonuklease XRN1 abgebaut wird. DCP2 und XRN1 können dabei u.a. zusammen mit der regulatorischen Untereinheit des *Decapping*-Komplexes DCP1a und dem *scaffold* Protein EDC4 in membranlosen, zytoplasmatischen *processing bodies* (*P-Bodies*) kolokalisieren. Aufgrund dieser starken, lokalen Konzentration von Faktoren des mRNA-Abbaus besteht die Annahme, dass diese makromolekularen Strukturen präferentielle Kompartimente des mRNA-Abbaus darstellen. Eine alternative Hypothese impliziert *P-Bodies* als Orte der transienten Lagerung von mRNAs, die dem Translationsprozess vorübergehend entzogen worden sind. Ein übergeordnetes Ziel dieser Dissertation war es, die Relevanz von *Decapping*-Faktoren im proinflammatorischen *signaling* zu untersuchen. Dazu wurden im ersten Teil dieser Arbeit posttranslationale Modifikationen von *Decapping*-Faktoren sowie die dabei beteiligten Enzyme untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von der IL-1-induzierten, reversiblen Phosphorylierung und K63-abhängigen Ubiquitinylierung von DCP1a durch JNK bzw. TRAF6 die *Decapping*-Aktivität, die Interaktion von einzelnen *Decapping*-Faktoren und die Assemblierung von *P-Bodies* reguliert werden kann. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zur weiteren Untersuchung der Rolle von *Decapping*-Faktoren und der dualen Funktion von *P-Bodies* DCP1a, EDC4 oder XRN1-defiziente Zelllinien mittels des CRISPR/Cas9 Systems etabliert. In diesen Modellsystemen zeigte sich nach der Depletion von EDC4 eine verringerte Phosphorylierung von DCP1a, sodass hier EDC4 eine neue Rolle bei der Rekrutierung der zuständigen DCP1a Kinase JNK spielt. Der *knockdown* von DCP1a zeigte dagegen eine weitreichende Reduzierung der IL-1-abhängigen Aktivierung von JNK und p38 MAPK, sowie eine Verringerung der NFκB p65 Translokation in den Zellkern, wodurch DCP1a als neue regulative Komponente im gesamten IL-1 *signaling* betrachtet

werden kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Assemblierung von *P-Bodies* unmittelbar von der Proteinkonzentration der einzelnen Faktoren abhängig ist. Während die Depletion von DCP1a zu einer Erhöhung der zellulären *P-Body*-Anzahlen führte, hemmte der *knockdown* von EDC4 die *P-Body*-Assemblierung komplett. Die Depletion von XRN1 hingegen bewirkte eine Erhöhung der *P-Body*-Größe. Mikroskopische Kollokalisationsstudien unter Verwendung von *proximity ligation assays* zeigten, dass die Depletion von DCP1a, EDC4 oder XRN1 zu einer Reduktion der zytoplasmatischen Protein:Protein-Interaktionen dieser Faktoren außerhalb der *P-Bodies* führt. Diese Veränderungen der *P-Body*-Assemblierung nach der Depletion von DCP1a, EDC4 oder XRN1 korrelierten nicht mit einer Veränderung der mRNA-Spiegel der proinflammatorischen Transkripte *IL8*, *IL6*, *CXCL3* und *NFKBIA*, so dass der Abbau dieser mRNAs offenbar überwiegend außerhalb von *P-Bodies* stattfindet. Alle drei *knockdowns* führten jedoch zu einer transkriptspezifischen Stabilisierung der untersuchten mRNAs. Dieser Effekt war für die *NFKBIA* mRNA nach der Depletion von XRN1 am stärksten ausgeprägt. Eine systematische Analyse der subzellulären Verteilung der *IL8*-, *NFKBIA*- und *IL6*- Transkripte mittels *single molecule* RNA-FISH zeigte eine massive Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA, aber nicht der *IL8*-mRNA, in den *P-Bodies* der XRN1 *knockdown* Zellen. Zur Untersuchung der Fragestellung, ob diese Akkumulation der *NFKBIA*-Transkripte in den *P-Bodies* Auswirkungen auf den Proteinspiegel des zentralen NF $\kappa$ B-Regulators I $\kappa$ B $\alpha$  aufweist, wurden pharmakologische Inhibitoren der IL-1-Signaltransduktion, der Transkription und der Translation eingesetzt, um so mRNA- und Proteinmengen zu modulieren. Hierdurch konnte keine Auflösung der Akkumulation des *NFKBIA*-Transkriptes in den *P-Bodies* der XRN1 *knockdown* Zellen herbeigeführt werden und es fand sich keine Korrelation zwischen mRNA-Abbauraten, mRNA-Lokalisation und I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinspiegel. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen damit, dass *Decapping*-Faktoren im IL-1 Signalweg einerseits posttranslational reguliert werden, andererseits aber auch selbst einen Einfluss auf die IL-1 Signalkaskaden ausüben. Während DCP1a, EDC4 und XRN1 beim Abbau von IL-1-induzierten Transkripten beteiligt sind, ist die Assemblierung von *P-Bodies* dagegen für diesen Effekt nicht erforderlich. Unter Konditionen mit gehemmtem mRNA-Abbau ermöglicht die dynamische Umverteilung der mRNAs in *P-Bodies* die Konstanthaltung der zellulären Proteinmenge, indem die kumulierenden Transkripte nicht für die Translation im Zytoplasma zur Verfügung stehen. Somit zeigen diese Daten, dass *P-Bodies* im proinflammatorischen *signaling* vor allem als Speicherorte für mRNAs und mRNA-Abbaufaktoren fungieren und so direkt Einfluss auf die Genexpression bei einer Entzündungsreaktion nehmen können.

**Abstract**

Inflammatory reactions are characterized by rapid and strong changes in the cellular expression of genes, a process that is mediated by proinflammatory cytokines such as interleukin-1 (IL-1). Thereby, IL-1 regulates both the rate of synthesis and decay of messenger (m)RNA molecules. The molecular mechanisms that orchestrate the timely and dynamic expression of hundreds of different IL-1 target genes at these two levels of the mRNA metabolism are incompletely understood. Decapping is a central process initiating mRNA degradation. After hydrolysis of the 5'-m<sup>7</sup>-guanosin-cap-structure by the catalytic subunit of the decapping complex, DCP2, the mRNA is degraded in 5'-3' direction by the exoribonuclease XRN1. DCP2 and XRN1 colocalize together with the regulatory subunit of the decapping complex DCP1a and the scaffolding protein EDC4 within membrane-less cytoplasmic *processing bodies (P-bodies)*. This strong local concentration of mRNA decapping factors has led to the hypothesis that these macromolecular structures are preferential sites of mRNA decay. An alternative hypothesis implicates P-bodies as transient sites of storage for mRNAs which have been withdrawn from translation. An overarching aim of this thesis was to explore the relevance of decapping factors for proinflammatory signaling. In the first part of this work posttranslational modifications of decapping factors and the enzymes involved were investigated. It was shown that reversible IL-1-induced phosphorylation by JNK and K63-linked ubiquitination by TRAF6 regulate decapping activity, interaction of decapping factors and P-body assembly. In the second part of the work, DCP1a, EDC4 and XRN1-deficient cell lines were established by the CRISPR/Cas9 system and used to investigate the roles of decapping factors and the dual function of P-bodies. In these models, the depletion of EDC4 resulted in reduced phosphorylation of DCP1a suggesting that EDC4 plays a new role recruiting the DCP1a kinase JNK. The knockdown of DCP1a resulted in suppression of IL-1-mediated activation of JNK and p38 MAPK and in reduced nuclear translocation of NFκB p65. Thus, DCP1a can be viewed as a new regulatory component of the IL-1 signaling pathway. Moreover, it was shown that the assembly of P-bodies is directly dependent on the concentration of the individual factors. Whereas depletion of DCP1a increases P-body numbers, knockdown of EDC4 completely impairs P-body assembly. In contrast, depletion of XRN1 increases P-body size. Microscopic colocalization studies using *proximity ligation assays* revealed that the depletion of DCP1a, EDC4, or XRN1 led to the reduction of protein:protein interactions of these factors outside of P-bodies. These changes in P-body assembly after depletion of DCP1a, EDC4 or XRN1 did

not correlate with changes in mRNA levels of the proinflammatory transcripts *IL8*, *IL6*, *CXCL3* and *NFKBIA*. Therefore, the decay of these mRNAs occurs mainly outside of P-bodies. However, all three knockdowns results in transcript-selective stabilization of the examined mRNAs. This effect was most prominent for the *NFKBIA* mRNA in cells lacking XRN1. A systematic analysis of the subcellular distribution of *IL8*, *NFKBIA* and *IL6* transcripts by single molecule RNA-FISH revealed a massive accumulation of *NFKBIA* mRNA but not *IL8* mRNA in P-bodies of XRN1 knockdown cells. This raised the question if the accumulation of *NFKBIA* transcripts within P-bodies affects the protein levels of the central regulator of NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ . Towards this end, pharmacological inhibitors of IL-1 signaling, transcription and translation were used to modulate mRNA and protein levels. In no instance a resolution of *NFKBIA* accumulation within P-bodies was observed and there was no correlation between mRNA decay rate, mRNA localization and I $\kappa$ B $\alpha$  protein level. Collectively, the results of this thesis show that within the IL-1 pathway decapping factors are regulated by posttranslational modifications but themselves also directly affect IL-1-signaling cascades. Whereas DCP1a, EDC4 and XRN1 participate in decay of IL-1-induced transcripts, the assembly of P-bodies is not needed for this effect. Under conditions of suppressed mRNA decay the dynamic redistribution of mRNAs into P-bodies facilitates maintenance of cellular protein levels by excluding cumulated transcripts from cytoplasmic translation. These data show that for proinflammatory signaling P-bodies function primarily as storage sites for mRNAs and mRNA decay factors thereby directly influencing gene expression during inflammation.

## 1. Einleitung

### 1.1. Die menschliche Immunantwort

Eine Vielzahl endogener und exogener Noxen können die Aktivierung des menschlichen Immunsystems herbeiführen. Dabei stellen DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) endogene Faktoren dar, welche im normalen Zustand keine Reaktion des Immunsystems hervorrufen, jedoch nach einem zellulären Schaden mit darauf folgender Nekrose in das extrazelluläre Milieu entlassen werden und anschließend zur Aktivierung des Immunsystems führen. Zu diesen Faktoren gehören vor allem das Chromatin-assoziierte Protein HMGB1 (*High-mobility group box 1*), Hitzeschockproteine und Bestandteile des Purinmetabolismus wie z.B. Adenosintriphosphat oder auch das Zytokin IL-1 $\alpha$  (Interleukin 1-alpha). Die Aktivierung des Immunsystems durch diese endogenen Faktoren führt anschließend zur Ausbildung einer sterilen Entzündungsreaktion, wobei die zellulären Mechanismen mit der Aktivierung des Immunsystems durch exogene Organismen hohe Ähnlichkeiten aufweisen (Chen & Nunez, 2010; Dinarello et al, 2012). Zu den exogenen Organismen zählen mehrzellige Lebewesen wie Würmer (z.B. Echinococcen oder Schistosomen), einzellige Protozoen (z.B. Trypanosomen oder Plasmodien), Pilze, Bakterien oder Viren, welche vielfältige Infektionskrankheiten auslösen können. Zur Abwehr dieser Krankheitserreger stellen die Haut, die Schleimhäute und Epithelien im Inneren des menschlichen Körpers mit ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften die erste Barriere für die Pathogene dar und verhindern einen ungehinderten Eintritt der Erreger in den Körper. Darüber hinaus sorgt das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem für die Abwehr der Krankheitserreger durch das gezielte Abtöten und die regulierte Phagozytose der Pathogene (Roitt et al, 2011).

Das angeborene Immunsystem wird nach der Erkennung von DAMPs und der Überwindung der epithelialen Barrieren der Haut, des Gastrointestinaltraktes und des Atemtraktes durch Krankheitserreger aktiviert, indem die Erkennung der endogenen Faktoren und Pathogene im Gewebe durch Makrophagen mit spezifischen Rezeptoren stattfindet. Makrophagen können neben der direkten Phagozytose auch durch eine Sezernierung von reaktiven Sauerstoffspezies, lysosomalen Enzymen, Interferonen, Zytokinen und Chemokinen ein Abtöten der Erreger bewirken. Zusätzlich führen die sezernierten Stoffe zu einer Rekrutierung von anderen Leukozyten, wie neutrophilen Zellen oder Monozyten und lymphatischen Zellen, wie den natürlichen Killerzellen. Diese Anhäufung von verschiedenen Zelltypen am Ort der Infektion führt anschließend zur Ausbildung einer lokalen Entzündung, wodurch die Erreger

möglichst effektiv abgetötet werden. Kommt es trotz dieser ersten Immunabwehr des Körpers zu einem Eindringen der Krankheitserreger in den Blutkreislauf, so wird das Komplementsystem als weitere Komponente des angeborenen Immunsystems aktiviert. Dieses aus Plasmaproteinen bestehende System bindet gezielt an die Oberflächen der Pathogene und kann zu proteolytischen Reaktionen führen, Phagozytose ermöglichen und durch die Ausschüttung von Signalmolekülen eine Entzündungsreaktion bewirken (Abbas et al, 2007; Janeway et al, 2002).

Nach der ersten Abwehr der potentiellen Krankheitserreger durch das angeborene Immunsystem kommt es zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems, wobei die Signalvermittlung vor allem durch die produzierten Zytokine und Chemokine stattfindet. Dazu nehmen zunächst dendritische Zellen Erreger durch Phagozytose auf und wandern anschließend in Lymphknoten, wo ihre Differenzierung zu antigenpräsentierenden Zellen erfolgt. Diese aktivieren anschließend B- und T-Lymphozyten, welche für die spezifische und wiederkehrende Erkennung von Antigenen bestimmter Pathogene zuständig sind. B-Lymphozyten sorgen durch die Synthese und Sekretion von spezifischen Antikörpern für die Neutralisierung der Erreger, indem diese mit den spezifischen Antikörpern umhüllt werden. Des Weiteren sorgt die Bindung der Antikörper an die Erreger für eine Erkennung dieser durch neutrophile Granulozyten, Makrophagen und das Komplementsystem und anschließend für die Phagozytose und Abtötung der Erreger. Zytotoxische T-Lymphozyten sorgen nach der Erkennung der spezifischen Antigene der Pathogene durch die Ausschüttung von Perforinen, Granzymen oder Fas-Ligand für die gezielte Apoptose der betroffenen Zellen und die Rekrutierung von Makrophagen und neutrophilen Zellen, sodass eine Abtötung der Pathogene gewährleistet wird (Janeway et al, 2002; Roitt et al, 2011).

### **1.2. Zytokine als Bestandteil des Immunsystems**

Bei diesen Prozessen der Aktivierung des angeborenen wie auch des adaptiven Immunsystems zur Bekämpfung möglicher Krankheitserreger nehmen Zytokine als extrazelluläre Signalmoleküle eine zentrale Rolle ein. Dabei haben Zytokine nicht nur spezifische Wirkungen auf die jeweiligen Zellen des Immunsystems, sondern können auch in nahezu allen Organen und Geweben des Körpers über die jeweiligen zellulären Rezeptoren spezifische Antworten auslösen. Zytokine können Prozesse wie Zellteilung, Entzündung, Zytotoxizität, Differenzierung, Migration und Reparatur beeinflussen und werden nicht nur

von den beschriebenen spezifischen Zelltypen des Immunsystems sezerniert, sondern können auch von einer Vielzahl anderer Zelltypen des Endothels oder Epithels von Geweben produziert werden, um als Signalmoleküle zwischen den einzelnen Zellen zu dienen. Anschließend können autokrine, parakrine oder endokrine Signalkaskaden durch die sezernierten Zytokine vermittelt werden, wobei auch eine erneute Produktion von Zytokinen durch die betroffene Zelle im Sinne eines *feed forward loops* stattfinden kann, wodurch es zur Verstärkung der lokalen zellulären Antwort kommt. Dabei werden verschiedene Signalkaskaden nicht nur von einzelnen Zytokinen ausgelöst, sondern die Zelle ist einer Vielzahl von verschiedenen Zytokinen ausgesetzt, welche synergistische oder antagonistische Funktionen ausüben können. Die Einteilung der Zytokine erfolgt in die Gruppen der Interleukine, Chemokine, Interferone, Tumornekrose-Faktoren und koloniestimulierenden Faktoren (Janeway et al, 2002; Kindt et al, 2007; Roitt et al, 2011; Schmitz et al, 2011).

### **1.3. IL-1-vermittelter, proinflammatorischer Signalweg**

#### **1.3.1. IL-1-abhängige Signaltransduktion**

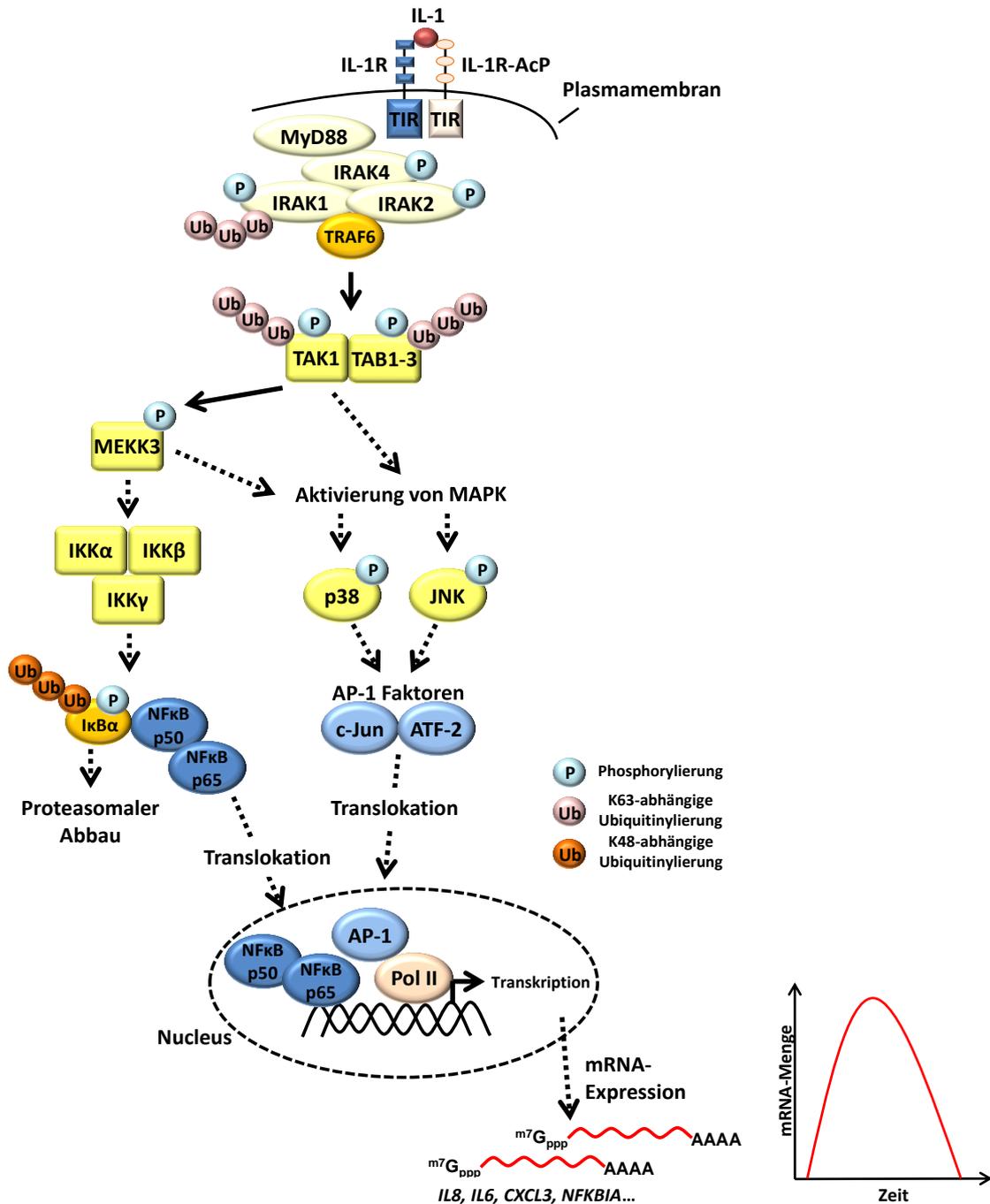
Die Interleukine-1 $\alpha/\beta$  (IL-1  $\alpha/\beta$ ) gehören neben IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$  und IL-36 $\gamma$  zur Interleukin-1-Familie und stellen zwei der wichtigsten Zytokine dar, da sie beim lokalen und systemischen, proinflammatorischen *signaling* beteiligt sind, indem sie in sehr geringen Mengen die Expression von Entzündungsmediatoren, Chemokinen und anderen Zytokinen effektiv induzieren können. Die Expression von IL-1 erfolgt in Form der zwei Varianten (IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) von zwei unabhängigen Genen, wobei Sequenzanalysen der Genstruktur von *IL1A* und *IL1B* darauf hinweisen, dass die beiden Varianten durch eine Genduplikation vor 350 Millionen Jahren hervorgegangen sein könnten (Dinarello, 1996; Garlanda et al, 2013). Obwohl nur eine Sequenzhomologie von ca. 30% zwischen diesen Varianten besteht, binden IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hochaffin und hochspezifisch aufgrund struktureller Ähnlichkeiten an denselben Rezeptor auf der Oberfläche von Zellen. Die Expression beider Proteine erfolgt zunächst als 33 kDa Polypeptidvorläufer, wobei beide Formen proteolytisch prozessiert werden, um die reifen Proteine mit einer Molekulargröße von 17 kDa zu produzieren. IL-1 $\beta$  weist dabei erst nach proteolytischer Spaltung Aktivität auf, während IL-1 $\alpha$  bereits als Polypeptidvorläufer aktiv ist (Abbas et al, 2007; Dinarello et al, 2012). Während die Expression von IL-1 $\alpha$  durch Keratinocyten der Haut, Epithelzellen von Schleimhäuten sowie Zellen der Lunge, Leber und Nieren konstitutiv stattfinden kann, erfolgt die Expression von

IL-1 $\beta$  erst nach einem proinflammatorischen Stimulus. Bei nahezu allen Entzündungsreaktionen findet sich eine erhöhte Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , wodurch diese Zytokine auch bei einer Vielzahl von autoinflammatorischen Krankheitsbildern induziert vorliegen und durch ihre übermäßige Menge entscheidend zur Pathogenese beitragen. Diese Krankheitsbilder können sich dabei in vielfältigen Symptomen manifestieren, welche u.a. Fieberschübe, allgemeine Ermüdung, Muskel- und Gelenkschmerzen, Appetitlosigkeit sowie Schlaflosigkeit umfassen können. Histologisch werden diese Krankheitsbildern oft durch destruktive und fibrotische Prozesse begleitet (Dinarello et al, 2012).

IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  binden beide an den Typ I IL-1-Rezeptor (IL-1R), welcher drei extrazelluläre, Immunoglobulin-ähnliche Domänen aufweist und von einer Vielzahl von Zellen exprimiert wird (Vigers et al, 1997). Diese Rezeptorkette kann außerdem vom IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra) gebunden werden, wodurch der Rezeptor geblockt wird und folglich keine Bindung von IL-1 mehr möglich ist und es so zu einer Inhibierung des Signalweges kommen kann (Schreuder et al, 1997). Des Weiteren ist das IL-1-Rezeptor akzessorische Protein (IL-1R-AcP) für die Signalentstehung notwendig. Dieses Protein stellt ebenfalls ein Transmembranprotein dar und bildet zusammen mit dem IL-1R und den IL-1-Agonisten einen trimeren Komplex. Zur Signalentstehung binden die IL-1-Agonisten in einer dualen Organisation gleichzeitig den IL-1R und IL-1R-AcP, wodurch es zur Signalentstehung kommt (Cullinan et al, 1998; Dinarello, 2003).

Nach der Bindung der IL-1-Liganden an den Rezeptor und der darauf folgenden Rekrutierung vom IL-1R-AcP kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors und der Interaktion der intrazellulären Toll-IL-1-Rezeptor (TIR)-Domänen des IL-1-Rezeptors und des IL-1R-AcP. (Dinarello, 2003; Wang et al, 2010). Dies führt zur Rekrutierung von IRAK4 (*IL-1 receptor associated kinase 4*) und MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) und somit zur Ausbildung eines ersten aktiven IL-1-abhängigen Proteinkomplexes. IRAK4 wird anschließend durch eine Autophosphorylierung posttranslational modifiziert und phosphoryliert wiederum selbst IRAK1 (*IL-1 receptor associated kinase 1*) und IRAK2 (*IL-1 receptor associated kinase 2*). Darauf kommt es zur Rekrutierung von TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) und der Dissoziation des Proteinkomplexes aus IRAK1/IRAK2/TRAF6 vom IL-1-Rezeptor (Brikos et al, 2007). TRAF6 stellt eine Ubiquitin E3-Ligase dar und katalysiert zusammen mit dem Ubiquitin E2-Ligase-Komplex aus UBC13 (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13*) und UEV1A (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*) die

regulatorische, Lysin 63 (K63)-abhängige Ubiquitylierung von verschiedenen Proteinen wie IRAK1, TAB2 (*TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2*), TAB3 (*TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 3*) und TAK1 (*TGF-beta-activated kinase 1*) (Kanayama et al, 2004; Liu & Chen, 2011). TAK1 induziert anschließend in einer Kaskade mit MEKK3 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3*) und dem IKK-Komplex (*Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*; bestehend aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$ ) die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  (*NF-kappa-B inhibitor alpha*) (Yamazaki et al, 2009). Anschließend kommt es zur Lysin 48 (K48)-abhängigen Ubiquitylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und der proteasomalen Degradation des Proteins. Dadurch werden die weiteren Untereinheiten des NF $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa-B*)-Komplexes (p50, p52, p65, c-Rel (*Proto-oncogene c-Rel*), RelB (*Transcription factor RelB*)) freigesetzt und können anschließend in den Zellkern translozieren, um dort als Transkriptionsfaktoren an entsprechende DNA-Sequenzen zu binden und die Expression von Zielgenen zu induzieren (Natoli et al, 2005; Zandi & Karin, 1999). Dabei weist der Komplex aus NF $\kappa$ B p50 und NF $\kappa$ B p65 die stärkste transkriptionelle Aktivität auf (Schmitz et al, 2004). Der Komplex aus TAK1 und MEKK3 kann daneben zusätzliche MAP Kinase-Kinasen aktivieren, welche in einer Phosphorylierungskaskade zunächst JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 (*MAP kinase p38*) phosphorylieren, was wiederum zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP-1-Familie (z.B. c-Jun (*Proto-oncogene c-Jun*) und ATF2 (*cAMP-dependent transcription factor*)) führt. Diese binden dann ebenfalls an entsprechende DNA-Sequenzen und induzieren so die gerichtete Expression der Zielgene. Dabei kommt es zur Expression von hunderten unterschiedlicher *messenger RNAs* (mRNAs), welche bei verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sind und unter anderem als Mediatoren des Immunsystems (z.B. *IL8*, *IL6*, *CXCL3*) oder als Komponenten des proinflammatorischen *signalings* (z.B. *NFKBIA*) agieren können (Bandman et al, 2002; Weber et al, 2010). Diese gerichtete und koordinierte Expression einer Vielzahl von unterschiedlichen Genprodukten ermöglicht die notwendige Eliminierung der Noxe, bei welcher eine rasche Amplifikation der Signale, die Migration von Immunzellen sowie die Induktion einer lokalen Entzündung und Fieber stattfinden. Gleichzeitig aber ermöglichen die exprimierten Faktoren eine Beendigung des proinflammatorischen Signalwegs, indem negative *feedback*-Mechanismen induziert werden, sodass die Immunantwort transient stattfindet (Abb.1.1).



**Abb.1.1: Schematische Darstellung des IL-1-Signalwegs.** Nach der Bindung von IL-1 erfolgt die Konformationsänderung des IL-1-Rezeptors (IL-1R) und die Assoziation mit IL-1R-AcP, wodurch der Proteinkomplex aus MyD88, IRAK 1/2/4 und TRAF6 an die intrazelluläre Toll-IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR) rekrutiert wird. Anschließend erfolgt die Aktivierung des Komplexes aus TAK1 und TAB1-3 durch Phosphorylierung und K63-abhängige Ubiquitinylierung, wonach die Phosphorylierung von MEKK3 stattfindet. MEKK3 kann darauf den IKK-Komplex aktivieren, worauf IκBα zunächst phosphoryliert und dann K48-abhängig ubiquitinyliert wird und anschließend durch das Proteasom abgebaut wird. Infolgedessen können die Untereinheiten des NFκB-Komplexes (p50 und p65) in den Zellkern translozieren. Parallel dazu kann der Komplex aus TAK1 und TAB1-3 die Aktivierung von weiteren MAPKs induzieren, wodurch es zur Phosphorylierung von p38 und JNK kommt, welche wiederum selbst die Aktivierung von Komponenten der AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie (c-Jun und ATF-2) induzieren können. Nach der Translokation in den Zellkern wirken c-Jun und ATF-2 zusammen mit NFκB p50 und NFκB p65 als Transkriptionsfaktoren und können so die zeitlich koordinierte Expression von proinflammatorisch relevanten mRNAs (z.B. *IL8*, *IL6*, *CXCL3*, *NFKBIA*) induzieren.

### 1.3.2. IL-8 und IL-6 als IL-1-induzierte proinflammatorische Mediatoren

Interleukin-8 (IL-8) stellt ein IL-1-induzierbares Chemokin da, welches vor allem die lokale Rekrutierung von Leukozyten bewirkt und von einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen wie z.B. Endothel- und Epithelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten sezerniert werden kann. Dabei erfolgt die Expression von IL-8 vom CXC-Gencluster auf Chromosom 4 als Protein mit einer Größe von 99 Aminosäuren, wobei die Sekretion nach der proteolytischen Abspaltung einer *leader* Sequenz mit einer Größe von 20 Aminosäuren erfolgt. IL-8 kann anschließend auf neutrophile Granulozyten wirken, wobei es u.a. die Chemotaxis, die Veränderung der Morphologie, die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und die Induktion von Adhäsions-Proteinen beeinflussen kann (Baggiolini, 1998; Baggiolini et al, 1994). Abgesehen von seiner Funktion im Immunsystem kann IL-8 ebenfalls bei der Entstehung von Tumoren involviert sein, wobei die Angiogenese, das Wachstum der Tumorzellen, die lokale Invasion und die Metastasierung von IL-8 abhängig sein können (Zhu et al, 2012).

Interleukin-6 (IL-6) stellt ein pro-, wie auch anti-inflammatorisches Zytokin dar, welches in unterschiedlichen Zelltypen Faktoren zur Differenzierung, Apoptose und Proliferation induzieren kann. Des Weiteren ist IL-6 auch maßgeblich bei der Regulation der Hämatopoese, der B-Zell-Differenzierung und der Akute-Phase-Reaktion in der Leber und somit der Immunantwort beteiligt. IL-6 aktiviert dazu unterschiedliche Signalwege, wobei Tyrosinkinasen der Janus-Kinase-Familie (JAK), welche wiederum zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Proteinfamilie (*Signal transducer and activator of transcription*) beitragen können, oder auch MAP-Kinasen involviert sein können. Die Expression von IL-6 erfolgt wie im Fall von IL-8 in Form eines Vorläuferpeptids mit einer Größe von 212 Aminosäuren, wobei nach proteolytischer Spaltung das reife Protein mit einer Größe von 184 Aminosäuren entsteht. Im basalen Zustand besteht dabei nahezu keine Expression IL-6, wobei diese durch eine Stimulation mit IL-1 stark induziert werden kann (Heinrich et al, 2003; Hirano et al, 1990; Hirano et al, 1986; Jones, 2005).

### 1.3.3. Termination des IL-1 signalings

Bei der Termination des IL-1-induzierten, proinflammatorischen Signalwegs spielen unter anderem verschiedene negative *feedback*-Mechanismen eine Rolle. So führt die p38-vermittelte Phosphorylierung von TAB1 (*TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding*

*protein 1*) nach der Aktivierung des IL-1-Signalwegs zur Inaktivierung von TAK1. Ebenso ist eine Termination durch die IL-1-induzierte Expression von MKP1 (*MAP kinase phosphatase1*) und der darauf folgenden Dephosphorylierung der MAP Kinasen möglich. Die bereits erwähnte Induktion der Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  führt zur erneuten Ausbildung des NF $\kappa$ B-Komplexes und somit zur Inaktivierung von NF $\kappa$ B p65 als Transkriptionsfaktor, indem dieser im zytoplasmatischen Komplex gebunden wird und nicht mehr in den Zellkern translozieren kann. Des Weiteren können als zusätzliche Mechanismen der Termination trunkierte Isoformen von MyD88 oder IRAK1 als endogene, dominant-negative Inhibitoren des IL-1-Signalwegs agieren. Diese Mechanismen auf Proteinebene werden durch Veränderungen des RNA-Metabolismus auf verschiedene Arten unterstützt, sodass eine rasche Abschaltung des *signalings* durch die Regulation auf mehreren Ebenen erreicht werden kann (Burns et al, 2003; Sun et al, 1993; Toh et al, 2004; Weber et al, 2010).

Diese Auswirkungen auf den RNA-Metabolismus lassen sich gut am Beispiel des Chemokins IL-8 (*Interleukin-8*) verdeutlichen. Im basalen, unstimulierten Zustand besteht eine sehr geringe oder eine komplett aufgehobene Expression von IL-8. Nach einem proinflammatorischen Stimulus erfolgt eine rasche und starke Induktion der mRNA-Expression des Chemokins, welche in vielen Zelltypen das Maximum bei einer bis zu drei Stunden erreicht und nach diesem ebenfalls rasch sinkt und das Ausgangsniveau erreicht (Kasahara et al, 1991; Mukaida et al, 1994). Diese Dynamik der Induktion wird durch eine starke NF $\kappa$ B p65 und AP-1-vermittelte Transkription erreicht. Zusätzlich dazu erfolgt eine IL-1-induzierte und p38 MAPK-vermittelte Stabilisierung der *IL8*-mRNA, wobei adeninreiche (ARE) Regionen der mRNA regulativ wirken können (Holtmann et al, 2001; Holtmann et al, 1999).

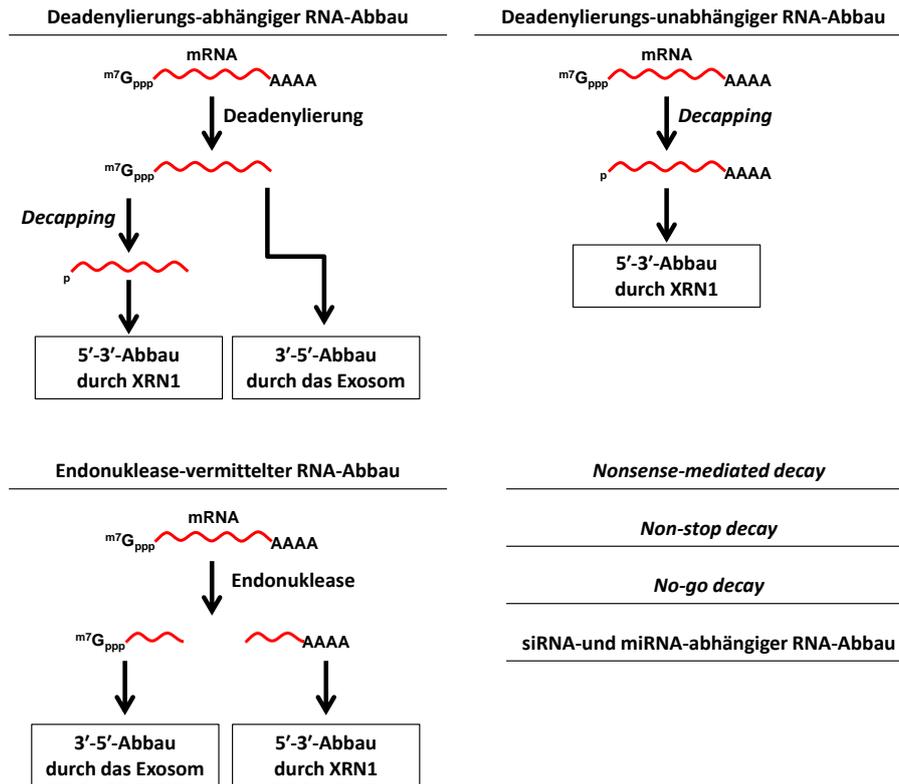
### **1.4. Möglichkeiten des mRNA-Abbaus**

Auf RNA-Ebene können die erwähnten Adenin-reichen Regionen (AREs) in den 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) von vielen inflammatorisch relevanten mRNAs eine regulatorische Rolle beim Abbau und der Stabilisierung dieser RNAs spielen. Diese Sequenzabschnitte bestehen oft aus mehrfachen Wiederholungen der konservierten Sequenz 5'-UUAUUUUAU-3' über eine Länge von 50-150 Nukleotiden und finden sich bei einer Vielzahl verschiedener mRNAs. Durch die Bindung von RNA-bindenden Proteinen an diese Sequenzen und der anschließenden Ausbildung von Komplexen aus mRNA und Proteinen

(mRNPs) ist eine Regulation des RNA-Abbaus möglich. Neben BRF-1 (*Butyrate response factor 1*) und KSRP (*KH type-splicing regulatory protein*) stellt TTP (*Tristetraprolin*) in diesem Zusammenhang ein vielfach beschriebenes Protein dar (Chen et al, 2001; Chou et al, 2006; Mukherjee et al, 2002; Stoecklin et al, 2006). Durch die Bindung an eine Reihe von Zytokin-mRNAs, wie z.B. *IL8* oder *IL6*, ist TTP in der Lage die Degradation der mRNAs einzuleiten und so eine Feinregulation der Genexpression nach der proinflammatorischen Induktion zu erreichen. Die Bindung von TTP oder auch von anderen ARE-bindenden Proteinen kann anschließend zur Rekrutierung von Proteinkomponenten des RNA-Abbaus führen und so den Abbau der mRNAs einleiten (Brooks & Blackshear, 2013; Chou et al, 2006; Lykke-Andersen & Wagner, 2005; Stumpo et al, 2010; Tiedje et al, 2016).

Generell werden beim Abbau von RNA die zwei Möglichkeiten des 3'-5'- und des 5'-3'-Abbaus unterschieden, wobei zelluläre Mechanismen und Prozesse wie Deadenylierung, *Decapping*, das Exosom, endonukleolytische Spaltung und RNA-Interferenz beteiligt sind und teilweise im Zusammenspiel den Abbau der RNA einleiten können. Daneben kann der RNA-Abbau durch *Nonsense-mediated decay*, *Non-stop decay* und *No-go decay* stattfinden, auf welche im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird (Abb.1.2). Die am besten untersuchten Mechanismen stellen dabei das deadenylierungsabhängige *Decapping* sowie der exosomale Abbau von RNA dar (Garneau et al, 2007; Houseley & Tollervey, 2009; Schoenberg & Maquat, 2012). Dabei ist zu beachten, dass das *Decapping* als initialer Schritt zum RNA-Abbau auch deadenylierungsunabhängig stattfinden kann (Badis et al, 2004; Wang et al, 2002).

Die Deadenylierung von mRNA stellt einen zentralen Mechanismus zur Induktion des mRNA-Abbaus durch das *Decapping* oder auch das Exosom dar. Dabei können PAN2-PAN3 (*PAB-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit PAN2-3*), der CCR4-NOT-Komplex (bestehend aus 9 verschiedenen Proteinen) und PARN (*Poly(A)-specific ribonuclease PARN*) zusammen die Verkürzung des protektiven 3'-Poly(A)-Überhangs der mRNA herbeiführen. Die Verkürzung des 3'-Poly(A)-Überhangs erfolgt in einem biphasischen Prozess, bei welchem zunächst PAN2-PAN3 den 3'-Poly(A)-Überhang von ca. 200 Nukleotiden auf ca. 80 verkürzt und anschließend der CCR4-NOT-Komplex den verbleibenden Überhang abbaut (Yamashita et al, 2005). Die Deadenylase PARN kann ebenfalls die Verkürzung des 3'-Poly(A)-Überhangs katalysieren, wobei die Interaktion mit der 5'-*Cap*-Struktur und der daran gebundenen Proteine die Aktivität von PARN bestimmen können.



**Abb.1.2: Schematische Darstellung möglicher RNA-Abbaumechanismen.** Das deadenylierungsabhängige *Decapping* mit anschließendem exoribonukleolytischen Abbau der RNA durch XRN1 und der exosomale Abbau der RNA nach der Deadenylierung stellen die am besten untersuchten Möglichkeiten zum RNA-Abbau dar. Daneben können sowohl XRN1, als auch das Exosom beim endonukleolytischen RNA-Abbau beteiligt sein. Des Weiteren kann das *Decapping* als einleitender Schritt zum RNA-Abbau auch unabhängig von der Deadenylierung stattfinden. Zusätzlich können die Faktoren des 5'-3'- und 3'-5'-RNA-Abbaus beim *Non-stop decay*, *No-go decay* und beim siRNA- und miRNA-abhängigen RNA-Abbau involviert sein.

So kann die Deadenylierung durch das Entfernen der 5'-*Cap*-Struktur, die Blockade der 5'-*Cap*-Struktur sowie durch die Bindung des Translationsinitiationsfaktors eIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*) an der 5'-*Cap*-Struktur inhibiert werden (Gao et al, 2000). Nach der erfolgten Deadenylierung der mRNA ist ein fortschreitender 3'-5'-Abbau durch das Exosom möglich. Gleichzeitig aber kann auch ein 5'-3'-Abbau der mRNA erfolgen.

Der Abbau der mRNA in 5'-3'-Orientierung ist jedoch aufgrund der protektiven 5'-*Cap*-Struktur nicht ohne weitere enzymatische Reaktion möglich. Die 5'-*Cap*-Struktur besteht aus einem terminalen N7-Methyl-Guanosin, welches über eine 5'-5'-Triphosphat-Gruppe mit dem vorletzten Nukleotid der mRNA verbunden ist (Shatkin, 1976). Die Synthese dieser 5'-*Cap*-Struktur erfolgt kotranskriptionell im Zellkern, sobald die naszente RNA eine Länge von 22-

25 Nukleotiden erreicht hat. Dazu wird zunächst die 5'- $\gamma$ -Phosphatgruppe der prä-mRNA durch eine RNA-Triphosphatase entfernt und anschließend ein Guanosin-Monophosphat-Nukleotid durch eine Guanylyltransferase an das freie 5'-Diphosphat-Ende der mRNA hinzugefügt. In einem dritten Schritt erfolgt dann die Methylierung der 5'-Cap-Struktur durch eine RNA-Methyltransferase. Die 5'-Cap-Struktur wird direkt im Anschluss an diese Reaktion durch den NCB-Komplex (CBP80/20 (*Nuclear cap-binding protein subunit 1/2*)) gebunden, welcher für die Regulation des nukleären Exports sowie des *splicings* der prä-mRNA verantwortlich ist. Im Zytoplasma kann die 5'-Cap-Struktur anschließend durch den Translationsinitiationsfaktor eIF4E gebunden werden, wodurch ribosomale Untereinheiten sowie andere, vor allem regulatorische Kofaktoren rekrutiert werden und letztendlich die Translation der mRNA eingeleitet wird (Ramanathan et al, 2016; Shuman, 1995; Topisirovic et al, 2011). Der Translationsinitiationsfaktor eIF4E steht dabei zusätzlich in Interaktion mit dem PABP (*Polyadenylate-binding protein 1*), sodass eine indirekte Interaktion der 5'-Cap-Struktur mit dem 3'-Poly(A)-Überhang der mRNA ermöglicht wird und die native mRNA zirkulär vorliegt (Franks & Lykke-Andersen, 2008). Der erwähnte NCB-Komplex und eIF4E verhindern die Bindung der 5'-Cap-Struktur durch den *Decapping*-Komplex, welcher durch seine Aktivität in der Lage ist, den Abbau der mRNA in 5'-3'-Orientierung einzuleiten. Somit stehen vor allem die Translation und das *Decapping* in direkter Konkurrenz zueinander, sodass die *Decapping*-Reaktion als initiales Ereignis für den RNA-Abbau nur stattfinden kann, wenn der Translationsinitiationsfaktor eIF4E nicht an die 5'-Cap-Struktur gebunden ist (Franks & Lykke-Andersen, 2008; Schwartz & Parker, 2000).

### **1.5. Der *Decapping*-Komplex und der 5'-3'-Abbau von mRNA**

Bei der *Decapping*-Reaktion kommt es zur Spaltung der 5'-Cap-Struktur, wonach ein  $m^7$ -GDP sowie die 5'-Monophosphat-mRNA als Spaltungsprodukte entstehen. Die Katalyse dieser Reaktion erfolgt durch den *Decapping*-Komplex und speziell durch die katalytische Untereinheit DCP2 (*mRNA-decapping enzyme subunit 2*). Die entstehende 5'-Monophosphat-Gruppe der mRNA kann anschließend durch die 5'-3'-Exoribonuklease XRN1 erkannt und gebunden werden, wodurch der Abbau der mRNA in dieser Orientierung eingeleitet wird (Steiger et al, 2003; van Dijk et al, 2002).

### 1.5.1. Die katalytische Untereinheit des *Decapping*-Komplexes: DCP2

DCP2 stellt eine hoch konservierte Hydrolase der NUDIX-Familie (*Nucleoside diphosphate linked to X*) dar, welche sich durch das konservierte Motiv GX<sub>3</sub>EX<sub>7</sub>REUXEEXGU auszeichnen. DCP2 kann durch die Erkennung der 5'-Cap-Struktur und der gleichzeitigen Bindung an die mRNA die *Decapping*-Reaktion durchführen, wobei eine minimale Länge der mRNA von 25-60 Nukleotiden gegeben sein muss. Die Bindung der RNA erfolgt dabei in der 5'-untranslatierten Region der mRNA. Für die Hydrolyse der 5'-Cap-Struktur sind innerhalb des NUDIX-Motivs drei Glutamat-Aminosäurereste essentiell, welche die Bindung von zweiwertigen Metallionen (Mn<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup>) koordinieren (Li & Kiledjian, 2010; Li et al, 2008; Piccirillo et al, 2003; Wang et al, 2002). Die Hydrolyse der 5'-Cap-Struktur erfolgt dabei durch nukleophile Substitution an der Phosphatgruppe der 5'-Cap-Struktur (Aglietti et al, 2013; Mildvan et al, 2005). Zwei weitere distinkte Motive von DCP2 ermöglichen die Bindung der RNA (Box B-Motiv) und die Interaktion mit der regulatorischen Untereinheit (Box A-Motiv) des *Decapping*-Komplexes DCP1a (*mRNA-decapping enzyme 1A*). Diese Motive flankieren das NUDIX-Motiv und befinden sich in der evolutionär hoch konservierten N-terminalen Region von DCP2 (Abb.1.4). Der C-Terminus von DCP2 hingegen ist variabel und im Menschen im Vergleich zu Hefen stark verkürzt (Arribas-Layton et al, 2013; Li & Kiledjian, 2010; Valkov et al, 2017).

### 1.5.2. Die regulatorische Untereinheit des *Decapping*-Komplexes: DCP1a

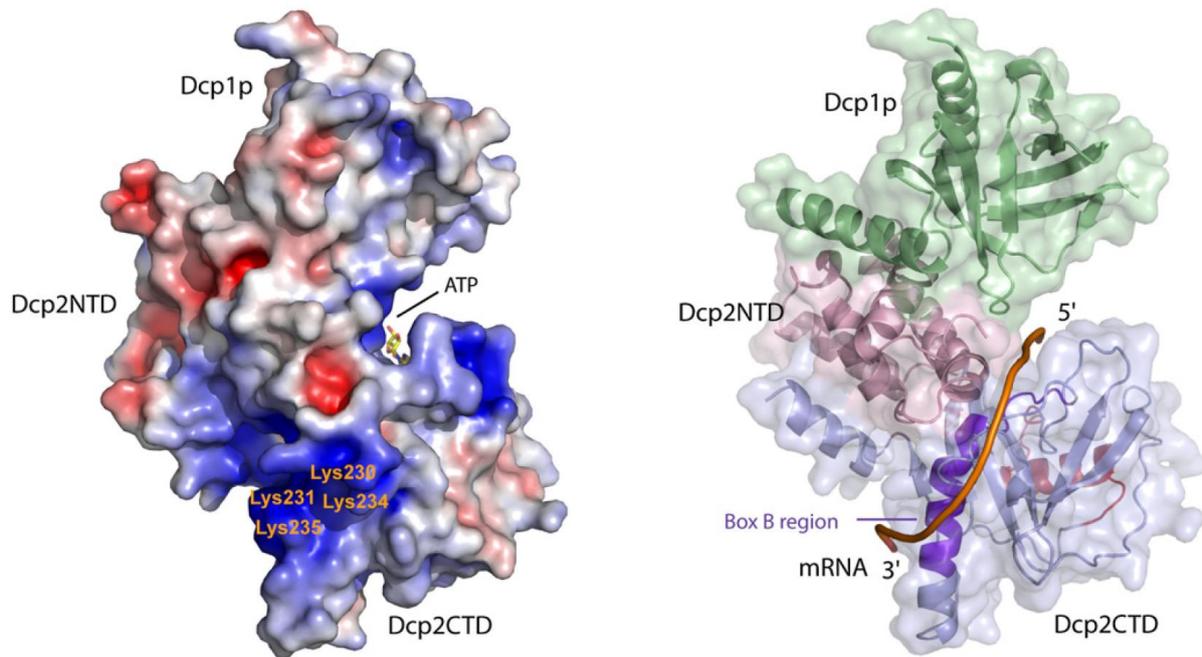
DCP1a stellt eine der beiden homologen Varianten von DCP1 dar. Neben DCP1a existiert eine weitere Form DCP1b, wobei beide Proteine von zwei unterschiedlichen Genen exprimiert werden. Die Homologie beider Formen von DCP1 beträgt 31%, wobei die N-terminalen Bereiche eine stärkere Homologie von 68% aufweisen. Dieser N-Terminus ist ebenfalls in Hefen stark konserviert, wobei höhere Eukaryoten einen zusätzlichen prolinreichen C-Terminus aufweisen. Unterschiede in den Funktionen der beiden Proteine DCP1a und DCP1b konnten bisher nicht beobachtet werden, wobei sich die Forschungsinhalte zum größten Teil auf DCP1a beschränken (Aizer et al, 2008; Lykke-Andersen, 2002). Dieses bildet durch seine direkte Interaktion mit DCP2 den minimalen *Decapping*-Komplex und ist für die *Decapping*-Aktivität von DCP2 in Hefen und im Menschen erforderlich (She et al, 2004). Dabei steht die konservierte EVH1-Domäne im Mittelpunkt der Regulation der *Decapping*-Aktivität. Diese N-terminale Domäne ist durch die

Exposition von drei aromatischen Aminosäuren auf der Oberfläche des Proteins charakterisiert, welche eine besonders gute Interaktion mit prolinreichen Proteinsequenzen ermöglichen (Abb.1.4). Über diese Domäne ist eine Interaktion von DCP1a mit den Hefe-Proteinen Edc1p und Edc2p möglich, wobei diese Interaktion die Aktivität des *Decapping*-Komplexes direkt reguliert (Borja et al, 2011). Darüber hinaus wird die Interaktion mit der Exoribonuklease XRN1 über die EVH1-Domäne ermöglicht (Braun et al, 2012), welche zusätzlich mit PNRC2 (*Proline-rich nuclear receptor coactivator 2*) interagieren kann. Dieses agiert neben der Adapterfunktion im *nonsense mediated decay* ebenfalls als Kofaktor für das *Decapping* (Lai et al, 2012). Bei der Interaktion von DCP1a mit DCP2 erfolgt die Bindung der zwei Proteine jedoch nicht über diese EVH1-Domäne. Stattdessen ist diese Domäne weiterhin exponiert, sodass die Möglichkeit weiterer Proteinbindungen gegeben ist (She et al, 2008). In diesem Zusammenhang stellt EDC4 (*Enhancer of mRNA-decapping protein 4*) einen weiteren Faktor dar, welcher durch seine Interaktionen mit DCP1a und DCP2 für die *Decapping*-Reaktion notwendig ist. Es wurden jedoch bislang keine homologen Formen von EDC4 in Hefen identifiziert, was auf eine exklusive Rolle von EDC4 in höheren Eukaryoten hindeutet (Chang et al, 2014; Fenger-Gron et al, 2005). Eine weitere Besonderheit der Struktur von DCP1a stellt das variable C-terminale Ende dar, welches sich durch eine spezifische Anordnung von drei antiparallelen  $\alpha$ -Helices (TD) auszeichnet und in Hefen nicht vorhanden ist. Über diese Domäne ist eine Trimerisierung von DCP1a und somit die Ausbildung von asymmetrischen DCP1a-Komplexen möglich. Die Trimerisierung von DCP1a wiederum ist eine Voraussetzung für die Aktivität des *Decapping*-Komplexes, da nur in Abhängigkeit der Trimerisierung von DCP1a eine Ausbildung von Proteinkomplexen von DCP1a mit DCP2 oder auch anderen Faktoren wie EDC4 möglich ist. Im Gegenteil dazu können andere Proteine wie EDC3 oder DDX6 (*DEAD-box helicase 6*) unabhängig von der DCP1a-Trimerisierung mit DCP1a interagieren. Daneben zeigt der allgemein variable C-Terminus von DCP1a eine hoch konservierte Proteinsequenz mit einer Länge von 14 Aminosäuren (MI-Motiv), welche sich ebenfalls nur bei höheren Eukaryoten findet (Tritschler et al, 2009). Der variable C-Terminus von DCP1a ist somit in höheren Eukaryoten für die Regulation der *Decapping*-Aktivität essentiell, indem die Möglichkeit der Ausbildung von Proteinkomplexen gewährleistet wird. Hingegen ist in Hefen aufgrund des stark verkürzten C-Terminus von DCP1a davon auszugehen, dass die Regulation der *Decapping*-Aktivität (Beelman et al, 1996) durch DCP1a mechanistisch weniger komplex ist, wobei die konservierte EVH1-Domäne dazu ausreichend ist (Abb.1.4).

Neben den Funktionen bei der Regulation der *Decapping*-Reaktion konnte für DCP1a gezeigt werden, dass es als Aktivator des TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) -Signalweges agieren kann. Dabei bildet DCP1a zusammen mit SMAD4 (*Mothers against decapentaplegic homolog 4*) einen Proteinkomplex, welcher als Einheit in Abhängigkeit von TGF- $\beta$  vom Zytosol in den Nukleus transloziert. Mittels Reporterassays konnte zusätzlich gezeigt werden, dass DCP1a transkriptionelle Aktivitäten induzieren kann. Diese Aktivierung wird durch die Ausbildung eines Proteinkomplexes aus SMAD4, CBP (*CREB-binding protein*)/p300 und DCP1a vermittelt, wobei DCP1a als stimulierender Faktor agiert. Ein distinkter Bereich von DCP1a (Aminosäuren 124-390) konnte dabei als Transaktivierungsdomäne identifiziert werden, wobei diese für die transkriptionelle Aktivität von SMAD4 essentiell ist (Bai et al, 2002; Callebaut, 2002). Eine zusätzliche nukleäre Funktion von DCP1a konnte beim kotranskriptionellen *Decapping* gezeigt werden. Dabei kann DCP1a u.a. im Komplex mit TTF2 (*Transcription termination factor 2*) und der nukleären Exoribonuklease XRN2 auftreten, wobei eine spezifische Bindung von DCP1a im Bereich des Transkriptionsstarts ( $\pm 500$  Basenpaaren) detektiert werden kann. So kann DCP1a nach dem Pausieren der Pol II im Promotor-proximalen Bereich und der Aktivierung des *Decappings* die naszente RNA für XRN2 exponieren, wodurch es zum Abbau der RNA und damit zur Termination der aberranten Transkription kommen kann. Somit kann durch diese vorzeitige Termination der Transkription eine weitere Ebene der Genregulation geschaffen werden, wodurch DCP1a neben den zytoplasmatischen Funktionen ebenfalls als transkriptioneller Regulator agieren kann (Brannan et al, 2012).

### **1.5.3. Weitere Regulationsmöglichkeiten der *Decapping*-Reaktion**

Die Regulation der *Decapping*-Aktivität kann wie beschrieben in Abhängigkeit von DCP1a erfolgen. Daneben können aber auch andere Faktoren wie die *enhancer of decapping* die Aktivität direkt beeinflussen. In Hefen konnten Edc1p, Edc2p und Edc3p als entsprechende Faktoren identifiziert werden, welche durch ihre Bindung an die RNA das *Decapping* stimulieren können (Decker et al, 2007; He & Jacobson, 2015; Schwartz et al, 2003). In höheren Eukaryoten konnten EDC3 (*Enhancer of mRNA-decapping protein 3*) und EDC4 (auch Hedls genannt) als regulatorische Faktoren des *Decappings* identifiziert werden.



**Abb.1.3: Aktive Proteinkonformation von Dcp2 in Hefen.** Gezeigt ist eine schematische Darstellung einer Kristallstruktur des Dcp1a-Dcp2-Komplexes in seiner geschlossenen, aktiven Konformation sowie die putative Bindung einer mRNA. NTD: N-terminale Domäne von Dcp2, CTD: C-terminale Domäne von Dcp2. Die Darstellung erfolgte verändert nach She et al, 2008 (Lizenznummer: 4165920128228).

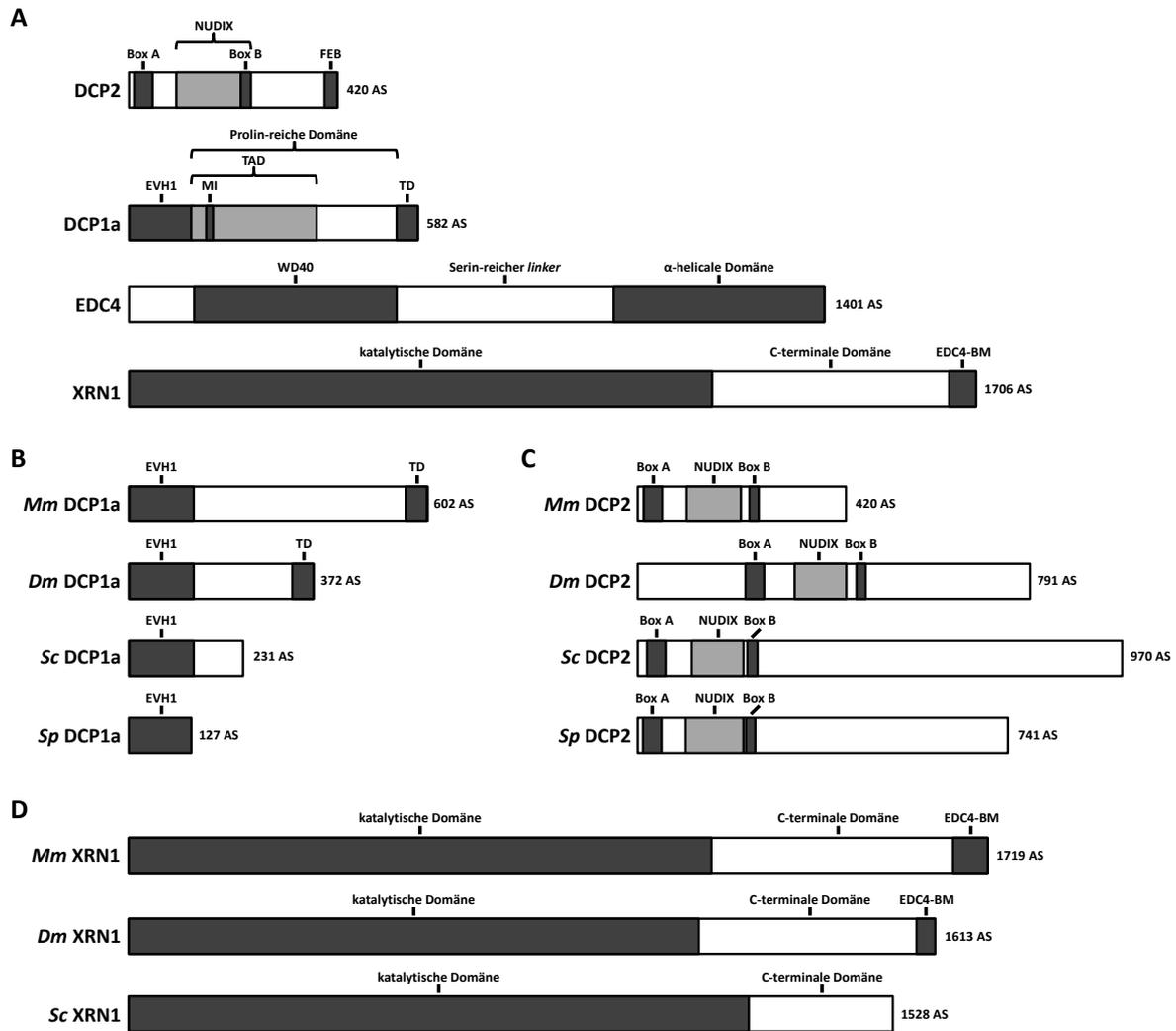
Darüber hinaus können Pat1 (*Protein associated with topoisomerase II*), Dhh1 (*ATP-dependent RNA helicase DHH1*), PNRC2 und der Lsm1-7-Komplex, welcher präferenziell an deadenylierte mRNA bindet, durch ihre Interaktionen mit dem *Decapping*-Komplex und vor allem DCP1a die *Decapping*-Aktivität regulieren (Arribas-Layton et al, 2013; Coller & Parker, 2005; Harigaya et al, 2010; Tharun & Parker, 2001). Diese Reihe unterschiedlicher Kofaktoren bewirkt direkt oder indirekt durch deren Bindung an den *Decapping*-Komplex eine Änderung der Proteinkonformation von DCP2 (Abb.1.3). Dabei kommt es zum Umklappen der zwei Hälften von DCP2 und somit zur Aktivierung des Proteins in seiner geschlossenen Konformation (She et al, 2008). Ohne die Bindung der jeweiligen Kofaktoren wechselt die Konformation von DCP2 zwischen der geschlossenen und der offenen, wobei erst durch die Bindung der jeweiligen Kofaktoren ein Verbleib der Konformation in der aktiven Form erreicht werden kann (Floor et al, 2012; Mugridge et al, 2016; Valkov et al, 2016; Wurm et al, 2017). Die Evidenz für diese Beobachtungen stammen jedoch größtenteils aus *in vitro Decapping*-Assays und Strukturanalysen von Hefeproteinen, sodass die natürliche Funktion der einzelnen Faktoren in einer Zelle weitestgehend unbekannt sind.

#### **1.5.4. Die Plattform der *Decapping*-Faktoren: EDC4**

EDC4 stellt das zentrale *scaffold*-Protein in höheren Eukaryoten dar, welches für die korrekte *Decapping*-Aktivität des Komplexes nötig ist und Bindestellen für DCP1a und DCP2 bietet. Das Protein lässt sich insgesamt in verschiedene Bereiche unterteilen, wobei sich im N-Terminus eine WD40-Domäne und im C-Terminus die  $\alpha$ -helikale Domäne befinden, welche durch einen serinreichen *linker* miteinander verbunden sind (Abb.1.4). EDC4 unterstützt die Interaktion der EVH1-Domäne von DCP1a mit der N-terminalen Region von DCP2. Diese Interaktion besitzt nur eine geringe Affinität, wird jedoch durch die Bindung von DCP1a und DCP2 an dasselbe EDC4-Molekül stark erhöht. Dabei bindet DCP2 mit seiner FEB-Domäne, welche sich im C-terminalen Bereich von DCP2 befindet und eine Anhäufung von Phenylalanin-Aminosäureresten aufweist, an die C-terminale,  $\alpha$ -helikale Domäne von EDC4. Des Weiteren bindet XRN1 an die C-terminale  $\alpha$ -helikale Domäne von EDC4. Jedoch erfolgt die Bindung von DCP2 und XRN1 nicht gleichzeitig und kompetitiv sondern in Koordination miteinander. Zusätzlich ist eine Interaktion von DCP2 und XRN1 in der Abwesenheit von EDC4 nicht möglich. Die Bindung von DCP1a und EDC4 erfolgt unabhängig von der Bindung von DCP2 und XRN1 über die WD40-Domäne von EDC4. Auf diese Weise bildet EDC4 eine Plattform für drei wichtige Proteine, welche am 5'-3'-Abbau der RNA beteiligt sind (Braun et al, 2012; Chang et al, 2014; Fenger-Gron et al, 2005; Jinek et al, 2008; Yu et al, 2005).

#### **1.5.5. Der abschließende Faktor des 5'-3'-mRNA-Abbaus: XRN1**

XRN1 stellt den abschließenden Faktor beim Abbau der RNA in der 5'-3'-Orientierung dar. Dabei handelt es sich um eine Exoribonuklease, welche für die Degradation der RNA nach der Entfernung der 5'-*Cap*-Struktur durch den *Decapping*-Komplex verantwortlich ist. Die Proteinsequenz von XRN1 ist evolutionär hoch konserviert, wobei die Homologie im aktiven Zentrum des Proteins am höchsten ist. Dieses zeichnet sich durch eine kleine Öffnung aus, wodurch die Bindung von doppelsträngiger RNA vermieden und die Auflösung von sekundären RNA-Strukturen ermöglicht wird. Die Bindung der RNA im aktiven Zentrum erfolgt durch basische Aminosäuren. Zusätzlich sorgt eine Gruppe von sauren Aminosäuren für die Koordinierung von zwei  $Mg^{2+}$ -Ionen, welche für die Katalyse des exoribonukleolytischen Abbaus der RNA notwendig sind (Abb.1.4; (Nagarajan et al, 2013)).



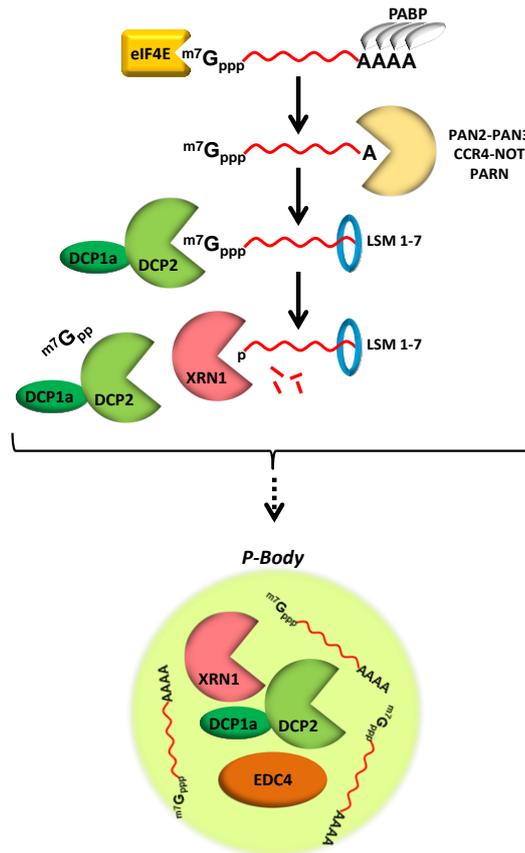
**Abb.1.4: Schematische, maßstabsgetreue Darstellung von zentralen Proteinen des 5'-3'-RNA-Abbaus.** Gezeigt sind die Proteindomänen der katalytischen (DCP2) und der regulatorischen (DCP1a) Untereinheiten des *Decapping*-Komplexes, des *scaffold*-Proteins EDC4 und der 5'-3'-Exoribonuklease XRN1 im humanen System (A), sowie der speziesübergreifende Vergleich der EVH1-Proteindomäne von DCP1a (B) und der Proteindomänen von DCP2 (C) und XRN1 (D). Die Proteingrößen sind in Aminosäuren (AS) angegeben. TD: Trimerisierungsdomäne, TAD: Transaktivatordomäne, EDC4-BM: EDC4-Bindemotiv, FEB: Phenylalaninreiche EDC4-Bindedomäne, NUDIX : *Nucleoside diphosphate linked to X*. *Mm*: *Mus musculus*, Hausmaus; *Rn*: *Rattus norvegicus*, Wanderratte; *Dm*: *Drosophila melanogaster*, Schwarzbäuchige Taufliege; *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*, Backhefe und *Sp*: *Schizosaccharomyces pombe*, Spaltheefe. Die Zusammenstellung erfolgte nach Bai et al, 2002; Braun et al, 2012; Chang et al, 2011; Chang et al, 2014; Li & Kiledijan, 2010; Miki & Grosshans, 2013; Piccirillo et al, 2003; Tritschler et al, 2009 und Xiang et al, 2009).

XRN1 ist dabei in der Lage durch kurze, prolinreiche Proteindomänen im C-Terminus mit der EVH1-Domäne von DCP1a zu interagieren. Daneben erfolgt die Interaktion mit EDC4 über das C-terminale EDC4-Bindemotiv (EDC4-BM) von XRN1 (Abb.1.4; (Chang et al, 2014; Chang et al, 2011; Miki & Grosshans, 2013; Xiang et al, 2009)).

## 1.6. *Processing bodies (P-Bodies)*

Viele der genannten Proteinkomponenten der *Decapping*-Reaktion und des 5'-3'-mRNA-Abbaus kolokalisieren in zellulären, zytoplasmatischen Strukturen, welche als *processing bodies (P-Bodies)* bezeichnet werden (Bashkirov et al, 1997; Eystathioy et al, 2002; Ingelfinger et al, 2002; Parker & Song, 2004; Stoecklin et al, 2006; Yu et al, 2005). Des Weiteren können Komponenten zur Deadenylierung von RNA (CCR4/NOT-Komplex), Komponenten des miRNA-abhängigen RNA-Abbaus (z.B. Argonaut-Proteine des RISC-Komplexes), Komponenten des *nonsense mediated decay* (UPF1, UPF2, UPF3, SMG5, SMG6, SMG7), sowie Komponenten der Translation wie der Translationsinitiationsfaktor eIF4E in den *P-Bodies* lokalisieren (Andrei et al, 2005; Durand et al, 2007; Jonas & Izaurralde, 2015; Liu et al, 2005b; Nishihara et al, 2013; Parker & Sheth, 2007; Rehwinkel et al, 2005; Sen & Blau, 2005; Sheth & Parker, 2006; Unterholzner & Izaurralde, 2004; Zheng et al, 2008). Dabei wurde XRN1 als erstes Protein identifiziert, welches in den *P-Bodies* lokalisiert (Bashkirov et al, 1997). Später folgten dann die weiteren Proteine des *Decappings* sowie des 5'-3'-Abbaus der mRNA (Abb.1.5; (Cougot et al, 2004; Sheth & Parker, 2003)).

*P-Bodies* weisen einen Durchmesser von 100-300 nm auf, besitzen aber nicht wie klassische Organellen eine Lipid-Doppelmembran. Sie ähneln jedoch in ihrer Organisation zellulären Organellen mit einer eigenen Dynamik des Aufbaus und des Abbaus. Dabei verteilen sich *P-Bodies* auf die ganze Zelle, wobei eine Tendenz der Nähe der Lokalisierung zu Ribosomen oder Mitochondrien bestehen kann. Weiter ist die Organisation der Proteinkomponenten strukturiert, sodass unterschiedliche Proteine eine Lokalisation im Zentrum oder in der Peripherie des *P-Body* aufweisen können (Cougot et al, 2012; Eulalio et al, 2007; Seto et al, 2015). Es besteht ein dynamisches Verhalten der einzelnen Proteinkomponenten, wobei diese die *P-Bodies* verlassen können oder umgekehrt in die *P-Bodies* rekrutiert werden (Andrei et al, 2005). DCP1a gehört zu jenen Proteinen, welche einen raschen Austausch zwischen den *P-Bodies* und dem übrigen Zytoplasma aufweisen. So konnte in Experimenten mit *Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)* eine Wiederherstellung der Fluoreszenzintensität eines *P-Bodies* in Abhängigkeit von GFP-DCP1a zu 86% nach 6 Sekunden beobachtet werden. Im Gegenteil dazu konnte diese Beobachtung des Proteinaustauschs zwischen *P-Body* und Zytoplasma nicht für DCP2 gemacht werden. Dies deutet darauf hin, dass unterschiedliche Proteinkomponenten der *P-Bodies* unterschiedliche Dynamiken der Bewegung aufweisen können (Aizer et al, 2008).



**Abb.1.5: Schematische Darstellung des mRNA-Abbaus durch deadenylierungsabhängiges *Decapping*.** Die zytoplasmatische RNA ist im Ausgangszustand mit dem 5'-Cap-bindenden Translationsinitiationsfaktor eIF4E und dem 3'-Poly(A)-bindenden Protein PABP assoziiert. Anschließend kommt es zur Initiation der Deadenylierung durch PAN2-PAN3, den CCR4-NOT-Komplex oder PARN. Der verkürzte 3'-Poly(A)-Überhang wird dann durch akessorische Faktoren wie dem LSM 1-7-Komplex gebunden. Dies führt zur Rekrutierung des *Decapping*-Komplexes aus DCP1a und DCP2 an die 5'-Cap-Struktur der mRNA, wodurch das *Decapping* der mRNA katalysiert wird. Daraufhin kann XRN1 durch seine Exoribonuklease-Aktivität die Degradierung der RNA in 5'-3'-Orientierung durchführen. Viele der genannten Faktoren kolokalisieren in zytoplasmatischen Strukturen welche *processing bodies (P-Bodies)* genannt werden.

Die Bewegung der *P-Bodies* als Ganzes kann entlang des zytoplasmatischen Mikrotubuli-Netzwerks erfolgen. So konnte gezeigt werden, dass *P-Bodies* teilweise fest an Mikrotubuli verankert sind und sich entlang diesen innerhalb der Zelle bewegen können. Die Interaktion der *P-Bodies* mit den Mikrotubuli kann dabei durch Proteine der Nespine-Familie erfolgen, welche ebenfalls in *P-Bodies* lokalisieren. Die Bewegungsgeschwindigkeit ist dabei mit anderen zellulären Strukturen und Organellen wie sekretorischen Vesikeln oder Mitochondrien vergleichbar und liegt somit um ein Vielfaches (Faktor 100) niedriger als die anderer zytoplasmatischer mRNP-Strukturen (Aizer et al, 2008; Burke et al, 1997; Fusco et al,

2003; Rajgor et al, 2014; Salmeen et al, 1985). Gleichzeitig besteht eine Abhängigkeit der *P-Body*-Formation vom Mikrotubuli-Netzwerk. Manipulationen der Mikrotubuliassemblierung mit Nocodazol, welches an Tubulinmonomere bindet und somit die Destabilisierung der Mikrotubuli bewirkt, führt zur Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen sowie zu einer Steigerung der *P-Body*-Größe (Rajgor et al, 2014). Des Weiteren konnte in Hefen gezeigt werden, dass unter wachstumslimitierenden Versuchsbedingungen während der Mitose ein gerichteter Transfer von *P-Bodies* von der Mutterzelle auf die Tochterzelle erfolgen kann (Garmendia-Torres et al, 2014).

### **1.7. *P-Bodies* als Orte des Abbaus oder der Speicherung von mRNA**

Die Kolo-kalisation von vielen beim RNA-Abbau beteiligten Proteinen in den *P-Bodies* impliziert, dass *P-Bodies* Kompartimente darstellen, welche Orte des RNA-Abbaus sind (Abb.1.5). Alternativ ist es aber auch möglich, dass *P-Bodies* Strukturen sein könnten, welche zur transienten Lagerung von RNA und besagten Proteinkomponenten dienen. Die Hypothese der *P-Bodies* als Orte des RNA-Abbaus wird vor allem dadurch unterstützt, dass RNA einen essentiellen Bestandteil von *P-Bodies* ausmacht (Eulalio et al, 2007; Lavut & Raveh, 2012). Die Absenkung der zellulären RNA-Menge durch eine langfristige Inhibierung der Transkription für 24 Stunden mit Actinomycin D oder die Behandlung von isolierten *P-Bodies* mit der Ribonuklease A führt zu einem Auflösen der *P-Body*-Strukturen (Cougot et al, 2004; Teixeira et al, 2005). Des Weiteren führt die Manipulation des RNA-Abbaus zu einem frühen Zeitpunkt durch eine Blockade der Deadenylierung zu einer Reduzierung der *P-Body*-Formation, während der Eingriff in den RNA-Abbau zu einem späten Zeitpunkt durch die Depletion von XRN1 und DCP1a zu einer Steigerung der *P-Body*-Assemblierung und zu einer Erhöhung der *P-Body*-Größe führt (Cougot et al, 2004; Sheth & Parker, 2003). Zusätzlich führt die Depletion von XRN1 und die Veränderung von RNA-Sequenzen durch die Insertion von Elementen, welche Sekundärstrukturen ausbilden, zu einer Akkumulation von RNA mit einem intakten 3'-Poly(A)-Überhang in den *P-Bodies* (Sheth & Parker, 2003). Ein ähnlicher Befund konnte nach der Depletion von Komponenten des Exosoms beobachtet werden, wonach es zur Akkumulation von adeninreichen mRNAs in den *P-Bodies* kommt (Franks & Lykke-Andersen, 2007). Daneben können mRNAs, welche ein vorzeitiges Stop-Codon enthalten in *P-Bodies* lokalisieren (Durand et al, 2007). Reporter-mRNAs sowie miRNAs, welche spezifisch für diese Reporter-mRNAs sind und deren translationale

Repression bewirken, konnten ebenfalls in oder in unmittelbarer Nähe zu *P-Bodies* detektiert werden (Pillai et al, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid, welches die Translation hemmt und den Verbleib der RNA an Polysomen bewirkt, eine Auflösung der *P-Body*-Strukturen zur Folge hat, da die nötige RNA nicht frei im Zytoplasma vorliegt und nicht von Komponenten der *P-Bodies* gebunden werden kann. Auch die zelluläre Mitose führt zur Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung. In diesen beiden Situationen ist ein Status mit verringerten RNA-Mengen gegeben, sodass die *P-Body*-Assemblierung mit der Menge vorhandener RNA zu korrelieren scheint (Andrei et al, 2005; Cougot et al, 2004; Yang et al, 2004).

Neben der Funktion der *P-Bodies* als Orte des RNA-Abbaus besteht ebenfalls die Theorie, dass *P-Bodies* Strukturen darstellen könnten, welche die vorübergehende Lagerung und Speicherung von mRNA und Proteinen erlauben. In Hefen konnte in einer physiologischen Situation nach einem Glucosemangel beobachtet werden, dass es zur Kolokalisation von spezifischen, induzierten mRNAs in *P-Bodies* kommen kann. Während einige mRNAs unter diesen Bedingungen diffus im Zytoplasma lokalisieren und weiterhin translatiert werden können, lokalisieren andere mRNAs, welche vor allem im Glucosemetabolismus involviert sind, in den *P-Bodies*, wobei keine Translation dieser mRNAs erfolgt (Zid & O'Shea, 2014). Weiterhin konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass die Aufhebung von Polysomen durch einen Glucoseentzug zu einer gesteigerten *P-Body*-Assemblierung sowie zur Akkumulation einer Reporter-mRNA in den *P-Bodies* führt. Die anschließende Gabe von Glucose führt dann zur erneuten Ausbildung von Polysomen und dem Austritt der Reporter-mRNA aus den *P-Bodies*. Auf diese Art können mRNA-Transkripte nach der Lokalisierung in *P-Bodies* erneut in den Vorgang der Translation eingebunden werden (Bregues et al, 2005). Die Lokalisation der mRNAs in den *P-Bodies* in Hefen kann dabei einen biphasischen Ablauf aufweisen, sodass die Lokalisierung der mRNAs zeitlich koordiniert ist (Simpson et al, 2014). Ferner konnte gezeigt werden, dass spezifische mRNAs in Abhängigkeit von miRNA-vermittelter RNA-Interferenz in *P-Bodies* lokalisieren, aber auch erneut dem Vorgang der Translation zugeteilt werden können (Bhattacharyya et al, 2006). Zusätzlich enthalten *P-Bodies* Proteinkomponenten wie Dhh1 (*DExD/H-box helicase 1*) und Rap55, welche bei der translationalen Suppression von mRNAs beteiligt sind (Coller & Parker, 2004). Des Weiteren führt die Depletion von Dcp1a in Hefen zu einem Verlust der Suppression der Translation, welche unter bestimmten zellulären Stresssituationen wie Glucosemangel stattfindet (Holmes et al, 2004). Auf diese Weise könnten *P-Bodies* neben ihren Funktionen

im RNA-Metabolismus auch bei der Proteinsynthese beteiligt sein, indem die dabei beteiligten Faktoren in den *P-Bodies* gelagert werden und bei Bedarf diese verlassen, um ihre eigentlichen Funktionen zu erfüllen (Parker & Sheth, 2007). Zudem ist das *Decapping* als einleitender Schritt zum RNA-Abbau reversibel. So konnte gezeigt werden, dass das Anfügen der 5'-*Cap*-Struktur nicht nur kotranskriptionell im Zellkern erfolgt, sondern davon unabhängig auch im Zytoplasma stattfinden kann. Dieses *Recapping* kann anschließend eine erneute Bindung der 5'-*Cap*-Struktur durch den Translationsinitiationsfaktor eIF4E ermöglichen, womit es zur Induktion der Translation kommen kann. Somit ist es vorstellbar, dass *P-Bodies* als Orte dienen könnten, in denen eine vorübergehende Lagerung von RNA ohne 5'-*Cap*-Struktur stattfindet (Ignatochkina et al, 2015; Otsuka et al, 2009; Schoenberg & Maquat, 2009).

### **1.8. Interaktion von *P-Bodies* und anderen zellulären Granula**

Einige der Proteinkomponenten von *P-Bodies* lokalisieren neben den distinkten Strukturen ebenfalls diffus im Zytoplasma. Darüber hinaus gibt es einige Faktoren, welche in einer anderen Art von zytoplasmatischen Strukturen lokalisieren können. Diese Strukturen werden Stressgranula genannt und stellen wie die *P-Bodies* abgrenzbare, zytoplasmatische Strukturen dar. Die Assemblierung dieser Strukturen erfolgt als Antwort auf vielfältige Arten von Stress wie UV-Bestrahlung, Hitze oder oxidativen Stress. Diese Situationen sind von einer Inhibierung der Translation gekennzeichnet, worauf die Formation von Stressgranula erfolgt, welche sich unter anderem dadurch auszeichnen, dass Faktoren der Translation wie Initiationsfaktoren oder ribosomale Untereinheiten in diesen lokalisieren können. Dagegen sind die Komponenten des *Decapping*-Komplexes und andere Komponenten von *P-Bodies* nicht in der Stressgranula zu finden. Als dritte Proteingruppe der Stressgranula sind jene Proteine zu nennen, welche sowohl Bestandteil von *P-Bodies*, wie auch Komponenten von Stressgranula darstellen können. Zu diesen zählen beispielsweise XRN1 oder auch TTP (Eulalio et al, 2007; Frydryskova et al, 2016; Kedersha et al, 2005; Kimball et al, 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Situationen eine Verschmelzung von Stressgranula und *P-Bodies* erfolgen kann (Buchan & Parker, 2009; Wilczynska et al, 2005). Des Weiteren ist zu erwähnen, dass Proteinkomponenten von *P-Bodies* ebenfalls mit anderen zellulären Strukturen wie maternalen Granula, Keimzell-Granula oder neuronalen Granula assoziiert sein können (Barbee et al, 2006; Kotaja et al, 2006; Nakamura et al, 2001).

## 1.9. Implikationen von *P-Bodies* und *P-Body*-Faktoren bei Krankheitsbildern

Bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten konnte eine Beteiligung von zentralen Proteinkomponenten von *P-Bodies* gezeigt werden, wobei die genauen pathologischen Mechanismen nicht geklärt sind. Dennoch zeigt die Beteiligung unterschiedlicher *P-Body*-Proteine eine Relevanz dieser bei verschiedenen Krankheitsbildern. So erfolgte in einer frühen Studie die Charakterisierung von *P-Bodies* anhand eines Serums eines Patienten, welcher an der Autoimmunkrankheit des Sjögren-Syndroms litt. Dieses Serum enthielt nachweislich Autoantikörper gegen EDC4 (auch Hedls genannt) und führte zur spezifischen Detektion von zytoplasmatischen *P-Bodies* (Bloch et al, 1994). In weiteren Studien konnten unter anderem Autoantikörper gegen die *P-Body*-Proteine GW182 (*Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein*) und erneut EDC4 in Seren aus Patienten mit unterschiedlich ausgebildeten Neuropathien, welche Ataxie, motorische und sensorische Neuropathien sowie das Sjögren-Syndrom umfassen können, detektiert werden (Bhanji et al, 2007). Beim Krankheitsbild der systemischen Sklerose, welche eine seltene Autoimmunkrankheit darstellt, konnte ebenfalls ein Einfluss von *P-Body*-Strukturen beobachtet werden. Dieses Krankheitsbild zeichnet sich durch fibrotische Hautveränderungen aus, wobei auch innere Organe betroffen sein können. Des Weiteren lässt sich eine starke Produktion von Autoantikörpern beobachten. Unter diesen Antikörpern befinden sich auch jene, welche eine spezifische Detektion von UPF1 (*Regulator of nonsense transcripts 1*) und MOV10 (*Moloney leukemia virus 10 protein*) ermöglichen, wobei beide Proteine in *P-Bodies* lokalisieren können (Johnson et al, 2016). Als weitere Autoimmunerkrankung konnte bei der primär, biliären Zirrhose ebenfalls eine Produktion von Autoantikörpern beobachtet werden, welche im Patientenserum die spezifische Detektion von *P-Body*-Strukturen ermöglichen (Bloch et al, 2005). Darüber hinaus konnte beim Krankheitsbild der unspezifischen X-chromosomalen, mentalen Retardierung eine Deletion des Gens *VCX-A* identifiziert werden. *VCX-A* (*Variable charge X-linked protein 3*) stellt ein Protein dar, welches durch seine Bindung an die 5'-Cap-Struktur in kompetitiver Form DCP2 in seiner Aktivität inhibieren kann. Zusätzlich konkurriert *VCX-A* durch seine Bindung an die 5'-Cap-Struktur mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4E. Auf diese Weise könnte *VCX-A* eine Regulation der mRNA-Stabilität sowie des translationalen *silencings* erlauben, wobei eine fehlerhafte Funktion von *VCX-A* zur Ausbildung des Krankheitsbildes führen könnte (Fukami et al, 2000; Jiao et al, 2009; Jiao et al, 2006). Bei einer weiteren Krankheit, der Chorea Huntington, konnte ebenfalls eine Verbindung zu *P-Bodies* verzeichnet werden. Diese autosomal-

dominant vererbte Genkrankheit wird durch Veränderungen des Gens *IT15* hervorgerufen. Die Mutationen innerhalb des Gens führen zur Expression von Huntingtin in einer veränderten Form mit ausgedehnten Proteinabschnitten mit Glutamin-Aminosäurewiederholungen. Diese Mutationen werden für die Ausbildung des pathologischen Krankheitsbildes verantwortlich gemacht. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Huntingtin ebenfalls in *P-Bodies* lokalisieren kann und die Formation von *P-Bodies* von der Huntingtin-Menge abhängig sein kann. Zusätzlich führt die Veränderung von Huntingtin mit der Einführung von Proteinabschnitten mit Glutamin-Aminosäurewiederholungen, wie sie bei der Ausbildung des Krankheitsbilds vorkommen, zu einer signifikanten Verringerung der *P-Body*-Assemblierung. Somit deuten diese Daten auf eine Relevanz von *P-Bodies* bei der Ausbildung der Krankheit der Chorea Huntington hin (Savas et al, 2008).

### **1.10. Regulation von *P-Body*-Faktoren durch proinflammatorisches *signaling***

Die beschriebenen Beobachtungen zur Relevanz von *P-Bodies* und der einzelnen Proteinkomponenten der *P-Bodies* bei verschiedenen Krankheitsbildern deuten auf eine Relevanz dieser Strukturen bei der Ausprägung dieser unterschiedlichen Krankheitsbilder hin.

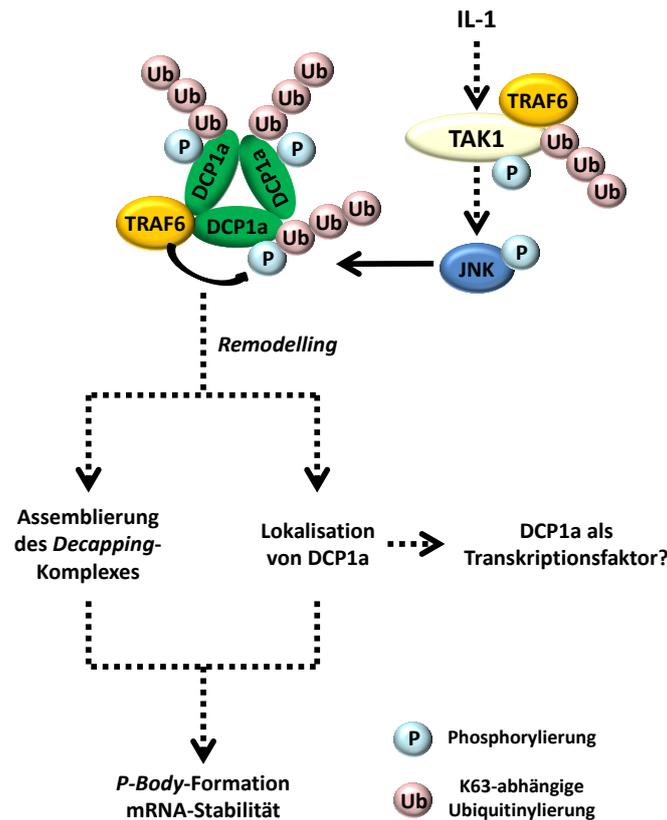
Zusätzlich ist eine signalabhängige Modifikation von *P-Body*-Proteinen möglich. In diesem Zusammenhang konnte in Hefen gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen von Dcp2 stattfinden können. So findet in Abhängigkeit von Glucosemangel, Hydrogenperoxid-Exposition und Wachstum bei hohen Zelldichten eine Phosphorylierung von Dcp2 an Serin 137 durch die MAP4K Ste20 statt. Die Veränderung von Serin 137 zu Alanin, wie auch der *knockout* von Ste20 führen dazu, dass Dcp2 nicht mehr in die *P-Bodies* rekrutiert werden kann, sodass die Phosphorylierung von Dcp2 einen Mechanismus zur Regulation der *P-Body*-Zusammensetzung darstellen kann. Daneben führt die Phosphorylierung von Dcp2 zur Stabilisierung von distinkten Gruppen von mRNAs, zu welchen vor allem mRNAs von ribosomalen Proteinen gehören (Staleva et al, 2004; Yoon et al, 2010). Zusätzlich kann der Verlust von Dcp2 unmittelbare Folgen für die Transkriptmengen von mRNAs mit einer Relevanz im Immunsystem haben. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit verringerten Proteinmengen von Dcp2 erhöhte Mengen von Transkripten aufweisen, welche bei der zellulären Antwort auf einen Interferon-Stimulus beteiligt sind (Li et al, 2012).

In höheren Eukaryoten konnte nach einer Stimulation der Zellen mit IL-1 eine Induktion der Phosphorylierung von DCP1a sowie eine Zunahme der *P-Body*-Assemblierung um bis zu 75% beobachtet werden. Im Detail führt dabei die Aktivierung des TAK1-JNK-Signalwegs, wie es auch im proinflammatorischen *signaling* durch Zytokine wie z.B. IL-1 stattfindet (Abb.1.6), zu einer Veränderung der subzellulären Lokalisation von DCP1a als *P-Body*-Protein (Rzeczkowski et al, 2011; Shim et al, 2005). So bewirkt die übermäßige Aktivierung von JNK, dass DCP1a nicht mehr in *P-Bodies* rekrutiert wird und in großen, distinkten, zytoplasmatischen Strukturen lokalisiert. Des Weiteren interagiert JNK als eine MAPK direkt mit DCP1a, kolokalisiert in *P-Bodies* und kann in Abhängigkeit einer proinflammatorischen IL-1-Stimulation DCP1a spezifisch an Serin 315 phosphorylieren. Allerdings ist die Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 nicht essentiell für die *Decapping*-Aktivität eines in Abhängigkeit von DCP1a präzipitierten Proteinkomplexes. Jedoch führt die Expression einer phosphorylierungsdefizienten Variante von DCP1a mit einer Veränderung von Serin 315 zu Alanin (DCP1a<sub>S315A</sub>) zu einer Induktion der *P-Body*-Assemblierung. Im Gegenteil dazu führt die Expression einer trimerisierungsdefizienten Variante von DCP1a (DCP1a<sub>Δ515-582</sub>) zu einem kompletten Verlust der Rekrutierung von DCP1a in die *P-Bodies* sowie zu einem nahezu kompletten Verlust der *Decapping*-Aktivität eines in Abhängigkeit von DCP1a präzipitierten Proteinkomplexes (Rzeczkowski et al, 2011; Tritschler et al, 2009). Gleichzeitig hat die posttranslationale Modifikation von DCP1a Auswirkungen auf die induzierbaren mRNA-Mengen von typischen IL-1-Zielgenen wie z.B. *IL8* oder *NFKBIA*. So führt die Expression von DCP1a<sub>S315A</sub> wie auch DCP1a<sub>Δ515-582</sub> in Zellen zu einer Suppression der mRNA-Induktion von *IL8* und *NFKBIA* nach dem Stimulus. Zusätzlich führt die Expression von einer phosphomimetischen Variante von DCP1a zur Stabilisierung der *IL8*-, jedoch nicht der *NFKBIA*-mRNA. Diese differentiellen Effekte von DCP1a auf die Expression von mRNAs könnten durch die direkte Interaktion von DCP1a mit NFκB p65 sowie der Möglichkeit der Lokalisierung von DCP1a im Zellkern und somit einer Funktion von DCP1a als transkriptionell aktivem Faktor erklärt werden (Rzeczkowski et al, 2011).

Die K63-abhängige, regulatorische Ubiquitylierung stellt eine weitere posttranslationale Modifikation von DCP1a dar, wodurch die Phosphorylierung von exogenem DCP1a sowie die Assemblierung von *P-Bodies* reguliert werden kann. So kann die Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 durch eine Überexpression von Ubiquitin induziert werden, wobei die Ubiquitylierung als Voraussetzung für die Phosphorylierung angenommen werden kann. Die Ubiquitylierung von DCP1a erfolgt dabei verteilt über fast alle Lysin-Aminosäurereste

des Proteins, wobei die bereits beschriebene Trimerisierungsdomäne von DCP1a essentiell für die Ubiquitylierung ist und somit eine weitere Ebene der Regulation der posttranslationalen Modifikation darstellt. Veränderungen aller sechs Lysin-Aminosäuren innerhalb der Trimerisierungsdomäne von DCP1a führen zusätzlich zu einer Induktion der *P-Body*-Assemblierung, welche durch eine Erhöhung der *P-Body*-Anzahl mit einer verminderten Größe sichtbar wird. Zusätzlich führt diese Veränderung von DCP1a zu einer verminderten *Decapping*-Aktivität eines präzipitierten Proteinkomplexes. Die generelle Depletion des Ubiquitin-Proteins einer Zelle führt zur Auflösung der *P-Body*-Strukturen. Gleichzeitig führt diese Depletion des Ubiquitin-Proteins zu einer erhöhten Stabilität von typischen IL-1-induzierten mRNAs. Des Weiteren können die Ubiquitin-E3-Ligasen TRAF6 und TRAF2 Faktoren darstellen, welche die Ubiquitylierung von DCP1a vermitteln können. TRAF6 stellt dabei einen Teil der Signalkaskade nach einem proinflammatorischen Stimulus dar und sorgt nach einer IL-1-Stimulation durch direkte Interaktionen mit DCP1a indirekt für die Phosphorylierung von DCP1a. Daneben führt eine Depletion von TRAF6 ebenfalls zu einer Verringerung der Proteinmengen von EDC4, XRN1 und DCP2 (Tenekeci et al, 2016).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich eine direkte Relevanz von *P-Bodies* und der einzelnen Proteinkomponenten bei der Signalvermittlung nach einem proinflammatorischen Stimulus ableiten. Dabei können *P-Bodies* abhängig von einer IL-1-Stimulation in ihrer Assemblierung reguliert werden. Diese Veränderung der Assemblierung kann dabei in Abhängigkeit von der posttranslationalen Modifikation von DCP1a durch Phosphorylierung und Ubiquitylierung erfolgen, wobei JNK bzw. TRAF6 die zuständigen, katalytischen Proteine darstellen können und die Trimerisierung von DCP1a als Voraussetzung gegeben sein muss. Die posttranslationalen Modifikationen von DCP1a könnten anschließend regulatorische Auswirkungen auf die Aktivität des *Decapping*-Komplexes haben und somit auch die Regulation der posttranskriptionellen Genexpression auf der Ebene der mRNA-Stabilität ermöglichen (Abb.1.6).



**Abb.1.6: IL-1-abhängige Veränderungen von DCP1a und *P-Bodies*.** Gezeigt ist eine schematische Zusammenfassung der Befunde, welche die Regulation von posttranslationalen Modifikationen von DCP1a und der *P-Bodies* durch IL-1 zeigen. Dabei kann DCP1a durch Phosphorylierung und Ubiquitinylierung durch JNK bzw. TRAF6 posttranslational verändert werden. Die Modifikationen können direkten Einfluss auf das *remodelling* und die Aktivität des *Decapping*-Komplexes haben sowie möglicherweise die nukleäre Lokalisation von DCP1a bewirken, wodurch DCP1a als Kofaktor bei der Transkription agieren kann. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Regulation der Lokalisation von DCP1a und der *P-Body*-Assemblierung, welche unmittelbare Folgen auf die mRNA-Stabilität haben kann. Die Zusammenstellung der Abbildung erfolgte nach Rzeckowski et al, 2011 und Tenekeci et al, 2016.

## 1.11. Zielsetzung der Arbeit

Die publizierten Forschungsergebnisse zu *P-Bodies* und deren einzelner Faktoren finden in ihrer funktionellen Bedeutung und Relevanz in einem gewissen Maße eine Limitation. So beruhen viele der bisherigen Erkenntnisse auf Modellsystemen in Hefen. Vor allem mit dem Hinblick auf DCP1a, welches in Hefen eine stark verkürzte Größe aufweist, sind die Erkenntnisse nicht direkt auf andere eukaryotische Systeme übertragbar, da bei diesen eine weitaus komplexere Regulation von DCP1a z.B. durch posttranslationale Modifikationen angenommen werden kann. Des Weiteren beruhen die publizierten Forschungsergebnisse oft auf einer exogenen Überexpression von GFP-Fusionsproteinen, Luciferase-Reportern oder anderen Konstrukten, welche die Untersuchung der *P-Body*-Faktoren erlauben. Anhand dieser exogenen Expression erfolgt dann in den meisten Fällen die Untersuchung von verschiedenen

Forschungsschwerpunkten wie der *P-Body*-Assemblierung oder auch der *in vitro Decapping*-Aktivität. Diese Daten werden durch zusätzliche *in vitro* Kristallstrukturanalysen mit verschiedenen *P-Body*-Faktoren aus unterschiedlichen Spezies unterstützt. Des Weiteren beruhen die Beobachtungen der Lokalisation von RNA in den *P-Bodies* auf der exogenen Expression von *tethering*-Systemen, welche die Detektion von bestimmten mRNAs in den *P-Bodies* erlauben, oder auf der unspezifischen Detektion von mRNAs anhand des 3'-Poly(A)-Überhangs. Die Verwendung dieser Methoden führt dazu, dass die physiologische Relevanz der *P-Bodies* und der einzelnen *P-Body*-Faktoren weiterhin nicht vollständig geklärt ist. Vor allem fehlen direkte Befunde zu endogenen und physiologischen Konditionen, welche eine Regulation der *P-Bodies* und deren Faktoren herbeiführen, sowie der anschließenden Folgen dieser Regulation auf den mRNA-Metabolismus. Besonders im Hinblick auf die Funktion der *P-Bodies* als Orte des mRNA-Abbaus oder der mRNA-Speicherung sind diese endogenen Befunde jedoch zwingend notwendig.

Zur Untersuchung von endogenen, physiologischen Konditionen konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von IL-1 posttranslationale Modifikationen der zentralen regulatorischen Untereinheit des *Decapping*-Komplexes DCP1a durch Phosphorylierung oder Ubiquitylierung erfolgen können, wobei diese regulatorische Funktionen bei der Assemblierung von *P-Bodies* und im RNA-Metabolismus haben können.

Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit die Relevanz der posttranslationalen Modifikation von DCP1a durch K63-abhängige Ubiquitylierung für die Regulation der *Decapping*-Aktivität, die *P-Body*-Assemblierung und die Ausbildung von zytoplasmatischen, endogenen Proteinkomplexen von *P-Body*-Faktoren weiter untersucht werden.

Des Weiteren sollten CRISPR/Cas9-abhängige *loss of function* Zellsysteme für zentrale *P-Body*-Faktoren etabliert werden. Anhand dieser stabilen Zellsysteme mit einer Depletion des jeweiligen endogenen Proteins sollten die Auswirkungen auf die *P-Body*-Assemblierung und die Ausbildung von zytoplasmatischen, endogenen Proteinkomplexen untersucht werden, um so die Regulation der Interaktion der unterschiedlichen *P-Body*-Faktoren besser zu verstehen.

Zusätzlich sollte die Relevanz der *knockdowns* der Proteine für das IL-1-abhängige proinflammatorische *signaling* auf den Ebenen der Proteinregulation, der mRNA-Expression und des mRNA-Abbaus analysiert werden.

Des Weiteren sollte mit Hilfe dieser Zellen die zentrale Fragestellung der Relevanz von *P-Bodies* für den Abbau oder die Speicherung von spezifischen mRNAs geklärt werden, indem die relative Lokalisation von einzelnen, endogenen mRNA-Molekülen zu *P-Bodies* systematisch analysiert wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Einwegartikel und Plastikwaren wurden von den Firmen Brand, Eppendorf, Greiner, Ibidi, Neolab, Nunc, Omnilab, Roth und Sarstedt bezogen.

#### 2.1.2. Geräte

##### Elektrophorese und Western Blot:

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Elektrophorese Power Supply EPS 600, 601, 3500	Pharmacia Biotech
Mighty Small II	Hoefer
Mupid-exU	Takara
Owl P9DS	Owl Separation Systems
PerfectBlue 'Semi-Dry'-Blotter, Sedec	VWR Peqlab

##### Photometer:

Nano Drop ND-1000	Peqlab
Spectramax Plus 384	Molecular Devices

##### Mikroskope:

CKX41	Olympus
Diavert	Leitz
DMi8	Leica
DMIRB	Leica
DMIRE2	Leica

##### PCR-Thermocycler:

7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystem
Thermocycler T Professional	Biometra

##### Gel- und Western Blot-Dokumentation:

Chemi Doc Touch Imaging System	Bio-Rad
Filmentwicklermaschine Curix 60	AGFA
Gel iX Imager UV-Transilluminator	INTAS

### 2.1.3. Chemikalien und Lösungsmittel

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roth, Roche, Serva und Sigma bezogen (Qualitätsstufe "p.a.", "Für die Molekularbiologie" oder "*cell culture grade*").

### 2.1.4. Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

10x FastDigest Buffer	Thermo Fisher Scientific (#B64)
4% Paraformaldehyd-Lösung in PBS	Santa Cruz (#sc-281692)
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific (#R0611)
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies (#5067-1511)
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies (#5067-1513)
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare (#RPN2106)
ATP	Thermo Fisher Scientific (#R0441)
dNTP Mix	Thermo Fisher Scientific (#R0192)
DPBS	PAN Biotech (#P04-36500)
Duolink In Situ Detection Reagents Orange	Sigma-Aldrich (#DUO92007-100RXN)
Ethidiumbromidlösung 1%	Carl Roth (#2218.2)
Fast SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (#4385612)
Fuji Medical X-ray Film SUPER RX	Fujifilm (#4741019236)
Gel Blotting Paper GB005	GE Healthcare (#10426994)
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific (#SM0331)
GFP-Trap_A	Chromotek (#gta-20/500µl)
Hank's BSS	PAN (#P04-32505)
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific (#H3570)
ibiTreat µ-Slide VI 0.4	Ibidi (#80606)
Immobilion Western Chemiluminescent HRP-Substrate	Merck Millipore (#WBKLS0500)
Lithium Chloride Precipitation Solution	Thermo Fisher Scientific (AM9480)
m <sup>7</sup> -G (5')ppp(5')G RNA Cap Structure Analog	New England BioLabs (#S1404S)
MEGAscript T7	Thermo Fisher Scientific (#AM1333)
mirVana miRNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific (#AM2560)
Normal Donkey Serum	Jackson ImmunoResearch (#017-000-121)
NucleoBond PC500	Macherey&Nagel (#740574.50)

## Material und Methoden

---

NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up	Macherey&Nagel (#740609.250)
NucleoSpin Plasmid	Macherey&Nagel (#740588.250)
NucleoSpin RNA II	Macherey&Nagel (#740955.250)
NucleoSpin Tissue	Macherey&Nagel (#740952.50)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (#26616)
PLA Probe anti-Goat Minus	Sigma-Aldrich (#DUO92006-100RXN)
PLA Probe anti-Mouse Minus	Sigma-Aldrich (#DUO92004-100RXN)
PLA Probe anti-Mouse Plus	Sigma-Aldrich (#DUO92001-100RXN)
PLA Probe anti-Rabbit Minus	Sigma-Aldrich (#DUO92005-100RXN)
PLA Probe anti-Rabbit Plus	Sigma-Aldrich (#DUO92002-100RXN)
PlasmidSafe ATP-abhängige DNase	Epicentre (E3101K)
Ponceau S	Serva (#33429)
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific (#S0142)
Roti-Load 1	Carl Roth (#K929.3)
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth (#3029.1)
Roti-PVDF	Carl Roth (#T830.1)
Roti-Quant	Carl Roth (#K015.1)
Saponin	Sigma-Aldrich (#S4521-10G)
ScriptCap m <sup>7</sup> -G Capping System	Epicentre Biotechnologies (#SCCE0610)
Soc-Medium	Invitrogen (#15544-034)
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems (#4352042)
TLC PEI Cellulose F	Merck Millipore (#1.05579.0001)
Trypsin/EDTA Solution	PAN Biotech (#P10-023100)
Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit	Affymetrix (#QVC0001)
$\gamma$ - <sup>32</sup> P-GTP	Perkin Elmer (#NEG506H250UC)

### 2.1.5. Enzyme

DNaseI	Thermo Fisher Scientific (#EN0521)
FastDigest BbsI	Thermo Fisher Scientific (#FD1014)
GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase	Promega (#M7805)
M-MuLV Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific (#EP0352)
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (#EP0571)
Plasmid-Safe ATP-Dependent DNase	Biozym (#161010)
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific (#EL0014)
T4 Polynucleotid Kinase	Thermo Fisher Scientific (#EK0031)

### 2.1.6. Antikörper

#### Primärantikörper:

anti- $\beta$ -Actin (Maus) Western Blot: 1:10000 in 5% MP/TBST	Santa Cruz (#sc-4778)
anti-DCP1a (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST IF/IF-PLA/IF-FISH: 1:100	Abcam (#ab47881)
anti-DCP1a (Maus) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST IF/IF-PLA/IF-FISH: 1:100	Abnova (#H00055802-M06)
anti-DCP2 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% BSA/TBST	Abcam (#ab28658)
anti-EDC3 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST IF/IF-PLA/IF-FISH: 1:100	Santa Cruz (#sc-135013)
anti-EDC4 (Kaninchen) Western Blot: 1:500 in 5% BSA/TBST IF/IF-PLA/IF-FISH: 1:100	Cell Signaling (#2548)
anti-EDC4 (Ziege) IF/IF-PLA/IF-FISH: 1:50	Santa Cruz (#sc-137444)
anti-GFP (Maus) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST	Roche (#11814460001)
anti-I $\kappa$ B $\alpha$ (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% BSA/TBST	Cell Signaling (#9242)
anti-NF $\kappa$ B p65 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST	Santa Cruz (#sc-8008)
anti-p38 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% BSA/TBST	Cell Signaling (#9212)
anti-phospho-NF $\kappa$ B p65 S536 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% BSA/TBST	Cell Signaling (#3033)
anti-phospho-DCP1a S315 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% BSA/TBST	Pickcell (Serum Fraction B, AG Kracht)
anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ S32 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST	Cell Signaling (#2859)
anti-phospho-p38 T180/Y182 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 3% BSA/TBST	Zymed (#36-8500)

## Material und Methoden

---

anti-Tubulin (Maus) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST	Santa Cruz (#sc-8035)
anti-XRN1 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST IF/IF-PLA/IF-FISH: 1:100	Abcam (#ab70259)
anti-XRN1 (Maus) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST IF/IF-PLA/IF-FISH: 1:100	Santa Cruz (#sc-50209)
anti-HSP27 (Maus) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST	Cell Signaling (#2402)
anti-phospho-HSP27 S82 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST	Cell Signaling (#2406)
anti-JNK (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% MP/TBST	Santa Cruz (#sc-571)
anti-phospho-JNK T183/Y185 (Kaninchen) Western Blot: 1:1000 in 5% BSA/TBST	Cell Signaling (#9251)
anti-FLAG (Maus) Western Blot: 1:500 in 5% MP/TBST	Sigma-Aldrich (#F1804)
anti-HA (Maus) Western Blot: 1:500 in 5% MP/TBST IF/IF-PLA/IF-FISH: 1:100	Sigma-Aldrich (#11583816001)

### Sekundärantikörper:

Cy3 anti-Kaninchen IgG (Esel)	Merck Millipore (#AP182C)
Cy3 anti-Maus IgG (Esel)	Merck Millipore (#AP192C)
Cy3 anti-Ziege IgG (Esel)	Merck Millipore (#AP180C)
Cy5 anti-Kaninchen IgG (Ziege)	Abcam (#ab97077)
Cy5 anti-Maus IgG (Ziege)	Abcam (#ab6563)
Alexa Fluor 647 anti-Ziege IgG (Esel)	Abcam (#ab150131)
Dylight 488 anti-Kaninchen IgG (Esel)	ImmunoReagent (#DkxRb-003D488NHSX)
Dylight 488 anti-Maus IgG (Esel)	ImmunoReagent (#DkxMu-003D488NHSX)
Dylight 488 anti-Ziege IgG (Esel)	Thermo Fisher Scientific (#SA5-10086)
HRP anti-Maus IgG (Ziege)	Dako (#P0447)
HRP anti-Kaninchen IgG (Ziege)	Dako (#P0448)
HRP anti-Kaninchen IgG (Ziege)	Thermo Fisher Scientific (#31460)

### 2.1.7. Inhibitoren

Actinomycin D	Sigma-Aldrich (#A1410)
Cycloheximid	Merck Millipore (#239764)
Flavopiridol	Selleckchem (#SEL-S1230)
Leupeptin Hemisulfat	Carl Roth (#CN33.2)
MG132	Merck Millipore (#474790)
Microcystin	Enzo Life Sciences (#ALX-350-012-M001)
Pepstatin A	Applichem (#A2205)
PHA-408	Axon Medchem (#1651)
PMSF	Sigma-Aldrich (#P-7626)
Protease inhibitor cocktail tablets	Roche (#11873580001)
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific (#E00381)

### 2.1.8. Expressionsvektoren

pGL2	Promega (#E1641)
pSpCas9(BB)-2A-Puro (px459)	Addgene (#48139)
pCIneo- $\lambda$ N-HA-LV	Prof. Dr. L. Schmitz, Gießen
pCIneo- $\lambda$ N-HA-EDC4	Prof. Dr. L. Schmitz, Gießen
peGFP-C1-LV	Clontech
peGFP-DCP1 <sub>wt</sub>	Prof. Dr. H. Holtmann, Hannover
peGFP-DCP1 <sub>a<sub>K520-577R</sub></sub>	Prof. Dr. M. Kracht, Gießen
peGFP-DCP1 <sub>a<sub><math>\Delta</math>515-582</sub></sub>	Prof. Dr. H. Holtmann, Hannover
pcDNA 3.1	Thermo Fisher Scientific (#V79020)
peGFP-DCP2	Prof. Dr. H. Holtmann, Hannover
pRK7-FLAG-TRAF6	Zhodan Cao, South San Francisco, USA
peGFP-DCP1 <sub>a<sub>MT3</sub></sub>	Prof. Dr. E. Izaurralde, Heidelberg

Im Rahmen dieser Arbeit generierte Expressionsvektoren:

px459-sg1 <sub>DCP1a</sub>	px459-sg1 <sub>EDC4</sub>
px459-sg3 <sub>DCP1a</sub>	px459-sg2 <sub>EDC4</sub>
px459-sg6 <sub>DCP1a</sub>	px459-sg4 <sub>EDC4</sub>
px459-sg4 <sub>DCP2</sub>	px459-sg0 <sub>XRN1</sub>
px459-sg6 <sub>DCP2</sub>	px459-sg2 <sub>XRN1</sub>
px459-sg10 <sub>DCP2</sub>	px459-sg4 <sub>XRN1</sub>
px459-sg1 <sub>EDC3</sub>	px459-sg1 <sub>XRN1</sub>

px459-sg2<sub>EDC3</sub>

px459-sg7<sub>XRN1</sub>

px459-sg6<sub>EDC3</sub>

px459-sg10<sub>XRN1</sub>

### 2.1.9. Oligonukleotide

#### Oligonukleotide für Klonierungen (5'-3'-Sequenz):

DCP1a_sgRNA1_as	AAACGCTCGACTCAGCGCCTCCATC
DCP1a_sgRNA1_se	CACCGATGGAGGCGCTGAGTCGAGC
DCP1a_sgRNA3_as	AAACCTAGGCTCATCTCCTGCCCAC
DCP1a_sgRNA3_se	CACCGTGGGCAGGAGATGAGCCTAG
DCP1a_sgRNA6_as	AAACGTGAGGTCTGCGATGCTGGTC
DCP1a_sgRNA6_se	CACCGACCAGCATCGCAGACCTCAC
DCP2_sgRNA10_as	AAACCAGTGTGGGATAAGAGAACTTC
DCP2_sgRNA10_se	CACCGAAGTCTCTTATCCCACACTG
DCP2_sgRNA4_as	AAACGGCAGCGTCCTGGACGATTTTC
DCP2_sgRNA4_se	CACCGAAATCGTCCAGGACGCTGCC
DCP2_sgRNA6_as	AAACAGCGATTAAAGAGACAATGCC
DCP2_sgRNA6_se	CACCGGCATTGTCTCTTTCTCGCT
EDC3_sgRNA1_as	CAAAGTCGGCGCGGAGGCTTTCAGC
EDC3_sgRNA1_se	CACCGCTGAAAGCCTCCGCGCCGAC
EDC3_sgRNA2_as	CAAATCGGCGCGGAGGCATTCAGGC
EDC3_sgRNA2_se	CACCGCCTGAAAGCCTCCGCGCCGA
EDC3_sgRNA6_as	AAACATACCTGAAAGCCTCCGCGCC
EDC3_sgRNA6_se	CACCGGCGCGGAGGCTTTCAGGTAT
EDC4_sgRNA1_as	AAACATGGCCTCCTGCGCGAGCAT C
EDC4_sgRNA1_se	CACCGATGCTCGCGCAGGAGGCCAT
EDC4_sgRNA2_as	AAACCCTGCGCGAGCATCGACATCC
EDC4_sgRNA2_se	CACCGGATGTTCGATGCTCGCGCAGG
EDC4_sgRNA4_as	AAACCGCAGCACCAGCGGGACATCC
EDC4_sgRNA4_se	CACCGGATGTCCCAGGCTGCTGCG
XRN1_sg10v2_as	AAACTGTCTCAGCGAAGTGGTGAAC
XRN1_sg10v2_se	CACCGTTCACCACTTCGCTGAGACA
XRN1_sg1v2_as	AAACCTTCGCTGAGACAGGGATAACC
XRN1_sg1v2_se	CACCGGTATCCCTGTCTCAGCGAAG
XRN1_sg7v2_as	AAACTCTGTAAACTTGGGGACTCC

XRN1_sg7v2_se	CACCGGAGTCCCCAAGTTTTACAGA
XRN1_sgRNA0_as	AAACCCGGTCGTCGCTCCGCGGATC
XRN1_sgRNA0_se	CACCGATCCGCGGAGCGACGACCGG
XRN1_sgRNA2_as	AAACGTCGTCGCTCCGCGGATGACC
XRN1_sgRNA2_se	CACCGGTCATCCGCGGAGCGACGAC
XRN1_sgRNA4_as	AAACGCGGGGCGTTTGGTTTCGGTC
XRN1_sgRNA4_se	CACCGACCGAAACCAAACGCCCCGC

### Oligonukleotide für Sanger-Sequenzierungen (5'-3'-Sequenz):

CRISPR-U6	GCATATACGATACAAGGCTG
DCP1a-Amplikon_se	TCTGCAAAGAAGGCAGGTCG
XRN1-Amplikon_as	GAGCGACGACCGGAGG

### Oligonukleotide für PCR (5'-3'-Sequenz):

T7-Luzi 323-341_se	GCGTAATACGACTCACTATAGG	
	GAGAATGGAACCGCTGGAGAG	Produktgröße: 202 bp
	CA	<i>annealing</i> -Temperatur: 58°C
Luzi 479-498_as	TCTGTGATTTGTATTCAGCC	
DCP1a-Amplikon_se	TCTGCAAAGAAGGCAGGTCG	Produktgröße: 658 bp
DCP1a-Amplikon_as	GACACCGCCCACATCGTA	<i>annealing</i> -Temperatur: 60°C
XRN1-Amplikon_se	AAGCGGCTGTTATCGTCTGTA	Produktgröße: 592 bp
XRN1-Amplikon_as	GAGCGACGACCGGAGG	<i>annealing</i> -Temperatur: 60°C

### **2.1.10. TaqMan Gene Expression Assays**

<i>ACTB</i>	Produktgröße: 171 bp	Thermo Fisher Scientific (Hs99999903_m1)
<i>CXCL2</i>	Produktgröße: 68 bp	Thermo Fisher Scientific (Hs00236966_m1)
<i>GUSB</i>	Produktgröße: 81 bp	Thermo Fisher Scientific (Hs99999908_m1)
<i>IL6</i>	Produktgröße: 95 bp	Thermo Fisher Scientific (Hs00174131_m1)
<i>IL8</i>	Produktgröße: 101 bp	Thermo Fisher Scientific (Hs00174103_m1)
<i>NFKBIA</i>	Produktgröße: 68 bp	Thermo Fisher Scientific (Hs00153283_m1)

### 2.1.11. Sonden für RNA-*in situ*-Hybridisierung

Human <i>IL6</i> Type 1	Affymetrix (#VA1-13526)
Human <i>IL8</i> Type 1	Affymetrix (#VA1-13103)
Human <i>NFKBIA</i> Type 6	Affymetrix (#VA6-17971)

### 2.1.12. Rekombinante Proteine

Humanes rekombinantes IL-1 $\alpha$	Prof. Dr. Saklatvala, London, England
Humanes rekombinantes IL-1 $\alpha$	AG Kracht

### 2.1.13. Puffer

#### Agarose-Gelelektrophorese:

TAE-Puffer	40 mM Tris
	1 mM EDTA
	0,11% (v/v) Essigsäure

#### Chemische Kompetition von Bakterien:

TSS-Puffer	50 mM MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O
	10% (v/v) Polyethylenglykol 6000
	5% (v/v) DMSO
	ad 25 ml LB Medium

#### Lysepuffer:

NET-Lysepuffer	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0,1% (v/v) Triton X-100
	10% (v/v) Glycerol
	pH 7,5 mit HCl
Spezial-Lysepuffer	30 mM Natriumpyrophosphat
	50 mM NaCl
	1% (v/v) Triton X-100
	2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	50 mM NaF
	20 mM $\beta$ -Glycerophosphat
	10 mM Tris

## Material und Methoden

---

pH 7,05 mit HCl  
Zugabe von:  
1 µg/ml Pepstatin (=1,5 mM)  
10 µg/ml Leupeptin (=23,4 mM)  
1 mM PMSF  
1 µM Microcystin

### SDS-PAGE und Western Blot:

1x Laemmli-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Ponceau S-Färbelösung	0,1% (w/v) Ponceau S in 5% (v/v) Essigsäure
Sammelgelpuffer	1 M Tris pH 6,8 mit HCl
TBS-Puffer	10 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,4 mit HCl
TBST-Puffer	TBS-Puffer mit Zugabe von 0,05% (v/v) Tween 20
Trenngelpuffer	1 M Tris pH 8,8 mit HCl
<u>Decapping-Assay:</u>	
1x Decapping-Puffer	50 mM Tris 30 mM Ammoniumsulfat 1 mM MgCl <sub>2</sub> pH 7,9 mit HCl
Decapping-Reaction-Puffer	44,5 µl 10x Decapping-Puffer 5 µl Cap Analog (100 mM) 0,5 µl Ribolock
NET2-Waschpuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Triton X-100 pH 7,5 mit HCl

### Calciumphosphat-Transfektion:

2x HEBS	280 mM NaCl
	50 mM HEPES
	1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7,12 mit NaOH
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	2 M CaCl <sub>2</sub>

### **2.1.14. Medien und Zusätze**

Ampicillin-Natriumsalz	BioChemica (#A0839,0025)
Difco LB Broth, Miller (Luria-Bertani)	BD (#244610)
DMEM	PAN Biotech (#P04-03550)
FBS Good Forte	PAN Biotech (#P40-47500)
Kanamycin-Sulfat	Carl Roth (T832.3)
L-Glutamin	PAN Biotech (#P04-80100)
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech (#P06-07100)
Puromycin	Merck Millipore (#540411-100MG)
Standard I-Nähragar	Merck (#1.07881.0500)
Doxycyclin	Sigma-Aldrich (#D9891)
DMEM-Vollmedium ( <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> )	500 ml DMEM mit: 10% (v/v) FBS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin nach Bedarf Zugabe von Puromycin (0,75-1 µg/ml)
Einfrriermedium	DMEM-Vollmedium mit: 10% (v/v) FBS 10% (v/v) DMSO
LB-Medium	25 g Difco LB Broth, Miller (Luria-Bertani) ad 1l ddH <sub>2</sub> O autoklavieren nach Bedarf Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml)

LB-Platten	37 g Standard I-Nähragar ad 1l ddH <sub>2</sub> O autoklavieren nach Bedarf Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml)
TSS-Puffer	LB-Medium mit: 10% (v/v) Polyethylenglykol 6000 5% (v/v) DMSO 50 mM MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O

### 2.1.15. Bakterienstämme

One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E.coli</i>	Thermo Fisher Scientific (#C404010) Genotyp: F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
XL1-Blue <i>E.coli</i>	Genotyp: F' Tn10(Tetr) proA +B + lacIqΔ(lacZ)M15I recA1 gyrA96 (Nalr) tbi-1bsdR17 (r-k m-k) glnV44 relA1 lac

### 2.1.16. Zelllinien

HEK293IL-1R	humane, adenovirus-transformierte, embryonale Nierenzelle, stabil transformiert mit TypI IL-1 Rezeptor, Prof. Dr. K. Matsumoto, Nagoya, Japan
HeLa	humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen (ATCC)
U2OS-shUb-Ub(wt)	humane, epitheloide Osteosarcomzellen
U2OS-shUb-Ub(K63R)	humane, epitheloide Osteosarcomzellen

im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Zelllinien:

HEK293IL-1R-px459-sg1 <sub>DCP1a</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg1 <sub>DCP1a</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg3 <sub>DCP1a</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg3 <sub>DCP1a</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg6 <sub>DCP1a</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg6 <sub>DCP1a</sub>

## Material und Methoden

---

HEK293IL-1R-px459- sg1+3+6 <sub>DCP1a</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit den Vektoren: px459-sg1 <sub>DCP1a</sub> , px459-sg3 <sub>DCP1a</sub> und px459-sg6 <sub>DCP1a</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg1 <sub>EDC3</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg1 <sub>EDC3</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg2 <sub>EDC3</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg2 <sub>EDC3</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg6 <sub>EDC3</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg6 <sub>EDC3</sub>
HEK293IL-1R-px459- sg1+2+6 <sub>EDC3</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit den Vektoren: px459-sg1 <sub>EDC3</sub> , px459-sg2 <sub>EDC3</sub> und px459-sg6 <sub>EDC3</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg1 <sub>EDC4</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg1 <sub>EDC4</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg2 <sub>EDC4</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg2 <sub>EDC4</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg4 <sub>EDC4</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg4 <sub>EDC4</sub>
HEK293IL-1R-px459- sg1+2+4 <sub>EDC4</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit den Vektoren: px459-sg1 <sub>EDC4</sub> , px459-sg2 <sub>EDC4</sub> und px459-sg4 <sub>EDC4</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg0 <sub>XRN1</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg0 <sub>XRN1</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg2 <sub>XRN1</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg2 <sub>XRN1</sub>
HEK293IL-1R-px459-sg4 <sub>XRN1</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit dem Vektor: px459-sg4 <sub>XRN1</sub>
HEK293IL-1R-px459- sg0+2+4 <sub>XRN1</sub>	stabil transfizierte HEK293IL-1R-Zellen mit den Vektoren: px459-sg0 <sub>XRN1</sub> , px459-sg2 <sub>XRN1</sub> und px459-sg4 <sub>XRN1</sub>
HeLa-px459-sg1 <sub>DCP1a</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg1 <sub>DCP1a</sub>
HeLa-px459-sg3 <sub>DCP1a</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg3 <sub>DCP1a</sub>
HeLa-px459-sg6 <sub>DCP1a</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg6 <sub>DCP1a</sub>
HeLa-px459-sg1+3+6 <sub>DCP1a</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit den Vektoren: px459-sg1 <sub>DCP1a</sub> , px459-sg3 <sub>DCP1a</sub> und px459-sg6 <sub>DCP1a</sub>
HeLa-px459-sg4 <sub>DCP2</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg4 <sub>DCP2</sub>
HeLa-px459-sg6 <sub>DCP2</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor:

	px459-sg6 <sub>DCP2</sub>
HeLa-px459-sg10 <sub>DCP2</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg10 <sub>DCP2</sub>
HeLa-px459-sg4+6+10 <sub>DCP2</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit den Vektoren: px459-sg4 <sub>DCP2</sub> , px459-sg6 <sub>DCP2</sub> und px459-sg10 <sub>DCP2</sub>
HeLa-px459-sg1 <sub>EDC4</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg1 <sub>EDC4</sub>
HeLa-px459-sg2 <sub>EDC4</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg2 <sub>EDC4</sub>
HeLa-px459-sg1+2+4 <sub>EDC4</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit den Vektoren: px459-sg1 <sub>EDC4</sub> , px459-sg2 <sub>EDC4</sub> und px459-sg4 <sub>EDC4</sub>
HeLa-px459-sg1 <sub>XRN1</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg1 <sub>XRN1</sub>
HeLa-px459-sg7 <sub>XRN1</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg7 <sub>XRN1</sub>
HeLa-px459-sg10 <sub>XRN1</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit dem Vektor: px459-sg10 <sub>XRN1</sub>
HeLa-px459-sg0+7+10 <sub>XRN1</sub>	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit den Vektoren: px459-sg1 <sub>XRN1</sub> , px459-sg7 <sub>XRN1</sub> und px459-sg10 <sub>XRN1</sub>

### 2.1.17. Software Programme

Leica FW4000	Version 1.2.1
Leica LasX	Version 1.5.1.13187
Adobe Photoshop	Version 7.0
ImageJ	Version 1.46r
Bio-Rad Image Lab	Version 5.2.1 build 11

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1. Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte je nach Volumen der Bakterienkultur mit den Kits NucleoSpin Plasmid (Kulturvolumen bis 5 ml) und NucleoBond PC500 (Kulturvolumen bis 200 ml) nach Herstellerangaben. Die Elution erfolgte bei der Aufreinigung nach NucleoSpin Plasmid mit 30-50 µl H<sub>2</sub>O und bei der Aufreinigung nach NucleoBond PC500 mit 500 µl H<sub>2</sub>O.

Die Isolation von genomischer DNA aus Zellkulturen erfolgte mit dem Kit NucleoSpin Tissue nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

Die Aufreinigung von Polymerasekettenreaktionen (PCR)-Produkten aus Agarosegelen oder direkt aus den PCR-Reaktionen erfolgte mit dem Kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up nach Herstellerangaben. Die DNA wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem Kit NucleoSpin RNA II nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 40-60 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

Die Aufreinigung von *in vitro* transkribierter RNA und radioaktiv markierter RNA für den *Decapping*-Assay (siehe 2.2.3.5) wurde mit dem mirVana miRNA Isolation Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der aufgereinigten RNA erfolgte jeweils in 100 µl H<sub>2</sub>O.

Nach der Isolation der Nukleinsäuren durch die verschiedenen Protokolle erfolgte für DNA- und RNA-Proben die photometrische Bestimmung der Konzentration mittels Nano Drop ND-1000. Die Lagerung von DNA-Proben erfolgte anschließend bei -20°C. RNA-Proben wurden für den kurzzeitigen Gebrauch ebenfalls bei -20°C gelagert, wobei die Langzeitlagerung bei -80°C stattfand.

#### **2.2.1.2. PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten**

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für den Nachweis von spezifischen genomischen DNA-Abschnitten wurden PCRs unter der Verwendung der GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase durchgeführt.

Ein 20 µl PCR-Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

Green GoTaq Flexi Buffer (5x)	4 µl
MgCl <sub>2</sub> Solution (25 mM)	3,2 µl
dNTP mix (jeweils 10 mM)	0,4 µl
Primer <i>sense</i> (10 pmol/µl)	1 µl
Primer <i>antisense</i> (10 pmol/µl)	1 µl
GoTaq Polymerase (5U/µl)	0,2 µl
DNA-Matrize	100-200 ng
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Für die PCR-Reaktion wurde folgendes Temperaturprofil für den Thermocycler T-Professional verwendet:

94°C	60 sek	
94°C	30 sek	} 35 Zyklen
60°C	30 sek	
72°C	30 sek	
72°C	180 sek	

### 2.2.1.3. Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA aus RNA zur weiteren Verwendung in quantitativen PCR-Methoden wurde eine reverse Transkription der RNA mittels der RNA-abhängigen DNA-Polymerase *Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase* (M-MuLV) durchgeführt.

Ein 20 µl RT-Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

RT Buffer (5x)	4 µl
Random Hexamer Primer	0,5 µl
dNTP mix (jeweils 10 mM)	0,5 µl
M-MuLV Transkriptase (20U/µl)	0,5 µl
Gesamt-RNA	1 µg
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Für die Durchführung der reversen Transkription wurde folgendes Temperaturprofil für den Thermocycler T-Professional verwendet:

23°C 10 min

37°C 60 min

95°C 5 min

### 2.2.1.4. Quantitative PCR (qPCR)

Mit Hilfe der quantitativen PCR ist es möglich durch die direkte Messung eines Fluoreszenzsignals eine indirekte Quantifizierung der Menge von spezifischen DNA-PCR-Amplikons durchzuführen. Durch die Verwendung von cDNA nach reverser Transkription als Matrize für die qPCR ist es zudem möglich, einen Rückschluss über die relative Menge der mRNA in einer Probe zu erhalten.

In dieser Arbeit wurden qPCRs mit Hilfe des TaqMan-Assay-Systems durchgeführt. Dieses System beruht auf der Detektion des Reporterfarbstoffes FAM (Carboxyfluorescein), welcher an das 5'-Ende einer genspezifischen DNA-Sonde gekoppelt ist, wobei am 3'-Ende derselben Sonde der *Quencher* TAMRA (Tetramethylrhodamin) gekoppelt vorliegt. Der *Quencher* absorbiert dabei aufgrund der räumlichen Nähe im Ausgangszustand die FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*)-induzierte Emission des Fluoreszenzsignals durch den FAM-Reporterfarbstoff, sodass kein messbares Lichtsignal entsteht. Kommt es nun im Verlauf der PCR zur Amplifikation der gewünschten Gensequenz durch *annealing* eines spezifischen Primerpaars und Elongation der Taq-Polymerase, so wird die TaqMan-Sonde durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Infolgedessen liegt der FAM-Reporterfarbstoff nicht mehr in räumlicher Nähe zum *Quencher* vor, wodurch ein messbares Fluoreszenzsignals entsteht, welches nach jedem PCR-Zyklus stärker wird und proportional zu der Menge der spezifischen DNA-Moleküle in der Ausgangsprobe ist. Erreicht die Fluoreszenzintensität in einem PCR-Zyklus einen Schwellenwert über der Hintergrundfluoreszenz so wird dieser Zyklus als Ct (*Cycle Threshold*)-Wert definiert. Durch diesen Ct-Wert ist eine relative Quantifizierung der Menge der in der Probe enthaltenen Zielmoleküle durch die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode möglich.

Dazu wird zunächst die Differenz aus den Ct-Werten des Zielgens und einem parallel gemessenen Referenzgen ermittelt ( $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}}$ ). Anschließend lassen sich die

$\Delta\text{Ct}$ -Werte auf eine experimentelle Kontrollprobe (Kalibrator) normieren und als  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ausdrücken ( $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Behandlung}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$ ). Die Umrechnung des  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werts in die vielfache Induktion erfolgt nach:  $n\text{-fache-Induktion} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

Ein 20  $\mu\text{l}$  qPCR-Ansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen:

TaqMan FAST 2x Universal PCR Master Mix	10 $\mu\text{l}$
TaqMan Assays on Demand	0,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	7,5 $\mu\text{l}$
cDNA	2 $\mu\text{l}$

Für die qPCR wurde der PCR-Modus 7500 Fast und folgendes Temperaturprofil für den Thermocycler 7500 Fast Real Time PCR System verwendet:

95°C	20 sek	
95°C	3 sek	} 40 Zyklen
60°C	30 sek	

Die Messungen erfolgten dabei als technisches Duplikat für jede Probe in einer 96-*well*-Platte.

### 2.2.1.5. Klonierung von CRISPR/Cas9-Vektoren

Für die Herstellung von eukaryotischen Expressionsvektoren für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von Proteinen wurden verschiedene sgRNAs in den Vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (px459) kloniert.

Dazu wurden zunächst geeignete sgRNA-Sequenzen mit dem Internetprogramm CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu/>) ermittelt. Den sgRNA-Sequenzen wurden jeweils Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym BbsI hinzugefügt. Die so ermittelten Sequenzen der Oligonukleotide wurden anschließend zusammen mit dem entsprechenden komplementären Gegenstrang (somit *sense* und *antisense*) mit jeweils zusätzlichen 5'-Phosphatgruppen bei der Firma Eurofins Genomics zur Synthese in Auftrag gegeben.

Nach Erhalt der sgRNA-Oligonukleotide wurden diese für eine finale Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  in H<sub>2</sub>O gelöst und zunächst zur Herstellung von doppelstängigen Oligonukleotiden hybridisiert.

## Material und Methoden

---

Die Hybridisierungsreaktion setze sich dabei wie folgt zusammen:

sgRNA <i>sense</i> (100 µM)	1 µl
sgRNA <i>antisense</i> (100 µM)	1 µl
T4 PNK Puffer A (10x)	5 µl
H <sub>2</sub> O	44 µl

Für die Reaktion wurde folgendes Temperaturprofil für den Thermocycler T-Professional verwendet:

95°C	4 min
10°C	10 min
37°C	15 min

Die nun doppelsträngig vorliegenden sgRNA-Oligonukleotide wurden 1:40 in Wasser verdünnt und in dieser Form für den folgenden Restriktionsansatz mit gleichzeitiger Ligation verwendet. Der Restriktions- und Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

px459-Vektor (3,3 ng/µl)	3 µl
sgRNA-Oligonukleotid-Duplex (1:40 verdünnt)	2 µl
FD-Puffer (10x)	5 µl
ATP (10 mM)	1 µl
FastDigest BbsI	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O	10 µl

Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 37°C und dann für 5 min bei 21°C im Thermocycler T-Professional inkubiert.

Um nicht insertierte und religierte doppelsträngige DNA aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, wurde im nächsten Schritt eine Entfernung dieser mit der ATP-abhängigen DNase PlasmidSafe durchgeführt. Der Ansatz dazu setzte sich wie folgt zusammen:

Ligations-Reaktion	11 µl
PlasmidSafe Puffer (10x)	1,5 µl
ATP (10 mM)	1,5 µl
PlasmidSafe DNase	1 µl

Für die Reaktion wurde der Ansatz zunächst für 30 min bei 37°C und anschließend für 30 min bei 70°C im Thermocycler T-Professional inkubiert.

Nach diesem Schritt ist eine Lagerung des Ligationsansatzes bei -20°C möglich.

Im Anschluss an den PlasmidSafe Verdau erfolgte die Transformation von 2 µl des Ligationsansatzes in XL1-Blue *E.coli* Bakterien (siehe 2.2.2.3). Nach dem Erhalt von positiven Bakterienklonen nach Selektion mit Ampicillin erfolgte die Isolation von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen (siehe 2.2.1.1). Anschließend wurde der Einbau des sgRNA-Oligonukleotids in den Vektor px459 durch eine Sanger-Sequenzierung des Plasmids (siehe 2.2.1.6) unter der Verwendung des Sequenzierungsprimers CRISPR-U6 überprüft.

### 2.2.1.6. Sanger-Sequenzierungen

Sanger-Sequenzierungen von Plasmid-DNA und PCR Produkten von genomischer DNA wurden durch die Firma LGC Genomics nach den Angaben des Anbieters durchgeführt. Dazu wurden die unterschiedlichen Protokolle Ready2 Run (Ansätze mit eigenen Sequenzierungsprimern) und Flexi Run (Ansätze mit fertig hinterlegten Sequenzierungsprimern) in Anspruch genommen. Die Analyse der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit der Software SeqMan Pro, DNASTAR.

### 2.2.1.7. Herstellung eines linearen RNA-Transkripts durch *in vitro* Transkription

Für den *Decapping-Assay* (siehe 2.2.3.5) ist die Herstellung eines *in vitro* transkribierten RNA-Moleküls von einer Plasmid-Matrize nötig. Dazu erfolgte zunächst eine PCR-Amplifikation eines DNA-Abschnittes des Plasmides pGL2 mit einer Größe von 202 Basenpaaren mit den PCR Primern T7-Luzi 323-341se und Luzi 479-498as. Die PCR wurde mit vier getrennten 100 µl Ansätzen mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

## Material und Methoden

---

pGL2 DNA-Matrize	500 ng
Primer T7-Luzi 323-341se (1 µg/µl)	1 µl
Primer Luzi 479-498as (1 µg/µl)	1 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer (10x)	10 µl
dNTP Mix (jeweils 10 mM)	1 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

Für die Reaktion wurde folgendes Temperaturprofil für den Thermocycler T-Professional verwendet:

94°C	60 sek	} 35 Zyklen
94°C	30 sek	
58°C	30 sek	
68°C	55 sek	

Nach der PCR wurden die DNA-Amplikons durch eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.1.9) aufgetrennt und durch eine DNA-Isolation aus dem Gel (siehe 2.2.1.1) aufgereinigt. Die Elution erfolgte dabei mit 30 µl H<sub>2</sub>O je PCR Ansatz, sodass ein Gesamtvolumen von 120 µl erreicht wurde.

Anschließend wurde die Reinheit des Eluats aus der Gelextraktion zusätzlich durch eine Ethanolpräzipitation weiter erhöht. Dazu wurden den 120 µl Gesamteluat 12 µl 3 M Natriumacetatlösung und 240 µl Ethanol (100%) zugesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation dieser Präzipitationslösung für 2 Stunden bei -80°C und eine anschließende Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 21000 g. Nach der Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut für 30 min bei 4°C und 21000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Die aufgereinigte DNA wurde nun unter Verwendung einer T7-Promotor-abhängigen RNA-Polymerase (MEGAscript T7 Kit) *in vitro* transkribiert. Zu diesem Zweck wurden zwei getrennte 20 µl Ansätze mit folgender Zusammensetzung verwendet:

aufgereinigte DNA-Matrize	1 µg
ATP-Lösung	1 µl
CTP-Lösung	2 µl
GTP-Lösung	2 µl
UTP-Lösung	2 µl
Reaktions-Puffer (10x)	2 µl
Enzym-Mix	2 µl

Die Inkubation der *in vitro* Transkription erfolgte für 16 Stunden bei 37°C.

Nach der Inkubation wurden die zwei Ansätze vereinigt und einem DNase-Verdau mit DNaseI unterzogen, um die DNA-Matrize aus der Reaktions-Mischung zu entfernen. Zu diesem Zweck wurde der Verdau mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

<i>in vitro</i> Transkriptions Reaktion	40 µl
DNaseI Puffer + MgCl <sub>2</sub> (10x)	4 µl
DNaseI	4 µl

Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch die Aufnahme in 560 µl entsprechendem Lysepuffer aus dem mirVana miRNA Isolation Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die RNA wurde am Ende der Aufreinigung in 100 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Die Qualität der *in vitro* transkribierten RNA wurde im Anschluss mit Hilfe einer Kapillarelektrophorese (siehe 2.2.1.10) überprüft und die Konzentration mittels Nano Drop ND-1000 bestimmt. Die RNA wurde anschließend in Aliquots mit jeweils 4 µg RNA bei -80°C bis zur weiteren Verwendung für den *Decapping-Assay* (siehe 2.2.3.5) gelagert.

### **2.2.1.8. Radioaktives *in vitro* Capping von RNA**

Für die Verwendung im *Decapping Assay* (siehe 2.2.3.5) wird eine *input*-RNA benötigt, welche eine radioaktiv markierte 5'-m<sup>7</sup>-GTP-Cap-Struktur aufweist. Zu diesem Zweck wurde eine *in vitro* Capping-Reaktion der zuvor *in vitro* transkribierten RNA (siehe 2.2.1.7) unter der Verwendung von α<sup>32</sup>P-GTP und dem Kit ScriptCap m<sup>7</sup>-G Capping System durchgeführt. Dieses nutzt das Capping-Enzym des *Vaccina Virus*, welches in der Lage ist in einer dreistufigen Reaktion die Herstellung der 5'-m<sup>7</sup>-GTP-Cap-Struktur durchzuführen. Demnach erfolgt zunächst die Abspaltung eines Phosphatrestes des 5'-Triphosphats der zuvor *in vitro*

transkribierten RNA durch die Phosphataseaktivität, wodurch eine 5'-Diphosphat-RNA entsteht. Anschließend kommt es durch die Guanylyltransferaseaktivität zur Verbindung von  $\alpha^{32}\text{P}$ -GTP und dem 5'-Diphosphat-Rest der RNA. Im Anschluss daran erfolgt die Methylierung der 5'-Cap-Struktur durch die Guanin-7-Methyltransferase-Aktivität unter Verwendung von S-Adenosyl-Methionin (SAM).

Um die *in vitro* Capping-Reaktion durchzuführen, wurden zunächst 4  $\mu\text{g}$  *in vitro* transkribierte RNA mit der sich aus dem Ansatz ergebenden Menge Wasser vermischt und für 10 min bei 65°C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA durch Denaturierung aufzuheben. Anschließend wurde die Capping-Reaktion nach folgendem Ansatz durchgeführt:

ScriptCap Capping Puffer (10x)	2 $\mu\text{l}$
SAM (2 mM)	1 $\mu\text{l}$
ScriptGuard RNase Inhibitor (40 U/ $\mu\text{l}$ )	0,5 $\mu\text{l}$
ScriptCap Capping Enzym (10 U/ml)	1 $\mu\text{l}$
$\alpha^{32}\text{P}$ -GTP	20 $\mu\text{Ci}$
<i>in vitro</i> transkribierte RNA (zuvor denaturiert)	4 $\mu\text{g}$
H <sub>2</sub> O (zuvor für Denaturierung bereits verwendet)	ad 20 $\mu\text{l}$

Der Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA im Reaktionsansatz durch Aufnahme in 580  $\mu\text{l}$  Lysepuffer aus dem mirVana miRNA Isolation Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution der RNA wurde mit 100  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O durchgeführt. Die aufgereinigte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.1.9. Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung und Identifikation von DNA-Molekülen wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Diese nutzt die Eigenschaft von negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und ermöglicht die Größenauftrennung von unterschiedlichen DNA-Fragmenten in einer Agarosegelmatrix durch elektrische Spannung. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente abhängig von der Größe und Konformation sowie der vorherrschenden elektrischen Spannung und der Dichte des Agarosegels. Für die Sichtbarkeit der DNA-Fragmente wird dabei eine Färbung der DNA durch den Farbstoff Ethidiumbromid durchgeführt. Dabei interkaliert Ethidiumbromid in Nukleinsäuren, wodurch es zur

Veränderung des Absorptionsspektrums des Farbstoffes kommt. Durch eine Anregung mit UV-Strahlung emittiert Ethidiumbromid nach Interkalation sichtbares Licht mit einer orangefarbenen Farbe (Wellenlänge 590 nm).

In dieser Arbeit wurden 1-2%-ige (w/v) Agarosegele verwendet. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst und aufgekocht und nach Abkühlen mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und im entsprechenden Gießstand gegossen. Das Gel wurde mit den zuvor mit 6x DNA Loading Dye versetzten DNA-Proben beladen und die Elektrophorese in der Laufkammer Mupid-exU bei 100 V für 30-45 min in 1xTAE-Laufpuffer durchgeführt. Nach dem Gellauf erfolgte die optische Auswertung der DNA-Fragmente mittels des UV-Transilluminators Gel iX Imager.

### **2.2.1.10. Kapillarelektrophorese**

Neben der Agarosegelelektrophorese wurde die Kapillarelektrophorese als alternative Technik für die Analyse von Nukleinsäuren verwendet. Dabei beruht dieses Verfahren auf der Detektion von Nukleinsäuren durch Fluoreszenzfarbstoffe und der Elektrophorese durch eine Mikrokapillare. Für die Kapillarelektrophorese wurden die Kits Agilent RNA 6000 Nano und Agilent RNA 6000 Pico nach Herstellerangaben verwendet. Die Elektrophorese wurde mit dem Gerät Agilent 2100 Bioanalyser ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.2.1.11. Dünnschichtchromatographie**

In dieser Arbeit wurde zur Trennung und zur Identifikation des abgespaltenen radioaktiv markierten  $m^7$ -GDP-Restes nach der *Decapping*-Reaktion (siehe 2.2.3.5) die Technik der Dünnschichtchromatographie verwendet. Diese ermöglicht es  $m^7$ GDP als Produkt der eigentlichen *Decapping*-Reaktion aus der hydrolytischen Spaltung der  $5'm^7$ -GTP-Cap-Struktur und auch der eigentlichen RNA zu trennen und später durch eine Autoradiographie zu detektieren.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden die Platten TLC PEI Cellulose F verwendet und zunächst für 1 h mit 100 ml H<sub>2</sub>O aufrecht in einer Chromatographiekammer bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit einem Volumen von 7 µl punktförmig auf die Platte in einem Abstand von

mindestens 0,6 cm aufgetragen, wobei ein Abstand von 2,5 cm zum unteren Rand der Platte und ein Abstand von 1 cm zu den beiden äußeren Rändern der Platte eingehalten wurden. Nach dem Auftragen der Proben auf die Platte wurde diese bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend unter der Verwendung von 100 ml des Lösungsmittels  $\text{LiCl}_2$  (0,75 M) aufrecht für eine Dauer von 75 min in der Chromatographiekammer bei Raumtemperatur chromatographiert. Die Dünnschichtchromatographieplatte wurde im Anschluss an den Lauf erneut für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in Klarsichtfolie eingehüllt. Anschließen konnte die Autoradiographie des radioaktiv markierten  $m^7$ -GDP-Restes durch das Auflegen eines Films (Fuji Medical X-ray Film SUPER RX) und der Entwicklung des Films mit der Entwicklermaschine Curix 60 detektiert werden.

### **2.2.2. Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.2.1. Kultivierung von Bakterien**

In dieser Arbeit wurden die *E.coli* Stämme TOP10 und XL1-Blue zur Herstellung und Amplifikation von eukaryotischen Expressionsvektoren verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte dabei in Flüssigkulturen (5 ml oder 200 ml LB-Medium) oder auf Agar-Nährböden (LB-Platten). Den Flüssigkulturen und den LB-Platten wurden dabei je nach Bedarf Ampicillin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Kanamycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) als Selektionsantibiotika zugegeben. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht (ca. 16 h) bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert und konnten so am nächsten Tag nach einer Pelletierung durch Zentrifugation für 10 min bei 1390 g und 4°C für weitere Schritte genutzt werden. LB-Platten wurden steril mit einem Drigalskispatel ausplattiert und ebenfalls über Nacht (ca. 16 h) bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.2.2. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien**

Für die Transformation von Bakterien mit Expressionsvektoren wurden chemisch kompetente Bakterien verwendet. Dazu wurden die Bakterienstämme TOP10 und XL1-Blue zunächst in einem Volumen von 5 ml LB-Medium für 16 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurde die optische Dichte der Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 650 nm ermittelt und die Suspension in einem Gesamtvolumen von 150 ml LB-Medium auf eine optische Dichte von 0,05 eingestellt. Die Bakterienkultur wurde anschließend im Schüttelinkubator bei 37°C bis

zu einer optischen Dichte von 0,3-0,5 inkubiert. Die Bakterien wurden dann durch eine Zentrifugation für 10 min bei 1390 g und 4°C pelletiert und in 1/10 Volumen TSS-Puffer (eiskalt) resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension aliquotiert in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.2.2.3. Transformation von Bakterien**

Für die Transformation wurden die zuvor hergestellten chemisch Kompetenten Bakterienstämme TOP10 und XL1-Blue verwendet. Dazu wurden 100 µl der Bakteriensuspension (siehe 2.2.2.2) schonend auf Eis aufgetaut und mit dem gewünschten Plasmid (1-2 µg) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42°C und eine weitere Inkubation für 5 min auf Eis. Dem Transformationsansatz wurde anschließend 700 µl LB-Medium oder 500 µl Soc-Medium zugesetzt und die Bakterien für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden unterschiedliche Mengen des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum steril mit einem Drigalskispatel ausgestrichen und über Nacht (16 h) bei 37°C inkubiert. Am Folgetag ist dann eine Benutzung der Bakterienkolonien auf den LB-Platten für weitere Schritte möglich.

### **2.2.2.4. Dauerkulturen von Bakterien**

Für die langfristige Lagerung von flüssigen Bakterienkulturen wurden diese jeweils in einem gleichen Volumen Glycerin aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## **2.2.3. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.3.1. Lysate für Immundetektion im Western Blot**

Für die Durchführung von Western Blots und der anschließenden Immundetektion der Proteine wurden Zelllysate durch die Verwendung des NET-Lysepuffers oder des Spezial-Lysepuffers hergestellt. In beiden Fällen erfolgten zunächst die Ernte der Zellen in kaltem PBS und das anschließende Pelletieren der Zellen durch eine Zentrifugation für 5 min bei 900 g und 4°C. Die Zellen wurden anschließend in Lysepuffer aufgenommen. Dabei wurden

550 µl Spezial-Lysepuffer oder 1 ml NET-Lysepuffer für die Zellmenge aus dem Maßstab einer 145 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale verwendet. Die Zellen wurden im jeweiligen Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 15 min bei 10000 g und 4°C. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und das Pellet aus Zellbestandteilen verworfen. Die Konzentration der Proteinlysate wurde im Bradford-Assay (siehe 2.2.3.2) bestimmt.

### **2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten nach Bradford**

Die Proteinkonzentrationen der Zelllysate wurden nach Bradford unter Verwendung von Roti-Quant bestimmt. Dabei beruht die Messung auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische Aminosäuren von Proteinen und der anschließenden Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 470 nm zu 595 nm. Dabei verhält sich die Absorption proportional zur Proteinkonzentration (Bradford, 1976).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurden diese zunächst 1:200 in PBS verdünnt. Ein Volumen von 100 µl dieser Verdünnungen sowie einer BSA-Standardreihe (0 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 35 µg/ml BSA in PBS) wurden anschließend als technisches Triplikat in eine 96-well-Platte pipettiert. Zu den Proben wurde anschließend 100 µl der 40%-igen (in H<sub>2</sub>O verdünnt) Roti-Quant Färbelösung hinzugegeben und die optische Dichte bei 595 nm im Microplate Spectrophotometer gemessen. Die Berechnung der unbekanntenen Proteinkonzentration erfolgte an Hand der Standardreihe.

### **2.2.3.3. Diskontinuierliche SDS-PAGE**

In dieser Arbeit wurde für die Auftrennung, Analyse und Identifikation von Proteinen die Methode der Natriumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970). Bei dieser werden Proteine in der Polyacrylamidgelmatrix in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse und der Gesamtladung getrennt. SDS bewirkt dabei durch die Bindung an hydrophobe Bereiche der Proteine eine Denaturierung der Proteinstruktur sowie die Einführung einer negativen Nettoladung der Proteine. Aufgrund dieser negativen Ladung bewegen sich die Proteine anschließend bei der PAGE im elektrischen Feld zur Anode, wodurch die Proteine nach der Masse aufgetrennt

werden. Die Gelmatrix setzt sich dabei aus Sammelgel (5% Acrylamidgehalt) und dem eigentlichen Trenngel zusammen. Der Acrylamidgehalt im Trenngel wurde dabei je nach Fragestellung und zu untersuchendem Protein in der Konzentration von 7-12% variiert.

Das Sammelgel (5 ml Volumen) und ein exemplarisches Trenngel (27 ml Volumen) mit einem Acrylamid-Gehalt von 10% setzten sich dabei wie folgt zusammen:

	<u>Sammelgel (5%; 5 ml)</u>	<u>Trenngel (10%; 27 ml)</u>
Sammelgelpuffer	0,63 ml	
Trenngelpuffer		10,3 ml
Rotiphorese Gel 30	0,84 ml	9 ml
50% (v/v) Glycerol	0,45 ml	2,4 ml
2% (w/v) SDS	0,25 ml	1,35 ml
H <sub>2</sub> O	2,8 ml	3,8 ml
40% (w/v) APS	15 µl	41 µl
TEMED	10 µl	27 µl

Das Trenngel und das Sammelgel wurden sequentiell gegossen und mit den Proben beladen, welche zuvor im Verhältnis von 4:1 mit Roti-Load 1 Auftragspuffer versetzt und anschließend für 10 min bei 95°C denaturiert wurden. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Laemmli-Laufpuffer in den entsprechenden Elektrophoresekammern bei 35-50 mA pro Gel. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Immundetektion der Proteine im Western Blot verwendet.

### **2.2.3.4. Western Blot und Immundetektion von Proteinen**

Um die Immundetektion von Proteinen zu ermöglichen, wurde die Methode des Western Blots mit anschließendem Nachweis der Proteine durch eine elektrochemische Lichtreaktion (ECL) durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst der elektrische Transfer der Proteine aus der SDS-PAGE (siehe 2.2.3.3) im *semi dry*-Verfahren auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran. Zu diesem Zweck wurden auf die Anode der Transferkammer 2 Filterpapiere (zuvor getränkt in 1x Blotpuffer), die PVDF-Membran, das Proteingel und 2 weitere Filterpapiere (zuvor getränkt in 1x Blotpuffer) in dieser Reihenfolge aufeinander gestapelt. Die Elektrophorese erfolgte anschließend für 2 h bei einer konstanten Stromstärke von 0,75 mA/cm<sup>2</sup> der PVDF-Membran. Nach dem Transfer erfolgte die Kontrolle der Transferqualität

durch eine Färbung der PVDF-Membran mit einer Ponceau S-Färbelösung. Nach Dokumentation der Anfärbung wurde die Membran durch mehrmaliges Waschen in TBST-Puffer entfärbt. Die unspezifischen Bindestellen der Membran wurden anschließend durch Inkubation mit 5% (w/v) Magermilchpulver (MP) in TBST-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der PVDF-Membran mit einer Primärantikörperlösung (verdünnt in 5% (w/v) Magermilchpulver/TBST) über Nacht bei 4°C. Darauf wurde die Primärantikörperlösung entfernt und die Membran durch dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer für jeweils 5 min von ungebundenen Antikörpern befreit. Anschließend wurde die Membran mit dem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper mit einer Verdünnung von 1:2000 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde danach erneut dreimal mit TBST-Puffer für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteine durch Chemilumineszenz mit den Reagenzien Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent oder Immobilon Western Chemiluminescent HRP-Substrate nach jeweiligen Herstellerangaben und unter Verwendung des Geräts Chemi Doc Touch Imaging System oder der Filme Fuji Medical X-ray Film SUPER RX mit anschließender Entwicklung der Filme in der Entwicklermaschine Curix 60.

### **2.2.3.5. Decapping-Assay**

In dieser Arbeit wurde der *Decapping-Assay* angewendet, um die *Decapping*-Aktivität eines immunpräzipitierten Proteinkomplexes zu ermitteln. Dabei beruht das Prinzip des *Decapping-Assays* auf der hydrolytischen Abspaltung einer zuvor radioaktiv markierten 5'-*Cap*-Struktur einer *in vitro* transkribierten RNA (siehe 2.2.1.7 und 2.2.1.8) durch die katalytische Untereinheit des *Decapping*-Komplexes (DCP2), welche im immunpräzipitierten Proteinkomplex vorliegt. Die Detektion der abgespaltenen 5'-*Cap*-Struktur ( $m^7$ -GDP) erfolgt dabei durch eine Dünnschichtchromatographie und anschließender Autoradiographie. Dabei wird ein proportionaler Zusammenhang zwischen der *Decapping*-Aktivität und der Signalstärke in der Autoradiographie angenommen (Zhang et al, 1999).

Für den *Decapping-Assay* erfolgte zunächst die Transfektion von Expressionsvektoren für GFP-Fusionsproteine in Zellen (siehe 2.2.4.3). Die Zellen wurden nach der Transfektion geerntet (siehe 2.2.4.2) und unter Verwendung des NET-Lysepuffers lysiert (siehe 2.2.3.1). Zeitgleich erfolgte die Equilibrierung von 10  $\mu$ l Agarose-*Beads* GFP-Trap\_A je

Versuchsansatz durch dreimaliges Waschen in NET-Lysepuffer und Zentrifugation für je 1 min bei 7600 g und 4°C. Anschließend wurden 1 mg des Proteinlysates zusammen mit den equilibrierten Agarose-*Beads* in einem Totalvolumen von 1000 µl für 2 h rotierend bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Agarose-*Beads* dreimal mit je 1 ml NET-Lysepuffer, einmal mit 1 ml NET2-Waschpuffer und in einem finalen Waschschrift mit 1 ml *Decapping*-Puffer (1x) gewaschen. Die Agarose-*Beads* wurden dabei jeweils durch Zentrifugation für 1 min bei 7600 g und 4°C pelletiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Puffer quantitativ entfernt und die Agarose-*Beads* in 10 µl *Decapping*-Puffer (1x) resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 3,6 µl *in vitro* transkribierter RNA mit radioaktiver 5'-*Cap*-Strukturmarkierung (siehe 2.2.1.8) und 1,51 µl *Decapping-Reaction*-Puffer gemischt und für 30 min bei 30°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die verbleibenden Agarose-*Beads* wurden in der Zwischenzeit in 40 µl Roti-Load 1 und 40 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 10 min bei 95°C inkubiert und für eine Immunodetektion mittels SDS-PAGE und Western Blot (siehe 2.2.3.3 und 2.2.3.4) weiter verwendet. Die *Decapping*-Reaktion wurde durch Zugabe von 1,67 µl EDTA (0,5 M) gestoppt und direkt weiter für die Dünnschichtchromatographie (siehe 2.2.1.11) verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Dünnschichtchromatographie wurden 7 µl des Reaktionsvolumens verwendet.

### **2.2.4. Zellkultur-Methoden**

#### **2.2.4.1. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese zunächst von den Zellkulturgefäßen abgelöst (siehe 2.2.4.2) und anschließend durch eine Zentrifugation für 5 min bei 900 g und 4°C pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in entsprechende Kryogefäße überführt und in diesen langsam mit Hilfe des Nalgene Cryo Freezing Container bei -80°C eingefroren und für die längere Lagerung in einen geeigneten Stickstoff-Tank überführt.

Zum Auftauen von Zellen wurden diese zügig im Wasserbad bei 37°C erwärmt und anschließend durch eine Zentrifugation für 5 min bei 900 g pelletiert. Das Medium der Zellen wurde zur Entfernung des enthaltenen DMSO verworfen und die Zellen in frischem DMEM-Vollmedium resuspendiert und in entsprechende Zellkulturgefäße gegeben und weiter kultiviert.

### 2.2.4.2. Kultivieren, Passagieren, Stimulation und Ernten von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM-Vollmedium (nach Bedarf mit 1 µg/ml Puromycin) im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 96% Luftfeuchtigkeit und 6% CO<sub>2</sub>-Gehalt.

Die Zellen wurden in variablen Verhältnissen passagiert, wofür zunächst das Zellkultur-Medium entfernt und die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen wurden. Nach Entfernung des PBS wurden Zellen mit einem Volumen von 1-2 ml (je 145 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale) Trypsin/EDTA benetzt, im CO<sub>2</sub>-Inkubator für 2-3 min inkubiert und anschließend durch Zugabe von frischem DMEM-Vollmedium resuspendiert und abschließend in entsprechenden Verhältnissen auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

Für die Stimulation der Zellen wurden unterschiedliche Substanzen verwendet. Dabei wurden die Substanzen direkt zum Zellmedium gegeben und durch Schwenken verteilt. Dabei wurden folgende Endkonzentrationen der unterschiedlichen Substanzen verwendet:

IL-1	10 ng/ml
Actinomycin D	5 µg/ml
Flavopiridol	10 µM
PHA-408	5 µM
MG132	10 µM
Cycloheximid	10 µg/ml

Für die Experimente wurden die Zellen am Tag vor der eigentlichen Stimulation je nach Experiment in Zellkulturschalen oder in µ-Slide VI 0.4 (Ibidi) je Kanal folgendermaßen ausgesät:

	<u>145 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale</u>	<u>µ-Slide VI 0.4 (Ibidi) je Kanal</u>
HeLa-Zellen	3,4x10 <sup>6</sup> Zellen in 15 ml Zellkulturmedium	9000 Zellen in 130 µl Zellkulturmedium
HEK293IL1R-Zellen	6,8x10 <sup>6</sup> Zellen in 15 ml Zellkulturmedium	18000 Zellen in 130 µl Zellkulturmedium

Für die Ernte der Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml PBS (je 145 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale) mit einem Zellschaber von den Zellkulturgefäßen abgelöst und in

geeignete Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation für 5 min bei 900 g pelletiert. Anschließend wurde das PBS quantitativ entfernt und die Zellen im entsprechenden Lysepuffern resuspendiert oder zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.4.3. Transiente Transfektion von Zellen mit der Calciumphosphat-Methode**

Zur Transfektion von Zellen mit eukaryotischen Expressionsvektoren wurde die Calciumphosphat-Methode verwendet. Diese beruht auf dem Prinzip der Endocytose von Calciumphosphatpräzipitaten, welche einen Komplex mit DNA und somit den Expressionsvektoren ausbilden.

Für den Transfektionsansatz im Maßstab einer  $145\text{ cm}^2$  Zellkulturschale wurden dabei zunächst  $2250\text{ }\mu\text{l}$  HEBS-Puffer (2x),  $2500\text{ }\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und  $80\text{ }\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in einem Reaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurde  $315\text{ }\mu\text{l}$  eiskalte  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (2 M) tropfenweise dazu gegeben. Der Ansatz wurde durch Vortexen gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Volumen des Transfektionsansatzes tropfenweise zu den Zellen gegeben und die Zellen 4-6 h im  $\text{CO}_2$ -Inkubator inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte für HeLa-Zellen zunächst ein Glycerolschock durch eine Inkubation der Zellen für 3 min mit 5 ml Schockmedium je  $145\text{ cm}^2$  Zellkulturschale. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml warmem PBS gewaschen, um überschüssige Calciumphosphatpräzipitate zu entfernen. Nach dem Waschen wurde den Zellen 15 ml frisches DMEM-Vollmedium zugegeben und die Zellen wurden für 20-24 h im  $\text{CO}_2$ -Inkubator kultiviert.

Für den Transfektionsansatz in  $\mu$ -Slide VI 0.4 (Ibidi) wurden zunächst  $112,5\text{ }\mu\text{l}$  HEBS-Puffer (2x),  $125\text{ }\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  und  $9\text{ }\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in einem Reaktionsgefäß vermischt. Anschließend wurde  $15,75\text{ }\mu\text{l}$  eiskalte  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (2 M) tropfenweise dazu gegeben. Der Ansatz wurde durch Vortexen gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden  $50\text{ }\mu\text{l}$  Zellkulturmedium aus jedem Kanal entnommen. Von diesen  $50\text{ }\mu\text{l}$  Zellkulturmedium wurde ein Volumen von  $30\text{ }\mu\text{l}$  verworfen und durch  $30\text{ }\mu\text{l}$  des jeweiligen Transfektionsansatzes ersetzt. Die Mischung aus Zellkulturmedium und Transfektionsansatz wurde zurück in den Kanal pipettiert und dieser zur besseren Vermischung zweimal durchgespült. Die Zellen wurden auf diese Art 4-6 h im  $\text{CO}_2$ -Inkubator inkubiert. Nach der

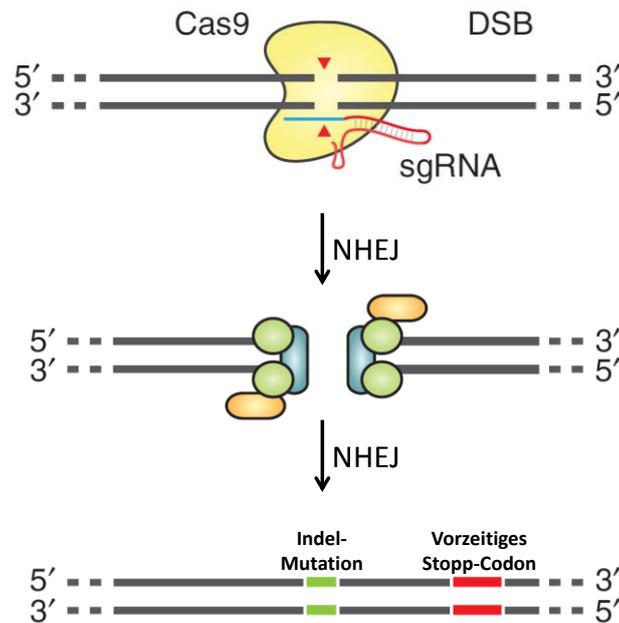
Inkubation erfolgte bedarfsweise für HeLa-Zellen zunächst ein Glycerolschock durch eine Inkubation der Zellen für 3 min mit 150 µl Schockmedium je Kanal. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 100 µl warmem PBS gewaschen, um überschüssige Calciumphosphat-Kristalle zu entfernen. Nach dem Waschen wurde den Zellen 130 µl frisches DMEM-Vollmedium zugegeben und für 20-24 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

Für die Experimente wurden die Zellen am Tag vor der eigentlichen Transfektion folgendermaßen ausgesät:

	<u>145 cm<sup>2</sup> Zellkulturschale</u>	<u>µ-Slide VI 0.4 (Ibidi) je Kanal</u>
HeLa-Zellen	3x10 <sup>6</sup> Zellen in 15 ml Zellkulturmedium	6000 Zellen in 130 µl Zellkulturmedium
HEK293IL1R-Zellen	6x10 <sup>6</sup> Zellen in 15 ml Zellkulturmedium	12000 Zellen in 130 µl Zellkulturmedium

#### **2.2.4.4. Stabile Transfektion zur Herstellung von CRISPR/Cas9-Zelllinien**

Die CRISPR/Cas9-Technologie beruht im Prinzip auf einer Art des „adaptiven Immunsystems“ aus Bakterien und Archaeen. Dabei ermöglicht dieses System diesen Mikroorganismen durch die Expression einer CRISPR-RNA und der Cas9-Nuklease eine zielgerichtete Degradation von fremden Nukleinsäuren, welche vor allem durch Bakteriophagen sezerniert werden (Barrangou et al, 2007). Die Anordnung der nötigen Komponenten dieses Systems liegt in Form von Gen-*clustern* vor, welche Gene für das Cas9-Protein, nicht-kodierende RNAs und repetitive Elemente beinhalten. Zwischen den repetitiven Elementen finden sich Sequenzabschnitte (*Protospacer*), welche von fremden Nukleinsäuren abgeleitet sind.



**Abb.2.1: Schematische Darstellung der Funktionsweise der CRISPR/Cas9-Technologie.** Die sgRNA-abhängige Rekrutierung der Cas9-Nuklease an den genomischen Ziellokus führt zur Einführung eines DNA-Doppelstrangbruchs (DSB). Dieser kann anschließend durch den zelleigenen Mechanismus des *nonhomologous end joining* (NHEJ) repariert werden. Bei dieser fehleranfälligen Reparatur kann es jedoch zu Insertions- und Deletions-Mutationen (Indel-Mutationen) kommen, welche die Entstehung eines vorzeitigen Stop-Codons bedingen. Auf diese Weise kommt es zum *knockdown* des gewünschten Zielgens. Die Abbildung wurde verändert nach Ran et al, 2013 (Lizenznummer: 4165921435638) dargestellt.

Diese bilden zusammen mit den repetitiven Elementen die CRISPR-RNA, wobei jeder *Protospacer* mit einem zusätzlichen kurzen Motiv (PAM) assoziiert ist. Dieses CRISPR/Cas9-System kann an eukaryotische Zellen adaptiert werden, um zielgerichtete Veränderungen der DNA vorzunehmen (Cong et al, 2013; Mali et al, 2013). Dabei beruhen diese Veränderungen im Wesentlichen darauf, dass eine Rekrutierung der Cas9-Nuklease durch eine *single-guide* RNA (sgRNA) an einen genomischen Locus erfolgt. Die sgRNA besteht aus einer *guide* RNA, welche eine Größe von 20 Nukleotiden aufweist, und einem daran fusionierten RNA-*scaffold*. Das Design und die Wahl der sgRNA sind bei der Durchführung des Experiments von zwei Faktoren abhängig. Zum einen muss die sgRNA auf der Länge von 20 Nukleotiden komplementär zur gewünschten, genomischen Zielsequenz sein, sodass eine Interaktion der sgRNA mit der genomischen DNA durch Watson-Crick-Basenpaarung möglich ist. Zum anderen muss die genomische DNA-Sequenz unmittelbar nach dem letzten Nukleotid der sgRNA das spezifische PAM-Motiv aufweisen.

In dieser Arbeit wurde ein Cas9-System verwendet, welches von *Streptococcus pyogenes* abgeleitet wurde. Daraus ergibt sich auch die Anforderung an das PAM-Motiv, wobei dieses

das DNA-Triplet NGG (N: beliebiges Nukleotid) aufweisen muss. Nach der Bindung der sgRNA an den spezifischen DNA-Lokus erfolgt die Rekrutierung der Cas9-Nuklease. Durch die Bindung des Cas9-Proteins an die DNA kommt es durch die Nukleaseaktivität zur Einführung eines DNA-Doppelstrangbruchs. Der entstehende DNA-Doppelstrangbruch kann anschließend durch die zelleigenen Mechanismen des *nonhomologous end joining* (NHEJ) oder *homology-directed repair* (HDR) repariert werden. Bei der Abwesenheit einer Reparaturmatrize und der darauf folgenden Reparatur der DNA durch das fehleranfällige NHEJ kann es aber zu Insertions- oder Deletions-Mutationen (Indel-Mutationen) kommen. Diese Mutationen können anschließend die Entstehung eines vorzeitigen Stop-Codons zur Folge haben, wodurch die Expression des Zielproteins nicht mehr stattfinden kann und es somit zur Depletion des Proteins aus dem Zellsystem kommt (Abb.2.1, (Ran et al, 2013)).

Zur Etablierung von Zellsystemen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* verschiedener Proteine wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Expressionsvektoren verwendet. Die Transfektion dieser erfolgte zunächst nach der üblichen Vorgehensweise der Calciumphosphat-Transfektion (siehe 2.2.4.3) mit je zwei 145 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen pro Ansatz. Am Tag nach der erfolgten Transfektion wurden die Zellkulturschalen in einem Verhältnis von 1:3 passagiert und dem DMEM-Vollmedium Puromycin (1 µg/ml) zugesetzt, um so eine Selektion der positiv mit dem Expressionsvektor transfizierten Zellen zu ermöglichen. Die Zellen wurden anschließend weiter kultiviert und selektiert, wobei nach Bedarf ein Mediumwechsel oder weiteres Passagieren erfolgte, bis eine stabile Kultur der Zelllinie entstand. Die so hergestellten Zelllinien wurden dann für den weiteren Verlauf der Kultivierung konstant in puromycinhaltigem Medium kultiviert und für Experimente und Analysen verwendet.

### **2.2.5. Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.5.1. Indirekte Immunfluoreszenz**

Zur Detektion und Analyse der zellulären Lokalisation von Proteinen sowie deren Expression wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenz (IF) verwendet.

Dazu erfolgte zunächst die Aussaat der Zellen in µ-Slides VI 0.4 (Ibidi) in einem Volumen von 30 µl DMEM-Vollmedium und einer Zellzahl von 9000 Zellen je Kanal. Nach der Aussaat wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 100 µl DMEM-

Vollmedium dazu gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 20-24 h kultiviert und standen so am nächsten Tag für das Versuchsprotokoll zu Verfügung. Für die Durchführung der IF erfolgten zunächst das Entfernen des Zellkulturmediums und ein zweimaliges Waschen der Zellen innerhalb von 5 min mit je 150 µl HBSS. Die Zellen wurden anschließend durch eine Inkubation für 5 min mit 100 µl 4% Paraformaldehyd fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten für 5 min mit 150 µl HBSS erfolgte eine Inkubation der Zellen für 20 min mit 100 µl Blockierlösung (10% (v/v) Normal Goat Serum in 0,1% (w/v) Saponin/HBSS). Anschließend wurde die Blockierlösung entfernt und die Zellen für 2 h mit 100 µl Primärantikörperlösung (Antikörperverdünnung in 0,1% (w/v) Saponin/HBSS) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen für je 10 min mit 150 µl 0,1% (w/v) Saponin/HBSS wurden die Zellen für 2 h mit 100 µl fluorophorgekoppelter Sekundärantikörperlösung (Antikörperverdünnung in 0,1% (w/v) Saponin/HBSS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für je 10 min mit 150 µl HBSS gewaschen und für die Anfärbung der Zellkerne für 5 min mit 100 µl Hoechst/HBSS (1 µM) inkubiert. Die Sekundärantikörperlösung wurde entfernt und die Zellen zweimal innerhalb von 5 min mit 150 µl HBSS gewaschen und anschließend mit 100 µl 30% (v/v) Glycerol/HBSS für die Lagerung versetzt. Die mikroskopischen Aufnahmen der Fluoreszenzbilder erfolgten mit den Mikroskopen IRE2 und DMi8 von Leica und den entsprechenden Computerprogrammen (FW4000 bzw. LasX, Leica).

### **2.2.5.2. Immuno-Proximity Ligation Assay (PLA)**

Für die Detektion und die Analyse der zellulären Lokalisation von Proteinkomplexen wurde die antikörperbasierte Technik der Immuno-PLA verwendet. Dabei wurde die Anfärbung der Proteinkomplexe durch PLA unter der Verwendung des Duolink-Kits der Firma Sigma-Aldrich um eine zusätzliche indirekte Immunfluoreszenz erweitert. Für die PLA wurden dabei zwei Primärantikörper aus verschiedenen Spezies gegen unterschiedliche Proteine oder unterschiedliche Epitope desselben Proteins verwendet. Nach der Bindung von oligonukleotidgekoppelten Sekundärantikörpern und der anschließenden Hybridisierung der Oligonukleotide und der Ligation dieser, kommt es dann zu einer signalverstärkenden *Rolling-Circle*-Amplifikation der DNA-Sequenz der Oligonukleotide. An diese amplifizierte DNA-Sequenz hybridisieren wiederum komplementäre fluorophorgekoppelte Oligonukleotide, wodurch die Detektion durch eine Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht wird.

Als untere Nachweisgrenze für den maximalen Abstand der Primärantikörper werden dabei 30 nm angegeben (Soderberg et al, 2006).

Für die PLA erfolgte zunächst die Aussaat der Zellen in  $\mu$ -Slides VI 0.4 (Ibidi) in einem Volumen von 30  $\mu$ l DMEM-Vollmedium und einer Zellzahl von 9000 Zellen je Kanal. Nach der Aussaat wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 100  $\mu$ l DMEM-Vollmedium pro Kanal dazu gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 20-24 h kultiviert und standen so am nächsten Tag für das Versuchsprotokoll zu Verfügung. Demnach erfolgten zunächst das Entfernen des Zellkulturmediums und ein zweimaliges Waschen der Zellen innerhalb von 5 min mit je 150  $\mu$ l HBSS. Die Zellen wurden anschließend durch eine Inkubation für 5 min mit 100  $\mu$ l 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend durch zwei weitere Waschschrte für 5 min mit 150  $\mu$ l 0,1% (w/v) Saponin/HBSS permeabilisiert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen für 30 min mit 100  $\mu$ l Blockierlösung (Duolink-Kit) bei 37°C. Anschließend wurde die Blockierlösung entfernt und die Zellen für 1 h mit 100  $\mu$ l Primärantikörperlösung (Antikörperverdünnung in 0,1% (w/v) Saponin/HBSS) bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen für je 5 min mit 150  $\mu$ l Puffer A (Duolink-Kit) wurden die Zellen für 1 h mit 50  $\mu$ l Sekundärantikörperlösung (PLA-*Probe*- und Sekundärantikörperverdünnung in 0,1% (w/v) Saponin/HBSS) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für je 5 min mit 150  $\mu$ l Puffer A gewaschen und dann für 30 min mit 50  $\mu$ l Ligaselösung (Duolink-Kit) bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen dreimal für je 2 min mit 150  $\mu$ l Puffer A gewaschen und dann für 100 min mit 50  $\mu$ l Polymeraselösung (Duolink-Kit) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit 150  $\mu$ l Puffer B (Duolink-Kit) und zweimal für 1 min mit 150  $\mu$ l HBSS gewaschen und für die Anfärbung der Zellkerne für 5 min mit 100  $\mu$ l Hoechst/HBSS (1  $\mu$ M) inkubiert, die Zellen zweimal innerhalb von 5 min mit 150  $\mu$ l HBSS gewaschen und anschließend mit 100  $\mu$ l 30% (v/v) Glycerol/HBSS für die Lagerung versetzt. Die mikroskopischen Aufnahmen der Fluoreszenzbilder erfolgten mit den Mikroskopen IRE2 und DMi8 von Leica und den entsprechenden Computerprogrammen (FW4000 bzw. LasX, Leica).

### 2.2.5.3. Immuno-RNA-*in situ* Hybridisierung

Für die Detektion und die Analyse der zellulären Lokalisation und Expression von mRNAs und der relativen Lokalisation von mRNAs zu Proteinen wurde die Technik der Immuno-RNA-*in situ* Hybridisierung verwendet. Die Durchführung der Experimente erfolgte unter Verwendung des Kits Quantigene View RNA ISH Cell Assay von Affymetrix und einer Erweiterung des Protokolls um eine indirekte Immunfluoreszenz. Dabei wird die Detektion der mRNA durch eine sequentielle Hybridisierung des Sondengemischs (*probe sets*), der *pre amplifier*, der *amplifier* und der *label probe* ermöglicht, wobei durch diese sequentielle Hybridisierung eine starke Signalverstärkung erreicht wird und die Möglichkeit der Detektion von einzelnen mRNA-Molekülen innerhalb der Zelle besteht (Battich et al, 2013; Player et al, 2001).

Dazu erfolgte zunächst die Aussaat der Zellen in  $\mu$ -Slides VI 0.4 (Ibidi) in einem Volumen von 30  $\mu$ l DMEM-Vollmedium und einer Zellzahl von 9000 Zellen je Kanal. Nach der Aussaat wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend 100  $\mu$ l DMEM-Vollmedium dazu gegeben und dann für 20-24 h kultiviert, sodass die Zellen am nächsten Tag für das Versuchsprotokoll zur Verfügung standen. Dafür erfolgten zunächst das Entfernen des Zellkulturmediums und ein zweimaliges Waschen der Zellen für je 3 min mit 150  $\mu$ l PBS. Die Zellen wurden anschließend durch eine Inkubation über Nacht mit 100  $\mu$ l 4% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert und anschließend dreimal für je 3 min mit 150  $\mu$ l PBS gewaschen und dann durch die Zugabe von 50  $\mu$ l Detergenzlösung (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) für 5 min permeabilisiert. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen für 3 min mit 150  $\mu$ l PBS und die Inkubation der Zellen für 3 h mit 50  $\mu$ l des jeweiligen genspezifischen *probe sets* (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) bei 40°C. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 3 min mit 150  $\mu$ l Waschpuffer (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) gewaschen und dann für 30 min mit 50  $\mu$ l der *pre amplifier*-Lösung (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) bei 40°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen für je 3 min mit 150  $\mu$ l Waschpuffer (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) wurden die Zellen für 30 min mit 50  $\mu$ l der *amplifier*-Lösung (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) bei 40°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für je 3 min mit 150  $\mu$ l Waschpuffer (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) gewaschen und dann für 30 min mit 50  $\mu$ l *Label-Probe*-Lösung (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) bei 40°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen zweimal für je 2 min mit 150  $\mu$ l Waschpuffer (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit), einmal für 10 min mit 150  $\mu$ l Waschpuffer

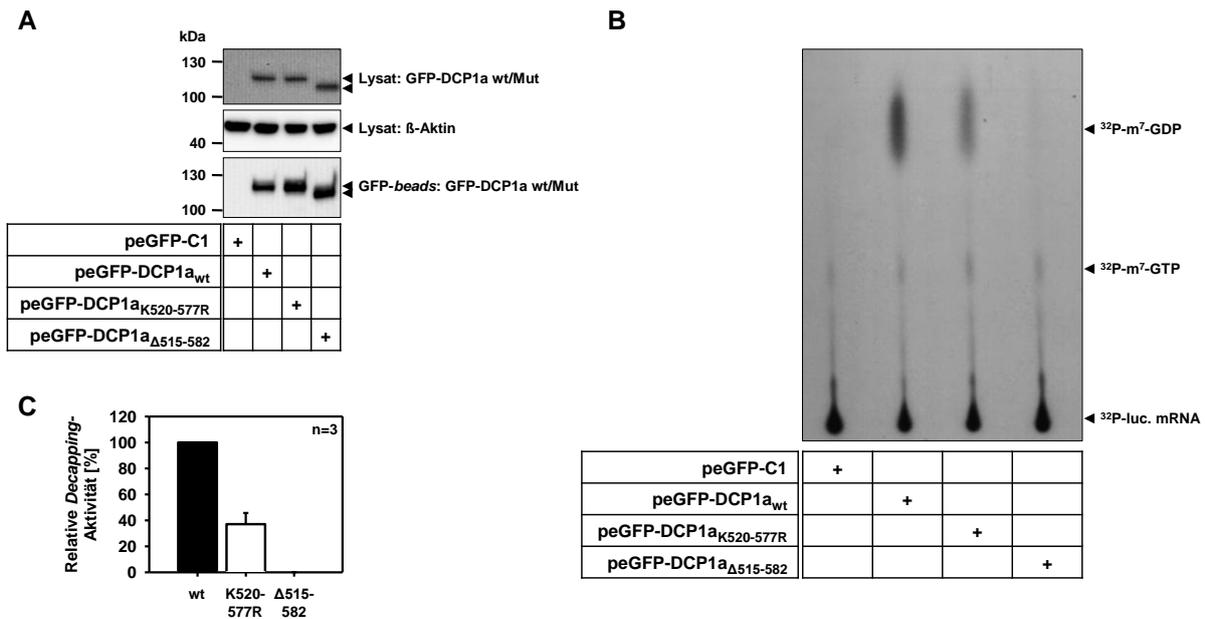
(Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) und zweimal für 1 min mit 150  $\mu$ l 0,1% (w/v) Saponin/HBSS gewaschen und dann für 30 min mit 100  $\mu$ l Blockierlösung (10% (v/v) Normal Goat Serum in 0,1% (w/v) Saponin/HBSS) blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für 1 h mit 100  $\mu$ l der Primärantikörperlösung (Antikörperverdünnung in 0,1% (w/v) Saponin/HBSS) bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen der Zellen für je 10 min mit 150  $\mu$ l 0,1% (w/v) Saponin/HBSS wurden die Zellen für 1 h mit 100  $\mu$ l Sekundärantikörperlösung (Antikörperverdünnung in 0,1% (w/v) Saponin/HBSS) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für je 10 min mit 150  $\mu$ l HBSS gewaschen und für die Anfärbung der Zellkerne für 5 min mit 100  $\mu$ l Hoechst/HBSS (1  $\mu$ M) inkubiert, dieses dann entfernt und die Zellen zweimal innerhalb von 5 min mit 150  $\mu$ l HBSS gewaschen und anschließend mit 100  $\mu$ l einer 30%-igen (v/v) Glycerol/HBSS-Lösung für die Lagerung versetzt. Die mikroskopischen Aufnahmen der Fluoreszenzbilder erfolgten mit den Mikroskopen IRE2 und DMi8 von Leica und den entsprechenden Computerprogrammen (FW4000 bzw. LasX, Leica).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Regulation der zellulären *Decapping*-Aktivität durch DCP1a, TRAF6 und posttranslationale Modifikationen

Die Deadenylierung und die darauf folgende Hydrolyse der 5'-m<sup>7</sup>-Guanosin-Cap-Struktur von messenger RNAs (mRNAs) durch die katalytische Untereinheit des *Decapping*-Komplexes (DCP2) stellen einen zentralen Mechanismus zur Regulation des mRNA-Abbaus in Eukaryoten dar (Sheth & Parker, 2003). Dabei wird nach der Abspaltung der 5'-m<sup>7</sup>-Guanosin-Diphosphatgruppe das Monophosphatende der mRNA durch die Exoribonuklease XRN1 erkannt und in 5'-3'-Richtung abgebaut (Schoenberg & Maquat, 2012). DCP1a kann dabei durch Interaktionen mit DCP2 die katalytische Aktivität von DCP2 und somit die *Decapping*-Reaktion regulieren (She et al, 2008). Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass DCP1a wiederum Interleukin (IL)-1 abhängig posttranslational durch Phosphorylierung (an Serin 315) und Ubiquitylierung (verteilt über das gesamte Protein) modifiziert werden kann (Rzeczkowski et al, 2011; Tenekeci et al, 2016). Einen wichtigen Bereich von DCP1a stellt dabei der C-Terminus dar, welcher die Trimerisierungsdomäne beinhaltet und ebenfalls ubiquityliert werden kann (Tenekeci et al, 2016; Tritschler et al, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst die Auswirkungen von Manipulationen des C-Terminus von DCP1a auf die *Decapping*-Aktivität eines durch Präzipitation aufgereinigten Proteinkomplexes untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden bereits vorhandene Plasmide zur Expression von verschiedenen GFP-DCP1a-Varianten (peGFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub> und peGFP-DCP1a<sub>Δ515-582</sub>) verwendet. GFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub> weist Veränderungen von allen sechs Lysin-Aminosäuren im C-Terminus von DCP1a zu Arginin auf, sodass z.B. eine Ubiquitylierung in diesem Bereich nicht mehr möglich ist. GFP-DCP1a<sub>Δ515-582</sub> stellt eine trunkierte Version von DCP1a dar, bei welcher der gesamte C-Terminus und somit auch die Trimerisierungsdomäne fehlen. Diese Veränderungen von DCP1a haben weiterhin unmittelbare Auswirkungen auf den *P-Body*-Phänotyp einer Zelle. So zeigen Immunfluoreszenz-Experimente, dass eine Expression von GFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub> in Zellen zu einer starken Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle führt, während die Expression von GFP-DCP1a<sub>Δ515-582</sub> eine Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung zur Folge hat (Rzeczkowski et al, 2011; Tenekeci et al, 2016).



**Abb.3.1: Die endogene Decapping-Aktivität eines GFP-DCP1a-Proteinkomplexes ist von den sechs C-terminalen Lysin-Aminosäuren von DCP1a abhängig.** HEK293IL-1R-Zellen wurden mit GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>wt</sub>), einer sechsfach Lysin Mutante (peGFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub>), einer C-terminalen Deletionsmutante (peGFP-DCP1a<sub>Δ515-582</sub>) oder dem Kontrollvektor (peGFP-C1) transfiziert. Anschließend erfolgte die Präzipitation der GFP-DCP1a-Proteinkomplexe mit GFP-Trap<sub>A</sub>-Beads. Für die Zelllysate und die präzipitierten Proteinkomplexe wurde ein Proteinnachweis mittels Western Blot durchgeführt (A). Der Decapping-Assay wurde unter Verwendung einer <sup>32</sup>P-markierten, *in vitro* transkribierten Template-mRNA (<sup>32</sup>P-luc.mRNA) durchgeführt und das <sup>32</sup>P-m<sup>7</sup>-GDP-Produkt der 5'-Cap-Hydrolyse durch Dünnschichtchromatographie mit anschließender Autoradiographie detektiert (B). Die densitometrische Signalstärke für das <sup>32</sup>P-m<sup>7</sup>-GDP-Produkt (bestimmt mittels ImageJ) wurde auf die jeweils präzipitierte GFP-DCP1a-Proteinmenge (densitometrisch bestimmt mittels ImageJ) normiert und als Mittelwert (± Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt (C). Teile dieser Daten wurden bereits in Tenekeci et al, 2016 publiziert.

Die genannten Plasmide wurden parallel zu der Leervektor-Kontrolle (peGFP-C1) und der unveränderten Variante von GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>wt</sub>) in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert und ein Decapping-Assay zur Bestimmung der Decapping-Aktivität eines durch Präzipitation aufgereinigten GFP-DCP1a-Proteinkomplexes durchgeführt. Die Präzipitation des GFP-DCP1a-Proteinkomplexes wurde mit GFP-Trap<sub>A</sub>-Beads durchgeführt und das <sup>32</sup>P-m<sup>7</sup>-GDP-Produkt der Decapping-Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie detektiert. Parallel dazu erfolgte der Proteinnachweis von GFP-DCP1a in den Zelllysaten sowie in der Präzipitation mit GFP-Trap<sub>A</sub>-Beads mittels Western Blot-Analysen. Anschließend wurden die densitometrisch bestimmten Signalintensitäten der <sup>32</sup>P-m<sup>7</sup>-GDP-Produkte aus der Dünnschichtchromatographie auf die jeweils präzipitierte GFP-DCP1a-Menge normiert und als Decapping-Aktivität dargestellt.

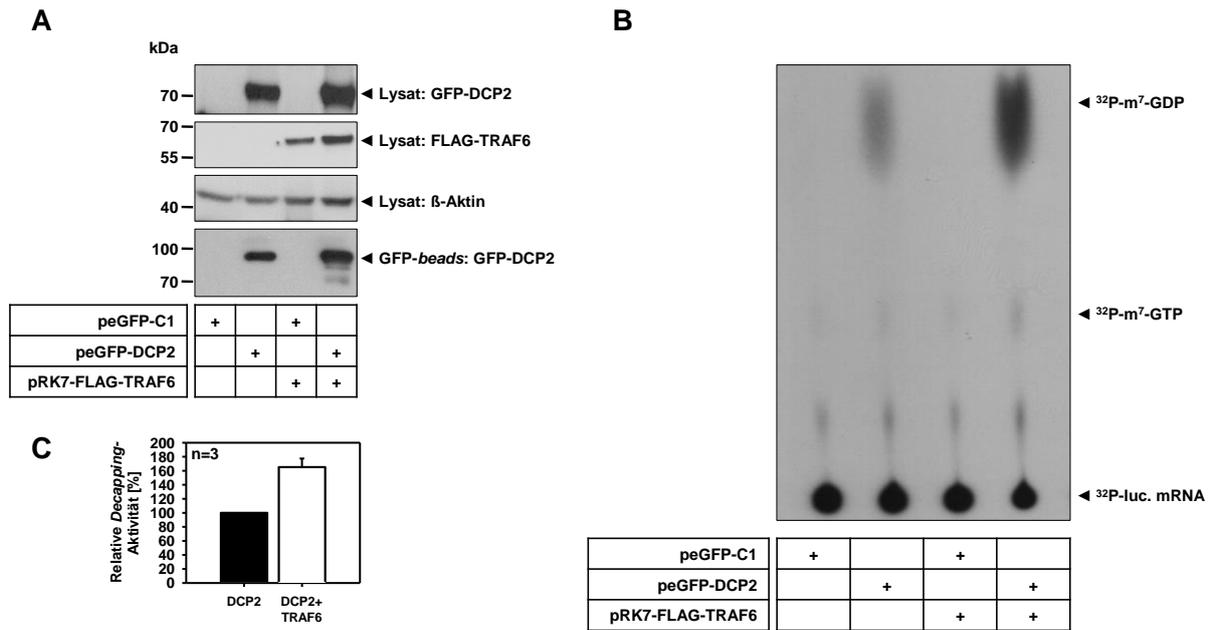
Dabei wurde eine Reduktion der GFP-DCP1a-abhängigen *Decapping*-Aktivität der Lysin-Mutante von DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>K520-K77R</sub>) um ca. 60% beobachtet. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte die C-terminale Deletionsmutante von DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>Δ515-582</sub>) im *Decapping-Assay* eine vollständige Aufhebung der *Decapping*-Aktivität (Abb.3.1).

Neben der Regulation der *Decapping*-Aktivität durch DCP1a wurde ebenfalls die direkte Regulation der *Decapping*-Aktivität in Abhängigkeit von der E3-Ubiquitin-Ligase TRAF6 untersucht. TRAF6 stellt dabei eine Proteinkomponente der IL-1-Signalkaskade dar und induziert nach Ubiquitylierung der TAK1/TAB1-3- und IKK-Komplexe indirekt die Aktivierung von NFκB (Kanayama et al, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TRAF6 die oben erwähnten Ubiquitylierungen an DCP1a induzieren kann (Tenekeci et al, 2016).

Zur Analyse der TRAF6 abhängigen Effekte auf die *Decapping*-Aktivität wurden HEK293IL-1R-Zellen mit GFP-DCP2 (peGFP-DCP2), FLAG-TRAF6 (pRK7-FLAG-TRAF6) und der Leervektor-Kontrolle (peGFP-C1) transfiziert. Anschließend erfolgten die Präzipitation des GFP-DCP2-Proteinkomplexes mit GFP-Trap\_A-Beads und der Nachweis des <sup>32</sup>P-m<sup>7</sup>-GDP-Produktes der *Decapping*-Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie. Parallel dazu erfolgte der Proteinnachweis von GFP-DCP2 in den Zelllysaten sowie in der Präzipitation mit GFP-Trap\_A-Beads mittels Western Blot. Anschließend wurden die densitometrisch bestimmten Signalintensitäten der <sup>32</sup>P-m<sup>7</sup>-GDP-Produkte aus der Dünnschichtchromatographie auf die jeweils präzipitierte GFP-DCP2 Menge normiert und als *Decapping*-Aktivität dargestellt (Abb.3.2 A, B).

Dabei führte die ektopische Koexpression von FLAG-TRAF6 zu einer Steigerung der GFP-DCP2-abhängigen *Decapping*-Aktivität um ca. 65% (Abb.3.2 C).

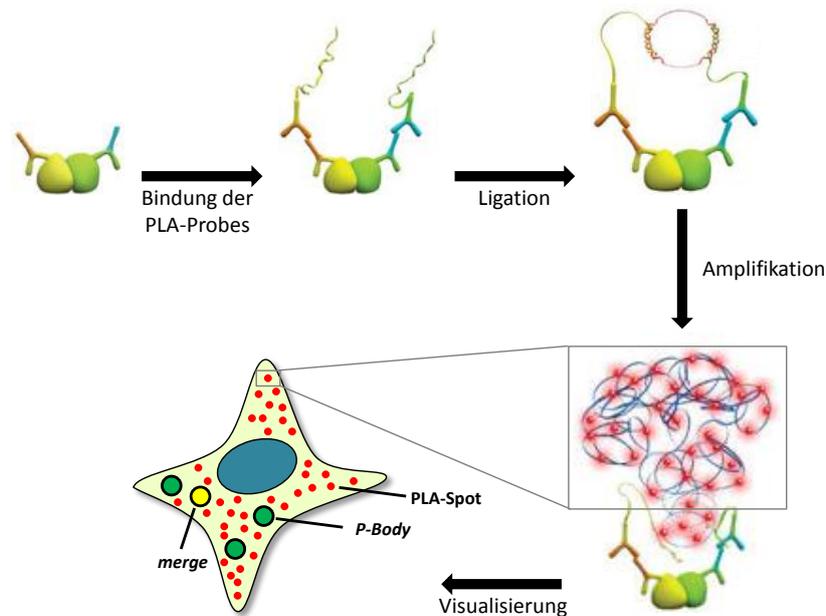
Diese Daten zeigen, dass bei der Regulation der globalen, zellulären *Decapping*-Aktivität die Ubiquitylierung von C-terminalen Lysinaminosäuren von DCP1a sowie die Ubiquitin E3-Ligase TRAF6 eine bisher nicht bekannte Rolle spielen.



**Abb.3.2: Regulation der Decapping-Aktivität eines GFP-DCP2-Proteinkomplexes durch ectopische Koexpression von TRAF6.** HEK293IL-1R-Zellen wurden mit GFP-DCP2 (peGFP-DCP2) oder dem Kontrollvektor (peGFP-C1) und zusätzlich FLAG-TRAF6 (pRK7-FLAG-TRAF6) transfiziert. Anschließend erfolgte die Präzipitation der GFP-DCP2-Proteinkomplexe mit GFP-Trap\_A-Beads. Für die Zelllysate und die präzipitierten Proteinkomplexe erfolgte ein Proteinnachweis mittels Western Blot (A). Der Decapping-Assay wurde unter Verwendung einer <sup>32</sup>P-markierten, *in vitro* transkribierten Template-mRNA (<sup>32</sup>P-luc.mRNA) durchgeführt und das <sup>32</sup>P-m<sup>7</sup>-GDP-Produkt der 5'-Cap-Hydrolyse durch Dünnschichtchromatographie mit anschließender Autoradiographie detektiert (B). Die densitometrische Signalstärke für das <sup>32</sup>P-m<sup>7</sup>-GDP-Produkt (bestimmt mittels ImageJ) wurde auf die jeweils präzipitierte GFP-DCP2-Proteinmenge (densitometrisch bestimmt mittels ImageJ) normiert und als Mittelwert (± Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten (C) dargestellt (verändert nach Tenekeci et al, 2016 (Lizenznummer: 4165930606701)).

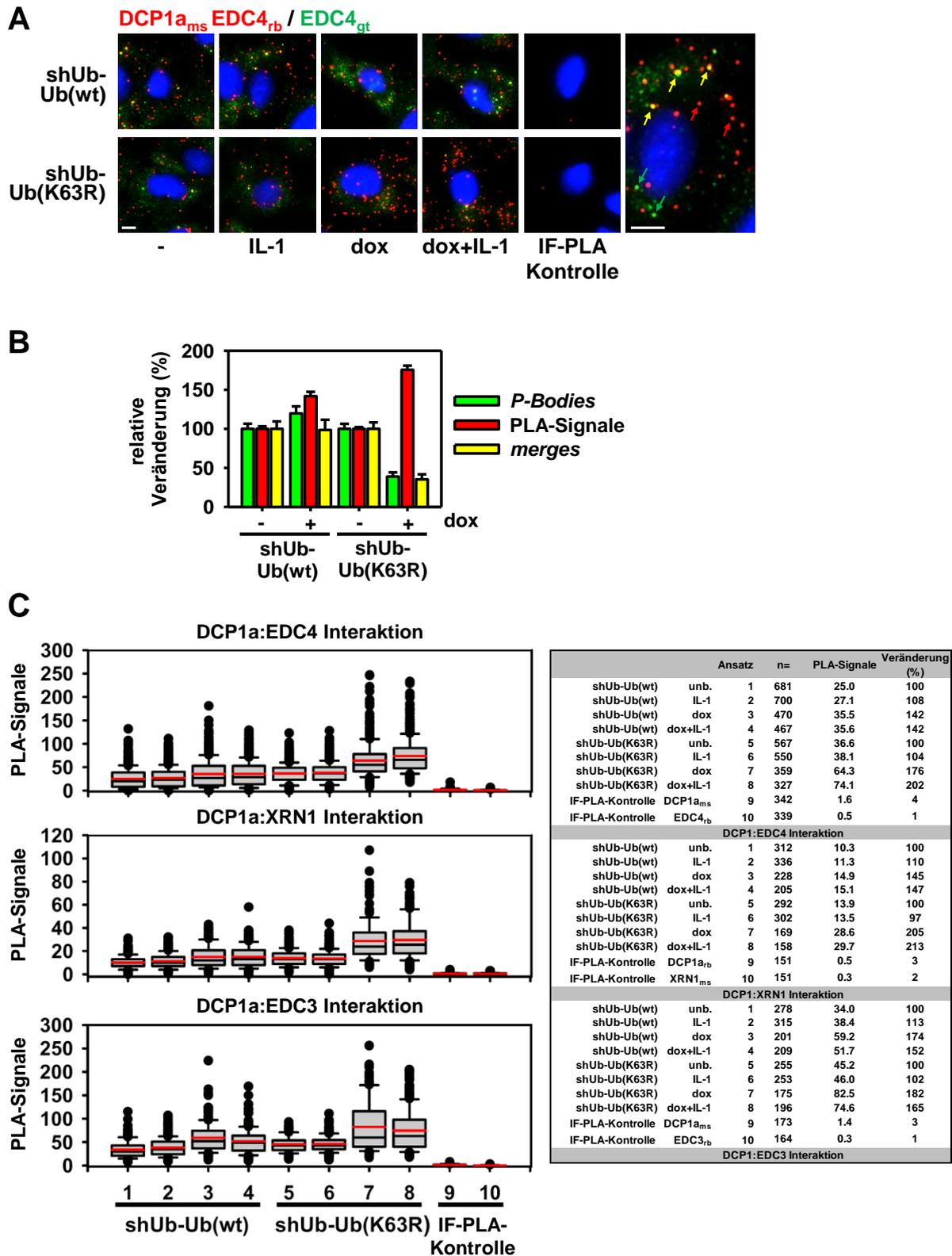
### 3.2. Regulation der Protein:Protein-Interaktionen von Decapping-Faktoren durch K63-Ubiquitin

Die vorliegenden Experimente deuten auf eine Relevanz der posttranslationalen Modifikation von Proteinen des Decappings bei der Regulation der Decapping-Aktivität wie auch bei der Regulation der P-Body-Assemblierung hin (Tenekeci et al, 2016). Zur weiteren Untersuchung der in Abhängigkeit von Ubiquitin regulierbaren zyttoplasmatischen Interaktion von DCP1a mit EDC4, XRN1 und EDC3 wurde die Technik des *Immuno-Proximity-Ligation-Assays* (Immuno-PLA) neu etabliert (Abb.3.3). Diese Methode erlaubt neben der antikörperabhängigen Detektion von Protein:Protein-Interaktionen (Gullberg et al, 2011; Soderberg et al, 2006; Weibrecht et al, 2010) zum ersten Mal die gleichzeitige Detektion von P-Bodies innerhalb einer Zelle.



**Abb.3.3: Schematische Darstellung der prinzipiellen Funktionsweise des Proximity-Ligation-Assay.** Nach Bindung der spezifischen Primärantikörper an die zu untersuchenden Proteinfaktoren, erfolgt die Bindung der oligonukleotidgekoppelten Sekundärantikörper (PLA-probes) und deren anschließende Hybridisierung und Ligation. Darauf erfolgt die signalverstärkende *Rolling-Circle-Amplifikation* mit gleichzeitiger Hybridisierung mit fluorophorgekoppelten Oligonukleotiden, wonach die Signale als PLA-Spots mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden können. Zur gleichzeitigen Detektion von *P-Bodies* wurden Primärantikörper einer dritten Spezies gegen EDC4 verwendet (siehe Schema der Zelle). Für die Auswertung wurden die Anzahlen der PLA-Spots, der *P-Bodies* sowie der Überlagerungen beider Signale (*merge*) ermittelt. Die Darstellung erfolgte verändert nach Gullberg et al, 2011 (Lizenznummer: 4165921249935).

Die Immuno-PLA Experimente wurden in epithelialen Osteosarcom-Zellen (U2OS) durchgeführt, welche ein induzierbares Ubiquitin-Austausch-System exprimieren. In diesen Doxycyclin-regulierten Zellsystemen ist eine shRNA-abhängige Depletion des endogenen Ubiquitins möglich, während gleichzeitig eine Reexpression von unverändertem Ubiquitin (U2OS-shUb-Ub<sub>(wt)</sub>) und einem Ubiquitin, welches eine Veränderung von Lysin 63 zu Arginin aufweist (U2OS-shUb-Ub<sub>(K63R)</sub>), erfolgt (Xu et al, 2009). Dieses System ermöglicht vor allem die Untersuchung der Funktion der K63-abhängigen Ubiquitylierung (Tenekeci et al, 2016; Xu et al, 2009). Bei den Immuno-PLA-Experimenten konnte der Großteil der Interaktion von DCP1a mit EDC4 außerhalb der *P-Bodies* detektiert werden. Lediglich wenige *P-Bodies* wiesen auch ein PLA-Signal auf. Nach der Expression von K63R-Ubiquitin konnte in den Immuno-PLA-Experimenten die Beobachtung der Verminderung der *P-Body*-Formation bestätigt werden (Abb.3.4, Tenekeci et al, 2016).



**Abb.3.4: Regulation der endogenen Protein:Protein-Interaktionen von Decapping-Faktoren durch die regulatorische, K63-abhängige Ubiquitinierung.** Die Interaktionen von DCP1a mit EDC4 (A, B, C), XRN1 oder EDC3 (C) wurde in U2OS-Zellen mit einem Doxycyclin-induzierbaren Ubiquitin-Austauschsystem mittels *Immuno-Proximity-Ligation-Assay* (Immuno-PLA) analysiert. Dazu wurden U2OS-shUb-Ub(wt)- und U2OS-shUb-Ub(K63R)-Zellen für 48 Stunden mit Doxycyclin (dox, 1 µg/ml) behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgt die Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml). Zur Kontrolle wurden unstimulierte

Zellen mitgeführt. Anschließend wurden die PLA-Experimente unter der Verwendung der in (A) und (C) gezeigten Primärantikörper unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen, gt=Ziege) durchgeführt. Die Immuno-PLA-Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Für die Interaktion von DCP1a und EDC4 wurde ebenfalls die relative Lokalisation dieser Interaktion zu *P-Bodies* ermittelt, wobei die Veränderung der *P-Body*-Anzahlen, Anzahl der PLA-Signale sowie Überlagerungen der PLA-Signale mit den *P-Bodies* (*merges*) aus vier biologisch unabhängigen Experimenten mit insgesamt mindestens 300 Zellen ermittelt wurden. Diese Parameter wurden auf die jeweilige Kontrollkondition normiert und als relative Veränderung in Prozent ( $\pm$  Standardfehler) dargestellt (B). Die totale Anzahl der PLA-Signale für die Interaktion von DCP1a mit EDC4 aus vier biologisch unabhängigen Experimenten sowie DCP1a mit XRN1 und EDC3 aus jeweils zwei biologisch unabhängigen Experimenten wurde quantitativ ermittelt und graphisch (schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert) sowie tabellarisch (Mittelwert) dargestellt (C). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der Messbalken entspricht 10  $\mu$ m. Die Abbildung wurde verändert nach Tenekeci et al, 2016 (Lizenznummer: 4165911196263) dargestellt.

Gleichzeitig aber führte die Expression von K63R-Ubiquitin zu einer Erhöhung der PLA-Signalanzahl für die Interaktion von DCP1a mit EDC4 und XRN1 um den Faktor 1,5-2. Dagegen konnte nahezu keine Beeinflussung der Interaktion von DCP1a und EDC3 in Abhängigkeit von K63R-Ubiquitin beobachtet werden (Abb.3.4).

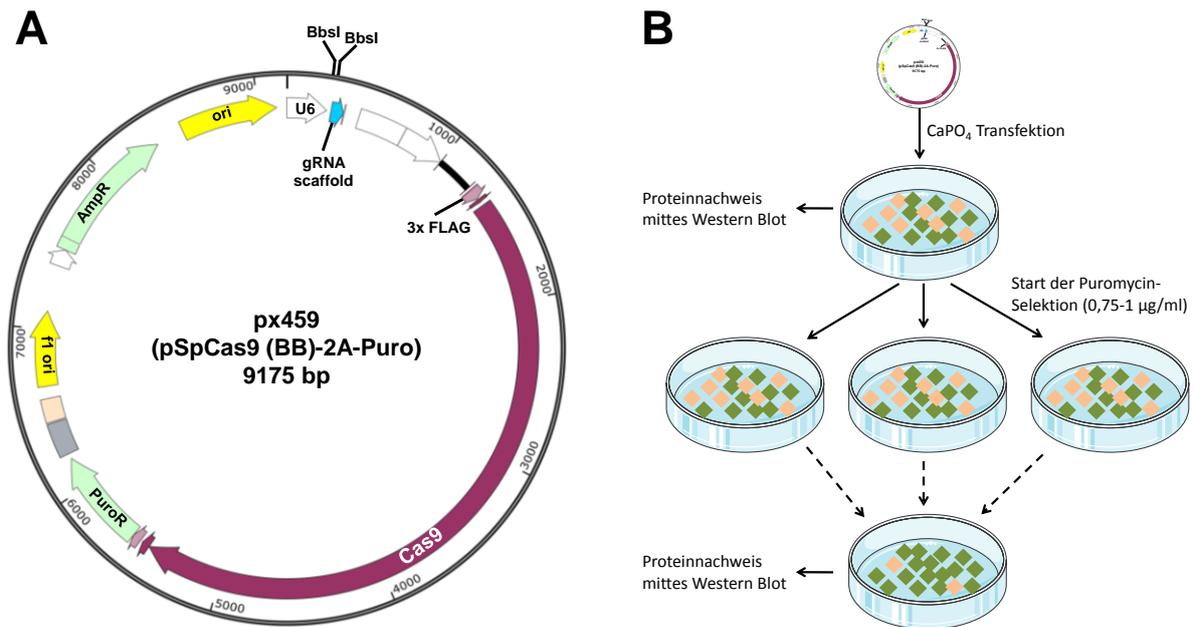
Diese Experimente verdeutlichen die Relevanz von DCP1a als regulatorische Untereinheit des *Decapping*-Komplexes. Besonders der C-terminale Bereich von DCP1a rückt dabei als regulatorisch notwendiger Bestandteil von DCP1a in den Vordergrund. Neben den Veränderungen der *Decapping*-Aktivität konnte für mutierte Formen von DCP1a zusätzlich eine Veränderung der Assemblierung von *P-Bodies* sowie Veränderungen der Ubiquitinylierung und Phosphorylierung beschrieben werden (Tenekeci et al, 2016). Dies zeigt die Notwendigkeit von DCP1a für zelluläre Funktionen wie dem *Decapping* und somit auch dem RNA-Abbau und die Assemblierung von *P-Bodies*. Des Weiteren deuten die Experimente auf eine Möglichkeit der Regulation der *Decapping*-Aktivität eines GFP-DCP2-Proteinkomplexes durch die TRAF6 Proteinmenge hin. Somit bekommen posttranslationale Proteinmodifikationen wie die TRAF6-abhängige Ubiquitinylierung von Proteinen des *Decapping*-Komplexes eine physiologische und regulatorische Relevanz für den Vorgang des *Decappings* und für den RNA-Abbau einer Zelle.

Die Relevanz dieser Regulation kann durch weitere Beobachtungen gestärkt werden. So zeigen unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe, dass ein Versuch der Etablierung eines Mausmodells mit generellem DCP1a-*knockout* aufgrund einer frühen embryonalen Letalität ab Tag 8.5 nicht möglich ist. Es konnten lediglich adulte Mäuse mit heterozygotem Genotyp erhalten werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine essentielle Funktion von DCP1a in der Embryonalentwicklung hin. Daneben besteht die Möglichkeit der funktionellen Regulation der *P-Bodies* durch einen proinflammatorischen Stimulus mit IL-1 (Rzeczkowski et al, 2011),

weshalb es von besonderem Interesse war einen CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* der *Decapping*-Proteine DCP1a und DCP2 sowie anderer *P-Body* Proteine wie EDC3, EDC4 und XRN1 zu etablieren. Diese *loss-of-function* Modellsysteme, in denen ein möglichst kompletter stabiler Verlust von Proteinen auf zellulärer Ebene vorhanden ist, können dazu dienen, die Funktion der *P-Body* lokalisierten Proteine und somit auch die allgemeinen Funktionen von *P-Bodies* weiter zu untersuchen.

### **3.3. Etablierung von Zellmodellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von *P-Body*-Proteinen**

Zur Herstellung von Zelllinien mit stabilem *knockdown* der *P-Body*-Proteine DCP1a, DCP2, EDC3, EDC4 und XRN1 wurde das CRISPR/Cas9-System verwendet. Dieses System erlaubt die zielgerichtete und stabile Veränderung des Genoms einer Zelle unter Verwendung der Cas9-Nuklease und spezifischen *small guide* (sg) RNA (Ran et al, 2013). Zu diesem Zweck wurden zunächst spezifische sgRNAs für die verschiedenen Gene in den Vektor px459 (sSpCas9 (BB)-2A-Puro) kloniert, auf welchem ebenfalls die Cas9-Nuklease kodiert ist (Abb.3.5). Anschließend wurden HEK293IL-1R- und HeLa-Zellen mit diesen Expressionsvektoren transfiziert und die Zellen einer Selektion mit Puromycin (0,75-1 µg/ml) ausgesetzt. Durch diese Selektion ist es möglich, nicht-transfizierte Zellen aus der Kultur zu entfernen, da der Vektor px459 weiterhin eine Kasette zur Expression einer Puromycin-Resistenz (Puromycin-N-Acetyltransferase) aufweist. Durch die Expression dieser Kasette in transfizierten Zellen sind nur diese in der Lage, weitere Zellteilungen zu durchlaufen. Schlussendlich führt diese Selektion über mehrere Passagen der Zellkultur hinweg zu einer Anreicherung von transfizierten Zellen und somit stabiler Zelllinien, welche unter weiterer Puromycin-Selektion lebensfähig bleiben und zusätzlich eine möglichst starke Verringerung des gewünschten Zielproteins aufweisen (Abb.3.5). Der Erfolg einer CRISPR/Cas9-vermittelten Reduzierung des gewünschten Proteins wurde nach Möglichkeit nach einer kurzzeitigen Selektion der Zellen mit Puromycin sowie nach dem Erhalt der stabilen Zellkultur durch einen Proteinnachweis mittels Western Blot überprüft. Um den gewünschten Effekt der stabilen Genveränderung zu erhalten, wurden pro Zielgen drei verschiedene sgRNAs getestet, wobei diese jeweils einzeln aber auch alle drei zusammen als Gemisch (*pool*) in die Zellen transfiziert wurden.



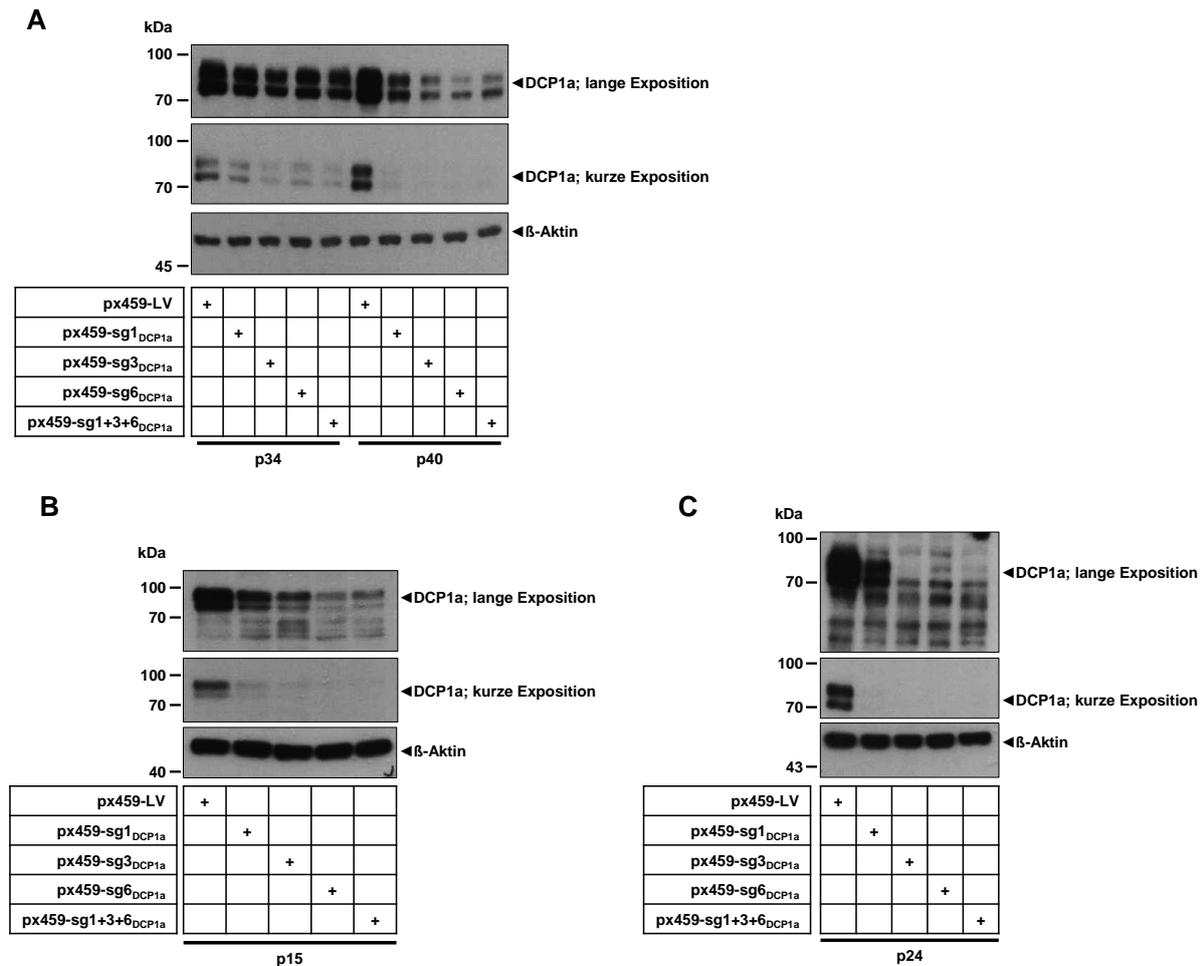
**Abb.3.5: Schematische Darstellung der Strategie zur Herstellung von CRISPR/Cas9-knockdown-Zelllinien.** **A:** Plasmidkarte des Expressionsvektors px459 (pSpCas9 (BB)-2A-Puro). **B:** Experimentelles Vorgehen zur Herstellung von genomisch veränderten HEK293IL-1- und HeLa-Zelllinien mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* eines beliebigen Gens. Grüne Quadrate stellen transfizierte Zellen dar. Untransfizierte Zellen sind durch eine helle Färbung der Quadrate gekennzeichnet.

Zur Bestimmung der sgRNA-Sequenzen für den *knockdown* von EDC3 und XRN1 wurde das Internet-Programm „*CRISPR design tool*“ ([www.crispr.mit.edu](http://www.crispr.mit.edu)) verwendet. Alternativ wurden für den *knockdown* von DCP1a, DCP2 und EDC4 bereits publizierte, zu den gewünschten Zielgenen komplementäre sgRNA-Sequenzen verwendet (Wang et al, 2014).

Für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP1a wurden die sgRNAs mit den Bezeichnungen sg1, sg3, und sg6 im Expressionsvektor px459 verwendet. Die jeweiligen px459-Expressionsvektoren wurden in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Bereits nach 48-stündiger Puromycin-Selektion konnte eine Verringerung der DCP1a-Proteinmenge beobachtet werden. Dabei wurde in den Ansätzen px459-sg3<sub>DCP1a</sub>, px459-sg6<sub>DCP1a</sub> und px459-sg1+3+6<sub>DCP1a</sub> eine vergleichbare Verringerung der DCP1a-Proteinmenge ersichtlich. Die durch verlängerte Puromycin-Selektion erhaltenen stabilen Zelllinien zeigten im direkten Vergleich eine weitere Verringerung der DCP1a-Proteinmenge. Dabei zeigten die Ansätze px459-sg6<sub>DCP1a</sub> und px459-sg1+3+6<sub>DCP1a</sub> die stärkste Verringerung der DCP1a-Proteinmenge (Abb.3.6 A). HeLa-Zellen wurden analog zu den HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Hier konnte bereits nach 72 Stunden Puromycin-Selektion eine CRISPR/Cas9-vermittelte Verringerung der DCP1a-Proteinmenge beobachtet werden, wobei die Ansätze px459-

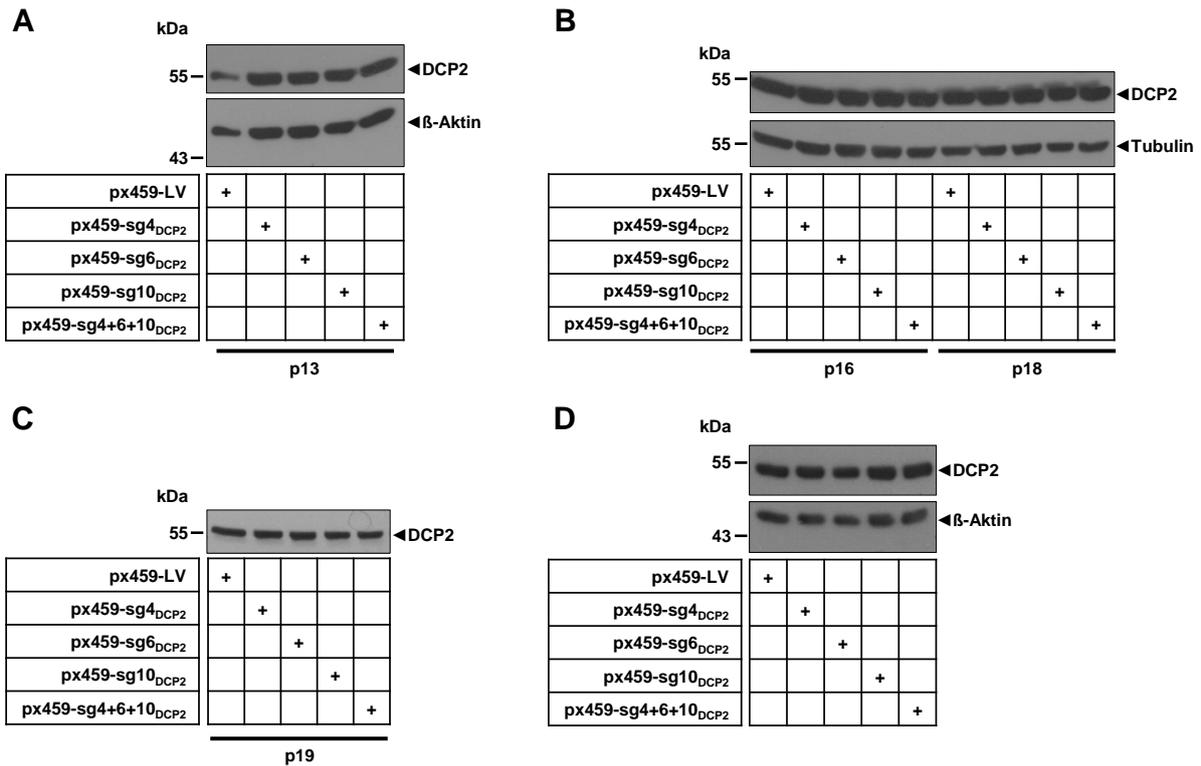
sg6<sub>DCP1a</sub> und px459-sg1+3+6<sub>DCP1a</sub> die stärksten Effekte aufwiesen. Nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien zeigte sich eine weitere Verringerung der DCP1a-Proteinmenge, wobei der Ansatz px459-sg3<sub>DCP1a</sub> den stärksten Effekt aufwies (Abb.3.6 B, C). Dieses Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass HeLa-Zellen polyploid sind (Landry et al, 2013) und es durch den irreversiblen Vorgang der NHEJ-DNA-Reparatur nach und nach zu einer Rekombination aller Allele der ausgewählten Loci in den HeLa-Zellen kommt.

Zur Charakterisierung der CRISPR/Cas9-vermittelten Veränderung der DNA-Sequenz in dieser Zelllinie, wurde die genomische DNA aus den px459-sg3<sub>DCP1a</sub>-Zellen und den px459-Kontrollzellen isoliert. Anschließend wurde der genomische Bereich um die sgRNA-Bindestelle durch eine PCR amplifiziert (verwendete Primer: DCP1a-Amplikon<sub>se</sub>/ DCP1a-Amplikon<sub>as</sub>) und die Sequenz des Amplikons (Produktgröße: 658 bp) mittels Sanger-Sequenzierung (verwendeter Sequenzierungsprimer: DCP1a-Amplikon<sub>se</sub>) durch die Firma LGC Genomics bestimmt. Dabei zeigte sich eine Punktmutation nach dem Translationsstart von *DCP1a* innerhalb der Sequenz der sgRNA-Bindestelle. Diese Punktmutation führt zum Verlust eines Cytosins, sodass es zu einer Verschiebung des Leserasters kommt, was wiederum die Entstehung eines vorzeitigen Stop-Codons zur Folge hat (Abb.Anh.1). Dieses Stop-Codon führt später bei der Translation zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese nach der zwölften Aminosäure und somit zu einem stark verkürzten Peptid.

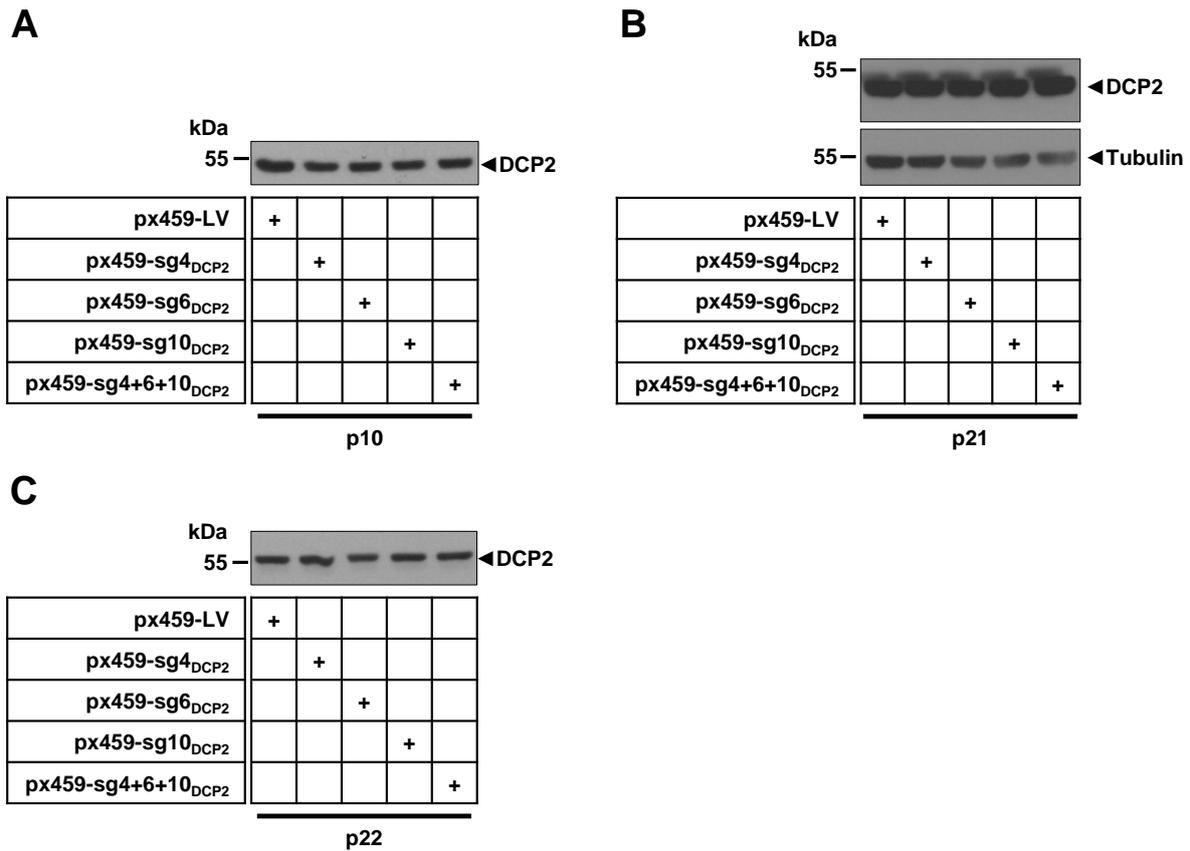


**Abb.3.6: Etablierung des DCP1a-knockdowns mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R- und HeLa-Zellen.** **A:** HEK293IL-1R-Zellen (Passage 33) wurden mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP1a (px459-sg1/2/3) und dem Kontrollvektor (px459-LV) transfiziert, am Folgetag der Transfektion gesplittet und nach 48 h Selektion mit Puromycin (0,75 µg/ml) für einen Proteinnachweis mittels Western Blot verwendet (p34). Der verbleibende Teil der Zellen wurde über mehrere Passagen hinweg weiter mit Puromycin selektiert bis eine stabile Zellkultur in Passage 40 erzielt wurde, welche ebenfalls einem Proteinnachweis mittels Western Blot unterzogen wurden. **B, C:** HeLa-Zellen (in Passage 13) wurden analog zu den HEK293IL-1R-Zellen transfiziert und ebenfalls am Folgetag der Transfektion gesplittet und nach 72 h Selektion mit Puromycin (1 µg/ml) für einen Proteinnachweis mittels Western Blot verwendet (**B**) Passage 15). Nach weiterer Selektion über mehrere Passagen konnte in Passage 24 (**C**) eine stabile Zellkultur erreicht werden, welche ebenfalls einem Proteinnachweis mittels Western Blot unterzogen wurde.

Für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP2 wurden die sgRNAs mit den Bezeichnungen sg4, sg6, und sg10 im Expressionsvektor px459 verwendet. Die jeweiligen px459-Expressionsvektoren wurden in HEK293IL-1R- und HeLa-Zellen transfiziert. Weder nach einer kurzfristigen Selektion der Zellen für 48 Stunden mit Puromycin noch nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien konnte in beiden Zelltypen eine Verringerung der DCP2-Proteinmenge beobachtet werden (Abb.3.7, Abb.3.8).

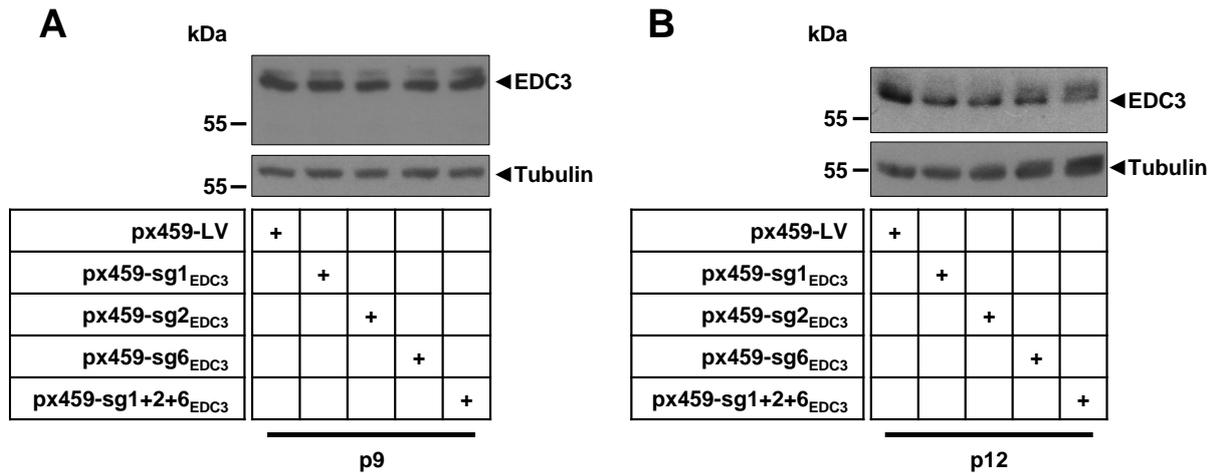


**Abb.3.7: Versuch der Etablierung des DCP2-knockdowns mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R-Zellen.** Western Blot Ergebnisse des Proteinnachweises von DCP2 in Zelllysaten mit zusätzlicher Detektion von Tubulin und β-Aktin- als Beladungskontrollen. HEK293IL-1R-Zellen wurden in Passage 12 mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP2 (px459-sg4/6/10) und dem Kontrollvektor (px459-LV) transfiziert und mit Puromycin (0,75 µg/ml) selektiert. Die DCP2-Proteinmenge wurde nach 48 h Puromycin-Selektion nach Transfektion (p13 (A)) sowie nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien in den Passagen 16 (B), 18 (B) und 19 (C) untersucht. HEK293IL-1R-Zellen wurden neu transfiziert und die DCP2-Proteinmenge nach 48 h Puromycin-Selektion erneut untersucht (D).



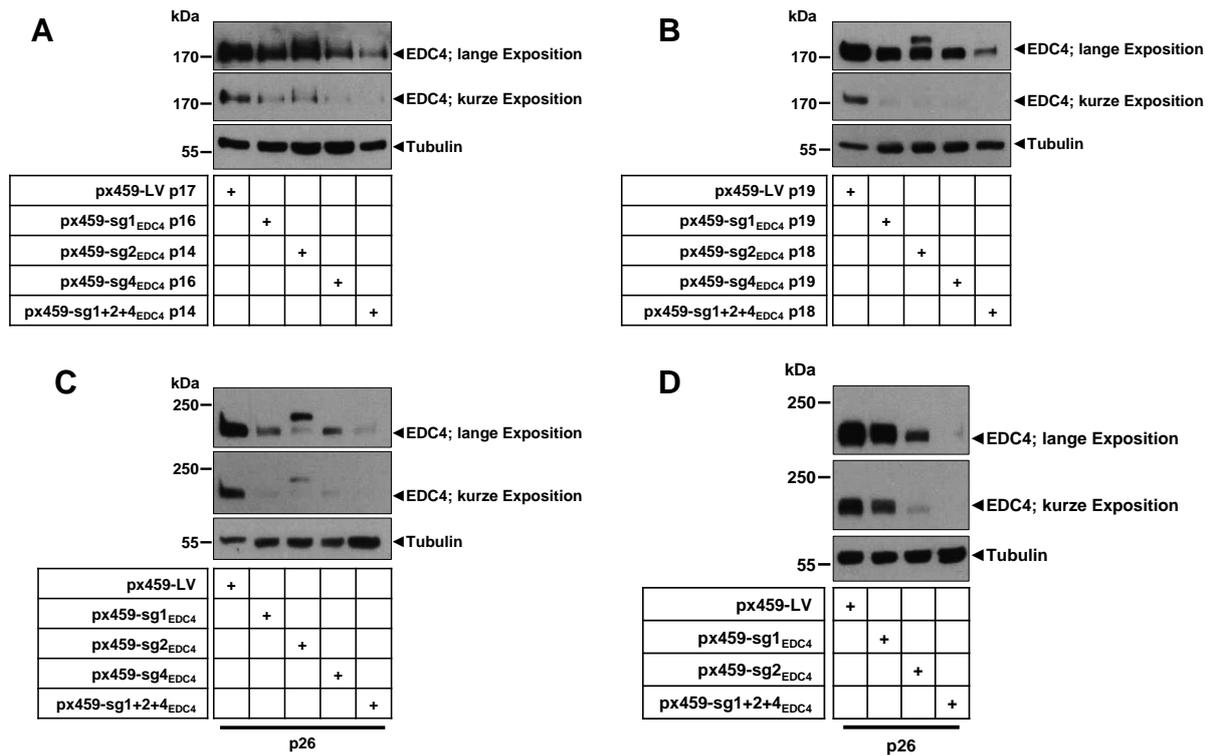
**Abb.3.8: Versuch der Etablierung des DCP2-knockdowns mittels CRISPR/Cas9 in HeLa-Zellen.** Western Blot Ergebnisse des Proteinnachweises von DCP2 in Zelllysaten mit zusätzlicher Detektion von Tubulin als Beladungskontrolle. HeLa-Zellen wurden in der Passage 9 mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP2 (px459-sg4/6/10) und dem Kontrollvektor (px459-LV) transfiziert und mit Puromycin (1 µg/ml) selektiert. Die DCP2-Proteinmenge wurde nach 48 h Puromycin-Selektion nach Transfektion in Passage 10 (A) sowie nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien in den Passagen 21 (B) und 22 (C) untersucht.

Für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von EDC3 wurden die sgRNAs mit den Bezeichnungen sg1, sg2, und sg6 im Expressionsvektor px459 verwendet. Die jeweiligen px459-Expressionsvektoren wurden in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Nach einer kurzfristigen Selektion der Zellen für 48 Stunden mit Puromycin (Abb.3.9 A) und nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien konnte keine Verringerung der EDC3-Proteinmenge beobachtet werden (Abb.3.9 B).



**Abb.3.9: Versuch der Etablierung des EDC3-knockdowns mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R-Zellen.** Western Blot Ergebnisse des Proteinnachweises von EDC3 in Zelllysaten mit zusätzlicher Detektion von Tubulin als Beladungskontrolle. HEK293IL-1R-Zellen wurden in Passage 8 mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von EDC3 (px459-sg1/2/6) und dem Kontrollvektor (px459-LV) transfiziert und mit Puromycin (0,75 µg/ml) selektiert. Die EDC3-Proteinmenge wurde nach 48 h Puromycin-Selektion nach Transfektion in Passage 9 (A) sowie nach dem Erhalt von stabilen Zellkulturen in der Passage 12 (B) untersucht.

Für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von EDC4 wurden die sgRNAs mit den Bezeichnungen sg1, sg2, und sg4 verwendet und die jeweiligen px459-Expressionsvektoren in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Bereits nach 48 stündiger Puromycin-Selektion konnte eine Verringerung der EDC4-Proteinmenge beobachtet werden. Dabei wurden in den Ansätzen px459-sg4<sub>EDC4</sub> und px459-sg1+2+4<sub>EDC4</sub> vergleichbare Effekte der Verringerung der EDC4-Proteinmenge ersichtlich (Abb.3.10 A). Nach langfristiger Selektion der Zellen und dem Erhalt stabiler Zelllinien zeigte sich eine weitere Verringerung der EDC4-Proteinmenge, wobei für den Ansatz px459-sg1+2+4<sub>EDC4</sub> der stärkste Effekt beobachtet werden konnte (Abb.3.10 B, C). HeLa-Zellen wurden analog zu den HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Eine erste Untersuchung der EDC4-Proteinmenge war hier erst nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien möglich. Für den Ansatz px459-sg4<sub>EDC4</sub> konnten keine stabilen Zelllinien erhalten werden. Die stärkste Verringerung der EDC4-Proteinmenge wurde für den Ansatz px459-sg1+2+4<sub>EDC4</sub> beobachtet (Abb.3.10 D).

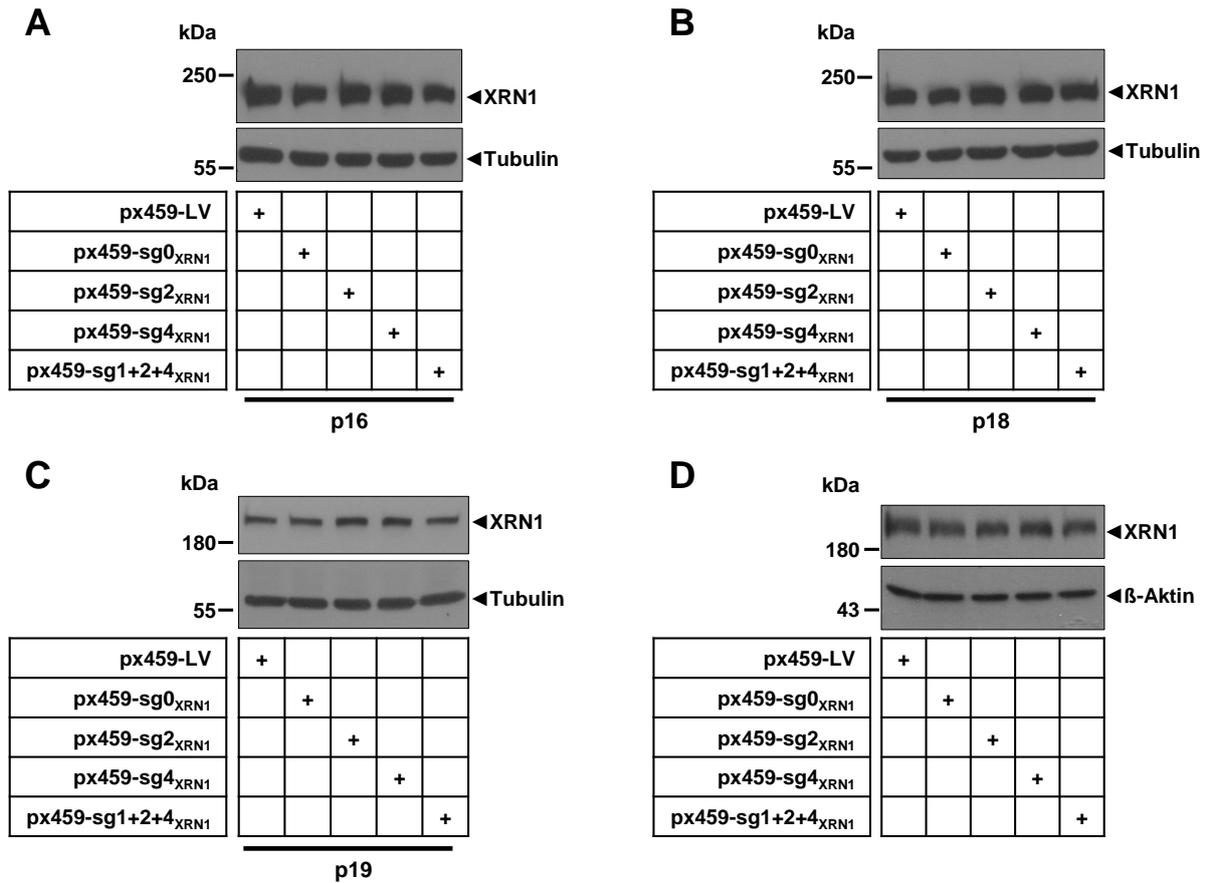


**Abb.3.10: Etablierung des EDC4-knockdowns mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R-Zellen (A,B,C) und HeLa-Zellen (D).** Western Blot Ergebnisse des Proteinnachweises von EDC4 in Zelllysaten mit zusätzlicher Detektion von Tubulin als Beladungskontrolle. **A,B,C:** HEK293IL-1R-Zellen wurden in Passage 8 mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von EDC4 (sg1/2/4) und dem Kontrollvektor (px459-LV) transfiziert und über mehrere Passagen hinweg mit Puromycin (0,75 µg/ml) selektiert. Die EDC4-Proteinmenge wurde nach dem Erhalt stabiler Zelllinien in den Passagen 14/16/17 (**A**), in den Passagen 18/19 (**B**) sowie in der Passage 26 (**C**) untersucht. **D:** HeLa-Zellen wurden in der Passage 13 analog zu den HEK293IL-1R-Zellen transfiziert und über mehrere Passagen hinweg mit Puromycin (1 µg/ml) selektiert. Die EDC4-Proteinmenge wurde nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien in der Passage 26 untersucht.

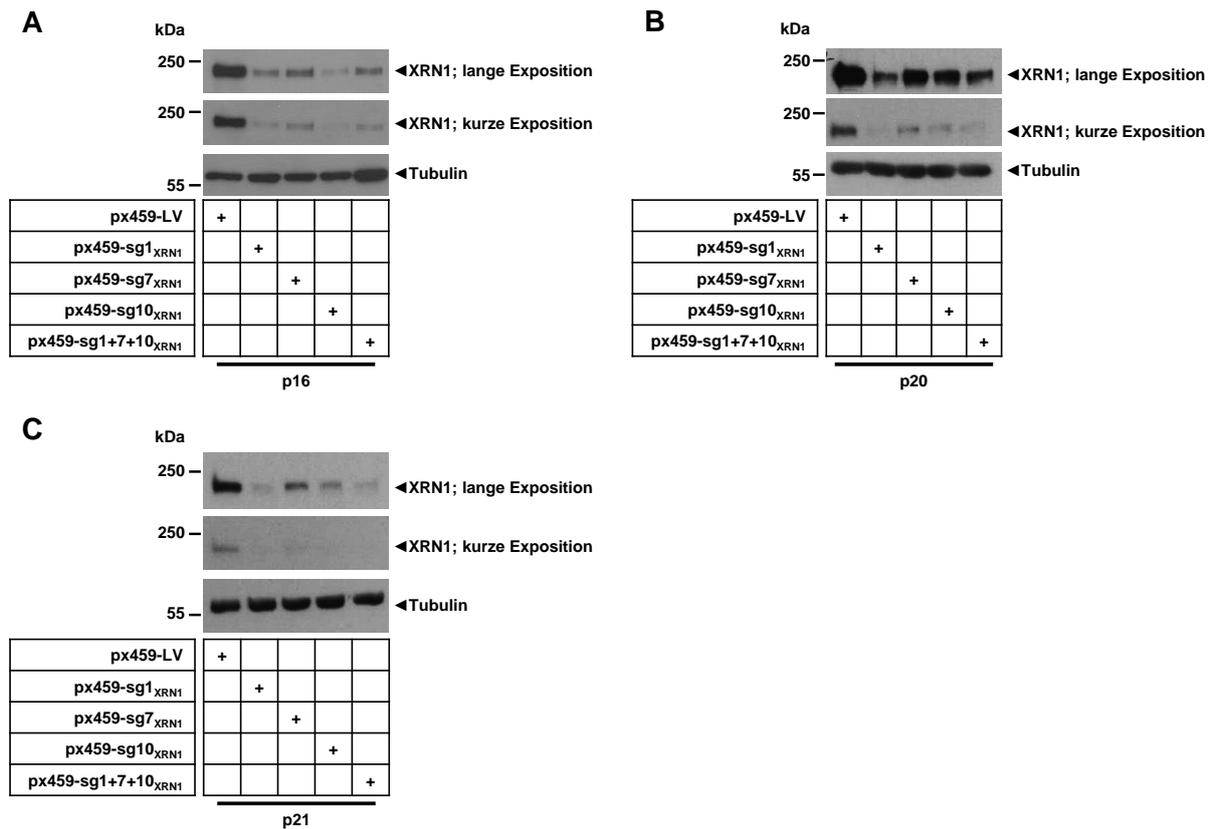
Für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von XRN1 in HEK293IL-1R-Zellen wurden die sgRNAs mit den Bezeichnungen sg0, sg2, und sg4 im Expressionsvektor px459 verwendet. Die jeweiligen px459-Expressionsvektoren wurden in HEK293IL-1R-Zellen transfiziert. Nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien nach einer langfristigen Puromycin-Selektion konnte keine Verringerung der XRN1-Proteinmenge beobachtet werden (Abb.3.11 A, B, C). Auch eine erneute Transfektion mit einer kurzfristigen Selektion der Zellen mit Puromycin für 48 Stunden erzielte keine Reduktion der XRN1-Proteinmenge (Abb.3.11 D). Aus diesem Grund wurden neue sgRNAs mit den Bezeichnungen sg1, sg7, sg10 verwendet und HeLa-Zellen mit diesen sgRNAs im Expressionsvektor px459 transfiziert. Hier konnte bereits nach 48 Stunden Puromycin-Selektion eine Reduktion der XRN1-Proteinmenge beobachtet werden, wobei diese für den Ansatz px459-sg1<sub>XRN1</sub> den stärksten Effekt zeigte (Abb.3.12 A). Nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien zeigte sich eine weitere Verringerung

der XRN1-Proteinmenge, wobei der Ansatz px459-sg1<sub>XRN1</sub> erneut den stärksten Effekt aufwies (Abb.3.12 B, C).

Aus diesen Zellen und den px459-Kontrollzellen wurde die genomische DNA isoliert, um die CRISPR/Cas9-vermittelten Veränderungen der DNA-Sequenz in den px459-sg1<sub>XRN1</sub>-Zellen zu charakterisieren. Anschließend erfolgte die Amplifikation des genomischen Bereiches um die sgRNA-Bindestelle durch PCR (verwendete Primer: XRN1-Amplikon<sub>se</sub>/ XRN1-Amplikon<sub>as</sub>; Produktgröße: 592 bp). Danach erfolgte die Ermittlung der Sequenz des PCR-Amplikons mittels Sanger-Sequenzierung (verwendeter Sequenzierungsprimer: XRN1-Amplikon<sub>se</sub>) durch die Firma LGC Genomics. Dabei konnte nur eine suboptimale Sequenz in den px459-sg1<sub>XRN1</sub>-Zellen erhalten werden. Kurz nach der Bindestelle der sgRNA wurde ein Abbruch der Sequenzierung verzeichnet (Abb.Anh.1). Weitere Optimierungsversuche waren nicht erfolgreich, da diverse andere PCR-Primerpaare für die Amplifikation des genomischen DNA-Abschnitts auch mit Veränderungen der Reaktionsbedingungen keine spezifischen PCR-Produkte erzielten. Zusätzlich konnte durch die Verwendung von anderen Sequenzierungsprimern keine Verbesserung des Sequenzierungsergebnisses erreicht werden. Diese Problematiken und die vorhandenen Ergebnisse aus den Sanger-Sequenzierungen aus den px459-sg1<sub>XRN1</sub>-Zellen deuten jedoch auf eine CRISPR/Cas9-vermittelte Veränderung der DNA-Sequenz durch ein Gemisch an Indel-Mutationen in diesen Zellen hin, wobei die genaue Veränderung im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnte.



**Abb.3.11: Etablierung des XRN1-knockdowns mittels CRISPR/Cas9 in HEK293IL-1R-Zellen.** Western Blot Ergebnisse des Proteinnachweises von XRN1 in Zelllysaten mit zusätzlicher Detektion von Tubulin und  $\beta$ -Aktin- Antikörper als Beladungskontrolle. HEK293IL-1R-Zellen wurden in der Passage 12 mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von XRN1 (px459-sg0/2/4) und dem Kontrollvektor (px459-LV) transfiziert und über mehrere Passagen hinweg mit Puromycin (0,75  $\mu$ g/ml) selektiert. Die XRN1-Proteinmenge wurde nach dem Erhalt von stabilen Zelllinien in den Passagen 16 (A), 18 (B) und 19 (C) untersucht. HEK293IL-1R-Zellen wurden erneut transfiziert und die XRN1-Proteinmenge nach 48 h Puromycin-Selektion untersucht (D).



**Abb.3.12: Etablierung des XRN1-knockdowns mittels CRISPR/Cas9 in HeLa-Zellen.** Western Blot Ergebnisse des Proteinnachweises von XRN1 in Zelllysaten mit zusätzlicher Detektion von Tubulin als Beladungskontrolle. HeLa-Zellen wurden in der Passage 15 mit den unterschiedlichen Expressionsplasmiden für den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von XRN1 (px459-sg1/7/10) und dem Kontrollvektor (px459-LV) transfiziert und mit Puromycin (1µg/ml) über mehrere Passagen hinweg selektiert. Die XRN1-Proteinmenge wurde nach 48 h Selektion nach Transfektion in Passage 16 (A) sowie nach dem Erhalt von stabilen Zellkulturen in den Passagen 20 (B) und 21 (C) untersucht.

Insgesamt war es möglich, einen CRISPR/Cas9-vermittelten stabilen *knockdown* von verschiedenen Proteinen, welche beim mRNA-*Decapping* und mRNA-Abbau beteiligt sind, in HEK293IL-1R- und HeLa-Zellen zu etablieren. Dabei konnte dies für DCP1a (HEK293IL-1R- und HeLa-Zellen), EDC4 (HEK293IL-1R- und HeLa-Zellen) und XRN1 (HeLa-Zellen) erreicht werden. Im Gegensatz dazu, konnte unter keinen Umständen eine Verringerung der EDC3- oder DCP2-Proteinmenge erreicht werden, wobei die Gründe dafür im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Des Weiteren zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass unterschiedliche sgRNAs eines bestimmten Zielgens unterschiedlich starke Effekte des *knockdowns* hervorbringen können. Zu diesem Zweck wurden im weiteren Verlauf der Arbeit möglichst jene Zelllinien verwendet, welche auch eine möglichst starke Reduktion der Proteinmenge des Zielgens aufweisen. Aus diesem Grund wurden primär folgende Zelllinien ausgewählt:

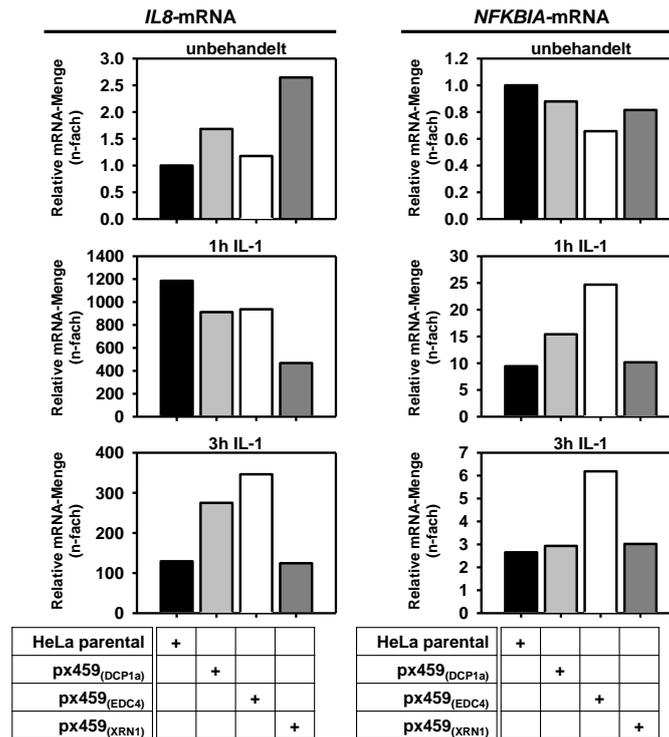
HEK293IL-1R-Zellen:	px459-sg1+3+6 <sub>DCP1a</sub> (folgend bezeichnet als sgpool-DCP1a)
	px459-sg1+2+4 <sub>EDC4</sub> (folgend bezeichnet als sgpool-EDC4)
HeLa- Zellen:	px459-sg3 <sub>DCP1a</sub> (folgend bezeichnet als sg3-DCP1a)
	px459-sg1+2+4 <sub>EDC4</sub> (folgend bezeichnet als sgpool-EDC4)
	px459-sg1 <sub>XRN1</sub> (folgend bezeichnet als sg1-XRN1)

Alle anderen hergestellten Zelllinien wurden im weiteren Verlauf der Arbeit als zusätzliche Kontrollen herangezogen und dienten nur als Ergänzung.

### 3.4. Auswahl der CRISPR/Cas9-Kontrollvektor-Zelllinie für HeLa-Zellen

In HeLa-Zellen konnte ein CRISPR/Cas9-vermittelter stabiler *knockdown* der Proteine DCP1a, EDC4 und XRN1 etabliert werden. Bei jeder Transfektion der verschiedenen sgRNAs im px459-Expressionsvektoren wurde jeweils eine Leervektor-Kontrolle mitgeführt. Aus diesem Grund wurden drei verschiedene px459-Leervektor-Kontroll-Zelllinien (px459<sub>(DCP1a)</sub>, px459<sub>(XRN1)</sub>, px459<sub>(EDC4)</sub>) erhalten. Zur Reduzierung der Anzahl dieser Kontrollzelllinien wurde ein vergleichendes Experiment mit einer zeitlichen IL-1-Stimulationsreihe durchgeführt. Dazu wurden die unterschiedlichen Kontrollzelllinien sowie parentale untransfizierte HeLa-Zellen für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt, die RNA der Gesamtzellen isoliert und die mRNA-Menge von IL-1-induzierten Genen (*IL8* und *NFKBIA*) mittels quantitativer Reverse-Transkriptase PCR (RT-qPCR) ermittelt.

Dabei zeigte sich, dass die unterschiedlichen Kontrollvektor-Zelllinien im Vergleich zu parentalen untransfizierten HeLa-Zellen unterschiedliche basale Mengen der *IL8*- und *NFKBIA*-mRNA aufweisen können. Daher fällt die IL-1-induzierte Expression von *IL8* und *NFKBIA* in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark aus (Abb.3.13). Aus diesen Gründen wurde die Kontrollvektor-Zelllinie px459<sub>DCP1a</sub> ausgewählt, da diese im Vergleich zu parentalen, untransfizierten HeLa-Zellen die geringfügigsten Unterschiede aufweist. Diese Zelllinie wurde in allen nachfolgenden Experimenten mit HeLa-CRISPR-Zellen als Kontrollsystem verwendet.



**Abb.3.13: Vergleichende Analyse der px459-Kontrollvektor-Zelllinien.** Die aus unterschiedlichen Transfektionen erhaltenen stabil transfizierten Zelllinien mit dem Vektor px459 (px459<sub>(DCP1a)</sub>, px459<sub>(XRN1)</sub>, px459<sub>(EDC4)</sub>) wurden in einem Experiment für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unbehandelt belassen. Als Referenzsystem dient dabei untransfizierte parentale HeLa-Zellen. Nach der Stimulation erfolgte die Analyse der differentiell exprimierten *IL8*- und *NFKBIA*-mRNA-Menge durch eine RT-qPCR. Die Auswertung der RT-qPCR erfolgte nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

### 3.5. Einfluss von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf den IL-1-abhängigen, proinflammatorischen Signalweg auf Proteinebene

Zur Ermittlung der Auswirkungen der CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdowns* von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf den IL-1-abhängigen proinflammatorischen Signalweg, wurden die verschiedenen HeLa- CRISPR-Zelllinien (sg3-DCP1a, sgpool-EDC4 und sg1-XRN1), die Kontroll-Zelllinie (px459) sowie untransfizierte parentale HeLa-Zellen einer Stimulation für 30 min, 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) unterzogen oder unbehandelt belassen. Nach der Stimulation wurden Zelllysate der einzelnen Versuchsansätze hergestellt und die Expression von relevanten Proteinen des *Decapping*-Komplexes sowie der IL-1-Signalkaskade mittels Western Blot untersucht. Gleichzeitig wurden die Experimente genutzt, um die Stärke der CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdowns* von DCP1a, EDC4 und XRN1 in den einzelnen Versuchsansätzen zu ermitteln.

Dabei konnte in allen CRISPR/Cas9-Zelllinien das Fusionsprotein FLAG-Cas9 nachgewiesen werden, was auf eine stabile Integration des px459-Expressionsvektors in das Genom hindeutet (Abb.3.14 A). Zusätzlich konnte im Vergleich zu der Kontrollzelllinie in den jeweils einzelnen *knockdown*-Zelllinien eine Reduktion der Proteinmenge von DCP1a (ca. 4% Restproteinmenge), EDC4 (ca. 6% Restproteinmenge) und XRN1 (ca. 34% Restproteinmenge) beobachtet werden. Für die weitere *P-Body*-Komponente EDC3 konnte in keiner Zelllinie eine Veränderung der Proteinmenge detektiert werden. Die DCP2-Proteinmenge zeigte teilweise experimentinterne Schwankungen auf, welche sich jedoch bei Betrachtung aller Experimente nicht bestätigte, sodass hier auch eine gleichbleibende Proteinmenge in den verschiedenen Zelllinien angenommen werden kann. Die Gesamtproteinmengen der untersuchten Proteinkomponenten der IL-1-Signalkaskade (NF $\kappa$ B p65, JNK, p38 und HSP27) zeigten ebenfalls in den verschiedenen Zelllinien keine Veränderungen (Abb.3.14 A, B).

Die bereits beschriebene IL-1-induzierte Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 (Rzeczowski et al, 2011) konnte in den px459-Kontroll-Zelllinien, den sg1-XRN1-Zellen und in den parental HeLa-Zellen beobachtet werden. Hier zeigte sich nach der IL-1-Stimulation der Zellen bereits nach 30 Minuten eine Zunahme der Phosphorylierung, welche die maximale Stärke nach 60 Minuten IL-1 Stimulation erreichte. Nach 180 Minuten IL-1-Stimulation konnte erneut eine Verringerung der Phosphorylierung von DCP1a beobachtet werden. Die Phosphorylierung von DCP1a konnte neben dem phosphorylierungsspezifischen Antikörper ebenfalls anhand des DCP1a-Antikörpers detektiert werden. In diesem Fall zeigte sich die Phosphorylierung von DCP1a durch eine Zunahme der Bandenintensität mit einem leicht erhöhten Molekulargewicht, was auf das Hinzufügen von Phosphatgruppen an das Protein zurückzuführen ist. Die Phosphorylierung von DCP1a konnte erwartungsgemäß nicht in den sg3-DCP1a-Zellen beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich eine deutlich verminderte Phosphorylierung von DCP1a in den sgpool-EDC4-Zellen (Abb.3.14 A, B), was auf eine mögliche Beteiligung von EDC4 bei der Regulation der Phosphorylierung von DCP1a hindeuten könnte.

Der IL-1-induzierte Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und die Resynthese des Proteins konnte in allen Zelllinien beobachtet werden. Nach einer Stimulation der Zellen für 30 min mit IL-1 wurde eine minimale Proteinmenge für I $\kappa$ B $\alpha$  beobachtet, welche bereits nach 60 min IL-1-Stimulation erneut zunahm. Die sg3-DCP1a-Zellen zeigten eine leichte Verminderung des Abbaus von I $\kappa$ B $\alpha$  nach 30 min IL-1-Stimulation. Die gleichzeitig stattfindende

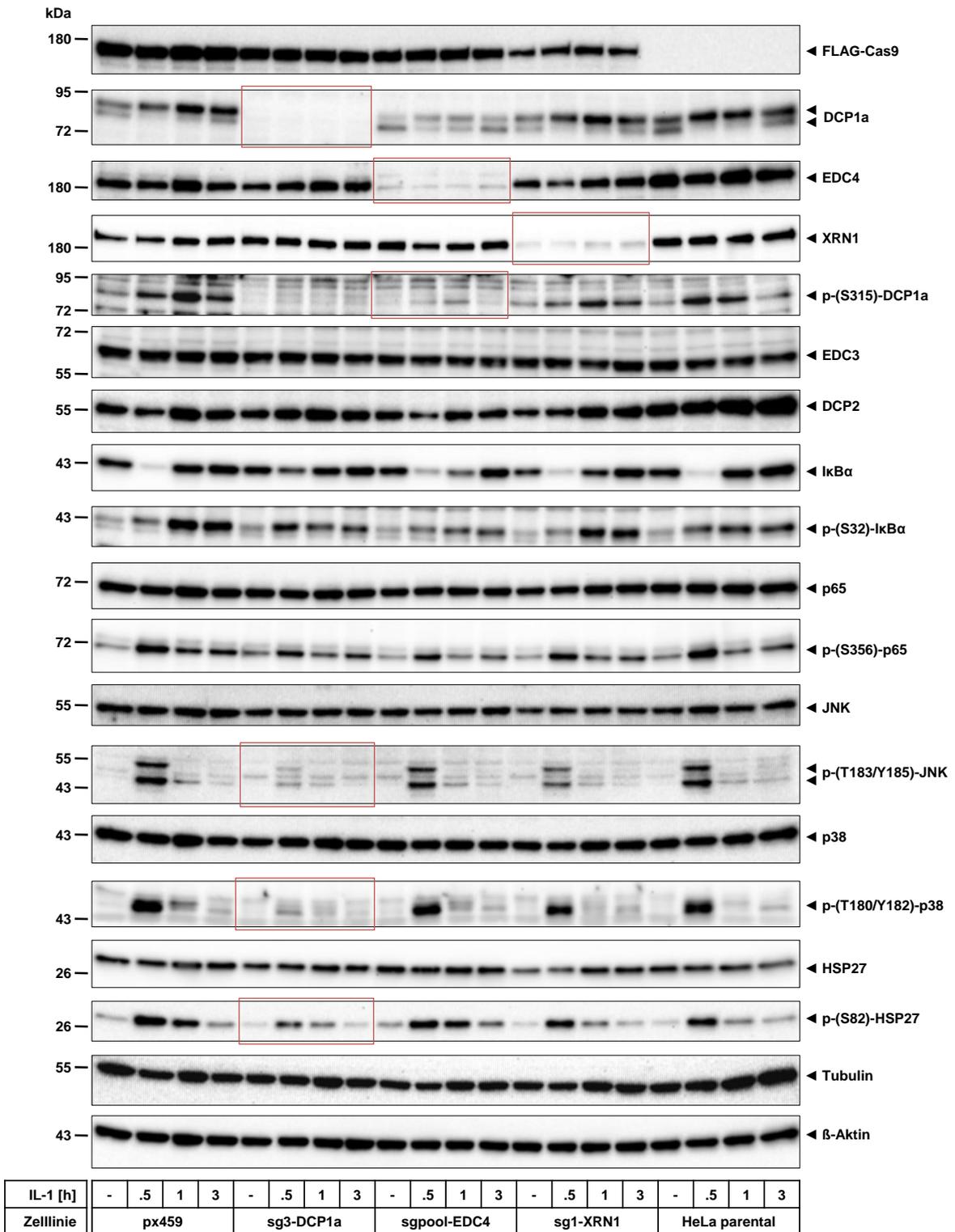
posttranslationale Modifikation von I $\kappa$ B $\alpha$  durch Phosphorylierung an Serin 32 konnte ebenfalls in allen Zelllinien beobachtet werden. Diese wurde durch eine starke Zunahme der Phosphorylierung nach 30 min IL-1-Stimulation deutlich. Dabei wurden in den verschiedenen Zelllinien über alle Experimente hinweg keine großen Unterschiede beobachtet (Abb.3.14 A, B).

Die ebenfalls IL-1-induzierten, posttranslationalen Modifikationen von NF $\kappa$ B p65 (Serin 356), JNK (Threonin 183/ Tyrosin 185), p38 (Threonin 180/ Tyrosin 182) und HSP27 (Serin 82) durch Phosphorylierung der entsprechenden Aminosäurereste konnten in allen Zelllinien beobachtet werden. Hierbei wurde jeweils eine maximale Phosphorylierung der unterschiedlichen Proteine nach 30 min IL-1-Stimulation beobachtet, welche sich dann im weiteren Verlauf der IL-1-Stimulation verringerte. Für die Phosphorylierung von NF $\kappa$ B p65 konnten in den verschiedenen Zelllinien keine Veränderungen beobachtet werden. Die Phosphorylierung von JNK, p38 und HSP27 hingegen zeigte in den sg3-DCP1a-Zellen im Vergleich zu den anderen Zelllinien ein verringertes Ausmaß, wobei ansonsten eine gleichbleibende Phosphorylierung beobachtet wurde (Abb.3.14 A, B).

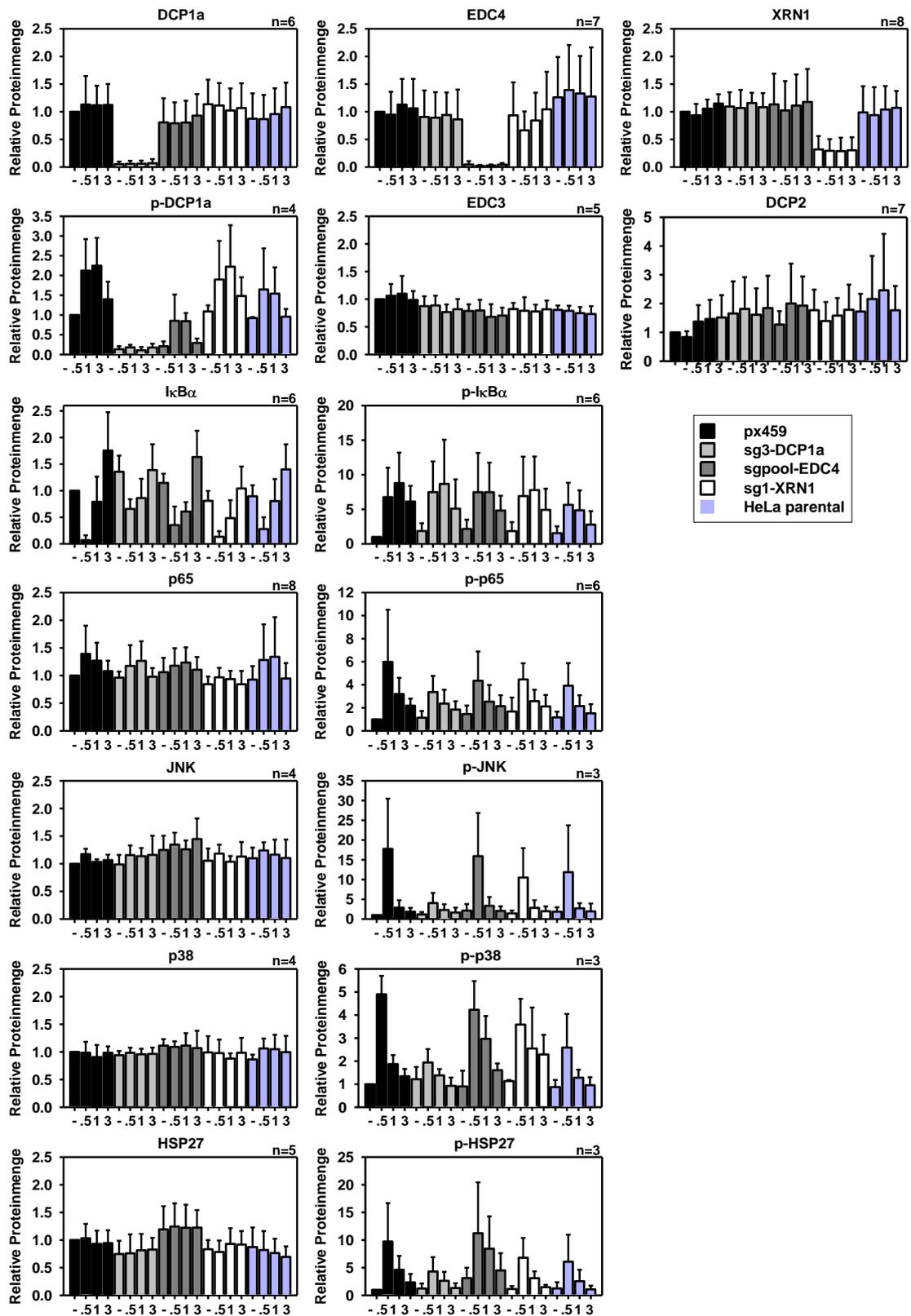
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den verschiedenen Zelllinien eine reguläre IL-1-induzierte Aktivierung von NF $\kappa$ B p65 nach I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation stattfinden kann. Ebenfalls sind andere Proteinkomponenten der IL-1-Signalkaskade in ihrer Regulation und Aktivierung größtenteils unverändert. Die IL-1-abhängige Phosphorylierung von DCP1a zeigte in den sgpool-EDC4-Zellen eine deutliche Verringerung, wobei die Aktivierung der dafür zuständigen Kinase JNK (Rzeczkowski et al, 2011) unverändert war. Dies deutet auf eine direkte Beteiligung von EDC4 bei der posttranslationalen Modifikation von DCP1a durch Phosphorylierung hin, wobei der Effekt möglicherweise durch eine fehlerhafte Rekrutierung von JNK an DCP1a hervorgerufen werden könnte. EDC4 könnte hierbei als „*scaffolding factor*“ fungieren. Des Weiteren verdeutlicht die verringerte IL-1-abhängige Aktivierung von JNK, p38 und HSP27 in den sg3-DCP1a-Zellen eine Möglichkeit der Beteiligung von DCP1a in der IL-1-Signalkaskade als zusätzliche, positiv regulatorische Proteinkomponente.

Neben dieser Charakterisierung von zentralen Proteinkomponenten der IL-1-Signalkaskade in den verschiedenen *knockdown*-Zelllinien, war es im nächsten Schritt ebenfalls von Interesse die allgemeine *P-Body*-Assemblierung der Zelllinien zu analysieren.

**A**



**B**



**Abb.3.14: Analyse des IL-1 abhängigen proinflammatorischen Signalwegs in CRISPR/Cas9-Zellen. A:** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), EDC4 (sgpool-EDC4) und XRN1 (sg1-XRN1) sowie die Kontroll-Zelllinie (px459) und untransfizierte parentale HeLa-Zellen wurden für 0,5 h; 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unbehandelt verwendet. Anschließend erfolgte

der Nachweis verschiedener *P-Body*-Komponenten und typischer Proteine der IL-1-Signalkaskade mittels Western Blot (in Zusammenarbeit mit Helmut Müller und Hendrik Weiser, AG Kracht). Die jeweiligen *knockdowns* und markante, zelluläre Ereignisse des IL-1 *signalings* sind durch rote Markierungen gekennzeichnet. **B:** Densitometrische Auswertung (mittels ImageJ) der Western Blot Ergebnisse aus (A) aus unabhängigen biologischen bzw. technischen Replikaten als Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) normalisiert auf die unbehandelten px459-Kontrollzellen.

### 3.6. Regulation der *P-Body*-Assemblierung durch DCP1a, EDC4 und XRN1

Für die Analyse des *P-Body*-Phänotyps sowie der Regulation der *P-Body*-Assemblierung durch eine Stimulation mit IL-1 wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Diese Vorgehensweise erlaubt die Visualisierung der subzellulären Verteilung von *P-Bodies* durch die Verwendung von verschiedenen Primärantikörpern und fluorophorgekoppelten Sekundärantikörpern, welche in Kombination die spezifische Detektion von *P-Body*-Proteinen ermöglichen. Gleichzeitig erlaubt diese Methode neben der Analyse des *P-Body*-Phänotyps eine Aussage über die Gesamtproteinmenge eines bestimmten Proteins einer Zelle. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Immunfluoreszenz-Experimente unter der Verwendung von DCP1a, XRN1- und EDC4-Antikörpern in den Zelllinien px459, sg3-DCP1a, sg1-XRN1, sgpool-EDC4 durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellen für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unstimuliert belassen, um den Effekt einer proinflammatorischen Stimulation der Zellen auf die *P-Body*-Assemblierung zu untersuchen.

Bei der gleichzeitigen Detektion der drei *P-Body*-Proteine DCP1a, XRN1 und EDC4 durch eine indirekte Triple-Immunfluoreszenz konnte eine Kollokalisierung dieser Proteine in *P-Bodies* gezeigt werden (Abb.3.15).

Der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* eines *P-Body*-Proteins wirkte sich wie erwartet in einer Reduktion der Signalintensität des jeweils spezifisch angefärbten Proteins aus. Dabei wurden im Vergleich mit den px459-Kontrollzellen eine geringere Signalintensität für DCP1a in den sg3-DCP1a-Zellen und eine geringere Signalintensität für XRN1 in den sg1-XRN1-Zellen detektiert. Die Detektion von EDC4 in den sgpool-EDC4 Zellen war nahezu nicht möglich, da sich hier das spezifische Signal in Bereich der Immunfluoreszenz-Kontrolle befand (Abb.3.15 A).

Darüber hinaus führte der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* der verschiedenen *P-Body*-Proteine zu einer Veränderung der Assemblierung von *P-Bodies*, welche sich durch die Ermittlung der Mittelwerte der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle verdeutlichen lässt. Im Vergleich zu den px459-Kontrollzellen (6,5 *P-Bodies* pro Zelle) wurde in den sg3-DCP1a-Zellen (18,1

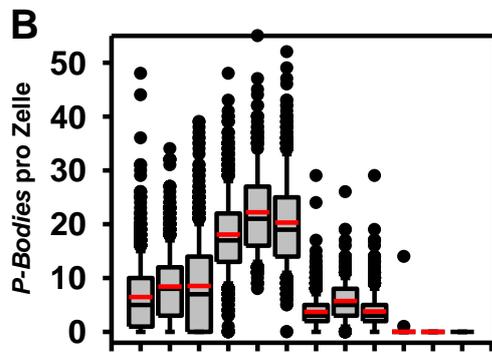
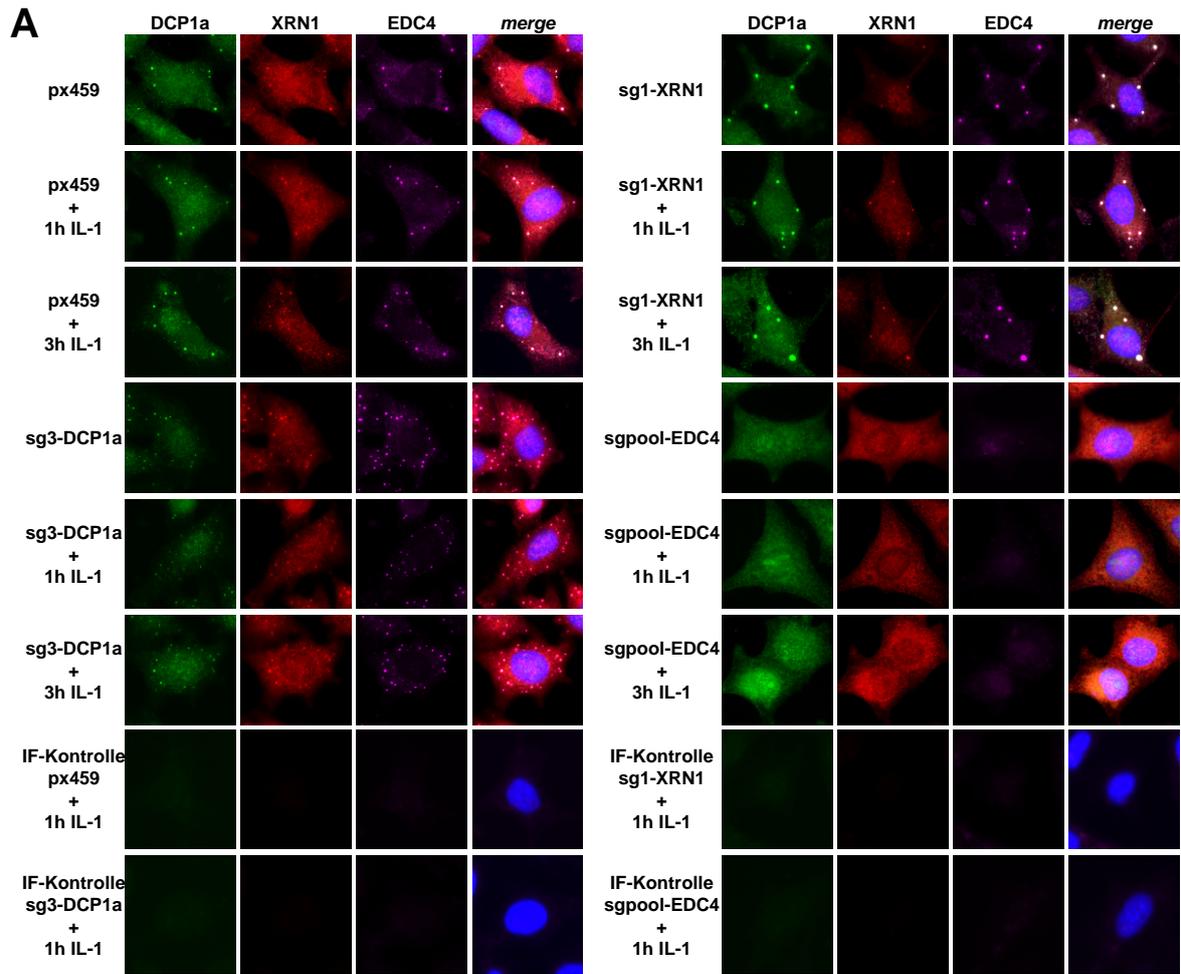
*P-Bodies* pro Zelle) eine deutliche Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle beobachtet. In den sg1-XRN1-Zellen (3,7 *P-Bodies* pro Zelle) konnte eine geringfügige Reduktion der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle beobachtet werden, während gleichzeitig eine sichtbare Erhöhung der *P-Body*-Größe verzeichnet wurde. In Gegensatz dazu führte der *knockdown* von EDC4 in den sgpool-EDC4-Zellen zum weitestgehend kompletten Verlust der *P-Body*-Assemblierung. In allen Konditionen führte eine Stimulation der Zellen mit IL-1 für 1 h und 3 h zu einer geringen Erhöhung der Mittelwerte der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle um einen maximalen Faktor von 1,5 (Abb.3.15 A, B, D).

Neben der Analyse des *P-Body*-Phänotyps mittels der Mittelwerte der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle wurde der *P-Body*-Phänotyp ebenfalls über die Analyse der Zellpopulation betrachtet. Hierzu wurden die Zellen anhand der *P-Body*-Anzahlen kategorisiert und die prozentuale Verteilung der einzelnen Populationen graphisch dargestellt. Dabei wurde ersichtlich, dass in den sg3-DCP1a-Zellen eine Population von Zellen mit mehr als 15 *P-Bodies* pro Zelle einen deutlich höheren Anteil ausmacht als in den px459-Kontrollzellen. Weiterhin zeigen die sg3-DCP1a-Zellen eine nahezu komplette Aufhebung der Zellpopulation, welche keine *P-Bodies* aufweisen. In den sg1-XRN1-Zellen wurde ersichtlich, dass der größte Anteil der Zellen *P-Body*-Anzahlen im Bereich von 1-8 *P-Bodies* pro Zelle enthalten. Zellpopulationen, mit höheren *P-Body*-Anzahlen, sowie Populationen ohne *P-Bodies* machen dabei prozentual nur einen sehr geringen Anteil aus. Bei der Betrachtung der Zellpopulationen konnte, wie auch schon beim Vergleich der Mittelwerte, eine Verschiebung der Zellpopulationen nach einer Stimulation der Zellen mit IL-1 beobachtet werden. In den px459-Kontrollzellen und den sg3-DCP1a-Zellen führte die Behandlung der Zellen mit IL-1 zu einer Zunahme der Zellpopulation mit mehr als 15 *P-Bodies*. Außerdem kommt es nach der IL-1-Stimulation in den sg1-XRN1-Zellen zu einer Zunahme der Zellpopulation mit mehr als 9 *P-Bodies*. Im Gegenzug dazu kommt es in den jeweiligen Versuchskonditionen zu einer Reduktion der Zellpopulationen mit einer geringen *P-Body*-Anzahlen pro Zelle. Im Falle der px459-Kontrollzellen und der sg1-XRN1-Zellen betrifft diese Reduktion vor allem Populationen, welche keine *P-Bodies* aufweisen, wogegen es bei den sg3-DCP1a-Zellen zu einer Reduktion der Zellpopulation mit weniger als 15 *P-Bodies* kommt (Abb.3.15 C).

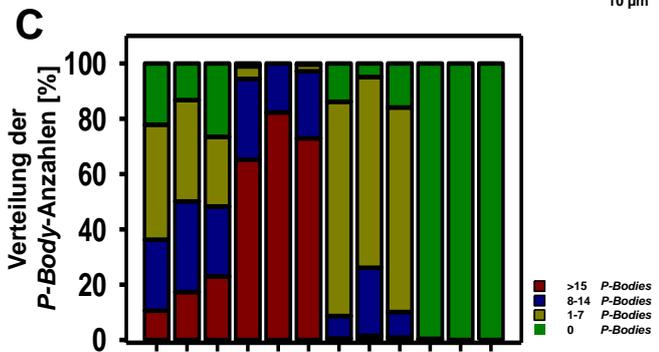
Die starken Veränderungen des *P-Body*-Phänotyps durch den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP1a in HeLa-Zellen konnte ebenfalls in HEK293IL-1R-Zellen beobachtet werden. Auch hier führte die deutliche Reduktion der DCP1a-Proteinmenge zu einer Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle (Abb.Anh.2).

Zusätzlich wurde der *P-Body*-Phänotyp in HeLa-Zellen untersucht, welche nur eine schwache CRISPR/Cas9-vermittelte Verringerung der Proteinmenge von EDC4 (sg1-EDC4) aufweisen. In diesem Fall konnte beobachtet werden, dass die beschriebene Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung nur teilweise stattfindet. In der Zellpopulation fanden sich Zellen, in welchen mittels der indirekten Immunfluoreszenz kein EDC4-Protein detektiert werden konnte. Diese Zellen zeigten eine komplette Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung. Die übrigen Zellen, in welchen auch weiterhin EDC4 detektiert werden konnte, waren von diesem Effekt nicht betroffen (Abb.Anh.3). Diese Ergebnisse zeigen, dass EDC4 eine essentielle Proteinkomponente für die Assemblierung von *P-Bodies* darstellt.

Abschließend lässt sich sagen, dass der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* aller drei *P-Body*-Proteine einen veränderten *P-Body*-Phänotyp zur Folge hat. Dabei werden diese Veränderungen nicht nur bei Betrachtung einzelner Zellen ersichtlich, sondern auch bei einer Betrachtung der gesamten Zellpopulation. Es konnten für die verschiedenen Proteine unterschiedliche Effekte von einer starken Zunahme (sg3-DCP1a-Zellen) bis hin zu einer kompletten Auflösung (sgpool-EDC4-Zellen) der *P-Body*-Assemblierung beobachtet werden.



px459	+	+	+										
sg3-DCP1a				+	+	+							
sg1-XRN1							+	+	+				
sgpool-EDC4										+	+	+	
1h IL-1		+					+					+	
3h IL-1			+				+					+	



px459	+	+	+										
sg3-DCP1a				+	+	+							
sg1-XRN1							+	+	+				
sgpool-EDC4										+	+	+	
1h IL-1		+					+					+	
3h IL-1			+				+					+	

**D**

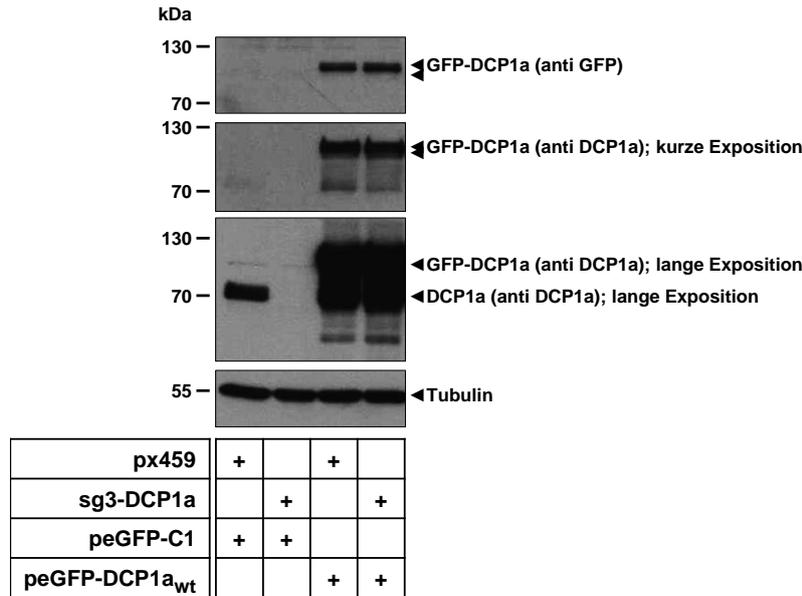
Zelltyp	IL-1 [h]	n=	P-Bodies pro Zelle
px459	-	899	6.5
px459	1	565	8.4
px459	3	584	8.5
sg3-DCP1	-	641	18.1
sg3-DCP1	1	293	22.2
sg3-DCP1	3	528	20.3
sg1-XRN1	-	809	3.7
sg1-XRN1	1	345	5.7
sg1-XRN1	3	702	3.8
sgpool-EDC4	-	467	0.0
sgpool-EDC4	1	426	0.0
sgpool-EDC4	3	323	0.0

**Abb.3.15: Einfluss von DCP1a, XRN1 und EDC4 für die Assemblierung von *P-Bodies*.** **A:** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1) und EDC4 (sgpool-EDC4) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unstimuliert verwendet. Anschließend erfolgte die Analyse des *P-Body*-Phänotyps durch indirekte Immunfluoreszenz mittels DCP1a, XRN1- und EDC4-Antikörpern. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. **B:** Quantitative Darstellung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle der unterschiedlichen Versuchsansätze aus bis zu 9 unterschiedlichen Experimenten (schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert) **C:** Quantitative Darstellung der Verteilung der zellulären *P-Body*-Anzahlen in den Gesamtpopulationen der Versuchsansätze aus bis zu 9 unterschiedlichen Experimenten. **D:** Zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Zellzahlen und der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle (Mittelwert) zu den unterschiedlichen Versuchsansätzen.

### 3.7. Einfluss der Rekonstitution von DCP1a und EDC4 in CRISPR/Cas9-Zellen auf die *P-Body*-Assemblierung

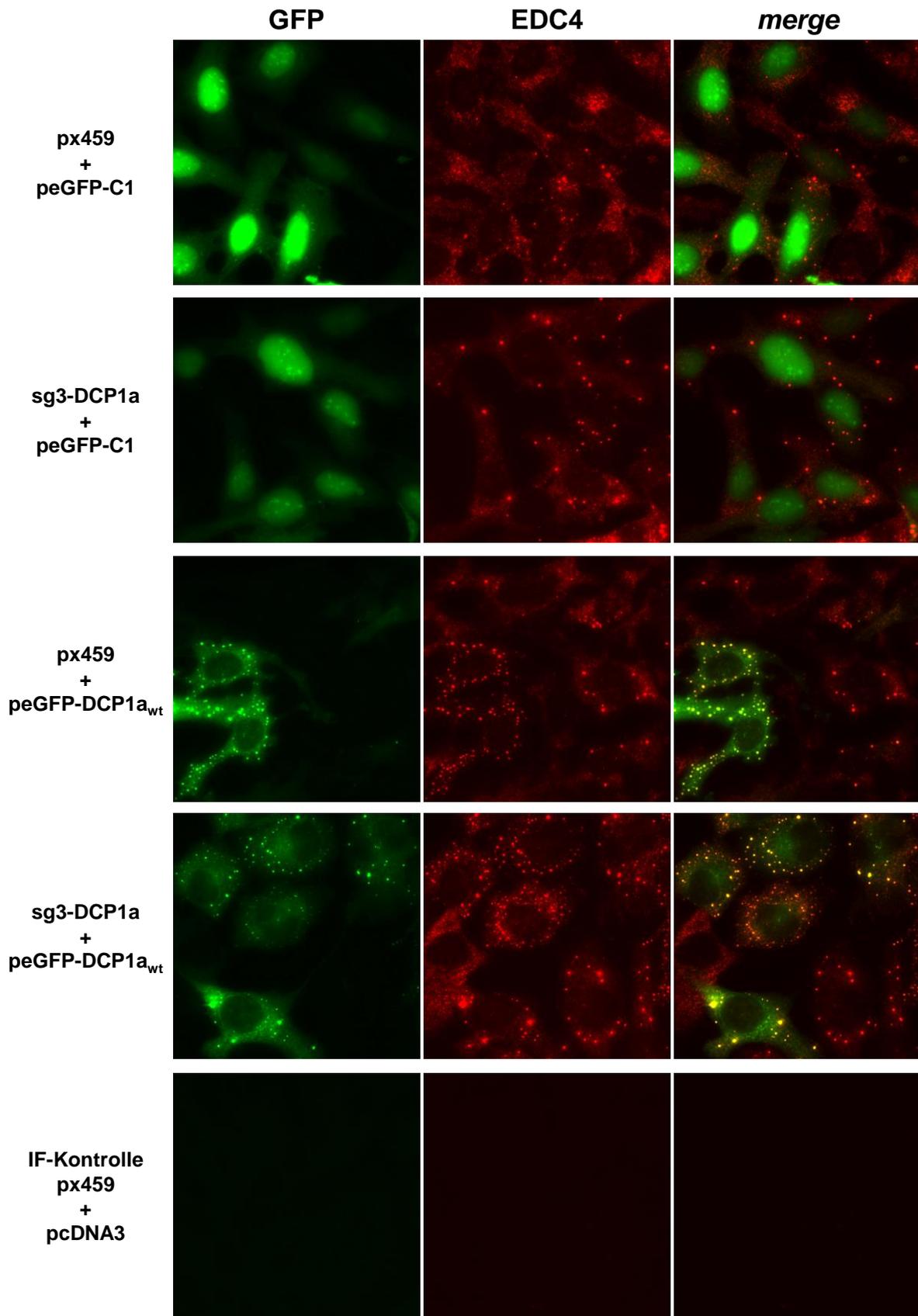
In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von DCP1a zu einer starken Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle und der *knockdown* von EDC4 zu einer kompletten Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung führt. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob eine Reexpression der betroffenen Proteine durch eine Transfektion der Zellen mit geeigneten Expressionsvektoren zu einer Umkehrung dieser Ergebnisse führen kann. So wäre im Falle von DCP1a zu erwarten, dass die Reexpression von DCP1a in den sg3-DCP1a-Zellen eine Verringerung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle auf das Niveau der px459-Kontrollzelllinie zur Folge hat. Die Reexpression von EDC4 in den sgpool-EDC4-Zellen sollte dagegen eine *P-Body*-Assemblierung ermöglichen.

Für die Reexpression von DCP1a wurden px459-Kontrollzellen und sg3-DCP1a-Zellen mit GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>wt</sub>) und der Leervektor-Kontrolle (peGFP-C1) im Maßstab einer 100 mm Schale transfiziert. Die Expression von GFP-DCP1a wurde nach der Transfektion durch einen Proteinnachweis mittels Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine Expression von GFP-DCP1a in beiden Zelllinien auf einem vergleichbaren Niveau möglich ist (Abb.3.16).



**Abb.3.16: Rekonstitution von DCP1a-knockdown-Zellen.** HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden mit GFP-DCP1a sowie dem Kontrollvektor (peGFP-C1) transfiziert. 24 h später wurde die Rekonstitution der CRISPR/Cas9-Zellen mit dem *knockdown* von DCP1a durch einen Proteinnachweis mittels Western Blot analysiert. Der Proteinnachweis von Tubulin diente dabei als Beladungskontrolle.

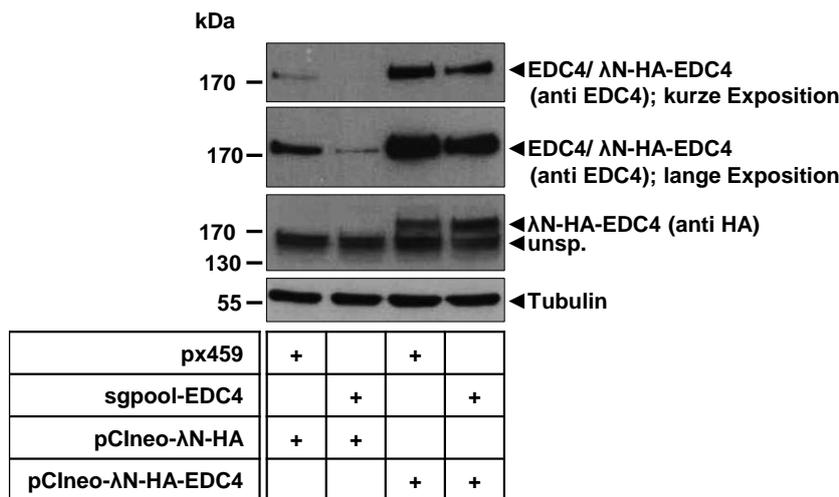
Zur Analyse der Effekte einer Reexpression von DCP1a in den sg3-DCP1a-Zellen auf die *P-Body*-Assemblierung wurden diese parallel zu den px459-Kontrollzellen mit einem Expressionsvektor für GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>wt</sub>) und dem Kontrollvektor (peGFP-C1) in  $\mu$ -Slides VI 0.4 (Ibidi) transfiziert. Anschließend erfolgte die Visualisierung der *P-Bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mittels EDC4-Antikörper und die Detektion der Expression des GFP-DCP1a-Proteins mittels der GFP-bedingten Eigenfluoreszenz. Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Expression von GFP-DCP1a in den px459-Kontrollzellen eine deutliche Steigerung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle zur Folge hat. Diese Beobachtung konnte in unveränderter Weise ebenfalls in den sg3-DCP1a-Zellen gemacht werden (Abb.3.17). Folglich konnte die Annahme einer Umkehrung der erhöhten *P-Body*-Anzahlen pro Zelle, welche nach einen CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP1a beobachtet wurden, durch eine Reexpression von DCP1a nicht bestätigt werden.



—  
10µm

**Abb.3.17: Rekonstitution von DCP1a-knockdown-Zellen.** HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden mit GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>wt</sub>) und dem Kontrollvektor (peGFP-C1) transfiziert. Anschließend wurde der *P-Body*-Phänotyp der transfizierten Zellen durch eine indirekte Immunfluoreszenz (IF) mit einem EDC4-Antikörper und der GFP-Eigenfluoreszenz analysiert. Für die IF-Kontrollen wurden px459-Zellen mit den Vektor pcDNA3 transfiziert und die IF ohne Primäntikörper durchgeführt.

Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von EDC4 (sgpool-EDC4) und die Kontrollzellen (px459) wurden für die Reexpression von EDC4 mit dem Expressionsvektor λN-HA-EDC4 (pCIneo-λN-HA-EDC4) und der Leervektor-Kontrolle (pCIneo-λN-HA) im Maßstab einer 100 mm Schale transfiziert. Anschließend wurde die Expression von λN-HA-EDC4 nach Transfektion durch einen Proteinnachweis mittels Western Blot analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Expression von λN-HA-EDC4 in beiden Zelllinien (sgpool-EDC4 und px459) auf einem vergleichbaren Niveau möglich ist (Abb.3.18).

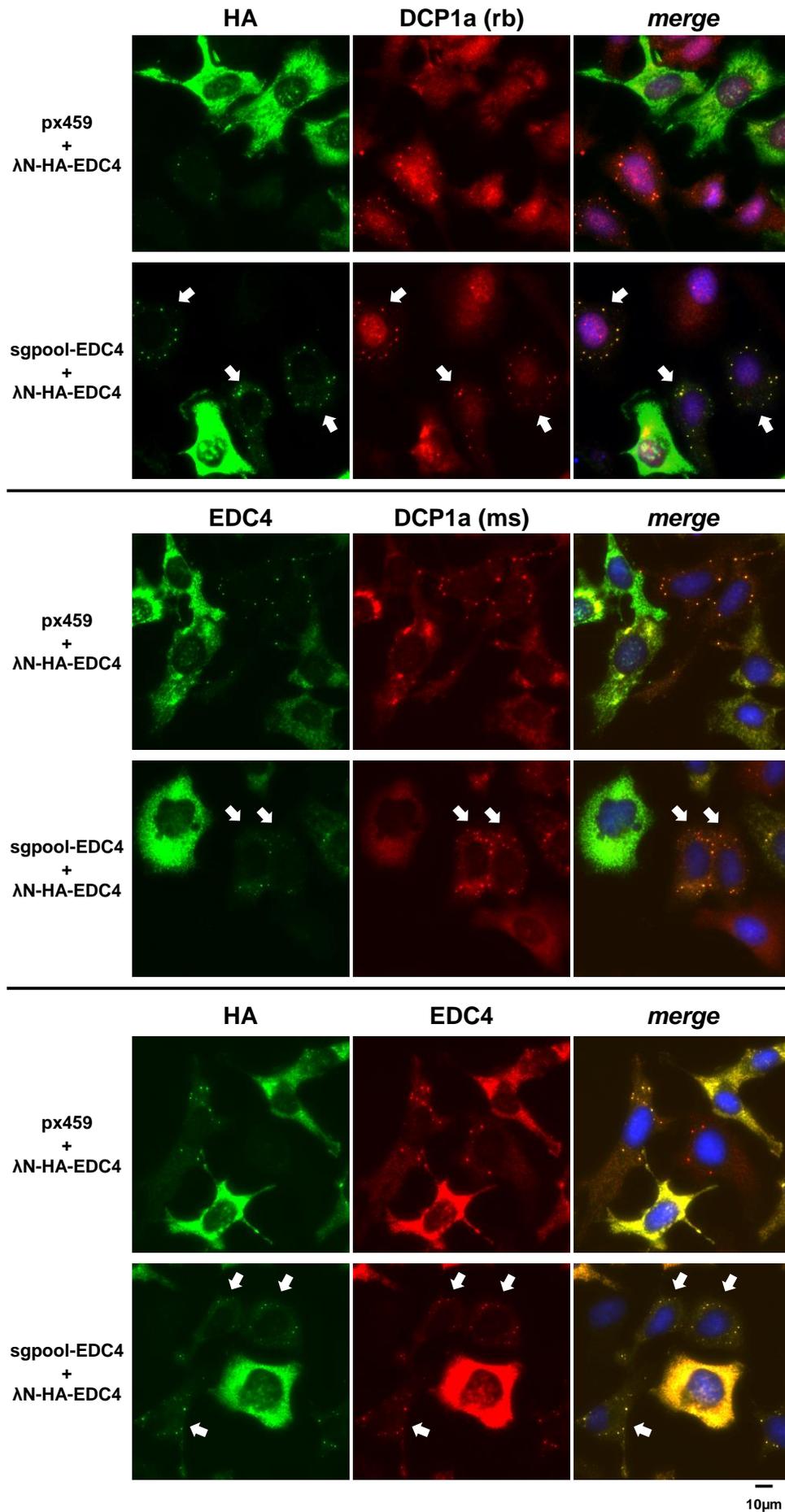


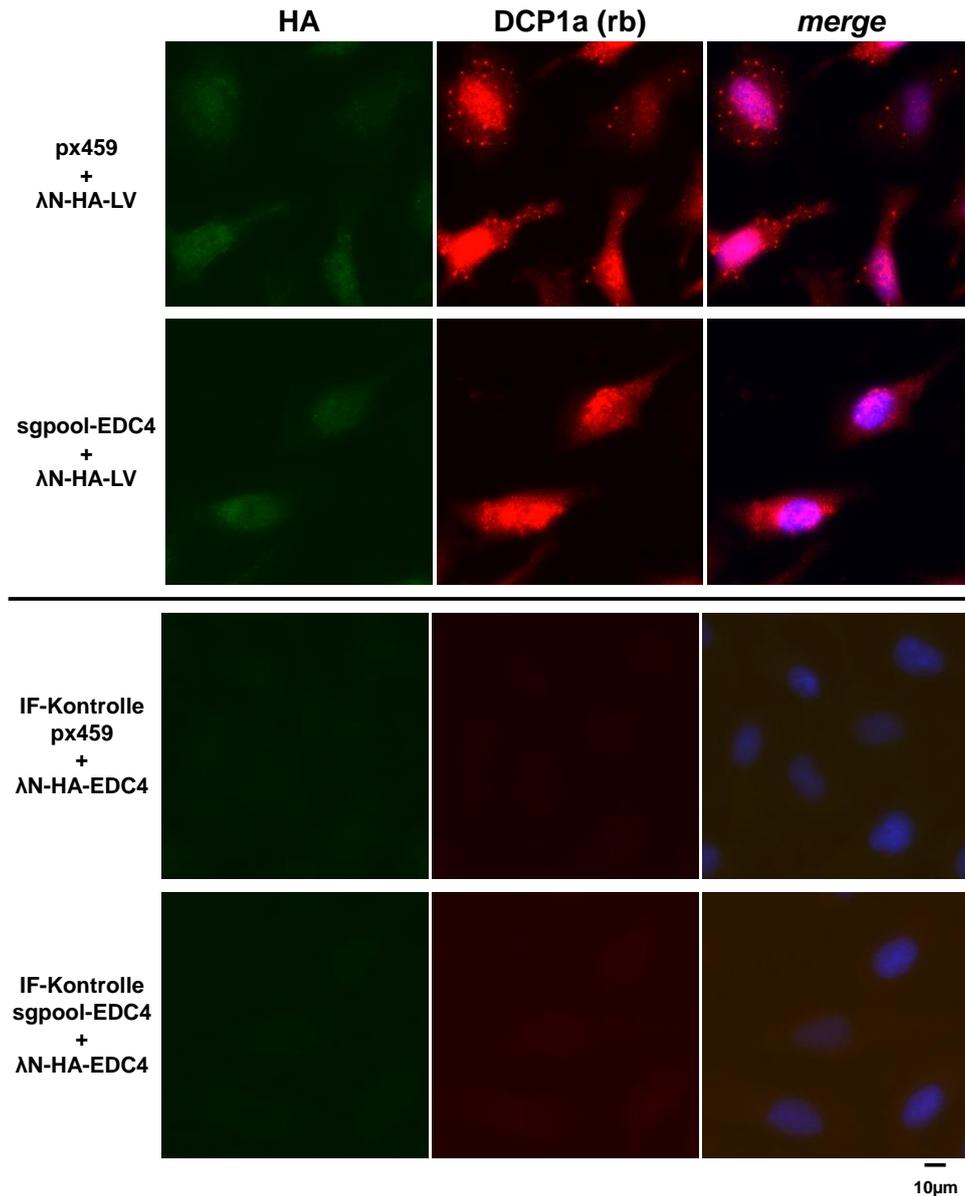
**Abb.3.18: Rekonstitution von EDC4-knockdown-Zellen.** HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von EDC4 (sgpool-EDC4) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden mit λN-HA-EDC4 (pCIneo-λN-HA-EDC4) sowie dem Kontrollvektor (pCIneo-λN-HA) transfiziert. Anschließend wurde die Rekonstruktion der CRISPR/Cas9-Zellen mit dem *knockdown* von EDC4 durch einen Proteinnachweis mittels Western Blot analysiert. Der Proteinnachweis von Tubulin diente dabei als Beladungskontrolle.

Zur Analyse der Effekte einer Reexpression von EDC4 in Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von EDC4 (sgpool-EDC4) auf die *P-Body*-Assemblierung wurden diese parallel zu den px459-Kontrollzellen mit einem Expressionsvektor für λN-HA-EDC4 (pCIneo-λN-HA-EDC4) und dem Kontrollvektor (pCIneo-λN-HA) in μ-Slides VI 0.4 (Ibidi) transfiziert. Anschließend erfolgte die Analyse der *P-Body*-Phänotypen durch eine indirekte

Immunfluoreszenz unter der Verwendung von verschiedenen anti-HA-, anti-DCP1a- und anti-EDC4-Antikörpern in unterschiedlichen Kombinationen. Dabei konnte in den px459-Kontrollzellen und den sgpool-EDC4-Zellen eine einzelzellabhängige Variation in der Expressionsstärke von  $\lambda$ N-HA-EDC4 beobachtet werden. Die übermäßig starke Expression von  $\lambda$ N-HA-EDC4 führte zu einer Auflösung der *P-Bodies*. Lediglich durch eine mäßige Expression von  $\lambda$ N-HA-EDC4 konnte eine Kolokalisation des ektoptisch exprimierten Proteins in *P-Bodies* sowie die allgemeine Assemblierung von *P-Bodies* nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte durch diese mäßige Expression eine Assemblierung von *P-Bodies* in den sgpool-EDC4 Zellen erreicht werden, welche wie beschrieben im Ausgangszustand in untransfizierten Zellen keine *P-Bodies* aufweisen (Abb.3.19).

Diese Daten zeigen, dass EDC4 einen zentralen Faktor für die Assemblierung von *P-Bodies* darstellt. Dabei kann eine direkte Verbindung zwischen der effektiven EDC4-Proteinmenge und der Assemblierung von *P-Bodies* angenommen werden. Eine zu geringe und eine zu stark erhöhte Proteinmenge bedingen die Auflösung der *P-Body*-Strukturen. Nur eine eng kontrollierte EDC4-Proteinmenge innerhalb einer Zelle ermöglicht so die korrekte Ausbildung von *P-Bodies*. Diese direkte Abhängigkeit der *P-Body*-Assemblierung von EDC4 konnte bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden. Dabei wurde in THP-1-Zellen gezeigt, dass ein Verlust des EDC4-Proteins eine Aufhebung der *P-Body*-Strukturen zur Folge hat (Seto et al, 2015). Die eigenen Experimente bestätigen diese Beobachtungen und verstärken die zentrale Rolle von EDC4 bei der *P-Body*-Assemblierung in verschiedenen zellulären Modellsystemen durch die Möglichkeit einer Wiederherstellung der *P-Body*-Assemblierung durch eine erfolgreiche EDC4-Reexpression. In dieser Arbeit konnte jedoch zusätzlich der neuartige Befund erhoben werden, dass auch eine zu starke Expression von EDC4 eine Auflösung der *P-Bodies* zur Folge hat. Folglich stellt EDC4 einen hoch relevanten *scaffolding* Faktor dar, dessen Proteinkonzentration die *P-Body*-Assemblierung unmittelbar reguliert.





**Abb.3.19: Die Rekonstitution von EDC4-knockdown-Zellen ermöglicht in Abhängigkeit von der exprimierten EDC4-Proteinmenge die Assemblierung von *P-Bodies*.** HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von EDC4 (sgpool-EDC4) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden mit  $\lambda$ N-HA-EDC4 (pCIneo- $\lambda$ N-HA-EDC4) sowie dem Kontrollvektor  $\lambda$ N-HA-LV (pCIneo- $\lambda$ N-HA) transfiziert. Anschließend wurde der *P-Body*-Phänotyp der rekonstituierten Zellen mittels einer indirekten Immunfluoreszenz (IF) unter der Verwendung von unterschiedlichen Primärantikörpern (anti-HA, anti-DCP1a (ms/rb), anti-EDC4) in verschiedenen Kombinationen analysiert. Für die IF-Kontrollen wurden die jeweiligen Zellen mit  $\lambda$ N-HA-EDC4 (pCIneo-  $\lambda$ N-HA-EDC4) transfiziert und die IF ohne Primärantikörper durchgeführt (Dylight 488 Kontrolle, Cy3 Kontrolle). Zellen mit korrekt rekonstituierten *P-Bodies* sind durch Pfeile gekennzeichnet.

### 3.8. DCP1a-abhängige Formation von *P-Body*-ähnlichen Strukturen in EDC4 *knockdown* Zellen

Für EDC4 wurde in weiteren Arbeiten neben der direkten Regulation der *P-Body*-Formation ebenfalls eine Regulation der Interaktion von Proteinkomponenten des *Decapping*-Komplexes

(DCP1a, DCP2 und XRN1) gezeigt, wobei EDC4 als *scaffold*-Protein dient und für die *Decapping*-Aktivität eines zellulären Systems essentiell ist (Chang et al, 2014).

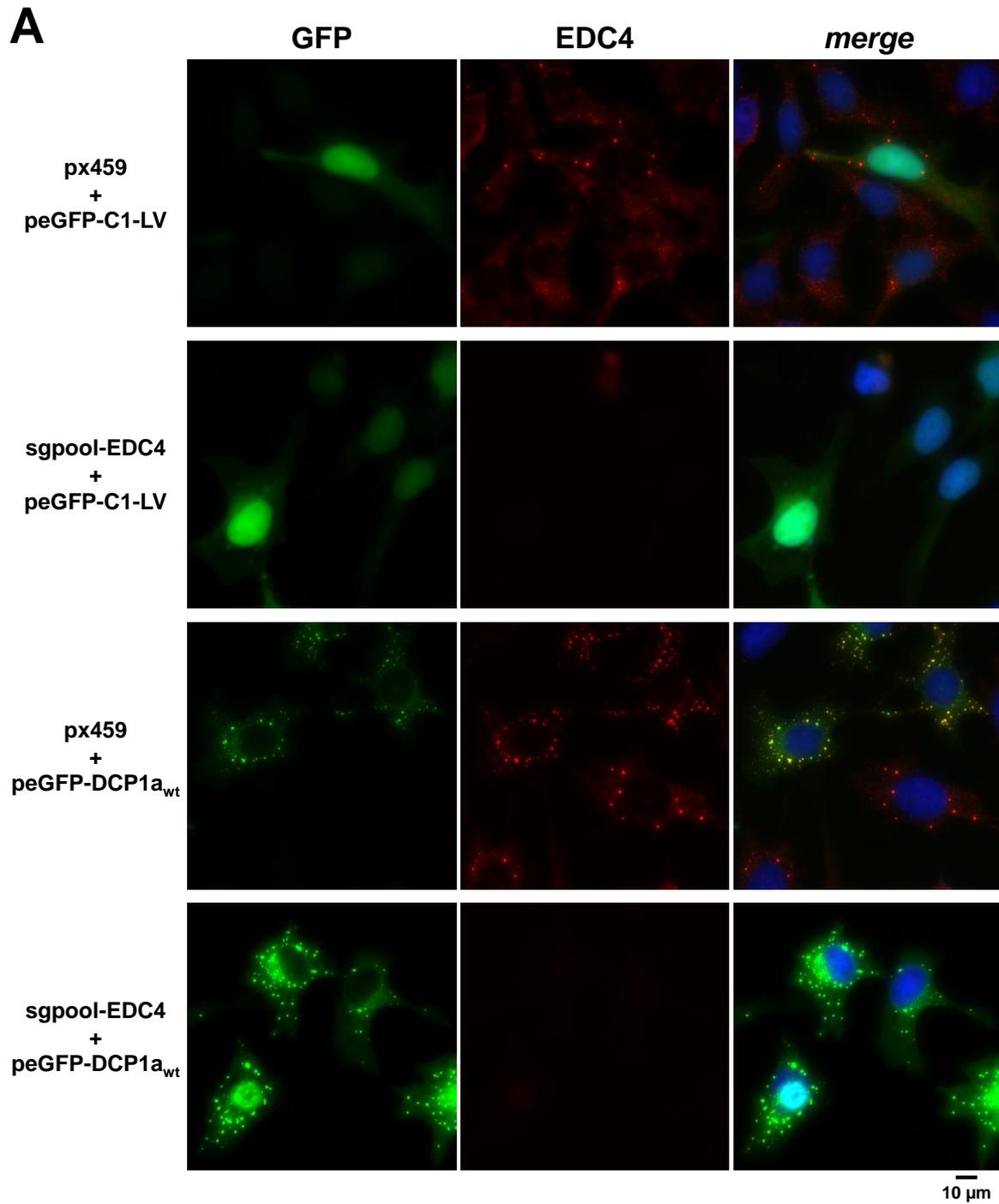
Um die Auswirkungen des *knockdowns* von EDC4 auf die Lokalisierung von überexprimiertem GFP-DCP1a-Protein, welches in den *P-Bodies* lokalisiert (Rzeczkowski et al, 2011), zu untersuchen, wurden sgpool-EDC4-Zellen und die px459-Kontrollzellen mit einem entsprechenden Vektor zur Expression von GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>wt</sub>) und dem Kontrollvektor (peGFP-C1) in  $\mu$ -Slides VI 0.4 (Ibidi) transfiziert. Anschließend wurde der *P-Body*-Phänotyp durch eine indirekte Immunfluoreszenz unter der Verwendung verschiedener anti-EDC4, anti-XRN1- und anti-EDC3-Antikörper sowie der GFP-Eigenfluoreszenz analysiert. Dabei konnte in den px459-Kontrollzellen die erwartete Kolokalisation von GFP-DCP1a mit EDC4, XRN1 sowie EDC3 in *P-Bodies* beobachtet werden. Untransfizierte sgpool-EDC4-Zellen zeigten, wie erwartet, keine *P-Body*-Assemblierung. Im Gegensatz dazu konnte durch eine ektopische Expression von GFP-DCP1a in den sgpool-EDC4-Zellen eine Formation von kreisförmigen zellulären Strukturen (*foci*) erreicht werden. Diese *foci* zeigten eine Kolokalisation mit EDC3 jedoch nicht mit XRN1 (Abb.3.20). Um eine mögliche Interferenz des zusätzlich exprimierten GFP-Tags von DCP1a bei der *P-Body*-Assemblierung auszuschließen, wurde das Experiment analog unter der Verwendung eines Vektors zur Expression von HA-DCP1a (pcDNA3-HA-DCP1a<sub>wt</sub>) und dem Kontrollvektor (pcDNA3-HA-LV) durchgeführt. Die Ausbildung von zellulären *foci*, sowie die ambivalente Kolokalisation von EDC3 und XRN1 in den sgpool-EDC4-Zellen konnte auch in diesem Experiment beobachtet werden (Abb.Anh.4).

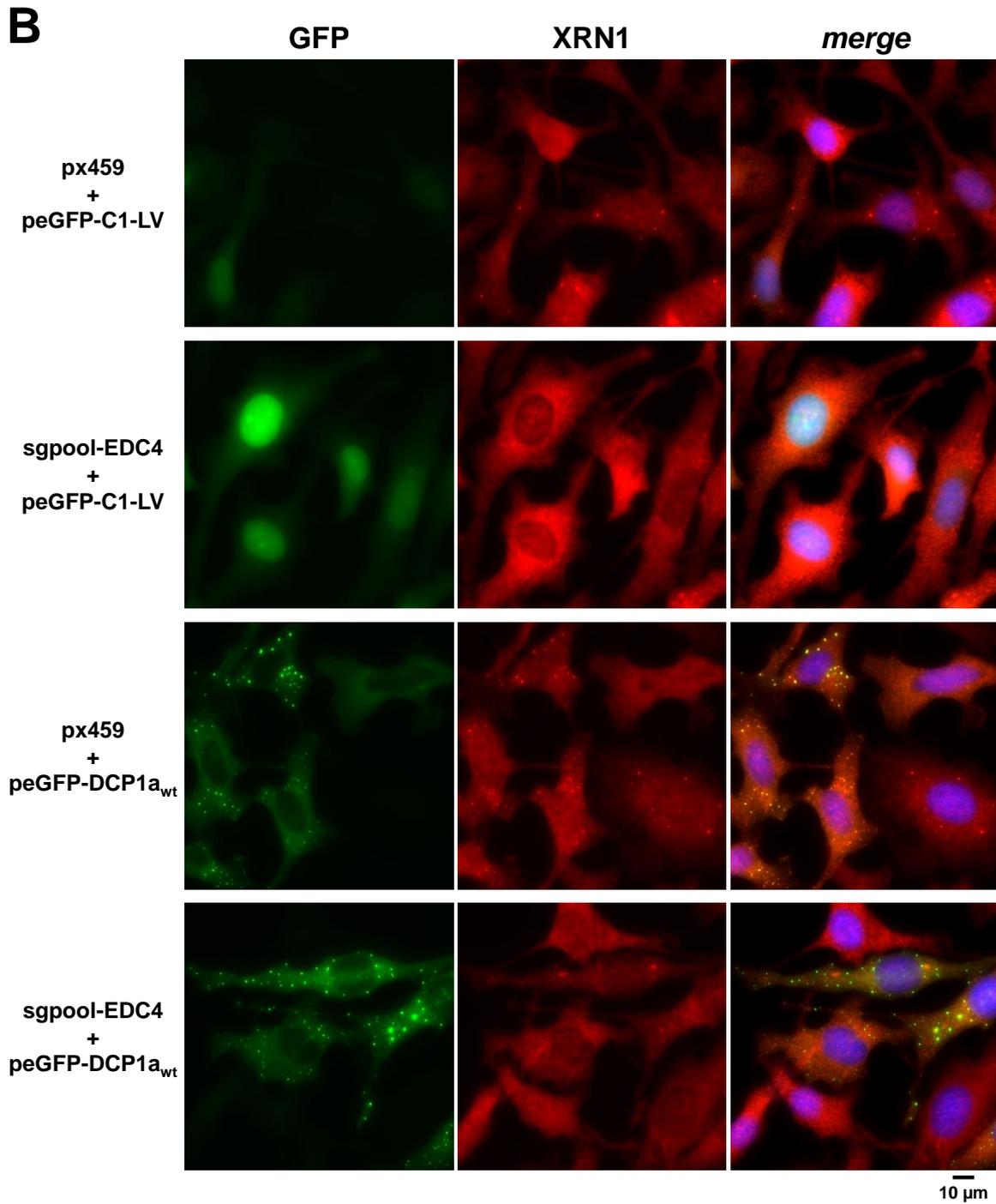
Zur weiteren Untersuchung der Regulation der Zusammensetzung der Proteinkomponenten von *P-Bodies* durch DCP1a in Abwesenheit von EDC4 wurden zusätzliche Vektoren zur Expression von veränderten Formen von DCP1a (GFP-gekoppelt) verwendet. Dazu wurden HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von EDC4 (sgpool-EDC4) und die px459-Kontrollzellen mit Vektoren zur Expression von GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>wt</sub>), GFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub> (peGFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub>) und zur Expression einer GFP-DCP1a-Variante mit vier Punktmutationen (L551R, I555S, F561R, L565S; peGFP-DCP1a<sub>MT3</sub>) sowie der Leervektor-Kontrolle (peGFP-C1) transfiziert. GFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub> stellt dabei, wie bereits beschrieben, eine ubiquitinylierungsdefiziente Proteinvariante dar und ist zusätzlich durch eine Erhöhung der zellulären *P-Body*-Anzahl charakterisiert (Tenekeci et al, 2016). Bei der Proteinvariante GFP-DCP1a<sub>MT3</sub> ist aufgrund der vier Punktmutationen eine Trimerisierung

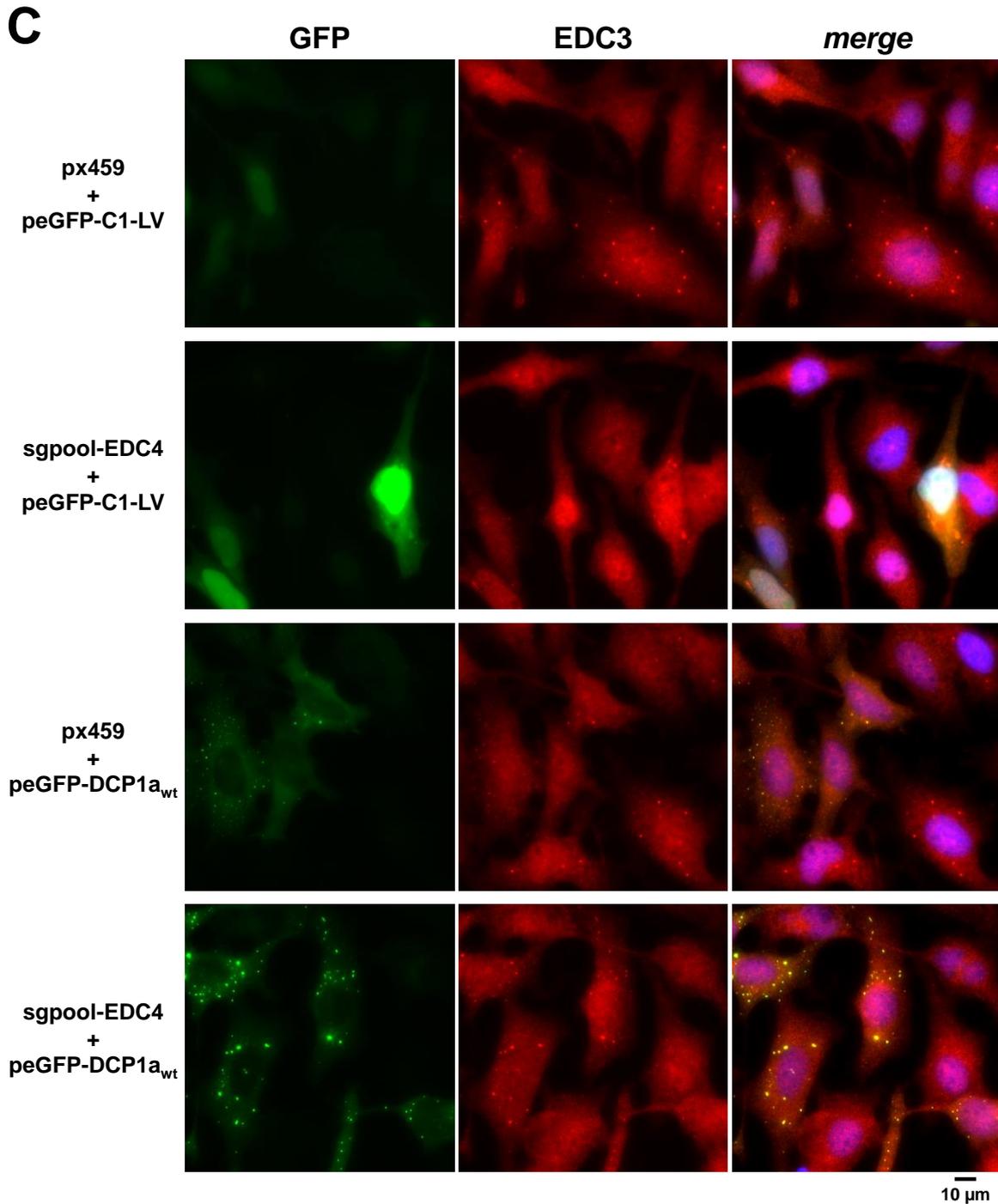
des Proteins nicht mehr möglich (Tritschler et al, 2009) . Diese Mutationen innerhalb der Trimerisierungsdomäne haben neben einer defizienten Phosphorylierung von DCP1a, zusätzlich einen Verlust der Assemblierung von *P-Bodies* zur Folge (Tenekeci et al, 2016; Tritschler et al, 2009). Nach der Transfektion der unterschiedlichen Expressionsvektoren erfolgte eine Analyse der *P-Body*-Assemblierung mittels Immunfluoreszenz-Experimenten unter der Verwendung von EDC3- und XRN1-Antikörpern sowie der Detektion der GFP-Eigenfluoreszenz der exprimierten Proteine.

Dabei konnten in den px459-Kontrollzellen die Zunahme der *P-Body*-Assemblierung nach der Expression von peGFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub> mit einer gleichzeitigen Kolokalisation von EDC3 und XRN1 sowie die Auflösung der *P-Body*-Strukturen nach der Expression von peGFP-DCP1a<sub>MT3</sub> bestätigt werden. Diese Beobachtungen der Effekte der exprimierten Varianten von DCP1a auf die *P-Body*-Assemblierung konnten ebenfalls in den sgpool-EDC4-Zellen gemacht werden. Allerdings führte die Expression von DCP1a<sub>K520-577R</sub> in den sgpool-EDC4-Zellen zu einer selektiven Lokalisierung von EDC3 und XRN1 in den *P-Bodies*. Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten, konnte in den sgpool-EDC4-Zellen keine Kolokalisation von XRN1 in den *P-Bodies* verzeichnet werden, während EDC3 in den *P-Bodies* lokalisierte (Abb.Anh.5).

Diese Ergebnisse verstärken die Rolle von EDC4 als *scaffolding*-Protein in *P-Bodies*. EDC4 fungiert dabei als zentrales Protein für die Rekrutierung von XRN1 in die *P-Bodies*. Die Möglichkeit zur Ausbildung von *P-Body*-ähnlichen Strukturen durch eine Überexpression von DCP1a in Zellen, in welchen aufgrund der Abwesenheit von EDC4 keine native *P-Body*-Assemblierung möglich ist, zeigt eine Subspezies von *P-Bodies*, welche in ihrer Proteinzusammensetzung remodelliert worden sind. Die Funktion und Aktivität dieser Subspezies an *P-Bodies* wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.







**Abb.3.20: Überexprimiertes GFP-DCP1a kolokalisiert in Abwesenheit von EDC4 mit EDC3, aber nicht mit XRN1 in remodellierten zytoplasmatischen *foci*.** HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von EDC4 (sgpool-EDC4) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden entweder mit GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>wt</sub>) oder dem Kontrollvektor (peGFP-C1-LV) transfiziert. Anschließend wurde der *P-Body*-Phänotyp der transfizierten Zellen mittels einer indirekten Immunfluoreszenz (IF) unter der Verwendung von EDC4-Antikörper (A), XRN1-Antikörper (B), EDC3-Antikörper (C) und der GFP-Eigenfluoreszenz analysiert. Die IF-Kontrollen finden sich im Anhang unter Abb.Anh.4.

### 3.9. Regulation der Ausbildung von DCP1a-, EDC4- und XRN1-Proteinkomplexen

Die bisher gezeigten Ergebnisse verdeutlichen die differentielle Abhängigkeit der *P-Body*-Assemblierung von den untersuchten *P-Body*-Proteinen DCP1a, XRN1 und EDC4. Dabei regulieren die drei genannten Proteine auf eine direkte oder indirekte Art und Weise die Formation von *P-Bodies*. Zusätzlich ist denkbar, dass nicht nur die Assemblierung von *P-Bodies* von den untersuchten Proteinen abhängig ist, sondern auch deren Interaktion und Ausbildung von Subkomplexen außerhalb der *P-Bodies* im Zytoplasma.

Zur Untersuchung der Ausbildung von zytoplasmatischen Proteinkomplexen, sowie der relativen Lokalisation dieser Komplexe zu den *P-Bodies*, wurde die Technik des *Immuno-Proximity-Ligation-Assays* (Immuno-PLA) verwendet (Abb.3.3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Interaktionen von DCP1a:EDC4, XRN1:DCP1a und XRN1:EDC4 sowie die Interaktionen, bzw. allgemeine Expression von XRN1:XRN1, DCP1a:DCP1a und EDC4:EDC4 durch spezifische Antikörper in Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1), EDC4 (sgpool-EDC4) und in der Kontroll-Zelllinie (px459) mittels PLA untersucht. Gleichzeitig erfolgte die Detektion der *P-Bodies* durch EDC4-, bzw. DCP1a-spezifische Anfärbungen. Für die Auswertung erfolgte die Ermittlung der PLA-Signale pro Zelle sowie deren Überlagerungen mit *P-Bodies*.

Bei den Experimenten konnten für die verschiedenen Kombinationen der PLA unterschiedlich Signalanzahlen detektiert werden. Die höchste PLA-Signalanzahl wurde für die Antikörperkombination DCP1a<sub>ms</sub>:DCP1a<sub>rb</sub>, welche sowohl die DCP1a Proteinexpression, als auch die Trimerisierung dieses Faktors erfasst, detektiert, während die niedrigste PLA-Signalanzahl für XRN1<sub>ms</sub>:DCP1a<sub>rb</sub> beobachtet wurde (Abb.3.21 A, B).

Der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von DCP1a führte bei der Verwendung der Antikörperkombinationen DCP1a<sub>ms</sub>:EDC4<sub>rb</sub>, XRN1<sub>ms</sub>:DCP1a<sub>rb</sub> und DCP1a<sub>ms</sub>:DCP1a<sub>rb</sub> zu einer Reduktion der PLA-Signale (Abb.3.21 A, B, D; Abb.Anh.6; Abb.Anh.7; Abb.Anh.10). Nach dem *knockdown* von XRN1 wurde bei der Verwendung der Antikörperkombinationen XRN1<sub>ms</sub>:DCP1a<sub>rb</sub>, XRN1<sub>ms</sub>:EDC4<sub>rb</sub> und XRN1<sub>ms</sub>:XRN1<sub>rb</sub> ebenfalls eine Reduktion der PLA-Signalanzahlen beobachtet (Abb.3.21 A, B, D; Abb.Anh.7; Abb.Anh.8; Abb.Anh.9). Die niedrigsten PLA-Signalanzahlen wurden nach dem *knockdown* von EDC4 für die Antikörperkombinationen DCP1a<sub>ms</sub>:EDC4<sub>rb</sub>, XRN1<sub>ms</sub>:EDC4<sub>rb</sub> und EDC4<sub>gt</sub>:EDC4<sub>rb</sub> erzielt,

wobei die Signalanzahlen in diesen Fällen das Niveau der Negativ-Kontrollen erreichten (Abb.3.21 A, B, D; Abb.Anh.6; Abb.Anh.8; Abb.Anh.11). Diese Ergebnisse sind auf die CRISPR/Cas9-vermittelte Reduzierung der jeweiligen Proteinmengen von DCP1a, XRN1 und EDC4 zurückzuführen und bestätigen die bereits durchgeführten Untersuchungen der Proteinmengen durch Western Blot-Analysen (Abb.3.14) und Immunfluoreszenz-Experimenten (Abb.3.15).

Darüber hinaus führte der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von DCP1a bei der Verwendung der Antikörperkombination XRN1<sub>ms</sub>:EDC4<sub>rb</sub> zu einer Reduktion der PLA-Signalanzahl um 33% (Abb.3.21 A, B, D; Abb.Anh.8). Für die Interaktion von DCP1a<sub>ms</sub>:EDC4<sub>rb</sub> konnte in den sg1-XRN1-Zellen eine Reduktion der PLA-Signalanzahlen um 20 Prozent beobachtet werden (Abb.3.21 A, B, D; Abb.Anh.6). Zusätzlich führte der *knockdown* von EDC4 bei der Verwendung der Antikörperkombination XRN1<sub>ms</sub>:DCP1a<sub>rb</sub> zu einer Reduktion der PLA-Signalanzahlen um 11 Prozent (Abb.3.21 A, B, D; Abb.Anh.7).

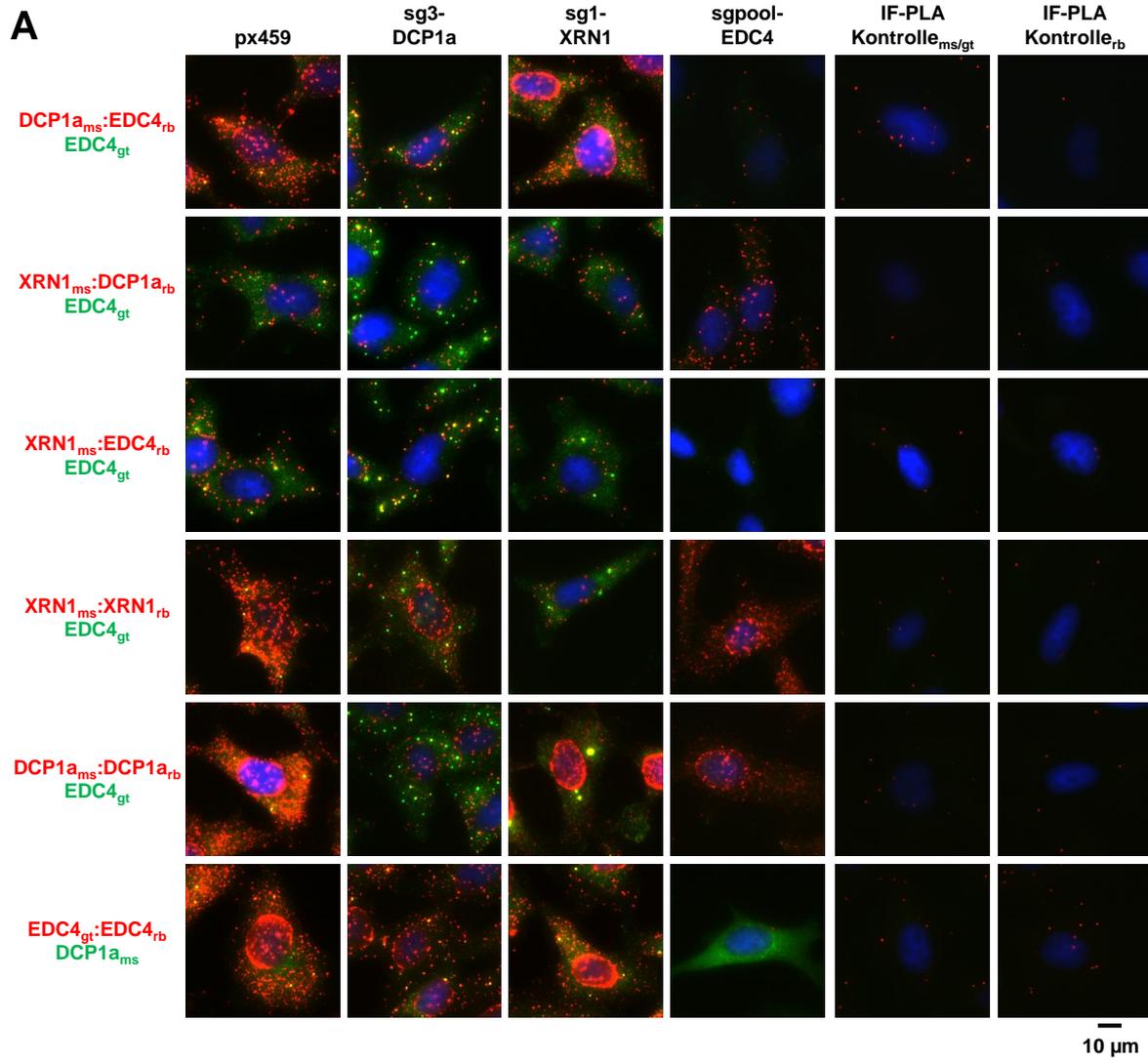
Bei der Untersuchung der Interaktion von XRN1:XRN1 sowie der allgemeinen Proteinexpression durch die Verwendung der XRN1<sub>ms</sub>:XRN1<sub>rb</sub> Antikörperkombination konnte in den sg3-DCP1a Zellen eine Reduktion um 13% und in den sgpool-EDC4-Zellen eine Reduktion um 28% der PLA-Signalanzahlen beobachtet werden (Abb.3.21 A, B, D; Abb.Anh.9). Analog zeigten die PLA-Experimente bei Verwendung der Antikörperkombination DCP1a<sub>ms</sub>:DCP1a<sub>rb</sub> in den sg1-XRN1-Zellen eine Reduktion um 44% und in den sgpool-EDC4-Zellen eine Reduktion um 57% der PLA-Signalanzahlen (Abb.3.21 A, B, D; Abb.Anh.10). Bei der Verwendung der Antikörperkombination EDC4<sub>gt</sub>:EDC4<sub>rb</sub> zeigte sich in den sg3-DCP1a-Zellen eine Reduktion um 41% und in den sg1-XRN1-Zellen eine Reduktion um 23% der PLA-Signalanzahlen (Abb.3.21 A, B, D; Abb.Anh.11).

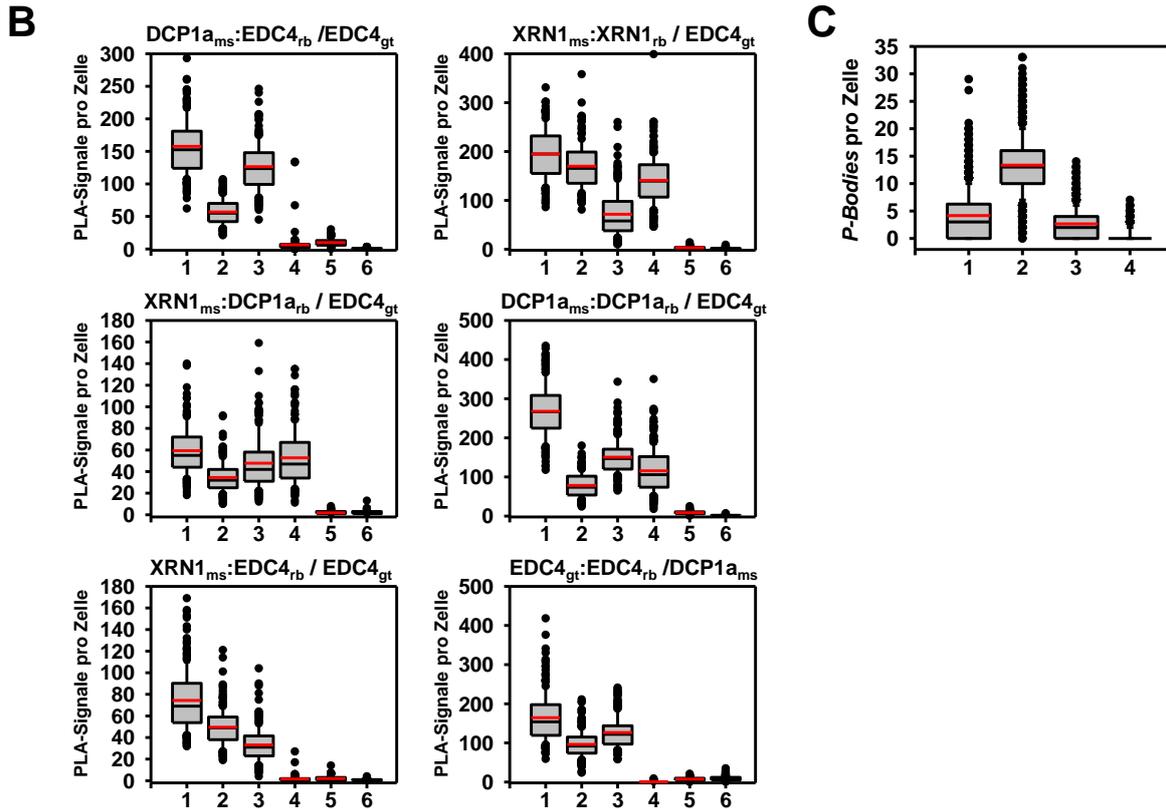
Bei der zusätzlichen Detektion der *P-Bodies* innerhalb der Immuno-PLA konnten die beschriebenen Veränderungen der *P-Body*-Phänotypen bestätigt werden. Auch bei der Immuno-PLA konnte eine starke Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle durch einen CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP1a und eine leichte Verringerung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle durch einen CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von XRN1 beobachtet werden. Der *knockdown* von EDC4 führte zu einer nahezu kompletten Auflösung der *P-Body*-Assemblierung (Abb.3.21 C).

Bei der Betrachtung der Kolo-kalisation der PLA-Spots mit den *P-Bodies* konnten für die verschiedenen Interaktionen unterschiedlich starke Überlagerungen der Signale detektiert

werden. Bei der Verwendung der Antikörperkombination EDC4<sub>gt</sub>:EDC4<sub>rb</sub> konnte in bis zu 90% der Fälle ein *merge* der *P-Bodies* mit PLA-Signalen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei XRN1<sub>ms</sub>:DCP1a<sub>rb</sub> in bis zu 26% der Fälle ein *merge* der *P-Bodies* mit PLA-Signalen. Für die übrigen Antikörperkombinationen wurde in ca. 30%-65% der Fälle ein *merge* der *P-Bodies* mit PLA-Signalen beobachtet. Eine statistisch signifikante Veränderung der Überlagerungen von *P-Bodies* mit PLA-Signalen wurde nur für die Antikörperkombinationen XRN1<sub>ms</sub>:EDC4<sub>rb</sub> und XRN1<sub>ms</sub>:XRN1<sub>rb</sub> nach dem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von EDC4 und für die Antikörperkombination DCP1a<sub>ms</sub>:DCP1a<sub>rb</sub> nach dem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a beobachtet. In diesen Fällen ist die signifikante Veränderung der Überlagerungen auf die Auflösung der *P-Body*-Assemblierung durch den EDC4 *knockdown* und die Verringerung der PLA-Signalanzahlen durch den DCP1a *knockdown* zurückzuführen (Abb.3.21 E, F).

Die vorliegenden Ergebnisse der PLA-Experimente bestätigen die Verringerungen der jeweiligen Proteinmengen durch den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP1a, XRN1 und EDC4, welche bereits durch Western Blot-Analysen detektiert werden konnten. Bei der Verwendung der jeweiligen Antikörperkombination für die PLA, bei welcher eines der beiden Proteine vom *knockdown* betroffen ist, konnte in jedem Fall eine Reduktion der PLA-Signale beobachtet werden. Dies zeigt, dass PLA-Experimente prinzipiell in der Lage sind, spezifische Protein:Protein-Interaktionen zu erfassen. Weiterhin konnten statistisch signifikante Veränderungen der Protein:Protein-Interaktionen der drei *P-Body*-Komponenten DCP1a, EDC4 und XRN1 in Abhängigkeit von dem *knockdown* der Proteine detektiert werden. Hierbei handelte es sich immer um Reduktionen der Protein:Protein-Interaktionen, da in keinem Fall der *knockdown* eines Faktors zur Zunahme der Interaktion der beiden anderen Faktoren führte. Neben der *P-Body*-Assemblierung ist somit auch die Regulation der zytoplasmatischen Interaktionen der drei Proteine außerhalb von den *P-Bodies* von den untersuchten *P-Body*-Proteinen abhängig. Die PLA-Signale kolokalisieren dabei je nach untersuchter Protein:Protein-Interaktion in variablem Ausmaß mit den *P-Bodies*. Unter keiner Kondition konnte eine Abhängigkeit der Häufigkeit dieser Kolokalisationen von dem CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP1a, EDC4 und XRN1 beobachtet werden.





**D**

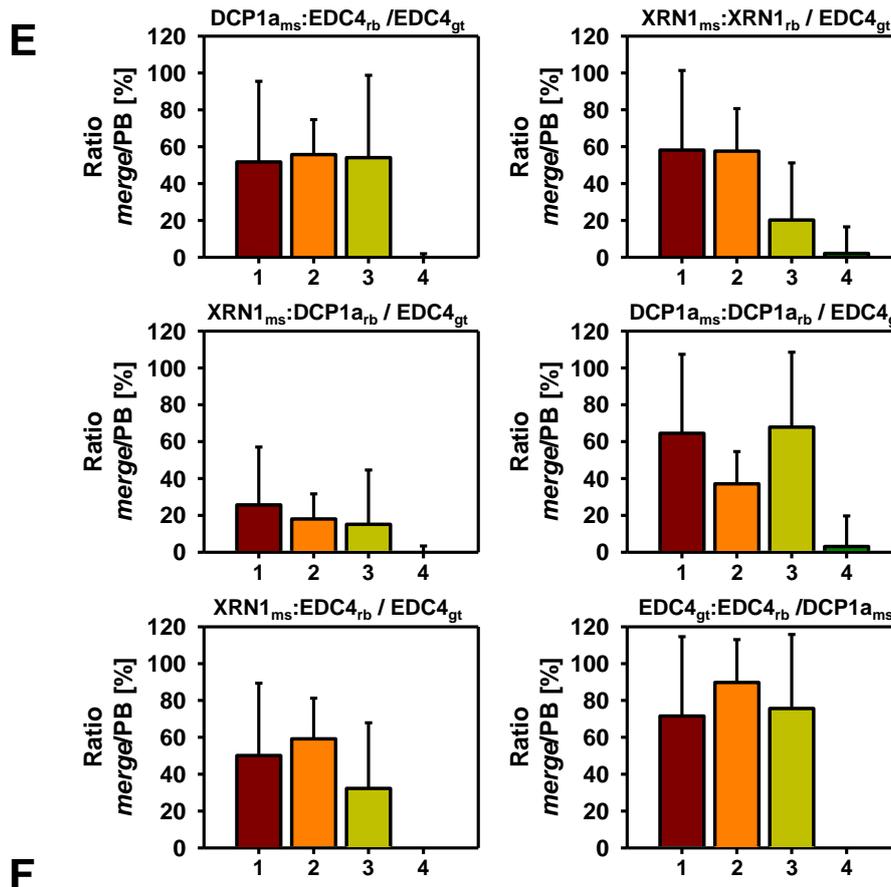
DCP1a <sub>ms</sub> :EDC4 <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>			p ≤ 0,001	XRN1 <sub>ms</sub> :XRN1 <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>			p ≤ 0,001
n=	PLA-Signale [%]			n=	PLA-Signale [%]		
1 px459	176	100	] * ] * ] *	1 px459	163	100	] * ] * ] *
2 sg3-DCP1	195	36		2 sg3-DCP1	178	87	
3 sg1-XRN1	208	80		3 sg1-XRN1	183	37	
4 sgpool-EDC4	201	4		4 sgpool-EDC4	190	72	
5 DCP1a <sub>ms</sub>	114	8		5 XRN1 <sub>ms</sub>	112	2	
6 EDC4 <sub>rb</sub>	117	0		6 XRN1 <sub>rb</sub>	107	1	

XRN1 <sub>ms</sub> :DCP1a <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>			p ≤ 0,001	DCP1a <sub>ms</sub> :DCP1a <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>			p ≤ 0,001
n=	PLA-Signale [%]			n=	PLA-Signale [%]		
1 px459	171	100	] * ] * ] *	1 px459	198	100	] * ] * ] *
2 sg3-DCP1	217	58		2 sg3-DCP1	223	29	
3 sg1-XRN1	206	80		3 sg1-XRN1	231	56	
4 sgpool-EDC4	181	89		4 sgpool-EDC4	234	43	
5 DCP1a <sub>rb</sub>	124	4		5 DCP1a <sub>ms</sub>	134	4	
6 XRN1 <sub>ms</sub>	122	4		6 DCP1a <sub>rb</sub>	127	1	

XRN1 <sub>ms</sub> :EDC4 <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>			p ≤ 0,001	EDC4 <sub>gt</sub> :EDC4 <sub>rb</sub> / DCP1a <sub>ms</sub>			p ≤ 0,001
n=	PLA-Signale [%]			n=	PLA-Signale [%]		
1 px459	194	100	] * ] * ] *	1 px459	204	100	] * ] * ] *
2 sg3-DCP1	183	67		2 sg3-DCP1	211	59	
3 sg1-XRN1	205	45		3 sg1-XRN1	220	77	
4 sgpool-EDC4	172	2		4 sgpool-EDC4	191	1	
5 XRN1 <sub>ms</sub>	98	3		5 EDC4 <sub>rb</sub>	132	6	
6 EDC4 <sub>rb</sub>	111	1		6 EDC4 <sub>gt</sub>	122	8	



DCP1a <sub>ms</sub> :EDC4 <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>			XRN1 <sub>ms</sub> :XRN1 <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>				
	n=	merge/PB [%]		n=	merge/PB [%]		
1	px459	176	52	1	px459	163	58
2	sg3-DCP1	195	56	2	sg3-DCP1	178	58
3	sg1-XRN1	208	54	3	sg1-XRN1	183	20
4	sgpool-EDC4	201	0	4	sgpool-EDC4	190	2
XRN1 <sub>ms</sub> :DCP1a <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>			DCP1a <sub>ms</sub> :DCP1a <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>				
	n=	merge/PB [%]		n=	merge/PB [%]		
1	px459	171	26	1	px459	198	65
2	sg3-DCP1	217	18	2	sg3-DCP1	223	37
3	sg1-XRN1	206	15	3	sg1-XRN1	231	68
4	sgpool-EDC4	181	0	4	sgpool-EDC4	234	3
XRN1 <sub>ms</sub> :EDC4 <sub>rb</sub> / EDC4 <sub>gt</sub>			EDC4 <sub>gt</sub> :EDC4 <sub>rb</sub> / DCP1a <sub>ms</sub>				
	n=	merge/PB [%]		n=	merge/PB [%]		
1	px459	194	50	1	px459	204	72
2	sg3-DCP1	183	59	2	sg3-DCP1	211	90
3	sg1-XRN1	205	32	3	sg1-XRN1	220	76
4	sgpool-EDC4	172	0	4	sgpool-EDC4	191	0

**Abb.3.21: Analyse der endogenen Protein:Protein-Interaktionen von Decapping-Faktoren in verschiedenen CRISPR/Cas9-knockdown-Zellen.** **A:** Die Interaktion von DCP1a, EDC4 und XRN1 sowie die zelluläre Lokalisation und räumliche Nähe zu *P-Bodies* dieser Interaktionen wurde in HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1) oder EDC4 (sgpool-EDC4) und in der Kontroll-Zelllinie (px459) durch *Immuno-Proximity-Ligation-Assays* (Immuno-PLA) analysiert. Dazu wurden die in (A) und (B) gezeigten Primärantikörper unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen, gt=Ziege) für die Detektion der Interaktionen mittels PLA verwendet. Zeitgleich erfolgte die Detektion der *P-Bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper der entsprechenden dritten Spezies (ms=Maus, gt=Ziege). Die Immuno-PLA-Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. **B:** Quantitative Darstellung der PLA-Signale pro Zelle der unterschiedlichen Versuchsansätze aus (A) von je drei biologisch unabhängigen Experimenten je Versuchsbedingung (schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert). **C:** Quantitative Darstellung der EDC4-positiven *P-Body*-Anzahlen pro Zelle der unterschiedlichen Versuchsansätze aus (A) von

neun biologisch unabhängigen Experimenten (schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert). **D:** Zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Zellzahlen und die relative Veränderung der PLA-Signalanzahlen in Prozent zu den Versuchsansätzen aus (A) von je drei biologisch unabhängigen Experimenten je Versuchskondition. Die Signifikanzanalyse wurde unter Verwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt (\*:  $p \leq 0,001$ ). **E:** Prozentuale Darstellung der *P-Bodies*, welche einen *merge* mit PLA-Signalen aufweisen ( $\pm$  Standardabweichung), zu den unterschiedlichen Versuchsansätzen aus (A) von je drei biologisch unabhängigen Experimenten je Versuchskondition. **F:** Zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Zellen und deren *P-Bodies* in Prozent, welche einen *merge* mit PLA-Signalen aufweisen, zu den Ergebnissen aus (E) von je drei biologisch unabhängigen Experimenten je Versuchskondition.

### **3.10. Relevanz von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf den Metabolismus von IL-1-induzierten mRNAs**

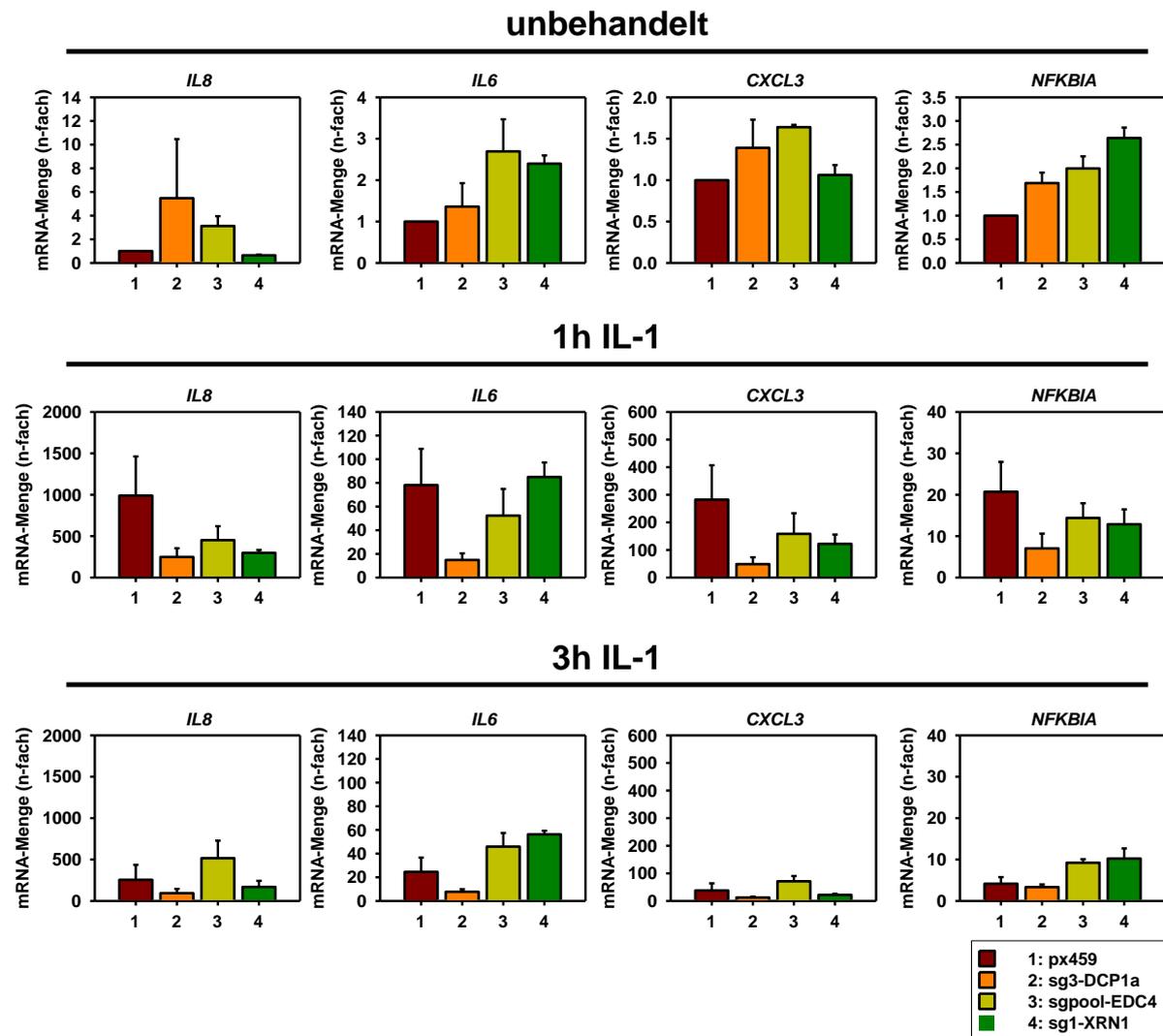
#### **3.10.1. Einfluss von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf die Induktion der mRNA-Expression**

Neben der Untersuchungen der Auswirkungen eines CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdowns* von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf den IL-1-abhängigen proinflammatorischen Signalweg auf Proteinebene, sollten die Auswirkungen der *knockdowns* auf die Regulation von IL-1-induzierten prototypischen mRNAs untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl die basalen, als auch die IL-1-induzierten mRNA-Mengen von *IL8*, *IL6*, *CXCL3* und *NFKBIA* in den verschiedenen Zellsystemen bestimmt.

Dazu wurden Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), EDC4 (sgpool-EDC4), XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und die mRNA-Mengen unterschiedlicher Gene (*IL8*, *IL6*, *CXCL3*, *NFKBIA*) mittels einer RT-qPCR ermittelt.

Bei der Untersuchung der basalen mRNA-Mengen wurde deutlich, dass im Vergleich mit den px459-Zellen die mRNA-Mengen in den unterschiedlichen *knockdown*-Zellen erhöht sind, wobei diese Erhöhung unterschiedlich stark ausfällt. Lediglich in den sg1-XRN1-Zellen konnte im Vergleich zu den px459-Zellen eine Verringerung der basalen mRNA-Menge von *IL8* beobachtet werden (Abb.3.22).

Nach der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 konnte in allen Zelllinien eine deutliche Induktion der Expression der untersuchten Gene beobachtet werden. Im zeitlichen Verlauf der Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 wurde in allen Zelllinien wieder die erwartete Abnahme der mRNA-Mengen beobachtet. Dabei konnten bei der Stärke der IL-1-induzierten Genexpression Unterschiede in den verschiedenen *knockdown*-Zellen verzeichnet werden.



**Abb.3.22: IL-1 induzierte Genexpression von proinflammatorischen Genen in CRISPR-Zellen.** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), EDC4 (sgpool-EDC4), XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unbehandelt verwendet. Anschließend wurden die mRNA-Mengen von prototypischen IL-1-induzierten Genen (*IL8*, *IL6*, *CXCL3*, *NFKBIA*) durch eine RT-qPCR ermittelt. Die Ergebnisse wurden nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf die unbehandelten px459-Zellen normiert und als Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) aus mindestens zwei unabhängigen biologischen Replikaten je Versuchsbedingung dargestellt.

Insgesamt fiel die Induktion der untersuchten Gene in den Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a, EDC4 und XRN1 im Vergleich zu den Kontrollzellen geringer aus. Für die einzelnen mRNAs konnten in diesem Zusammenhang unterschiedlich starke Verringerungen der Transkriptmenge in den verschiedenen Zelllinien beobachtet werden. Lediglich in den sg1-XRN1-Zellen wurde im Vergleich zu den px459-Zellen nach der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 eine vergleichbare Induktion der

Genexpression von *IL6* beobachtet. Nach der Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 konnte in den sgpool-EDC4 Zellen im Vergleich zu den px459-Kontrollzellen eine leichte Erhöhung der mRNA-Menge für *IL8*, *IL6* und *NFKBIA* verzeichnet werden. Parallel dazu waren die mRNA-Mengen von *IL6* und *NFKBIA* in den sg1-XRN1-Zellen erhöht. In allen anderen Konditionen wurden nach der dreistündigen IL-1-Stimulation im Vergleich zu den px459-Kontrollzellen verringerte mRNA-Mengen verzeichnet (Abb.3.22).

### 3.10.2. Einfluss von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf den mRNA-Abbau

Zusätzlich zu diesen Untersuchungen der mRNA-Mengen der ausgewählten Gene wurde die Stabilität der einzelnen Transkripte analysiert, um so eine Aussage über die Auswirkungen der Verluste der Proteine DCP1a, EDC4 und XRN1 auf den Abbau von mRNA zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), EDC4 (sgpool-EDC4), XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen und anschließend jeweils für 30 min, 60 min, 120 min und 180 min mit Actinomycin D (5 µg/ml) behandelt. Actinomycin D stellt dabei ein zellmembrangängiges Zytostatikum dar und blockiert durch die Interkalation in die DNA die Transkription von mRNA durch die Polymerase II (Chen et al, 2008; Sobell, 1985). Auf diese Art ist es möglich, nach der Inhibierung der Transkription die RNA-Stabilität im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Dazu wurde die RNA der Gesamtzellen zu jeder Versuchskondition isoliert und die mRNA-Mengen unterschiedlicher Gene (*IL8*, *IL6*, *CXCL3*, *NFKBIA*) mittels einer RT-qPCR ermittelt. Die relativen mRNA-Mengen wurden zu jedem Zeitpunkt der Actinomycin D-Behandlung graphisch mittels semilogarithmischer Skalierung dargestellt und eine nicht lineare Regression der Datenmenge mit dem Programm SigmaPlot durchgeführt (Abb.3.23 A). Für die Regression wurde folgende Funktionsgleichung verwendet:

$$f(x) = a \cdot e^{(-b \cdot x)}$$

Anschließend wurde unter Verwendung des ermittelten Koeffizienten (b) die Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) des mRNA-Transkripts mit folgender Formel bestimmt:

$$t_{1/2[min]} = \frac{\ln(2)}{b}$$

Die so bestimmten Halbwertszeiten wurden zu den jeweiligen Halbwertszeiten in den px459-Zellen normiert und graphisch dargestellt (Abb.3.23 A).

Für die *IL8*-mRNA konnte im unbehandelten Zustand in den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen eine hohe Stabilität der mRNA beobachtet werden, d.h. innerhalb von 180 min erfolgte nahezu keine Degradation. Aus diesem Grund konnten die Halbwertszeiten in diesen Fällen mathematisch nicht zuverlässig bestimmt werden und wurden als prinzipiell stabil bewertet. Im Gegensatz dazu wurde eine Verringerung der Stabilität in den sg3-DCP1a-Zellen ( $t_{1/2}=204$  min) und den sgpool-EDC4-Zellen ( $t_{1/2}=385$  min) verzeichnet. Die Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 führte in allen Zelllinien im Vergleich zur unstimulierten Versuchskondition zu einer Destabilisierung der *IL8*-mRNA. Beim direkten Vergleich der unterschiedlichen Zelllinien zur px459-Kontroll-Zelllinie ( $t_{1/2}=15$  min) konnten jedoch Unterschiede bei der Destabilisierung beobachtet werden. So führte der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von DCP1a ( $t_{1/2}=42$  min), EDC4( $t_{1/2}=68$  min) und XRN1 ( $t_{1/2}=52$  min) zu einer Verringerung der IL-1-induzierten Destabilisierung der *IL8*-mRNA. Der stärkste Effekt zeigte sich für die sgpool-EDC4-Zellen, wobei hier eine Erhöhung der Halbwertszeit der *IL8*-mRNA um den Faktor 4,6 beobachtet wurde. Nach einer Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 wurden analoge Effekte beobachtet, wobei eine allgemeine Stabilisierung der *IL8*-mRNA in allen Zelllinien gezeigt werden konnte. Die Stabilität der *IL8*-mRNA erreichte dabei jedoch nicht den unbehandelten Ausgangszustand (Abb.3.23 A, B; Tab.3.1).

Im Vergleich mit der *IL8*-mRNA zeigte sich für die *IL6*-mRNA im unbehandelten Zustand in allen Zelllinien eine geringere Stabilität. Für die px459-Kontrollzellen ( $t_{1/2}=28$  min), die sg3-DCP1a-Zellen ( $t_{1/2}=28$  min) und die sg1-XRN1-Zellen ( $t_{1/2}=33$  min) konnten im unbehandelten Zustand vergleichbare Halbwertszeiten beobachtet werden, wobei die sgpool-EDC4-Zellen ( $t_{1/2}=79$  min) eine deutliche Erhöhung der Halbwertszeit der *IL6*-mRNA zeigten. Nach der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 konnte in den px459-Kontrollzellen ( $t_{1/2}=16$  min) eine Destabilisierung der *IL6*-mRNA beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte diese IL-1-induzierte Destabilisierung der *IL6*-mRNA in den CRISPR-Zellen nicht beobachtet werden. In den sg3-DCP1a-Zellen ( $t_{1/2}=52$  min) und den sg1-XRN1-Zellen ( $t_{1/2}=54$  min) zeigte sich im Vergleich zu der unbehandelten Versuchskondition eine Erhöhung der mRNA-Stabilität nach einer IL-1-Stimulation der Zellen. Der stärkste Effekt konnte für die sgpool-EDC4-Zellen ( $t_{1/2}=72$  min) verzeichnet werden, wobei nach IL-1-Stimulation nahezu keine Veränderung der Halbwertszeit gegenüber der unbehandelten

Versuchskondition beobachtet wurden und die Halbwertszeit im Vergleich zu den px459-Kontrollzellen um den Faktor 4,6 erhöht war. Nach der Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 konnte für die px459-Kontrollzellen ( $t_{1/2}=33$  min) eine Erhöhung der *IL6*-mRNA-Stabilität auf das Niveau der unbehandelten Versuchskondition beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde in den sg3-DCP1a-Zellen ( $t_{1/2}=59$  min), den sgpool-EDC4-Zellen ( $t_{1/2}=107$  min) und den sg1-XRN1-Zellen ( $t_{1/2}=110$  min) eine noch stärkere Erhöhung der mRNA-Stabilität über das Niveau der unbehandelten Versuchskondition hinaus verzeichnet (Abb.3.23 A, B; Tab.3.1).

Für die *CXCL3*-mRNA wurden im unbehandelten Zustand in den px459-Kontrollzellen ( $t_{1/2}=34$  min), den sg3-DCP1a-Zellen ( $t_{1/2}=26$  min) und den sg1-XRN1-Zellen ( $t_{1/2}=31$  min) vergleichbare Halbwertszeiten der mRNA beobachtet. In den sgpool-EDC4-Zellen ( $t_{1/2}=75$  min) hingegen zeigte sich im unbehandelten Zustand eine erhöhte mRNA-Stabilität. Die Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 führte in den px459-Kontrollzellen ( $t_{1/2}=35$  min) und den sgpool-EDC4-Zellen ( $t_{1/2}=76$  min) im Vergleich zur unbehandelten Versuchskondition zu nahezu keiner Veränderung der mRNA-Halbwertszeit. Dagegen konnte in den sg3-DCP1a-Zellen ( $t_{1/2}=94$  min) und den sg1-XRN1-Zellen ( $t_{1/2}=52$  min) eine IL-1-induzierte Erhöhung der mRNA-Stabilität beobachtet werden. Die Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 führte in den px459-Kontrollzellen ( $t_{1/2}=76$  min), den sg3-DCP1a-Zellen ( $t_{1/2}=98$  min) und den sg1-XRN1 ( $t_{1/2}=71$  min) im Vergleich zur unbehandelten Versuchskondition zu einer Stabilisierung der *CXCL3*-mRNA. In den sgpool-EDC4-Zellen ( $t_{1/2}=86$  min) konnte nach der drei-stündigen Stimulation der Zellen mit IL-1 nahezu keine Veränderung der mRNA-Halbwertszeit im Vergleich zur unbehandelten Versuchskondition beobachtet werden (Abb.3.23 A, B; Tab.3.1).

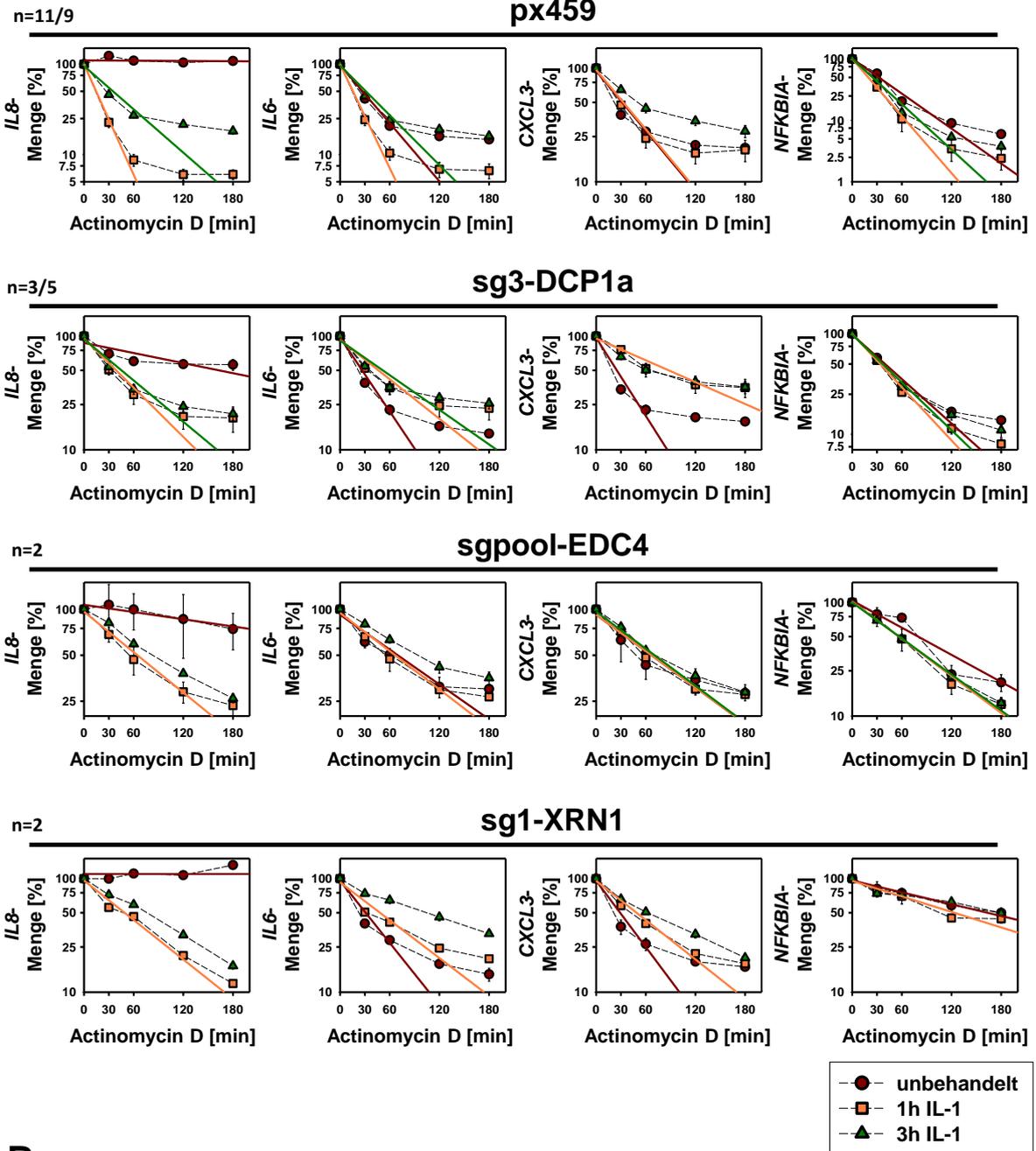
Für die *NFKBIA*-mRNA konnten im unstimulierten Zustand in den px459-Kontrollzellen ( $t_{1/2}=32$  min) und den sg3-DCP1a-Zellen ( $t_{1/2}=41$  min) vergleichbare Halbwertszeiten beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den sgpool-EDC4-Zellen ( $t_{1/2}=75$  min) und besonders in den sg1-XRN1-Zellen ( $t_{1/2}=173$  min) eine massiv erhöhte Halbwertszeit der mRNA. Nach Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 konnte in allen Zelllinien eine Verringerung der mRNA-Stabilität gegenüber der unbehandelten Versuchskondition um den Faktor 0,6-0,8 beobachtet werden. Nach der Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 zeigte sich in den px459-Kontrollzellen ( $t_{1/2}=24$  min) und den sg3-DCP1a-Zellen ( $t_{1/2}=38$  min) im Vergleich zur Versuchskondition mit der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 eine Stabilisierung der *NFKBIA*-mRNA. In den sgpool-EDC4-Zellen ( $t_{1/2}=57$  min) konnte dagegen

keine Stabilisierung der mRNA beobachtet werden. In den sg1-XRN1-Zellen ( $t_{1/2}=187$  min) zeigte sich eine Stabilisierung der mRNA auf nahezu das Niveau der unstimulierten Ausgangskondition (Abb.3.23 A, B; Tab.3.1).

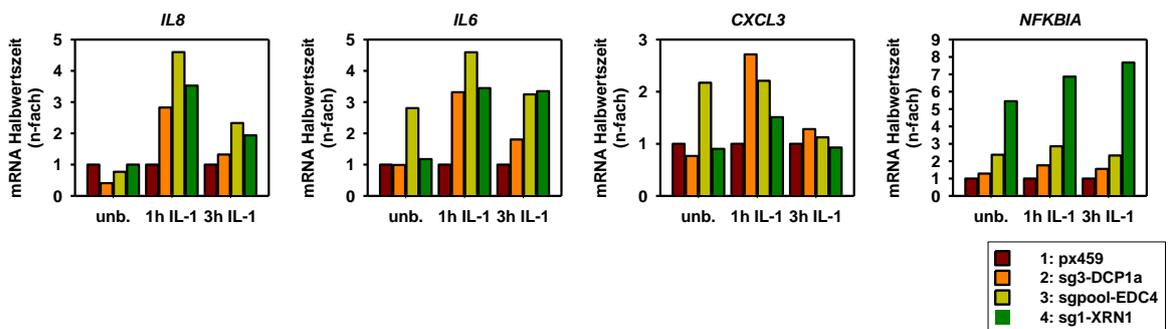
### **3.10.3. Zusammenfassende Beurteilung der Relevanz von DCP1a, EDC4 und XRN1 für die *steady state level* und den Abbau von proinflammatorischen mRNAs**

Die vorliegenden Befunde zeigen einen komplexen aber eindeutigen Einfluss der CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdowns* von DCP1a, EDC4 bzw. XRN1 auf die basalen wie auch die induzierbaren mRNA-Mengen von typischen proinflammatorischen mRNAs. Dabei konnte in den meisten Fällen eine Erhöhung der basalen mRNA-Pegel der untersuchten Gene nach den *knockdowns* von DCP1a, EDC4 und XRN1 beobachtet werden. Das Ausmaß dieser Erhöhung der basalen mRNA-Menge variiert abhängig vom Transkript und dem supprimierten Proteinfaktor. In Bezug auf die induzierbare Genexpression durch eine Stimulation der Zellen mit IL-1 zeigte sich dagegen in den meisten Fällen eine verringerte Induktion der untersuchten Transkripte, wobei auch hier die Hemmeffekte Transkript- und *knockdown*-abhängig unterschiedlich stark ausfielen. DCP1a, EDC4 und XRN1 regulieren daher sowohl die basalen, als auch die IL-1-induzierten mRNA-Spiegel von den hier untersuchten proinflammatorischen IL-1 Zielgenen. Bis auf wenige Ausnahmen zeigt die Analyse der mRNA-Stabilitäten im basalen und IL-1 stimulierten Zustand eine Stabilisierung der untersuchten mRNAs durch die jeweiligen *knockdowns* von DCP1a, EDC4 und XRN1. Daher kann die Abnahme der *steady state* mRNA-Spiegel der IL-1 Zielgene nach IL-1 Behandlung in den *knockdowns* einen kompensatorischen, transkriptionellen Effekt darstellen, welcher die erhöhte mRNA Stabilität ausgleicht. Gleichzeitig aber könnten EDC4, DCP1a und XRN1 auch eine aktive Rolle bei der positiven Regulation der Gentranskription im IL-1-abhängigen *signaling* spielen. Der eindrucklichste Befund zeigte sich aber hinsichtlich der Regulation der *NFKBIA*-mRNA. Diese sehr instabile mRNA wird in den XRN1 *knockdown* Zellen massiv stabilisiert und definiert daher XRN1 als einen neuen „*down stream*“ Regulator des wichtigsten, zytoplasmatischen Inhibitors des kanonischen NFκB Signalwegs.

**A**



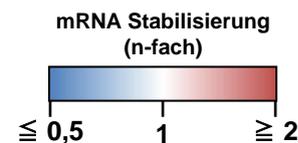
**B**



**Abb.3.23: Veränderte mRNA-Stabilitäten in Abhängigkeit von IL-1 in den verschiedenen CRISPR/Cas9-knockdown-Zellen.** A: HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), EDC4 (sgpool-EDC4), bzw. (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unstimuliert belassen. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen für jeweils 30 min, 60 min, 120 min oder 180 min mit Actinomycin D (5 µg/ml). Die mRNA-Mengen der IL-1-induzierten Gene *IL8*, *IL6*, *CXCL3* und *NFKBIA* wurden zu jeder Versuchskondition durch eine RT-qPCR ermittelt. Die Ergebnisse wurden nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode auf die jeweils nicht mit Actinomycin D behandelte Versuchskondition normiert und als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) mit semi-logarithmischer Skalierung aus mindestens zwei unabhängigen biologischen Replikaten dargestellt. Zur Berechnung der Halbwertszeiten der mRNA-Transkripte wurde eine nicht-lineare Regression der Datenpunkte mit Hilfe des Programms SigmaPlot durchgeführt. B: Darstellung der relativen Veränderungen der mRNA-Halbwertszeiten normiert auf die jeweiligen Halbwertszeiten aus unbehandelten px459-Kontrollzellen. Für die mathematische Berechnung der relativen Veränderung wurde in den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen im unbehandelten Zustand eine Halbwertszeit für *IL8* von 500 min. eingesetzt.

**Tab.3.1: Halbwertszeiten der untersuchten, prototypischen IL-1-induzierten mRNAs.** Darstellung der berechneten Halbwertszeiten ( $t_{1/2}$  [min]) der mRNAs von *IL8*, *IL6*, *CXCL3* und *NFKBIA* in HeLa Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), EDC4 (sgpool-EDC4), XRN1 (sg1-XRN1) und der Kontroll-Zelllinie (px459) in Abhängigkeit von einer IL-1-Stimulation (10 ng/ml) für 1 h und 3 h oder im unbehandelten Zustand. Der Farbkodierung entspricht einer Verringerung (blau) oder einer Erhöhung (rot) der mRNA-Halbwertszeit normalisiert auf die unbehandelten px459-Kontrollzelllinien. Die Halbwertszeiten für die *IL8*-mRNA im unbehandelten Zustand in den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen konnten mathematisch aufgrund der hohen Stabilität nicht bestimmt werden (stabil).

Zelllinie	IL-1 (10 ng/ml)	Halbwertszeit $t_{1/2}$ [min]			
		<i>IL8</i> - mRNA	<i>IL6</i> - mRNA	<i>CXCL3</i> - mRNA	<i>NFKBIA</i> - mRNA
px459	-	stabil	28	34	32
px459	1 h	15	16	34	19
px459	3 h	38	33	76	24
sg3-DCP1a	-	204	28	26	41
sg3-DCP1a	1 h	42	52	94	34
sg3-DCP1a	3 h	50	59	98	38
sgpool-EDC4	-	385	79	75	75
sgpool-EDC4	1 h	68	72	76	55
sgpool-EDC4	3 h	88	107	86	57
sg1-XRN1	-	stabil	33	31	173
sg1-XRN1	1 h	52	54	52	133
sg1-XRN1	3 h	73	110	71	187

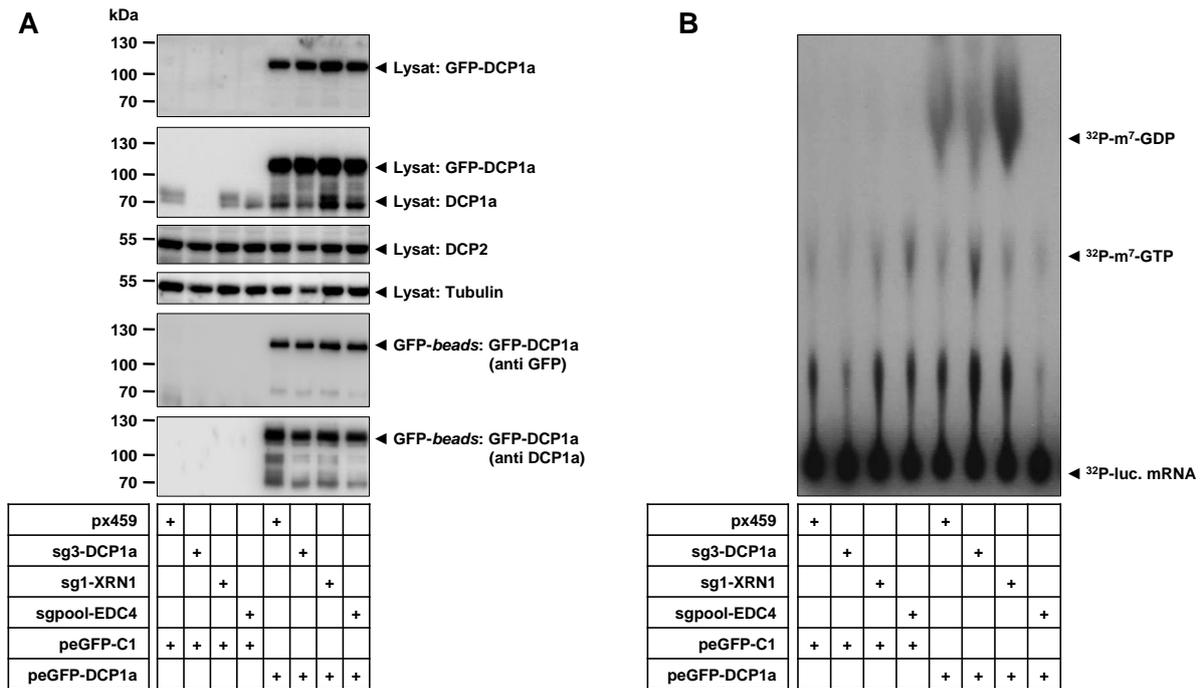


### 3.11. Relevanz von EDC4 für die *Decapping*-Aktivität

Um die möglichen Gründe für die Veränderung der mRNA-Stabilitäten in den CRISPR/Cas9-Zellen zu analysieren, wurden *Decapping-Assays* zur Bestimmung der GFP-DCP1a-abhängigen *Decapping*-Aktivität durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden HeLa-Zellen mit einem Vektor zur Expression von GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a) und dem Kontroll-Vektor (GFP-C1) transfiziert. Im Anschluss wurden die GFP-DCP1a-Proteinkomplexe unter der Verwendung von GFP-Trap\_A-Beads präzipitiert und das  $^{32}\text{P}$ -m<sup>7</sup>-GDP-Produkt der *Decapping*-Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie mit anschließender Autoradiographie detektiert.

Dabei führte der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von EDC4 zu einem nahezu kompletten Verlust der GFP-DCP1a-abhängigen *Decapping*-Aktivität (Abb.3.24). Dieses Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Für die sg3-DCP1a-Zellen und die sg1-XRN1-Zellen konnten beim Vergleich mit der Kontroll-Zelllinie (px459) Schwankungen der GFP-DCP1a-abhängigen *Decapping*-Aktivität verzeichnet werden (Abb.3.24). Diese Schwankungen konnten jedoch in weiteren Experimenten nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), sodass in diesen Fällen eine eher unveränderte *Decapping*-Aktivität angenommen werden kann.

Diese *Decapping-Assays* zeigen, dass die Stabilisierung der mRNAs in den unterschiedlichen Zelllinien durch eine Beeinflussung der *Decapping*-Aktivität der Zellen zustande kommen kann. Im Fall des *knockdowns* von EDC4 trifft diese Aussage zu, wobei sich die Stabilisierung direkt an die nahezu komplett aufgehobene, zelluläre *Decapping*-Aktivität koppeln lässt. In den Fällen der *knockdowns* von DCP1a und XRN1 jedoch trifft diese Aussage nicht zu, sodass die Stabilisierung der untersuchten mRNAs von Mechanismen abhängt, welche nicht durch Veränderungen der globalen *Decapping*-Aktivität eines präzipitierten GFP-DCP1a-Proteinkomplexes erfassbar sind. Es ist jedoch trotzdem möglich, dass DCP1a oder XRN1 die lokale, transkriptspezifische *Decapping*-Aktivität modulieren. Eine Überprüfung dieser Annahme würde allerdings die Etablierung von transkriptspezifischen *Decapping-Assays* erfordern, die den Effekt der enzymatischen Reaktion auch *in vitro* noch abbilden.



**Abb.3.24: Die Erfassung der globalen, zellulären Decapping-Aktivität mittels der Isolation eines GFP-DCP1a-Proteinkomplexes zeigt eine direkte Abhängigkeit von EDC4 auf.** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1) und EDC4 (sgpool-EDC4) sowie die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden mit einem Vektor zur Expression von GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a) und dem Kontrollvektor (peGFP-C1) transfiziert. Anschließend erfolgte die Präzipitation der GFP-DCP1a-Proteinkomplexe mit GFP-Trap\_A-Beads. Für die Zelllysate und die präzipitierten Proteinkomplexe erfolgte ein Proteinnachweis mittels Western Blot (A). Der *Decapping-Assay* wurde unter der Verwendung einer <sup>32</sup>P-markierten, *in vitro* transkribierten *template*-mRNA (<sup>32</sup>P-luc.mRNA) durchgeführt und das <sup>32</sup>P-m<sup>7</sup>-GDP-Produkt der 5'-Cap-Hydrolyse durch Dünnschichtchromatographie mit anschließender Autoradiographie detektiert (B).

### 3.12. IL-1-induzierte Expression der IL8-mRNA und Translokation von NFκB p65 in den Zellkern in Einzelzellen mit DCP1a, EDC4 oder XRN1 *knockdown*

In den vorangegangenen Experimenten konnte eine differentielle Regulation der mRNA-Expression von prototypischen IL-1-induzierten Genen nach dem CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP1a, XRN1 oder EDC4 gezeigt werden. Im Folgenden sollte diese differentielle Regulation der mRNA auf der Ebene von Einzelzellen untersucht werden, um eine mögliche Veränderung der Reaktivität der Zellen auf den IL-1-Stimulus und/oder der subzellulären Lokalisation der IL-1-induzierten Transkripte zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit dem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1), EDC4 (sgpool-EDC4), die Kontroll-Zelllinie (px459) und parentale HeLa-Zellen für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen und anschließend eine Immuno-Fluoreszenz-RNA-*in-situ*-

Hybridisierung (Immuno-RNA-FISH) durchgeführt. Dabei erlaubt die Immuno-RNA-FISH die gleichzeitige Detektion von Proteinen und einzelnen RNA-Molekülen innerhalb einer Zelle. In diesem Fall erfolgte die Detektion von NFκB p65 mittels spezifischen Antikörpern und der *IL8*-mRNA durch genspezifische RNA-Sonden.

Bei der Analyse der NFκB p65 Fluoreszenzsignale konnte im unstimulierten Zustand der Zellen eine diffuse Lokalisation von NFκB p65 im Zytoplasma detektiert werden. Nach der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 konnte die bereits beschriebene Translokation von NFκB p65 in den Zellkern (Brown et al, 1993) beobachtet werden (Abb.3.25 A). Für die px459-Kontroll-Zelllinie, die parentalen HeLa-Zellen und die sgpool-EDC4-Zellen konnte in ca. 60% der Zellen eine Translokation von NFκB p65 in den Zellkern in vergleichbarer Art beobachtet werden. In den sg3-DCP1a-Zellen (36%) und in den sg1-XRN1-Zellen (39%) hingegen zeigte sich nach der IL-1-Stimulation der Zellen eine verringerte Translokationsrate von NFκB p65 in den Zellkern (Abb.3.25 A, B, C).

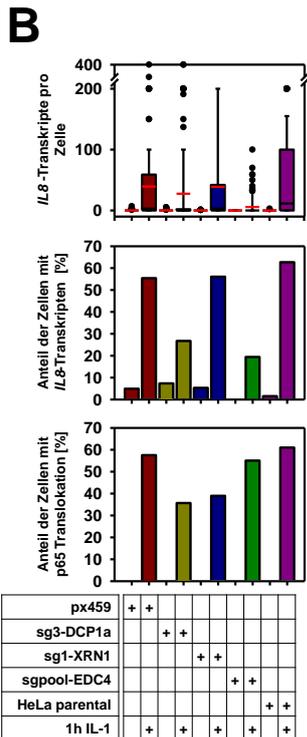
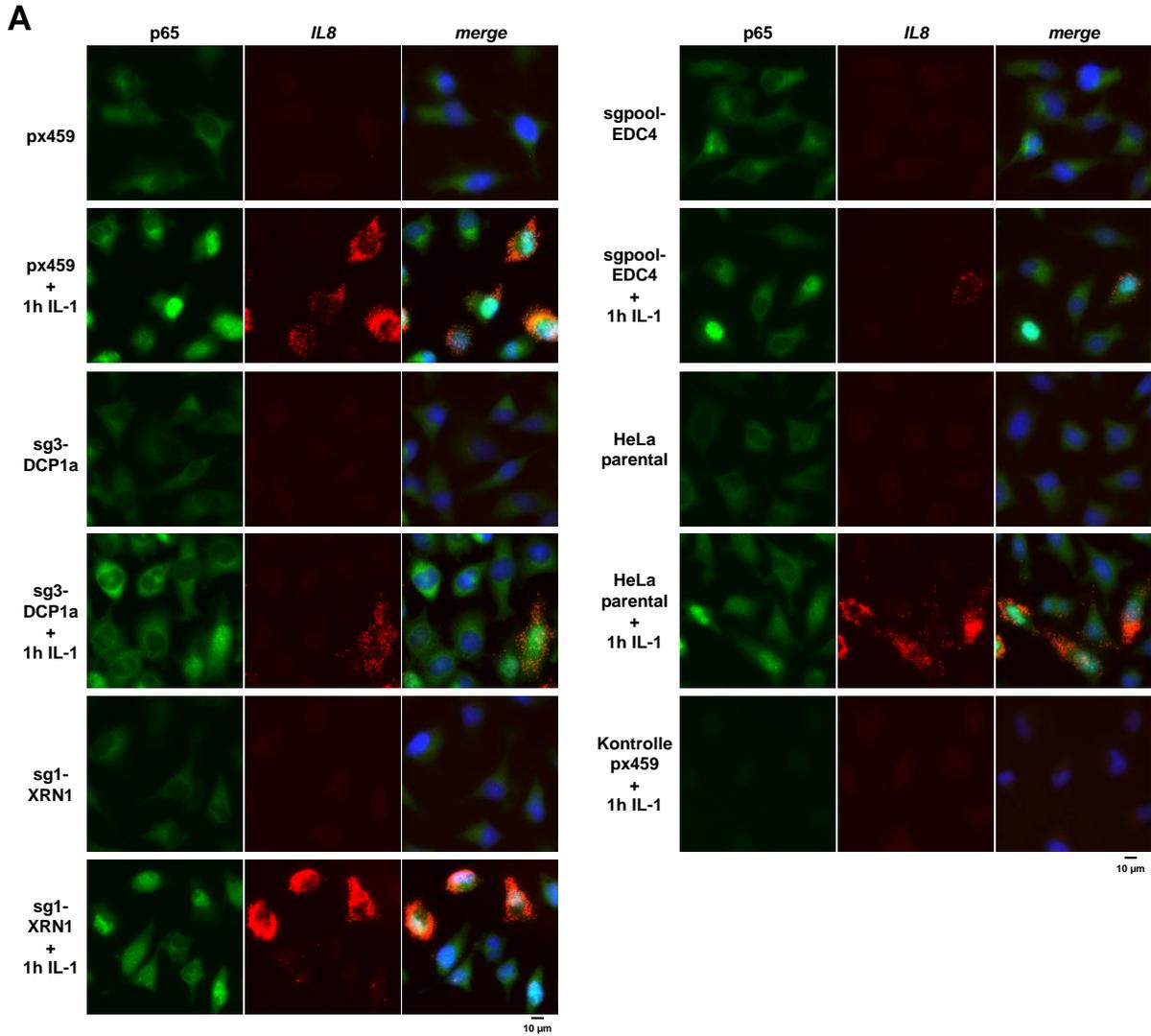
Bei der Untersuchung der Fluoreszenz-Signale für die *IL8*-mRNA konnten im unstimulierten Zustand der Zellen nahezu keine Signale detektiert werden. Nach der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 konnten hauptsächlich zytoplasmatische Fluoreszenzsignale detektiert werden. Dabei zeigten sich in den px459-Zellen und in den parentalen HeLa-Zellen in 55% bzw. 63% der Zellen Signale für die *IL8*-mRNA (Abb.3.25 A, B, C). Somit korreliert in diesen Zelllinien die Rate der nukleären Translokation von NFκB p65 mit dem prozentualen Anteil der Zellen, welche auch *IL8*-mRNA-Signale aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen sg1-XRN1-Zellen verglichen mit der Rate der NFκB p65 Translokation (39%) anteilig mehr Zellen auf, welche *IL8*-mRNA-Signale (56%) aufweisen. In den sgpool-EDC4-Zellen besteht ebenfalls eine Diskrepanz zwischen der Zellpopulation mit NFκB p65 Translokation (60%) und der anteiligen Zellpopulation mit detektierter *IL8*-mRNA. Hier zeigte sich für die Zellpopulation, welche *IL8*-mRNA-Signale aufweisen, ein prozentualer Anteil von 19%. Dagegen korreliert in den sg3-DCP1a-Zellen die Größe der Zellpopulation mit NFκB p65 Translokation (36%) mit der Größe der Zellpopulation, welche auch *IL8*-mRNA Transkripte aufweist (27%; (Abb.3.25 A, B, C)).

Bei der Ermittlung der Anzahlen der Fluoreszenzsignale für die *IL8*-mRNA konnten in den parentalen untransfizierten HeLa-Zellen mit 58 *IL8*-mRNA Transkripten pro Zelle die höchste Transkriptanzahl beobachtet werden. In den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen konnte eine leichte Verringerung der Transkriptanzahlen mit 39 *IL8*-mRNA Transkripten pro

Zelle gezeigt werden. Eine weitere Verringerung der Transkriptanzahl pro Zelle zeigte sich in den sg3-DCP1a-Zellen (28 *IL8*-mRNA Transkripte pro Zelle) und in den sgpool-EDC4-Zellen (6 *IL8*-mRNA Transkripte pro Zelle; Abb.3.25 B, C)). Dabei ist in allen Versuchsansätzen eine starke Streuung der Messwerte der *IL8*-Transkripte vorhanden. Der mathematische Mittelwert sowie der Median der Messwerte unterscheiden sich in den einzelnen Versuchsansätzen, was eine nicht-normalverteilte Datenmenge verdeutlicht. Eine Begründung für diese nicht-normalverteilte Datenmenge stellt die heterogene Reaktion der Zellen nach einer Stimulation mit IL-1 dar, was durch die Unterschiede der prozentualen Anteile der Zellen, welche *IL8*-Transkripte aufweisen, und die Rate der NFκB p65 Translokation in den Zellkern verdeutlicht wird (Abb.3.25 A, B, C).

### **Zusammenfassende Beurteilung der Befunde:**

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bereits die parentale HeLa-Zellpopulation nicht homogen auf eine Stimulation mit IL-1 reagiert. Dabei zeigen nur ca. 50-60% der parental Zellen nach einer einstündigen IL-1-Stimulation eine Translokation von NFκB p65 in den Zellkern. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine zeitlich verschobene, asynchrone Aktivierung derjenigen Zellen darstellen, welche sich in unterschiedlichen Interphasestadien befinden. Überwiegend korreliert dann allerdings die Translokation von NFκB p65 mit der Produktion von *IL8*-mRNA in einer gegebenen Zelle. Durch den CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdown* von DCP1a, XRN1 und EDC4 kommt es zu einer abgeschwächten Reaktion der Zellen nach einem IL-1-Stimulus, sodass die Beobachtungen aus den RT-qPCR-Experimenten bestätigt werden können. Zusätzlich führt der *knockdown* der jeweiligen Proteine zu einer teilweisen Aufhebung der direkten Korrelation zwischen der Translokation von NFκB p65 in den Zellkern und der *IL8*-mRNA-Expression. Diese Daten deuten daher genau wie die eingangs gezeigten Immunoblotexperimente darauf hin, dass DCP1a, EDC4 und XRN1 einen direkten oder indirekten Einfluss auf die IL-1-Signaltransduktion auf verschiedenen Ebenen haben. Dabei beeinflusst DCP1 z.B. die Aktivierung des JNK-Signalwegs (Abb.3.14). Ferner werden DCP1a und XRN1 für die optimale NFκB p65 Translokation in den Zellkern nach dem proteasomalem Abbau von IκBα im Zytoplasma benötigt, während EDC4 distal der NFκB p65 Kerntranslokation die Expression von NFκB Zielgenen wie *IL8* positiv reguliert.



**C**

Zelltyp	IL-1 [h]	n	IL8-Transkripte pro Zelle	% Zellen mit IL8-Transkripten	% Zellen mit p65-Transl.
px459	-	182	0	5	0
px459	1	175	39	55	58
sg3-DCP1a	-	136	0	7	0
sg3-DCP1a	1	157	28	27	36
sg1-XRN1	-	94	0	5	0
sg1-XRN1	1	107	39	56	39
sgpool-EDC4	-	102	0	0	0
sgpool-EDC4	1	108	6	19	55
HeLa parental	-	130	0	2	0
HeLa parental	1	118	58	63	61

**Abb.3.25: Einzelzellbasierte Analyse der IL-1 vermittelten Translokation von NFκB p65 in den Zellkern sowie der Expression und zelluläre Lokalisation von IL8-mRNA in CRISPR/Cas9-Zellen.** **A:** HeLa-Zellen mit stabilen CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdowns* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1) oder EDC4 (sgpool-EDC4), die Kontroll-Zelllinie (px459) und parentale HeLa-Zellen wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unbehandelt verwendet. Anschließend erfolgte in einer Immuno-RNA-FISH die Analyse der IL-1-vermittelten, nukleären Translokation von NFκB p65 in den Zellkern mittels anti-p65-Antikörper sowie die simultane Analyse der zellulären Lokalisation von IL8-Transkripten mittels spezifischer Sonden. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. **B:** Quantitative Darstellung der IL8-Transkripte pro Zelle (Oben), der prozentualen Anteile der Zellen mit IL8-Transkripten (Mitte) sowie der prozentualen Anteile der Zellen mit NFκB p65 Translokation in den Zellkern (Unten) der unterschiedlichen Versuchsansätze aus (A). **C:** Zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Zellzahlen und der Ergebnisse aus (B).

### 3.13. Relative, subzelluläre Lokalisation der IL8- und NFKBIA-mRNA zu P-Body-Strukturen in den DCP1a, EDC4 oder XRN1 knockdown Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen einen eindeutigen Einfluss von DCP1a, EDC4 und XRN1 auf die *steady state level* und den mRNA-Abbau von IL8 und NFKBIA. Die Immuno-RNA-FISH-Analysen verdeutlichen die Wichtigkeit von Einzelzellanalysen, um die Aussagekraft der Befunde zur Responsivität der Zellpopulation zu korrelieren. Diese Analysen ermöglichen es aber auch, die zentrale Fragestellung zu klären, ob spezifische, *Decapping*-Faktor-abhängig regulierte mRNAs tatsächlich in *P-Bodies* kolokalisieren.

Aus diesem Grund wurden weitere Immuno-RNA-FISH-Experimente zur Analyse der IL-1-induzierbaren Expression der IL8- und NFKBIA-mRNA, sowie zur Analyse der relativen Lokalisation dieser mRNAs zu *P-Bodies* durchgeführt.

Dazu wurden Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a) oder XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen und Immuno-RNA-FISH-Experimente mit genspezifischen Sonden für IL8 und NFKBIA sowie spezifischen Antikörpern gegen EDC4 durchgeführt.

Im unstimulierten Zustand konnten in allen Zelllinien wie zuvor nahezu keine IL8-Transkripte detektiert werden. Durch die Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 zeigte sich eine Induktion der mRNA-Expression. Diese Induktion fiel in den px459-Kontrollzellen mit 86 IL8-Transkripten pro Zelle am stärksten aus. In den sg1-XRN1-Zellen (59 IL8-Transkripten pro Zelle) und den sg3-DCP1a-Zellen (17 IL8-Transkripten pro Zelle) war diese Induktion verringert. Durch die fortgeführte Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 konnte in den px459-Kontrollzellen (48 IL8-Transkripten pro Zelle) eine Verringerung der IL8-Transkriptmenge detektiert werden, welche jedoch nicht die Menge der Ausgangssituation

erreichte. Dagegen konnte diese Verringerung der *IL8*-Transkriptmenge in den sg3-DCP1a-Zellen (12 *IL8*-Transkripten pro Zelle) und den sg1-XRN1 (61 *IL8*-Transkripten pro Zelle) nicht in diesem Ausmaß beobachtet werden (Abb.3.26 A, C, E).

Für die *NFKBIA*-mRNA konnten im Gegensatz zur *IL8*-mRNA auch im unstimulierten Zustand Transkripte in den Zellen detektiert werden. Dabei zeigten die px459-Kontrollzellen und die sg3-DCP1a-Zellen identische Mengen an *NFKBIA*-Transkripten (jeweils 36 *NFKBIA*-mRNA- pro Zelle), während die sg1-XRN1-Zellen erhöhte Transkriptanzahlen aufwiesen (79 Transkripte pro Zelle). Nach der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 konnte in allen Zelllinien eine Induktion der *NFKBIA*-mRNA-Expression beobachtet werden. Verglichen mit der unstimulierten Versuchskondition zeigte sich in den px459-Kontrollzellen die stärkste Induktion der *NFKBIA*-mRNA mit 176 Transkripten pro Zelle. In den sg3-DCP1a-Zellen (115 *NFKBIA*-Transkripte pro Zelle) und den sg1-XRN1-Zellen (183 *NFKBIA*-Transkripte pro Zelle) war diese Induktion im Vergleich zu der px459-Kontrollzelllinie abgeschwächt. Trotzdem konnte in den sg1-XRN1-Zellen die höchste *NFKBIA*-mRNA-Menge beobachtet werden. Nach der Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 zeigte sich in den px459-Kontrollzellen und den sg3-DCP1a eine Verringerung der *NFKBIA*-mRNA-Menge auf ein vergleichbares Niveau von 57 bzw. 51 *NFKBIA*-Transkripten pro Zelle. Im Gegensatz dazu konnte diese Verringerung in den sg1-XRN1-Zellen nicht beobachtet werden. Die Transkriptmenge zeigte mit 166 *NFKBIA*-Transkripten pro Zelle eine vergleichbare Menge wie bei der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 (Abb.3.26 A, B, E).

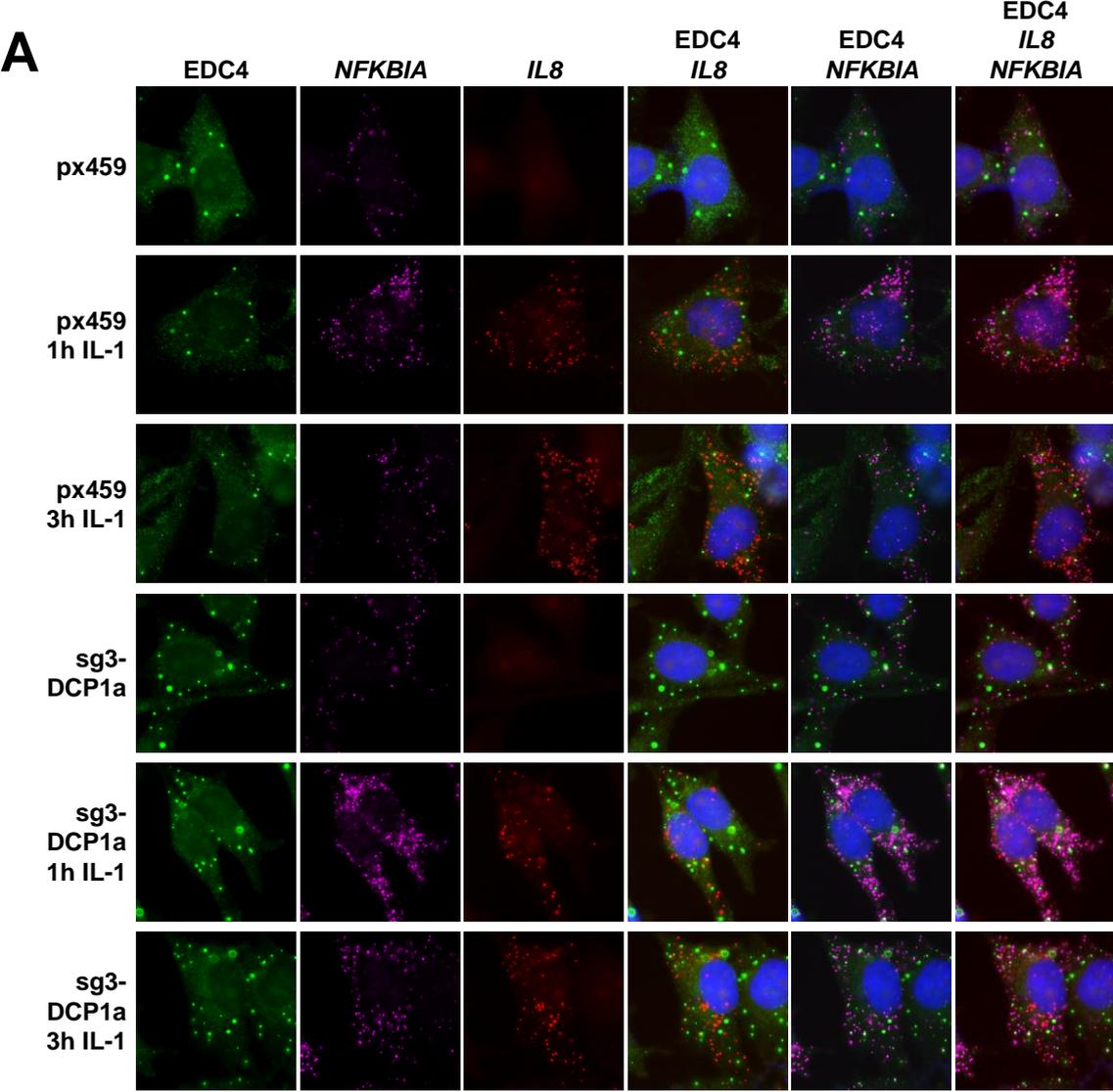
Bei der Auswertung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle konnten die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden. Der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von DCP1a führte zur starken Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle. Der *knockdown* von XRN1 hatte dagegen keinen starken Einfluss auf die *P-Body*-Assemblierung. Jedoch konnte in diesem Fall eine Erhöhung der *P-Body*-Größe beobachtet werden, was durch eine intensivere Fluoreszenzfärbung deutlich wird (Abb.3.26 A, D, E).

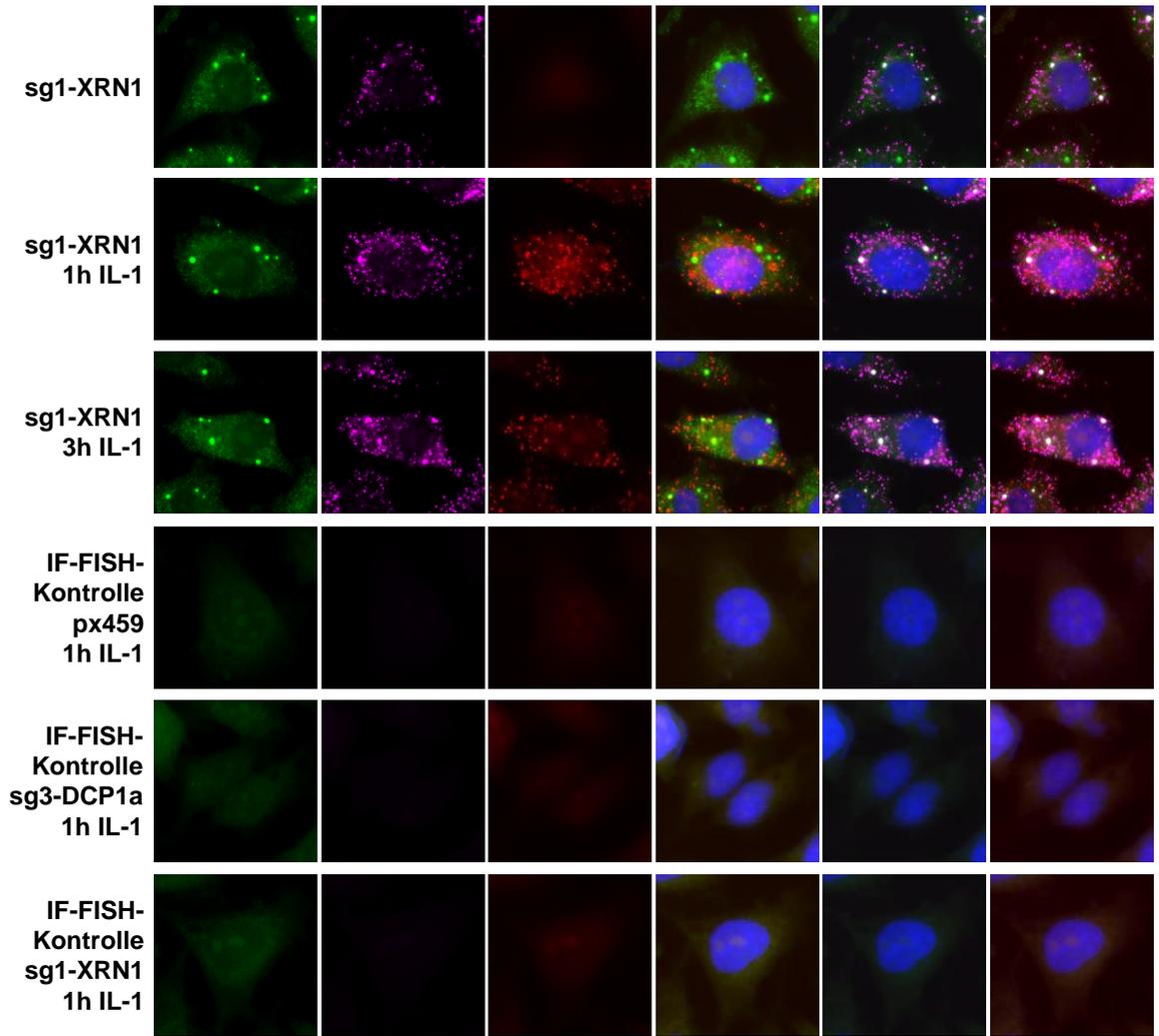
Die *IL8*-mRNA kolokalisiert dabei nur sehr selten mit den *P-Bodies*. In den px459-Kontrollzellen konnte nach der Stimulation der Zellen für 1 h und 3 h eine Kolokalisation von 9% bzw. 5% der *P-Bodies* mit *IL8*-Transkripten beobachtet werden. In den sg3-DCP1a-Zellen war diese Rate weiter erniedrigt. Die höchste Rate der Kolokalisationen konnte für die sg1-XRN1-Zellen beobachtet werden, wobei nach der Stimulation der Zellen für 1 h und 3 h 8%, bzw. 16% der *P-Bodies* mit den *IL8*-Transkripten kolokalisierten (Abb.3.26 A, C, E).

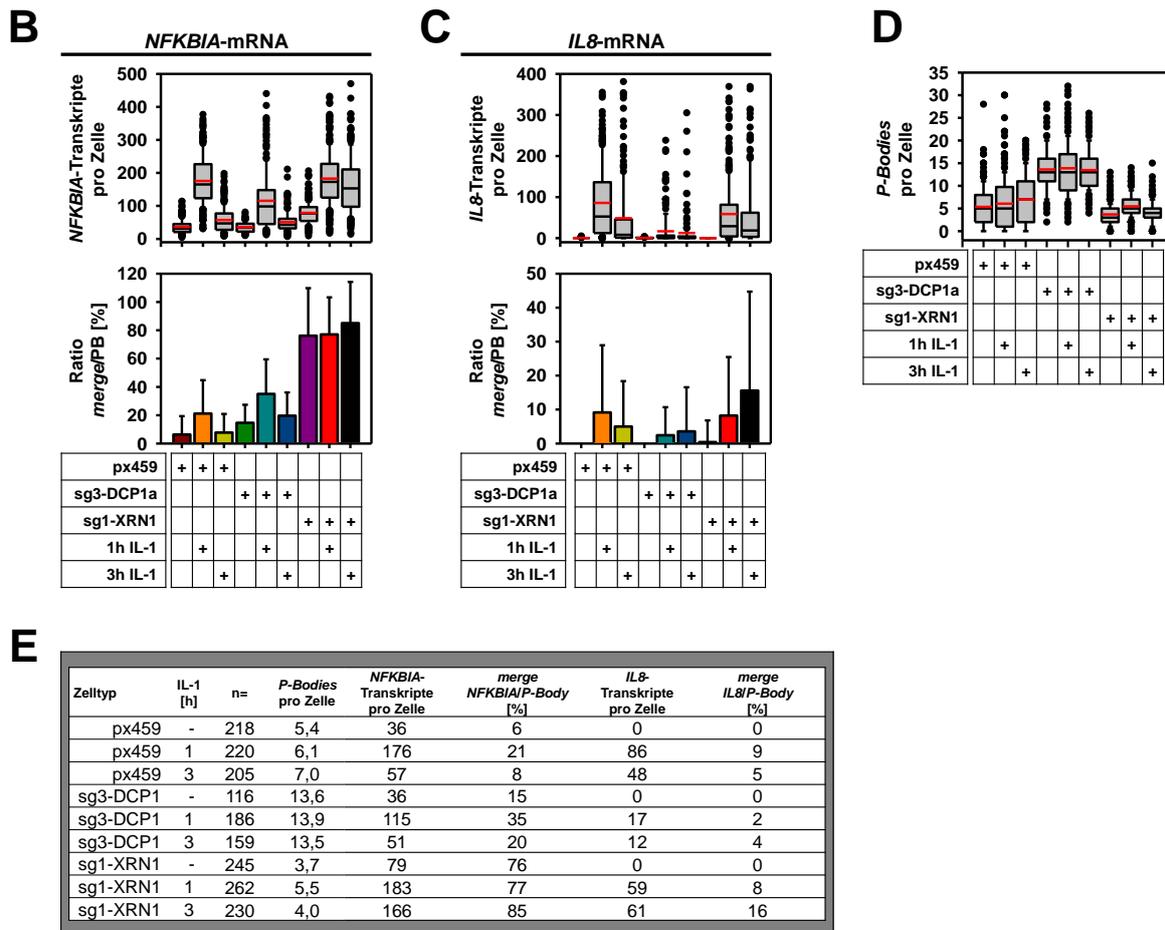
Für die *NFKBIA*-mRNA konnte im Vergleich zur *IL8*-mRNA eine erhöhte Kolokalisation der Transkripte mit den *P-Bodies* beobachtet werden. In den px459-Kontrollzellen und den sg3-DCP1a-Zellen zeigte sich dabei mit 21%, bzw. 35% die maximale Rate der Kolokalisation nach der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1. Der deutlichste Effekt konnte für die sg1-XRN1-Zellen beobachtet werden. Hier zeigte sich für die Kolokalisation der *NFKBIA*-mRNA und den *P-Bodies* in unstimulierten wie auch in stimulierten Versuchsbedingungen eine Rate von 76-85% (Abb.3.26 A, B, E).

### **Zusammenfassende Beurteilung der Befunde:**

Die vorliegenden Experimente bestätigen auf Einzelzellebene die Erhöhung der *NFKBIA*-mRNA-Menge in den sg1-XRN1-Zellen, welche bereits durch RT-qPCR-Experimente gezeigt wurde. Zusätzlich ist in den Immuno-RNA-FISH-Experimenten die erhöhte Stabilität der *NFKBIA*-mRNA zu erkennen, was durch die erhöhten Transkriptmengen nach der Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 verdeutlicht wird. Auch diese Daten passen zu den bereits erhaltenen Ergebnissen aus den RT-qPCR-Experimenten. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse eine unerwartete Selektivität der *P-Bodies* für bestimmte Transkripte. Während die *NFKBIA*-Transkripte in den *P-Bodies* lokalisieren können, findet diese Kolokalisation bei den *IL8*-Transkripten nicht statt. Dabei ist eine erhöhte Rate der Lokalisation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* nur nach dem *knockdown* von XRN1 in den sg1-XRN1-Zellen möglich. Diese XRN1-abhängige Kolokalisation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* deutet auf eine Möglichkeit der Regulation der RNA-Zusammensetzung der *P-Bodies* durch XRN1 hin.







**Abb.3.26: Analyse der relativen zellulären Lokalisation von IL8-Transkripten, NFKBIA-Transkripten und P-Bodies in verschiedenen CRISPR/Cas9-Zellen.** A: HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3 DCP1a) oder XRN1 (sg1 XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unstimuliert belassen. Anschließend erfolgte in einer Immuno-RNA-FISH die Analyse der räumlichen Nähe von IL8-Transkripten und NFKBIA-Transkripten zu P-Bodies mittels genspezifischer Sonden und EDC4-Antikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. B: Quantitative Darstellung der NFKBIA-Transkripte pro Zelle (oben; schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert) sowie der prozentuale Anteil der P-Bodies, welche eine Überlagerung (*merge*) mit den Transkripten aufweisen (unten; Mittelwert ± Standardabweichung), zu den unterschiedlichen Versuchsansätzen aus (A) von zwei biologisch unabhängigen Experimenten. C: Quantitative Darstellung der IL8-Transkripte pro Zelle (oben; schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert) sowie der prozentuale Anteil der P-Bodies, welche eine Überlagerung (*merge*) mit den Transkripten aufweisen (unten; Mittelwert ± Standardabweichung), zu den unterschiedlichen Versuchsansätzen aus (A) von zwei biologischen Experimenten. D: Quantitative Darstellung der P-Body-Anzahlen pro Zelle (schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert) zu den unterschiedlichen Versuchsansätzen aus (A). E: Zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Zellzahlen und der Ergebnisse aus (B, C, D).

### 3.14. Subzelluläre Lokalisation der IL6-mRNA und P-Bodies in DCP1a, EDC4 und XRN1 knockdown Zellen

In Abhängigkeit des *knockdowns* von XRN1 konnte eine Akkumulation von NFKBIA-Transkripten, aber nicht von IL8-Transkripten in P-Bodies beobachtet werden. Um zu unterscheiden, ob diese Beobachtungen Extremfälle darstellen, oder repräsentativ für Gruppen

an Genen stehen könnten, welche diesem Phänotypen folgen, wurden zusätzliche Immuno-RNA-FISH Experimente für *IL6*, einem weiteren IL-1 Zielgen durchgeführt.

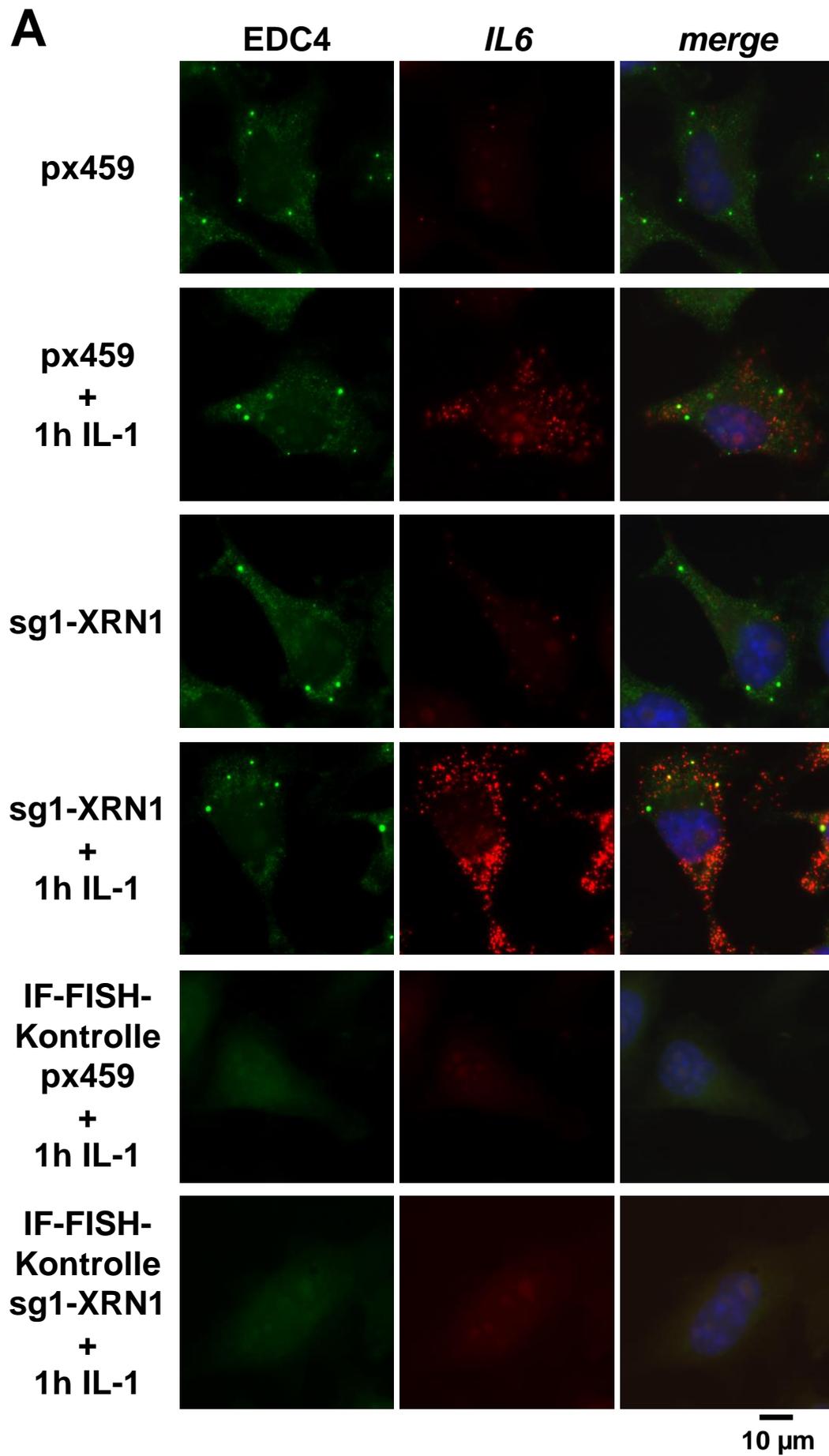
Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unstimuliert belassen. Anschließend erfolgte in Immuno-RNA-FISH-Experimenten die Analyse der *IL6*-mRNA mittels einer genspezifischen Sonde und der relativen Lokalisation der mRNA zu *P-Bodies* durch eine gleichzeitige Detektion von EDC4.

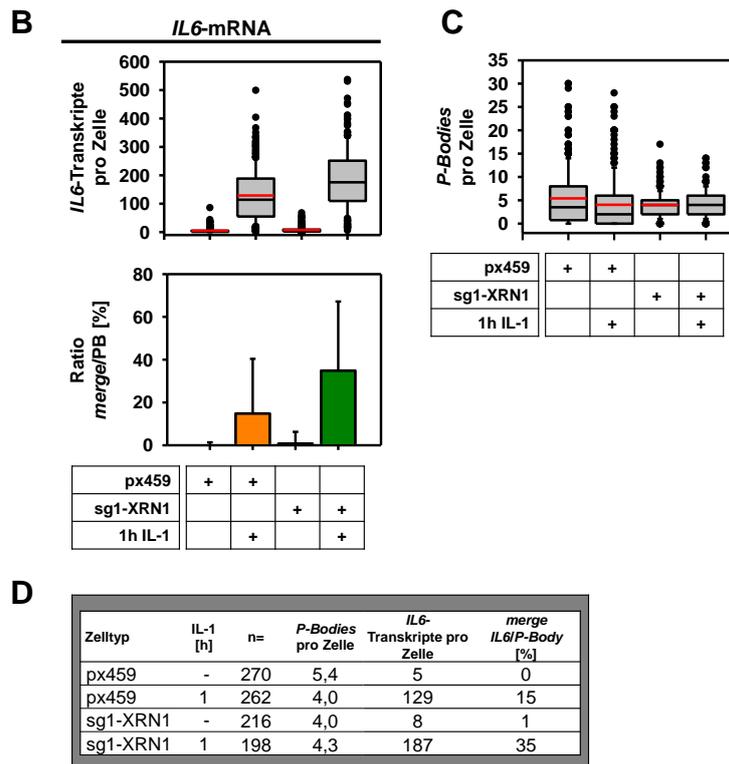
Dabei konnten im unstimulierten Zustand der Zellen nahezu keine Signale für *IL6*-Transkripte detektiert werden. In den px459-Kontrollzellen konnte nach der Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 eine Induktion der mRNA-Expression mit 129 Transkripten pro Zelle beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte sich in den sg1-XRN1-Zellen eine Erhöhung der Transkriptmenge auf 187 *IL6*-Transkripte pro Zelle (Abb.3.27 A, B, D).

Bei der Auswertung der *P-Body*-Anzahl pro Zelle konnten die bisherigen Ergebnisse erneut bestätigt werden. Der *knockdown* von XRN1 führte nur zu einer geringfügigen Veränderung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle, allerdings wurde auch eine Größenzunahme beobachtet (Abb.3.27 A, C).

Bei der Betrachtung der relativen Lokalisation der *IL6*-mRNA und der *P-Bodies* zeigten in den px459-Kontrollzellen nach der Stimulation der Zellen mit IL-1 15% der *P-Bodies* eine Kolokalisation mit den *IL6*-Transkripten. In den sg1-XRN1-Zellen konnte eine Erhöhung der Rate der Kolokalisation von *IL6*-Transkripten und *P-Bodies* (35%) beobachtet werden (Abb.3.27 A, B, D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass neben der *NFKBIA*-mRNA ebenfalls die *IL6*-mRNA in Abhängigkeit des *knockdowns* von XRN1 in *P-Bodies* akkumulieren kann. Dabei findet die Akkumulation der *IL6*-mRNA im Vergleich mit der *NFKBIA*-mRNA auf einem niedrigeren, jedoch im Vergleich mit der *IL8*-mRNA auf einem deutlich höheren Niveau statt.





**Abb.3.27: Analyse der relativen zellulären Lokalisation der *IL6*-mRNA und *P*-Bodies in ausgewählten CRISPR/Cas9-Zellen.** A: HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) und die entsprechende Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unstimuliert belassen. Anschließend erfolgte in einer Immuno-RNA-FISH die Analyse der räumlichen Nähe von *IL6*-Transkripten zu *P*-Bodies mittels genspezifischer Sonden und EDC4-Antikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. B: Quantitative Darstellung der *IL6*-Transkripte pro Zelle (oben; schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert) sowie der prozentualen Anteil der *P*-Bodies, welche einen Überlagerung (*merge*) mit den Transkripten aufweisen (unten; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), zu den unterschiedlichen Versuchsansätzen aus (A) von zwei biologisch unabhängigen Experimenten. C: Quantitative Darstellung der *P*-Body-Anzahlen pro Zelle (schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert) zu den unterschiedlichen Versuchsansätzen aus (A). E: Zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Zellzahlen und der Ergebnisse aus (B, C).

### 3.15. Manipulation des *P*-Body remodellings durch pharmakologische Inhibitoren des RNA-Metabolismus und des IL-1 signalings

In den voran gegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass *NFKBIA*- und *IL6*-Transkripte nach dem *knockdown* von XRN1 in *P*-Bodies akkumulieren können. Dies ist für die *IL8*-mRNA nicht der Fall, sodass eine selektive Transkriptausswahl der *P*-Bodies bzw. eine transkriptspezifische Remodellierung dieser makromolekularen Strukturen angenommen werden kann. Aus diesem Grund sollte in den nächsten Experimenten geprüft werden, ob eine Manipulation des RNA- und Protein-Metabolismus durch verschiedene pharmakologische Inhibitoren in den sg1-XRN1-Zellen zu einer differentiellen Veränderung der Expression der

*NFKBIA*-mRNA, der Expression des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins sowie der Lokalisation der *NFKBIA*-mRNA führen kann.

Zu diesem Zweck wurden die Inhibitoren PHA-408, MG132, Cycloheximid, Actinomycin D und Flavopiridol verwendet. PHA-408 stellt einen ATP-kompetitiven Inhibitor von IKK2 dar und inhibiert die Phosphorylierung und den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und somit die Aktivierung von NF $\kappa$ B p65 nach einem proinflammatorischen Stimulus und damit auch die mRNA-Synthese von IL-1-Zielgenen (Mbalaviele et al, 2009). MG132 ist ein Tripeptidinhibitor des Proteasoms und verhindert dadurch unter anderem den IL-1-induzierten proteasomalen Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , was wiederum zu einer indirekten Inhibierung der Aktivierung von NF $\kappa$ B p65 führt (Fiedler et al, 1998; Tsubuki et al, 1996). Cycloheximid gehört zur Klasse der Glutarimidantibiotika und blockiert die Proteinsynthese durch die Inhibierung der Translationselongation (Obrig et al, 1971). In frühen Studien konnte in Hefen nach einer Behandlung von Zellen mit Cycloheximid die Auflösung der *P-Body*-Strukturen beobachtet werden, was durch die Depletion freier zytoplasmatischer mRNAs erklärt wurde (Teixeira et al, 2005). Actinomycin D blockt als Zytostatikum nach der Interkalation in die DNA die korrekte Formation des Transkriptionsinitiationskomplexes und dadurch die *de novo* Synthese von RNA durch die RNA-Polymerase II (Chen et al, 2008; Sobell, 1985). Des Weiteren wurde nach einer langfristigen Behandlung von Zellen für 24 h mit Actinomycin D eine Auflösung von *P-Bodies* beobachtet (Aizer et al, 2008). Flavopiridol führt durch die Inhibierung von Cyclin-abhängigen-Kinasen (CDKs) zu einem Stop des Zellzyklus. Gleichzeitig aber hemmt Flavopiridol durch die Inhibierung von CDK9, welches im Komplex mit Cyclin T den Translationselongationsfaktor P-TEFb bildet, die Transkription, indem die Phosphorylierung der C-terminalen-Domäne der RNA-Polymerase II durch P-TEFb verhindert wird (Bensaude, 2011; Blagosklonny, 2004; Chen et al, 2005). Dabei erfolgt die Hemmung von CDK9 im Vergleich zu den anderen CDKs bereits bei einer 5-10-fach geringeren Dosis (Blagosklonny, 2004), wodurch der transkriptionelle Hemmeffekt hier dominiert.

Zur Untersuchung der Fragestellung der Auswirkungen der verschiedenen Inhibitoren auf den Protein- und mRNA-Metabolismus mittels Analysen im Western Blot und RT-qPCR wurden HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 und die Kontroll-Zelllinie (px459) auf unterschiedliche Weise behandelt. Zunächst erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen mit den verschiedenen Inhibitoren MG132 (30 min Vorbehandlung; 10  $\mu$ M), Flavopiridol (60 min Vorbehandlung; 10  $\mu$ M), PHA-408 (60 min

Vorbehandlung; 5  $\mu$ M), Cycloheximid (60 min Vorbehandlung; 10  $\mu$ g/ml) und Actinomycin D (60 min Vorbehandlung; 5  $\mu$ g/ml). Als Kontrolle dienten komplett unbehandelte oder DMSO-behandelte Zellen (60 min Vorbehandlung; 1mM). Nach der Vorbehandlung mit den Inhibitoren wurden die Zellen für 0,5 h; 1 h; 3 h und 8 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen. Nach der Zellernte erfolgte die Herstellung von Zelllysaten zum Proteinnachweis von I $\kappa$ B $\alpha$ , p(S32)- I $\kappa$ B $\alpha$ , XRN1, EDC4 und DCP1a mittels Western Blot-Analysen und die Isolierung von RNA zum Nachweis der *NFKBIA*-mRNA mittels RT-qPCR.

In unbehandelten, wie auch in mit DMSO-behandelten Zellen konnte auf Proteinebene der starke CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von XRN1 bestätigt werden. Bei der Betrachtung der Proteinmengen von EDC4 und DCP1a konnte unter allen Bedingungen keine Veränderung dieser Proteinmengen festgestellt werden (Abb.3.28 A). Der erwartete Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  nach einer 30-minütigen Stimulation der Zellen mit IL-1 sowie die anschließend stattfindende Resynthese des Proteins konnte in den sg1-XRN1-Zellen und in den px459-Kontrollzellen gleichermaßen beobachtet werden. Zeitgleich konnte mit dem Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  nach dieser Stimulation eine Induktion der Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an Serin 32 beobachtet werden, welche nach einer 60-minütigen IL-1-Stimulation die maximale Stärke aufwies. Auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen den sg1-XRN1-Zellen und den px459-Kontrollzellen (Abb.3.28 A, B). Bei der Analyse der Menge der *NFKBIA*-Transkripte konnte die leichte Erhöhung der mRNA-Menge in den unstimulierten sg1-XRN1-Zellen bestätigt werden. Die IL-1-abhängige Induktion der *NFKBIA*-mRNA nach einer Stimulation der Zellen für 1 h und 3 h war in den sg1-XRN1-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen leicht verringert (Abb.3.28 C).

Die Behandlung der Zellen mit den unterschiedlichen Inhibitoren führte in keinem Fall zu einer Veränderung der Proteinmengen von XRN1, EDC4 und DCP1a (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnten in Abhängigkeit der Inhibitorbehandlungen unterschiedliche Effekte auf die I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge und Phosphorylierung sowie der *NFKBIA*-mRNA-Menge beobachtet werden.

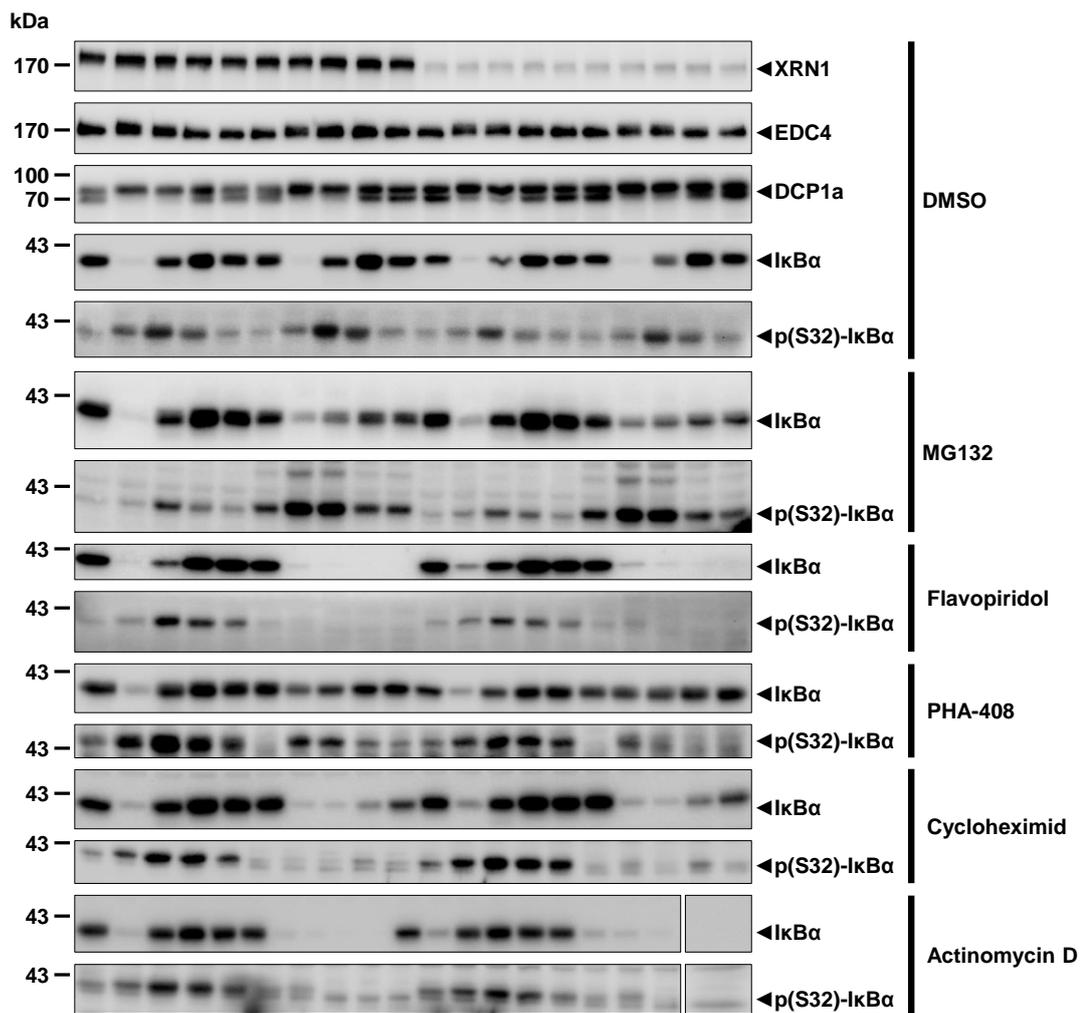
Die Behandlung der Zellen mit MG132 und PHA-408 führte, wie erwartet, zu einem verminderten Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  nach der Stimulation der Zellen für 30 min mit IL-1. Auch die Resynthese von I $\kappa$ B $\alpha$  fand auf einem verringerten Niveau statt. Des Weiteren führte die Behandlung der Zellen mit MG132 zu einer Zunahme der Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an

Serin 32, wogegen die Behandlung der Zellen mit PHA-408 zu einer verringerten Phosphorylierung führte. Diese Beobachtungen konnten gleichermaßen für sg1-XRN1-Zellen und die px459-Kontrollzellen gemacht werden (Abb.3.28 A, B). Die IL-1-induzierte Expression der *NFKBIA*-mRNA war im Vergleich zur Kontrollkondition durch die Behandlung der Zellen mit MG132 und PHA-408 deutlich verringert. Dieser Effekt wirkte sich gleichermaßen in den sg1-XRN1-Zellen und den px459-Kontrollzellen aus (Abb.3.28 C).

Die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol und Actinomycin D hatte eine nahezu komplette Inhibierung der Resynthese von I $\kappa$ B $\alpha$  nach der Stimulation der Zellen für 30 min mit IL-1 zur Folge. Daher konnte ebenfalls nahezu kein phosphoryliertes I $\kappa$ B $\alpha$ -Protein detektiert werden. Diese Auswirkungen auf Proteinebene könnten auf die erwarteten Effekte der Inhibierung der *NFKBIA*-mRNA-Expression zurückgeführt werden, welche bei beiden Inhibitoren beobachtet werden konnte. Unter allen Versuchsbedingungen zeigten sich keine Unterschiede zwischen den sg1-XRN1-Zellen und den px459-Kontrollzellen (Abb.3.28 A, B, C).

Die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid führte ebenfalls zu einem regulären Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  nach der Stimulation der Zellen für 30 min mit IL-1, jedoch zu einer stark verringerten IL-1-induzierten Resynthese des Proteins. Folglich konnte auch die Phosphorylierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteins nach der Behandlung mit Cycloheximid nicht beobachtet werden (Abb.3.28 A, C). Die IL-1-induzierte Induktion der Expression der *NFKBIA*-mRNA war von der Behandlung der Zellen mit Cycloheximid nahezu unbeeinflusst. Dabei konnten in den Experimenten auf Protein- und mRNA-Ebene keine Unterschiede zwischen den sg1-XRN1-Zellen und den px459-Kontrollzellen beobachtet werden (Abb.3.28 C).

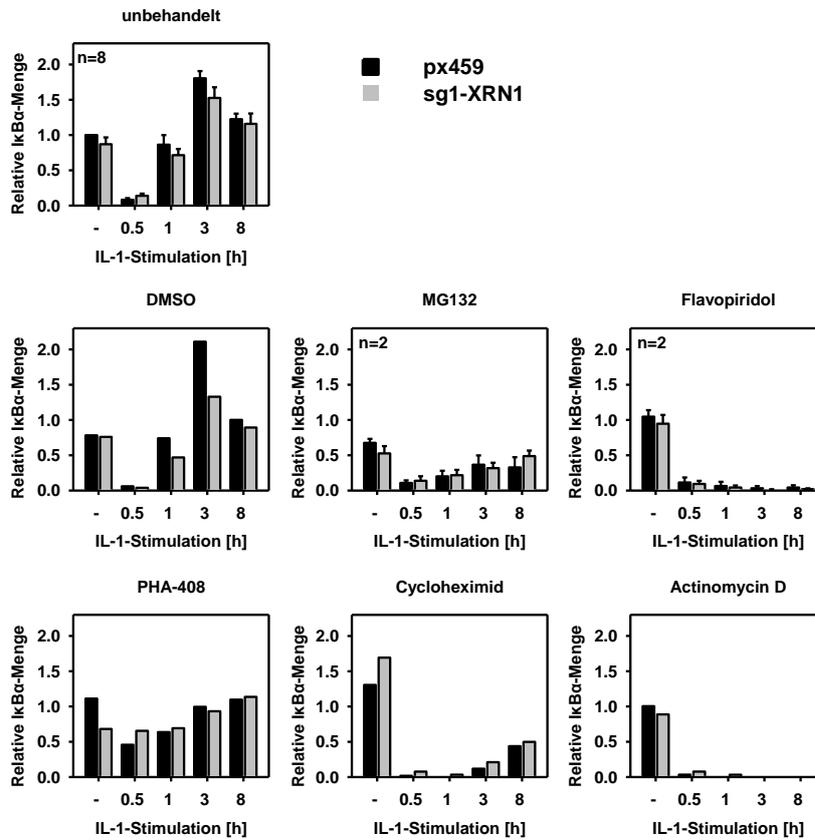
**A**



px459	+	+	+	+	+	+	+	+	+											
sg1-XRN1										+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
IL-1 [h]	-	1/2	1	3	8	-	1/2	1	3	8	-	1/2	1	3	8	-	1/2	1	3	8
Inhibitor						+	+	+	+	+						+	+	+	+	+

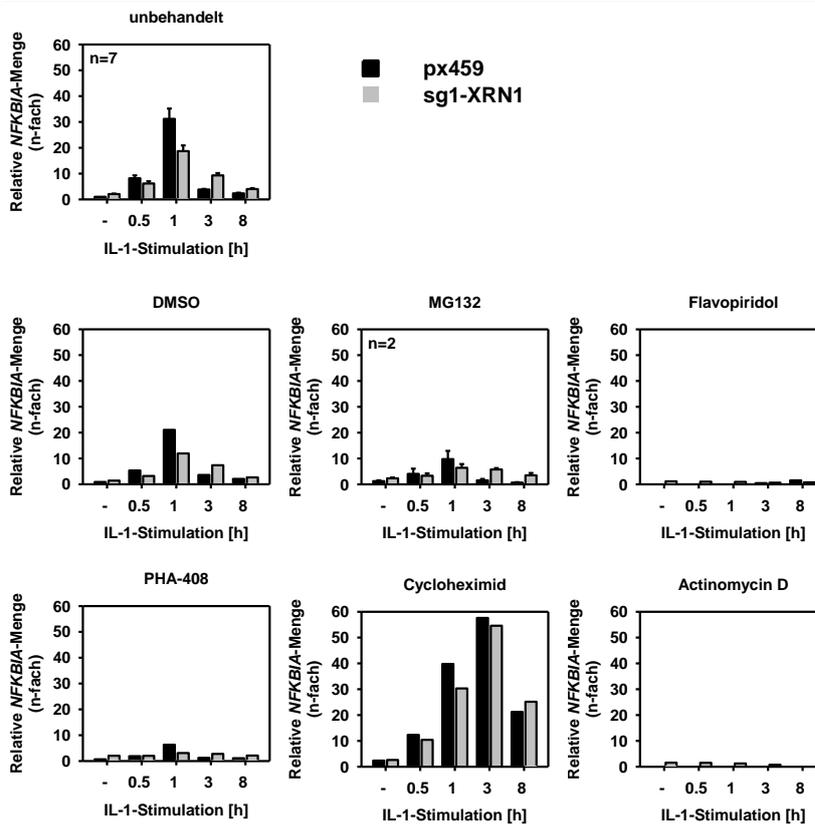
**B**

**I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmenge**



**C**

**NFKBIA-mRNA-Menge**



**Abb.3.28: Einfluss von pharmakologischen Inhibitoren auf den IL-1-abhängigen I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinmetabolismus und die NFKBIA-mRNA-Expression.** **A:** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) sowie die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden mit den Inhibitoren MG132 (30 min Vorbehandlung; 10  $\mu$ M), Flavopiridol (60 min Vorbehandlung; 10  $\mu$ M), PHA-408 (60 min Vorbehandlung; 5  $\mu$ M), Cycloheximid (60 min Vorbehandlung; 10  $\mu$ g/ml) und Actinomycin D (60 min Vorbehandlung; 5  $\mu$ g/ml) sowie DMSO (60 min Vorbehandlung; 1 mM) als Kontrolle behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen für 0,5 h; 1 h; 3 h und 8 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unstimuliert belassen. Die Proteinmengen von XRN1, EDC4, DCP1a, I $\kappa$ B $\alpha$  und der phosphorylierten Form von I $\kappa$ B $\alpha$  (p(S32)- I $\kappa$ B $\alpha$ ) wurden mittels einem Proteinnachweis im Western Blot bestimmt. **B:** Densitometrische Auswertung (mittels ImageJ) der Western Blot Ergebnisse aus (A) als Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung). **C:** Parallel zu den Versuchen aus (A) wurde neben der Analyse der Proteinmengen ebenfalls eine Untersuchung der mRNA-Menge von NFKBIA derselben Versuchsansätze mittels RT-qPCR durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nach der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode auf die unbehandelten px459-Zellen normiert und als Mittelwert ( $\pm$ Standardabweichung) dargestellt.

### 3.16. Kolokalisation von NFKBIA-mRNA und P-Bodies in XRN1 knockdown Zellen in Abhängigkeit von pharmakologischen Inhibitoren

Die vorliegenden Experimente zeigen weitestgehend die erwarteten Effekte der unterschiedlichen Inhibitoren auf den Protein- und mRNA-Metabolismus des Proteins I $\kappa$ B $\alpha$ , bzw. dessen Transkript (NFKBIA). Dabei führt der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von XRN1, welcher vor allem die Stabilität der NFKBIA-mRNA massiv beeinflusst, in keiner Weise zu einer Veränderung der Proteinmenge von I $\kappa$ B $\alpha$ . Auch die Störungen des zellulären Systems durch die unterschiedlichen Inhibitoren führen, verglichen mit den px459-Kontrollzellen, nicht zu einer Veränderung der Aufrechterhaltung der Proteinmenge von I $\kappa$ B $\alpha$ . Diese Ergebnisse implizieren zusammen mit der erhöhten NFKBIA-mRNA-Menge in den sg1-XRN1-Zellen eine Entkopplung der mRNA-Expression, des mRNA-Abbaus sowie der Proteinsynthese. Die beobachtete Akkumulation der NFKBIA-mRNA in den sg1-XRN1-Zellen in den P-Bodies könnte einen Mechanismus darstellen, welcher in der Lage ist diese Entkopplung der mRNA- und Proteinmenge zu erreichen. Deshalb sollte in den nächsten Experimenten geklärt werden, ob eine Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren zu einer Veränderung der Lokalisation der NFKBIA-mRNA und der relativen Lokalisation dieser zu den P-Bodies führen kann.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontrollzellen (px459) auf unterschiedliche Weise mit den Inhibitoren behandelt. Zum einen erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen vor der IL-1-Stimulation mit MG132 (0,5 h; 10  $\mu$ M), Flavopiridol (1 h; 10  $\mu$ M) und PHA-408 (1 h; 5  $\mu$ M). Zum anderen erfolgte die Nachbehandlung der Zellen nach der IL-1-Stimulation mit MG132 (2 h; 10  $\mu$ M), Flavopiridol (2 h; 10  $\mu$ M), PHA-408 (2 h; 5  $\mu$ M) und Actinomycin D (1 h;

5 µg/ml). Die Zellen wurden entsprechend nach oder vor der Inhibitorbehandlung für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden Immuno-RNA-FISH-Experimente zum Nachweis der *NFKBIA*-mRNA durch genspezifische Sonden und der *P-Bodies* durch einen EDC4-Antikörper durchgeführt.

Auf eine Durchführung der Immuno-RNA-FISH-Experimente unter der Verwendung von Cycloheximid wurde verzichtet. Für die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid (2 h; 10 µg/ml) konnte wie auch schon aus der Literatur bekannt (Teixeira et al, 2005) in eigenen vorangegangenen Immunfluoreszenz-Experimenten eine nahezu komplette Auflösung der *P-Body*-Assemblierung gezeigt werden. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen (Abb.Anh.12).

Bei der Betrachtung der Auswirkungen der verwendeten Inhibitoren auf die *P-Body*-Assemblierung zeigten sich in den Immuno-RNA-FISH-Experimenten zum Teil drastische Effekte auf die *P-Body*-Anzahlen.

Die Vorbehandlung und auch die Nachbehandlung mit MG132 führten in den px459-Kontrollzellen über alle Versuchsbedingungen hinweg zu einer starken Reduktion der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle um ca. 85%. Im Gegensatz dazu konnte in den sg1-XRN1-Zellen keine Reduktion der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle durch die Behandlung mit MG132 beobachtet werden (Abb.3.29 A, B, C; Abb.Anh.13; Abb.Anh.16). Diese Beobachtung der ausbleibenden Auflösung der *P-Body*-Strukturen in den XRN1 *knockdown* Zellen könnte dadurch erklärt werden, dass ein XRN1-abhängiger Faktor existiert, dessen proteasomaler Abbau für die Assemblierung von *P-Bodies* notwendig ist.

Bei der Vorbehandlung der Zellen mit Flavopiridol konnte in den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen eine leichte Erhöhung der *P-Body*-Anzahl pro Zelle beobachtet werden. Die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol nach der IL-1-Stimulation führte nicht zu dieser Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen (Abb.3.29 A, B, C; Abb.Anh.14; Abb.Anh.15).

Die Vorbehandlung, wie auch die Nachbehandlung der Zellen mit PHA-408 hatte in den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf die *P-Body*-Assemblierung (Abb.3.29 A, B, C; Abb.Anh.16; Abb.Anh.17).

Die Nachbehandlung der Zellen mit Actinomycin D führte in den px459-Kontrollzellen zu einer leichten Erhöhung der *P-Body*-Anzahl pro Zelle. In den sg1-XRN1-Zellen konnte dieser Effekt nicht verzeichnet werden (Abb.3.29; Abb.Anh.13).

Bei der Analyse der *NFKBIA*-Transkripte zeigten sich ebenfalls differentielle Auswirkungen der unterschiedlichen Inhibitoren auf die mRNA-Menge.

Zunächst zeigte sich in den sg1-XRN1-Zellen unter allen Versuchsbedingungen im unbehandelten Zustand im Vergleich zu den px459-Kontrollzellen eine erhöhte Menge der *NFKBIA*-Transkripte, was auch schon in den vorangegangenen Experimenten beobachtet werden konnte (Abb.3.29 A, B, C).

Die Vorbehandlung der Zellen mit MG132 und PHA-408 führte in den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen zu keiner Veränderung der basalen Transkriptmengen von *NFKBIA*. Bei der anschließenden Stimulation der Zellen mit IL-1 zeigte sich für beide Zelltypen eine schwächere Induktion der *NFKBIA*-mRNA (Abb.3.29 A, B, C; Abb.Anh.13; Abb.Anh.17).

Die Vorbehandlung der Zellen mit Flavopiridol führte in den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen zu einer Verringerung der basalen *NFKBIA*-Transkriptmenge. Dabei war dieser Effekt in den sg1-XRN1-Zellen im Vergleich zu den px459-Kontrollzellen abgeschwächt. Bei der darauf folgenden Stimulation der Zellen mit IL-1 konnte in beiden Zelltypen keine Induktion der *NFKBIA*-mRNA beobachtet werden (Abb.3.29 A, B, C; Abb.Anh.14).

Die Behandlung der Zellen mit Flavopiridol und Actinomycin D nach der Stimulation der Zellen mit IL-1 führte in den px459-Kontrollzellen und den sg1-XRN1-Zellen zu einer Verringerung der IL-1-induzierten *NFKBIA*-Transkriptmenge. Dabei konnte dieser Effekt in den sg1-XRN1-Zellen in abgeschwächter Form beobachtet werden. Zusätzlich wirkte sich die Inhibitorbehandlung der Zellen verringernd auf die Transkriptmengen im basalen Zustand aus (Abb.3.29 A, B, C; Abb.Anh.13; Abb.Anh.15).

Die Behandlung der Zellen mit MG132 nach der IL-1-Stimulation wirkte sich in beiden Zelltypen ebenfalls mit einer Verringerung der induzierten Transkriptmenge von *NFKBIA* aus. Im basalen Zustand konnten bei der Behandlung der Zellen mit MG132 nahezu keine Veränderungen der *NFKBIA*-Transkriptmenge beobachtet werden (Abb.3.29 A, B, C; Abb.Anh.16).

Bei der Behandlung der Zellen mit PHA-408 nach der IL-1-Stimulation konnte in den px459-Kontrollzellen eine stark reduzierte Menge der *NFKBIA*-mRNA beobachtet werden. In den sg1-XRN1-Zellen hingegen konnte bei der Behandlung der Zellen mit PHA-408 eine

schwächere Reduktion der Transkriptmenge von *NFKBIA* beobachtet werden. Im basalen Zustand hatte die Behandlung der Zellen mit PHA-408 in beiden Zelltypen nahezu keinen Einfluss auf die Menge der *NFKBIA*-mRNA (Abb.3.29 A, B, C; Abb.Anh.16).

Bei der Analyse der Kolokalisation der *NFKBIA*-mRNA mit den *P-Bodies* konnte in den px459-Kontrollzellen kaum eine Überlagerung der Signale der mRNA mit denen der *P-Bodies* beobachtet werden. Auch die Behandlung der Zellen mit den unterschiedlichen Inhibitoren führte nicht zu einer Anhäufung der Kolokalisierungen der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies*. Lediglich durch die Stimulation der Zellen mit IL-1 und somit in einer Situation mit stark erhöhter Transkriptmenge in der Zelle konnte eine geringfügige Kolokalisation in den Kontrollzellen beobachtet werden (Abb.3.29 A, B, C). Für die sg1-XRN1-Zellen zeigte sich in allen Experimenten eine hohe Rate der Kolokalisation der Transkripte mit den *P-Bodies*, wie es auch in den vorangegangenen Experimenten der Fall war. In den sg1-XRN1-Zellen führte eine Behandlung der Zellen mit den unterschiedlichen Inhibitoren zu keiner merklichen Veränderung der Rate der Kolokalisation der *NFKBIA*-mRNA mit den *P-Bodies* (Abb.3.29 A, B, C). Eine Wiederherstellung der ursprünglichen Rate der Kolokalisationen in den sg1-XRN1-Zellen auf dem Niveau der Kontroll-Zelllinie war somit durch die Inhibitorbehandlungen nicht möglich.

Die Ergebnisse der Immuno-RNA-FISH-Experimente zeigen die erwarteten, differentiellen Effekte der unterschiedlichen Inhibitoren auf die Expression von mRNAs am Beispiel der *NFKBIA*-mRNA. Die Effekte der Inhibitoren auf den RNA-Metabolismus zeigen sich dabei in den px459-Zellen und den sg1-XRN1-Zellen in vergleichbarer Weise. Die zum größten Teil verringerten Effekte der Inhibitoren in den sg1-XRN1-Zellen sind auf die Erhöhung der Stabilität der *NFKBIA*-mRNA zurückzuführen und äußern sich in den Immuno-RNA-FISH-Experimenten vor allem durch erhöhte mRNA-Mengen in den sg1-XRN1-Zellen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen. Bei den Auswirkungen der Inhibitoren auf die *P-Body*-Assemblierung ist besonders der Effekt der Behandlung mit MG132 hervorzuheben. Während die Behandlung der px459-Kontrollzellen zu einer nahezu kompletten Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung führte, konnte diese Beobachtung für die sg1-XRN1-Zellen nicht gemacht werden. Die Gründe für diese interessante Beobachtung konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter aufgeklärt werden. Es kann jedoch spekuliert werden, dass es einen MG132-sensitiven Faktor gibt, welcher zusätzlich XRN1-abhängig ist und die positive Regulation der *P-Body*-Assemblierung ermöglicht. Des Weiteren führte eine kurzfristige Inhibierung der mRNA-Expression auf der Ebene der Transkription durch Flavopiridol und

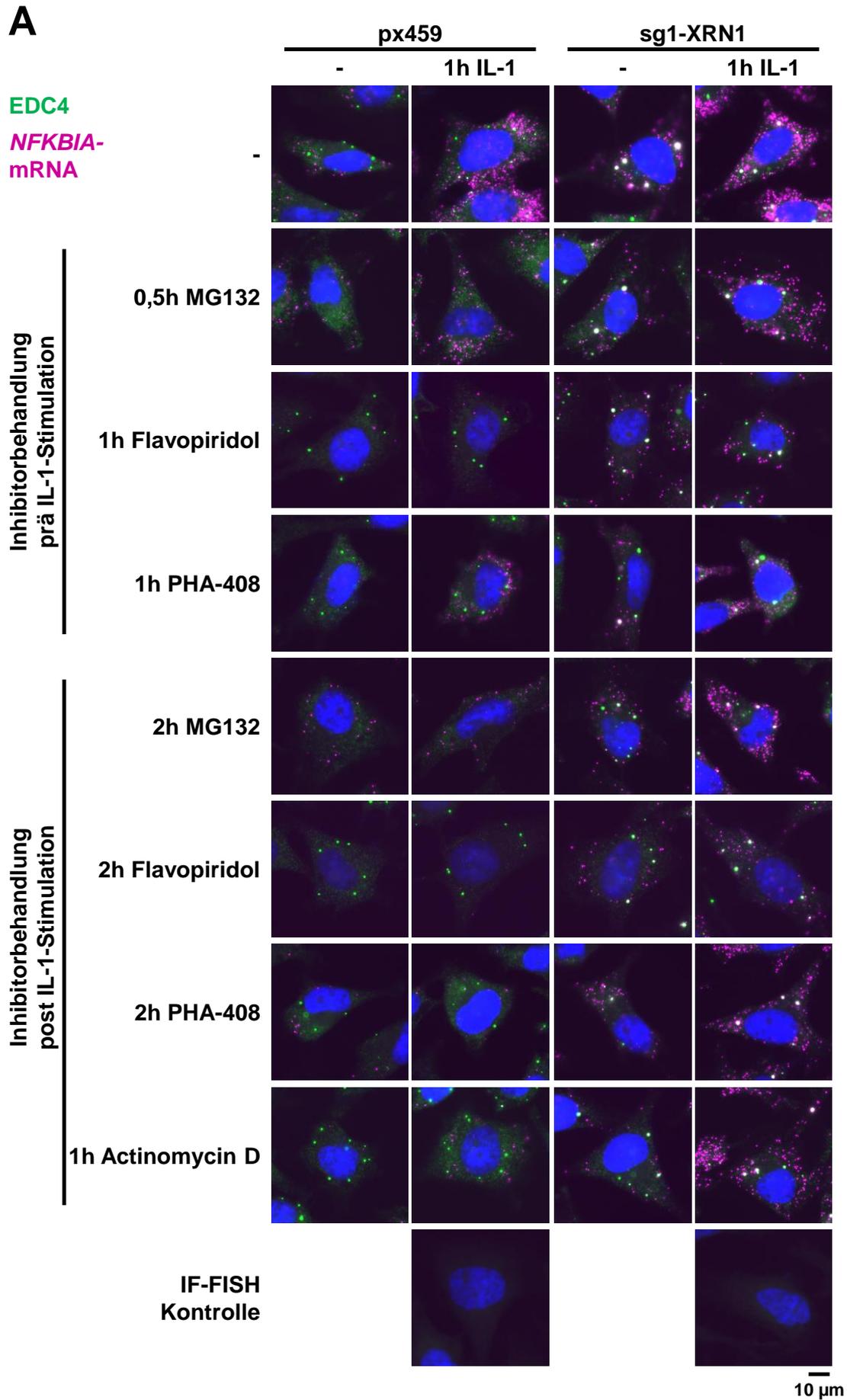
auch Actinomycin D zu einer geringfügigen Zunahme der *P-Body*-Assemblierung, im Gegensatz zu den bereits erwähnten, publizierten Ergebnissen aus der Literatur mit der Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung bei einer langfristigen Behandlung der Zellen mit Actinomycin D (Aizer et al, 2008). Offensichtlich fallen die zytoplasmatischen mRNA-Spiegel erst nach einer langen Actinomycin D Behandlung soweit ab, dass *P-Bodies* sich auflösen. Diese Bedingung induziert allerdings auch bereits Zelltod (Wu & Yung, 1994). Die hier gewählte Bedingung ist daher deutlich schonender für die Zellen und zeigt, dass eine kurze Actinomycin D Behandlung eher eine stressvermittelte Zunahme der *P-Bodies* bewirkt, was ebenfalls mit einer Aktivierung von JNK durch Actinomycin D kompatibel ist (Ho & Li, 2010; Kleeff et al, 2000). Zusätzlich führte die Behandlung der Zellen mit den unterschiedlichen Inhibitoren nicht zu einer Veränderung der Kollokationen der *NFKBIA*-mRNA mit den *P-Bodies*. In den px459-Kontrollzellen konnte durch die Inhibitorbehandlungen keine Situation etabliert werden, in der es zu einer massiven Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* kommt, wie es in den sg1-XRN1-Zellen der Fall ist. Analog dazu konnte durch die Inhibitorbehandlungen der sg1-XRN1-Zellen keine Situation erreicht werden, die zu einer Rekonstitution der Kollokation auf dem Niveau der px459-Kontrollzellen führte.

### **Zusammenfassende Beurteilung der Befunde:**

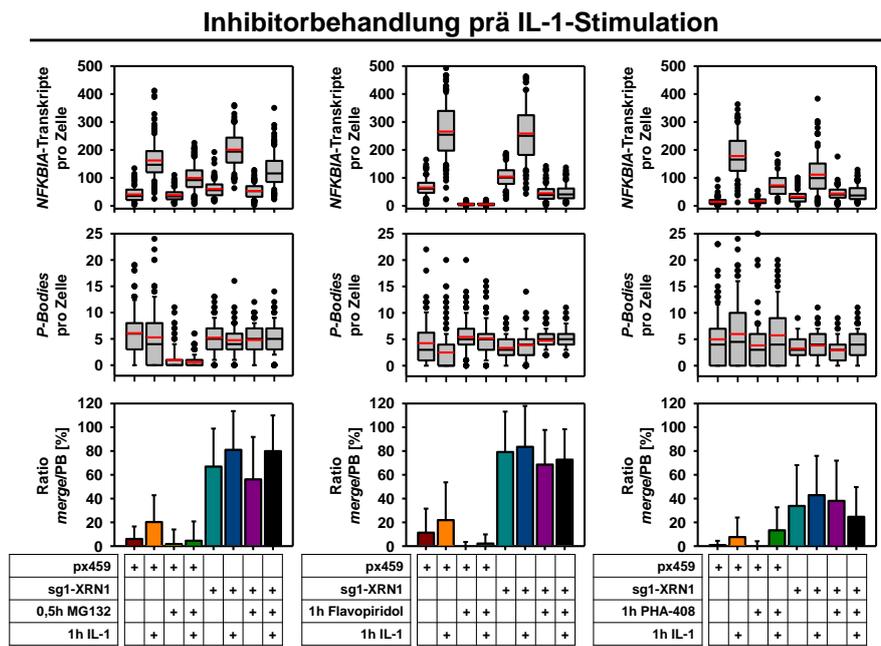
Zusammenfassend zeigen die Daten aus der vorliegenden Arbeit, dass die mRNA-Spiegel von *NFKBIA* keine Determinante der *P-Body*-Assemblierung darstellen und die Stabilisierung oder Destabilisierung der *NFKBIA*-mRNA durch *P-Body*-Faktoren unabhängig vom *P-Body*-Status erfolgt. Verallgemeinert bedeutet dies, dass, entgegen einiger veröffentlichter Befunde, die mRNA-Spiegel von der Ausbildung der *P-Bodies* entkoppelt sind. Daher korreliert die Anzahl an *P-Bodies* nicht mit der Stabilisierung von *IL8*, *IL6*, *CXCL3* und *NFKBIA*. Der Exzess an *NFKBIA*-mRNA, wie sie durch die fehlende Prozessierung in den XRN1-defizienten Zellen entsteht, wird dagegen in den *P-Bodies* gelagert. Weiterhin sind unter diesen Bedingungen die Proteinspiegel unabhängig vom XRN1-vermittelten mRNA-Abbau und der Lokalisation in den *P-Bodies* reguliert. Das ist insofern sinnvoll, als dass der Hauptabbaumechanismus von I $\kappa$ B $\alpha$  eine schlagartig erfolgende, signalvermittelte Destruktion des Proteins darstellt. Entsprechend weist das I $\kappa$ B $\alpha$  Protein eine hohe Halbwertszeit auf, was

durch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, wogegen die Halbwertszeit der entsprechenden *NFKBIA*-mRNA, wie in dieser Arbeit gezeigt, sehr kurz ist.

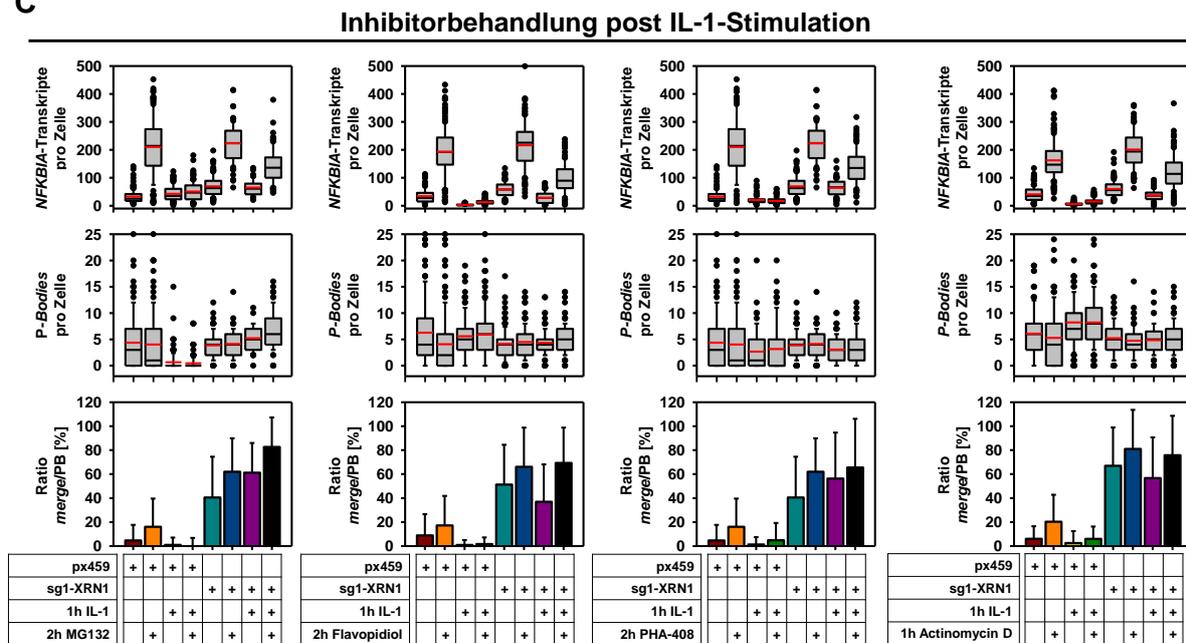
Diese Befunde zeigen daher überraschenderweise, dass die *P-Body* Formation und die mRNA- und Proteinspiegel voneinander entkoppelt werden können, wodurch die letztlich entscheidenden Proteinspiegel – hier gezeigt am Beispiel des I $\kappa$ B $\alpha$  Proteins - über einen breiten dynamischen Bereich gepuffert werden können. Das ist biologisch insofern sinnvoll, da im Fall von I $\kappa$ B $\alpha$  bereits ein geringer Abfall der konstitutiven Proteinspiegel zu einer Freisetzung von NF $\kappa$ B p65 und dessen Translokation in den Zellkern führen kann. Eine solchermaßen erhöhte Aktivität des NF $\kappa$ B Signalweges ist ein zentrales Kennzeichen vieler Tumoren und autoimmunologischer Erkrankungen (Courtois & Gilmore, 2006; Perkins, 2012; Smahi et al, 2002), wodurch die exakte Kontrolle der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinspiegel durch zelluläre Mechanismen an Bedeutung gewinnt.



**B**



**C**



**Abb.3.29: Einfluss von pharmakologischen Inhibitoren auf die relative zelluläre Lokalisation von *NFKBIA*-mRNA und *P-Bodies* in CRISPR/Cas9-Zellen.** A: HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Abhängig von der Fragestellung erfolgte neben der IL-1-Stimulation ebenfalls eine Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren MG132 (10  $\mu$ M), Flavopiridol (10  $\mu$ M), PHA-408 (5  $\mu$ M) und Actinomycin D (5  $\mu$ g/ml) prä IL-1-Stimulation oder post IL-1-Stimulation mit den jeweils angegebenen Behandlungsdauern. Zur Kontrolle wurden die Zellen unbehandelt verwendet. Anschließend erfolgte in einer Immuno-RNA-FISH die Analyse der räumlichen Nähe von *NFKBIA*-mRNA zu *P-Bodies* mittels genspezifischer Sonden und einem EDC4-Antikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. **B, C:** Quantitative Darstellung der *NFKBIA*-Transkripte pro Zelle (oben; schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert), der *P-Body*-Anzahl pro Zelle (mitte; schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert) sowie der prozentuale Anteil der *P-Bodies*, welche einen Überlagerung (*merge*) mit den Transkripten aufweisen (unten; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), zu den unterschiedlichen Versuchsansätzen aus mindestens 50 Zellen je Versuchsbedingung.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die mRNA-Expression als vielschichtiger, zellulärer Prozess

Das klassische Modell der eukaryotischen Genexpression basiert auf einem linearen, mehrstufigen Prozess, welcher mit der Transkription und der Synthese einer prä-mRNA beginnt und im Abbau der reifen mRNA nach der Translation endet. Zwischen diesen zwei Endpunkten erfolgt die Prozessierung der prä-mRNA mit der Anbringung von Modifikationen wie der 5'-Cap-Struktur und des 3'-Poly(A)-Überhangs sowie das Spleißen zur reifen mRNA und der Export der mRNA für die Translation in das Zytoplasma. Schon während der Transkription im Zellkern wie auch später im Zytoplasma erfolgt die Assoziation der mRNA durch RNA-bindende Proteine, wobei diese Komplexe aus Proteinen und RNA als *messenger ribonucleoprotein particle* (mRNPs) bezeichnet werden. Eine kontinuierliche Änderung der Zusammensetzung der mRNPs, im Sinne eines molekularen *remodellings*, ermöglicht anschließend eine vielschichtige, kompartmentalisierte und sequentielle Regulation der unterschiedlichen biologischen Prozesse des RNA-Metabolismus, wobei diese nicht notwendigerweise nach dem erwähnten klassischen, linearen Prozess ablaufen müssen (Moore, 2005). So erfolgt die Anbringung der 5'-Cap-Struktur zeitgleich mit dem Beginn der Transkription, sobald die ersten 40-60 Nukleotide durch die Polymerase II (Pol II) synthetisiert wurden. Hierfür erfolgt die Rekrutierung der beteiligten Proteine in Abhängigkeit einer Phosphorylierung am Serin 5 der 52 Heptapeptide der C-terminalen Domäne (CTD) von Pol II durch CDK7 (*Cyclin-dependent kinase 7*). Diese *multisite* Phosphorylierung generiert eine Bindeplattform für die Rekrutierung der Cap-modifizierenden Enzyme. Die 5'-Cap-Struktur wiederum stellt ihrerseits ebenfalls eine Bindeplattform für weitere Proteinkomplexe dar, welche das Schicksal der neu-synthetisierten mRNA bestimmen, sodass bereits sehr früh während der Transkription spätere posttranskriptionelle Ereignisse determiniert werden können. Während der anschließenden Elongation des Transkripts leitet die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der Pol II die Rekrutierung der Spleiß-Maschinerie ein. Zusätzlich erfolgt die Prozessierung des 3'-mRNA Endes in Koordination mit der Termination der Transkription (Braun & Young, 2014). Dieses ineinander greifende Zusammenspiel von unterschiedlichen zellulären Mechanismen zur mRNA-Prozessierung setzt sich auf weiteren Ebenen der Regulation fort. So kann bereits im Zellkern kotranskriptionell eine exoribonukleolytische Degradierung von naszenten, aberrant abgelesenen und synthetisierten Transkripten durch die nukleäre 5'-3'-Exoribonuklease XRN2 erfolgen, wobei DCP2 als

*Decapping*-Enzym ebenfalls in unmittelbarer Nähe zur RNA und dem Chromatin vorliegen kann (Brannan et al, 2012; Reines, 2012). Dies ist ein eindrückliches Beispiel dafür, wie der Abbau von RNA und die Transkription als biologische Prozesse miteinander verschmolzen sein können, wobei ähnliche Mechanismen und Faktoren wie beim zytoplasmatischen mRNA-Abbau beteiligt sind (Davidson et al, 2012). Umgekehrt können die Rpb4 (*DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB4*) und Rpb7 (*DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7*) Untereinheiten der Pol II durch ihre dauerhafte Bindung an die naszente mRNA im Zytoplasma regulatorische Effekte auf die Abbaurate der mRNA ausüben, indem sie stimulierend auf die Deadenylierung wirken und so alle folgenden Schritte des mRNA-Abbaus eingeleitet werden können (Braun & Young, 2014). Zusätzlich können diese Untereinheiten der Pol II aber auch eine positive Regulation der Translation durch die Interaktion mit dem Initiationsfaktor eIF3 (*Eukaryotic translation initiation factor 3*) bewirken (Harel-Sharvit et al, 2010). Prinzipiell ist das *Decapping* als einleitender Schritt zum RNA-Abbau von der Dissoziation der Translationsmaschinerie (z.B. eIF4E) von der 5'-Cap-Struktur abhängig. Jedoch konnte in Hefen gezeigt werden, dass auch hierbei Ausnahmen vorhanden sein können, bei welchen der Abbau der mRNA ebenfalls kotranslational stattfinden kann, während sich die mRNA noch immer im aktiven Translationsprozess durch das Ribosom befindet (Hu et al, 2009). Des Weiteren sind die Vorgänge der Deadenylierung und des *Decappings* der mRNA als initiale Ereignisse des mRNA-Abbaus nicht endgültig und können rückgängig gemacht werden (Kiss et al, 2016; Mauer et al, 2017; Mukherjee et al, 2012). So ist in meiotisch inaktiven Frosch-Oozyten ein Verbleib von mRNAs mit einem verkürzten 3'-Poly(A)-Überhang in einem translational inaktiven Status möglich, wobei beim Fortschreiten der Meiose eine erneute Adenylierung der mRNA und somit die Initiierung der Translation stattfinden kann (Richter & Sonenberg, 2005). Daneben konnte in Trypanosomen gezeigt werden, dass ein spezifisches *Decapping* von mRNA durch TbDcp2 stattfindet, wobei eine erneute Synthese der 5'-Cap-Struktur durch TbCe1 und TbCmt1 erfolgen kann. Im Zustand mit entfernter 5'-Cap-Struktur steht die mRNA nicht für die Translation zur Verfügung, während durch das erneute Einbringen der 5'-Cap-Struktur die Translation initiiert werden kann (Ignatochkina et al, 2015).

Diese vielschichtige Involvierung verschiedenster Proteinfaktoren zur Steuerung der Genexpression auf mRNA- und Protein-Ebene sowie das Ineinandergreifen von unterschiedlichen biologischen Prozessen verdeutlicht die Komplexität der Regulation des RNA-Metabolismus. Eine attraktive Hypothese ist hierbei, dass die unterschiedlichen

Aufgaben im RNA-Metabolismus einer Zelle kompartmentalisiert, also räumlich getrennt voneinander ablaufen können. Dieses würde über die erhöhte lokale Konzentration von Protein-Faktoren und spezifischen mRNAs eine erhöhte Prozessivität dieser Transkripte ermöglichen und so schnelle posttranskriptionelle oder sogar epigenetische Mechanismen zur Genregulation bereitstellen. Bei den in dieser Arbeit im Fokus stehenden *P-Bodies* handelt es sich um solch distinkte, zelluläre Kompartimente, die in der Literatur als subzelluläre Orte der Lagerung, aber vor allem auch des gezielten Abbaus von RNA beschrieben wurden (Coller & Parker, 2005; Zheng et al, 2011). Die letztere Hypothese ist allerdings für Säugerzellen bisher nicht bewiesen und würde den konkreten Nachweis von spezifischen mRNAs und deren Abbau in *P-Bodies* erfordern. Zusätzlich stellen die zellulären, signalabhängigen Ereignisse und die darauf folgende Steuerung der genauen Protein- und RNA-Zusammensetzung der *P-Bodies* und des *Decappings* als einleitender Schritt zum mRNA-Abbau einen wenig erforschten Aspekt der *P-Body*-Forschung dar (Valkov et al, 2017). Die Analyse der molekularen Zusammensetzung von *P-Bodies* und deren mögliche signalabhängige Regulation standen daher im Zentrum dieser Arbeit.

#### **4.2. Regulation der *Decapping*-Aktivität und der Interaktion von *P-Body*-Faktoren durch signalabhängige, posttranslationale Modifikationen**

Die Möglichkeiten der Regulation der *P-Body*-Assemblierung, sowie des *Decappings* durch posttranslationale Modifikationen (PTM) der regulatorischen Untereinheit des *Decapping*-Komplexes DCP1a im Zuge des IL-1- abhängigen, proinflammatorischen *signalings* wurden zu Beginn dieser Arbeit untersucht. Dabei zeigte insbesondere die Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 durch JNK und die K63-abhängige, regulatorische Ubiquitylierung durch TRAF6 die Relevanz von posttranslationalen Modifikationen durch signalabhängig aktivierte Effektorproteine. Dabei können diese Veränderungen von DCP1a direkt oder indirekt die Assemblierung von *P-Bodies*, die Induktion der Genexpression und die Stabilität von mRNAs beeinflussen (Rzeczkowski et al, 2011; Tenekeci et al, 2016). Diese Ergebnisse werden zusätzlich dadurch unterstützt, dass JNK als Kinase von DCP1a nicht nur konstitutiv im Zytoplasma mit DCP1a interagiert, sondern auch spezifisch in *P-Bodies* rekrutiert werden kann und somit integraler Bestandteil eines größeren, zellulären Kompartiments sein kann (Wasserman et al, 2010). Daneben konnte die Phosphorylierung von DCP1a ebenfalls in anderen Konditionen wie der neuronalen Entwicklung, der Adipozytendifferenzierung und beim Eintreten von Zellen in die Mitose beobachtet werden (Aizer et al, 2013; Blumenthal et

al, 2009; Chiang et al, 2013). In zwei dieser Arbeiten wurde die Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 bestätigt, wobei sie in diesen Fällen durch ERK erfolgte. Dieses ist insofern interessant, als dass die MAPK-Konsensussequenzen um Serin 315 (und Serin 319) damit offenbar einen Konvergenzpunkt für verschiedene intrazelluläre Signalwege darstellen können (Aizer et al, 2013; Chiang et al, 2013). In Hefen wurde ebenfalls die Phosphorylierung von *P-Body*-Faktoren gezeigt. So führte die Phosphorylierung von Pat1 durch PKA (*cAMP-dependent protein kinase*) zu einer Inhibition der Formation von *P-Bodies* (Ramachandran et al, 2011). Daneben kann DCP2 in Hefen durch eine Ste20-homologe Kinase phosphoryliert werden (Yoon et al, 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass durch die posttranslationalen Modifikationen von DCP1a eine Regulation der *Decapping*-Aktivität erfolgen kann. So führt die dominant-negative Expression von DCP1a-Varianten, welche vermindert ubiquitinyliert werden, zu einer Reduktion oder einer fast kompletten Aufhebung der *Decapping*-Aktivität (Abb.3.1). Im Gegenteil dazu sorgt die allgemeine Aktivierung der Ubiquitinylierung durch die Überexpression der Ubiquitin-E3-Ligase TRAF6 für eine Steigerung der *Decapping*-Aktivität (Abb.3.2). Zusätzlich führt die Expression der K63R-Variante von Ubiquitin zu einer Auflösung der *P-Body*-Assemblierung und damit einem „Einfrieren“ der dynamischen, zytoplasmatischen Interaktion von DCP1a mit EDC4, XRN1 und EDC3 (Abb.3.4).

Diese Ergebnisse können in ein Modell integriert werden, bei welchem durch die TRAF6-vermittelte K63-abhängige Ubiquitinylierung von DCP1a eine schnelle und vor allem reversible Möglichkeit der Regulation der *Decapping*-Aktivität, der *P-Body*-Assemblierung und der Interaktion von DCP1a mit anderen *P-Body*-Proteinen wie EDC4, XRN1 oder EDC3 erfolgt (Tenekeci et al, 2016). Dieser Mechanismus stellt nicht nur in der *P-body* Forschung eine neue Beobachtung dar, sondern zeigt auch eine bisher nicht bekannte Funktion von TRAF6 auf. Die relativ gut charakterisierte, durch TRAF6 katalysierte, K63-abhängige Ubiquitinylierung von anderen Faktoren, welche am proinflammatorischen *signaling* beteiligt sind, führen in Zytokin- und LPS-induzierten Signalwegen zur Aktivierung von NFκB und somit zur Genexpression (Tarantino et al, 2014). Die hier beschriebene duale Funktion von TRAF6 definiert diese E3-Ubiquitin-Ligase als einen Mediator, welcher gleichzeitig die Transkription aber auch den mRNA-Abbau reguliert, indem das *Decapping* durch die K63-abhängige Ubiquitinylierung von DCP1a und die Assemblierung von *P-Bodies* gefördert wird. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob DCP1a in Abhängigkeit von diesen posttranslationalen Modifikationen auch eine Funktion als nukleärer Kofaktor einnimmt und

so zusammen mit den übrigen Faktoren des IL-1-Signalwegs die Induktion der Genexpression steuert. Hinweise hierauf sind die (relative schwache) transaktivierende Domäne, die nukleäre Lokalisation und der dominant negative Effekt einer DCP1a Überexpression auf die NFκB p65 vermittelte Reportergenaktivität (Bai et al, 2002; Dickey et al, 2015; Rzeckowski et al, 2011). So ist es möglich, dass auf der Ebene von *Decapping*-Faktoren die vermeintlich getrennten biologischen Prozesse der mRNA-Expression und des mRNA-Abbaus unter der Beteiligung von TRAF6 und DCP1a aneinander gekoppelt werden und in Zusammenspiel regulativ auf die allgemeine Genexpression wirken (Rzeckowski et al, 2011; Tenekeci et al, 2016). In einem anderen zellulären System konnte ebenfalls eine Relevanz der Ubiquitylierung für die *P-Body*-Assemblierung gezeigt werden. Dabei führte ein siRNA-vermittelter *knockdown* und die Überexpression von USP4, einem Enzym zur Deubiquitylierung von Proteinen oder der *knockdown* der Ubiquitin-E3-Ligase Ro52 zur eingeschränkten *P-Body*-Assemblierung (Zheng et al, 2011). Zwei weitere Arbeiten beschreiben eine ubiquitinabhängige, proteasomale Degradation von DCP2 oder DCP1a und eine damit einhergehende Beeinflussung der *P-body* Formation und des *Decapping* Prozesses (Erickson et al, 2015; Singh et al, 2012). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass die Ubiquitylierung von *P-Body*-Faktoren in direkter Weise regulativ auf die Formation von *P-Bodies* wirken kann und die vorherrschende Menge der einzelnen Faktoren genau kontrolliert sein muss, um eine reguläre *P-Body*-Assemblierung zu gewährleisten.

### **4.3. Etablierung von Zellsystemen zur CRISPR/Cas9-abhängigen Depletion von *P-Body*-Faktoren**

Die Relevanz von IL-1-induzierten posttranslationalen Modifikationen eines *Decapping*-Faktors wie DCP1a, die Abhängigkeit der *P-Body*-Assemblierung von diesen PTMs und die Folgen für die Genexpression lenkten ein besonderes Interesse auf die Funktionen der *P-Bodies* und deren Komponenten beim proinflammatorischen *signaling*. Um diesen Aspekt funktionell weiter zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit CRISPR/Cas9-abhängige Depletionen der *P-Body*-Faktoren DCP1a, DCP2, EDC3, EDC4 oder XRN1 durchgeführt. Mit den etablierten zellulären Systemen sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Verluste der unterschiedlichen Proteine auf die proinflammatorischen Signalkaskaden haben können.

Die Etablierung der verschiedenen CRISPR/Cas9-Zellsysteme gelang mit unterschiedlichem Erfolg. Für die Depletion von DCP1a (Abb.3.6), EDC4 (Abb.3.10) und XRN1 (Abb.3.11; Abb.3.12) konnten stabile Zellsysteme etabliert werden, während dies für die Depletion von DCP2 (Abb.3.7; Abb.3.8) und EDC3 (Abb.3.9) nicht möglich war. In mehreren Versuchen konnten hier keine stabilen Zelllinien generiert werden, welche eine Verringerung der jeweiligen Proteinmenge zeigten. Dieser Ausgang der Experimente könnte unterschiedliche Ursachen haben. Eine biologische Erklärung könnte darin liegen, dass die Verringerung der Proteinmenge von DCP2 oder EDC3 letale Auswirkungen zur Folge haben können. Somit könnten Zellen, welche eine starke CRISPR/Cas9-vermittelte Reduzierung der jeweiligen Proteinmengen aufweisen, nicht mehr lebensfähig sein, wodurch eine Etablierung einer Zelllinie mit verringerter Proteinmenge nicht möglich ist. Diese Argumentation wird dadurch unterstützt, dass in einer anderen Studie in HEK293-Zellen nur ein partieller shRNA-vermittelter *knockdown* von DCP1a, DCP2 und EDC3 etabliert werden konnte (Brannan et al, 2012). In murinen, embryonalen Fibroblasten ist es dagegen möglich, durch Ruptur des *DCP2* Locus Zellen mit einem ca. 90%-igen *knockout* von DCP2 herzustellen, wobei dies keinen Effekt auf die globale *Decapping*-Aktivität hat. In der Maus und im humanen Zellsystem finden sich zudem eine ausgeprägte zelltyp- und gewebespezifische Varianz der Expression von DCP2. Daher wird in diesen Zellen der Verlust von DCP2 möglicherweise komplett durch andere Nudix Enzyme wie Nudt16 kompensiert (Li et al, 2012; Song et al, 2010). Eine weitere Erklärung für die fehlende CRISPR/Cas9-vermittelte Depletion von DCP2 und EDC3 könnte darin liegen, dass die verwendeten sgRNAs eine zu geringe Spezifität und Effektivität aufweisen. Wie aus der Literatur bekannt ist (Ran et al, 2013) und auch in den eigenen Experimenten beobachtet wurde, können verschiedene sgRNAs für dasselbe Zielgen eine variable Verringerung der Proteinmenge bewirken. So führte z.B. der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von DCP1a in HeLa-Zellen mit den verschiedenen sgRNAs (sg1, sg3 oder sg6) in jedem Ansatz zu einer unterschiedlich starken Reduktion der DCP1a-Proteinmenge (Abb.3.6), obwohl sich die genomischen Zielsequenzen aller sgRNAs in einem eng beschränkten Rahmen (90 Basenpaare) um den Translationsstart befinden. Diese Variabilität deutet darauf hin, dass die verschiedenen sgRNAs eine unterschiedlich starke Rekrutierung der Cas9-Nuklease an den genomischen Locus bewirken oder sich die durch NHEJ bewirkten, DNA-Reparatur-bedingten, genomischen Veränderungen variabel auswirken. Zusätzlich deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass sich die gesamten Zelllinien über einen langen Zeitraum in einer permanenten Entwicklung befinden. Da HeLa-Zellen polyploid sind und oft mehr als drei Kopien eines Gens besitzen (Landry et al, 2013),

könnte bei einer permanenten Expression der Cas9-Nuklease in den Zellen eine kontinuierliche Exzision der einzelnen Allele erreicht werden. So zeigt sich am Beispiel der Depletion von DCP1a eine stärkere Verringerung der Proteinmenge nach der langfristigen Etablierung der Zelllinie, wobei dies abhängig von den jeweils verwendeten sgRNAs und der stabilen Integration der Cas9-Kassette zu sein schien (Abb.3.6).

Des Weiteren führen vermutlich zufällige Ereignisse, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden konnten, dazu, dass sich CRISPR/Cas9-Zelllinien aus unterschiedlichen Transfektionen mit dem selben Kontrollvektor (px459) im Kontext einer proinflammatorischen Stimulation mit IL-1 variabel verhalten können (Abb.3.13). Um mögliche Fehlinterpretationen in späteren Versuchen beim Vergleich der unterschiedlichen CRISPR/Cas9-Zelllinien mit den Kontrollvektor-Zelllinien zu vermeiden, wurden die drei verfügbaren HeLa-px459-Kontrollvektor-Zelllinien mit parentalen HeLa-Zellen auf Ihre Reaktion nach einer IL-1-Stimulation verglichen. Aus diesen Experimenten wurde eine allgemeine px459-Kontrollvektor-Zelllinie abgeleitet (px459<sub>DCP1a</sub>) und in allen folgenden Experimenten verwendet (Abb.3.13). Dieses Auftreten von variablen Ergebnissen bei der Untersuchung der Reaktion der Zelllinien auf einen IL-1-Stimulus führte ebenfalls zur Entscheidung, die etablierten Zelllinien als *Zell-pools* zu nutzen und keine monoklonalen Zelllinien zu etablieren. Bei monoklonalen Zelllinien ist es nicht auszuschließen, dass Zellklone erhalten werden, welche ein artifizielles Verhalten des proinflammatorischen *signalings* aufweisen. Diese Problematik von monoklonalen Zelllinien ist ebenfalls aus der Literatur bekannt (Ran et al, 2013) und wurde im Rahmen dieser Arbeit speziell für das proinflammatorische *signaling* beachtet. Aus diesem Grund war es mit der Nutzung der *Zell-pools* möglich, diese negativen, zufälligen Ereignisse zu minimieren, um so mögliche Artefakte bei der Ergebnisinterpretation zu vermeiden. Gleichzeitig musste dadurch aber auf die Möglichkeit eine kompletten (100%-igen) CRISPR/Cas9-vermittelten *knockout* der jeweiligen Proteine verzichtet werden, da bei der Nutzung der *Zell-pools* dieser Zustand nicht erreicht werden kann. So konnten sowohl im Proteinnachweis mittels Western Blot (Abb.3.14), als auch bei der Untersuchung der Zellen mittels Immunfluoreszenz (Abb.3.15) entsprechende Restsignale für die einzelnen Proteine detektiert werden.

#### 4.4. Die Assemblierung von *P-Bodies* ist von DCP1a, XRN1 und EDC4 abhängig

Bei der Untersuchung der Effekte der Depletion von DCP1a, XRN1 oder EDC4 auf die *P-Body*-Assemblierung mittels Immunfluoreszenz konnten gravierende Unterschiede festgestellt werden. Während der CRISPR/Cas9-vermittelte *knockdown* von EDC4 zu einer nahezu kompletten Auflösung der *P-Body*-Assemblierung führte (Abb.3.15), zeigte sich für den *knockdown* von DCP1a eine starke Zunahme der *P-Bodies* (Abb.3.15). Der *knockdown* von XRN1 führte zu einer Etablierung einer homogenen Verteilung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle und zu einer sichtbaren Zunahme der Größe der *P-Bodies*, was durch eine stärkere Fluoreszenzintensität der einzelnen *P-Bodies* deutlich wurde (Abb.3.15).

Diese Beobachtungen bestätigen die überwiegend in Hefen oder in Drosophilazellen und zu einem geringen Anteil auch in humanen Zellen erhobenen, bereits publizierten Forschungsergebnisse (Eulalio et al, 2007). So führte die Depletion von DCP1a und XRN1 in Hefen zu einer starken Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen der Zellen und/oder der *P-Body*-Größe (Coller & Parker, 2004; Cougot et al, 2004; Sheth & Parker, 2003). Im Gegensatz dazu konnte, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, für die Depletion von EDC4 die Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung gezeigt werden (Seto et al, 2015; Yu et al, 2005). Darüber hinaus resultierte die Depletion oder Überexpression einer Vielzahl von weiteren *P-Body*-Proteinen in Hefen oder im humanen Zellsystem in einer Deregulation der *P-Body*-Formation. So kann die Depletion von Sbp1, eIF4E-T (eIF4E transporter), GW182, RAP55 (*RNA-associated protein 55*), RCK/p54 und Faktoren des CCR-CAF1-NOT- oder Lsm1-7-Komplexes oder die Überexpression von EDC3, DCP2 und RCK/p54 zu einer Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung führen. Dagegen kann eine Erhöhung der *P-Body*-Größe und/oder deren Anzahl durch eine Depletion von DCP2, UPF2 (*Regulator of nonsense transcripts 2*), UPF3 (*Regulator of nonsense transcripts 3*), Rpb4 und Faktoren des Lsm1-7-Komplexes oder durch eine Überexpression von Sbp1 (*Single-stranded nucleic acid-binding protein 1*), Pat1, SMG7 und RCK/p54 erreicht werden. Zusätzlich kann die Depletion von Pat1 zu einer verringerten *P-Body*-Größe führen (Eulalio et al, 2007). Diese Befunde zum basalen Status und der stimulusunabhängigen Deregulation der *P-Body*-Formation durch Proteinfaktoren sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die beobachteten Abhängigkeiten der Assemblierung von sichtbaren *P-Bodies* von den einzelnen Proteinkomponenten könnten dabei evolutionär konserviert sein, da die Effekte speziesübergreifend vergleichbar ausfallen können. Die zugrunde liegenden Prinzipien und deren Mechanismen sind jedoch weitestgehend unverstanden (Jain & Parker, 2013).

**Tab.4.1: Veränderungen der *P-Body*-Assemblierung durch Depletion oder Überexpression von *P-Body*-Proteinen.** Gezeigt ist eine Zusammenstellung von Ergebnissen, bei denen eine Veränderung der *P-Body*-Formation nach einer Depletion oder Überexpression von *P-Body* lokalisierenden Proteinen in Hefen oder im humanen Zellsystem beobachtet wurde. Dabei wurden der Verlust der *P-Body*-Assemblierung (Verlust) und positive ( $\uparrow$ ) bzw. negative ( $\downarrow$ ) Veränderungen der *P-Body*-Größe ( $\emptyset$ ) und *P-Body*-Anzahl (n) beobachtet. Die Zusammenstellung erfolgte verändert nach Eulalio et al, 2007, wobei Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit (grau hinterlegt) hinzugefügt wurden.

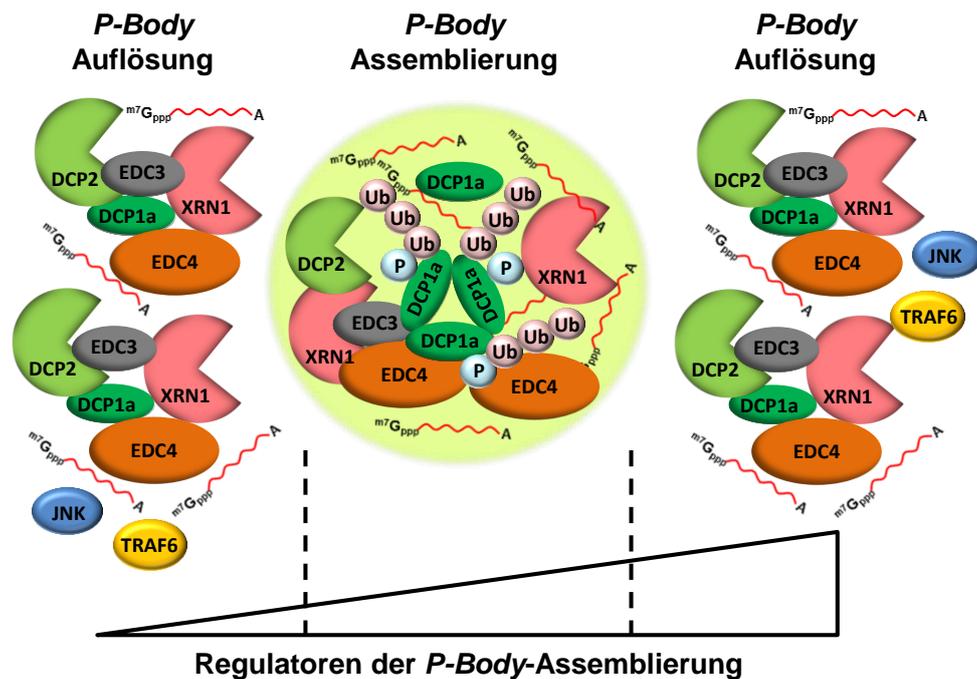
Faktor	Spezies	Depletion	Überexpression	Literaturverweis
<b>CCR-CAF1-NOT</b>	Human, Hefen	Verlust		(Andrei et al, 2005; Sheth & Parker, 2003)
<b>DCP1a</b>	Hefen	$\emptyset=\uparrow$ ; n= $\uparrow$		(Coller & Parker, 2005; Sheth & Parker, 2003)
	Human	n= $\uparrow$	$\emptyset=\downarrow$ ; n= $\uparrow$	vorliegende Arbeit; (Rzeczkowski et al, 2011)
<b>DCP2</b>	Human	$\emptyset=\uparrow$ ; n= $\uparrow$	Verlust	(Andrei et al, 2005; Fenger-Gron et al, 2005)
<b>EDC3</b>	Human		Verlust	(Fenger-Gron et al, 2005)
<b>EDC4</b>	Human	Verlust	$\emptyset=\uparrow$ ; n= $\uparrow$	(Fenger-Gron et al, 2005; Seto et al, 2015; Yu et al, 2005)
	Human	Verlust	Verlust	vorliegende Arbeit
<b>eIF4E-T</b>	Human	Verlust		(Andrei et al, 2005; Ferraiuolo et al, 2005)
<b>GW182</b>	Human	Verlust		(Behm-Ansmant et al, 2006; Jakymiw et al, 2005; Liu et al, 2005a; Yang et al, 2004)
<b>Lsm1-7</b>	Human	Verlust		(Andrei et al, 2005; Chu & Rana, 2006; Sheth & Parker, 2003)
	Hefen	n= $\uparrow$		
<b>Pab1</b>	Hefen	$\emptyset=\uparrow$		(Bregues & Parker, 2007)
<b>Pat1</b>	Hefen	$\emptyset=\downarrow$	$\emptyset=\uparrow$ ; n= $\uparrow$	(Coller & Parker, 2005; Sheth & Parker, 2003)
<b>RAP55</b>	Human	Verlust		(Yang et al, 2006)
<b>RCK/p54</b>	Human, Hefen	Verlust		(Andrei et al, 2005; Chu & Rana, 2006; Eulalio et al, 2007; Fenger-Gron et al, 2005)
	Hefen		Verlust	
	Human		$\emptyset=\uparrow$ ; n= $\uparrow$	
<b>Rpb4</b>	Hefen	$\emptyset=\uparrow$ ; n= $\uparrow$		(Lotan et al, 2005)
<b>Sbp1</b>	Hefen	Verlust	$\emptyset=\uparrow$ ; n= $\uparrow$	(Segal et al, 2006)
<b>SMG7</b>	Human		$\emptyset=\uparrow$	(Unterholzner & Izaurralde, 2004)
<b>UPF2</b>	Hefen	$\emptyset=\uparrow$		(Sheth & Parker, 2006)
<b>UPF3</b>	Hefen	$\emptyset=\uparrow$		(Sheth & Parker, 2006)
<b>XRN1</b>	Hefen	$\emptyset=\uparrow$ ; n= $\uparrow$		(Cougot et al, 2004; Sheth & Parker, 2003)
	Human	$\emptyset=\uparrow$		vorliegende Arbeit

Insbesondere ist unklar, inwieweit diese Ergebnisse (patho)physiologische Situationen abbilden, in denen angeborene oder erworbene Störungen in der korrekten Menge von *P-Body* Proteinen vorliegen könnten.

Die hier erhobenen eigenen Daten in stabilen HeLa-Zellkulturen und die publizierten Forschungsergebnisse verdeutlichen, dass die genaue Konstitution der Proteinkomponenten

von *P-Bodies* streng geregelt sein muss. Infolgedessen führt offenbar jeglicher Eingriff in die Proteinmengen der einzelnen Komponenten durch Depletion oder Überexpression zu einer Veränderung der *P-Body*-Assemblierung. Aus diesem Grund kann die korrekte Formation der *P-Bodies* wahrscheinlich nur dadurch gewährleistet werden, dass eine enge Kontrolle der Proteinmengen der einzelnen Komponenten stattfindet. Die molekularen Sensoren dieser Mengenänderungen von *P-Body* Faktoren und deren Koppelung an die signal- und PTM-abhängigen Mechanismen der *P-Body* Assemblierung oder auch der Dissemblierung sind nicht bekannt. Sehr interessant ist allerdings, dass eine Reihe an Domänen in DCP2, DCP1a, EDC4 und XRN1 durch Mutationsanalysen und umfangreiche, hochauflösende Strukturanalysen bestimmt werden konnten, die für „*higher order assemblies*“ und die Funktionalität von *Decapping*-Faktoren essentiell sind (Chang et al, 2014; Jonas & Izaurralde, 2013; Valkov et al, 2017). Dabei zeigt sich eine mögliche, evolutionäre Entwicklung dieser Regulation durch eine Zunahme der Komplexität der Proteinstrukturen und der zugrunde liegenden Mechanismen. So findet sich in Hefen im Vergleich zu höher entwickelten Eukaryoten eine deutlich verkürzte Form von DCP1a mit einem weniger komplexen C-Terminus (Abb.1.4), welcher regulative Funktion ausüben kann. Daneben existiert das *scaffold* Protein EDC4 in Hefen nicht (Beelman et al, 1996; Chang et al, 2014; Fenger-Gron et al, 2005).

Hinzu kommt, dass eine Reihe von experimentellen Beobachtungen zeigen, dass die *P-Body*-Assemblierung durch Störungen im mRNA-Metabolismus gefördert oder gehemmt werden kann. Daher besteht ein Konsens in der Literatur, dass *P-Bodies* immer auch einen „Kern“ aus mRNA enthalten (Eulalio et al, 2007). Neueste *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass ansteigende Mengen von längeren mRNA Fragmenten zusammen mit rekombinanten DCP1a-, DCP2- und EDC3-Proteinen die Ausbildung von schwer löslichen mRNP-Aggregaten hervorrufen. Dieses Phänomen ist spezifisch und nicht durch eine Form von „*molecular crowding*“ bedingt, da andere Proteine wie BSA diesen Effekt nicht hervorrufen können (Schutz et al, 2017). Möglicherweise ist der Übertritt von hochmolekularen Strukturen aus RNA und Proteinen in eine unlösliche Phase daher auch ein generelles Prinzip der Bildung von „*cellular bodies*“ in intakten Zellen (Banani et al, 2016).



**Abb.4.1:** Die Assemblierung von *P-Bodies* erfolgt durch unterschiedliche Regulatoren. Zu diesen regulativen Mechanismen und Faktoren gehören die Trimerisierung von DCP1a, die posttranslationalen Modifikationen von DCP1a durch JNK- bzw. TRAF6-abhängige Phosphorylierung (P) bzw. Ubiquitynylierung (Ub), die aktuelle, zelluläre mRNA-Menge sowie die Proteinmenge von verschiedenen *P-Body*-lokalisierenden Faktoren, welche hier exemplarisch durch DCP1a, DCP2, EDC3, EDC4 und XRN1 verdeutlicht sind. In Abhängigkeit der genauen Verhältnisse der Faktoren erfolgt die Assemblierung der *P-Bodies*, während zu geringe oder auch zu hohe Mengen dieser die Auflösung von *P-Bodies* herbeiführen können.

Die Assemblierung von *P-Bodies* könnte dabei damit beginnen, dass die vorliegende, zytoplasmatische RNA durch Proteine gebunden wird und sich einzelne mRNPs bilden, welche sich dann zu größeren Strukturen organisieren (Decker & Parker, 2012). Die funktionellen Konsequenzen der Assemblierung von *P-Bodies* für den zellulären RNA-Metabolismus sind dabei weitestgehend unerforscht. So könnte die Möglichkeit bestehen, dass die Veränderungen der mRNP-Größe von einzelnen Protein-RNA-Komplexen bis hin zu den mikroskopisch sichtbaren, komplexen *P-Bodies*, neben der molekularen Remodellierung auch eine Veränderung der Funktion der mRNPs induziert (Parker & Sheth, 2007). Dies wird ferner dadurch unterstützt, dass membranlose Kompartimente wie *P-Bodies* Eigenschaften von Flüssigkeiten aufweisen und aus diesem Grund auch mit anderen intrazellulären Partikeln wie z.B. Stress Granula fusionieren können. Aufgrund dieser Eigenschaften konnte in einem zellfreien System gezeigt werden, dass die oben beschriebenen „*in vitro processing bodies*“ aus DCP1a, DCP2, EDC3 und mRNA nicht nur spontan aggregieren, sondern durch diese

artifiziellen mRNPs ein Schutz der RNA vor Degradation besteht und die Decapping-Aktivität von DCP2 erniedrigt ist (Fromm et al, 2014; Schutz et al, 2017). Aus den bis hierher erhobenen und diskutierten Befunden ergibt sich ein Modell der Protein- und mRNA-abhängigen Ausbildung von mRNPs und der Assemblierung von *P-Bodies* (Abb.4.1).

Im Rahmen dieses Modelles konnte in den eigenen Experimenten zur Rekonstitution von DCP1a und EDC4 in den entsprechenden CRISPR/Cas9-*knockdown* Zellen ein weiterer besonderer Einfluss von EDC4 auf die *P-Body*-Assemblierung beobachtet werden. Während die Rekonstitution von DCP1a *knockdown* Zellen keine zusätzliche Veränderung der *P-Body*-Assemblierung bewirken konnte (Abb.3.17), war es durch die Rekonstitution von EDC4 möglich, die Formation von *P-Bodies* in den EDC4-CRISPR/Cas9-Zellen wieder herbeizuführen, welche wie beschrieben im basalen Zustand keinerlei *P-Bodies* aufweisen (Abb.3.19). Zusätzlich dazu zeigte sich bei einer starken Expression von exogenem EDC4 in diesen Zellen eine Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung (Abb.3.19). Dieses Ergebnis zeigt, dass es in der Zelle eine fest definierte EDC4-Konzentration geben muss, wobei ober- und unterhalb dieser keine korrekte *P-Body*-Assemblierung möglich ist, wodurch die Hypothese unterstützt wird, dass allein die Proteinmenge die Assemblierung von *P-Bodies* fördern oder negativ regulieren kann. Diese Beobachtung kontrastiert mit den wenigen Befunden zu EDC4 aus humanen Zellsystemen, in denen für die Überexpression von EDC4 z.B. in HeLa-Zellen gezeigt wurde, dass eine Zunahme der *P-Body*-Größe sowie deren Anzahl erfolgen kann (Fenger-Gron et al, 2005). Hingegen bestätigt diese Beobachtung die typische Funktion eines zellulären „*scaffold*“ Proteins, welches über mehrere unterschiedliche Bindungsdomänen Multiproteinkomplexe mit verschiedenen Partner- oder *client*-Proteinen ausbilden kann. Übersteigt die Konzentration des *scaffolds* allerdings die seiner *client*-Proteine, kommt es zur Sequestrierung dieses höhermolekularen Komplexes (Burack & Shaw, 2000). Aus diesem Grund könnte die enge Kontrolle der Proteinmenge von EDC4 einen zellulären Mechanismus darstellen, welcher die Regulation der *P-Body*-Assemblierung im Sinne des beschriebenen Modells erlaubt (Abb.4.1).

Zusätzlich dazu führte die Überexpression von DCP1a in EDC4 *knockdown* Zellen (sgpool-EDC4) zur Rekonstitution von remodelierten, *P-Body*-ähnlichen Strukturen. Diese zeichneten sich dadurch aus, dass sie DCP1a und EDC3, jedoch nicht XRN1 enthielten (Abb.3.20). Dies deutet darauf hin, dass EDC4 für die korrekte Rekrutierung von XRN1 und möglicherweise auch von anderen Proteinen in die *P-Bodies* nötig ist. Die Funktionalität von diesen *P-Body*-artigen Strukturen, welche sich auch noch in der Abwesenheit von EDC4

ausbilden können, und ihre Relevanz für die *Decapping*-Aktivität wurden in dieser Arbeit durch einen *Decapping*-Assay untersucht. Dabei zeigte sich in den EDC4 *knockdown* Zellen nahezu keine *in vitro* *Decapping*-Aktivität eines mittels GFP-DCP1a kopräzipitierten *Decapping*-Komplexes, während solche aus DCP1a oder XRN1 *knockdown* Zellen eine normale *in vitro* *Decapping*-Aktivität aufwiesen (Abb.3.24). Keiner dieser Befunde erlaubt jedoch eine klare Zuordnung der veränderten *Decapping*-Aktivität zu den (remodellierten) *P-Body*-Strukturen, da es bis heute nicht möglich ist, zelluläre *P-Bodies* in hoher Reinheit zu isolieren und ihre putative, enzymatische Aktivität zu bestimmen. Diese Befunde unterstreichen jedoch die Bedeutung des EDC4-Proteins und suggerieren, dass dieser nur in höher entwickelten Zellen zu findende Faktor deutlich mehr ist als ein *enhancer of decapping*, da seine Anwesenheit für die *Decapping*-Aktivität erforderlich ist, wie es bereits auch im Überexpressionssystem in HEK293-Zellen gezeigt wurde (Fenger-Gron et al, 2005). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen daher eindrücklich die Bedeutung und Notwendigkeit der Untersuchung von *P-Bodies* sowie deren Komponenten und Funktionen auf einem endogenen Proteinniveau. Da eine alleinige Überexpression von DCP1a die Assemblierung von inkompletten *P-Body*-artigen Strukturen induzieren kann, ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl von verschiedenen Prozessen durch die Überexpression von DCP1a oder anderen *P-Body*-Faktoren beeinflusst sein könnten. Obwohl GFP-DCP1a in endogene *P-Body*-Strukturen integriert wird und daher häufig im Überexpressionssystem zur Visualisierung von *P-Bodies* eingesetzt wurde, führt das GFP-DCP1a-Protein auch zur Hemmung der NFκB p65-abhängigen Genexpression, welches möglicherweise einen dominant negativen Überexpressionseffekt darstellt (Rzeczkowski et al, 2011; Sheth & Parker, 2003; Tritschler et al, 2009). Umso wichtiger sind die in dieser Arbeit etablierten *loss of function* Zelllinien für die funktionelle Analyse von *Decapping*-Faktoren.

#### **4.5. Abhängigkeit der Protein:Protein-Interaktion von DCP1a, EDC4 und XRN1 von der Proteinmenge der einzelnen Faktoren**

Die Hypothese, dass die Proteinmenge von *P-Body*-Faktoren eine kritische Determinante der Assemblierung dieser sein könnten, wurde neben der Analyse der Formation von mikroskopisch sichtbaren *P-Bodies* in dieser Arbeit ebenfalls auf der Ebene von endogenen Protein-Komplexen aus DCP1a, EDC4 und XRN1 untersucht. Dazu wurden in den jeweiligen CRISPR/Cas9 *knockdown* Zellen die Protein:Protein-Interaktionen der drei Proteine untereinander sowie die subzelluläre und relative Lokalisation dieser zu *P-Bodies* mittels

Immuno-*proximity ligation assay* (Immuno-PLA) untersucht. Dabei konnte aus technischer Sicht die robuste Detektion der einzelnen Protein:Protein-Interaktionen durch diese noch relativ wenig verwendete Methode verifiziert werden. So führte die Depletion der einzelnen Proteine in allen Fällen erwartungsgemäß auch zu einer Reduktion der spezifischen PLA-Signale bei der Verwendung der jeweiligen Proteine als einen der Interaktionspartner für das Experiment (Abb.3.21). Zusätzlich konnten statistisch signifikante Veränderungen der Interaktionen zwischen DCP1a, EDC4 oder XRN1 mit variablem Ausmaß durch die Depletion eines der drei Proteine beobachtet werden (Abb.3.21). Interessant ist zum Beispiel, dass eine Abnahme der gesamten, zellulären Protein:Protein-Interaktionen von XRN1 und EDC4 im DCP1a *knockdown* beobachtet wurde (Abb.3.21), obwohl im DCP1a *knockdown* mehr *P-Body* Strukturen auftreten. Dieses zeigt, dass eine Verringerung von DCP1a das *shuttling* von XRN1 und EDC4 aus den *P-Bodies* in das Zytoplasma inhibieren könnte oder die Migration von mRNAs vermindert ist, welche für die Ausbildung von XRN1- und EDC4-Komplexen wichtig sind. Das Fehlen von EDC4 dagegen hat keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl der XRN1- und DCP1-Komplexe, obwohl unter dieser Bedingung keine *P-Bodies* mehr vorhanden sind (Abb.3.21). Die PLA-Ergebnisse verdeutlichen daher erneut die Abhängigkeit der (dynamischen) Interaktion der verschiedenen *P-Body*-Proteine von der Proteinmenge aller beteiligten Faktoren, wie dies bereits bei der Assemblierung der *P-Bodies* beobachtet werden konnte. Gleichzeitig lassen diese Beobachtungen vermuten, dass neben den mikroskopisch sichtbaren *P-Bodies* ebenfalls submikroskopische Strukturen gebildet werden können, welche eine deutlich geringere Größe besitzen, jedoch ähnliche Funktionen wie *P-Bodies* aufweisen könnten. Somit ist davon auszugehen, dass die Proteinkomplexe der *P-Body*-Proteine ein Kontinuum unterschiedlicher Größe aufweisen und möglicherweise die mikroskopisch sichtbaren *P-Bodies* im Vergleich zu den Strukturen außerhalb dieser die maximale Größe und vielleicht auch die inaktivste oder am wenigsten dynamischste Form dieser darstellen.

Die relative Lokalisation der einzelnen, mittels PLA detektierten Protein:Protein-Interaktionen zu *P-Bodies* zeigte variable Veränderungen. Während beispielsweise die PLA-Signale für die Interaktion von DCP1a und EDC4 mit einer vergleichsweise hohen Rate eine Kolokalisation mit *P-Bodies* aufwiesen, wurde für PLA-Signale für die Interaktion von XRN1 und DCP1a eine geringere Kolokalisation mit *P-Bodies* beobachtet. Allerdings zeigte sich bei allen untersuchten Protein:Protein-Interaktionen, dass nur wenige Zellen eine Überlagerung der PLA-Signale mit allen *P-Bodies* aufweisen (Abb.3.21). Dieser Umstand ist

möglicherweise darauf zurückzuführen, dass durch die Fixierung und die darauf folgende Analyse der Protein:Protein-Interaktionen eine Momentaufnahme der zellulären Prozesse entsteht. Die beschriebene hohe Dynamik der *P-Body*-Assemblierung und die transiente Lokalisierung von unterschiedlichen *P-Body*-Proteinen in diesen (Andrei et al, 2005) könnten den Zustand der teilweisen Überlagerung der PLA-Signale mit den *P-Bodies* weiter begünstigen. Aus diesem Grund könnte es sich bei den detektierten *merges* um transiente, zelluläre Ereignisse handeln, welche die zelluläre Bewegung der einzelnen Faktoren widerspiegelt. Eine weitere Erklärung für diese geringe Rate der Kolo-kalisation könnte in der räumlichen Organisation von *P-Bodies* liegen. Dazu konnte in publizierten Forschungsergebnissen gezeigt werden, dass *P-Bodies* eine duale Organisation aufweisen können, wobei bestimmte Proteine in peripheren oder in zentralen Regionen von *P-Bodies* lokalisiert sein können (Cougot et al, 2012). Unter den Annahmen, dass *P-Bodies* eine Größe von 100-300 nm (Eulalio et al, 2007) aufweisen und die maximale Distanz zur Entstehung eines PLA-Signals zwischen zwei Proteinen 30 nm nicht übersteigen darf (Soderberg et al, 2006), könnte es je nach Konstitution und Organisation eines einzelnen *P-Bodies* möglich sein, dass die zwei mittels PLA untersuchten Proteine an den äußeren Grenzen der *P-Bodies* lokalisieren und somit eine Ausbildung des PLA-Signals aufgrund der zu hohen Entfernung nicht möglich ist. Somit zeigen die vorliegenden Ergebnisse aus den PLA-Experimenten ebenfalls diese duale und räumlich gerichtete Organisation der einzelnen Faktoren von *P-Bodies*.

Insgesamt lassen sich diese Ergebnisse aus den PLA-Experimenten in das beschriebene Modell der *P-Body*-Assemblierung (Abb.4.1) implementieren. Die hohe Anzahl der PLA-Signale außerhalb der *P-Bodies* deutet darauf hin, dass ein großer Teil der Protein:Protein-Interaktionen von *P-Body*-Proteinen ubiquitär im Zytoplasma stattfindet, wobei die Funktionalität dieser nicht geklärt ist. Die Proteine können dabei zwischen den *P-Bodies* und dem Zytoplasma *shuttlen*, was möglicherweise durch die transiente Kolo-kalisation von PLA-Signalen und *P-Bodies* abgebildet wurde. Die Validierung dieser Dynamik könnte mittels *live cell imaging* erfolgen, wobei dies aufgrund der oben beschriebenen Effekte bei einer Überexpression von GFP- oder anderen Fusionsproteinen problematisch sein könnte. Interessant wäre es auch, die PLA-Untersuchungen durch eine gleichzeitige Detektion von spezifischen mRNAs zu erweitern und diese mittels hochauflösender Mikroskopie zu analysieren, um die genaue Lokalisation von Proteinen und mRNA in einem *P-Body* und den Proteinkomplexen zu untersuchen, wie es bereits für die allgemeine Untersuchung von

*P-Bodies* mittels SOFI (*Super-resolution optical fluctuations imaging*) durchgeführt werden konnte (Gallina et al, 2013). In einem Modell, bei welchem die Ausbildung der *P-Bodies* von der Proteinmenge der einzelnen Faktoren abhängig ist, könnte die vermehrte Ausbildung von zytoplasmatischen Proteinkomplexen außerhalb der *P-Bodies* eine indirekte Möglichkeit der negativen Regulation dieser RNA-Granula darstellen. Dies steht im Einklang mit einem Befund aus dieser Arbeit, bei welchem die Expression von K63-Ubiquitin die PLA-Signale im Zytoplasma erhöht, jedoch die Anzahl an *P-Bodies* supprimiert (Abb.3.4; (Tenekeci et al, 2016)).

#### **4.6. Relevanz von *P-Bodies* und *P-Body*-Faktoren für das IL-1-abhängige proinflammatorische *signaling***

Der Einfluss der DCP1a-, EDC4- oder XRN1-regulierten *P-Body*-Assemblierung auf den IL-1-abhängigen, proinflammatorischen Signalweg stand im weiteren Verlauf dieser Arbeit im Fokus der Forschungsinhalte. Dabei konnten nach der Depletion von DCP1a, EDC4 oder XRN1 auf Protein- und mRNA-Ebene unterschiedliche Auswirkungen auf das proinflammatorische *signaling* beobachtet werden.

In den EDC4 *knockdown* Zellen (sgpool-EDC4) zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung von DCP1a, während die zuständige Kinase JNK in ihrer Menge und Aktivierung unverändert vorlag (Abb.3.14). Alle anderen untersuchten Ereignisse der IL-1-Signalkaskade zeigten nahezu keine Veränderungen. Damit ist die Phosphorylierung von DCP1a durch JNK von der Anwesenheit von EDC4 abhängig. Dabei könnte EDC4 durch seine Funktion als Plattform die Rekrutierung von JNK bewirken, obwohl keine direkte Interaktion zwischen EDC4 und JNK detektiert werden kann (Rzeczkowski et al, 2011). Zusätzlich könnte EDC4 zu einer Stabilisierung des konstitutiv vorliegenden Komplexes aus DCP1a und JNK beitragen und so die Phosphorylierung von DCP1a ermöglichen. Da auch die Anwesenheit von TRAF6 die Phosphorylierung von DCP1a erhöht (Tenekeci et al, 2016), könnte die Bindung von JNK an DCP1a auch indirekt über Polyubiquitinketten stabilisiert werden, wobei die Rolle von EDC4 für diesen Prozess geklärt werden muss. Zur Untersuchung dieser EDC4-abhängigen Stabilisierung der Interaktion zwischen DCP1a und JNK und deren phosphorylierten Formen könnten vergleichende PLA-Experimente in Kontroll- und EDC4 *knockdown*-Zellen durchgeführt werden, um die Interaktion von DCP1a

und JNK sowie die Rolle von EDC4 bei der IL-1-abhängigen Phosphorylierung von DCP1a weiter zu untersuchen.

Dabei ist zu betonen, dass die Phosphorylierung von DCP1a durch IL-1 transient erfolgt, während diese durch Sorbitol oder Anisomycin, welche osmotischen bzw. translationalen Stress hervorrufen und ebenfalls Aktivatoren von JNK und p38 darstellen, stärker und langanhaltend induziert werden kann (Rzeczkowski et al, 2011). Die Auswirkungen der Phosphorylierung von DCP1a auf die *P-Body*-Assemblierung sind jedoch in diesen Fällen gegenläufig zu den Effekten, welche durch IL-1 hervorgerufen werden. Während die Zunahme der Phosphorylierung von DCP1a durch IL-1 mit einer Zunahme der *P-Body*-Formation korreliert, führt die starke Phosphorylierung von DCP1a durch Sorbitol oder Anisomycin direkt oder indirekt zu einer Aufhebung der *P-Body*-Strukturen. Somit ist davon auszugehen, dass unterschiedliche Mechanismen bei der Regulation der *P-Body*-Assemblierung beteiligt sind, wobei die Phosphorylierung von DCP1a in bestimmten Situationen, wie der IL-1-Stimulation, dabei eine Rolle spielen kann (Rzeczkowski et al, 2011).

Zusätzlich konnte in den eigenen Experimenten gezeigt werden, dass die Ausbildung von *P-Bodies* eine Voraussetzung für die Phosphorylierung von DCP1a darstellen könnte, wobei in einem System mit verringerter EDC4-Proteinmenge und somit einer gestörten *P-Body*-Assemblierung die Phosphorylierung von DCP1a stark reduziert ist. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass JNK ebenfalls in *P-Bodies* lokalisieren kann (Rzeczkowski et al, 2011) und möglicherweise die Phosphorylierung von DCP1a in den *P-Bodies* erfolgt. In EDC4 *knockdown* Zellen mit einer Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung könnte es folglich nach einer IL-1-Stimulation zu einer reduzierten Phosphorylierung von DCP1a kommen, sodass hier nicht die beschriebene Funktion von EDC4 als *scaffold* maßgeblich, sondern die Phosphorylierung vom *P-Body*-Status abhängig ist. Dies könnte dadurch experimentell untersucht werden, indem die EDC4 *knockdown* Zellen mit einem stärkeren Stimulus wie Sorbitol oder Anisomycin behandelt werden, welche neben der Phosphorylierung von DCP1a auch die Auflösung von *P-Bodies* bewirken (Rzeczkowski et al, 2011). Somit könnte geklärt werden, ob die Phosphorylierung tatsächlich von der Anwesenheit von EDC4 oder von einer vorherigen Formation von *P-Bodies* abhängig ist. Diese Ergebnisse verdeutlichen zusammenfassend, dass die Phosphorylierung von DCP1a ebenfalls in das vorgestellte Modell der *P-Body*-Assemblierung integriert werden könnte (Abb.4.1). Demnach könnte eine

„optimale“ Menge an phosphoryliertem DCP1a die Assemblierung der *P-Bodies* regulieren, eine zu starke Phosphorylierung dagegen wieder die Aufhebung der *P-Bodies* bewirken.

Parallel dazu konnte für den *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a) eine weitreichendere Störung der IL-1-Signalkaskade auf Proteinebene beobachtet werden. So zeigten sich eine verminderte, IL-1-induzierte Phosphorylierung von JNK, p38, HSP27, NFκB p65 und IκBα sowie ein verminderter Abbau von IκBα (Abb.3.14). Diese Beobachtungen könnten auf einen indirekten Effekt hinweisen, welcher z.B. auf die Herstellung der Zelllinien mittels CRISPR/Cas9 zurückzuführen ist und eine globale Reduzierung der zellulären Antwort auf einen proinflammatorischen Stimulus zur Folge hat. Diese Erklärung ist jedoch unwahrscheinlich, da in den den übrigen Zelllinien (px459, sgpool-EDC4 und sg1-XRN1) im Vergleich mit den parentalen HeLa-Zellen keine weitreichenden Schwankungen der IL-1-Signalkaskade auf Proteinebene beobachtet werden konnten, obwohl diese ebenfalls dem gleichen Prozess zur Herstellung der CRISPR/Cas9-Zelllinien unterlagen. Somit ist von einer direkten Beteiligung von DCP1a bei der Signaltransduktion im IL-1 *signaling* auszugehen.

Die Veränderungen der IL-1-Signalkaskade auf Proteinebene wurden durch eine differentielle Regulation der Expressionen der mRNAs von *IL8*, *IL6*, *CXCL3* und *NFKBIA* begleitet, wobei hierbei stärkere Schwankungen beobachtet werden konnten. So konnte in den CRISPR/Cas9-Zelllinien eine selektive Erhöhung der basalen Menge dieser mRNAs detektiert werden. Dabei lagen die *IL8*- und *CXCL3*-mRNA in den DCP1a (sg3-DCP1a) und EDC4 (sgpool-EDC4) *knockdown* Zellen erhöht vor, während die Mengen der *IL6*- und *NFKBIA*-mRNA in den DCP1a, EDC4 und XRN1 (sg1-XRN1) *knockdown* Zellen erhöht waren (Abb.3.22). Nach der kurzfristigen Stimulation der Zellen für 1 h mit IL-1 konnte in allen Zelllinien eine reduzierte Induktion der mRNA-Expression der unterschiedlichen Gene in variablem Ausmaß beobachtet werden (Abb.3.22). Eine länger andauernde Stimulation der Zellen für 3 h mit IL-1 führte dazu, dass in den CRISPR/Cas9 *knockdown* Zellen die Suppression der mRNA-Expression nicht beobachtet werden konnte. Stattdessen wurde im Vergleich mit der Kontroll-Zelllinie eine anhaltendere Expression der mRNAs beobachtet (Abb.3.22).

Diese Beobachtungen der Relevanz von DCP1a für die allgemeine oder auch IL-1-induzierte Genexpression bestätigen frühere Ergebnisse aus HEK293IL-1R-Zellen. So konnte bei der Expression von phosphorylierungsdefizienten Varianten von DCP1a eine Verringerung der genomweiten Genexpression nach einer IL-1-Stimulation beobachtet werden. Speziell konnte dabei für die *IL-8*-mRNA eine komplette Aufhebung der Geninduktion und eine starke

Reduzierung der Induktion der *NFKBIA*-mRNA gezeigt werden. Diese Effekte könnten möglicherweise auf eine Funktion von DCP1a als positiven, transkriptionellen Regulator zurückgeführt werden, da zusätzlich eine nukleäre Lokalisation und eine Interaktion von DCP1a mit dem Transkriptionsfaktor NFκB p65 bestehen kann (Rzeczkowski et al, 2011). Diese Befunde werden weiterhin durch die beschriebene Funktion von DCP1a als transkriptioneller Koaktivator im TGF-β-Signalweg (Bai et al, 2002) und die Möglichkeit der Interaktion von DCP1a mit dem Transkriptionsfaktor PNRC2 (Cho et al, 2009) gestärkt. Es könnte darüber hinaus die Möglichkeit bestehen, dass DCP1a bei der Regulation der IL-1-induzierten Translokation von NFκB p65 in den Zellkern beteiligt ist. Diese Beobachtung konnte in den eigenen Experimenten gemacht werden, da in den DCP1a *knockdown* Zellen eine geringfügige Verringerung der Translokation von NFκB p65 gezeigt werden konnte. Auf Einzelzellebene führte diese verminderte Translokation von NFκB p65 zu einer im Verhältnis stärkeren Reduzierung der *IL8*-mRNA Expression (Abb.3.25). In Anbetracht dessen, dass eine Vielzahl von signalabhängigen, posttranslationalen Ereignissen durch die Depletion von DCP1a vermindert sind, welche jedoch in einer relativ regulären, nukleären Translokation von NFκB p65 in den Zellkern resultieren, kann der Schluss gezogen werden, dass entweder NFκB p65 oder zusätzliche transkriptionelle Kofaktoren in ihrer Funktion eingeschränkt sind oder DCP1a eine direkte Rolle bei der Regulation der Transkription spielt. Zusammen zeigen diese Daten, dass DCP1a eine neue Komponente im IL-1 Signalweg darstellt und damit neben seiner Beteiligung beim zytoplasmatischen RNA-Abbau auch als nukleäres, funktionelles Protein agieren kann.

Die vergleichbaren, überwiegend inhibitorischen Auswirkungen der Depletion von EDC4 und XRN1 auf die IL-1-induzierte Genexpression könnten darauf hinweisen, dass ein globaler Zusammenhang zwischen den *P-Body*-Faktoren und der Induktion der Genexpression bestehen kann. Aufgrund der vorliegenden Datenlage könnte im Fall des CRISPR/Cas9-abhängigen *knockdowns* von EDC4 die reduzierte Phosphorylierung von DCP1a einen indirekten Mechanismus darstellen, welcher, wie zuvor beschrieben, über den DCP1a Signalweg die verminderte Induktion der Genexpression zur Folge hat. Diese Interpretation wird dadurch unterstützt, dass in den EDC4 *knockdown* Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen oder auch parentalen HeLa-Zellen auf Einzelzellebene keine Abweichungen der Translokationsrate von NFκB p65 in den Zellkern (Abb.3.25) und der Aktivierung von NFκB p65 durch Phosphorylierung (Abb.3.14) beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zu DCP1a findet sich EDC4 in der Immunfluoreszenzanalyse auch nicht im Zellkern, was

ebenfalls gegen einen direkten Effekt auf NF $\kappa$ B p65-abhängige Transkription spricht. Im Falle der Depletion von XRN1 konnte eine geringfügige Verringerung der Translokationsrate von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern (Abb.3.25) mit unveränderter Aktivierung von NF $\kappa$ B p65 durch Phosphorylierung (Abb.3.14) beobachtet werden, wobei die Effekte auf die Translokation von NF $\kappa$ B p65 vergleichbar mit dem DCP1a *knockdown* sind. Die Gründe für diese verminderte Translokation von NF $\kappa$ B p65 konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter geklärt werden. Jedoch zeigen diese Ergebnisse, besonders im Hinblick auf die deutlichen Unterschiede der *P-Body*-Assemblierung im Vergleich zu den DCP1a oder EDC4 *knockdown* Zellen, dass in den XRN1 *knockdown* Zellen von einem komplexeren Mechanismus auszugehen ist, welcher eine inhibierte Genexpression im proinflammatorischen *signaling* bewirkt. Letztlich könnten auch alle drei *knockdowns* (DCP1a, EDC4 und XRN1) über eine indirekte Deregulation von Genprodukten, welche MAPK Kaskaden oder den IKK-I $\kappa$ B $\alpha$ -p65 Signalweg regulieren, das IL-1 *signaling* beeinflussen. Kandidaten dafür wären z.B. verschiedene IL-1-regulierte *negative feedback* Inhibitoren wie dualspezifische Phosphatasen oder TNFAIP3/A20 (Schmitz et al, 2011).

### **4.7. DCP1a, EDC4 und XRN1 weisen einen transkriptselektiven Einfluss auf die mRNA-Stabilität auf**

Diese Relevanz der *P-Body*-Proteine und möglicherweise auch der Formation von *P-Bodies* für die IL-1-induzierte Signalkaskade setzt sich auf der Ebene der Regulation der mRNA-Stabilität fort, sodass sich insgesamt eine duale Funktion dieser Faktoren, sowohl bei der Geninduktion, als auch beim mRNA-Abbau ergibt. So kann in den DCP1a, EDC4 oder XRN1 CRISPR/Cas9-Zellen die erhöhte Expression von *IL8*, *IL6*, *CXCL3* oder *NFKBIA* im basalen Zustand sowie deren verminderte Repression nach einer lang anhaltenden Stimulation der Zellen mit IL-1 (Abb.3.22) auf eine transkriptspezifische Erhöhung der mRNA-Stabilität zurückgeführt werden (Abb.3.23). Dabei zeigte sich abhängig vom jeweiligen Transkript und des jeweiligen depletierten Proteins eine Stabilisierung der mRNAs in einem variablen Ausmaß. Davon ausgenommen ist die *IL8*-mRNA, welche im basalen Zustand in den DCP1a und EDC4 *knockdown* Zellen eine Destabilisierung aufweist. Die stärksten Effekte der Stabilisierung wurden für die *NFKBIA*-mRNA in den XRN1 *knockdown* Zellen verzeichnet (Abb.3.23). Diese Beobachtung ist ungewöhnlich, da in einer Vielzahl von publizierten Experimenten mit einer Relevanz für das proinflammatorische *signaling* keine Stabilisierung der *NFKBIA*-mRNA beobachtet wurde. So konnte in HEK293IL-1-R-Zellen, welche eine

stabile Expression von GFP-DCP1a und dessen phosphorylierungsdefizienten Varianten aufweisen, nach einer IL-1-Stimulation keine Veränderung der *NFKBIA*-mRNA-Stabilität beobachtet werden (Rzeczkowski et al, 2011). Auch eine Manipulation des Ubiquitinsystems durch einen *knockdown* des endogenen Ubiquitins, die dominant negative Expression der Ubiquitin K63R-Variante oder die Depletion der Ubiquitin E3-Ligase TRAF6 führten nicht zu einer Veränderung der mRNA-Stabilität von *NFKBIA* (Tenekeci et al, 2016). Im Gegenteil dazu konnte bei Verwendung eines alternativen Stimulus durch einen Hitzeschock eine p38-abhängige Erhöhung der mRNA-Stabilität von *NFKBIA* beobachtet werden, was erhöhte zelluläre mRNA-Mengen zur Folge hatte (Dunsmore et al, 2006). Eine ähnliche Erhöhung der mRNA-Stabilität konnte ebenfalls für eine Behandlung von Zellen mit kurzzeitigem Licht (UV-Strahlung) beobachtet werden (Gowrishankar et al, 2006). Somit kann die Regulation der mRNA-Stabilität abhängig vom jeweiligen Stimulus und der Manipulation auf verschiedenen Ebenen differentiell erfolgen. Diese präzise Regulation der *NFKBIA*-Stabilität und damit deren Expression ist vor allem für das rasche Wiedererreichen der Proteinmenge von I $\kappa$ B $\alpha$  nach dessen IL-1-induziertem Abbau essentiell und spielt somit gleichzeitig eine wichtige Rolle bei der Termination des proinflammatorischen *signalings*, indem die erneute Ausbildung des zytosolischen, inhibitorischen Komplexes stattfindet und die Deaktivierung von NF $\kappa$ B p65 als Transkriptionsfaktor erfolgt (Brown et al, 1993; Sun et al, 1993).

Die ausgeprägten Effekte der Depletion der unterschiedlichen Proteine auf die mRNA-Stabilität deuteten auf einen globalen Einfluss von DCP1a, EDC4 oder XRN1 auf den mRNA-Abbau hin. Obwohl jede der etablierten Zelllinien nach der Depletion des entsprechenden Proteins eine unterschiedliche Regulation der *P-Body*-Assemblierung aufweist, führt der *knockdown* jedoch bei nahezu jeder Bedingung unabhängig von der IL-1-Stimulation zu einer Stabilisierung der untersuchten mRNAs. Diese Entkoppelung der Formation von *P-Bodies* vom RNA-Abbau stellt einen zentralen Befund dieser Arbeit dar und zeigt, dass die Effekte der mRNA-Stabilisierung primär auf Funktionen der jeweiligen Proteine außerhalb der *P-Bodies* zurückgeführt werden können. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine Funktion von *P-Bodies* als Orte des mRNA-Abbaus in einer Säugerzelle und suggerieren vielmehr eine Beteiligung der *P-Bodies* bei der Speicherung von mRNAs und Proteinen. Diese Beobachtungen werden ferner dadurch unterstützt, dass nach dem *knockdown* von DCP1a oder XRN1 eine vergleichbare *Decapping*-Aktivität eines in Abhängigkeit von GFP-DCP1a präzipitierten Proteinkomplexes beobachtet wurde, obwohl

sich die *P-Body*-Anzahlen in den DCP1a *knockdown* Zellen erhöhen. Nach der Depletion von EDC4 sind dagegen weder *Decapping*-Aktivität, noch *P-Bodies* detektierbar, sodass hier nicht zwischen Ursache und Konsequenz unterschieden werden kann (Abb.3.15; Abb.3.24). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Abbau der mRNAs unabhängig von der *P-Body*-Assemblierung und möglicherweise sogar dem *Decapping* beeinflusst werden kann. Im Rahmen dessen zeigte eine kürzlich veröffentlichte Forschungsarbeit in Hefen, dass die Assemblierung von *P-Bodies* nach einem osmotischen Stress zunimmt und dadurch Faktoren des *Decappings* und der Deadenylierung sequestriert werden und somit nicht mehr im Zytoplasma zur Verfügung stehen. Infolgedessen kommt es zur Verringerung des zytoplasmatischen mRNA-Abbaus. In einem zellulären System, bei welchem dagegen die *P-Body*-Assemblierung inhibiert ist, erfolgt in Konsequenz die Erhöhung der zytoplasmatischen Proteinmengen der Faktoren des mRNA-Abbaus, wodurch die Abbaurate erhöht wird und die Stabilität von mRNAs reduziert ist (Huch & Nissan, 2017). Der letztere Befund ist allerdings nicht mit dem hier beschriebenen Phänotyp des humanen EDC4 *knockdowns* kompatibel, der einerseits durch diesen die *P-Body*-Assemblierung verhindert und andererseits eine Stabilisierung der vier untersuchten mRNAs bewirkt. Zusätzlich wurde für *P-Body*-Strukturen, welche sich *in vitro* ausbilden können, gezeigt, dass die *Decapping*-Aktivität innerhalb dieser *P-Body*-Strukturen vermindert ist, wodurch eine Funktion von *P-Bodies* als „passive“, transiente Speicherorte für mRNAs in den Fokus aktueller Studien rücken (Schutz et al, 2017).

Die Untersuchungen der Stabilitäten der vier ausgewählten mRNAs deuten ferner darauf hin, dass global weitaus mehr Transkripte in einer ähnlichen Art von dieser Stabilisierung betroffen sein könnten. Um diese globalen Auswirkungen der Depletion von DCP1a, EDC4 oder XRN1 weiter zu untersuchen, könnten Microarray- oder RNA-Sequenzierungsexperimente durchgeführt werden. Dazu könnten die jeweiligen Zellen einer IL-1-Stimulation mit anschließender Actinomycin D-Kinetik unterzogen werden, um anschließend eine genomweite Auswertung der mRNA-Menge zu jeder Versuchskondition zu erhalten und mRNA-Stabilitäten für jedes Transkript zu ermitteln. Daraus könnte eine zentrale Datensammlung der Transkripte entstehen, welche in Abhängigkeit von DCP1a, EDC4 oder XNR1 abgebaut werden. Solche Messungen könnten mit Analysen zur Identifikation von regulatorischen und deterministischen *cis*-Elementen mittels bioinformatischen Auswertungen oder die Techniken des PAR-CLIP (*Photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation*) bzw. iCLIP (*Individual-nucleotide resolution UV crosslinking and*

*immunoprecipitation*) kombiniert werden (Hafner et al, 2010; Spitzer et al, 2014). Dadurch ließe sich herausfinden, ob bestimmte Bindestellen für RNA-bindende Proteine in DCP1, EDC4 oder XRN1-abhängig regulierten mRNAs angereichert sind. Basierend auf den hier beschriebenen mRNA Untersuchungen könnten so die zellulären Prozesse und Mechanismen, an welchen *P-Body*-Proteine beteiligt sind, gezielt weiter im Detail untersucht werden, um so die allgemeine Funktion von P-Bodies im RNA-Metabolismus besser zu verstehen.

### **4.8. *P-Bodies* ermöglichen die transkriptspezifische Speicherung von mRNAs**

Die eindeutige Entkopplung der *P-Body*-Assemblierung und des mRNA-Abbaus, welche in den vorliegenden Experimenten beobachtet wurde, führte zu der Fragestellung, wie sich die relative Lokalisation der stabilisierten, endogenen mRNAs zu *P-Bodies* verhält. Hierbei ist auch wichtig, dass in der Literatur keine Daten zur Lokalisation von spezifischen, endogenen Transkripten in *P-Bodies* vorliegen.

In Hefen konnte bereits eine transkriptunspezifische Lokalisation von mRNAs in *P-Bodies* beschrieben werden. Dabei wurde beobachtet, dass *in vitro* aufgereinigte *P-Bodies* für ihre Assemblierung RNAs benötigen, da eine RNase A Behandlung zur Auflösung der *P-Bodies* führt (Teixeira et al, 2005). Des Weiteren führt in Hefen die Blockade des mRNA-Abbaus durch den Austausch des Poly(A)-Überhangs durch einen Poly(G)-Überhang zur Akkumulation einer ektopisch exprimierten Modell-mRNA in den *P-Bodies* (Sheth & Parker, 2003). Daneben ist die mikroskopische, transkriptunspezifische Detektion der Kolo-kalisation von mRNAs in *P-Bodies* anhand des Poly(A)-Überhangs mit Oligo d(T)-Sonden möglich (Cougot et al, 2004). Zusätzlich konnte für Reporter mRNAs, welche spezielle *hairpin* Motive für RNA-bindende Proteine beinhalten und so die Bindung von GFP-Fusionsproteinen ermöglichen, sowie für miRNAs indirekt gezeigt werden, dass eine Kolo-kalisation von diesen RNA-Populationen mit den *P-Bodies* bestehen kann (Aizer et al, 2014; Sheth & Parker, 2003; Sheth & Parker, 2006; Wang et al, 2017). Alle zitierten, funktionellen Experimente beruhen auf einer exogenen Expression der jeweiligen mRNA-Konstrukte und Proteine, sodass keine Daten über die endogene Verteilung und Lokalisation von mRNAs in *P-Bodies* vorhanden sind. Aus diesem Grund besteht die Notwendigkeit, die Rolle von *P-Bodies* bei der Lokalisation von mRNAs auf einem endogenen Niveau mit transkriptspezifischen Sonden zu untersuchen.

Zur Untersuchung der Relevanz von *P-Body*-Proteinen für die mRNA-Lokalisation wurden in den DCP1a oder XRN1 *knockdown* Zellen Immuno-RNA-FISH-Experimente durchgeführt und die subzelluläre Lokalisation der endogenen *IL8*-, *NFKBIA*- und *IL6*-mRNA und die relative Nähe dieser zu *P-Bodies* untersucht. Die EDC4 *knockdown* Zellen wurden aus dieser Analyse ausgeschlossen, da diese keine *P-Bodies* aufweisen. Dabei konnte zunächst die stark verringerte Induktion der *IL8*-mRNA in den DCP1a *knockdown* Zellen nach einer IL-1-Stimulation auf Einzelzellebene bestätigt werden (Abb.3.26). Zusätzlich konnte in XRN1 *knockdown* Zellen die Erhöhung der Expression der *NFKBIA*-mRNA nach einer dreistündigen IL-1-Stimulation bestätigt werden (Abb.3.26). Der zentrale Befund dieser Experimente ergab -unabhängig von der IL-1-Stimulation- in den XRN1 CRISPR/Cas9-Zellen eine starke, transkriptspezifische Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA (Abb.3.26) sowie eine erhöhte Kolokalisation der *IL6*-mRNA (Abb.3.27) in *P-Bodies*. Im Gegensatz dazu konnten in den Kontrollzellen und den DCP1a *knockdown* Zellen keine Akkumulation von *NFKBIA* in den *P-Bodies* detektiert werden. Die *IL8*-mRNA wurde in keiner Situation in *P-Bodies* detektiert (Abb.3.26).

Diese Beobachtungen zeigen, dass es bei einer Störung des mRNA-Abbaus zu einer transkriptspezifischen Akkumulation von mRNAs in den *P-Bodies* kommt. Da alle drei mittels Immuno-RNA-FISH untersuchten Transkripte in Abhängigkeit von DCP1a, EDC4 und XRN1 abgebaut werden, ist die fehlende Kolokalisation im basalen und IL-1-stimulierten Zustand ein weiterer Hinweis darauf, dass *P-Bodies* nicht am normalen mRNA-Abbau beteiligt sind.

So führt die Depletion von DCP1a zur Erhöhung der *P-Body*-Assemblierung (Abb.3.15) und einer Erhöhung der mRNA-Stabilität (Abb.3.23), während keine Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* erfolgt (Abb.3.26). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in diesem zellulären System eine unveränderte *Decapping*-Aktivität gewährleistet werden kann (Abb.3.24) oder aber die verbleibende Proteinmenge von DCP1a, nachgewiesen mittels Western Blot (Abb.3.14) und Immunfluoreszenz (Abb.3.15), ausreicht, um eine minimale *Decapping*-Aktivität aufrecht zu erhalten. Zudem könnte es möglich sein, dass andere Regulatoren des *Decappings* in der Lage sind, die aktivierende und regulierende Funktion von DCP1a zu komplementieren. Folglich könnte der mRNA-Abbau durch *Decapping*, wenn auch vermindert, außerhalb der *P-Bodies* im Zytoplasma stattfinden, sodass es nicht zur Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* kommt. Unterstützt wird diese Argumentation dadurch, dass in den Kontrollzellen ebenfalls keine Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* detektierbar ist (Abb.3.26). Somit besteht in einem System mit einer regulären

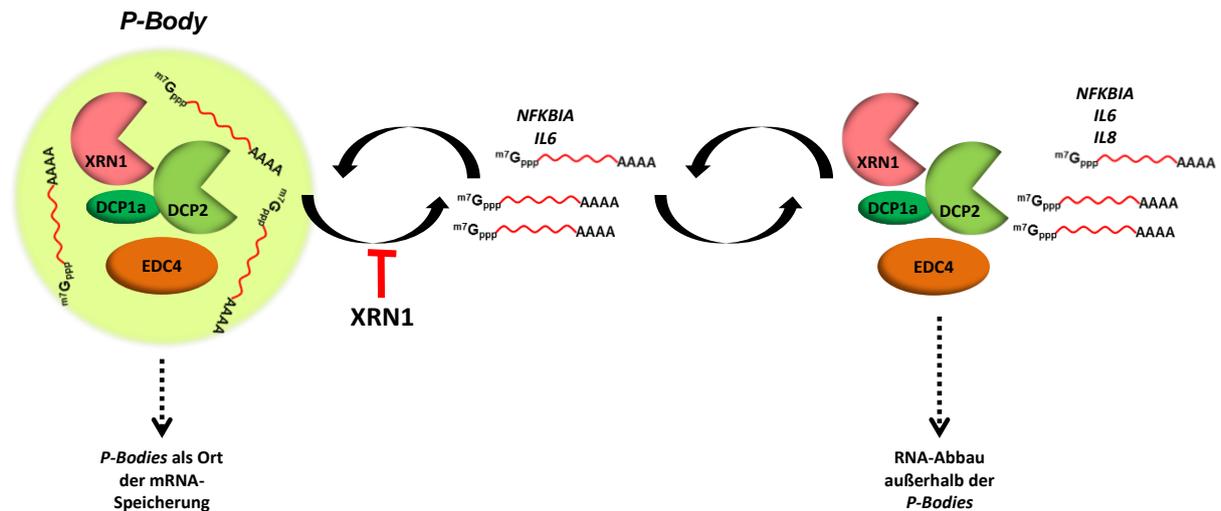
*Decapping*-Aktivität keine Notwendigkeit der Speicherung von großen Mengen von mRNAs in *P-Bodies*, da der mRNA-Abbau außerhalb der *P-Bodies* gewährleistet werden kann.

Im zweiten Zellsystem mit der Depletion von XRN1 führt der Verlust des Proteins zu einer fast vollständigen Aufhebung des Abbaus von *NFKBIA* (Abb.3.23). Da davon auszugehen ist, dass die vorgeschalteten, regulären Schritte des mRNA-Abbaus, wie z.B. die Deadenylierung und auch die *Decapping*-Reaktion (Abb.3.24) in ihrer Aktivität unverändert sind, führt die Blockierung des 5'-3'-mRNA-Abbaus durch die Depletion von XRN1 beim letzten Schritt der Prozessierung zur enormen Stabilisierung der *NFKBIA*-mRNA. Dies hat zur Folge, dass die zytoplasmatische mRNA-Menge erhöht wird und infolgedessen eine Akkumulation der mRNA in den *P-Bodies* stattfindet (Abb.3.26). Dadurch können möglicherweise weiterhin konstante Proteinspiegel gewährleistet werden, indem der mangelnde mRNA-Abbau durch eine Auslagerung der überschüssigen mRNA in *P-Bodies* kompensiert wird. Da XRN1 die am häufigsten beschriebene, zytoplasmatische 5'-3'-Exoribonuklease für den mRNA-Abbau darstellt (Nagarajan et al, 2013), ist zusätzlich nicht davon auszugehen, dass andere Enzyme die Funktion von XRN1 kompensieren können und infolgedessen die beobachteten starken Effekte der mRNA-Stabilisierung und mRNA-Lagerung stattfinden. Des Weiteren kann aus den beschriebenen Effekten geschlossen werden, dass im Gegensatz zur Depletion von DCP1a die nach dem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 verbleibende Proteinmenge nicht dazu ausreicht, einen Abbau der mRNA zu gewährleisten. Diese Interpretationen erklären allerdings nicht die transkriptselektive Anreicherung der *NFKBIA*- und *IL6*-mRNAs in *P-Bodies* von XRN1-defizienten Zellen, sodass der zugrunde liegende, deterministische Mechanismus weiter untersucht werden muss.

Möglicherweise findet im normalen Zustand ständig ein Austausch von mRNAs zwischen *P-Bodies* und dem übrigen Zytoplasma stattfindet. Im Falle der Depletion von XRN1 könnte das *Decapping* als einleitender, katalytischer Schritt zum Abbau der mRNA in den *P-Bodies* erhalten sein, obwohl der anschließend exoribonukleolytische mRNA-Abbau durch XRN1 nicht mehr stattfinden kann. Folglich würde es zur Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* kommen. Diese Argumentation lässt sich jedoch bei der Betrachtung aller Ergebnisse in den DCP1a oder EDC4 CRISPR/Cas9-Zellen widerlegen, da die Stabilisierung der mRNA komplett unabhängig von der *P-Body*-Assemblierung erfolgen kann, und sie nicht mit dem Vorhandensein von *P-Bodies* korreliert und in den DCP1a *knockdown* Zellen keine Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* stattfindet.

Des Weiteren deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass eine starke transkriptspezifische Auswahl der mRNAs vorliegen kann. Während die *NFKBIA*- und *IL6*-mRNA in variablem Ausmaß in *P-Bodies* lokalisieren können, ist dies für die *IL8*-mRNA nicht der Fall. Dieser Befund ist eindeutig, da sehr viele individuelle *IL8* mRNA-*spots* in den Zellen detektiert wurden. Zusätzlich zeigen unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe, dass zwei unterschiedlich markierte *IL8*-Sonden zu hundert Prozent kolokalisieren, sodass ein sondenspezifischer Artefakt für die fehlende Kolokalisation von *IL8* mit *P-Bodies* ausgeschlossen werden kann.

Diese Daten wären damit vereinbar, dass der Abbau der unterschiedlichen mRNAs durch verschiedene, zelluläre mRNA-Abbaumechanismen stattfindet. Allerdings zeigt die Beeinflussung der mRNA-Stabilität von *IL8* durch den *knockdown* von DCP1a und auch EDC4, dass auch dieses Transkript dem *Decapping*-abhängigen mRNA-Abbau unterliegt und vermutlich nicht unabhängig davon durch z.B. das Exosom degradiert wird. Alternativ könnten transkriptselektive, RNA-bindende Proteine für die Rekrutierung und Lokalisation von mRNAs in den *P-Bodies* verantwortlich sein. In diesem Fall müssten sich *IL8*, *NFKBIA* und *IL6* in den relevanten, regulatorischen *cis*-Elementen deutlich unterscheiden. Alle drei mRNAs sind durch AU-reiche Regionen gekennzeichnet (Hao et al, 2008; Mahmoud et al, 2014), sodass diese regulatorischen Elemente für diese Hypothese nicht in Frage kommen. Folglich unterstützt die Stabilisierung von *IL8* durch den *knockdown* von DCP1a und EDC4 erneut einen Abbau von inflammatorisch relevanten mRNAs unabhängig von der *P-Body*-Assemblierung im Zytoplasma. Ferner implizieren diese Beobachtungen, dass in den XRN1 *knockdown* Zellen weitere mRNAs von dieser Akkumulation betroffen sein können. Die XRN1 CRISPR/Cas9 Zellen könnten somit dazu verwendet werden, um alle Transkripte zu identifizieren, welche im Prinzip eine Lokalisation in *P-Bodies* aufweisen können. Zur Identifizierung dieser Transkripte könnten *P-Bodies* in den XRN1 *knockdown* Zellen auch in Abhängigkeit einer IL-1-Stimulation durch geeignete Aufreinigungsmethoden wie z.B. der Lasermikrodissektion von *P-Bodies* aus fixierten Zellen oder auch durch differentielle Zentrifugationsschritte isoliert werden, um anschließend die mRNAs durch eine RNA-Sequenzierung oder Microarrayexperimente zu bestimmen. Im Rahmen dessen konnte bereits in Hefen mittels CLIP-Experimenten gezeigt werden, dass die *P-Body*-Komponenten Pat1, Lsm1, Dhh1 und Sbp1 in der Lage sind überlappend eine enge Gruppe an Transkripten zu binden. Diese überlappende Bindung von distinkten Transkriptgruppen könnten vor allem darauf zurückgeführt werden, dass zwischen den genannten Proteinen physikalische



**Abb.4.2:** *P-Bodies* ermöglichen eine transkriptspezifische Speicherung von mRNAs. Im Rahmen dieser Arbeit konnten *NFKBIA* und *IL6* (jedoch nicht *IL8*) als Transkripte identifiziert werden, welche nach einem *knockdown* von *XRN1* eine spezifische Akkumulation in *P-Bodies* aufweisen können. Obwohl der *knockdown* von *XRN1* eine starke Erhöhung der mRNA-Stabilität zur Folge hat, führen die erhöhten zellulären mRNA-Mengen nicht zu einer erhöhten Proteinexpression. Diese Stabilisierung der mRNAs konnte ebenfalls in *DCP1a* und *EDC4 knockdown* Zellen beobachtet werden, welche eine unterschiedliche *P-Body*-Assemblierung aufweisen, sodass die Formation von *P-Bodies* unabhängig von dem mRNA-Abbau stattfindet. Somit ist davon auszugehen, dass der Abbau der mRNA überwiegend oder sogar komplett außerhalb der *P-Bodies* stattfindet und diese somit einen Ort der mRNA-Speicherung darstellen. *XRN1* kann dabei als kritischer Faktor betrachtet werden, welcher in der Lage ist die transkriptspezifische mRNA-Rekrutierung in die *P-Bodies* zu regulieren, da nach der Depletion von *XRN1* eine Akkumulation bestimmter Transkripte in *P-Bodies* stattfinden kann.

Interaktionen vorhanden sind und diese koordiniert in einem Netzwerk die betreffenden Transkripte binden können (Mitchell et al, 2013).

Diese Daten aus dem Hefemodell zeigen eine starke transkriptabhängige Lokalisation von mRNAs in *P-Bodies*, deren funktionelle Bedeutung unklar ist. Durch die Etablierung geeigneter Untersuchungstechniken könnte die Rolle von *P-Bodies* im proinflammatorischen Signalweg besser untersucht werden, indem die transkriptspezifische Lokalisierung von mRNAs in *P-Bodies* ermittelt wird und so die identifizierten Transkripte besser biologischen Prozessen zugeordnet werden können. Diese transkriptspezifische Möglichkeit der (Re)Lokalisation von mRNAs in *P-Bodies* könnte somit einen „Überlauf“-Mechanismus darstellen, welcher es der Zelle erlaubt, auch in Stresssituationen die Homöostase des RNA- und Protein-Metabolismus aufrecht zu erhalten. So zeigen die eigenen Ergebnisse am Beispiel von *IκBα*, dass dessen starke mRNA-Expression nach einem proinflammatorischen Stimulus,

welche primär auf einen inhibierten RNA-Abbau zurückzuführen ist, ohne Einfluss auf die exprimierte Proteinmenge bleibt. Die Proteinmenge wird demnach durch eine Speicherung der überschüssigen mRNA in den *P-Bodies* konstant gehalten (Abb.4.2).

### **4.9. *P-Bodies* sorgen durch die Speicherung von mRNAs für die Aufrechterhaltung der Proteinmenge**

Um die Hypothese der Rolle der *P-Bodies* als Speicherorte für mRNAs, welche eine Aufrechterhaltung oder Pufferung der zellulären Proteinmengen erlauben, weiter zu verfolgen, wurde eine Reihe von zellpermeablen Inhibitoren verwendet, die auf verschiedenen Ebenen einen Eingriff in den RNA- und Proteinmetabolismus erlauben. Dabei wurde auch erneut das Konzept überprüft, dass ein Anstieg oder Abfall der zytoplasmatischen mRNA die Bildung von *P-Bodies* beeinflusst (Cougot et al, 2004; Eulalio et al, 2007; Teixeira et al, 2005). Der Hemmstoff PHA-408 inhibiert spezifisch den IKK-Komplex und damit den phosphorylierungsabhängigen Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ , während MG132 eine globale Hemmung des Proteasoms bewirkt, womit ebenfalls u.a. der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau blockiert wird. Beide Inhibitoren hemmen daher die Aktivierung von NF $\kappa$ B p65 und somit die Transkription NF $\kappa$ B-abhängiger Gene wie *IL8* oder *NFKBIA*. Zusätzlich wurde die Transkription global durch Flavopiridol und Actinomycin D sowie die Translation durch Cycloheximid blockiert. Bei diesen Experimenten wurden anschließend die Effekte der Inhibitoren auf die totalen mRNA-Spiegel von *NFKBIA* und die Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* der *XRN1 knockdown* Zellen beurteilt. Hierbei wurden die Änderungen der *P-Body*-Anzahl und der mRNA-sowie Proteinmenge von I $\kappa$ B $\alpha$  jeweils miteinander in Korrelation gebracht.

Bei der IL1-abhängigen Expression der *NFKBIA*-mRNA konnten bei der Verwendung der unterschiedlichen Inhibitoren die erwarteten Effekte beobachtet werden. Die Inhibierung der Transkription durch Flavopiridol und Actinomycin D und auch die *upstream* Blockade des IL-1-Signalwegs durch PHA-408 und MG132 führten zu einer starken Suppression der IL-1-induzierten *NFKBIA*-mRNA-Transkription, während bei der Verwendung von Cycloheximid kein Einfluss auf die mRNA-Expression beobachtet werden konnte (Abb.3.28). Auf Proteinebene führte die Verwendung aller Inhibitoren erwartungsgemäß zu einer verringerten Reexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  nach dem induzierten, IL-1-vermittelten Abbau, wobei die Proteinmenge mit der vorher exprimierten RNA-Menge korrelierte (Abb.3.28). Zusätzlich konnte unter allen Bedingungen keine differentielle Regulation der mRNA-und Protein-

Expression zwischen den Kontrollzellen und den XRN1 *knockdown* Zellen beobachtet werden (Abb.3.28).

Bei der Untersuchung der *P-Body*-Assemblierung konnten variable Effekte der Inhibitoren beobachtet werden. Die Behandlungen mit Flavopiridol, PHA-408 oder Actinomycin D führten zu keiner Veränderung bzw. zu einer leichten Erhöhung der *P-Body*-Assemblierung. Die Behandlung mit MG132 führte in den Kontrollzellen zu einer Auflösung der *P-Body*-Assemblierung, während dieser Effekt in den XRN1 *knockdown* Zellen interessanterweise ausblieb (Abb.3.29). Die Behandlung mit Cycloheximid führte hingegen in beiden Zelltypen zu einer Auflösung der *P-Body*-Assemblierung, weshalb in diesem Fall auf die Durchführung von Immuno-RNA-FISH-Experimenten verzichtet wurde (Abb.Anh.12).

Ferner konnte in den Immuno-RNA-FISH-Experimenten die Kolokalisation und Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* in den XRN1 *knockdown* Zellen bestätigt werden, wobei die Rate der Kolokalisation mit den Effekten der Inhibitoren auf den totalen *NFKBIA*-mRNA-Spiegel korrelierte. Ferner führten die Behandlungen weder zu einer übermäßigen Erhöhung der Akkumulation von *NFKBIA* in den *P-Bodies* der Kontrollzellen, noch zu einer allgemeinen Verringerung der Akkumulation von *NFKBIA* in den *P-Bodies* der XRN1 *knockdown* Zellen (Abb.3.29).

Der Effekt von Cycloheximid in Bezug auf die Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung ist aus der Literatur bekannt und konnte in den eigenen Experimenten bestätigt werden. So führt die Inhibierung der Translationselongation in Hefen zu einer Verringerung der *Decapping*-Aktivität (Beelman & Parker, 1994) sowie zu einer Auflösung der *P-Bodies* innerhalb von 10 Minuten (Sheth & Parker, 2003). Dabei wird vermutet, dass Cycloheximid durch seine Wirkung einen Verbleib der mRNAs an Ribosom bewirkt und dadurch eine Verringerung der zellulär frei verfügbaren RNA herbeiführt. Infolgedessen ist aufgrund der verringerten RNA-Mengen eine Assemblierung von *P-Bodies* nicht mehr möglich (Sheth & Parker, 2003). Für die Auswirkungen der Behandlung der Zellen mit Actinomycin D wurde in den eigenen Experimenten eine leichte Erhöhung der *P-Body*-Anzahlen beobachtet. Im Gegenteil dazu konnte in publizierten Forschungsergebnissen ein gegenteiliger Effekt mit einer Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung gezeigt werden. Dabei tritt die Verringerung der *P-Bodies* bereits nach einer zweistündigen Behandlung der Zellen auf, wobei eine nahezu komplette Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung nach 24 Stunden erfolgt (Cougot et al, 2004). Diese gegenteiligen Beobachtungen können möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass in

den eigenen Experimenten eine Behandlung der Zellen für lediglich eine Stunde durchgeführt wurde. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine kurzzeitige Behandlung von Zellen mit Actinomycin D eine Erhöhung der *P-Body*-Assemblierung zur Folge haben kann, während eine langfristige Behandlung die Abnahme der *P-Body*-Formation bewirkt. Für die Effekte von Flavopiridol, PHA-408 und MG132 auf die *P-Body*-Assemblierung sind in bereits publizierten Forschungsergebnissen keine Referenzdaten vorhanden, sodass die hier in der Arbeit vorgestellten Effekte neuartig sind. Der variable Effekte von MG132, welcher in den Kontrollzellen eine Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung bewirkt, jedoch nicht in den *XRN1 knockdown* Zellen, konnte im Rahmen dieser Arbeit experimentell nicht weiter untersucht werden. Dabei könnte ein *XRN1*-abhängiger Faktor, dessen proteasomaler Abbau für die positive Regulation der *P-Body*-Assemblierung notwendig ist, für diese Beobachtungen verantwortlich sein. Die Identifikation von solch einem Faktor könnte durch genom- und proteomweite Ansätze erfolgen. Neben den bereits erwähnten Inhibitoren konnte in publizierten Forschungsergebnissen für eine Reihe von zusätzlichen Substanzen und Stimuli ein Einfluss auf die *P-Body*-Assemblierung gezeigt werden. Die Vielfältigkeit dieser Effektoren und die unterschiedlichen Einflüsse auf die Formation der *P-Bodies* sind in unterschiedlichen Zellsystemen erhoben worden und in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Diese Daten sowie die eigenen Befunde verdeutlichen die vielfältigen Regulationsmöglichkeiten der *P-Bodies* und die dabei beteiligten, überwiegend chemischen Trigger und Effektorsysteme, die direkt oder indirekt die *P-Body*-Assemblierung beeinflussen können. Aus diesem Grund bleibt es weiterhin schwierig, diese Beobachtungen in ein einheitliches Konzept der (patho-)physiologischen Funktionen von *P-Bodies* zu integrieren. Insbesondere müssen die Schlüsse, die durch die Verwendung von zum Teil sehr toxischen, chemikalischen Verbindungen erhoben wurden, in geeigneten physiologischen Modellen überprüft werden. Eine zusammenfassende Interpretation der vorhandenen Daten ist aber, dass es keinen singulären Signalweg gibt, der die *P-Body*-Assemblierung fördert oder hemmt, sodass die dynamischen Veränderungen der *P-Bodies* eher eine Folge der Integration sehr unterschiedlicher zellulärer Signalsysteme darstellen.

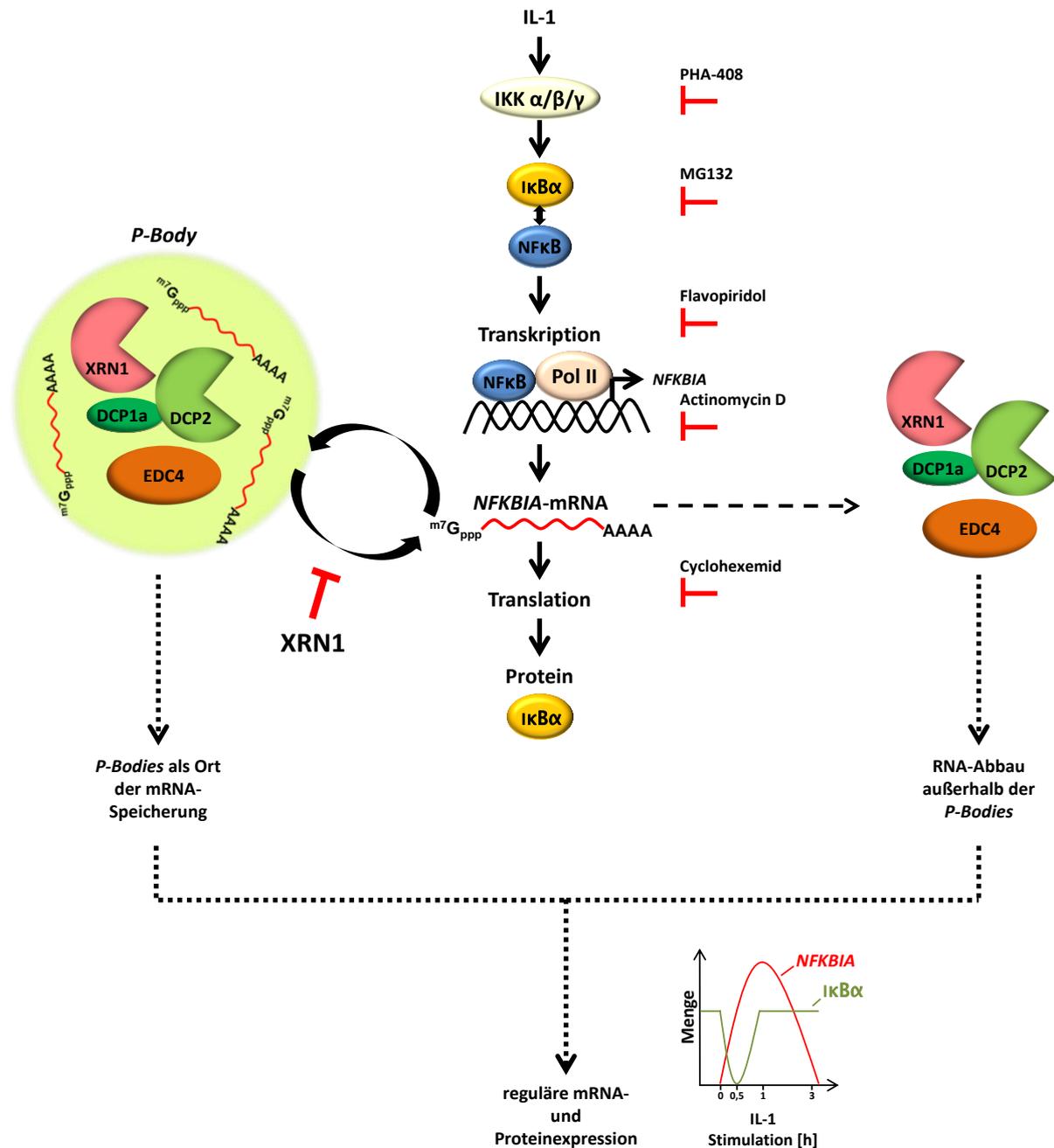
**Tab.4.2: Veränderungen der *P-Body*-Assemblierung durch verschiedene Substanzen und Stimuli.** Gezeigt ist eine Zusammenstellung von Ergebnissen, bei welchen eine Veränderung der *P-Body*-Formation nach der Behandlung von Zellen mit Substanzen oder extrazellulären Triggern in Hefen oder im humanen Zellsystem beobachtet wurde. Dabei wurden der Verlust der *P-Body*-Assemblierung (Verlust) und positive ( $\uparrow$ ) bzw. negative ( $\downarrow$ ) Veränderungen der *P-Body*-Größe ( $\emptyset$ ) und *P-Body*-Anzahl (n) beobachtet. Die Zusammenstellung erfolgte anhand von verfügbaren, publizierten Forschungsergebnissen und wurde zusätzlich durch die Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit (grau hinterlegt) ergänzt.

Substanz/Stimulus	Spezies	Mechanismus	Effekt auf P-Bodies	Literaturverweis
<b>Actinomycin D (kurzfristig)</b>	Human	Inhibierung der Transkription	n= $\uparrow$	vorliegende Arbeit
<b>Actinomycin D (langfristig)</b>	Human		Verlust	(Cougot et al, 2004)
<b>Flavopiridol</b>	Human		n= $\uparrow$	vorliegende Arbeit
<b>Anisomycin</b>	Human	Inhibierung der Translation	Verlust	(Rzeczkowski et al, 2011)
<b>Cycloheximid</b>	Hefe		Verlust	(Teixeira et al, 2005)
	Human		Verlust	(Andrei et al, 2005; Cougot et al, 2004), vorliegende Arbeit
<b>Emetin</b>	Human		Verlust	(Kedersha et al, 2005)
<b>Puromycin</b>	Human		$\emptyset$ = $\uparrow$ ; n= $\uparrow$	(Aizer et al, 2008)
<b>Kaliumchlorid</b>	Hefe		Induktion von osmotischem Stress	$\emptyset$ = $\uparrow$ ; n= $\uparrow$
<b>Sorbitol</b>	Human	Verlust		(Rzeczkowski et al, 2011)
<b>Arsenit</b>	Human	Induktion von oxidativem Stress	n= $\uparrow$	(Kedersha et al, 2005)
<b>Nocodazol</b>	Human	Destabilisierung von Mikrotubuli	Verlust	(Aizer et al, 2008)
<b>Vinblastin</b>	Human		Verlust	(Aizer et al, 2008)
<b>RNase A</b>	Hefe	Abbau der zellulär verfügbaren RNA	Verlust	(Teixeira et al, 2005)
<b>1,6-Hexandiol</b>	Human, Hefe	Störung hydrophober Wechselwirkungen	Verlust	(Kroschwald et al, 2015; Sfakianos et al, 2016)
<b>MG132</b>	Human	Inhibierung des Proteasoms	Verlust bzw. kein Einfluss	vorliegende Arbeit
<b>PHA-408</b>	Human	Inhibierung von IKK2	kein Einfluss	vorliegende Arbeit
<b>Aminosäuremangel</b>	Human		n= $\uparrow$	(Aizer et al, 2014)
<b>Glucosemangel</b>	Hefe		$\emptyset$ = $\uparrow$ ; n= $\uparrow$	(Teixeira et al, 2005)
<b>UV-Strahlung</b>	Hefe		$\emptyset$ = $\uparrow$ ; n= $\uparrow$	(Teixeira et al, 2005)

Trotz der zum Teil drastischen Einflüsse der Inhibitoren auf den RNA- und Proteinmetabolismus, konnte bei keiner der verwendeten Substanzen eine Auflösung der Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* der *XRN1 knockdown* Zellen erreicht werden. Ebenfalls konnte durch die Behandlungen keine Akkumulation von *NFKBIA* in den *P-Bodies* der Kontrollzellen induziert werden. Diese Beobachtungen favorisieren eindeutig das Modell der *P-Bodies* als Speicherorte für mRNA (Abb.4.2). Ein biologischer Sinn der

beobachteten Effekte könnte darin liegen, dass die durch den *knockdown* von XRN1 bedingte, starke Verringerung des zytoplasmatischen Abbaus von *NFKBIA* und der dadurch erfolgende starke Anstieg der mRNA-Menge im Zytoplasma durch die Auslagerung der RNA in *P-Bodies* kompensiert wird. Obwohl der Abbau der *NFKBIA*-mRNA in den DCP1a oder EDC4 *knockdown* Zellen ebenfalls verringert ist, zeigt sich hier keine deutliche Akkumulation der RNA in den *P-Bodies* (Abb.3.26). Für die Depletion von DCP1a zeigen diese Daten, dass die Stabilisierung der mRNA unabhängig vom vorherrschenden *P-Body*-Status der Zelle geschieht. Die Akkumulation von *NFKBIA* in den XRN1 *knockdown* Zellen kann demnach darauf zurück geführt werden, dass XRN1 einen Faktor oder zellulären Prozess reguliert, der in die RNA-Zusammensetzung von *P-Bodies* eingreifen kann und speziell in dem hier gezeigten Fall für den Austritt der mRNAs aus den *P-Bodies* verantwortlich sein könnte. Diese noch unbekannt Faktoren oder Prozesse könnten ebenfalls die transkriptspezifische Akkumulation der drei getesteten mRNAs *NFKBIA*, *IL6* und *IL8* in den *P-Bodies* mitbedingen, wobei XRN1 durch die Bindung an spezifische RNA-Motive eine Rekrutierung individueller mRNAs in die *P-Bodies* regulieren könnte oder eben deren Austritt.

Die Beobachtung, dass eine Manipulation der Lokalisation von mRNAs in *P-Bodies* durch eine Verringerung oder Erhöhung der zytoplasmatischen mRNA-Menge mittels der angewandten Inhibitoren nicht möglich ist, weist zusätzlich darauf hin, dass *P-Bodies* andere übergreifende Funktionen haben könnten. So weist die Möglichkeit der Regulation der *P-Body*-Assemblierung und auch der einzelnen Faktoren durch signalabhängige, posttranslationale Modifikationen auf die Relevanz der *P-Bodies* im proinflammatorischen Signalweg hin (Rzeczkowski et al, 2011; Tenekeci et al, 2016). Diese Überlegungen lassen sich in ein Modell integrieren, in welchem *P-Bodies* zusammen mit dem zytoplasmatischen RNA-Abbau außerhalb der *P-Bodies* in Summe eine Kontrolle von transkriptspezifischen mRNA-Mengen einer Zelle erlauben. Dabei dienen *P-Bodies* als hochdynamische Speicherorte für spezifische, biologische, hochrelevante mRNAs, wobei sie aber auch die Konzentration von zytoplasmatischen RNA-Abbaufaktoren regulieren können. Auf diese Weise können die effektiven Proteinmengen von Chemokinen (IL-8), Zytokinen (IL-6) und dem zentralen zytoplasmatischen Regulator des kanonischen NF $\kappa$ B-Signalwegs (I $\kappa$ B $\alpha$ ) auch in Situationen eines beeinträchtigten mRNA-Abbaus konstant gehalten werden, um die zellulären Funktionen im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu gewährleisten (Abb.4.3).



**Abb.4.3: P-Bodies** gewährleisten durch die Speicherung von RNA-Abbaufaktoren und spezifischen mRNAs die Aufrechterhaltung einer regulierten mRNA- und Proteinexpression. Auf Basis der im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse lassen sich *P-Bodies* als subzelluläre Strukturen definieren, welche eine vorübergehende Speicherung von spezifischen mRNAs (z.B. *NFKBIA*) erlauben, um eine möglichst korrekt regulierte Genexpression zu gewährleisten. Im Gegensatz dazu findet der *Decapping*-vermittelte Abbau der mRNAs im Zytoplasma statt. Dabei erfolgt ein kontinuierlicher Austausch von mRNAs zwischen dem Zytoplasma und den *P-Bodies*. Durch zellulären Stress oder durch einen proinflammatorischen Stimulus wie IL-1, können *P-Bodies* durch die vorübergehende Lagerung von spezifischen mRNAs eine Feinregulation der zytoplasmatischen mRNA-Mengen ermöglichen. Auf diese Weise wird auch unter Konditionen eines stark inhibierten, zytoplasmatischen mRNA-Abbaus die translatierbare mRNA-Menge und folglich auch die

exprimierte Proteinmenge reguliert und konstant gehalten. Inhibitoren, welche auf unterschiedlichen Ebenen eine Manipulation des RNA- und Proteinmetabolismus erlauben, sind nicht in der Lage, den Status der mRNA-Speicherung unter Konditionen eines vorherrschenden, XRN1 *knockdown* bedingten, inhibierten mRNA-Abbaus zu verändern. Dagegen konnte XRN1 in dieser Arbeit als ein Faktor identifiziert werden, welcher direkt oder indirekt die RNA-Zusammensetzung von *P-Bodies* regulieren kann. *P-Bodies* fungieren somit als eine Art membranloses „Überlauf“-Kompartiment, welches im Zusammenspiel mit dem zytoplasmatischen mRNA-Abbau die robuste Expression von mRNAs und Proteinen in einer zellulären Entzündungsreaktion gewährleistet.

### 4.10. Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Forschungsergebnisse verdeutlichen die Relevanz der Untersuchung von *P-Bodies* und der Einflüsse dieser auf biologische Ereignisse wie das proinflammatorische *signaling* einer Zelle. Besonders die Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* in einem zellulären System mit einer stark verringerten XRN1-Menge und einem stark verringerten RNA-Abbau zeigt die Rolle von *P-Bodies* bei der Speicherung von proinflammatorisch relevanten mRNAs.

Aus diesem Grund wäre es auch in Zukunft von Interesse, diese XRN1-abhängige Akkumulation der *NFKBIA*-mRNA in den *P-Bodies* und die zugrundeliegenden Mechanismen weiter zu untersuchen. Dazu könnten zunächst Experimente durchgeführt werden, welche neben der Depletion von XRN1 ebenfalls eine Auflösung von *P-Bodies* induzieren, ohne möglichst andere zelluläre Mechanismen zu beeinflussen. Im Rahmen dessen könnte eine gleichzeitige Depletion von XRN1 und EDC4 unter der Verwendung eines Multiplex-CRISPR/Cas9-Systems (Kabadi et al, 2014; Yan et al, 2016), welches den gleichzeitigen *knockdown* beider Proteine ermöglicht, durchgeführt werden. Der *knockdown* von XRN1 sollte in diesem Fall die beschriebenen Effekte der mRNA-Stabilisierung herbeiführen, wobei der zusätzliche *knockdown* von EDC4 die Auflösung der *P-Bodies* bewirken sollte, wie es im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Alternativ dazu könnte die Auflösung von *P-Bodies* nach einem *knockdown* von XRN1 durch die Behandlung der Zellen mit 1,6-Hexandiol erreicht werden. Für diese Substanz konnte in Hefen und auch im humanen Zellsystem gezeigt werden, dass eine Aufhebung der *P-Body*-Assemblierung erfolgt (Kroschwald et al, 2015). In diesen Systemen mit einem stark verringerten mRNA-Abbau sollte folglich keine Lagerung der mRNAs mehr möglich sein, sodass die zellulären Mengen dieser stark erhöht vorliegen. Infolgedessen sollte davon ausgegangen werden, dass diese stark erhöhten mRNA-Mengen auch in einer Erhöhung der effektiven Proteinmengen

resultieren. Dadurch könnte erneut die Notwendigkeit von *P-Bodies* als Speicherorte für mRNAs bestätigt werden.

Ähnliche Untersuchungen zur Akkumulation von mRNAs in *P-Bodies* könnten ebenfalls in den EDC4 CRISPR/Cas9 Zellen durchgeführt werden, in welchen eine Überexpression von DCP1a in der erneuten Ausbildung von *P-Bodies* resultiert. Diese *P-Bodies*, welche durch die Depletion von EDC4 eine differentielle Zusammensetzung aufweisen, könnten in der Lage sein eine Speicherung von mRNAs durchzuführen, wobei die Untersuchung dieser mittels einer Immuno-RNA-FISH erfolgen kann.

Die gezeigte transkriptspezifische Akkumulation von *NFKBIA* und *IL6*, jedoch nicht *IL8*, in den *XRN1 knockdown* Zellen und die anschließende Aufrechterhaltung der effektiven Proteinmenge von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  impliziert, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Lokalisation von mRNAs in *P-Bodies* und der anschließenden Proteinexpression besteht. Um diese Beobachtungen weiter zu stärken, könnten die Proteinmengen von IL-6 und auch IL-8 ermittelt werden, um eine direkte Korrelation zwischen den exprimierten mRNA-Mengen, der Akkumulation der mRNAs in den *P-Bodies* und der effektiven Proteinmengen herzustellen. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass möglicherweise eine Veränderung der Proteinmenge von IL-8 auftreten kann, da diese nach der Depletion von *XRN1* nicht in den *P-Bodies* lokalisiert.

Die Aufrechterhaltung der effektiven Proteinmenge durch eine Speicherung der überschüssigen mRNA in der *P-Bodies* der *XRN1 knockdown* Zellen, könnte neben diesem Effekt auch auf eine differentielle Regulation der Proteinbiosynthese zurückgeführt werden. Dabei könnte die Proteinsynthese in den *XRN1 knockdown* Zellen verringert sein, um die erhöhten zellulären RNA-Mengen und den verringerten RNA-Abbau zu kompensieren. Aus diesem Grund könnten *Polysome Profiling*- oder *Ribosome Profiling*-Experimente durchgeführt werden, mit welchen es möglich ist die Translationsrate einer gegebenen mRNA zu ermitteln oder sogar eine genomweite Analyse der aktiv translatierten mRNAs durchzuführen (Piccirillo et al, 2014). Anhand dieser Experimente könnte ausgeschlossen werden, dass die Aufrechterhaltung der effektiven Proteinmenge auf eine verringerte Proteinbiosynthese zurückzuführen ist, sodass indirekt die Funktion von *P-Bodies* als Speicherorte von mRNAs weiter gestärkt wird.

Des Weiteren könnten die in dieser Arbeit etablierten und charakterisierten *XRN1 knockdown* Zellen dazu verwendet werden, typische mRNAs zu identifizieren, welche in den *P-Bodies* lokalisieren können. In Anbetracht dessen, dass in den *P-Bodies* dieser Zellen eine

transkriptspezifische Akkumulation von *NFKBIA* und *IL6* stattfindet, ist davon auszugehen, dass möglicherweise weitere mRNAs von dieser Akkumulation betroffen sind. Um diese mRNAs zu bestimmen, könnten die *P-Bodies* der *XRN1 knockdown* Zellen durch eine zentrifugale Anreicherung oder Lasermikrodissektion aufgereinigt werden, um anschließend die mRNAs aus dieser aufgereinigten Fraktionen zu isolieren. Die mRNAs könnten dann durch RNA-Sequenzierungen oder Microarrayexperimente identifiziert werden. Die so bestimmten mRNAs könnten zusätzlich in ihrer Sequenz untersucht werden, um gemeinsame Motive zu identifizieren, sodass eine Aussage über einen übergeordneten Mechanismus, welcher von der Sequenz der mRNA abhängig ist und die Lokalisation von mRNAs in *P-Bodies* regulieren kann, getroffen werden kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zur Relevanz von *P-Bodies* im proinflammatorischen *signaling* auf mRNA- und Proteinebene könnten so um die genannten, zusätzlichen Experimente erweitert werden, um weitere Erkenntnisse zur Rolle von *P-Bodies* zu erhalten. Besonders die Möglichkeit der gleichzeitigen Untersuchung der mRNA- und Proteinkomponenten auf einem endogenen Niveau ermöglichen es, ein besonders genaues Bild der zellulären Vorgänge und Mechanismen zu erhalten, bei welchen *P-Bodies* und deren Proteinfaktoren eine gezielte Feinregulation der mRNA-Mengen herbeiführen und so die zelluläre Genexpression steuern können.

## 5. Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S (2007) *Cellular and molecular immunology*, 6. edn. Philadelphia: Elsevier.

Aglietti RA, Floor SN, McClendon CL, Jacobson MP, Gross JD (2013) Active Site Conformational Dynamics Are Coupled to Catalysis in the mRNA Decapping Enzyme Dcp2. *Structure*

Aizer A, Brody Y, Ler LW, Sonenberg N, Singer RH, Shav-Tal Y (2008) The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Molecular biology of the cell* **19**: 4154-4166

Aizer A, Kafri P, Kalo A, Shav-Tal Y (2013) The P Body Protein Dcp1a Is Hyperphosphorylated during Mitosis. *PloS one* **8**: e49783

Aizer A, Kalo A, Kafri P, Shraga A, Ben-Yishay R, Jacob A, Kinor N, Shav-Tal Y (2014) Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage. *Journal of cell science* **127**: 4443-4456

Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Luhrmann R (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* **11**: 717-727

Arribas-Layton M, Wu D, Lykke-Andersen J, Song H (2013) Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochimica et biophysica acta* **1829**: 580-589

Badis G, Saveanu C, Fromont-Racine M, Jacquier A (2004) Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Molecular cell* **15**: 5-15

Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**: 565-568

Baggiolini M, Moser B, Clark-Lewis I (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture. *Chest* **105**: 95S-98S

Bai RY, Koester C, Ouyang T, Hahn SA, Hammerschmidt M, Peschel C, Duyster J (2002) SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGFbeta signalling. *Nature cell biology* **4**: 181-190

Banani SF, Rice AM, Peeples WB, Lin Y, Jain S, Parker R, Rosen MK (2016) Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell* **166**: 651-663

Bandman O, Coleman RT, Loring JF, Seilhamer JJ, Cocks BG (2002) Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **975**: 77-90

Barbee SA, Estes PS, Cziko AM, Hillebrand J, Luedeman RA, Coller JM, Johnson N, Howlett IC, Geng C, Ueda R, Brand AH, Newbury SF, Wilhelm JE, Levine RB, Nakamura A, Parker R, Ramaswami M (2006) Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**: 997-1009

- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709-1712
- Bashkirov VI, Scherthan H, Solinger JA, Buerstedde JM, Heyer WD (1997) A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *The Journal of cell biology* **136**: 761-773
- Battich N, Stoeger T, Pelkmans L (2013) Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution. *Nature methods* **10**: 1127-1133
- Beelman CA, Parker R (1994) Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA. *The Journal of biological chemistry* **269**: 9687-9692
- Beelman CA, Stevens A, Caponigro G, LaGrandeur TE, Hatfield L, Fortner DM, Parker R (1996) An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* **382**: 642-646
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E (2006) mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* **20**: 1885-1898
- Bensaude O (2011) Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription* **2**: 103-108
- Bhanji RA, Eystathioy T, Chan EK, Bloch DB, Fritzler MJ (2007) Clinical and serological features of patients with autoantibodies to GW/P bodies. *Clin Immunol* **125**: 247-256
- Bhattacharyya SN, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W (2006) Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**: 1111-1124
- Blagosklonny MV (2004) Flavopiridol, an inhibitor of transcription: implications, problems and solutions. *Cell Cycle* **3**: 1537-1542
- Bloch DB, Rabkina D, Quertermous T, Bloch KD (1994) The immunoreactive region in a novel autoantigen contains a nuclear localization sequence. *Clinical immunology and immunopathology* **72**: 380-389
- Bloch DB, Yu JH, Yang WH, Graeme-Cook F, Lindor KD, Viswanathan A, Bloch KD, Nakajima A (2005) The cytoplasmic dot staining pattern is detected in a subgroup of patients with primary biliary cirrhosis. *The Journal of rheumatology* **32**: 477-483
- Blumenthal J, Behar L, Elliott E, Ginzburg I (2009) Dcp1a phosphorylation along neuronal development and stress. *FEBS letters* **583**: 197-201
- Borja MS, Piotukh K, Freund C, Gross JD (2011) Dcp1 links coactivators of mRNA decapping to Dcp2 by proline recognition. *RNA* **17**: 278-290
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254

- Brannan K, Kim H, Erickson B, Glover-Cutter K, Kim S, Fong N, Kiemele L, Hansen K, Davis R, Lykke-Andersen J, Bentley DL (2012) mRNA decapping factors and the exonuclease Xrn2 function in widespread premature termination of RNA polymerase II transcription. *Molecular cell* **46**: 311-324
- Braun JE, Truffault V, Boland A, Huntzinger E, Chang CT, Haas G, Weichenrieder O, Coles M, Izaurralde E (2012) A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature structural & molecular biology* **19**: 1324-1331
- Braun KA, Young ET (2014) Coupling mRNA synthesis and decay. *Molecular and cellular biology* **34**: 4078-4087
- Bregues M, Parker R (2007) Accumulation of polyadenylated mRNA, Pab1p, eIF4E, and eIF4G with P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **18**: 2592-2602
- Bregues M, Teixeira D, Parker R (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**: 486-489
- Brikos C, Wait R, Begum S, O'Neill LA, Saklatvala J (2007) Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**: 1551-1559
- Brooks SA, Blackshear PJ (2013) Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta*
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 2532-2536
- Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell* **36**: 932-941
- Burack WR, Shaw AS (2000) Signal transduction: hanging on a scaffold. *Current opinion in cell biology* **12**: 211-216
- Burke NV, Han W, Li D, Takimoto K, Watkins SC, Levitan ES (1997) Neuronal peptide release is limited by secretory granule mobility. *Neuron* **19**: 1095-1102
- Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J (2003) Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *The Journal of experimental medicine* **197**: 263-268
- Callebaut I (2002) An EVH1/WH1 domain as a key actor in TGFbeta signalling. *FEBS letters* **519**: 178-180
- Chang CT, Bercovich N, Loh B, Jonas S, Izaurralde E (2014) The activation of the decapping enzyme DCP2 by DCP1 occurs on the EDC4 scaffold and involves a conserved loop in DCP1. *Nucleic acids research*

- Chang JH, Xiang S, Xiang K, Manley JL, Tong L (2011) Structural and biochemical studies of the 5'→3' exoribonuclease Xrn1. *Nature structural & molecular biology* **18**: 270-276
- Chen CY, Ezzeddine N, Shyu AB (2008) Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods in enzymology* **448**: 335-357
- Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**: 451-464
- Chen GY, Nunez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology* **10**: 826-837
- Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W (2005) Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* **106**: 2513-2519
- Chiang PY, Shen YF, Su YL, Kao CH, Lin NY, Hsu PH, Tsai MD, Wang SC, Chang GD, Lee SC, Chang CJ (2013) Phosphorylation of mRNA decapping protein Dcp1a by the ERK signaling pathway during early differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *PloS one* **8**: e61697
- Cho H, Kim KM, Kim YK (2009) Human proline-rich nuclear receptor coregulatory protein 2 mediates an interaction between mRNA surveillance machinery and decapping complex. *Molecular cell* **33**: 75-86
- Chou CF, Mulky A, Maitra S, Lin WJ, Gherzi R, Kappes J, Chen CY (2006) Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay. *Molecular and cellular biology* **26**: 3695-3706
- Chu CY, Rana TM (2006) Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS biology* **4**: e210
- Coller J, Parker R (2004) Eukaryotic mRNA decapping. *Annual review of biochemistry* **73**: 861-890
- Coller J, Parker R (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **122**: 875-886
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**: 819-823
- Cougot N, Babajko S, Seraphin B (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *The Journal of cell biology* **165**: 31-40
- Cougot N, Cavalier A, Thomas D, Gillet R (2012) The dual organization of P-bodies revealed by immunoelectron microscopy and electron tomography. *Journal of molecular biology* **420**: 17-28
- Courtois G, Gilmore TD (2006) Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* **25**: 6831-6843
- Cullinan EB, Kwee L, Nunes P, Shuster DJ, Ju G, McIntyre KW, Chizzonite RA, Labow MA (1998) IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *J Immunol* **161**: 5614-5620

- Davidson L, Kerr A, West S (2012) Co-transcriptional degradation of aberrant pre-mRNA by Xrn2. *The EMBO journal* **31**: 2566-2578
- Decker CJ, Parker R (2012) P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**: a012286
- Decker CJ, Teixeira D, Parker R (2007) Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **179**: 437-449
- Dickey LL, Duncan JK, Hanley TM, Fearn R (2015) Decapping protein 1 phosphorylation modulates IL-8 expression during respiratory syncytial virus infection. *Virology* **481**: 199-209
- Dinarello CA (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**: 2095-2147
- Dinarello CA (2003) Setting the cytokine trap for autoimmunity. *Nature medicine* **9**: 20-22
- Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW (2012) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews Drug discovery* **11**: 633-652
- Dunsmore KE, Denenberg AG, Page K, Wong HR (2006) Mechanism and function of heat shock-dependent IkappaBalpha expression. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* **55**: 254-259
- Durand S, Cougot N, Mahuteau-Betzer F, Nguyen CH, Grierson DS, Bertrand E, Tazi J, Lejeune F (2007) Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *The Journal of cell biology* **178**: 1145-1160
- Erickson SL, Corpuz EO, Maloy JP, Fillman C, Webb K, Bennett EJ, Lykke-Andersen J (2015) Competition between Decapping Complex Formation and Ubiquitin-Mediated Proteasomal Degradation Controls Human Dcp2 Decapping Activity. *Molecular and cellular biology* **35**: 2144-2153
- Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 9-22
- Eystathioy T, Chan EK, Tenenbaum SA, Keene JD, Griffith K, Fritzler MJ (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Molecular biology of the cell* **13**: 1338-1351
- Fenger-Gron M, Fillman C, Norrild B, Lykke-Andersen J (2005) Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Molecular cell* **20**: 905-915
- Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR, Sonenberg N (2005) A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *The Journal of cell biology* **170**: 913-924
- Fiedler MA, Wernke-Dollries K, Stark JM (1998) Inhibition of TNF-alpha-induced NF-kappaB activation and IL-8 release in A549 cells with the proteasome inhibitor MG-132. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **19**: 259-268

- Floor SN, Borja MS, Gross JD (2012) Interdomain dynamics and coactivation of the mRNA decapping enzyme Dcp2 are mediated by a gatekeeper tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 2872-2877
- Franks TM, Lykke-Andersen J (2007) TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes & development* **21**: 719-735
- Franks TM, Lykke-Andersen J (2008) The control of mRNA decapping and P-body formation. *Molecular cell* **32**: 605-615
- Fromm SA, Kamenz J, Noldeke ER, Neu A, Zocher G, Sprangers R (2014) In Vitro Reconstitution of a Cellular Phase-Transition Process that Involves the mRNA Decapping Machinery. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**: 7354-7359
- Frydryskova K, Masek T, Borcin K, Mrvova S, Venturi V, Pospisek M (2016) Distinct recruitment of human eIF4E isoforms to processing bodies and stress granules. *BMC molecular biology* **17**: 21
- Fukami M, Kirsch S, Schiller S, Richter A, Benes V, Franco B, Muroya K, Rao E, Merker S, Niesler B, Ballabio A, Ansorge W, Ogata T, Rappold GA (2000) A member of a gene family on Xp22.3, VCX-A, is deleted in patients with X-linked nonspecific mental retardation. *American journal of human genetics* **67**: 563-573
- Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E (2003) Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Current biology : CB* **13**: 161-167
- Gallina ME, Xu J, Dertinger T, Aizer A, Shav-Tal Y, Weiss S (2013) Resolving the spatial relationship between intracellular components by dual color super resolution optical fluctuations imaging (SOFI). *Optical nanoscopy* **2**
- Gao M, Fritz DT, Ford LP, Wilusz J (2000) Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Molecular cell* **5**: 479-488
- Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A (2013) The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* **39**: 1003-1018
- Garmendia-Torres C, Skupin A, Michael SA, Ruusuvuori P, Kuwada NJ, Falconnet D, Cary GA, Hansen C, Wiggins PA, Dudley AM (2014) Unidirectional P-Body Transport during the Yeast Cell Cycle. *PloS one* **9**: e99428
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 113-126
- Gowrishankar G, Winzen R, Dittrich-Breiholz O, Redich N, Kracht M, Holtmann H (2006) Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by different types of cell stress. *Biological chemistry* **387**: 323-327
- Gullberg M, Göransson C, Fredriksson S (2011) Duolink-"In-cell Co-IP" for visualization of protein interactions in situ. *Nature methods* **8**
- Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M, Jr., Jungkamp AC, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M,

- Tuschl T (2010) Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**: 129-141
- Hao SJ, Hou JF, Jiang N, Zhang GJ (2008) Loss of membrane cholesterol affects lysosomal osmotic stability. *General physiology and biophysics* **27**: 278-283
- Harel-Sharvit L, Eldad N, Haimovich G, Barkai O, Duek L, Choder M (2010) RNA polymerase II subunits link transcription and mRNA decay to translation. *Cell* **143**: 552-563
- Harigaya Y, Jones BN, Muhlrad D, Gross JD, Parker R (2010) Identification and analysis of the interaction between Edc3 and Dcp2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **30**: 1446-1456
- He F, Jacobson A (2015) Control of mRNA decapping by positive and negative regulatory elements in the Dcp2 C-terminal domain. *RNA*
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* **374**: 1-20
- Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T (1990) Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology today* **11**: 443-449
- Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al. (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324**: 73-76
- Ho CY, Li HY (2010) DNA damage during mitosis invokes a JNK-mediated stress response that leads to cell death. *Journal of cellular biochemistry* **110**: 725-731
- Holmes LE, Campbell SG, De Long SK, Sachs AB, Ashe MP (2004) Loss of translational control in yeast compromised for the major mRNA decay pathway. *Molecular and cellular biology* **24**: 2998-3010
- Holtmann H, Enninga J, Kalble S, Thiefes A, Dorrie A, Broemer M, Winzen R, Wilhelm A, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Resch K, Kracht M (2001) The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation. *The Journal of biological chemistry* **276**: 3508-3516
- Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D, Malinin NL, Cooper JA, Resch K, Kracht M (1999) Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Molecular and cellular biology* **19**: 6742-6753
- Houseley J, Tollervey D (2009) The many pathways of RNA degradation. *Cell* **136**: 763-776
- Hu W, Sweet TJ, Chamnongpol S, Baker KE, Collier J (2009) Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **461**: 225-229
- Huch S, Nissan T (2017) An mRNA decapping mutant deficient in P body assembly limits mRNA stabilization in response to osmotic stress. *Scientific reports* **7**: 44395

- Ignatochkina AV, Takagi Y, Liu Y, Nagata K, Ho CK (2015) The messenger RNA decapping and recapping pathway in Trypanosoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 6967-6972
- Ingelfinger D, Arndt-Jovin DJ, Luhrmann R, Achsel T (2002) The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA* **8**: 1489-1501
- Jain S, Parker R (2013) The discovery and analysis of P Bodies. *Advances in experimental medicine and biology* **768**: 23-43
- Jakymiw A, Lian S, Eystathioy T, Li S, Satoh M, Hamel JC, Fritzler MJ, Chan EK (2005) Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nature cell biology* **7**: 1267-1274
- Janeway CA, Beutler L, Melnick M, Rajewsky K (2002) *Immunologie*, 5. Aufl. edn. Heidelberg [u.a.]: Spektrum.
- Jiao X, Chen H, Chen J, Herrup K, Firestein BL, Kiledjian M (2009) Modulation of neuritogenesis by a protein implicated in X-linked mental retardation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**: 12419-12427
- Jiao X, Wang Z, Kiledjian M (2006) Identification of an mRNA-decapping regulator implicated in X-linked mental retardation. *Molecular cell* **24**: 713-722
- Jinek M, Eulalio A, Lingel A, Helms S, Conti E, Izaurralde E (2008) The C-terminal region of Ge-1 presents conserved structural features required for P-body localization. *RNA* **14**: 1991-1998
- Johnson ME, Grasseti AV, Taroni JN, Lyons SM, Schweppe D, Gordon JK, Spiera RF, Lafyatis R, Anderson PJ, Gerber SA, Whitfield ML (2016) Stress granules and RNA processing bodies are novel autoantibody targets in systemic sclerosis. *Arthritis research & therapy* **18**: 27
- Jonas S, Izaurralde E (2013) The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes & development* **27**: 2628-2641
- Jonas S, Izaurralde E (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature reviews Genetics* **16**: 421-433
- Jones SA (2005) Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* **175**: 3463-3468
- Kabadi AM, Ousterout DG, Hilton IB, Gersbach CA (2014) Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic acids research* **42**: e147
- Kanayama A, Seth RB, Sun L, Ea CK, Hong M, Shaito A, Chiu YH, Deng L, Chen ZJ (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Molecular cell* **15**: 535-548
- Kasahara T, Mukaida N, Yamashita K, Yagisawa H, Akahoshi T, Matsushima K (1991) IL-1 and TNF-alpha induction of IL-8 and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF) mRNA expression in a human astrocytoma cell line. *Immunology* **74**: 60-67

- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology* **169**: 871-884
- Kimball SR, Horetsky RL, Ron D, Jefferson LS, Harding HP (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *American journal of physiology Cell physiology* **284**: C273-284
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J (2007) *Kuby immunology*, 6. edn. New York, NY: Freeman.
- Kiss DL, Oman KM, Dougherty JA, Mukherjee C, Bundschuh R, Schoenberg DR (2016) Cap homeostasis is independent of poly(A) tail length. *Nucleic acids research* **44**: 304-314
- Kleeff J, Kornmann M, Sawhney H, Korc M (2000) Actinomycin D induces apoptosis and inhibits growth of pancreatic cancer cells. *International journal of cancer* **86**: 399-407
- Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W, Sassone-Corsi P (2006) The chromatoid body of male germ cells: similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 2647-2652
- Kroschwald S, Maharana S, Mateju D, Malinowska L, Nuske E, Poser I, Richter D, Alberti S (2015) Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules. *eLife* **4**: e06807
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lai T, Cho H, Liu Z, Bowler MW, Piao S, Parker R, Kim YK, Song H (2012) Structural Basis of the PNRC2-Mediated Link between mRNA Surveillance and Decapping. *Structure*
- Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stutz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM (2013) The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda)* **3**: 1213-1224
- Lavut A, Raveh D (2012) Sequestration of highly expressed mRNAs in cytoplasmic granules, P-bodies, and stress granules enhances cell viability. *PLoS genetics* **8**: e1002527
- Li Y, Dai J, Song M, Fitzgerald-Bocarsly P, Kiledjian M (2012) Dcp2 decapping protein modulates mRNA stability of the critical interferon regulatory factor (IRF) IRF-7. *Molecular and cellular biology* **32**: 1164-1172
- Li Y, Kiledjian M (2010) Regulation of mRNA decapping. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **1**: 253-265
- Li Y, Song MG, Kiledjian M (2008) Transcript-specific decapping and regulated stability by the human Dcp2 decapping protein. *Molecular and cellular biology* **28**: 939-948
- Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, 3rd, Parker R, Hannon GJ (2005a) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature cell biology* **7**: 1261-1266
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005b) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology* **7**: 719-723

- Liu S, Chen ZJ (2011) Expanding role of ubiquitination in NF-kappaB signaling. *Cell research* **21**: 6-21
- Lotan R, Bar-On VG, Harel-Sharvit L, Duek L, Melamed D, Choder M (2005) The RNA polymerase II subunit Rpb4p mediates decay of a specific class of mRNAs. *Genes & development* **19**: 3004-3016
- Lykke-Andersen J (2002) Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Molecular and cellular biology* **22**: 8114-8121
- Lykke-Andersen J, Wagner E (2005) Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes & development* **19**: 351-361
- Mahmoud L, Al-Enezi F, Al-Saif M, Warsy A, Khabar KS, Hitti EG (2014) Sustained stabilization of Interleukin-8 mRNA in human macrophages. *RNA biology* **11**: 124-133
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**: 823-826
- Mauer J, Luo X, Blanjoie A, Jiao X, Grozhik AV, Patil DP, Linder B, Pickering BF, Vasseur JJ, Chen Q, Gross SS, Elemento O, Debart F, Kiledjian M, Jaffrey SR (2017) Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature* **541**: 371-375
- Mbalaviele G, Sommers CD, Bonar SL, Mathialagan S, Schindler JF, Guzova JA, Shaffer AF, Melton MA, Christine LJ, Tripp CS, Chiang PC, Thompson DC, Hu Y, Kishore N (2009) A novel, highly selective, tight binding IkappaB kinase-2 (IKK-2) inhibitor: a tool to correlate IKK-2 activity to the fate and functions of the components of the nuclear factor-kappaB pathway in arthritis-relevant cells and animal models. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **329**: 14-25
- Miki TS, Grosshans H (2013) The multifunctional RNase XRN2. *Biochemical Society transactions* **41**: 825-830
- Mildvan AS, Xia Z, Azurmendi HF, Saraswat V, Legler PM, Massiah MA, Gabelli SB, Bianchet MA, Kang LW, Amzel LM (2005) Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. *Archives of biochemistry and biophysics* **433**: 129-143
- Mitchell SF, Jain S, She M, Parker R (2013) Global analysis of yeast mRNPs. *Nature structural & molecular biology* **20**: 127-133
- Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**: 1514-1518
- Mugridge JS, Ziemniak M, Jemielity J, Gross JD (2016) Structural basis of mRNA-cap recognition by Dcp1-Dcp2. *Nature structural & molecular biology*
- Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K (1994) Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *Journal of leukocyte biology* **56**: 554-558
- Mukherjee C, Patil DP, Kennedy BA, Bakthavachalu B, Bundschuh R, Schoenberg DR (2012) Identification of cytoplasmic capping targets reveals a role for cap homeostasis in translation and mRNA stability. *Cell reports* **2**: 674-684

- Mukherjee D, Gao M, O'Connor JP, Rajmakers R, Pruijn G, Lutz CS, Wilusz J (2002) The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *The EMBO journal* **21**: 165-174
- Nagarajan VK, Jones CI, Newbury SF, Green PJ (2013) XRN 5'→3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochimica et biophysica acta* **1829**: 590-603
- Nakamura A, Amikura R, Hanyu K, Kobayashi S (2001) Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during Drosophila oogenesis. *Development* **128**: 3233-3242
- Natoli G, Sacconi S, Bosisio D, Marazzi I (2005) Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. *Nature immunology* **6**: 439-445
- Nishihara T, Zekri L, Braun JE, Izaurralde E (2013) miRISC recruits decapping factors to miRNA targets to enhance their degradation. *Nucleic acids research*
- Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B (1971) The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *The Journal of biological chemistry* **246**: 174-181
- Otsuka Y, Kedersha NL, Schoenberg DR (2009) Identification of a cytoplasmic complex that adds a cap onto 5'-monophosphate RNA. *Molecular and cellular biology* **29**: 2155-2167
- Parker R, Sheth U (2007) P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular cell* **25**: 635-646
- Parker R, Song H (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature structural & molecular biology* **11**: 121-127
- Perkins ND (2012) The diverse and complex roles of NF-kappaB subunits in cancer. *Nature reviews Cancer* **12**: 121-132
- Piccirillo C, Khanna R, Kiledjian M (2003) Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2. *RNA* **9**: 1138-1147
- Piccirillo CA, Bjur E, Topisirovic I, Sonenberg N, Larsson O (2014) Translational control of immune responses: from transcripts to translomes. *Nature immunology* **15**: 503-511
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* **309**: 1573-1576
- Player AN, Shen LP, Kenny D, Antao VP, Kolberg JA (2001) Single-copy gene detection using branched DNA (bDNA) in situ hybridization. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **49**: 603-612
- Rajgor D, Mellad JA, Soong D, Rattner JB, Fritzler MJ, Shanahan CM (2014) Mammalian microtubule P-body dynamics are mediated by nesprin-1. *The Journal of cell biology* **205**: 457-475
- Ramachandran V, Shah KH, Herman PK (2011) The cAMP-dependent protein kinase signaling pathway is a key regulator of P body foci formation. *Molecular cell* **43**: 973-981

- Ramanathan A, Robb GB, Chan SH (2016) mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic acids research* **44**: 7511-7526
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols* **8**: 2281-2308
- Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E (2005) A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* **11**: 1640-1647
- Reines D (2012) Decapping goes nuclear. *Molecular cell* **46**: 241-242
- Richter JD, Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**: 477-480
- Roitt IM, Delves PJ, Martin SJ, Burton DR (2011) *Roitt's essential immunology*, 12. edn. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Rzeczkowski K, Beuerlein K, Muller H, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Kettner-Buhrow D, Holtmann H, Kracht M (2011) c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies. *The Journal of cell biology* **194**: 581-596
- Salmeen I, Zacmanidis P, Jesion G, Feldkamp LA (1985) Motion of mitochondria in cultured cells quantified by analysis of digitized images. *Biophysical journal* **48**: 681-686
- Savas JN, Makusky A, Ottosen S, Baillat D, Then F, Krainc D, Shiekhattar R, Markey SP, Tanese N (2008) Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing through association with Argonaute and P bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 10820-10825
- Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M (2004) NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **5**: 1348-1358
- Schmitz ML, Weber A, Roxlau T, Gaestel M, Kracht M (2011) Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. *Biochimica et biophysica acta* **1813**: 2165-2175
- Schoenberg DR, Maquat LE (2009) Re-capping the message. *Trends in biochemical sciences* **34**: 435-442
- Schoenberg DR, Maquat LE (2012) Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature reviews Genetics* **13**: 246-259
- Schreuder H, Tardif C, Trump-Kallmeyer S, Soffientini A, Sarubbi E, Akeson A, Bowlin T, Yanofsky S, Barrett RW (1997) A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *Nature* **386**: 194-200
- Schutz S, Noldeke ER, Sprangers R (2017) A synergistic network of interactions promotes the formation of in vitro processing bodies and protects mRNA against decapping. *Nucleic acids research*
- Schwartz D, Decker CJ, Parker R (2003) The enhancer of decapping proteins, Edc1p and Edc2p, bind RNA and stimulate the activity of the decapping enzyme. *RNA* **9**: 239-251

- Schwartz DC, Parker R (2000) mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology* **20**: 7933-7942
- Segal SP, Dunkley T, Parker R (2006) Sbp1p affects translational repression and decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **26**: 5120-5130
- Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature cell biology* **7**: 633-636
- Seto E, Yoshida-Sugitani R, Kobayashi T, Toyama-Sorimachi N (2015) The Assembly of EDC4 and Dcp1a into Processing Bodies Is Critical for the Translational Regulation of IL-6. *PLoS one* **10**: e0123223
- Sfakianos AP, Whitmarsh AJ, Ashe MP (2016) Ribonucleoprotein bodies are phased in. *Biochemical Society transactions* **44**: 1411-1416
- Shatkin AJ (1976) Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* **9**: 645-653
- She M, Decker CJ, Sundramurthy K, Liu Y, Chen N, Parker R, Song H (2004) Crystal structure of Dcp1p and its functional implications in mRNA decapping. *Nature structural & molecular biology* **11**: 249-256
- She M, Decker CJ, Svergun DI, Round A, Chen N, Muhlrad D, Parker R, Song H (2008) Structural basis of dcp2 recognition and activation by dcp1. *Molecular cell* **29**: 337-349
- Sheth U, Parker R (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**: 805-808
- Sheth U, Parker R (2006) Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* **125**: 1095-1109
- Shim JH, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS, Lee KY, 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 & development* **19**: 2668-2681
- Shuman S (1995) Capping enzyme in eukaryotic mRNA synthesis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **50**: 101-129
- Simpson CE, Lui J, Kershaw CJ, Sims PF, Ashe MP (2014) mRNA localization to P-bodies in yeast is bi-phasic with many mRNAs captured in a late Bfr1p-dependent wave. *Journal of cell science*
- Singh S, Singh PK, Bhadauriya P, Ganesh S (2012) Lafora disease E3 ubiquitin ligase malin is recruited to the processing bodies and regulates the microRNA-mediated gene silencing process via the decapping enzyme Dcp1a. *RNA biology* **9**: 1440-1449
- Smahi A, Courtois G, Rabia SH, Doffinger R, Bodemer C, Munnich A, Casanova JL, Israel A (2002) The NF-kappaB signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Human molecular genetics* **11**: 2371-2375
- Sobell HM (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 5328-5331

- Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature methods* **3**: 995-1000
- Song MG, Li Y, Kiledjian M (2010) Multiple mRNA decapping enzymes in mammalian cells. *Molecular cell* **40**: 423-432
- Spitzer J, Hafner M, Landthaler M, Ascano M, Farazi T, Wardle G, Nusbaum J, Khorshid M, Burger L, Zavolan M, Tuschl T (2014) PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation): a Step-By-Step Protocol to the Transcriptome-Wide Identification of Binding Sites of RNA-Binding Proteins. *Methods in enzymology* **539**: 113-161
- Staleva L, Hall A, Orlow SJ (2004) Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent Manner. *Molecular biology of the cell* **15**: 5574-5582
- Steiger M, Carr-Schmid A, Schwartz DC, Kiledjian M, Parker R (2003) Analysis of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA* **9**: 231-238
- Stoecklin G, Mayo T, Anderson P (2006) ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. *EMBO reports* **7**: 72-77
- Stumpo DJ, Lai WS, Blackshear PJ (2010) Inflammation: cytokines and RNA-based regulation. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **1**: 60-80
- Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC (1993) NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259**: 1912-1915
- Tarantino N, Tinevez JY, Crowell EF, Boisson B, Henriques R, Mhlanga M, Agou F, Israel A, Laplantine E (2014) TNF and IL-1 exhibit distinct ubiquitin requirements for inducing NEMO-IKK supramolecular structures. *The Journal of cell biology* **204**: 231-245
- Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* **11**: 371-382
- Tenekeci U, Poppe M, Beuerlein K, Buro C, Muller H, Weiser H, Kettner-Buhrow D, Porada K, Newel D, Xu M, Chen ZJ, Busch J, Schmitz ML, Kracht M (2016) K63-Ubiquitylation and TRAF6 Pathways Regulate Mammalian P-Body Formation and mRNA Decapping. *Molecular cell* **62**: 943-957
- Tharun S, Parker R (2001) Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Molecular cell* **8**: 1075-1083
- Tiedje C, Diaz-Munoz MD, Trulley P, Ahlfors H, Laass K, Blackshear PJ, Turner M, Gaestel M (2016) The RNA-binding protein TTP is a global post-transcriptional regulator of feedback control in inflammation. *Nucleic acids research*
- Toh ML, Yang Y, Leech M, Santos L, Morand EF (2004) Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, a negative regulator of the mitogen-activated protein kinases, in rheumatoid arthritis: up-regulation by interleukin-1beta and glucocorticoids. *Arthritis and rheumatism* **50**: 3118-3128

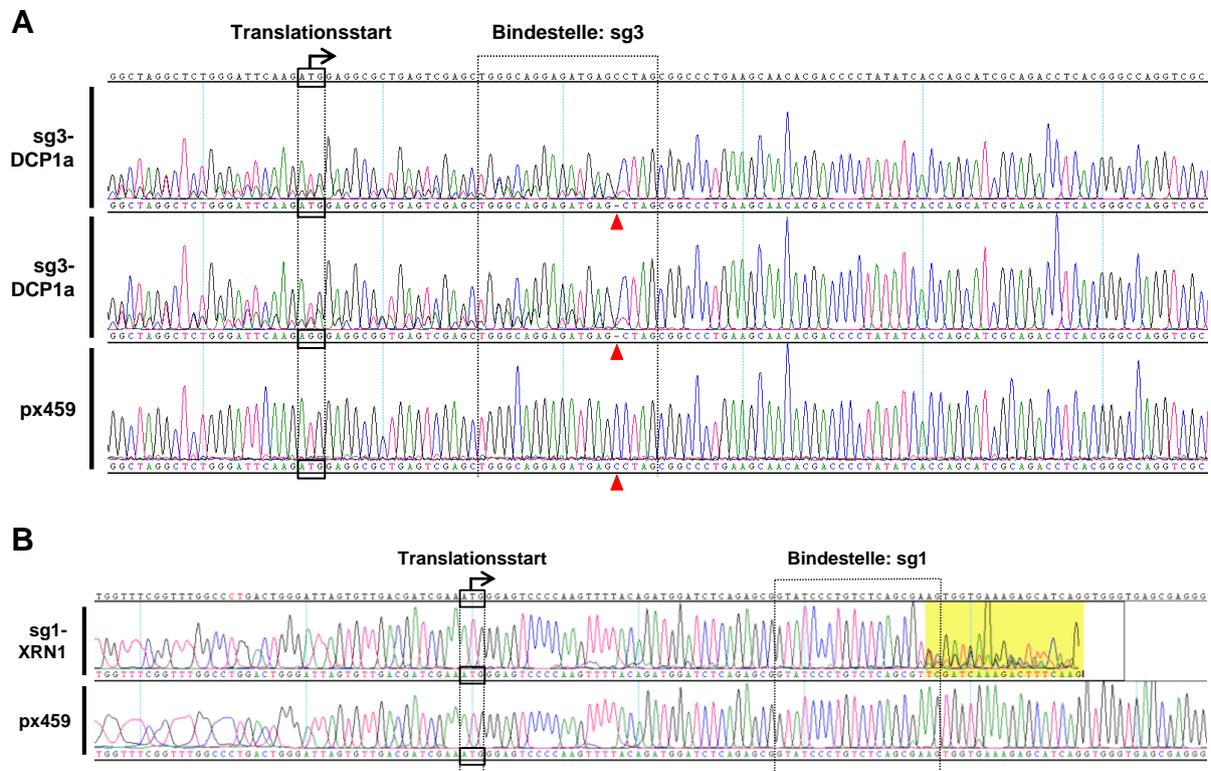
- Topisirovic I, Svitkin YV, Sonenberg N, Shatkin AJ (2011) Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **2**: 277-298
- Tritschler F, Braun JE, Motz C, Igreja C, Haas G, Truffault V, Izaurralde E, Weichenrieder O (2009) DCP1 forms asymmetric trimers to assemble into active mRNA decapping complexes in metazoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 21591-21596
- Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S (1996) Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *Journal of biochemistry* **119**: 572-576
- Unterholzner L, Izaurralde E (2004) SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Molecular cell* **16**: 587-596
- Valkov E, Jonas S, Weichenrieder O (2017) Mille viae in eukaryotic mRNA decapping. *Current opinion in structural biology* **47**: 40-51
- Valkov E, Muthukumar S, Chang CT, Jonas S, Weichenrieder O, Izaurralde E (2016) Structure of the Dcp2-Dcp1 mRNA-decapping complex in the activated conformation. *Nature structural & molecular biology*
- van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Seraphin B (2002) Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *The EMBO journal* **21**: 6915-6924
- Vigers GP, Anderson LJ, Caffes P, Brandhuber BJ (1997) Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. *Nature* **386**: 190-194
- Wang D, Zhang S, Li L, Liu X, Mei K, Wang X (2010) Structural insights into the assembly and activation of IL-1beta with its receptors. *Nature immunology* **11**: 905-911
- Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* **343**: 80-84
- Wang X, Chang L, Wang H, Su A, Wu Z (2017) Dcp1a and GW182 Induce Distinct Cellular Aggregates and Have Different Effects on microRNA Pathway. *DNA and cell biology*
- Wang Z, Jiao X, Carr-Schmid A, Kiledjian M (2002) The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 12663-12668
- Wasserman T, Katsenelson K, Daniliuc S, Hasin T, Choder M, Aronheim A (2010) A novel c-Jun N-terminal kinase (JNK)-binding protein WDR62 is recruited to stress granules and mediates a nonclassical JNK activation. *Molecular biology of the cell* **21**: 117-130
- Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010) Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science signaling* **3**
- Weibrecht I, Leuchowius KJ, Clausson CM, Conze T, Jarvius M, Howell WM, Kamali-Moghaddam M, Soderberg O (2010) Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert review of proteomics* **7**: 401-409
- Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D (2005) The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *Journal of cell science* **118**: 981-992

- Wu MH, Yung BY (1994) Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of actinomycin D in HeLa cells. *European journal of pharmacology* **270**: 203-212
- Wurm JP, Holdermann I, Overbeck JH, Mayer PHO, Sprangers R (2017) Changes in conformational equilibria regulate the activity of the Dcp2 decapping enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
- Xiang S, Cooper-Morgan A, Jiao X, Kiledjian M, Manley JL, Tong L (2009) Structure and function of the 5'→3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Nature* **458**: 784-788
- Xu M, Skaug B, Zeng W, Chen ZJ (2009) A ubiquitin replacement strategy in human cells reveals distinct mechanisms of IKK activation by TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Molecular cell* **36**: 302-314
- Yamashita A, Chang TC, Yamashita Y, Zhu W, Zhong Z, Chen CY, Shyu AB (2005) Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature structural & molecular biology* **12**: 1054-1063
- Yamazaki K, Gohda J, Kanayama A, Miyamoto Y, Sakurai H, Yamamoto M, Akira S, Hayashi H, Su B, Inoue J (2009) Two mechanistically and temporally distinct NF- $\kappa$ B activation pathways in IL-1 signaling. *Science signaling* **2**: ra66
- Yan Q, Xu K, Xing J, Zhang T, Wang X, Wei Z, Ren C, Liu Z, Shao S, Zhang Z (2016) Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering enhanced by Drosha-mediated sgRNA-shRNA structure. *Scientific reports* **6**: 38970
- Yang WH, Yu JH, Gulick T, Bloch KD, Bloch DB (2006) RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA* **12**: 547-554
- Yang Z, Jakymiw A, Wood MR, Eystathiou T, Rubin RL, Fritzler MJ, Chan EK (2004) GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *Journal of cell science* **117**: 5567-5578
- Yoon JH, Choi EJ, Parker R (2010) Dcp2 phosphorylation by Ste20 modulates stress granule assembly and mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* **189**: 813-827
- Yu JH, Yang WH, Gulick T, Bloch KD, Bloch DB (2005) Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* **11**: 1795-1802
- Zandi E, Karin M (1999) Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the I $\kappa$ B kinase complex. *Molecular and cellular biology* **19**: 4547-4551
- Zhang S, Williams CJ, Wormington M, Stevens A, Peltz SW (1999) Monitoring mRNA decapping activity. *Methods* **17**: 46-51
- Zheng D, Chen CY, Shyu AB (2011) Unraveling regulation and new components of human P-bodies through a protein interaction framework and experimental validation. *RNA* **17**: 1619-1634
- Zheng D, Ezzeddine N, Chen CY, Zhu W, He X, Shyu AB (2008) Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *The Journal of cell biology* **182**: 89-101

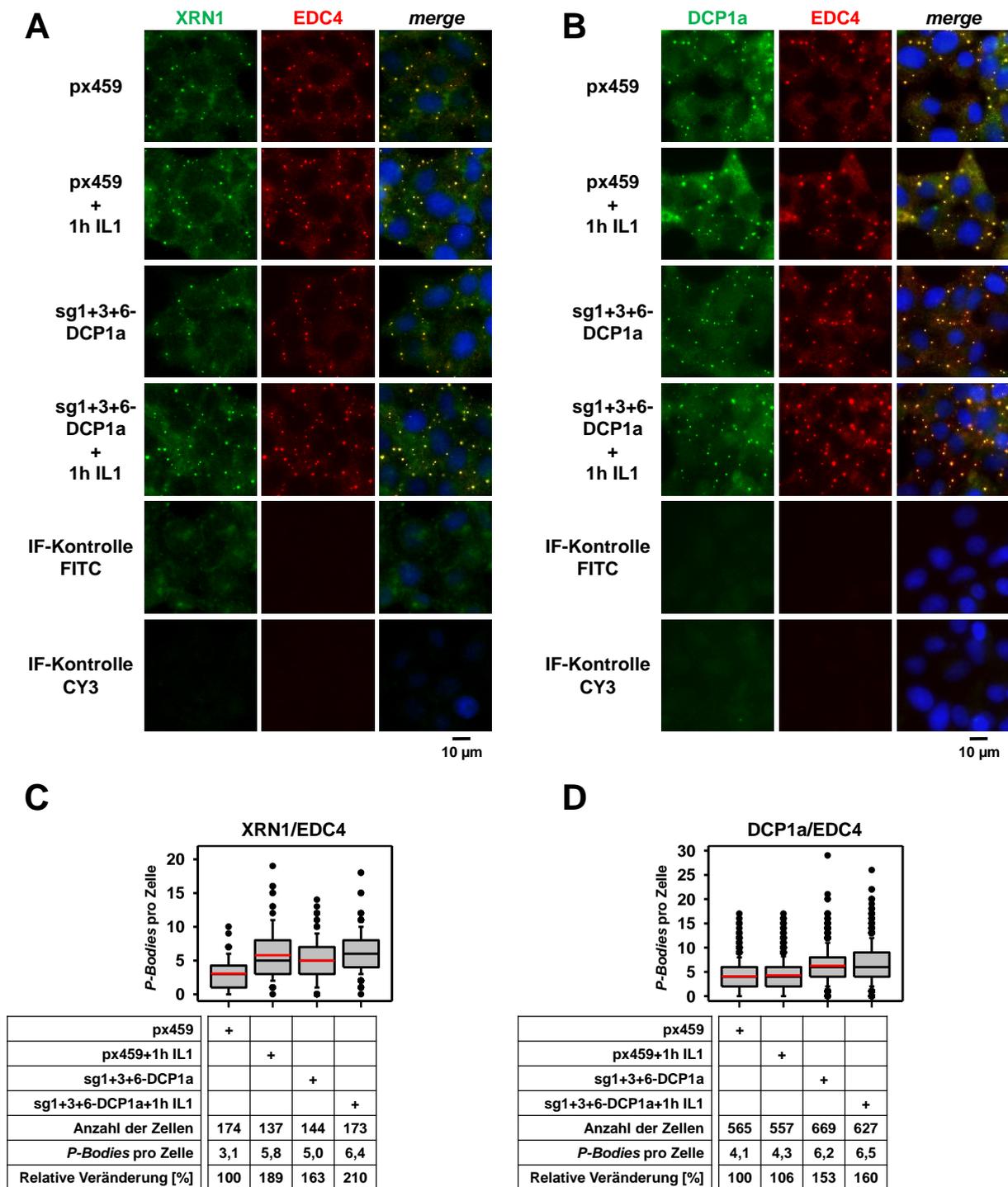
Zhu Q, Han X, Peng J, Qin H, Wang Y (2012) The role of CXC chemokines and their receptors in the progression and treatment of tumors. *Journal of molecular histology* **43**: 699-713

Zid BM, O'Shea EK (2014) Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast. *Nature*

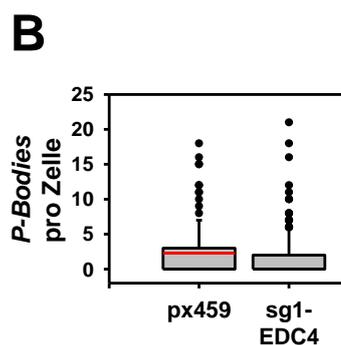
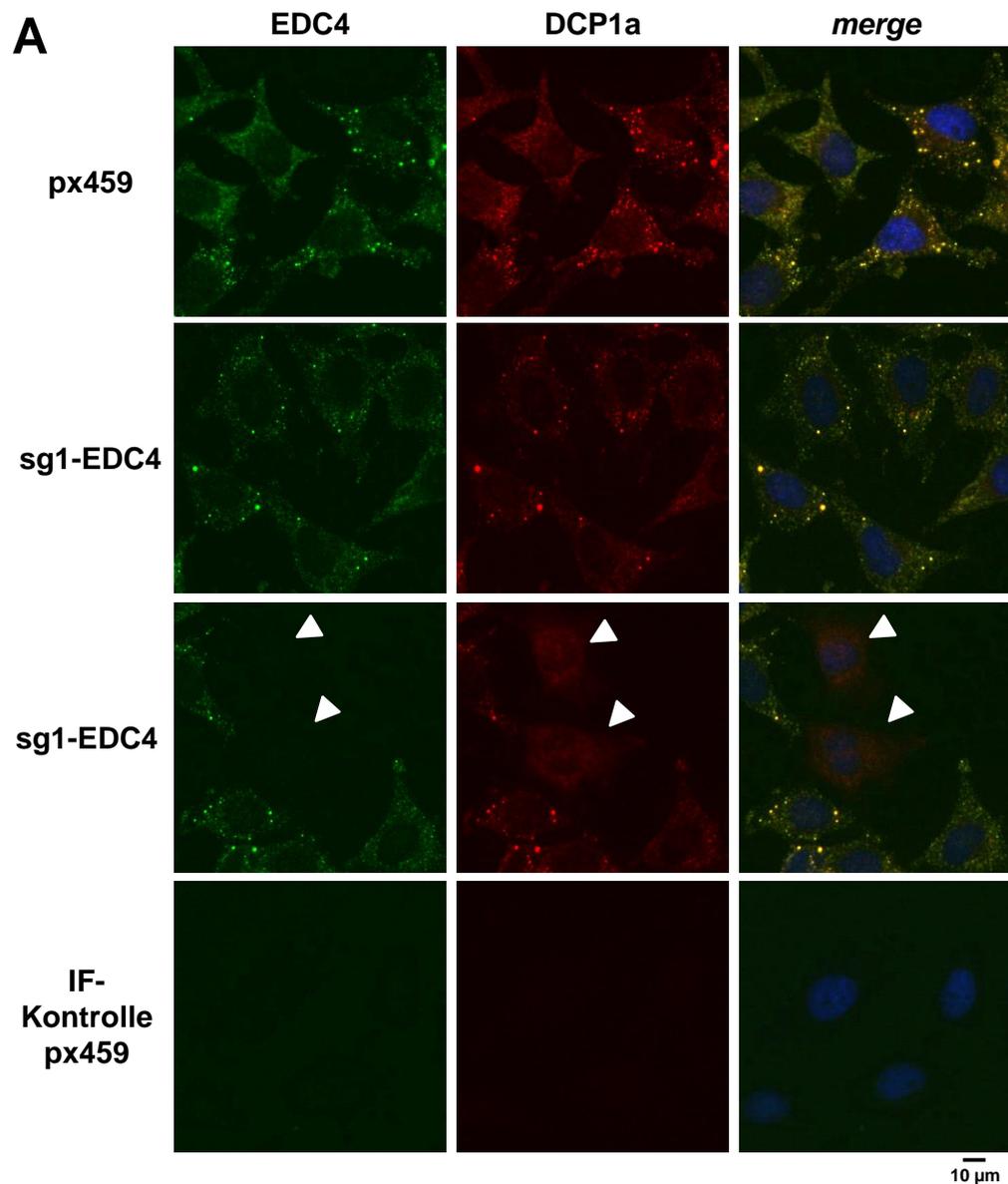
## 6. Anhang



**Abb.Anh.1: CRISPR/Cas9-vermittelte genomische Sequenzveränderungen.** Genomische DNA wurde aus HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (**A**, sg3-DCP1a) oder XRN1 (**B**, sg1-XRN1) und der Kontroll-Zelllinie (px459) isoliert. Anschließend wurde der genomische DNA-Lokus der Bindestelle der sgRNA durch PCR amplifiziert und das entstandene Amplikon durch Sanger-Sequenzierung sequenziert. Die Sequenzierung wurde durch die Firma LGC Genomics durchgeführt. Markiert sind der Translationsstart sowie die Sequenz der sgRNA-Bindestelle. Rote Dreiecke markieren zusätzlich Punktmutationen im CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (**A**, sg3-DCP1a).



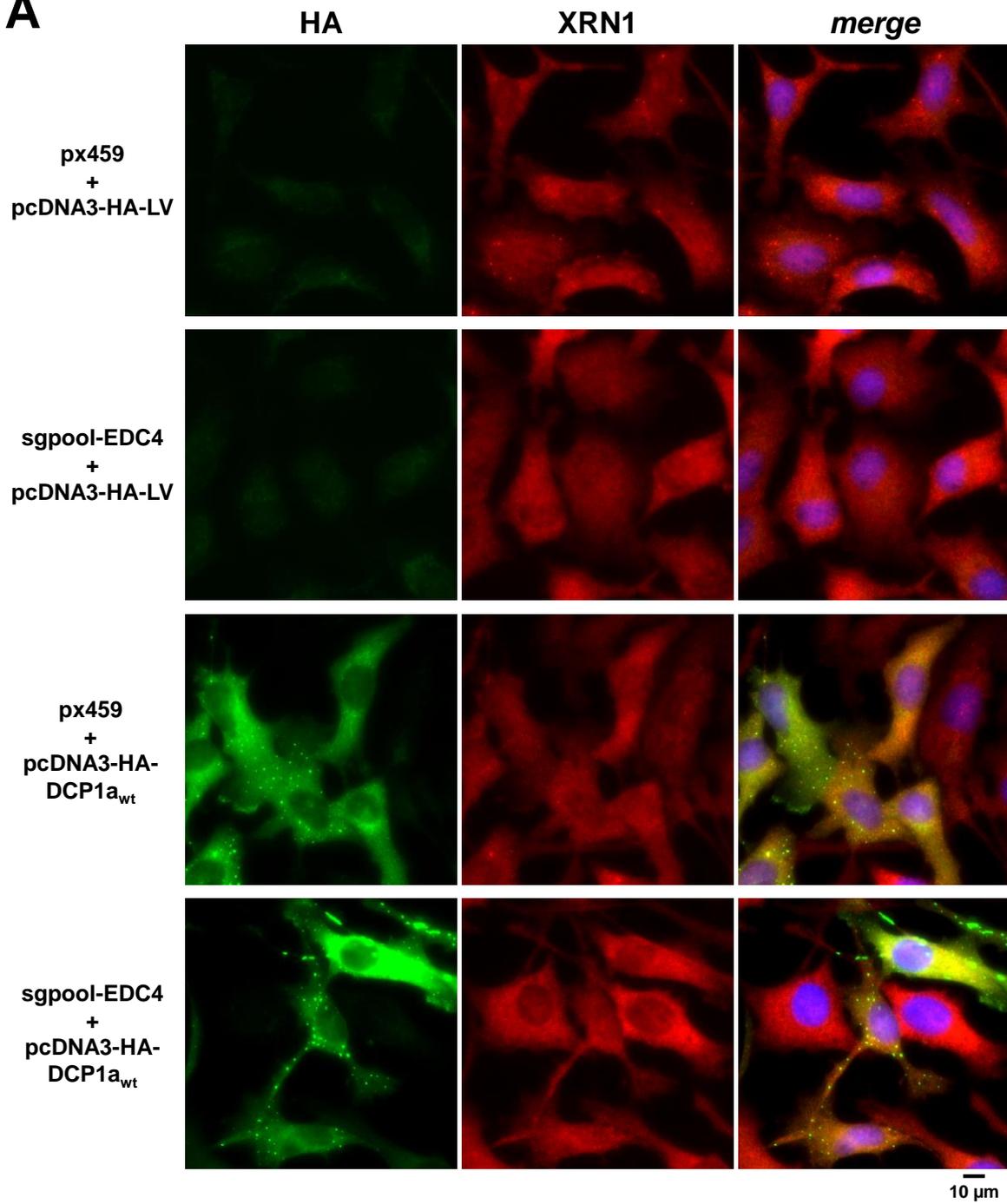
**Abb.Anh.2: Einfluss des DCP1a knockdowns auf die Assemblierung von *P-Bodies* in HEK293IL-1R-Zellen.** **A, B:** HEK293IL-1R-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg1+3+6-DCP1a) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unstimuliert verwendet. Anschließend erfolgte die Analyse des *P-Body*-Phänotyps durch indirekte Immunfluoreszenz mit XRN1- und EDC4-Antikörpern (**A**) und DCP1a- und EDC4-Antikörpern (**B**). **C, D:** Quantitative Darstellung der *P-Body*-Anzahlen pro Zelle der unterschiedlichen Antikörper-Kombinationen aus (**A**) und (**B**).

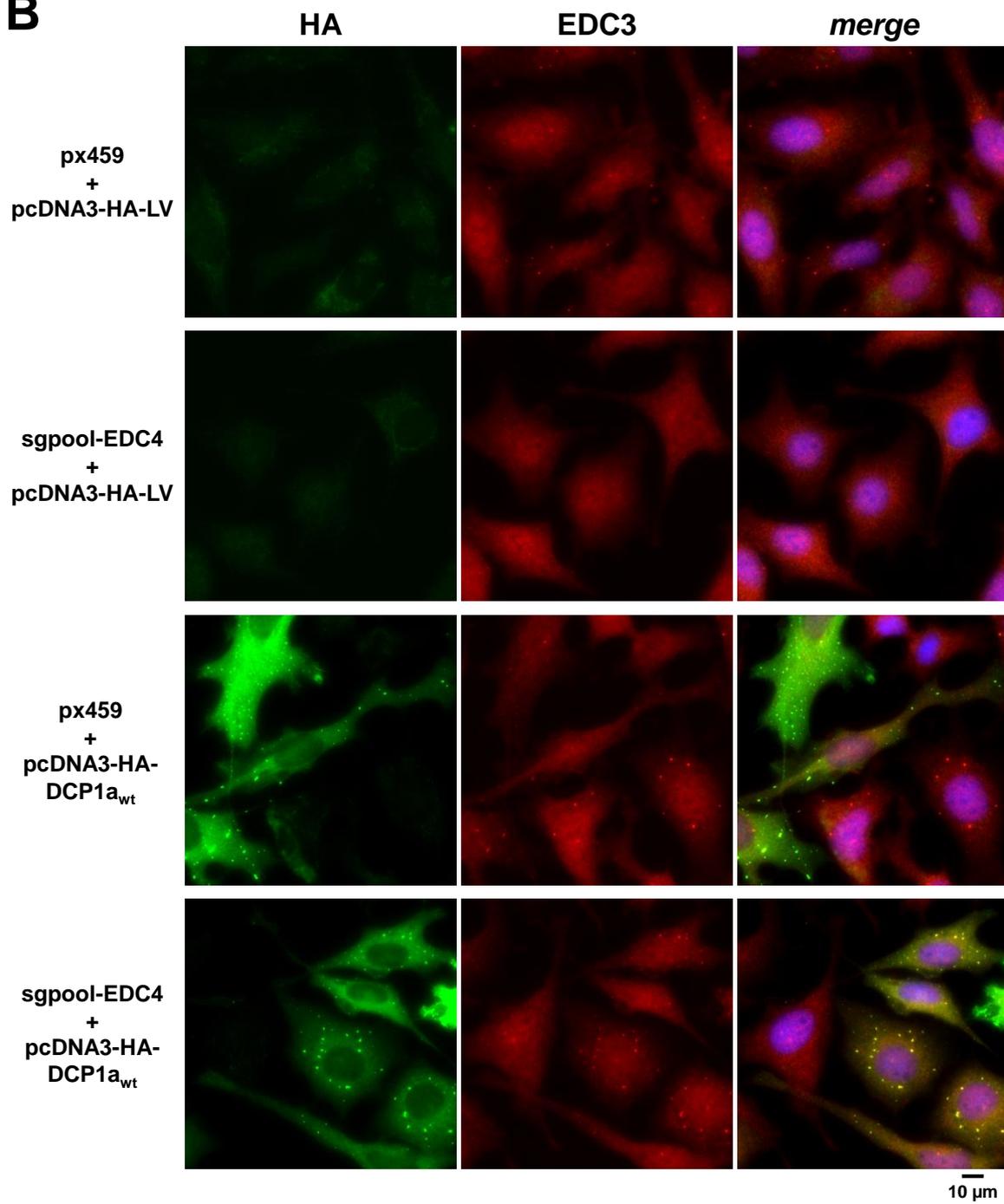


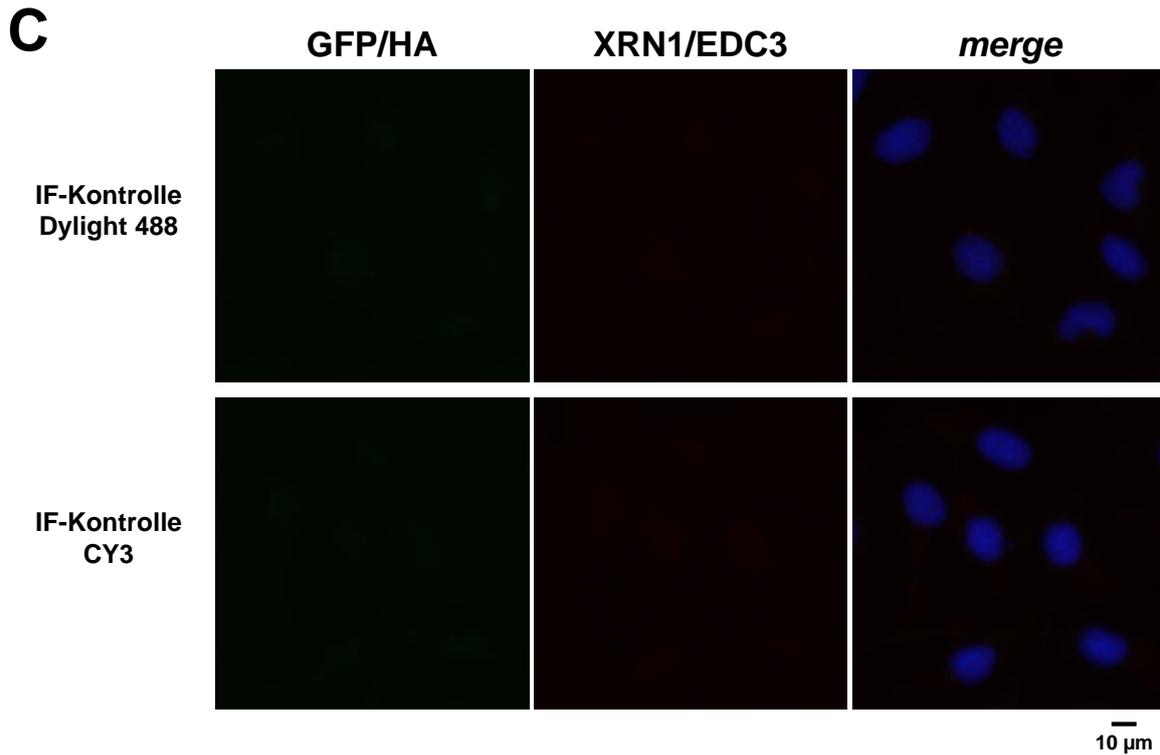
**C**

Zelltyp	IL-1 [h]	n=	<i>P</i> -Bodies pro Zelle
px459	-	155	2.3
sg1-EDC4	-	190	1.7

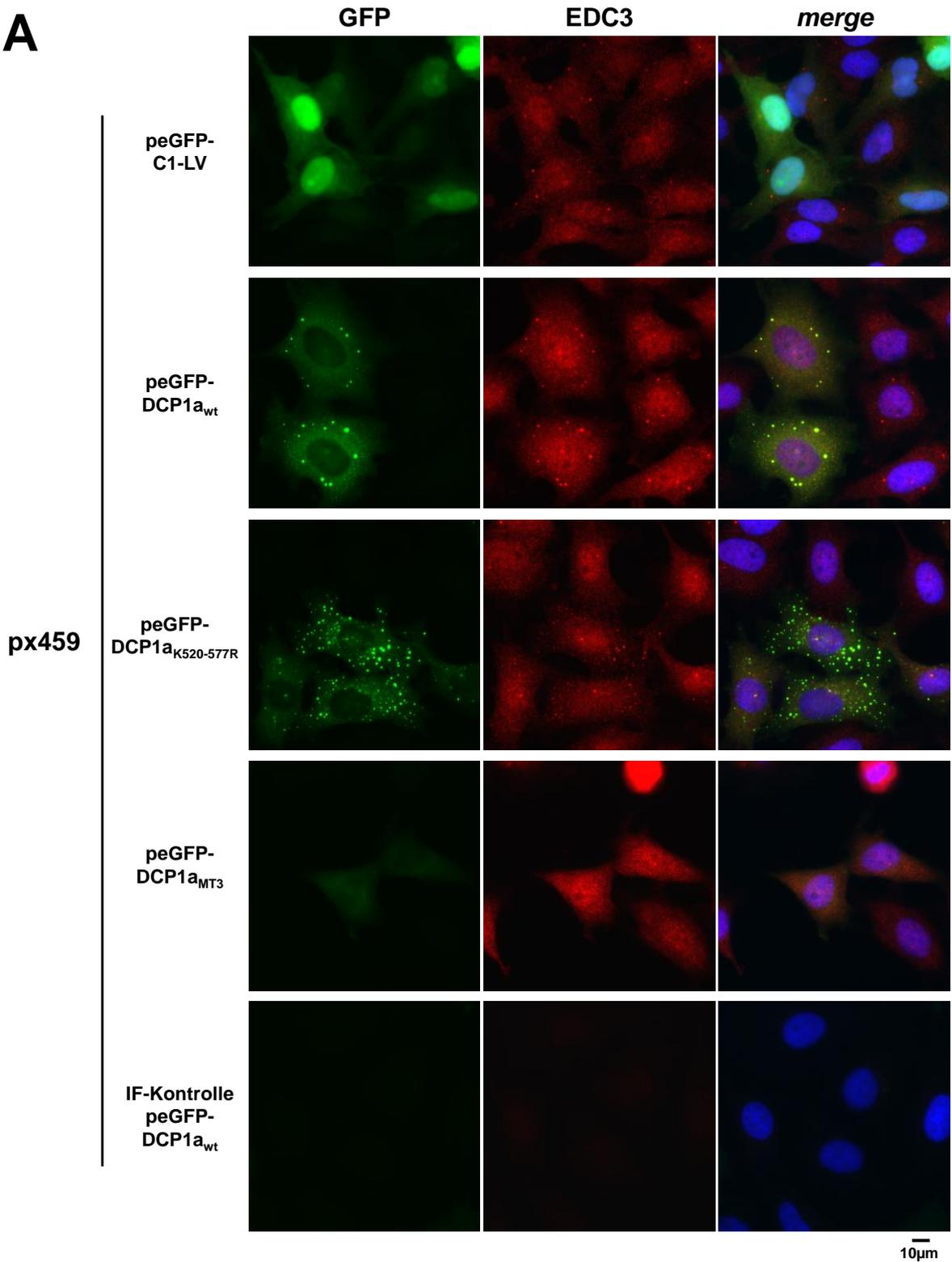
**Abb.Anh.3: Einfluss des EDC4 knockdowns auf die Assemblierung von *P*-Bodies.** **A:** Der *P*-Body-Phänotyp von HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem knockdown von EDC4 (sg1-EDC4) und der Kontroll-Zelllinie (px459) wurde durch eine indirekte Immunfluoreszenz mittels DCP1a- und EDC4-Antikörpern analysiert. Die Pfeile markieren Zellen mit einer sehr starken Verringerung der EDC4-Proteinmenge. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst33342. **B:** Quantitative Darstellung der *P*-Body-Anzahl pro Zelle (schwarzer Balken: Median; roter Balken: Mittelwert) der unterschiedlichen Versuchsansätze aus (A). **C:** Zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Zellzahlen und der *P*-Body-Anzahl pro Zelle (Mittelwert) zu den Versuchsansätzen aus (A).

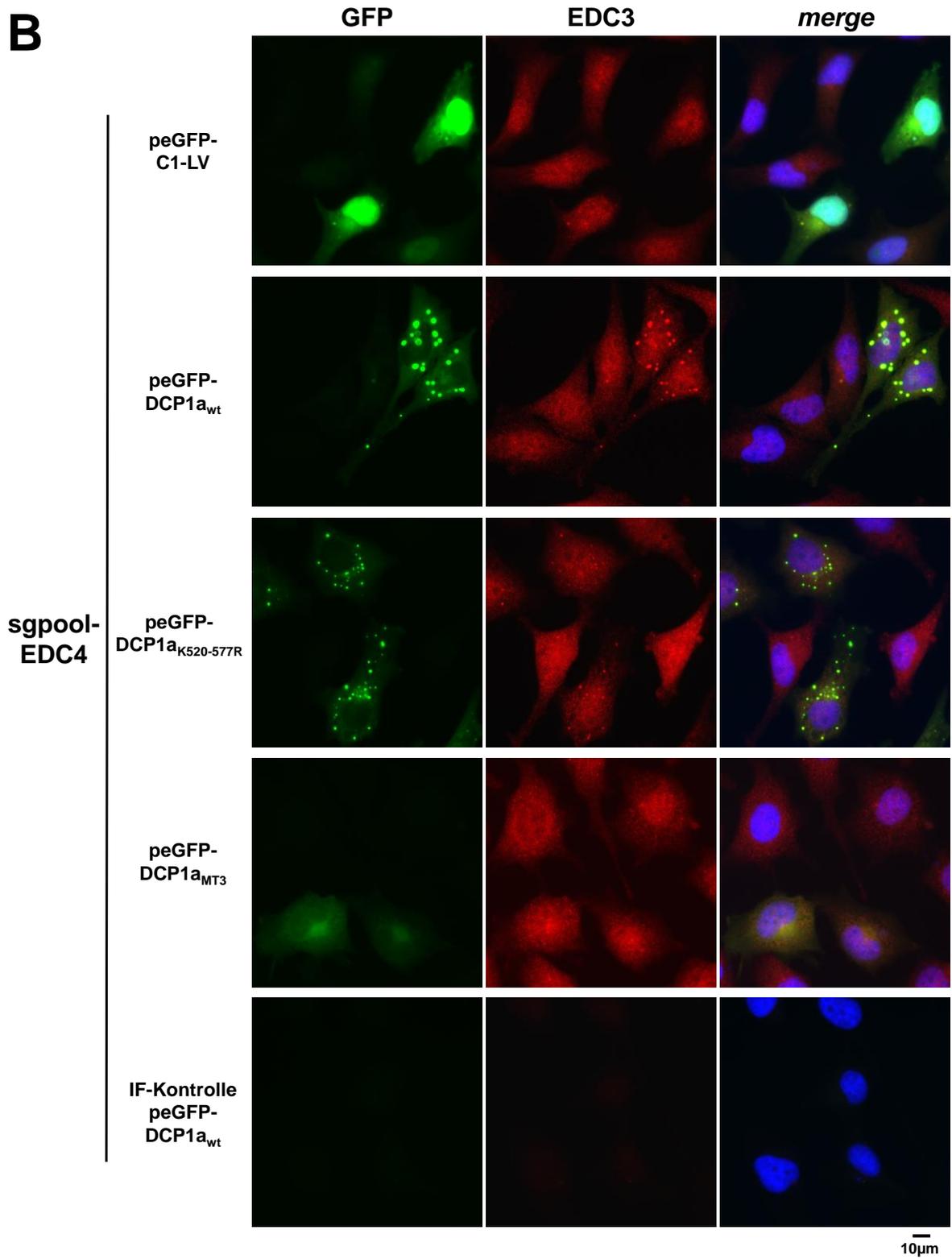
**A**

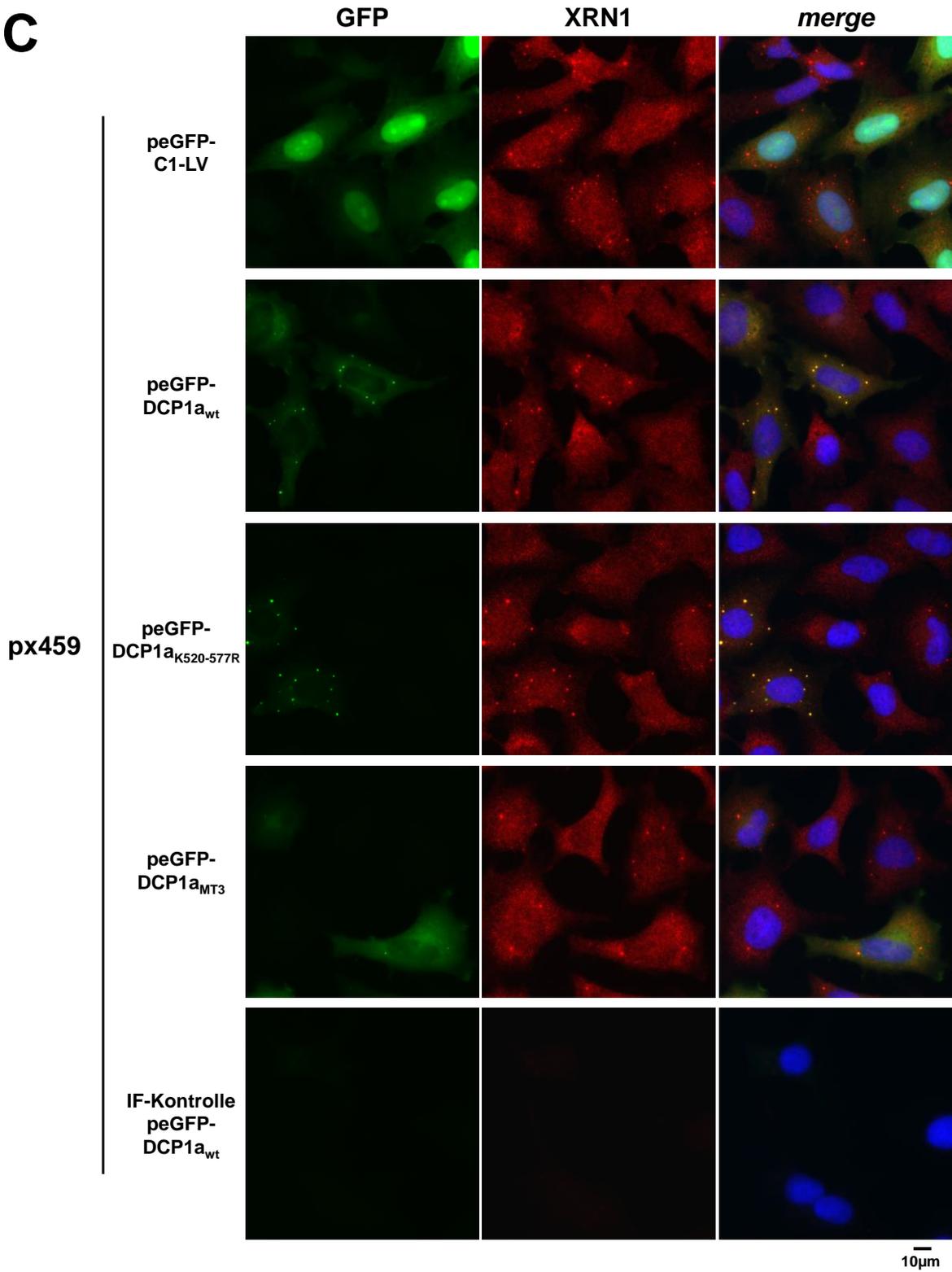
**B**

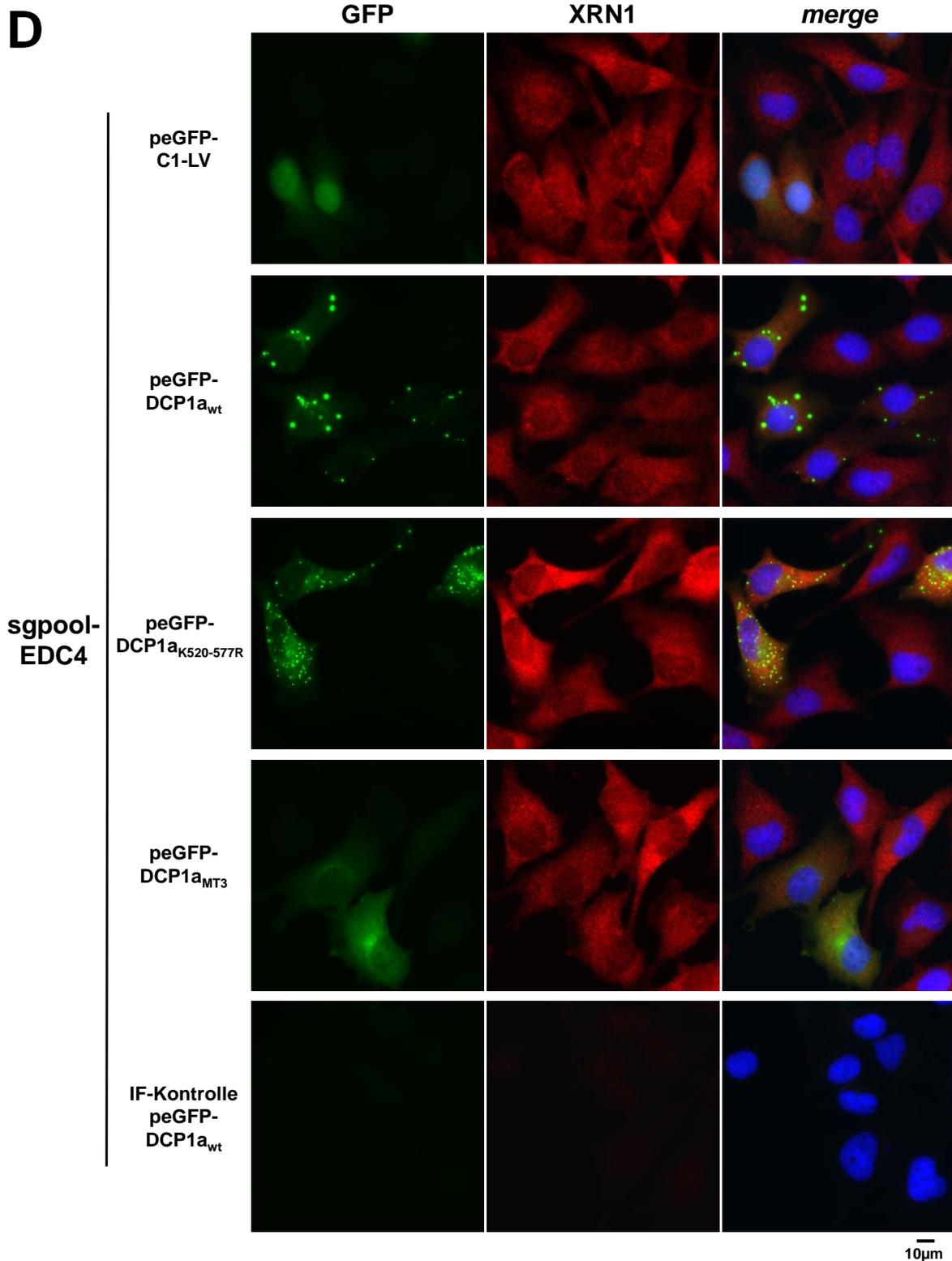


**Abb.Anh.4: Überexprimiertes HA-DCP1a kolokalisiert mit EDC3 auch in Abwesenheit von EDC4 in zytoplasmatischen *foci*.** HeLa Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von EDC4 (sgpool-EDC4) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden mit HA-DCP1a (pcDNA3-HA-DCP1a<sub>wt</sub>) sowie dem Kontrollvektor (pcDNA3-HA-LV) transfiziert. Anschließend wurde der *P-Body*-Phänotyp der transfizierten Zellen mittels einer indirekten Immunfluoreszenz (IF) unter der Verwendung von HA-Antikörper (**A**, **B**), XRN1-Antikörper (**A**) und EDC3-Antikörper (**B**) analysiert. Die IF-Kontrollen wurden ohne Primärantikörper durchgeführt (**C**).

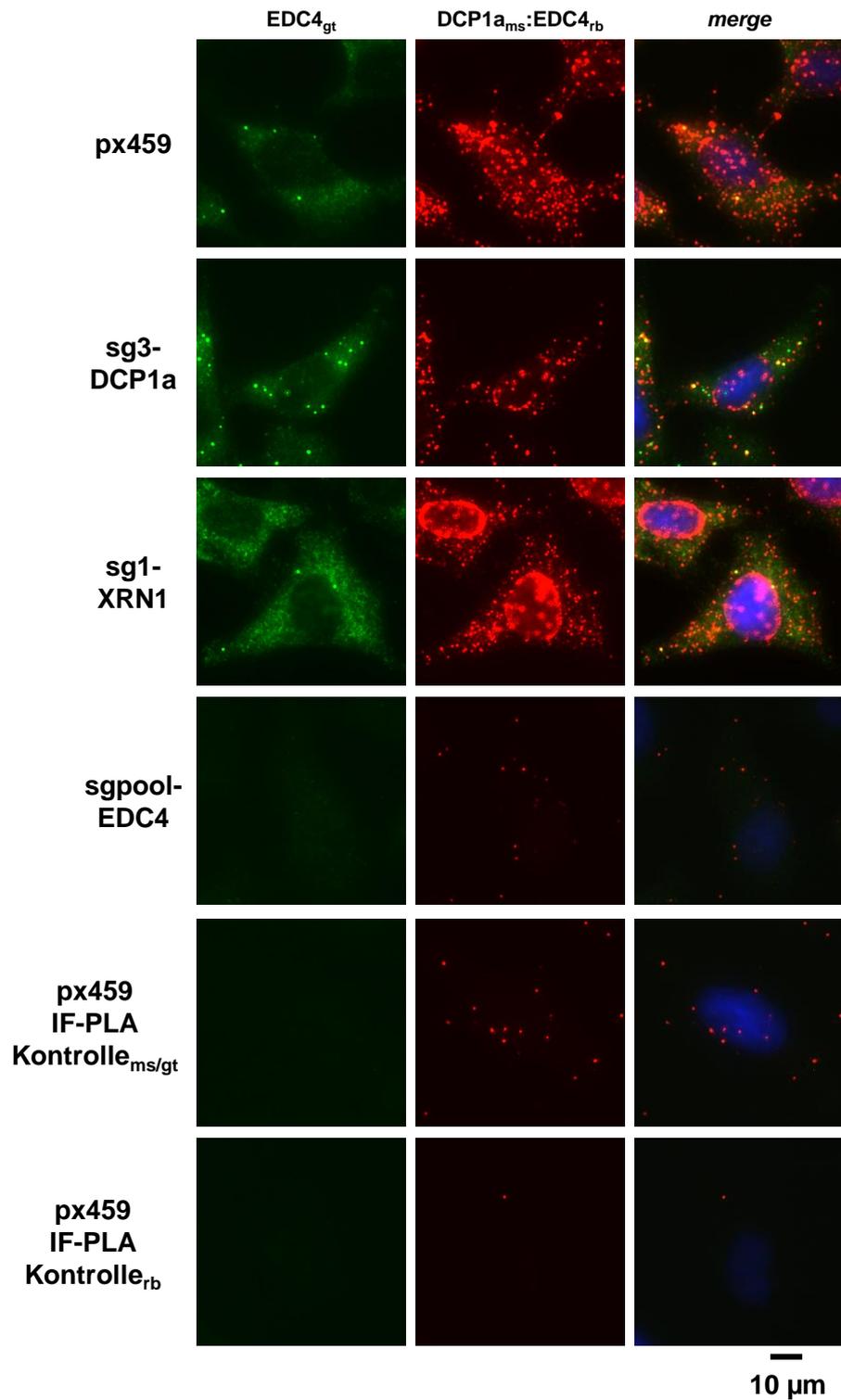
**A**

**B**

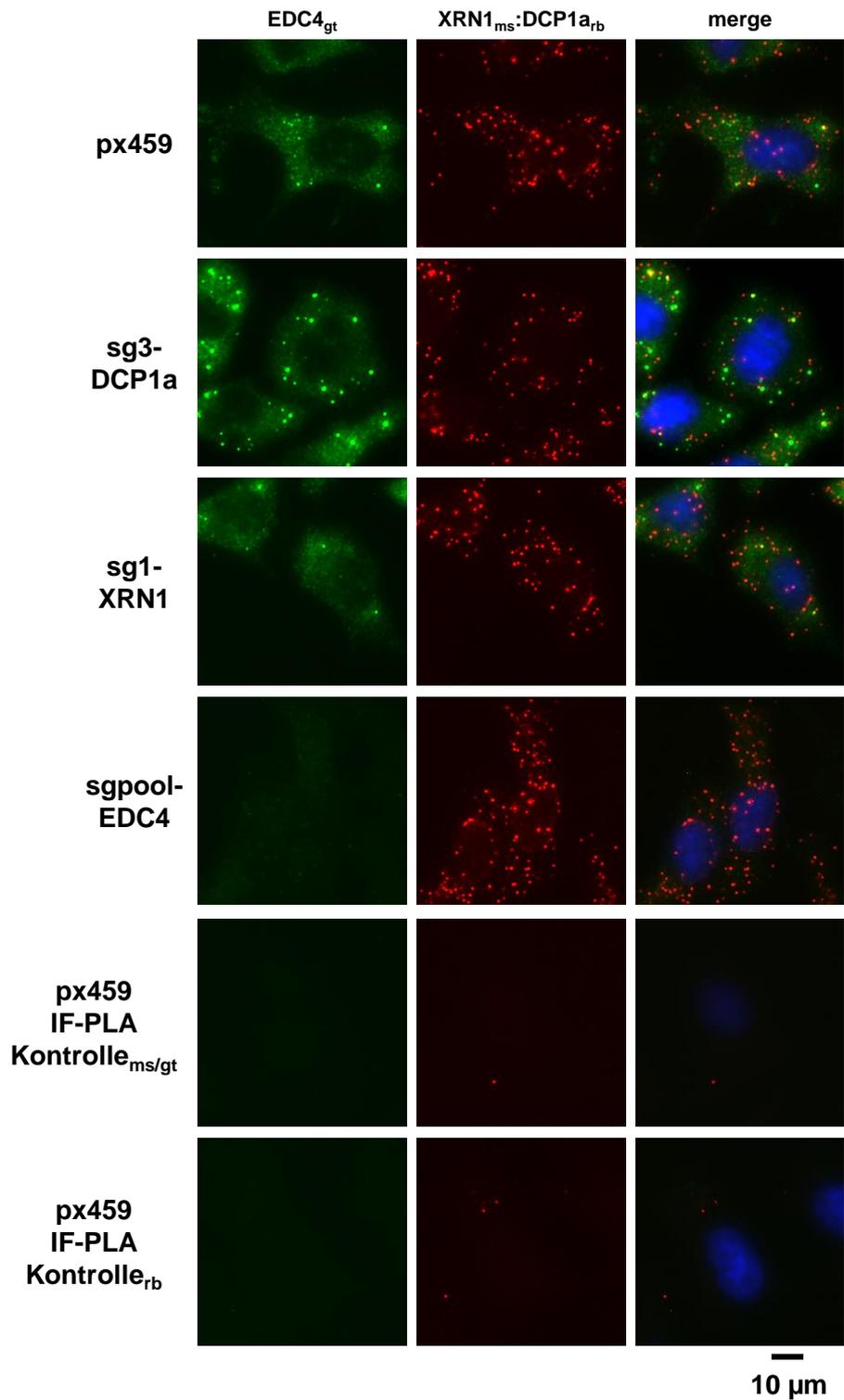
**C**



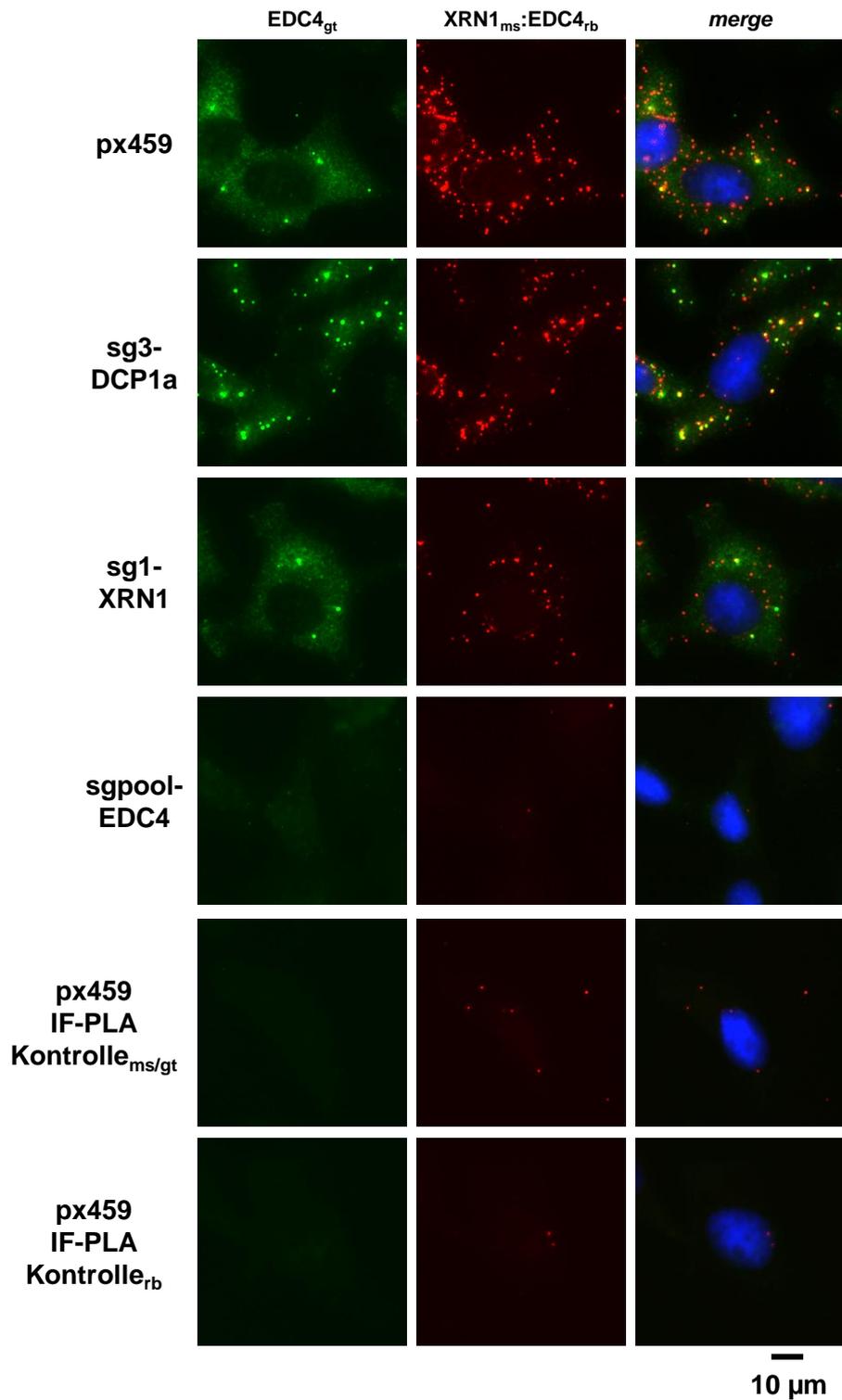
**Abb.Anh.5: Überexprimiertes GFP-DCP1a und dessen Varianten kolokalisieren mit EDC3 auch in Abwesenheit von EDC4 in zytoplasmatischen *foci*.** HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von EDC4 (sgpool-EDC4 (B), (D)) und die Kontroll-Zelllinie (px459 (A), (C)) wurden mit GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a<sub>wt</sub>) sowie den veränderten Varianten GFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub>(peGFP-DCP1a<sub>K520-577R</sub>) und GFP-DCP1a<sub>MT3</sub>(GFP-DCP1a<sub>MT3</sub>) und dem Kontrollvektor (peGFP-C1-LV) transfiziert. Anschließend wurde der *P-Body*-Phänotyp der transfizierten Zellen mittels einer indirekten Immunfluoreszenz unter der Verwendung von EDC3-Antikörper (A, B), XRN1-Antikörper (C, D) und der GFP-Eigenfluoreszenz analysiert. Die IF-Kontrollen wurden ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



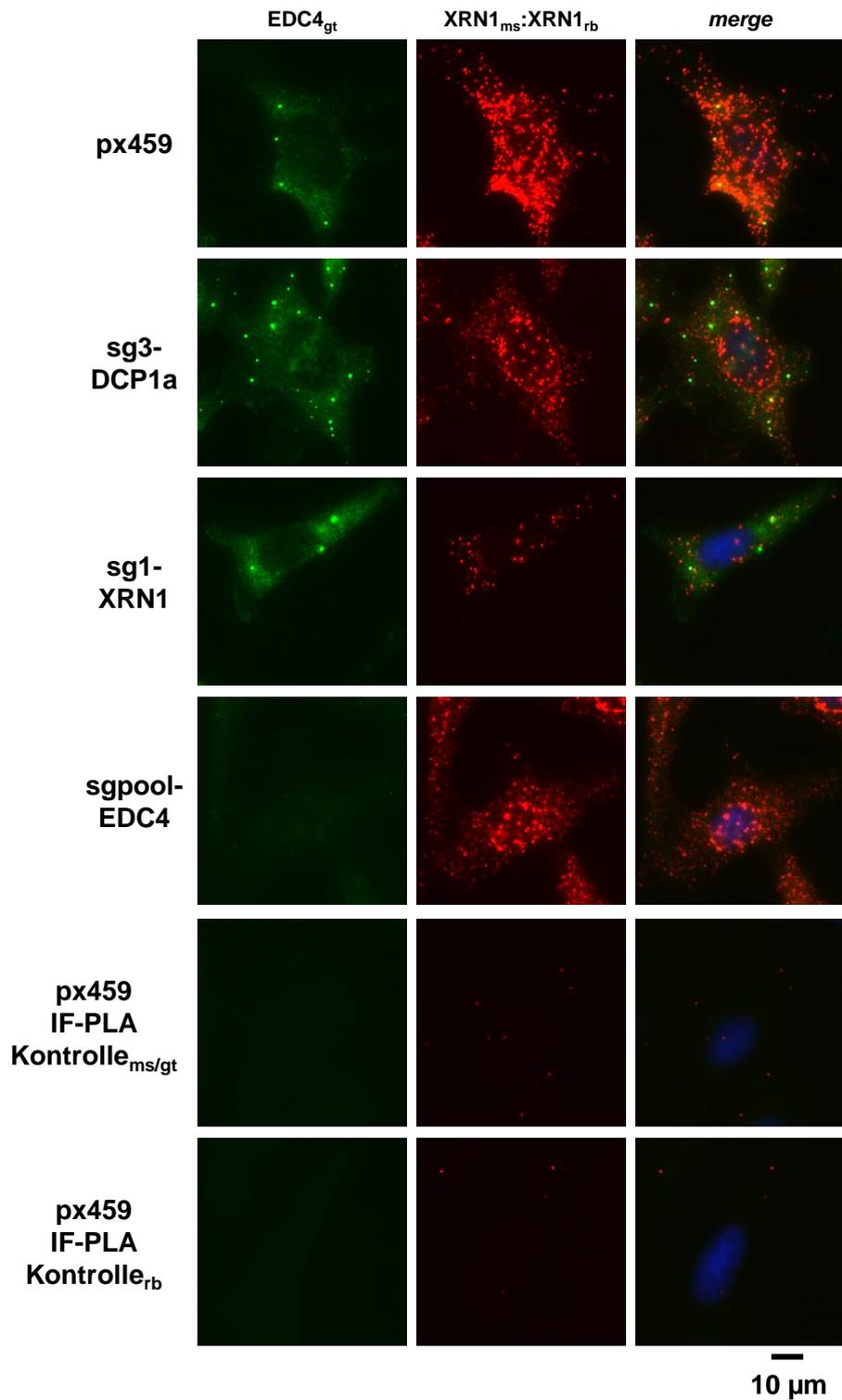
**Abb.Anh.6: Analyse der endogenen DCP1a:EDC4-Proteininteraktionen in CRISPR/Cas9-Zellen.** Die Interaktion von DCP1a und EDC4 sowie die zelluläre Lokalisation und räumliche Nähe zu *P-Bodies* dieser Interaktionen wurde in HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1), EDC4 (sgpool-EDC4) und in der Kontroll-Zelllinie (px459) durch *Immuno-proximity-ligation-assay* (Immuno-PLA) analysiert. Dazu wurden die gezeigten Primärantikörper unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen) für die Detektion der Interaktionen mittels PLA verwendet. Zeitgleich erfolgte eine Detektion der *P-Bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem EDC4-Antikörper einer dritten Spezies (gt=Ziege). Die Immuno-PLA-Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



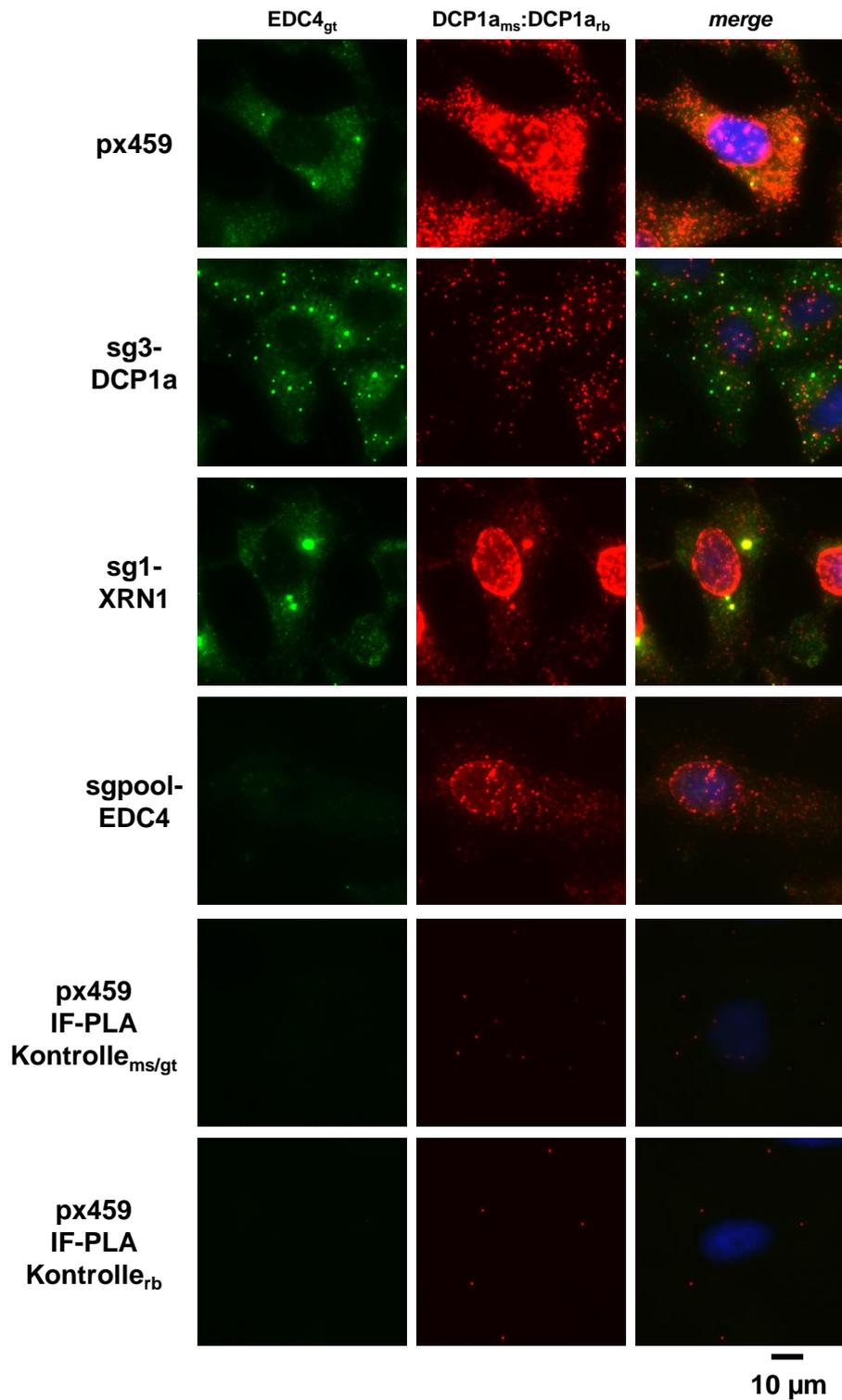
**Abb.Anh.7: Analyse der endogenen XRN1:DCP1a-Proteininteraktionen in CRISPR/Cas9-Zellen.** Die Interaktion von XRN1 und DCP1a sowie die zelluläre Lokalisation und räumliche Nähe zu *P-Bodies* dieser Interaktionen wurde in HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1), EDC4 (sgpool-EDC4) und in der Kontroll-Zelllinie (px459) durch *Immuno-proximity-ligation-assay* (Immuno-PLA) analysiert. Dazu wurden die gezeigten Primäntikörper unterschiedlicher Spezies (ms=Maus; rb= Kaninchen) für die Detektion der Interaktionen mittels PLA verwendet. Zeitgleich erfolgte eine Detektion der *P-Bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem EDC4-Antikörper einer dritten Spezies (gt=Ziege). Die Immuno-PLA-Kontrollen wurden jeweils ohne Primäntikörper durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



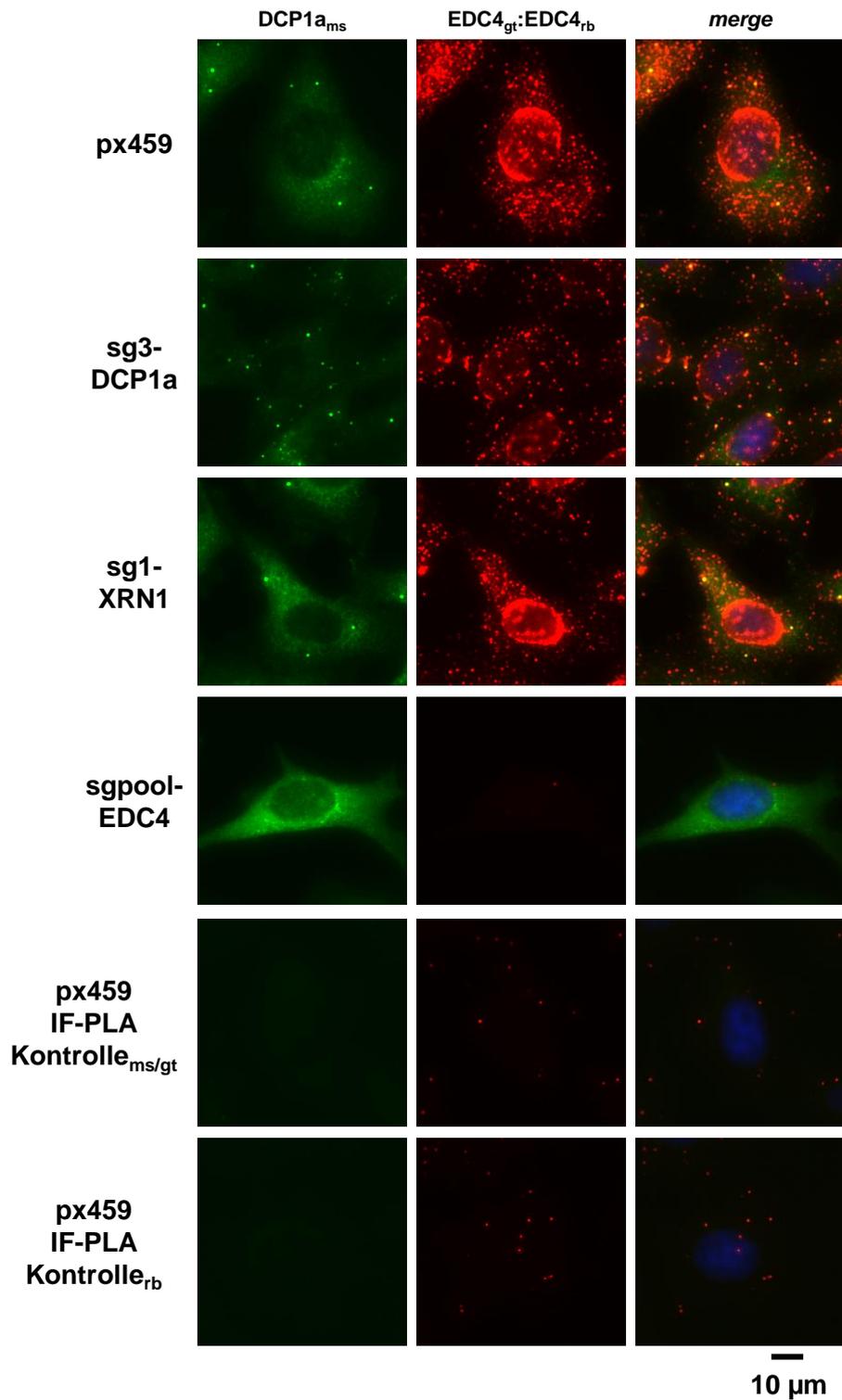
**Abb.Anh.8: Analyse der endogenen XRN1:EDC4-Proteininteraktionen in CRISPR/Cas9-Zellen.** Die Interaktion von XRN1 und EDC4 sowie die zelluläre Lokalisation und räumliche Nähe zu *P-Bodies* dieser Interaktionen wurde in HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1), EDC4 (sgpool-EDC4) und in der Kontroll-Zelllinie (px459) durch *Immuno-proximity-ligation-assay* (Immuno-PLA) analysiert. Dazu wurden die gezeigten Primärantikörper unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen) für die Detektion der Interaktionen mittels PLA verwendet. Zeitgleich erfolgte eine Detektion der *P-Bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem EDC4-Antikörper einer dritten Spezies (gt=Ziege). Die Immuno-PLA-Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



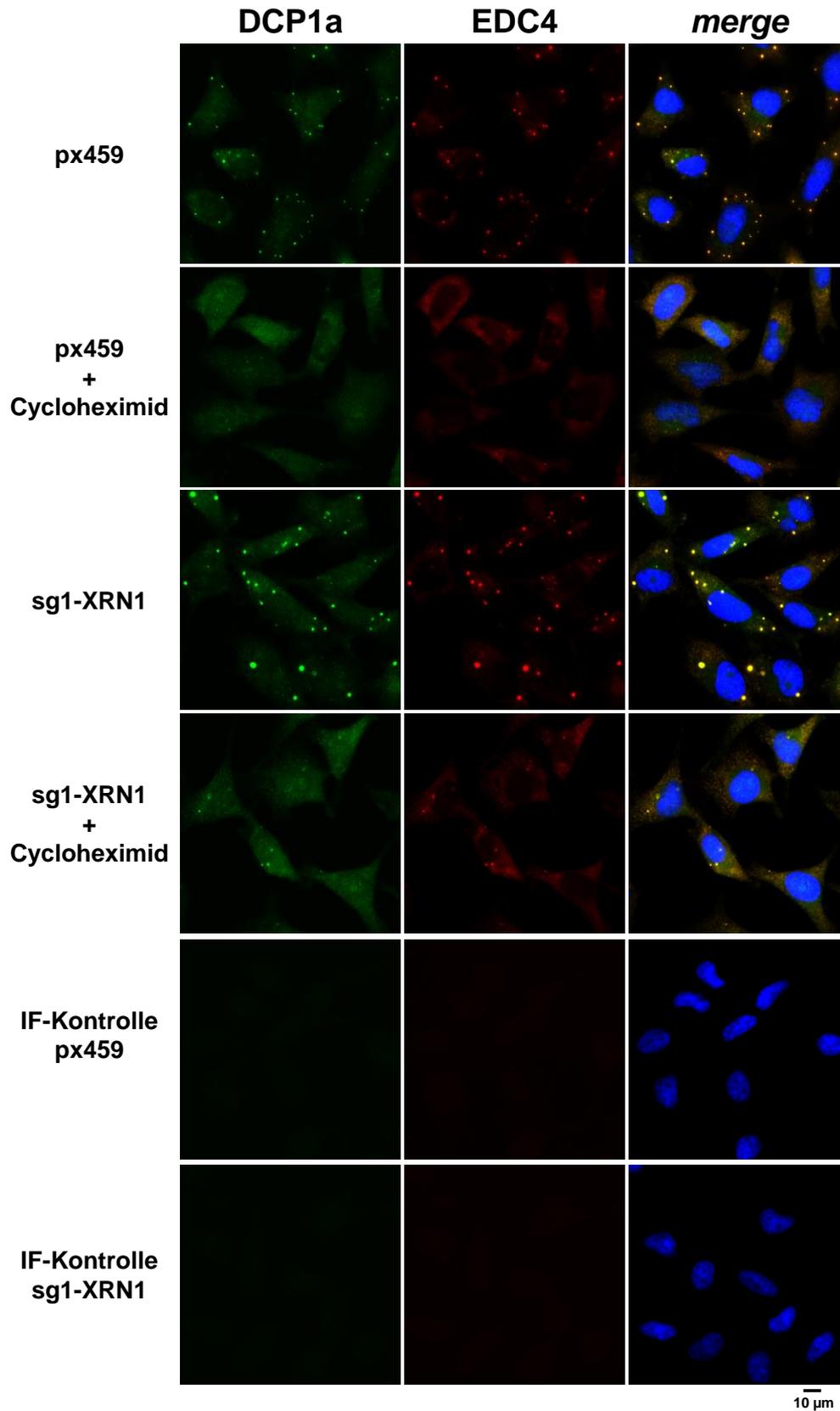
**Abb.Anh.9: Analyse der endogenen XRN1:XRN1-Proteininteraktionen und Proteinexpression in CRISPR/Cas9-Zellen.** Die Interaktion von zwei XRN1-Proteinmolekülen, deren Expression sowie die zelluläre Lokalisation und räumliche Nähe zu *P-Bodies* dieser Interaktionen wurde in HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1), EDC4 (sgpool-EDC4) und in der Kontroll-Zelllinie (px459) durch *Immuno-proximity-ligation-assay* (Immuno-PLA) analysiert. Dazu wurden die gezeigten Primärantikörper unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen) für die Detektion der Interaktionen mittels PLA verwendet. Zeitgleich erfolgte eine Detektion der *P-Bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem EDC4-Antikörper einer dritten Spezies (gt=Ziege). Die Immuno-PLA-Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



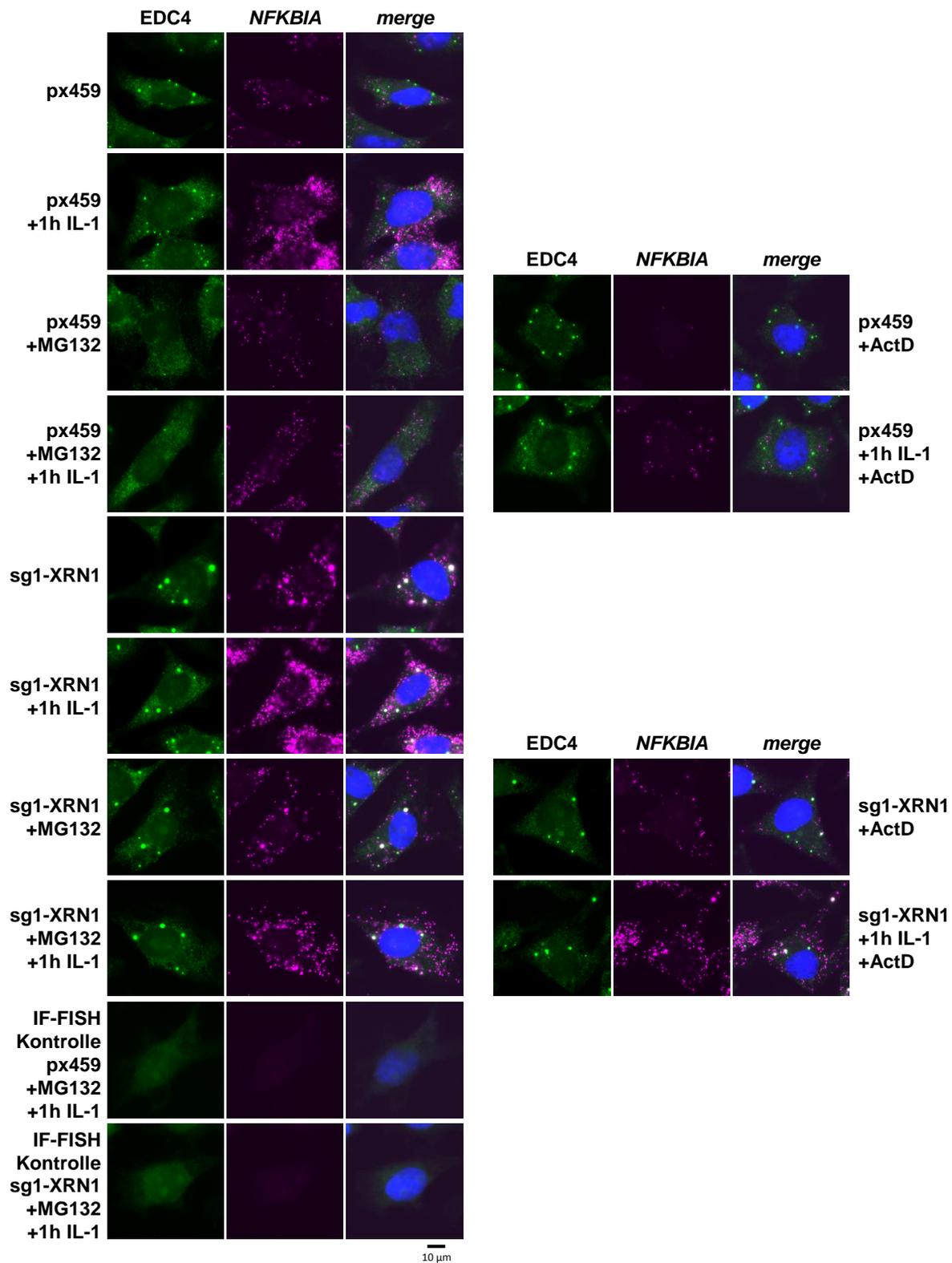
**Abb.Anh.10: Analyse der endogenen DCP1a:DCP1a-Proteininteraktionen und Proteinexpression in CRISPR/Cas9-Zellen.** Die Interaktion von zwei DCP1a-Proteinmolekülen, deren Expression sowie die zelluläre Lokalisation und räumliche Nähe zu *P-Bodies* dieser Interaktionen wurde in HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1), EDC4 (sgpool-EDC4) und in der Kontroll-Zelllinie (px459) durch *Immuno-proximity-ligation-assay* (Immuno-PLA) analysiert. Dazu wurden die gezeigten Primärantikörper unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen) für die Detektion der Interaktionen mittels PLA verwendet. Zeitgleich erfolgte eine Detektion der *P-Bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem EDC4-Antikörper einer dritten Spezies (gt=Ziege). Die Immuno-PLA-Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



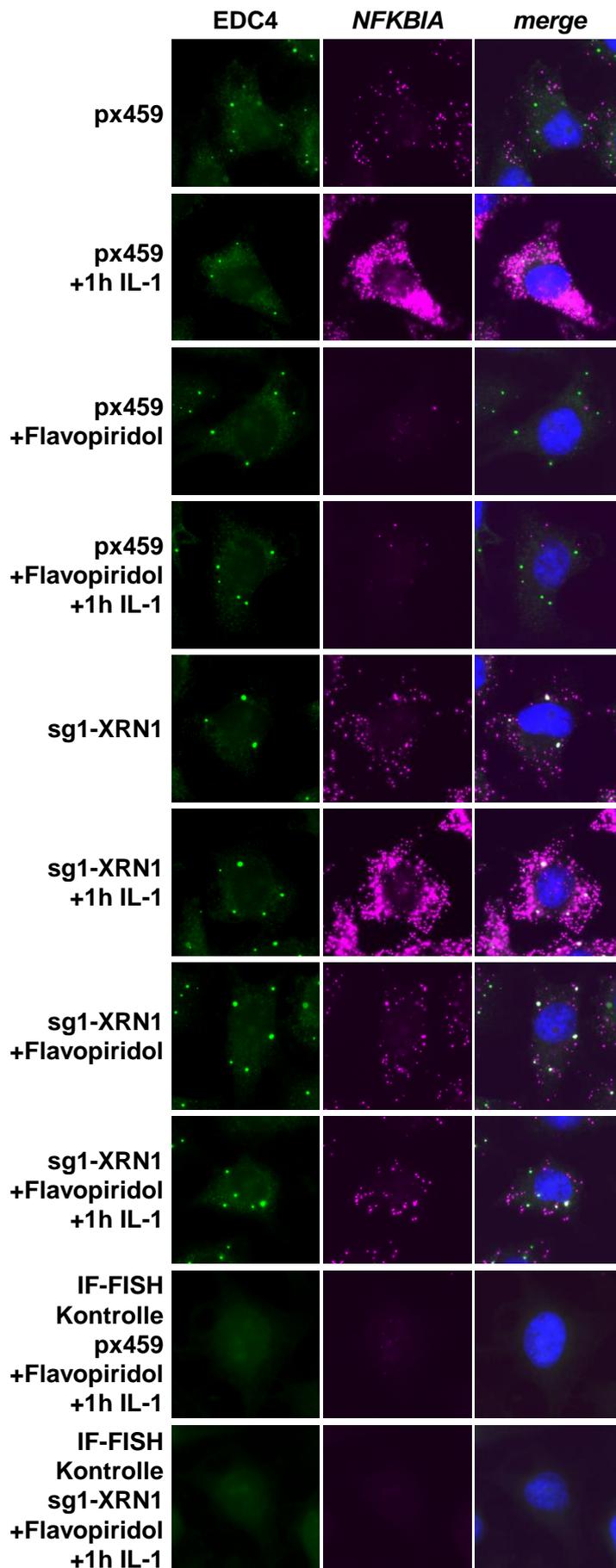
**Abb.Anh.11: Analyse der endogenen EDC4:EDC4-Proteininteraktionen und Proteinexpression in CRISPR/Cas9-Zellen.** Die Interaktion von zwei EDC4-Proteinmolekülen, deren Expression sowie die zelluläre Lokalisation und räumliche Nähe zu *P-Bodies* dieser Interaktionen wurde in HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von DCP1a (sg3-DCP1a), XRN1 (sg1-XRN1), EDC4 (sgpool-EDC4) und in der Kontroll-Zelllinie (px459) durch *Immuno-proximity-ligation-assay* (Immuno-PLA) analysiert. Dazu wurden die gezeigten Primärantikörper unterschiedlicher Spezies (gt=Ziege, rb=Kaninchen) für die Detektion der Interaktionen mittels PLA verwendet. Zeitgleich erfolgte eine Detektion der *P-Bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem DCP1a-Antikörper einer dritten Spezies (ms=Maus). Die Immuno-PLA-Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



**Abb.Anh.12: Einfluss von Cycloheximid auf die *P-Body*-Assemblierung in CRISPR/Cas9-Zellen.** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 2 h mit Cycloheximid (10  $\mu$ g/ml) behandelt oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte in einer Immunfluoreszenz die Analyse der *P-Body*-Assemblierung mittels DCP1a- und EDC4-Antikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.

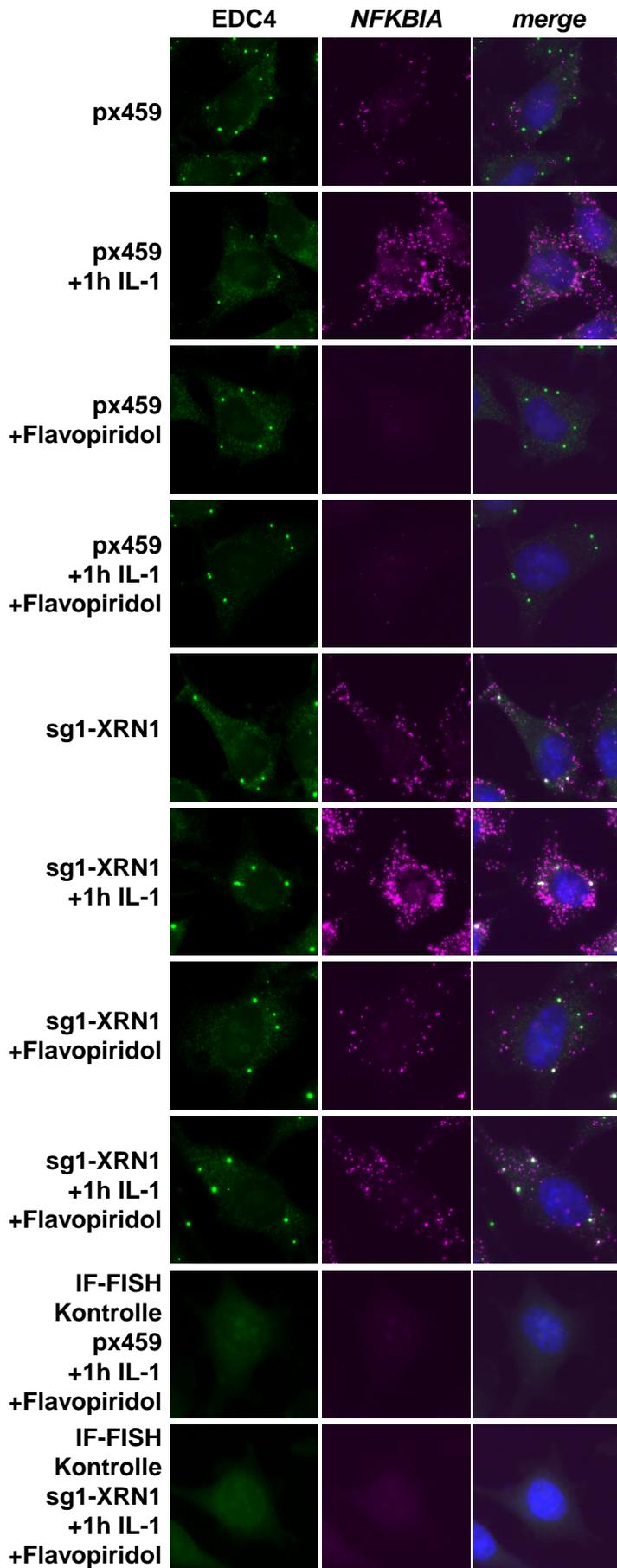


**Abb.Anh.13: Einfluss von MG132 und Actinomycin D auf die relative zelluläre Lokalisation von *NFKBIA*-Transkripten und *P-Bodies* in CRISPR/Cas9-Zellen.** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Neben der IL-1-Stimulation erfolgte ebenfalls eine Behandlung der Zellen mit MG132 (10 µM) für 0,5 h prä IL-1-Stimulation und Actinomycin D (5 µg/ml) für 1 h post IL-1-Stimulation. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Anschließend erfolgte in einer Immun-RNA-FISH die Analyse der räumlichen Nähe von *NFKBIA*-Transkripten zu *P-Bodies* mittels genspezifischer Sonden und einem EDC4-Antikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



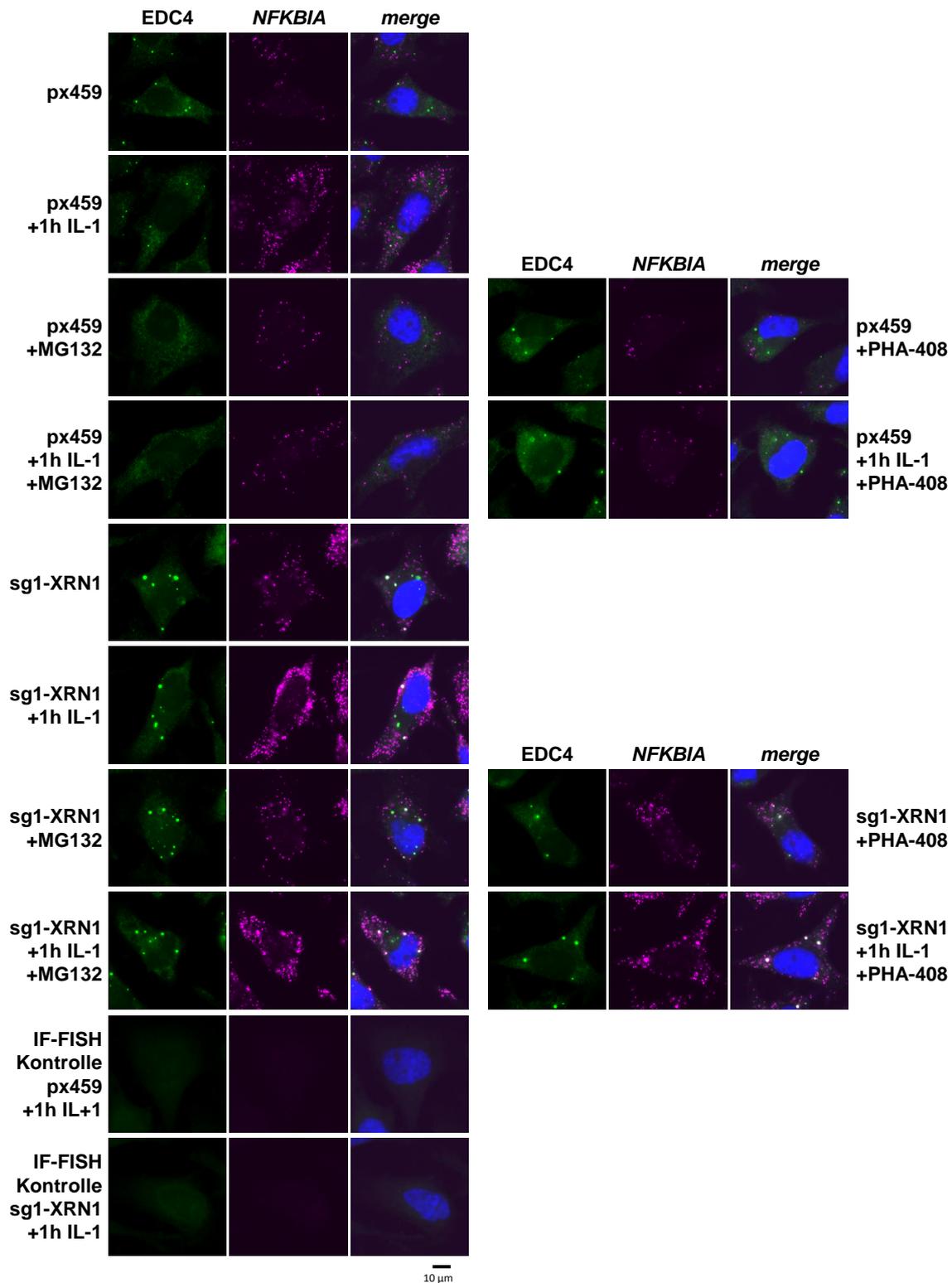
**Abb.Anh.14: Einfluss von Flavopiridol auf die relative zelluläre Lokalisation von NFKBIA-Transkripten und P-Bodies in CRISPR/Cas9-Zellen.** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Neben der IL-1-Stimulation erfolgte ebenfalls eine Behandlung der Zellen mit Flavopiridol (10  $\mu$ M) für 1 h prä IL-1-Stimulation. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Anschließend erfolgte in einer Immuno-RNA-FISH die Analyse der räumlichen Nähe von NFKBIA-Transkripten zu P-Bodies mittels genspezifischer Sonden und einem EDC4-Antikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.

10  $\mu$ m

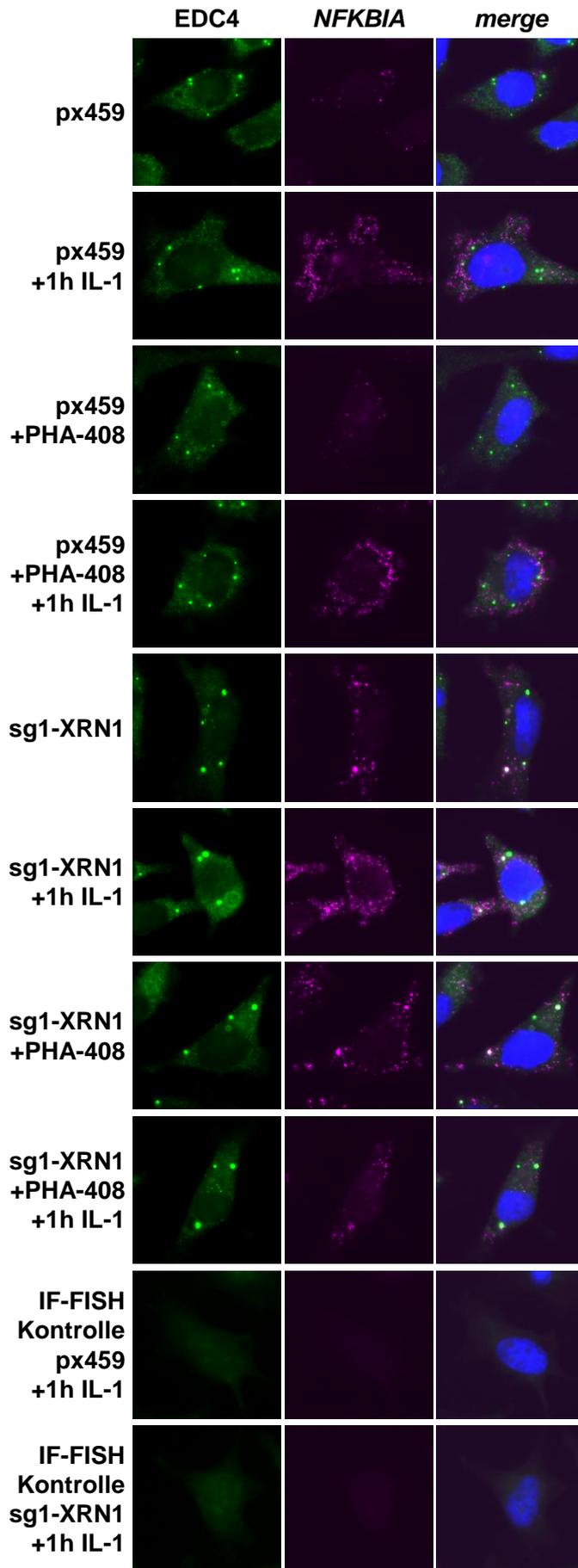


10  $\mu$ m

**Abb.Anh.15: Einfluss von Flavopiridol auf die relative zelluläre Lokalisation von NFKBIA-Transkripten und P-Bodies in CRISPR/Cas9-Zellen.** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Neben der IL-1-Stimulation erfolgte ebenfalls eine Behandlung der Zellen mit Flavopiridol (10  $\mu$ M) für 2 h post IL-1-Stimulation. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Anschließend erfolgte in einer Immuno-RNA-FISH die Analyse der räumlichen Nähe von NFKBIA-Transkripten zu P-Bodies mittels genspezifischer Sonden und einem EDC4-Antikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



**Abb.Anh.16: Einfluss von MG132 und PHA-408 auf die relative zelluläre Lokalisation von *NFKBIA*-Transkripten und *P-Bodies* in CRISPR/Cas9-Zellen.** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1-XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Neben der IL-1-Stimulation erfolgte ebenfalls eine Behandlung der Zellen mit MG132 (10 µM) für 2 h post IL-1-Stimulation und PHA-408 (5 µM) für 1 h post IL-1-Stimulation. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Anschließend erfolgte in einer Immuno-RNA-FISH die Analyse der räumlichen Nähe von *NFKBIA*-Transkripten zu *P-Bodies* mittels genspezifischer Sonden und einem EDC4-Antikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



10 µm

**Abb.Anh.17: Einfluss von PHA-408 auf die relative zelluläre Lokalisation von *NFKBIA*-Transkripten und *P-Bodies* in CRISPR/Cas9-Zellen.** HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem *knockdown* von XRN1 (sg1 XRN1) und die Kontroll-Zelllinie (px459) wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Neben der IL-1-Stimulation erfolgte ebenfalls eine Behandlung der Zellen mit PHA-408 (5 µM) für 1 h prä IL-1-Stimulation. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen verwendet. Anschließend erfolgte in einer Immuno-RNA-FISH die Analyse der räumlichen Nähe von *NFKBIA*-Transkripten zu *P-Bodies* mittels genspezifischer Sonden und einem EDC4-Antikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.

## **Eidesstaatliche Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ulaş Tenekeci

## Portfolio

### Publikationen

**Tenekeci U**, Poppe M, Beuerlein K, Buro C, Muller H, Weiser H, Kettner-Buhrow D, Porada K, Newel D, Xu M, Chen ZJ, Busch J, Schmitz ML, Kracht M (2016) *K63-Ubiquitylation and TRAF6 Pathways Regulate Mammalian P-Body Formation and mRNA Decapping. Molecular Cell* 62: 943-957

### Kongressbeiträge

**U. Tenekeci**, C. Mayr-Buro, H. Weiser, M. Kracht (2017) *Essential roles of decapping factors and the exonuclease XRN1 in cytokine-inducible gene expression*. 83. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Heidelberg 06-09.03.2017; Vortrag

Katharina Porada, Knut Beuerlein, Helmut Müller, Daniela Kettner-Buhrow, Doris Newel, Hendrik Weiser, **Ulas Tenekeci**, Michael Poppe, Christin Buro, Zhijian J. Chen, M.Lienhard Schmitz and Michael Kracht (2013) *Signal-dependent assembly of decapping proteins in cytokine responses. Current Trends in Biomedicine*, Baeza, Spanien 04.-06.11.2013; Posterpräsentation

### Seminare

Arbeitsgruppenseminar AG Kracht	14.01.2013	03.11.2014
	18.03.2013	09.03.2015
	01.07.2013	12.10.2015
	16.12.2013	26.02.2016
	07.03.2014	11.07.2016
	23.06.2014	19.06.2017

RBI-Institutsseminar	01.11.2012
	21.03.2013
	24.10.2013

Joint Lab Meeting AG Borggreffe, AG Schmitz, AG Kracht	27.09.2013
	29.07.2015
	07.10.2016

Seminar M-AG-SEM, Besprechung neuerer tumorgenetischer und epigenetischer Arbeiten	03.11.2015
--	------------

### Betreuung von Studierenden

Masterarbeit Katja Kopp	10/2017- 04/2017
-------------------------	------------------

### Betreuung von Praktika

Pharmakologisches Praktikum am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie	09.10.2017- 12.10.2017
Master-Modul Molekulare Medizin WS 2017/18	27.11.2017- 01.12.2017

## **Danksagung**

Die Danksagung wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.