

**Zytokin-regulierte Veränderungen von *messenger*
Ribonucleoprotein-Partikeln in humanen retinalen
Pigmentepithelzellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Verena Maßmann
aus Georgsmarienhütte

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Tag der Disputation: 09.06.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zytokine sind Mediatoren der angeborenen Immunantwort	1
1.1.1	Das proinflammatorische Zytokin IL-1.....	1
1.1.2	IL-1-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion.....	3
1.1.3	Termination der IL-1-Antwort	5
1.2	Regulation der mRNA-Stabilität durch den mRNA-Abbau.....	6
1.3	<i>Processing (p)-bodies</i>	8
1.3.1	Proteine des mRNA-Abbaus kolokalisieren in <i>P-bodies</i>	8
1.3.2	Funktion von <i>P-bodies</i>	10
1.3.3	<i>P-bodies</i> und IL-1- <i>signaling</i>	12
1.4	hTERT-RPE1-Zellen als humane, epitheliale und diploide Zelllinie.....	14
1.5	Ausgangsrationalen und Ziele der Arbeit.....	16
2	Material	17
2.1	Geräte.....	17
2.2	Chemikalien.....	17
2.3	Gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien.....	17
2.4	Puffer und Lösungen	18
2.4.1	Puffer für Gesamtproteinlyse	18
2.4.2	Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot	18
2.4.3	Puffer und Lösungen für Calciumphosphat-Transfektion.....	19
2.4.4	Medien für Zellkultur	19
2.5	Enzyme	20
2.6	Marker	20
2.7	Inhibitoren	20
2.8	Primergemische (TaqMan Gene Expression Assays)	20
2.9	Antikörper.....	21
2.9.1	Antikörper für indirekte Immunfluoreszenz und Immuno-RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung.....	21
2.9.2	Antikörper für Western Blot	21
2.10	Sonden für RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung	22
2.11	Zelllinien.....	22
2.12	Rekombinante Proteine.....	22
2.13	Vektoren	23
2.14	siRNAs.....	23
2.15	Software-Programme.....	23
3	Methoden	24
3.1	Zellkultur	24
3.1.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	24
3.1.2	Kultivieren und Passagieren von Zellen.....	24

3.1.3	Stimulation und Ernte von Zellen	25
3.1.4	Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation in IBIDI μ -Slides VI	26
3.1.5	Transiente Transfektion mit siRNAs und HiPerFect-Transfektionsreagenz in 60 mm Schalen und IBIDI μ -Slides VI.....	27
3.2	Proteinbiochemische Methoden	30
3.2.1	Zelllyse	30
3.2.2	Proteingehaltsbestimmung nach Bradford.....	30
3.2.3	Probenvorbereitung für Western Blot	31
3.2.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ...	31
3.2.5	Western Blot und Immunfärbung.....	32
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	33
3.3.1	Isolierung von RNA	33
3.3.2	Quantifizierung der RNA-Menge.....	33
3.3.3	Reverse Transkription	33
3.3.4	Quantitative PCR (qPCR)	34
3.4	Zellbiologische Methoden	36
3.4.1	Indirekte Immunfluoreszenz (IF)	36
3.4.2	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	37
3.4.3	Immuno-RNA- <i>in situ</i> -Hybridisierung (IF-FISH).....	39
3.5	Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen für IF, FISH und IF-FISH.....	39
3.5.1	Verwendung eines Pixel-Rasters für die Erfassung von <i>P-bodies</i>	40
3.6	Darstellung und Auswertung der eigenen Versuchsergebnisse.....	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Stimulierbarkeit von hTERT-RPE1-Zellen mit IL-1 α anhand der p65-Translokation in den Zellkern.....	42
4.2	Charakterisierung der <i>P-body</i> -Zusammensetzung nach IL-1 α -Stimulation in hTERT-RPE1-Zellen	44
4.2.1	Vergleich der <i>P-body</i> -Zusammensetzung und IL-1 α -abhängigen <i>P-body</i> -Proteinspiegel in hTERT-RPE1-Zellen und HeLa-Zellen	44
4.2.2	IL-1 α -abhängige <i>P-body</i> -Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen	48
4.3	IL-1 α -induzierte Genexpression in hTERT-RPE1-Zellen.....	50
4.3.1	Gesamtzellanalyse der IL-1 α -induzierten Genexpression von <i>IL6</i> , <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i>	51
4.3.2	Einzelzellanalyse der IL-1 α -induzierten Genexpression von <i>IL6</i> , <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i>	52
4.4	Bestimmung der mRNA-Stabilitäten IL-1 α -induzierbarer Gene	57
4.4.1	Einfluss von IL-1 α auf die mRNA-Stabilitäten von <i>IL6</i> , <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i>	58
4.4.2	Analyse der Lokalisation von <i>IL8</i> - und <i>NFKBIA</i> -mRNAs in Bezug auf EDC4 bei Transkriptionsinhibition	62
4.5	Veränderung der <i>P-body</i> -Zusammensetzung durch Überexpression ausgewählter <i>P-body</i> -Proteine in hTERT-RPE1-Zellen.....	72

4.5.1	Etablierung einer effizienten Überexpression mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation	72
4.5.2	Einfluss der Überexpression von DCP1a auf die <i>P-body</i> -Assemblierung	74
4.5.3	Einfluss der Überexpression von EDC4 auf die <i>P-body</i> -Assemblierung	76
4.6	Funktionsanalyse von <i>P-bodies</i> anhand eines siRNA-vermittelten <i>knockdowns</i> ausgewählter <i>P-body</i> -Proteine in hTERT-RPE1-Zellen.....	79
4.6.1	Funktioneller <i>knockdown</i> von XRN1	79
4.6.2	Funktioneller <i>knockdown</i> von EDC4	92
5	Diskussion.....	102
5.1	IL-1 α ist ein starker Stimulus für hTERT-RPE1-Zellen und induziert eine andauernde intrazelluläre Entzündungsaktivität.....	102
5.2	Regulation der mRNA-Stabilitäten von <i>IL6</i> , <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i> durch IL-1 α und ihre mögliche biologische Relevanz.....	104
5.3	IL-1 α hat keinen Einfluss auf die DCP1a-, EDC4- und XRN1-abhängige <i>P-body</i> -Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen.....	107
5.4	Dynamik von mRNA-Umsatz und subzellulärer Lokalisation von <i>IL8</i> - und <i>NFKBIA</i> -mRNAs zu EDC4 nach Transkriptionseinhibition.....	109
5.5	Erhöhte intrazelluläre Proteinspiegel von DCP1a und EDC4 beeinflussen die <i>P-body</i> -Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen.....	112
5.6	XRN1 reguliert die <i>P-body</i> -Assemblierung und senkt den basalen mRNA- <i>steady-state-level</i>	114
5.7	EDC4 reguliert die <i>P-body</i> -Assemblierung und erhöht den basalen mRNA- <i>steady-state-level</i>	118
5.8	Ausblick.....	121
6	Zusammenfassung.....	123
7	Summary	125
8	Abkürzungsverzeichnis.....	127
9	Abbildungsverzeichnis.....	130
10	Literaturverzeichnis	132
11	Anhang.....	141
12	Publikationsverzeichnis	147
13	Ehrenwörtliche Erklärung	148
14	Danksagung.....	149

1 Einleitung

1.1 Zytokine sind Mediatoren der angeborenen Immunantwort

Zytokine sind als Entzündungsmediatoren im menschlichen Körper an der Regulation der angeborenen Immunantwort beteiligt. Sie werden nach Aktivierung von spezifischen Rezeptoren durch exogene *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und endogene *damage- bzw. danger-associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt und können über autokrine, juxtakrine, parakrine, endokrine oder intrazelluläre Signaltransduktionswege zelluläre Stoffwechselwege beeinflussen (Schmitz et al., 2011). Proinflammatorisch wirkende Zytokine, wie Interleukin (IL)-1 und Tumornekrosefaktor (TNF), fördern über induzierbare Genexpression eine Aktivierung von Immunzellen, während antiinflammatorisch wirkende Zytokine, wie IL-10, für ein rasches Abklingen der Immunreaktion sorgen (Dinarello, 2000). Eine Autoregulation der Zytokin-vermittelten Immunantwort erfolgt zur schnellen Immunabwehr über sogenannte positive *feed-forward loops* und zur Verhinderung einer überschießenden Entzündungsreaktion über negative *feedback loops* (Schmitz et al., 2011). Ein Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Faktoren ist essenziell für eine kontrollierte Immunreaktion, da sich bei Störungen dieses Gleichgewichts chronisch inflammatorische Erkrankungen, wie z.B. rheumatoide Arthritis, Asthma bronchiale oder Lupus erythematoses manifestieren können (Gaestel, 2009; Schmitz et al., 2011).

1.1.1 Das proinflammatorische Zytokin IL-1

IL-1 α und IL-1 β gehören zur IL-1-Familie und sind als wichtige proinflammatorische Zytokine an der Regulation von lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt, indem sie eine Kaskade von verschiedenen Chemokinen und anderen Zytokinen triggern (Dinarello et al., 2012; Garlanda et al., 2013). Während IL-1 α auch im gesunden Organismus in verschiedenen Zelltypen, wie Keratinozyten, Endothel-, Leber- und Nierenzellen, sowie in der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten zu finden ist, wird IL-1 β erst als Antwort auf einen Stimulus, wie mikrobielle Produkte, TNF oder IL-1 α/β vor allem in Blutmonozyten, Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen rasch synthetisiert und freigesetzt (Dinarello et al., 2012). Beide IL-1-Typen besitzen ähnliche biologische Fähigkeiten und binden an die IL-1-Rezeptoren Typ 1 und

Typ 2 (IL-1R1, IL-1R2) (Garlanda et al., 2013). Der IL-1R1 wird auf fast allen Zellen exprimiert und induziert über eine komplexe Signalkaskade von biochemischen Prozessen die mRNA-Expression proinflammatorischer Gene, wie z.B. *PTGS2* (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2), *IL6* und *IL8*, aber auch *IL1α* und *β* selbst (Weber et al., 2010). Die Bindung von IL-1α oder -β an den IL-1R2 führt, wie auch die Bindung des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1-RA) an den IL-1R1, zu keiner intrazellulären Signalverarbeitung und somit zu einer Abschwächung der IL-1-Antwort (Garlanda et al., 2013; Weber et al., 2010).

Als Entzündungsmediator kann IL-1 Symptome wie Fieber, Appetitverlust, Hypotension, Muskel- und Gelenkschmerzen im menschlichen Körper verursachen (Dinarello, 1996). Es hat sich herausgestellt, dass die Freisetzung von IL-1 eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. dem familiären Mittelmeerfieber (FMF), den Cryopyrin-assoziierten periodischen Fiebersyndromen (CAPS), Diabetes mellitus, rheumatoider Arthritis, Gicht, Morbus Still, Morbus Behçet, Alzheimer-Erkrankung, Morbus Parkinson und der Arteriosklerose spielt, sodass die Hemmung der IL-1-Wirkung von pharmakologischem Interesse und mittlerweile gut etabliert ist (Dinarello et al., 2012; Mantovani et al., 2019). Bei einem Teil der zuvor genannten Erkrankungen wird das IL-1-System durch Mutationen, z.B. in Komponenten des Inflammasoms, hyperaktiviert und es kommt chronisch und rezidivierend zu einer gesteigerten IL-1-Freisetzung mit der Auslösung entsprechender inflammatorischer Krankheitsschübe (Sobi, 2020). Der rekombinant hergestellte IL-1-Rezeptor-Antagonist Anakinra ist in der Lage, die Aktivität von IL-1α und IL-1β zu neutralisieren und ist derzeit u.a. zur Therapie der rheumatoiden Arthritis, periodischer Fiebersyndrome und des Still-Syndroms zugelassen (Sobi, 2020). Der monoklonale Anti-IL-1β-Antikörper Canakinumab ist ebenfalls zur Therapie periodischer Fiebersyndrome, Still-Syndrom und der Gichtarthritis zugelassen (Novartis Pharma, 2020). Die Blockade des IL-1-Systems mittels Anakinra oder Canakinumab erlaubt allerdings keine selektive Modulation bestimmter IL-1-Funktionen. Daher ist es von Interesse, auf der Ebene der IL-1-vermittelten Signaltransduktion (neue) Mechanismen zu identifizieren, um IL-1-Wirkungen spezifisch und gegebenenfalls auch dauerhaft zu beeinflussen.

1.1.2 IL-1-vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion

Die Bindung von IL-1 an den IL-1R induziert über ein Netzwerk aus intrazellulären Signaltransduktionswegen die Expression verschiedener Zielgene (Abb. 1.1). Dabei können die ersten intrazellulären biochemischen Veränderungen bereits innerhalb von 5 Minuten nach IL-1/IL-1R-Interaktion beobachtet werden (Dinarello, 2000).

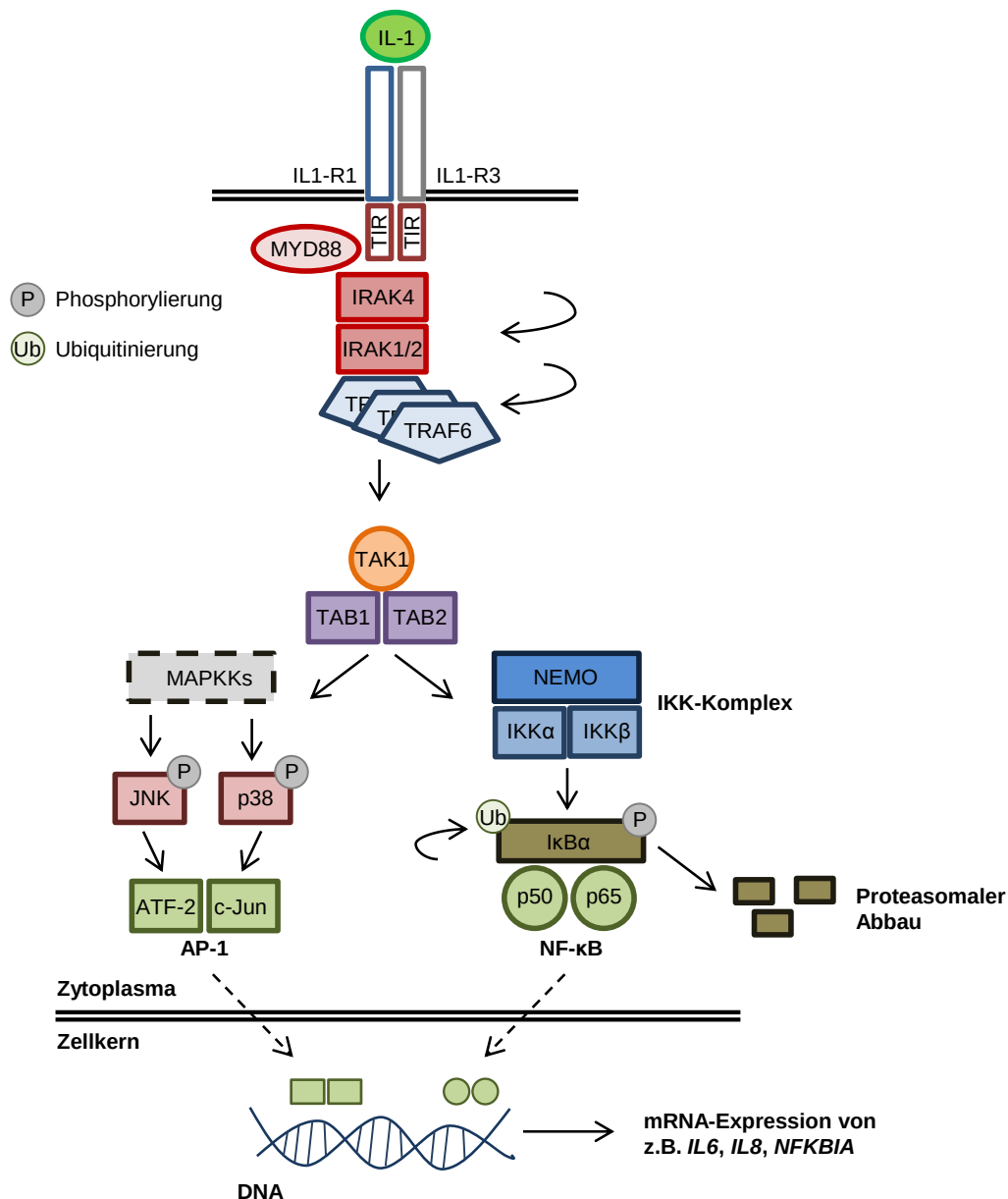


Abb. 1.1: IL-1-induzierte Signaltransduktion. Nach Bindung von IL-1 an den IL-1R1 erfolgt die Rekrutierung von IL-1R3. Dadurch assembliert intrazellulär ein Komplex aus MYD88, IRAK1/2/4 und TRAF6 an die TIR-Domäne des IL-1R1. Daraufhin interagiert die Ubiquitin-E3-Ligase TRAF6 mit dem TAK1-TAB1/2-Kinase-Komplex. TAK1 kann im Folgenden den IKK-Komplex aktivieren, wodurch IκBα zunächst phosphoryliert, dann ubiquitinyliert und anschließend durch das Proteasom abgebaut wird. Dadurch können die p65- und p50-Untereinheiten des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern translozieren. Des Weiteren kann TAK1 über die Aktivierung verschiedener MAPKKs die Phosphorylierung von JNK und p38 bewirken, die infolgedessen die Untereinheiten des AP-1-Transkriptionsfaktors (c-Jun und ATF-2) aktivieren können und ihre Translokation in den Zellkern induzieren. Die Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1 und NF-κB induzieren im Zellkern daraufhin die Transkription verschiedener IL-1-responsiver Gene wie *IL6*, *IL8*, und *NFKBIA*. Die Abbildung wurde modifiziert nach Turner et al., 2014.

Durch die Bindung von IL-1 an den IL-1R1 erfolgt zur Ausbildung eines funktionellen IL-1R-Komplexes nach Konformationsänderung eine Interaktion mit dem Rezeptorprotein IL-1R3, früher IL-1-Rezeptor *accessory* Protein (IL-1RAcP) genannt, gefolgt von einer intrazellulären Assemblierung von *myleoid differentiation primary response gene 88* (MYD88) und IL-1 *receptor-associated* Kinase (IRAK) 4 an die Toll-IL-1-Rezeptor (TIR)-Domänen (Boraschi et al., 2018; Brikos et al., 2007; Casadio et al., 2001; Radons et al., 2003). Danach kommt es zur Autophosphorylierung von IRAK4, welche wiederum IRAK1 und IRAK2 phosphoryliert und dadurch die Rekrutierung und Oligomerisierung von TNF *receptor-associated factor* (TRAF) 6 bewirkt (Weber et al., 2010). Der Komplex aus IRAK1, IRAK2 und TRAF6 löst sich infolgedessen vom IL-1R1 (Brikos et al., 2007; Weber et al., 2010). Daraufhin kann TRAF6 als Ubiquitin-E3-Ligase die K63-verknüpfte-ubiquitinylierungsabhängige Aktivierung eines Kinase-Komplexes, bestehend aus *transforming growth factor beta-activated* Kinase (TAK) 1 und den Adaptorproteinen TAK1-*binding* Protein (TAB) 1 und 2, bewirken (Kanayama et al., 2004; Kawai & Akira, 2007). Aktivierte TAK1 induziert als Ausgangspunkt über verschiedene Komplexbildungen den *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B)-, *c-Jun N-terminal* Kinase (JNK)- und p38 *mitogen-activated* Proteinkinase (MAPK)-Signalweg (Sakurai et al., 2000).

Die Aktivierung der Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgt über die TAK1-induzierte Aktivierung des *inhibitor of nuclear factor B* (I κ B) Kinase (IKK)-Komplexes, der aus IKK α , IKK β und der regulatorischen Untereinheit NF- κ B *essential modifier* (NEMO) besteht (Kawai & Akira, 2007; Schmitz et al., 2004). Aktivierte IKK β phosphoryliert das inhibitorische Protein I κ B α , welches die p50- und p65-Untereinheiten von NF- κ B in Zytosol bindet und so in einem inaktiven Zustand hält (Brown et al., 1993; Zandi & Karin, 1999). Phosphoryliertes I κ B α triggert daraufhin seine eigene K48-verknüpfte Polyubiquitinylierung und wird im Proteasom abgebaut (Zandi et al., 1998). Dieser Schritt ermöglicht die Freisetzung der p50- und p65-Untereinheiten und ihre Translokation in den Zellkern, wo sie die Transkription verschiedener inflammatorischer Gene induzieren (Schmitz et al., 2004; Turner et al., 2014).

Die Aktivierung der p38 MAPK- und JNK-Signalwege erfolgt über die TAK1-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung verschiedener MAPK-Kinasen (MAPKKs) (Holtmann et al., 2001). Dabei führt die Aktivierung von JNK zur Phosphorylierung der *c-Jun*- und *activating transcription factor 2* (ATF-2)-

Untereinheiten des Transkriptionsfaktors *activator protein 1* (AP-1), die wiederum die Genexpression IL-1-responsiver Gene fördern (Weber et al., 2010). Aktivierte p38 MAPK aktiviert ebenfalls den Transkriptionsfaktor AP-1 und sorgt außerdem durch die Inhibierung von mRNA-destabilisierenden Faktoren für eine Stabilisierung von IL-1-induzierten mRNAs (Weber et al., 2010; Winzen et al., 1999).

In dieser Arbeit sollte die IL-1-vermittelte Genexpression insbesondere anhand der Zielgene *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* untersucht werden, da ihre Translationsprodukte wichtige Funktionen im Bezug auf die Vermittlung und Regulation der IL-1-Antwort besitzen und bei gegebenem Stimulus rapide induziert werden können (Krause et al., 1998; Tenekeci, 2018; Weber et al., 2010). Das multifunktionelle Zytokin IL-6 fördert u.a. die Bildung und Differenzierung von B-Zellen, reguliert die B- und T-Zell-Antwort und vermittelt die Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber (Garbers et al., 2018; Kishimoto, 2010; Gauldie et al., 1989). IL-8 ist als Chemokin vor allem an der Chemotaxis und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt (Hammond et al., 1995; Nagarsheth et al., 2017). Somit verstärken IL-6 und IL-8 die Entzündungsreaktion, während I κ B α als Translationsprodukt von *NFKBIA* die IL-1-induzierte Genexpression inhibiert (s.o.).

1.1.3 Termination der IL-1-Antwort

Zur Verhinderung eines Zellschadens ist es wichtig, dass der IL-1-Signalweg nach erfolgreicher Abwehr des Erregers zügig abgeschaltet wird. Die IL-1-Antwort findet daher u.a. durch die Aktivierung negativer *feedback loops* in verschiedenen Signaltransduktionswegen transient statt (Weber et al., 2010). Beispielhaft seien hier einige Mechanismen dargestellt, die zu einer Termination der IL-1-Antwort führen: Die Assoziation des IL-1-Rezeptors zum *adaptor toll-interacting* Protein (TOLLIP) inhibiert IRAK1 und fördert die Internalisierung und infolgedessen den Abbau des IL-1R1 (Didierlaurent et al., 2006; Brissoni et al., 2006). Eine Inaktivierung von TAK1 kann über die p38 MAPK-vermittelte Phosphorylierung von TAB1 induziert werden (Mendoza et al., 2008). Des Weiteren inhibiert die IL-1-induzierte Expression von MAPK Phosphatase 1 (MKP1) und I κ B α den IL-1-Signalweg. Während I κ B α durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren p50 und p65 im Zytoplasma den NF- κ B-Signalweg inhibiert (s.o.), inaktiviert MKP1 MAPKs und unterbricht die IL-1-Signalkaskade an verschiedenen Stellen (Toh et al., 2004).

1.2 Regulation der mRNA-Stabilität durch den mRNA-Abbau

Für die Regulation der Genexpression spielt der mRNA-Umsatz eine wichtige Rolle (Parker & Song, 2004). Dieser kann in eukaryotischen Zellen nicht nur auf transkriptioneller Ebene, sondern auch posttranskriptionell gesteuert werden. Posttranskriptionell wird neben der Translation vor allem der mRNA-Abbau reguliert, wodurch die mRNA-Stabilität und damit die Halbwertszeit der Transkripte beeinflusst werden (Carpenter et al., 2014; Chen et al., 2008; Radhakrishnan & Green, 2016). Synthese und Abbau von mRNA beeinflussen sich zur Aufrechterhaltung eines bestimmten *mRNA-steady-state-levels* über komplexe Signaltransduktionswege gegenseitig (Braun & Young, 2014; Timmers & Tora, 2018).

Untersuchungen zur Regulation von mRNA-Stabilitäten identifizierten *adenylate-uridylate* (AU)-reiche Sequenzen in der 3'-*untranslated region* (3'-UTR), sogenannte *AU-rich destabilizing elements* (ARE)-Sequenzen, die über spezifische ARE-Bindeproteine wie z.B. Tristetraprolin (TTP) die mRNA-Deadenylierung aktivieren und den *ARE-mediated mRNA decay* (AMD) fördern können (Carpenter et al., 2014; Fenger-Grøn et al., 2005). ARE-Sequenzen sind weit verbreitet in Genen, die an der Immunantwort beteiligt sind (Bakheet et al., 2006). So konnten diese Sequenzen u.a. in kurzlebigen mRNAs von Zytokinen, wie der *IL6*- und der *IL8*-mRNA, beobachtet werden (Hao & Baltimore, 2009; Winzen et al., 1999). Andere Motive, wie *embryo deadenylation element* (EDEN)-ähnliche Sequenzen fördern ebenfalls die mRNA-Deadenylierung, während die Bindung von Zytokin-induziertem *polypyrimidine tract-binding* Protein (PTB) an UC-reiche Sequenzen mRNAs stabilisiert (Moraes et al., 2006; Pautz et al., 2006). Viele mRNAs, die an der Immunabwehr beteiligt sind, enthalten zudem MicroRNA (miRNA)-Bindestellen in ihrer 3'-UTR, die die Deadenylierung von mRNA über den *RNA-induced silencing complex* (RISC) katalysieren (Fabian & Sonenberg, 2012; Franks & Lykke-Andersen, 2008).

Der mRNA-Abbau kann in eukaryotischen Zellen auf verschiedene Weise stattfinden, wobei beide Hauptwege (Abb. 1.2) durch die Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes eingeleitet werden (Schoenberg & Maquat, 2012). Diese Deadenylierung kann durch die *poly(A)-binding protein-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit PAN2-3* (Pan2/Pan3)-, dem *carbon catabolite repressor protein 4-negative on TATA* (Ccr4/Not)-Komplex oder der *poly(A)-specific ribonuclease* (PARN) durchgeführt werden

(Garneau et al., 2007). Daraufgehend kann die mRNA exosomal in 3'-5'-Richtung oder, infolge einer Entfernung der 5'-cap-Struktur durch die mRNA-decapping-Enzyme (DCP) 1 und 2, in 5'-3'-Richtung durch die Exoribonuklease 1 (XRN1) abgebaut werden (Langenberg et al., 2020; Parker & Song, 2004). Die cap stellt einen N7-Methyl-Guanosin (m^7G)-Rest am 5'-Ende einer mRNA dar und schützt diese durch Interaktion mit dem *eucaryotic translation initiation factor* 4E (eIF4E) vor ihrem Abbau (Franks & Lykke-Andersen, 2008; Shatkin, 1976). Der Vorgang des mRNA-decappings kann prinzipiell auch deadenylierungsunabhängig erfolgen (Garneau et al., 2007).

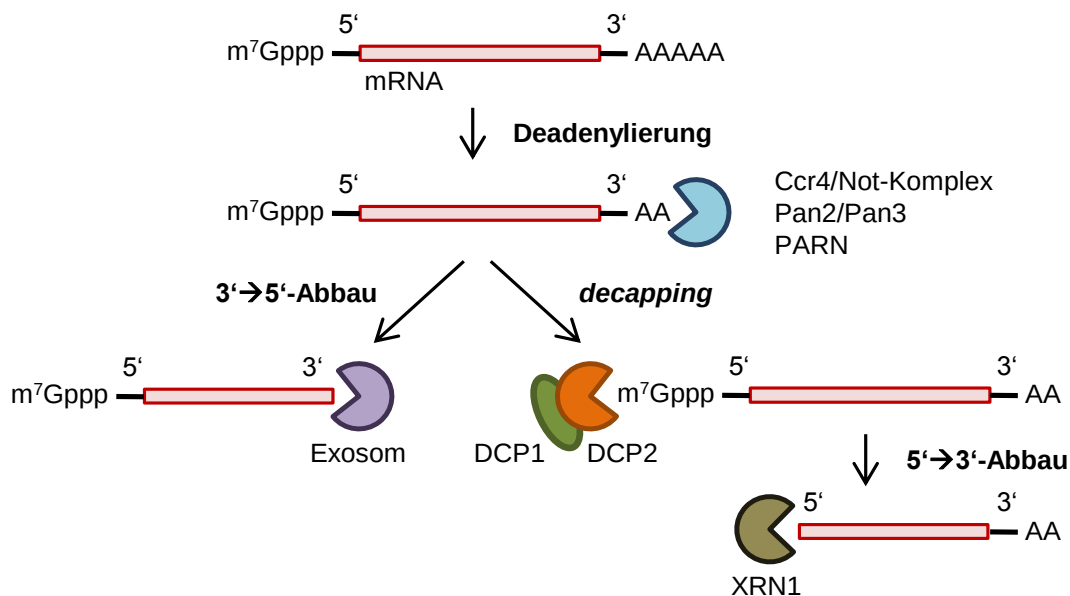


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des deadenylierungsabhängigen mRNA-Abbaus. Nach hydrolytischer Spaltung des Poly(A)-Schwanzes durch den Ccr4/Not-Komplex (Deadenylierung) kann die deadenylierte mRNA auf zwei Wegen abgebaut werden. Der erste Weg beinhaltet den Abbau durch das Exosom in 5'-3'-Richtung, der andere zunächst die Entfernung des m^7G -cap durch das decapping-Enzym DCP2 und seinem Coenzym DCP1, gefolgt vom mRNA-Abbau in 5'-3'-Richtung und die Exoribonuklease XRN1. Abbildung wurde modifiziert nach Garneau et al., 2007.

Andere mRNA-Abbaumechanismen erfolgen RNA-Interferenz- und Endonuklease-vermittelt (Parker & Song, 2004). Spezielle Abbaumechanismen, die bei der Qualitätskontrolle von synthetisierter mRNA eine Rolle spielen, sind unter anderem der *nonsense-mediated decay* (NMD), der bei Erkennung von vorzeitigen Stop-Codons eingeleitet wird, sowie der *non-stop decay*, bei dem mRNAs ohne Stop-Codon abgebaut werden, und der *no-go decay* infolge nicht fortschreitender Translationselongation (Coller & Parker, 2004; Decker & Parker, 2012). Auf diese Mechanismen soll in dieser Arbeit jedoch nicht näher eingegangen werden.

1.3 *Processing (p)-bodies*

Die komplexe Komposition von mRNAs und gebundenen Proteinen, die für die Regulation von Transkription, mRNA-Prozessierung, -Lokalisation, -Stabilität, Translation, und mRNA-Abbau nötig ist, wird als *messenger* Ribonucleoprotein (mRNP) bezeichnet, welches während des Lebenszyklus einer mRNA immer wieder restrukturiert wird (Anderson & Kedersha, 2009; Hieronymus & Silver, 2004). Die direkte Protein/mRNA-Interaktion kann dabei die Funktion der mRNA, sowie die Aktivität des gebundenen Proteins, z.B. einer Kinase, beeinflussen oder im Rahmen von Stoffwechselwegen durch bestimmte Metabolite reguliert werden (Mitchell & Parker, 2014).

P-bodies sind dynamische, zytoplasmatisch lokalisierte mRNPs, die translationell inhibierte mRNAs enthalten und ubiquitär vorkommen (Jain & Parker, 2013; Teixeira et al., 2005). Sie besitzen im Gegensatz zu klassischen Zellorganellen keine Lipid-Doppelmembran (Cougot et al., 2012). Stattdessen lassen ihre Morphologie und Dynamik darauf schließen, dass sie sich in einem Flüssigkeit-ähnlichen Zustand befinden und ihre Formierung auf einem Prozess der *liquid-liquid phase separation* (LLPS) beruht (Lin et al., 2015). Sie stellen keine isolierten Zellstrukturen dar, sondern sind in der Lage mit anderen Zellorganellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum und Mitochondrien, sowie Komponenten des Zytoskeletts in Kontakt zu treten (Aizer et al., 2008; Cougot et al., 2012). Obwohl *P-bodies* schon seit langer Zeit untersucht werden und bereits viele Proteine identifiziert werden konnten, die in ihnen kolokalisieren, ist ihre spezifische Funktion im Zellstoffwechsel noch nicht abschließend geklärt (Luo et al., 2018). Es existieren diesbezüglich jedoch Hypothesen, die sich auf zahlreiche experimentelle Beobachtungen stützen (vgl. 1.3.2). Obwohl viele dieser Untersuchungen in Hefezellen oder transformierten Säugetierzellen durchgeführt wurden, lassen sich wahrscheinlich die meisten der erworbenen Beobachtungen auch auf komplexe eukaryotische Zellen übertragen (Andrei et al., 2005; Jain & Parker, 2013).

1.3.1 **Proteine des mRNA-Abbaus kolokalisieren in *P-bodies***

Innerhalb von *P-bodies* können u.a. Proteine gefunden werden, die eine Rolle beim mRNA-Abbau (vgl. 1.2) und der Translationsinhibition spielen. Dazu gehören die *decapping*-Enzyme DCP1 und DCP2, *decapping*-Aktivatoren, wie *enhancer of mRNA-*

decapping (EDC) 3 und 4, die Exoribonuklease (XRN) 1, sowie Komponenten des Deadenylase-Komplexes (Jain & Parker, 2013). Außerdem enthalten *P-bodies* sogenannte *translation repressors* und Proteine, die an der Regulation von miRNA-Funktionen und dem NMD beteiligt sind (Parker & Sheth, 2007). Translationsinitiationsfaktoren, ausgenommen eIF4E, und ribosomale Proteine konnten bislang nicht in *P-bodies* beobachtet werden (Andrei et al., 2005; Brengues et al., 2005). *P-bodies* stellen somit ein intrazelluläres Kompartiment dar, das translationell inaktive mRNA enthält (Youn et al., 2019).

Beim *decapping*-Prozess bindet DCP2 an die mRNA und katalysiert die irreversible hydrolytische Spaltung des m⁷G-cap unter Freisetzung von 7-Methyl-Guanosin 5'-Diphosphat (m⁷GDP) und 5'-monophosphorylierter mRNA (Franks & Lykke-Andersen, 2008). Zu diesem Zweck enthält DCP2 die katalytisch aktive *nucleoside diphosphate linked to X* (NUDIX)-Domäne und kann direkt über die N-terminale regulatorische Domäne (NRD) mit der N-terminalen regulatorisch aktiven *enabled/VASP homology 1* (EVH1)-Domäne von DCP1, der regulatorischen Untereinheit des *decapping*-Komplexes, interagieren (Chang et al., 2014; She et al., 2008). Neben der EVH1-Domäne konnte in humanem DCP1 eine C-terminale Erweiterung mit einer Trimerisationsdomäne (TD) identifiziert werden, die durch Trimerisation von DCP1 für eine Aktivierung des *decapping*-Komplexes benötigt wird (Tritschler et al., 2009). In Eukaryoten konnten zwei DCP1-Isoformen (DCP1a und DCP1b) bisher ohne funktionellen Unterschied nachgewiesen werden (Coller & Parker, 2004; Fenger-Gron et al., 2005). Der *decapping*-Prozess wird durch verschiedene Proteine reguliert: *Decapping*-Aktivatoren sind z.B. das *DNA topoisomerase 2-associated protein* Pat1, EDC3 und die *DEAD-box RNA helicase* Dhh1 (Coller et al., 2001; Kshirsagar & Parker, 2004). Zur Gruppe der *decapping*-Inhibitoren gehören z.B. das *poly(A)-binding protein* (Pab1), welches den *decapping*-Prozess ohne vorherige Deadenylierung unterbricht, und Translationsinitiationsfaktoren (Caponigro & Parker, 1995; Schwartz et al., 2003). *Decapping* und Translation stehen somit in einem entgegengesetzten Verhältnis und in einer Art Konkurrenz zueinander. Infolge des mRNA-*decappings* katalysiert XRN1 den mRNA-Abbau in 5'-3'-Richtung (Jain & Parker, 2013). Dabei ist es in der Lage, über ein prolinreiches Motiv in der C-terminalen Region, genannt *DCP1-binding motif* (DBM), mit der EVH1-Domäne von DCP1 zu interagieren (Braun et al., 2012). Das *P-body*-Protein EDC4 fördert als sogenanntes

scaffolding-Protein die Kopplung des *decapping*-Prozesses mit dem 5'-3'-mRNA-Abbau über eine Vermittlung der Interaktion von DCP1, DCP2 und XRN1 und konnte in humanen Zellen, aber nicht in Hefezellen gefunden werden (Chang et al., 2014). Die starke EDC4-vermittelte Protein/Protein-Interaktion trägt vermutlich dazu bei, dass der XRN1-vermittelte mRNA-Abbau im Vergleich zu anderen mRNA-Abbaumechanismen einen dominanten Abbauweg darstellt (Horvathova et al., 2017). Die Beobachtung, dass eine Reduktion des EDC4-Spiegels in humanen Zellen zu einer Inhibierung des *decappings* führt, verdeutlicht außerdem die Bedeutung von EDC4 für den mRNA-Abbau (Chang et al., 2014).

Beobachtungen aus *knockdown*-Experimenten konnten zeigen, dass bei Depletion von DCP1, XRN1 oder EDC4 eine veränderte *P-body*-Assemblierung resultiert, was ihre Funktion für die *P-body*-Formierung verdeutlicht, wobei die genauen Mechanismen und ihre spezifischen Funktionen noch nicht ausreichend geklärt sind (Sheth & Parker, 2003; Tenekeci, 2018). Das Protein EDC4 scheint dabei sogar einen essenziellen Faktor für die *P-body*-Bildung darzustellen, da bei Depletion von EDC4 eine Auflösung der *P-body*-Strukturen beobachtet werden konnte (Seto et al., 2015; Tenekeci, 2018).

1.3.2 Funktion von *P-bodies*

Die Beobachtung, dass mRNAs und Proteine des mRNA-Abbaus in *P-bodies* lokalisiert sind, impliziert die Hypothese, dass *P-bodies* Orte des mRNA-Abbaus, insbesondere des *decappings* und der 5'-3'-Hydrolyse darstellen. So konnte in Hefezellen infolge einer inhibierten Deadenylierung, dem frühen Schritt im mRNA-Abbau, eine Reduktion der *P-body*-Anzahl beobachtet werden, während infolge einer Depletion bzw. Inaktivierung von DCP1 oder XRN1, einem späteren mRNA-Abbau-Prozess, ein Anstieg der *P-body*-Anzahl und -Größe gezeigt werden konnte (Sheth & Parker, 2003). Cougot et al. konnten außerdem bei (partieller) Inaktivierung von XRN1 eine Akkumulation von mRNA-Abbau-Produkten in *P-bodies* beschreiben (Cougot et al., 2004). Diese Beobachtungen gehen mit der Auffassung einher, dass die *P-body*-Assemblierung mit der Menge an untranslatierter mRNA korreliert und von dieser abhängig ist (Teixeira et al., 2005). So konnte bei Anstieg des mRNA-*pools* durch Inhibition der Translationsinitiation durch Mutationen, osmotischem Stress oder Glucose-Mangel eine Induktion der *P-body*-Ausbildung verzeichnet werden, während bei Reduktion des zytoplasmatischen *pools* an mRNA durch langfristige Inhibierung der Transkription mittels Actinomycin D, Behandlung mit Ribonuclease A oder Hemmung

der Translationselongation durch Cycloheximid eine Auflösung der *P-body*-Strukturen beobachtet werden konnte (Ashe et al., 2000; Cougot et al., 2004; Teixeira et al., 2005; Uesono & Toh-e, 2002).

Allerdings kann der mRNA-Abbau auch noch ohne mikroskopisch sichtbare *P-bodies* stattfinden, zumal *P-body*-Komponenten in einem dynamischen Austausch mit dem Zytoplasma stehen und die Mehrheit dieser scheinbar außerhalb von *P-bodies* zu lokalisieren sind (Eulalio et al., 2007a; Kedersha et al., 2005; unveröffentlichte Daten AG Kracht). Als Erklärung dafür wäre es denkbar, dass *P-bodies* subzelluläre Orte darstellen, in denen aufgrund einer räumlichen Konzentration an Abbau-Faktoren der mRNA-Abbau besonders effizient erfolgt (Franks & Lykke-Andersen, 2008). Demgegenüber impliziert die Feststellung, dass mRNAs *P-bodies* wieder verlassen und in den Translationsprozess übertreten können, die Hypothese, dass *P-bodies* vielmehr als Orte der temporären Speicherung von mRNA zusammen mit den daran gebundenen mRNA-Abbau-Proteinen darstellen (Brenques et al., 2005; Luo et al., 2018). Biochemische Aufreinigungen von *P-bodies* in HEK293-Zellen konnten in diesem Zusammenhang zwar eine erwartungsgemäße Akkumulation von translationell inhibierten mRNAs, Proteinen des *decappings*, mRNA-Abbaus und von miRNA-Funktionen, sowie Faktoren der Translationsinhibierung und des NMDs nachweisen, es wurde jedoch keine Akkumulation von Transkripten gefunden, die in 5'-Richtung abgebaut wurden (Hubstenberger et al., 2017). Auch Horvathova et al. konnten anhand von *live-cell*-Analysen in HeLa-Zellen zeigen, dass im Gegensatz zum Zytoplasma keine Akkumulation von 5' abgebauter mRNA in *P-bodies* stattfindet (Horvathova et al., 2017).

Das Modell des „mRNA-cycle“ beschreibt die dynamische Vorstellung, dass mRNAs durch Wechsel der Bindungsproteine zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten wechseln können und weist *P-bodies* eine vielfältige Funktion im RNA-Metabolismus zu (Aizer et al., 2014). Demnach können translationell inhibierte mRNAs nach Lagerung in *P-bodies* an Polysomen translatiert werden oder durch *P-body*-Proteine abgebaut werden (Jain & Parker, 2013). Nach dieser Vorstellung wäre eine Art *P-body*-vermittelte Puffer-Funktion denkbar, die für ein angemessenes Verhältnis zwischen dem vorhandenen mRNA-*pool* und der Translationskapazität sorgt, um so die Proteinsynthese effektiver zu gestalten (Parker & Sheth, 2007). Aizer et al. bestärken dieses Modell durch *live-cell*-Analysen, die zeigen konnten, dass mRNAs für

mehrere Minuten in *P-bodies* verbleiben und recht langsam mit dem zytoplasmatischen *pool* ausgetauscht werden (Aizer et al., 2014). Im Rahmen des erforderlichen Umbaus der mRNPs ist in diesem Modell auch eine Interaktion von *P-bodies* mit sogenannten Stress-Granula beschrieben (Eulalio et al., 2007b). Stress-Granula sind eng mit *P-bodies* verwandt, da sie ähnliche Proteine, jedoch zusätzlich Translationsinitiationsfaktoren und auch ribosomale Proteine enthalten können (Decker & Parker, 2012). Sie bilden sich in Analogie zu *P-bodies* vermehrt bei stressinduzierter Inhibition der Translationsinitiation (Buchan & Parker, 2009).

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass *P-bodies* bei der Regulation viraler Vermehrungszyklen eine Rolle spielen (Jain & Parker, 2013). So konnte gezeigt werden, dass miRNAs und *P-body*-Komponenten bei der Abwehr von Infektionen mit humanem Immundefizienz-Virus (HIV) beteiligt sein können (Nathans et al., 2009). Außerdem konnte eine Akkumulation von antiviralen Proteinen, wie *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide Like 3G* (APOBEC3G), in *P-bodies* gefunden werden, was darauf hindeutet, dass *P-bodies* Orte der viralen Abwehr darstellen (Beckham & Parker, 2008).

1.3.3 *P-bodies* und IL-1-signaling

Die Beobachtung, dass verschiedene Signalmoleküle, wie Proteinphosphatasen und -kinasen, mit *P-bodies* assoziieren können, deutet darauf hin, dass *P-bodies* eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen können (Zhang & Herman, 2019). Im Zusammenhang mit der inflammatorischen Genexpression ist beschrieben worden, dass verschiedene Stressoren posttranslationelle Modifikationen von *P-body*-Komponenten (Abb. 1.3) induzieren und die Zusammensetzung von *P-bodies* und die mRNA-Stabilität beeinflussen können (Luo et al., 2018; Tenekeci et al., 2018). Somit wäre eine direkte Funktion von *P-bodies* bei der Regulation von Entzündungsprozessen im Körper denkbar.

Näher betrachtet konnte über eine IL-1 α -vermittelte Aktivierung von JNK eine transiente Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 beobachtet werden, die in HEK293IL-1R-Zellen nach einer Stunde IL-1 α -Inkubation zu einer starken Akkumulation von P(S315)-DCP1a in *P-bodies* führt, die *decapping*-Aktivität jedoch unbeeinflusst lässt (Rzeczkowski et al., 2011). Außerdem konnte nach einstündiger IL-1 α -Behandlung ein vorübergehender Anstieg der *P-body*-Anzahl um ca. 75 %

beobachtet werden, ein Effekt, der sich in geringerem Ausmaße auch in HeLa-Zellen reproduzieren ließ (Rzeczkowski et al., 2011; Tenekeci, 2018). Des Weiteren konnte ein stabilisierender Effekt der Phosphorylierung von DCP1a auf *IL8*-mRNA, sowie eine DCP1a-regulierte IL-1-abhängige mRNA-Induktion beobachtet werden, sodass DCP1a eine Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen könnte (Rzeczkowski et al., 2011). Die TRAF6-vermittelte K63-abhängige Ubiquitylierung von DCP1a am C-Terminus stellt eine weitere posttranslationale Modifikation von *P-body*-Proteinen dar und beeinflusst die IL-1-abhängige Phosphorylierung von DCP1a (Tenekeci et al., 2016). Dabei wird die TD von DCP1a als essenziell für die genannte Ubiquitylierung angesehen (Tenekeci et al., 2016). Da infolge einer Depletion von Ubiquitin in U2OS-Osteosarkom-Zellen eine Verminderung der *P-body*-Anzahl und eine Stabilisierung von IL-1-abhängigen Genen beobachtet werden konnte, kann von einer ubiquitylierungsabhängigen *P-body*-Assemblierung und mRNA-Stabilität ausgegangen werden (Tenekeci et al., 2016). Des Weiteren konnte durch Unterbindung der TRAF6-abhängigen Ubiquitylierung durch Mutation im C-Terminus von DCP1a eine verminderte *decapping*-Aktivität beobachtet werden, was weiterhin für eine Regulation des mRNA-Abbaus durch TRAF6 spricht (Tenekeci et al., 2016).

Aktuellere Untersuchungen der AG Kracht konnten weitreichendere Erkenntnisse für die Funktion von *P-bodies* im Zusammenhang mit Zytokin-getriggertem RNA-Metabolismus aufzeigen. Dafür wurde in HeLa-Zellen mittels *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)-Cas9-System ein stabiler *knockdown* der *P-body*-Proteine DCP1a, EDC4 und XRN1 etabliert und systematisch das IL-1-abhängige mRNA-*steady-state-level*, die mRNA-Stabilitäten, die Assemblierung des *decapping*-Komplexes, die mRNA-Lokalisation und die *de novo* Proteinsynthese untersucht (Tenekeci, 2018). Die dabei erhaltenen Erkenntnisse unterstützen vor allem die Hypothese der Speicherfunktion von *P-bodies* und werden im Ergebnis- und Diskussionsteil näher erläutert.

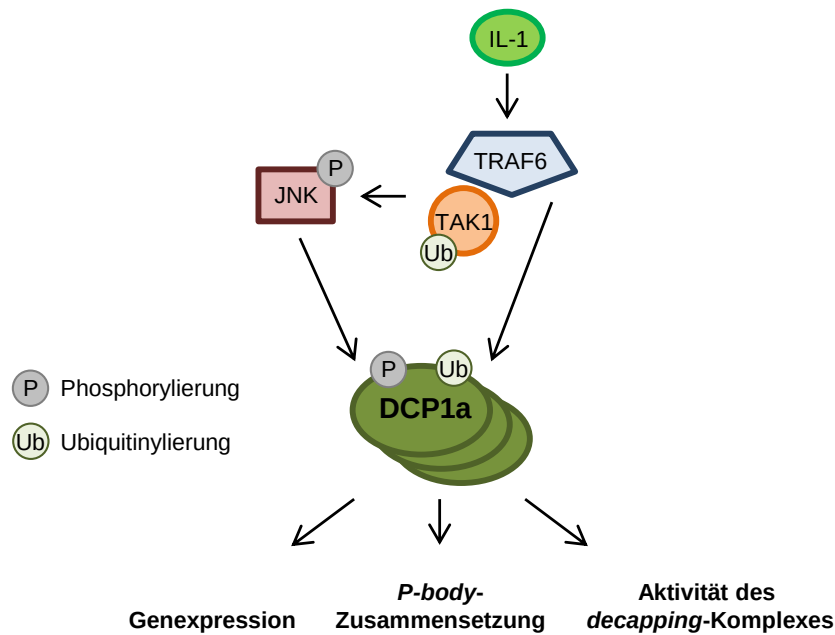


Abb. 1.3: IL-1-induzierte posttranslationale Modifikationen von DCP1a. DCP1a wird durch die IL-1-vermittelte Aktivierung von JNK an S315 phosphoryliert und die E3 Ubiquitinligase TRAF6 am C-Terminus ubiquitinyliert, wodurch wiederum die Phosphorylierung von DCP1a eingeleitet wird. Diese posttranslationalen Modifikationen beeinflussen die Genexpression, *P-body*-Assemblierung und die Aktivität des *decapping*-Komplexes, wodurch eine DCP1a-vermittelte Regulation von inflammatorischer Signaltransduktion ermöglicht wird. Abbildung wurde modifiziert nach Tenekeci et al., 2016.

1.4 hTERT-RPE1-Zellen als humane, epitheliale und diploide Zelllinie

In dieser Arbeit sollen humane *telomerase reverse transcriptase* (hTERT)-*retinal pigmented epithelial* (RPE1)-Zellen als humane und epitheliale Zelllinie im Hinblick auf die Regulation der IL-1-vermittelten Genexpression im Zusammenhang mit der Funktion von *P-body*-Proteinen charakterisiert werden. Diese Zelllinie wurde von der Firma ATCC (*american type cell collection*, CRL-4000) erworben und von der AG Schmitz übernommen. Die Originalzellen stammen aus dem retinalen Pigmentepithel einer weiblichen Spenderin und sind durch eine stabile Transfektion mit dem pGRN145-Plasmid (ATCC MBA-141) hTERT-immortalisiert und mittels Hygromycin B selektiert worden (ATCC, 2016). Sie besitzen im Gegensatz zu anderen breit untersuchten Zelllinien wie HeLa- und HEK293-Zellen die Eigenschaft eines diploiden Chromosomensatzes (ATCC, 2016; Katoh et al., 2017).

Das retinale Pigmentepithel liegt als äußerste Schicht der Netzhaut auf der Bruch-Membran und direkt der Aderhaut auf und umfasst mit seinen Fortsätzen die Außensegmente der Photorezeptoren (Sachsenweger et al., 2003). Es ist an vielfältigen Stoffwechselprozessen der Retina beteiligt. So dient es u.a. der Wiederverwertung von Vitamin A, der Phagozytose der sich erneuernden Außensegmente der Photorezeptoren,

dem Wärmeaustausch mit der Aderhaut und der Absorption von Streulicht (Sachsenweger et al., 2003). Durch Verbindungen der einzelnen Zellen über Zonulae occludentes bildet es als weitere wichtige Funktion einen Teil der Blut-Retina-Schranke, die dafür sorgt, dass nur niedermolekulare Stoffe zur Nährstoffversorgung aus der Aderhaut zur Netzhaut gelangen (Sachsenweger et al., 2003). Als post-mitotische Zellen sind sie nur begrenzt regenerationsfähig und degenerieren daher mit fortschreitendem Alter (An et al., 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass neben infiltrierenden Leukozyten auch RPE-Zellen durch Zytokinproduktion an der okulären Immunantwort beteiligt sind und eine Rolle bei der Pathogenese verschiedener Augenerkrankungen wie z.B. der diabetischen Retinopathie spielen (Bian et al., 2011; Kim et al., 2014). Die diabetische Retinopathie ist eine Folgeerkrankung des Diabetes mellitus mit progredienter Sehverschlechterung, die auf einer Hyperglykämie-induzierten Schädigung der Blut-Retina-Schranke durch u.a. Dysfunktion und Apoptose des retinalen Pigmentepithels beruht (Kim et al., 2014; Xia & Rizzolo, 2017). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Induktion der *coactivator-associated arginine methyltransferase 1* (CARM1), die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren p53 und NF- κ B führt, bei diesem Prozess eine Rolle spielt (Kim et al., 2014). Die altersbedingte Makuladegeneration stellt eine weitere weit verbreitete Erkrankung dar, die mit fortschreitendem Visusverlust bis zur Erblindung einhergeht und bei der RPE-Zellen eine pathogenetische Rolle spielen (An et al., 2006). Pathognomisch sind Ablagerungen von Stoffwechselprodukten, den sogenannten Drusen, zwischen Pigmentepithelzellschicht und Bruch-Membran, die von einer choroidalen Neovaskularisation begleitet sind (Hageman & Mullins, 1999). Es wird vermutet, dass RPE-Zellen durch eine Sekretion von verschiedenen extrazellulären Matrix-Proteinen, Wachstumsfaktoren, Komplementfaktoren und Protease-Inhibitoren an der Bildung dieser Drusen beteiligt sind (An et al., 2006). IL-1 α stellt dabei einen potenziellen Initiator des retinalen Inflammasoms dar, von dem das Zelltodprofil beschädigter RPE-Zellen von der Apoptose bis zur Pyroptose, einem entzündlichen Zelltodweg, abhängig ist (Wooff et al., 2019). Weitere Studien zeigen, dass IL-1 α als eine Art „Alarmsignal“ von gestressten oder sterbenden RPE-Zellen sezerniert wird und zur Sekretion anderer führt und dadurch die Krankheitsprogression beeinflusst (Bian et al., 2019).

1.5 Ausgangsrationalen und Ziele der Arbeit

Die Zusammensetzung von *P-bodies* ist bis heute zwar recht gut erforscht, jedoch lässt sich die genaue (patho-) physiologische Funktion dieser Zellkomponenten noch nicht eindeutig formulieren. Es kommt hinzu, dass die meisten der Erkenntnisse zu *P-body*-Proteinen in Hefezellen oder diversen Tumorzelllinien wie HeLa- oder HEK293-Zellen eruiert wurden, sodass eine Untersuchung in einer humanen, diploiden Zelllinie erstrebenswert war. Da *P-bodies* als mRNPs aus einer Assoziation von Proteinen und mRNAs bestehen ist es sinnvoll, ihre Funktion in einem dynamisch regulierten Modell mit hohem mRNA-Umsatz zu explorieren. Als solches System bietet sich die IL-1-induzierbare Genantwort an, die sich aufgrund verschiedenster Rückkopplungsmechanismen durch eine massive, aber transiente Änderung der Gentranskription und der mRNA-Stabilität auszeichnet. Außerdem repräsentiert dieses Zytokin-vermittelte System das prototypische Modell einer zellulären Entzündungsreaktion, die die Grundlage vieler Erkrankungen im menschlichen Körper und Ziel verschiedener pharmakologischer Therapeutika darstellt. In der AG Kracht konnten in diesem System bereits IL-1-abhängige posttranslationelle Modifikationen des *P-body*-Proteins DCP1a im Zusammenhang mit einer Regulation der mRNA-Stabilität identifiziert werden. Des Weiteren konnten in HeLa-Zellen Veränderungen der *P-body*-Assemblierung und Veränderungen der *steady-state-level*, mRNA-Stabilitäten und mRNA-Lokalisationen IL-1-abhängiger Gene bei stabilem *knockdown* einzelner *P-body*-Proteine mittels des CRISPR/Cas 9-Systems beobachtet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion von *P-bodies* bzw. einzelner *P-body*-Proteine bei der Ausbildung von mikroskopisch sichtbaren mRNPs und der Regulation der IL-1-abhängigen Genexpression in hTERT-RPE1-Zellen näher untersucht werden. Dafür sollten die Zellen zunächst im Hinblick auf die IL-1-abhängige *P-body*-Assemblierung und Genexpression charakterisiert und anschließend der Einfluss einzelner ausgewählter *P-body*-Proteine auf die *P-body*-Zusammensetzung und mRNA-Spiegel IL-1-induzierbarer Gene anhand transienter Überexpression und Depletion untersucht werden.

2 Material

Alle Verbrauchsmaterialien (Plastikwaren und Einwegmaterialien) wurden von den Firmen Brand, Eppendorf, Greiner, Ibidi, Neolab, Nunc, Omnilab, Roth und Sarstedt bezogen.

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
7500 Fast Real Time PCR System	Applied Biosystem
Chemi Doc Touch Imaging System	Biorad
Elektrophoresekammer	Thermo Scientific
Elektrophorese Power Supply EPS 600, 601, 3500	Pharmacia Biotech
Fluoreszenzmikroskop DMi8	Leica
Lichtmikroskop DMIRB	Leitz
Nano Drop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie
Semi-Dry-Blotter	Peqlab Biotechnologie
Spectramax Plus 384	Molecular Devices
Techne Hybridiser HB-ID	Thermo-DUX
Thermocycler T Professional	Biometra

2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roth, Roche, Serva und Sigma bezogen.

2.3 Gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Name	Hersteller (Art. Nr.)
4 % Paraformaldehyd in <i>phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Santa Cruz (#sc-281692)
4x Rotiload Auftragspuffer	Roth (#K929.3)
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (#RPN2106)
<i>Desoxynucleotidtriphosphate</i> (dNTP) Mix	Thermo Fisher Scientific (#R0192)
<i>Hank's balanced salt solution</i> (HBSS)	PAN Biotech (#P04-32505)
HiPerFect-Transfektionsreagenz	Qiagen (#301704)
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific (#H3570)
ibiTreat μ -Slide VI 0.4	Ibidi (#80606)

Immobilion Western Chemiluminescent HRP-Substrat	Merck Milipore (#WBKLS0500)
Normal Donkey Serum	Jackson ImmunoResearch (#017-000-121)
NucleoSpin RNA II Kit	Macherey-Nagel (#740955.250)
PBS	Santa Cruz (#281692)
Ponceau S	Serva (#33429)
Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit	Affymetrix (#QVC0001)
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific (#S0142)
Roti-PVDF-Membran	Roth (#T830.1)
Roti-Quant Bradford Kit	Roth (#K015.1)
Saponin	Sigma-Aldrich (#S4521-10G)
Serumfreies Medium (Opti-MEM)	Gibco (#51985-026)
TaqMan Fast Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems (#4352042)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio Rad (#1610801)
Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Solution	PAN Biotech (#P10-023100)

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Puffer für Gesamtproteinlyse

Puffer	Zusammensetzung
Speziallysepuffer	30 mM Natriumpyrophosphat 50 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 2 mM Na ₃ VO ₄ 50 mM NaF 20 mM β-Glycerophosphat 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminoethan (Tris) pH 7,05 mit HCl

Der Speziallysepuffer wurde vor seiner Verwendung mit den Protease- und Phosphataseinhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (0,5 mM), Pepstatin (1 µg/ml), Leupeptin (2,5 µg/ml) und Microcystin (1 µM) versetzt.

2.4.2 Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western Blot

Substanzen	Zusammensetzung
Blockpuffer	5 % (w/v) Milchpulver/TBST (1x)
Blotpuffer (<i>semi-dry</i>)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

Laemmli-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
Ponceau S-Färbelösung	0,1 % (w/v) Ponceau S 5 % (v/v) Essigsäure
Sammelgelpuffer	1 M Tris pH 6,8 mit NaCl
<i>Tris-buffered saline</i> (TBS) (10x)	100 mM Tris 1,5 M NaCl pH 7,4 mit NaCl
TBST (1x)	0,05 % (v/v) Tween 20/TBS (1x)
Trenngelpuffer	1 M Tris pH 8,8 mit NaCl

2.4.3 Puffer und Lösungen für Calciumphosphat-Transfektion

Substanzen	Zusammensetzung
HEPES- <i>buffered saline</i> (HEBS) (2x)	280 mM NaCl 50 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,12 mit NaOH
CaCl ₂ -Lösung	2 M CaCl ₂

2.4.4 Medien für Zellkultur

Medium	Zusammensetzung	Hersteller (Art. Nr.)
<u>Für HeLa-Zellen:</u>		
DMEM-Vollmedium	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> (DMEM)	PAN Biotech (#P04-03550)
	10 % (v/v) <i>fetal bovine serum</i> (FBS)	PAN Biotech (#P40-47500)
	100 U/ml Penicillin	PAN Biotech (#P06-07100)
	100 µg/ml Streptomycin	PAN Biotech (#P06-07100)
	2 mM L-Glutamin	PAN Biotech (#P04-80100)
<u>Für hTERT-RPE1-Zellen:</u>		
DMEM/F12-Vollmedium	<i>Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12</i> (DMEM/F12)	Gibco (#11320-074)
	10 % (v/v) FBS	PAN Biotech (#P40-47500)
	100 U/ml Penicillin	PAN Biotech (#P06-07100)
	100 µg/ml Streptomycin	PAN Biotech (#P06-07100)
	0,01 mg/ml Hygromycin B	Sigma Aldrich (#H3274)
Einfriermedium	DMEM/F12-Vollmedium	Gibco (#11320-074)
	10 % (v/v) FBS	PAN Biotech (#P40-47500)

	10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (#D2650)
Schockmedium	DMEM/F12-Vollmedium 10 % (v/v) Glycerol	Gibco (#11320-074) Merck Milipore (#1040921000)

2.5 Enzyme

Name	Hersteller (Art. Nr.)
Rekombinante RevertAid Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific (#EP0441)
DNAse	Thermo Fisher Scientific (#EN0521)

2.6 Marker

Marker	Hersteller (Art. Nr.)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (#26616)

2.7 Inhibitoren

Inhibitor	Stocklösung	Hersteller (Art. Nr.)
Actinomycin D	10 mg/ml	Sigma-Aldrich (#A1410)
Leupeptin	5 mg/ml	Carl Roth (#CN33.2)
Microcystin	1 mM	Enzo Life Sciences (#ALX-350-012-M001)
Pepstatin	1 mg/ml	Applichem (#A2205)
PMSF	200 mM	Sigma-Aldrich (#P-7626)

2.8 Primergemische (TaqMan Gene Expression Assays)

Alle verwendeten Sonden sind mit FAM-*minor groove binder* (MGB) markiert und wurden bei der Firma Thermo Fisher Scientific erworben.

Sonde	RefSeq.	Assay-ID
Human <i>GUSB</i>	NM_000181.3	Hs99999908_m1
Human <i>IL6</i>	NM_000600.4	Hs00174131_m1
Human <i>IL8</i>	NM_000584.3	Hs00174103_m1
Human <i>NFKBIA</i>	NM_020529.2	Hs00153283_m1

2.9 Antikörper

2.9.1 Antikörper für indirekte Immunfluoreszenz und Immuno-RNA-*in situ*-Hybridisierung

Antikörper	Verdünnung (in 0,005 % (w/v) Saponin/HBSS)	Hersteller (Art. Nr.)
<u>Primärantikörper</u>		
Anti-DCP1a (rb)	1:100	Abcam (#ab47811)
Anti-DCP1a (ms)	1:100	Abnova (#H00555802-M06)
Anti-EDC3 (rb)	1:50, 1:100	Santa Cruz (#sc-135013)
Anti-EDC4 (rb)	1:100	Cell Signaling (#2548S)
Anti-EDC4 (gt)	1:200	Santa Cruz (#sc-137444)
anti-HA (ms)	1:100	Roche (#11583816001)
Anti-NFκB p65 (rb)	1:50	Santa Cruz (#sc-372)
Anti-NFκB p65 (ms)	1:100	Santa Cruz (#sc-8008)
Anti-Phospho(S315)-DCP1a (rb)	1:100	Pickcell (Serum Fraction B)
Anti-XRN1 (rb)	1:50, 1:100	Abcam (#ab70259)
Anti-XRN1 (ms)	1:50, 1:100	Santa Cruz (#sc-165985)
<u>Sekundärantikörper</u>		
Cy3 anti-rb IgG (Esel)	1:100	Merck Millipore (#AP182C)
Cy3 anti-ms IgG (Esel)	1:100	Merck Millipore (#AP192C)
Cy5 anti-gt (Esel)	1:200	Abcam (#ab150131)
Dylight 488 anti-rb IgG (Esel)	1:100	ImmunoReagent (#DkxRb-003D488 NHSX)
Dylight 488 anti-ms IgG (Esel)	1:100	ImmunoReagent (#DkxMu-003D488 NHSX)

2.9.2 Antikörper für Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Hersteller (Art. Nr.)
<u>Primärantikörper</u>		
Anti-β-Aktin (ms)	1:1000 in 5 % Milch/TBST	Santa Cruz (#sc-47778)
Anti-DCP1a (ms)	1:1000 in 5 % Milch/TBST	Abnova (#H00555802-M06)
Anti-EDC3 (rb)	1:1000 in 5 % Milch/TBST	Santa Cruz (#sc-135013)
Anti-EDC4 (rb)	1:500 in 5 % BSA/TBST	Cell Signaling (#2548S)
Anti-IκBα (rb)	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell Signaling (#9242S)
Anti-NFκB p65 (rb)	1:1000 in 5 % Milch/TBST	Santa Cruz (#sc-372)

Anti-phospho(S536)-NFκB p65 (rb)	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell Signaling (#3033S)
Anti-phospho(S315)-DCP1a (rb)	1:300 in 5 % BSA/TBST	Pickcell (Serum Fraction B)
Anti-phospho(S32)-IκB (rb)	1:1000 in 5 % Milch/TBST	Cell Signaling (#2859S)
Anti-Tubulin (ms)	1:1000 in 5 % Milch/TBST	Santa Cruz (#sc-8038)
Anti-XRN1 (rb)	1:1000 in 5 % Milch/TBST	Abcam (#ab70259)
<u>Sekundärantikörper</u>		
HRP anti-rb IgG	1:2000 in 5 % Milch/TBST	DakoCytomation (#P0447)
HRP anti-ms IgG	1:2000/1:10000 in 5 % Milch/TBST	DakoCytomation (#P0448)

2.10 Sonden für RNA-*in situ*-Hybridisierung

Sonde	Typ	Hersteller (Art. Nr.)
Human <i>IL6</i>	Type 1	Affymetrix (#VA1-13526)
Human <i>IL8</i>	Type 1	Affymetrix (#VA1-13103)
Human <i>IL8</i>	Type 6	Affymetrix (#VA6-13192)
Human <i>NFKB1A</i>	Type 1	Affymetrix (#VA1-14406)
Human <i>NFKB1A</i>	Type 6	Affymetrix (#VA6-17971)
Human <i>ACTB</i>	Type 4	Affymetrix (#VA4-10293)

2.11 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
HeLa (humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen)	ATCC CCL-2
hTERT-RPE1 (hTERT-immortalisierte humane Pigmentepithelzellen der Retina)	ATCC CRL-4000

2.12 Rekombinante Proteine

rekombinantes Protein	Stocklösung	Herkunft
humanes, rekombinantes IL-1α	10 µg/ml	AG Kracht

2.13 Vektoren

Vektor	Herkunft
pCIneo- λ N-HA-EDC4	Prof. Dr. M.L. Schmitz, Gießen, Prof. Dr. E.Izaurrealde, Tübingen
pCIneo- λ N-HA-LV	Prof. Dr. M.L. Schmitz, Gießen, Prof. Dr. E.Izaurrealde, Tübingen
peGFP-C1-LV	Clontech
peGFP-DCP1a	Prof. Dr. H. Holtmann, Hannover

2.14 siRNAs

Protein	siRNA-Name	Hersteller (Art. Nr.)
EDC4	Hs_EDC4_1 FlexiTube siRNA	Qiagen (#SI04151616)
	Hs_EDC4_3 FlexiTube siRNA	Qiagen (#SI05002235)
Luziferase	Ps_Luciferase	Dharmacon (#D-001100-01-20)
XRN1	Hs_XRN1_6 FlexiTube siRNA	Qiagen (#SI04224514)
	Hs_XRN1_9 FlexiTube siRNA	Qiagen (#SI04999204)

2.15 Software-Programme

Software	Version
Adobe Photoshop	7.0
Bio-Rad Image Lab	5.2.1
Duolink Image Tool	1.0.1.2
Leica LasX	1.5.1.13187
Sigma Plot	11.0

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, resuspendiert und in eine mit Vollmedium (vgl. 2.4.4) bedeckte Zellkulturschale überführt. Daraufhin wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert.

Zum Einfrieren wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und für 1-2 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator durch Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden in Vollmedium resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 500 x g für 5 Minuten pelletiert und das überstehende Medium vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium (vgl. 2.4.4) aufgenommen und auf zwei Kryoröhrchen verteilt. Das Aliquot wurde zunächst bei -80°C gefroren und später in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Zellen wurden in Vollmedium im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Adhärente Zellen wurden für die verschiedenen Versuche in entsprechenden Dichteverhältnissen passagiert. Dafür wurden sie zweimal mit warmem PBS gewaschen und für 1-2 Minuten mit Hilfe von Trypsin/EDTA bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator abgelöst. Die Zellen wurden daraufhin in Vollmedium resuspendiert und nach gewünschter Dichte in IBIDI μ -Slides VI oder neuen Zellkulturgefäßen ausgesät. Zur Ermittlung der Zellzahl der Zellsuspension wurden die vier Großquadrate einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt und folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\sum \text{Zellen aller Großquadrate}}{4} \times 10^4$$

3.1.2.1 Aussäen von Zellen in IBIDI μ -Slides VI

Um Zellen für verschiedene Experimente in IBIDI μ -Slides VI auszusäen, wurde zunächst eine Zellsuspension von 1 ml Gesamtvolumen auf eine vom Versuch und Zelltyp abhängige Konzentration eingestellt.

Zelltyp	Fixierung nach	Zellzahl pro ml	Zellzahl pro Kanal
hTERT-RPE1	1 Tag	350.000	10.500
	2 Tagen	190.000	5.700
	3 Tagen	90.000	2.700
	4 Tagen	47.500	1.425
HeLa	1 Tag	300.000	9.000

Von dieser Zellsuspension wurden pro Kanal 30 µl in IBIDI *µ-Slides* VI verteilt, welcher nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator mit 100 µl Vollmedium aufgefüllt wurden. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert.

3.1.2.2 Aussäen von Zellen in Zellkulturschalen

Zellen wurden zur Erhaltung der Zellpopulation in 100 mm Zellkulturschalen und für weiterführende Experimente in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät.

Zelltyp	Konfluent nach	Zellen pro 100 mm Schale	Zellen pro 60 mm Schale
hTERT-RPE1	1 Tag	$1,6 \times 10^6$	6×10^5
	2 Tagen	8×10^5	3×10^5
	3 Tagen	3×10^5	$1,1 \times 10^5$
	4 Tagen	$1,5 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$
HeLa	1 Tag	$1,5 \times 10^6$	5×10^5
	2 Tagen	7×10^5	$2,5 \times 10^5$
	3 Tagen	3×10^5	$1,1 \times 10^5$
	4 Tagen	$1,4 \times 10^5$	5×10^4

3.1.3 Stimulation und Ernte von Zellen

Eine Stimulation von Zellen erfolgte sowohl in IBIDI *µ-Slides* VI als auch in 60 mm Zellkulturschalen. Abhängig von den Versuchsbedingungen wurden die Zellen für eine bestimmte Zeit mit 10 ng/ml IL-1 α (Stocklösung: 10 µg/ml) stimuliert, indem es im Medium entsprechend verdünnt wurde. Wenn eine Behandlung mit dem Inhibitor Actinomycin D (Stocklösung: 10 mg/ml) erfolgen sollte, wurde dieser in einer Konzentration von 5 µg/ml nach Ablauf der IL-1 α -Stimulationszeit für eine bestimmte Zeit dem Medium hinzugefügt.

Für eine Behandlung der Zellen in IBIDI μ -Slides VI musste aufgrund der kleinen einzusetzenden Volumina vom Stimulanz bzw. Inhibitor mit Vorverdünnungen gearbeitet werden. Um die gewünschte Konzentration in dem jeweiligen Kanal zu erreichen, wurden zunächst 60 μ l Zellkulturmedium des zu behandelnden Kanals entnommen, von dem ein bestimmtes Volumen der 1:100-Vorverdünnung des jeweiligen Stimulanz oder Inhibitors ersetzt wurde. Die komplettierten 60 μ l Medium inklusive Stimulanz bzw. Inhibitor wurden zurück in den entsprechenden Kanal pipettiert und durch zwei- bis dreimaliges Durchspülen des Kanals mit dem restlichen Medium vermischt. Für eine Stimulation in 60 mm Zellkulturschalen wurde der Zellkulturüberstand auf 2 ml reduziert und das Stimulanz bzw. der Inhibitor in entsprechendem Volumen für die gewünschte Konzentration direkt zum Medium gegeben und durch Schwenken verteilt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Proben.

Für die Ernte von Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen auf Eis zweimalig mit kaltem PBS gewaschen. Mittels Zellkulturschaber wurden die Zellen in 1,2 ml kaltem PBS vom Boden der Zellkulturschale mechanisch abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 500 x g für 5 Minuten bei 4°C pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das entstandene Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur RNA-Isolation oder Proteinlyse bei -80°C gelagert.

3.1.4 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-Präzipitation in IBIDI μ -Slides VI

Mittels Calciumphosphat-Präzipitation kann eine transiente Transfektion von Zellen mit eukaryotischen Expressionsvektoren erzielt werden (Mülhardt, 2013). Bei dieser Methode wird eine Calciumchlorid- mit einer Natriumphosphatlösung gemischt, wodurch Calciumphosphatkristalle ausfallen, die mit der enthaltenden DNA kopräzipitieren (Rassow et al., 2008). Die entstandenen Präzipitate werden dann mittels Endozytose von den Zellen aufgenommen (Mülhardt, 2013; Rassow et al., 2008).

Nach Aussaat von versuchsabhängigen Zelldichten in IBIDI μ -Slides VI (vgl. 3.1.2.1) am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit den entsprechenden Expressionsvektoren (vgl. 2.13). Dafür wurde folgender Transfektionsansatz erstellt:

Reagenz	Menge
HEBS-Puffer	112,5 µl
H ₂ O	125 µl
Plasmid-DNA	9 µg
CaCl ₂	15,75 µl

Nachdem zuletzt die kalte CaCl₂-Lösung tropfenweise dem Transfektionsansatz hinzugegeben wurde, wurde dieser gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise konnte das schlechter lösliche Calciumphosphat ausfallen und mit der zu transfizierenden DNA kopräzipitieren. Anschließend wurden von den zu transfizierenden Kanälen 60 µl Medium entfernt. Davon wurden 30 µl verworfen und durch 30 µl der Transfektionslösung ersetzt. Die Mischung aus Zellkulturmedium und Transfektionsansatz wurde wieder zurück in den Kanal gegeben und dieser zwei- bis dreimal durchspült. Nach 5 Stunden Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator wurde eine gewisse Menge der Calciumphosphatkristalle von den Zellen aufgenommen. Das Transfektionsmedium wurde entfernt und ein Glycerolschock mit 150 µl Schockmedium (vgl. 2.4.4) für 3 Minuten durchgeführt, der den Transfektionserfolg in hTERT-RPE1-Zellen verbesserte (vgl. 4.5.1). Nach zweimaligem Waschen der transfizierten Zellen mit 130 µl vorgewärmtem PBS zur Entfernung der überschüssigen Calciumphosphat-Kristalle wurden je Kanal 130 µl Vollmedium auf die Zellen gegeben. Die Zellen standen nach weiteren 20-24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ zu weiteren Versuchszwecken zur Verfügung. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit den entsprechenden Leervektoren transfiziert wurden.

3.1.5 Transiente Transfektion mit siRNAs und HiPerFect-Transfektionsreagenz in 60 mm Schalen und IBIDI µ-Slides VI

Durch die Transfektion von *small interfering RNA* (siRNA) kann auch in schlecht transfizierbaren Zellen wie den hTERT-RPE1, die auch bereits Puromycin-resistent und damit nicht unter Verwendung von diesem Antibiotikum selektierbar sind, ein starker *knockdown* eines Proteins erzielt werden (Möertl et al., 2007). siRNAs sind kurze doppelsträngige Ribonukleinsäuren, die von den Zellen aufgenommen werden und zusammen mit anderen Proteinen den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) bilden (Qiagen, 2010). Dieser Komplex kann an eine genspezifische komplementäre mRNA-Sequenz binden, die daraufhin geschnitten und dann abgebaut

wird, sodass das kodierende Protein folglich nicht mehr exprimiert wird (Abb. 3.1) (Möertl et al., 2007; Qiagen, 2010). Unter Verwendung des lipidreichen HiPerFect-Transfektionsreagenz wurden in dieser Arbeit verschiedene siRNAs verwendet, die mit *XRN1*- und *EDC4*-mRNA interferieren. Das Transfektionsreagenz und die siRNAs wurden von der Firma Qiagen bezogen. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit siRNA gegen das *firefly* (Glühwürmchen)-Protein Luziferase, welches in humanen Zellen nicht vorkommt, transfiziert wurden.

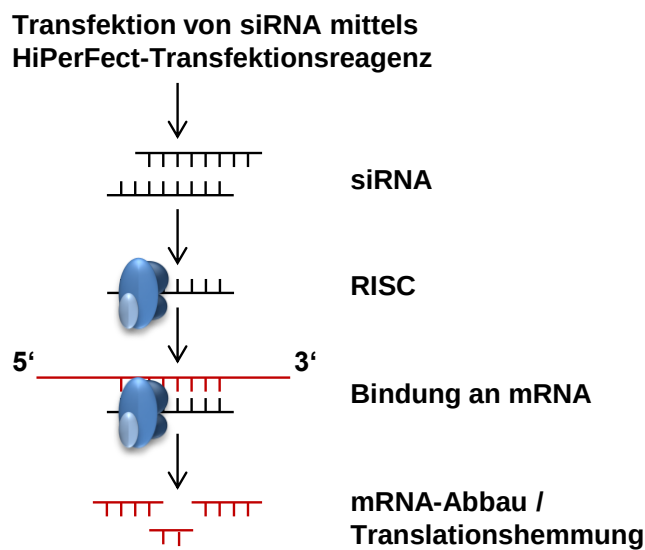


Abb. 3.1: Prinzip des siRNA-vermittelten knockdowns von Proteinen. Zellen wurden unter Verwendung des HiPerFect-Transfektionsreagenz mit spezifischen siRNAs transfiziert, die eine komplementäre Sequenz zur Ziel-mRNA aufweisen. Daraufhin formierte sich intrazellulär der RISC, der aus siRNAs und verschiedenen Proteinen besteht. Die Bindung der siRNAs an die korrespondierende Ziel-mRNAs ermöglichte die Spaltung dieser mRNAs durch Proteine des RISC, sodass die verfügbare mRNA-Menge für die darauf folgende Proteinsynthese reduziert wurde. Abbildung modifiziert nach Qiagen, 2010.

3.1.5.1 Transfektion von Zellen mit siRNAs in 60 mm Schalen

Nach Aussaat von versuchsabhängigen Zelldichten (vgl. 3.1.2.2) in 60 mm Zellkulturschalen am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen über Nacht in 4 ml Vollmedium bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit spezifischen siRNAs und dem HiPerFect-Transfektionsreagenz. Dafür wurde zunächst das Medium pro Schale auf 2 ml reduziert und folgender Ansatz für jede zu transfizierende Schale erstellt:

Reagenz	Menge
Serumfreies Medium (Opti-MEM)	500 µl
HiPerFect-Transfektionsreagenz	10 µl
siRNAs	25 / 50 / 100 nM (auf 2 ml Medium bezogen)

Der Transfektionsansatz wurde kurz gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde pro Schale das Volumen an Medium, das dem Transfektionsansatz entsprach, verworfen und durch den Transfektionsansatz ersetzt. Dafür wurde die Transfektionslösung dem Vollmedium tröpfchenweise hinzugegeben und durch Schwenken der Zellkulturschale vermischt. Nach 5 Stunden Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Transfektionsmedium vollständig abgesaugt und durch 4 ml frisches Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden nun für weitere 24, 48 oder 72 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und standen dann weiteren Versuchszwecken zur Verfügung.

3.1.5.2 Transfektion von Zellen mit siRNAs in IBIDI μ -Slides VI

Nach Aussaat von versuchsabhängigen Zelldichten (vgl. 3.1.2.1) in IBIDI μ -Slides VI am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit spezifischen siRNAs und dem HiPerFect-Transfektionsreagenz. Dafür wurde folgender Ansatz für jeden zu transfizierenden Kanal erstellt:

Reagenz	Menge
Serumfreies Medium (Opti-MEM)	30 μ l
HiPerFect-Transfektionsreagenz	0,6 μ l
siRNAs	25 / 50 / 100 nM (auf 120 μ l Medium bezogen)

Dieser Ansatz wurde kurz gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 60 μ l pro Kanal in ein Reaktionsgefäß überführt. Davon wurde das Volumen an Medium, das dem Transfektionsansatz entsprach, verworfen und durch den Transfektionsansatz ersetzt. Diese 60 μ l Medium mit der enthaltenden Transfektionslösung wurden zurück in den Kanal pipettiert und dieser zwei- bis dreimal durchspült. Nach 5 Stunden Inkubation im Inkubator wurde das Transfektionsmedium entfernt und jeder Kanal nach einmaligem Durchspülen mit vorgewärmtem Vollmedium mit 150 μ l Vollmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden nun für weitere 24, 48 oder 72 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und standen dann weiteren Versuchszwecken zur Verfügung.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Zellyse

Um mittels Western Blot spezifische Proteinspiegel zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst unter Verwendung eines Speziallysepuffers lysiert. Dafür wurde der Speziallysepuffer auf Eis mit den Inhibitoren Pepstatin, Leupeptin, PMSF und Microcystin (vgl. 2.4.1) versetzt. 60 bis 80 µl dieser Lösung wurden auf die geernteten Zellpellets gegeben, das Reaktionsgefäß gevortext und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellpellets im Lysepuffer erneut kurz gevortext und für 15 Minuten bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert, damit sich unlösliche Zellbestandteile absetzen konnten. Das Lysat im Überstand, welches die löslichen Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Darauf folgte unmittelbar die Bestimmung des Gesamtproteingehalts durch die Methode nach Bradford.

3.2.2 Proteingehaltbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts in den Speziallysaten wurde die Methode nach Bradford angewendet. Diese Methode basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm auf 595 nm aufgrund seiner Bindung an Proteine im sauren Milieu (Rehm & Letzel, 2016). Diese Absorptionsverschiebung kann mittels Photometer gemessen werden.

Die Lysate wurden zunächst bei Raumtemperatur 1:300 in PBS verdünnt. Alle Ansätze wurden als technische Quadruplikate aufgetragen, um die Proteinkonzentration so genau wie möglich ermitteln zu können. Dafür wurden 100 µl der verdünnten Lysate und 100 µl einer *bovine serum albumin* (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) in eine 96-well-Flachbodenplatte pipettiert. Zu jedem Ansatz wurden dann 100 µl einer 40%-igen Rotiquant-Lösung hinzugegeben, wodurch sich bereits eine sichtbare Farbreaktion zeigte. Die Messung der Extinktion bei 595 nm erfolgte nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur im Microplate Spectrophotometer. Die Proteinkonzentration jeder Probe wurde durch das Messgerät anhand der BSA-Standardreihe unter Berücksichtigung der verwendeten Verdünnung berechnet. Die Lysate wurden bei -80°C gelagert.

3.2.3 Probenvorbereitung für Western Blot

Für die nachfolgende Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese wurden 30-40 µg Protein pro Probe für ein Gel verwendet. Dafür wurden die Lysate entsprechend ihrer Proteinkonzentration mit Wasser verdünnt und mit 1x Rotiload versetzt, sodass ein Volumen von 30 µl pro Gelkammer aufgetragen werden konnte. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 95°C im Heizblock erhitzt, wodurch die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen wurden. Die denaturierten Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.2.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE können Proteine anhand ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden (Rehm & Letzel, 2016). Diese Auftrennung erfolgte in einer Gelmatrix aus einem Polyacrylamid (PAA)-haltigen Sammel- und Trenngel. Der Acrylamidgehalt des Trenngels kann abhängig vom zu untersuchenden Protein variiert werden. Da die PAA-Matrix als molekulares Sieb fungiert, in dem kleine Moleküle schnell und große Moleküle langsam migrieren, verwendet man höherprozentige Gele zur Detektion von kleineren, und niedrigprozentige Gele zur Detektion von größeren Proteinen (Rehm & Letzel, 2016). In dieser Arbeit wurden 8 %-ige PAA-Trenngele verwendet. Das Migrierungsverhalten der Proteine wird durch das in den aufbereiteten Proben enthaltene SDS ermöglicht. SDS lädt die enthaltenden Proteine durch Komplexbildung gleichmäßig negativ auf, sodass sie im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode migrieren können (Rehm & Letzel, 2016).

Für die SDS-PAGE wurden Trenn- und Sammelgel nacheinander in einer Gelkammer gegossen. Nach der Auspolymerisierung wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer platziert und mit 1x Laemmli-Laufpuffer befüllt. Die Probentaschen wurden mit je 30 µl Probe (30-40 µg Protein) und 10 µl Page Ruler Protein Ladder als Marker beladen, welcher nach seiner Auftrennung charakteristische Banden bei 170, 130, 100, 70 (rot), 55, 40, 35, 25, 15 und 10 (grün) kDa zeigte. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 50 mA pro Gel für ca. 2 Stunden.

Zusammensetzung der PAA-Gele:

Lösung	Sammelgel (5 %; 10 ml)	Trenngel (8 %; 27 ml)
ddH ₂ O	5,6 ml	5,6 ml
50 % (v/v) Glycerol	0,9 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	-	10,3 ml
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,26 ml	-
2 % (w/v) SDS	0,5 ml	1,35 ml
30 % (w/v) Acrylamid	1,68 ml	7,2 ml
40 % (w/v) Ammonium- peroxodisulfat (APS)	30 µl	41 µl
TEMED	20 µl	27 µl

3.2.5 Western Blot und Immunfärbung

Nach Auftrennung der Proteine im Trenngel wurden diese vom Gel mittels *semi-dry* Transfermethode auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dafür wurden zwei zugeschnittene Whatman-Papiere in 1x Blotpuffer äquilibriert und auf die Anode der Transferkammer gelegt. Auf diese wurden eine in 100 %-igem Methanol aktivierte PVDF-Membran, das Proteingel und zwei weitere in 1x Blotpuffer äquilibrierte Whatman-Papiere gestapelt. Der Zusammenbau und Anschluss der Transferkammer ermöglichte einen Proteintransfer entlang des Elektronenflusses von der Kathode zur Anode, sodass die Proteine auf die PVDF-Membran transferiert werden konnten. Der Transfer erfolgte bei 0,75 mA/cm² pro Gel für 2,5 Stunden.

Mittels 0,1 %-Ponceau S Färbung wurde der Proteintransfer auf die PVDF-Membran überprüft. Der Farbstoff bindet reversibel an die aufgetrennten Proteine und macht sie somit kurzzeitig sichtbar (Rehm & Letzel, 2016). Die Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran wurde nach Dokumentation mit TBST herausgewaschen.

Die Visualisierung spezifischer Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte mittels Immunfärbung. Dafür wurden unspezifische Proteinbindestellen mit einem Blockpuffer (5 % (w/v) Milchpulver/TBST) für mindestens eine Stunde blockiert. Nach einem kurzen Waschschrift mit TBST wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4°C in einer proteinspezifischen Primärantikörperlösung (vgl. 2.9.2) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Primärantikörperlösung entfernt und die PVDF-Membran viermal für je 5 Minuten mit TBST gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu beseitigen.

Darauf folgte die Inkubation mit einem *horseradish peroxidase* (HRPO)-konjugierten Sekundärantikörper für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur, welcher gegen den konstanten Teil des jeweiligen Primärantikörpers gerichtet ist. Anschließend folgten vier weitere fünfminütige Waschschrte mit TBST. Für die Detektion der Proteine wurde die PVDF-Membran mit Amersham ECL Western Blotting Detection Reagenz oder Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat nach Herstellerangaben inkubiert. Dabei katalysiert die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase die Oxidation von Luminol, wodurch eine Chemilumineszenz erzeugt wird (Rehm & Letzel, 2016). Das bei dieser Reaktion emittierte Licht wurde im Chemi Doc Touch Imaging System detektiert. Die Auswertung und Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte mittels Image Lab Software.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA aus einer Zellpopulation erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerprotokoll. Die geernteten Zellen wurden zunächst lysiert und die entstandenen Zelltrümmer mit Hilfe einer Filtersäule entfernt. Nach Fällung von Nukleinsäuren durch Zugabe von 70 %-igem Ethanol wurde die RNA an eine Silikamembran gebunden, die im Anschluss entsalzt wurde. Danach fand eine Degradation von vorhandener DNA durch einen DNase-Mix statt, auf die nach drei Waschschrten mit zwei verschiedenen Waschpuffern die Elution der RNA in 30-60 µl RNase-freiem Wasser folgte. Die isolierte RNA wurde zur weiteren Verwendung kurzfristig bei -20°C und langfristig bei -80°C gelagert.

3.3.2 Quantifizierung der RNA-Menge

Die Quantifizierung des RNA-Gehalts in den einzelnen Proben erfolgte mittels Nano-Drop ND-1000 Spectrophotometer durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dafür wurden 1,2 µl einer Probe eingesetzt. Zusätzlich wurde als Maß für die Reinheit der isolierten RNA der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} bestimmt, der bei reiner RNA zwischen 1,9 und 2,1 lag.

3.3.3 Reverse Transkription

Für die quantitative *polymerase chain reaction* (PCR) musste die RNA mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die Reaktion

wurde durch das rekombinant hergestellte Enzym RevertAid Reverse Transkriptase unter Einsatz von Random Hexamer Primern und dNTPs katalysiert und im PCR-Thermocycler durchgeführt. Abhängig vom zuvor bestimmten RNA-Gehalt wurden für jede Probe entsprechende Volumina an RNA und RNase-freiem Wasser eingesetzt, um 1 µg RNA umzuschreiben.

Zusammensetzung eines 20 µl-Ansatzes:

Reagenz	Menge
RNA	1 µg
RT-Puffer (5x)	4 µl
dNTP Set (10 mM)	0,5 µl
RevertAid Reverse Transkriptase	0,5 µl
Random Hexamer Primer	0,5 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde für die reverse Transkription verwendet:

Temperatur	Zeit
25°C	10 Minuten
42°C	60 Minuten
70°C	10 Minuten

Die hergestellte cDNA wurde direkt für die Analyse mittels quantitativer PCR eingesetzt oder bis zum Einsatz bei -20°C gelagert.

3.3.4 Quantitative PCR (qPCR)

Mittels quantitativer PCR wurde die relative mRNA-Expression von Zielgenen in einer Zellpopulation basierend auf einer Polymerase-Kettenreaktion untersucht. Sie ermöglichte eine quantitative Echtzeitanalyse durch die Messung von Fluoreszenzsignalen und gab dadurch indirekt die Menge der enthaltenen amplifizierten cDNA an. In dieser Arbeit wurde das TaqMan-basierte qPCR-System der Firma Applied Biosystems verwendet. Bei diesem System wurde der *reporter*-Farbstoff Carboxyfluorescein (FAM) detektiert, der sich am 5'-Ende der verwendeten genspezifischen DNA-Sonden (vgl. 2.8) befand. Am 3'-Ende waren die Sonden mit dem *quencher*-Farbstoff Tetramethylrhodamin (TAMRA) markiert. Bei räumlicher Nähe

von *reporter* und *quencher* zueinander wurde die Lichtemission des *reporter*-Farbstoffs über Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) durch den *quencher* inhibiert (Mülhardt, 2013). Durch das *annealing* der Primer und Elongation des komplementären DNA-Stranges wurde die räumliche Nähe von *reporter* und *quencher* unterbrochen, da durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase zunächst der *reporter* und anschließend der *quencher* aus der Sondenmatrize freigesetzt wurde (Mülhardt, 2013). Dadurch konnte am Ende eines jeden Zyklus der Elongationsphase das Fluoreszenzsignal des *reporter*-Farbstoffes detektiert werden. Dieses Signal nahm proportional zur Menge des amplifizierten PCR-Produktes zu, wodurch es indirekt die Berechnung der Ausgangsmenge des cDNA- *templates* ermöglichte.

Zusammensetzung eines 20 µl qPCR-Reaktionsansatzes:

Reagenz	Menge
cDNA	2 µl
TaqMan FAST 2x Universal PCR Master Mix	10 µl
TaqMan Assays on Demand	0,5 µl
H ₂ O	7,5 µl

Folgendes Temperaturprofil wurde für die qPCR im Thermocycler 7500 Fast Real Time PCR System verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	20 Sekunden	1
Denaturierung	95°C	3 Sekunden	} 40
<i>annealing</i> / Elongation	60°C	30 Sekunden	

Die Daten wurden nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet, die auf einer relativen Quantifizierung des Zielgens, welches auf ein parallel gemessenes, nicht reguliertes Referenzgen (endogene Kontrolle) normiert wurde, beruht. Die gemessenen *cycle threshold* (C_t)-Werte gaben dabei den PCR-Zyklus an, indem die Fluoreszenzintensität einen Schwellenwert über der Hintergrundfluoreszenz erreichte. Der PCR-Ansatz jeder Probe wurde als technisches Duplikat analysiert und ging als Mittelwert der beiden C_t -Werte in die weiteren Berechnungen ein. Zum Ausgleich kleinerer Schwankungen wurde die Differenz aus dem C_t -Mittelwert des Zielgens und dem parallel gemessenen Referenzgen ermittelt:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

Zur Normierung auf einen Kalibrator wurde die Differenz der beiden ΔCt -Werte gebildet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandlung}} - \Delta Ct_{\text{Kalibrator}}$$

Unter der Annahme, dass sich die PCR-Produktmenge in jedem Zyklus verdoppelte, erfolgte schließlich die Umrechnung der $\Delta\Delta Ct$ -Werte in eine vielfache Expression:

$$n = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Als Referenzgen wurde in dieser Arbeit *GUSB* verwendet. Als Kalibrator der vielfachen Expression diente eine experimentelle Kontrollprobe.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Unter Verwendung einer indirekten Immunfluoreszenz konnte die Expression und Lokalisation von Proteinen in fixierten Zellen mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden. Dafür wurden abhängig von den Versuchsbedingungen bestimmte Zelldichten (vgl. 3.1.2.1) in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Kanäle je nach Versuchsansatz mittels Calciumphosphat-Präzipitation oder HiPerFect-Transfektionsreagenz transfiziert oder für entsprechende Zeiten mit 10 ng/ml IL-1 α behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach Ablauf der versuchsabhängigen Kultivierungszeit wurde das Medium entfernt und jeder Kanal zweimal in 5 Minuten mit 150 μ l HBSS-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde für 5 Minuten mit 100 μ l einer 4 %-igen Paraformaldehyd/PBS-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 150 μ l HBSS für jeweils 5 Minuten wurden die Zellen mit 100 μ l einer Blockierlösung (10 % (v/v) *donkey serum* in 0,005 % (w/v) Saponin/HBSS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer mit 50 μ l einer Primärantikörperlösung (vgl. 2.9.1, Verdünnung in 0,005 % (w/v) Saponin/HBSS) inkubiert. Der Primärantikörper hat dabei an ein spezifisches Epitop des nachzuweisenden Proteins gebunden. Nach drei weiteren zehnminütigen

Waschschritten mit 150 µl 0,005 % (w/v) Saponin/HBSS wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer mit 50 µl einer fluorophorgekoppelten Sekundärantikörperlösung (vgl. 2.9.1, Verdünnung in 0,005 % (w/v) Saponin/HBSS) inkubiert. Die fluorophorgekoppelten Sekundärantikörper haben dabei an den konstanten Teil der Primärantikörper gebunden. Ab diesem Schritt wurde möglichst dunkel gearbeitet. Nach drei weiteren Waschschritten mit 150 µl HBSS für je 10 Minuten wurden die Zellkerne für 5 Minuten mittels 100 µl Hoechst/HBSS (1 µM) angefärbt. Die Hoechstlösung wurde entfernt und die Zellen zweimal innerhalb von 5 Minuten mit 150 µl HBSS gewaschen und schließlich in 100 µl 30 % (v/v) Glycerol/HBSS eingebettet. Für die Negativkontrollen wurden die Zellen nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten die mikroskopischen Aufnahmen mittels DMI8-Mikroskop von Leica und der entsprechenden LasX-Software.

3.4.2 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Für die FISH wurde das QuantiGene ViewRNA ISH Cell Assay Kit der Firma Affymetrix verwendet, welches eine Untersuchung von Expression und Lokalisation fluorophormarkierter mRNA in fixierten Zellen ermöglichte. Diese Methode basiert auf einem Prinzip der Signalamplifikation (Abb. 3.2), bei der nacheinander genspezifische Sonden (*probe sets*), *pre amplifier*, *amplifier* und Fluorophor-gekoppelte *label probes* an die nachzuweisende mRNA hybridisierten. Bei der Durchführung wurde nach Protokollangaben des Herstellers verfahren. Es wurden abhängig von den Versuchsbedingungen bestimmte Zelldichten (vgl. 3.1.2.1) in IBIDI µ-Slides VI ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Kanäle je nach Versuchsansatz für die entsprechenden Zeiten mit 10 ng/ml IL-1α behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde das Medium der einzelnen Kanäle entfernt und jeder Kanal zweimal in 5 Minuten mit 150 µl PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen über Nacht bei 4°C in 100 µl 4 %-iger Paraformaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal für je 3 Minuten mit 150 µl PBS gewaschen und durch die Zugabe von 100 µl PBS-Tween (1:1000 Tween/PBS) für 5 Minuten permeabilisiert. Daraufhin erfolgte nach zweimaligem Waschen mit 150 µl PBS für je 3 Minuten die Inkubation mit 50 µl genspezifischen *probe sets* (Verdünnung 1:100 in *probe set diluent*, QuantiGene View RNA ISH Cell Assay Kit) für 3 Stunden bei 40°C in einer

feuchten Kammer. Danach wurden die Zellen dreimal 3 Minuten mit 150 µl Waschpuffer (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) gewaschen und für 30 Minuten bei 40°C mit 50 µl *pre amplifier* (Verdünnung 1:30 in *amplifier diluent*, Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) hybridisiert. Anschließend erfolgte nach drei weiteren Waschschritten mit 150 µl Waschpuffer für je 3 Minuten die 30-minütige Hybridisierung mit 50 µl *amplifier* (Verdünnung 1:30 in *amplifier diluent*, Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit). Nach drei weiteren Waschschritten mit 150 µl Waschpuffer wurden die Zellen schließlich mit 50 µl *label probes* (Verdünnung 1:30 in *label probe diluent*, Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) für 30 Minuten bei 40°C hybridisiert. Nach diesem Schritt wurde möglichst dunkel gearbeitet. Es wurde dann zweimal 2 Minuten und einmal 10 Minuten mit 150 µl Waschpuffer gewaschen. Darauf folgte die Färbung der Zellkerne mit 100 µl Hoechst/PBS (1 µM) für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden die Zellen zweimal in 5 Minuten mit 150 µl PBS gewaschen und über Nacht in 10 µl 30 % (v/v) Glycerol/PBS eingebettet. Am nächsten Tag erfolgten die mikroskopischen Aufnahmen mittels DMi8-Mikroskop von Leica und der entsprechenden LasX-Software.

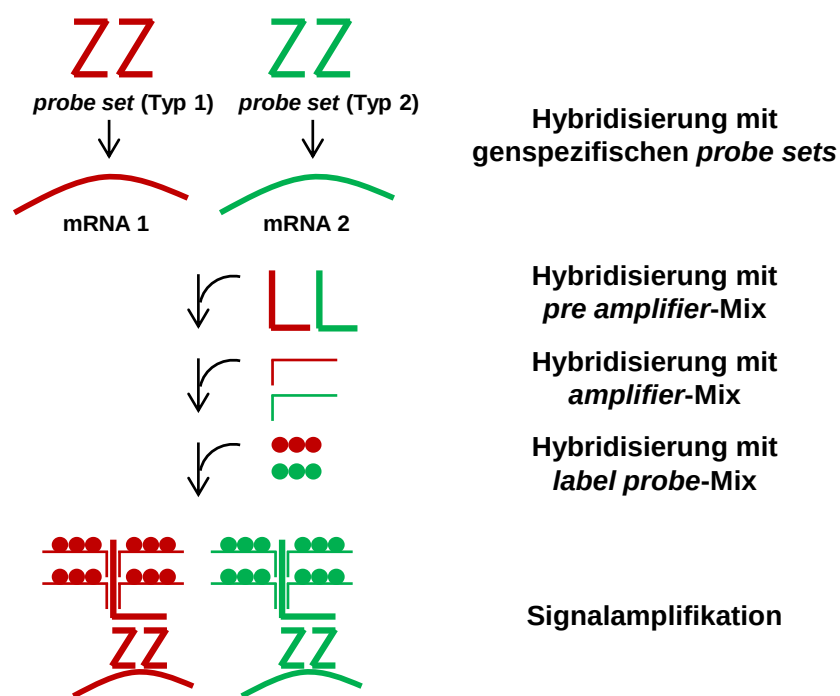


Abb. 3.2: Prinzip der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung. In fixierten Zellen hybridisierten zunächst genspezifische Sondenpaare (*probe sets*) an die nachzuweisende mRNA. Dabei bestand die Möglichkeit durch die Verwendung verschiedener Sondentypen (hier Typ 1 und 2) in einer Zelle verschiedene mRNAs zu detektieren. An diese *probes* hybridisierten in den folgenden Schritten nacheinander spezifische *pre amplifier*, *amplifier* und Fluorophor-gekoppelte *label probes*, wodurch das Signal eines einzelnen mRNA-Moleküls amplifiziert wurde. Abbildung modifiziert nach Affymetrix, 2011.

3.4.3 Immuno-RNA-*in situ*-Hybridisierung (IF-FISH)

Die IF-FISH stellt eine Kombinationsmethode aus der FISH, mit der Fluorophor-markierte mRNA detektiert werden konnten, und Immunfärbung von Proteinen dar. Dafür wurde das Herstellerprotokoll des QuantiGene ViewRNA ISH Cell Assay Kits (vgl. 3.4.2) um die indirekte Immunfluoreszenz der Proteine (vgl. 3.4.1) erweitert. Es wurden abhängig von den Versuchsbedingungen bestimmte Zelldichten (vgl. 3.1.2.1) in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen je nach Versuchsansatz mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz transfiziert oder untransfiziert gelassen und für die entsprechenden Zeiten mit 10 ng/ml IL-1 α und ggf. 5 μ g/ml Actinomycin D behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach Ablauf der versuchsabhängigen Kultivierungszeiten wurde das Medium abgesaugt und mit den Zellen zunächst wie in 3.4.2 beschrieben verfahren. Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubation der Zellen mit der *label probe*-Lösung erfolgte die Immunfärbung der Proteine bei 40°C. Dafür wurden die Zellen zweimal 2 Minuten und einmal 10 Minuten mit 150 μ l Waschpuffer (Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen zweimal für je 1 Minute mit 150 μ l 0,005 % (w/v) Saponin/HBSS gewaschen und für 30 Minuten mit 100 μ l Blockierlösung (10 % (v/v) *donkey serum* in 0,005 % (w/v) Saponin/HBSS) blockiert. Für die darauffolgenden Wasch- und Inkubationsschritte für Primär- und Sekundärantikörper wurde wie in 3.4.1 beschrieben verfahren. Am nächsten Tag erfolgten die mikroskopischen Aufnahmen mittels DMi8-Mikroskop von Leica und der entsprechenden LasX-Software.

3.5 Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen für IF, FISH und IF-FISH

Die Fluoreszenzsignale pro Zelle in den mikroskopischen Aufnahmen wurden entweder manuell oder mithilfe der Duolink ImageTool-Software ausgezählt. Dafür war es notwendig, manuell eine Einstellung von Zellgrenzen, Schwellenwert und Größe der auszählenden Signale einzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde darauf geachtet, diese Einstellungen zwischen den biologischen Replikaten möglichst identisch zu halten, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Zellen, die die Bildgrenze berührten oder überschritten, sowie unscharfe Aufnahmen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

3.5.1 Verwendung eines Pixel-Rasters für die Erfassung von *P-bodies*

Zur Auszählung der einzelnen *P-body*-Signale wurde ein 4x4-Pixel-Raster über die aufgenommenen Bilder der einzelnen Versuche gelegt und die einzelnen Bilder um einen gleichen Faktor vergrößert, um die *P-body*-Anzahl pro Zelle anhand von Größe und Farbintensität der *merges* manuell möglichst objektiv zu bestimmen. Zu schwache Signale im *merge* und Signale, die sich kleiner als ein Kasten im Raster darstellten, wurden nicht mitgezählt. Ein beispielhafter Ausschnitt einer Zählung ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

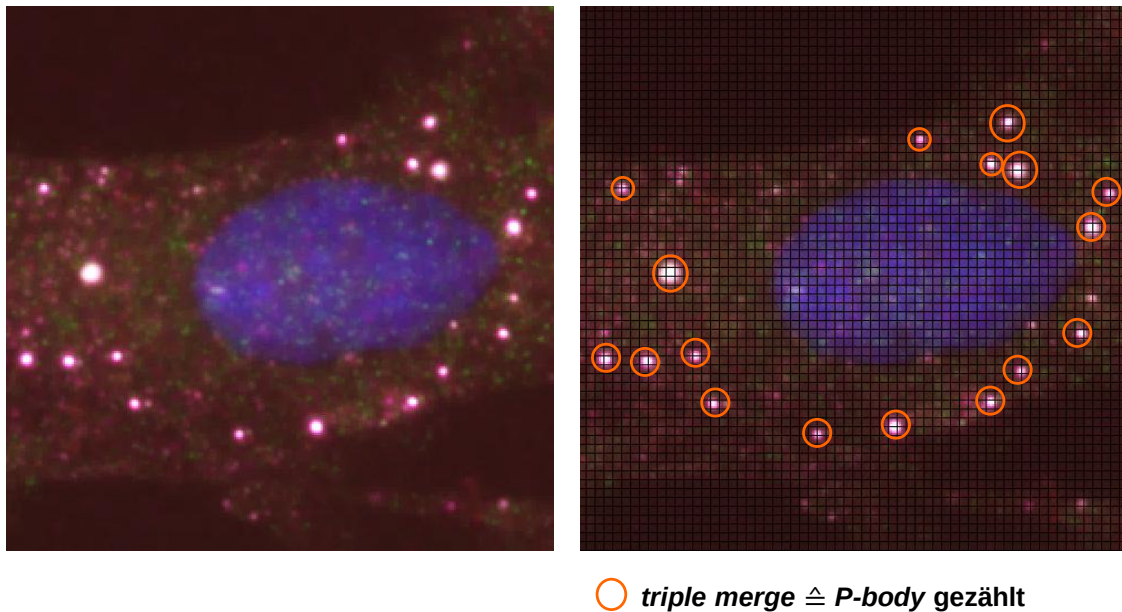


Abb. 3.3: Exemplarische Darstellung der Verwendung eines 4x4-Pixel-Rasters zur Erfassung von *P-bodies* in hTERT-RPE1-Zellen. Zur Erfassung der *P-body*-Anzahl einer hTERT-RPE1-Zelle wurde über die *gemergten* Bilder der verschiedenen Versuchsbedingungen ein 4x4-Pixel-Raster gelegt, das Bild am Bildschirm jeweils um den gleichen Faktor vergrößert und die *P-body*-Anzahl pro Zelle manuell ausgezählt. In ihrer Intensität zu schwache Signale, sowie Signale, die sich kleiner als ein Kasten des Rasters darstellten, wurden nicht mitgezählt. Die orange-färbten Kreise zeigen hier exemplarisch die gezählten Signale im Ausschnitt einer Zelle (*triple merges*).

3.6 Darstellung und Auswertung der eigenen Versuchsergebnisse

Versuchintern wurden die mikroskopischen Aufnahmen mittels LasX-Software unter Anwendung der gleichen Belichtungszeiten pro Filter durchgeführt. Für die Darstellung der Versuchsergebnisse in dieser Arbeit wurden die Bilder ggf. in zwei weiteren Bildbearbeitungsschritten mit der LasX-Software und Adobe Photoshop bearbeitet. Dabei wurden für die Aufnahmen eines Versuches die gleichen Einstellungen zur Bildbearbeitung angewendet. Bei der Einstellung der Belichtungszeiten und Bearbeitung der Bilder wurden die Negativkontrollen berücksichtigt, um ein möglichst geringes Hintergrundsignal zu erhalten. Für die graphische Darstellung der

Versuchsergebnisse wurde die Software SigmaPlot verwendet. Die Box im *box plot* enthält 50 % der Werte und zeigt den Median an. Die *whisker* zeigen die 10. und 90. Perzentile an. In den Balkendiagrammen und *scatter plots* wurden die Mittelwerte mit einfacher Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Auswertung einzelner Versuchsergebnisse wurde ein *Mann-Whitney rank sum test* (SigmaPlot) angewendet. Zur Prüfung der Unabhängigkeit zweier Variablen wurde ein *fisher's-exact-test* (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>, Stand: 18.08.2018) angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 Stimulierbarkeit von hTERT-RPE1-Zellen mit IL-1 α anhand der p65-Translokation in den Zellkern

Nach proteasomalem Abbau von I κ Ba stellt die Translokation des Transkriptionsfaktors p65 in Zellkern einen spezifischen intrazellulären Mechanismus der IL-1 α -Antwort dar (vgl. 1.1.2). Als Grundlage für die folgenden Stimulationsversuche sollte anhand dieses Translokationsmechanismus mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz zunächst untersucht werden, wie stark hTERT-RPE1-Zellen auf IL-1 α reagieren (Abb. 4.1). Die Zellen wurden dafür für 1 Stunde mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert (-) gelassen. Dieses grundlegende Ergebnis war wichtig, um mögliche Ergebniskonstellationen der darauffolgenden Stimulationsversuche auf Einzelzelebene erklären zu können.

Im unstimulierten Zustand zeigte der Zellkern im Vergleich zum Zytoplasma eine geringere bis gleichstarke Färbung des p65-Proteins. Nach 1 Stunde IL-1 α -Stimulation wurde die Translokation von p65 in den Zellkern durch eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals (grün) im Kern deutlich. Während im unstimulierten Zustand in ca. 2 % der Zellen eine Lokation im Zellkern zu finden war, ließen sich nach 1 Stunde IL-1 α -Behandlung in nahezu 80 % der Zellen eine p65-Translokation in den Zellkern vorfinden. Diese Beobachtung ließ einerseits darauf schließen, dass hTERT-RPE1-Zellen in den verwendeten IBIDI μ -Slides VI bei gegebener Zelldichte basal wenig gestresst waren und andererseits IL-1 α für diese Zellen ein starker Stimulus zu sein schien, der in nahezu allen Zellen eine Translokation des p65-Proteins in den Zellkern induzierte, wo es als Transkriptionsfaktor die Genexpression IL-1-abhängiger Gene aktivieren konnte.

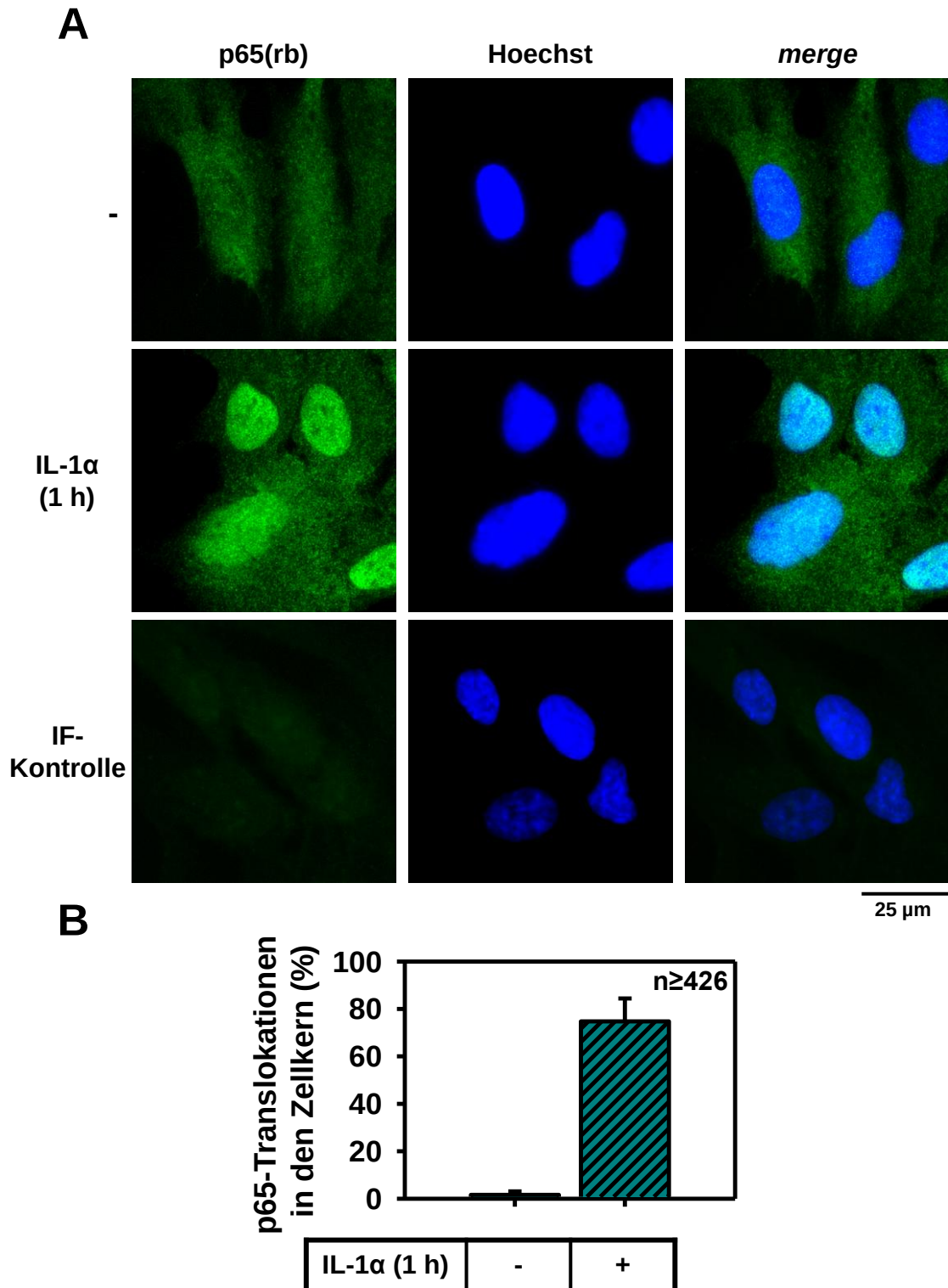


Abb. 4.1: IL-1 α -Einfluss auf die Lokalisation von p65 in hTERT-RPE1-Zellen. **A:** hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag für 1 h mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert (-) gelassen. Nach Fixierung der Zellen für 5 min bei Raumtemperatur wurde eine Immunfärbung von p65 durchgeführt. Verwendet wurde als Primärantikörper Anti-p65(rb) der Firma Santa Cruz, #sc-372 (markiert mit Sekundärantikörper Dylight 488). Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop und LasX-Software. **B:** Darstellung der Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) der prozentualen Anteile an p65-Translokationen in den Zellkern in 3 voneinander unabhängigen Experimenten in einer Gesamtzellpopulation von mindestens 426 Zellen pro Bedingung (n $\geq$ 426).

4.2 Charakterisierung der *P-body*-Zusammensetzung nach IL-1 α -Stimulation in hTERT-RPE1-Zellen

P-bodies bestehen als mRNPs aus mRNAs und Proteinen mit verschiedenen regulativen Funktionen der mRNA-Stabilität. Untersuchungen zur *P-body*-Assemblierung und -Funktion im Zusammenhang mit dem IL-1-abhängigen proinflammatorischen Signalweg wurden in der AG Kracht u.a. anhand von HEK293IL-1R-, U2OS- und HeLa-Zellen als Tumorzelllinien durchgeführt. Dabei wurden IL-1-induzierte posttranslationelle Modifikationen von DCP1a, wie die Phosphorylierung an Serin 315, Veränderungen der *P-body*-Assemblierung, Veränderungen von mRNA-*steady-state-level* und mRNA-Stabilitäten IL-1-abhängiger Gene beobachtet, die eine regulative Funktion von *P-bodies* bzw. *P-body*-Proteinen bei Entzündungsreaktionen im menschlichen Körper vermuten ließen (vgl. 1.3.). Zur Untersuchung der IL-1-abhängigen Funktion von *P-bodies* in hTERT-RPE1-Zellen sollte im ersten Schritt die *P-body*-Assemblierung zu verschiedenen IL-1 α -Inkubationszeitpunkten untersucht werden. Dafür wurden ausgewählte *P-body*-Proteine im Vergleich zu HeLa-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz visualisiert und die Proteinspiegel in Abhängigkeit von IL-1 α miteinander verglichen.

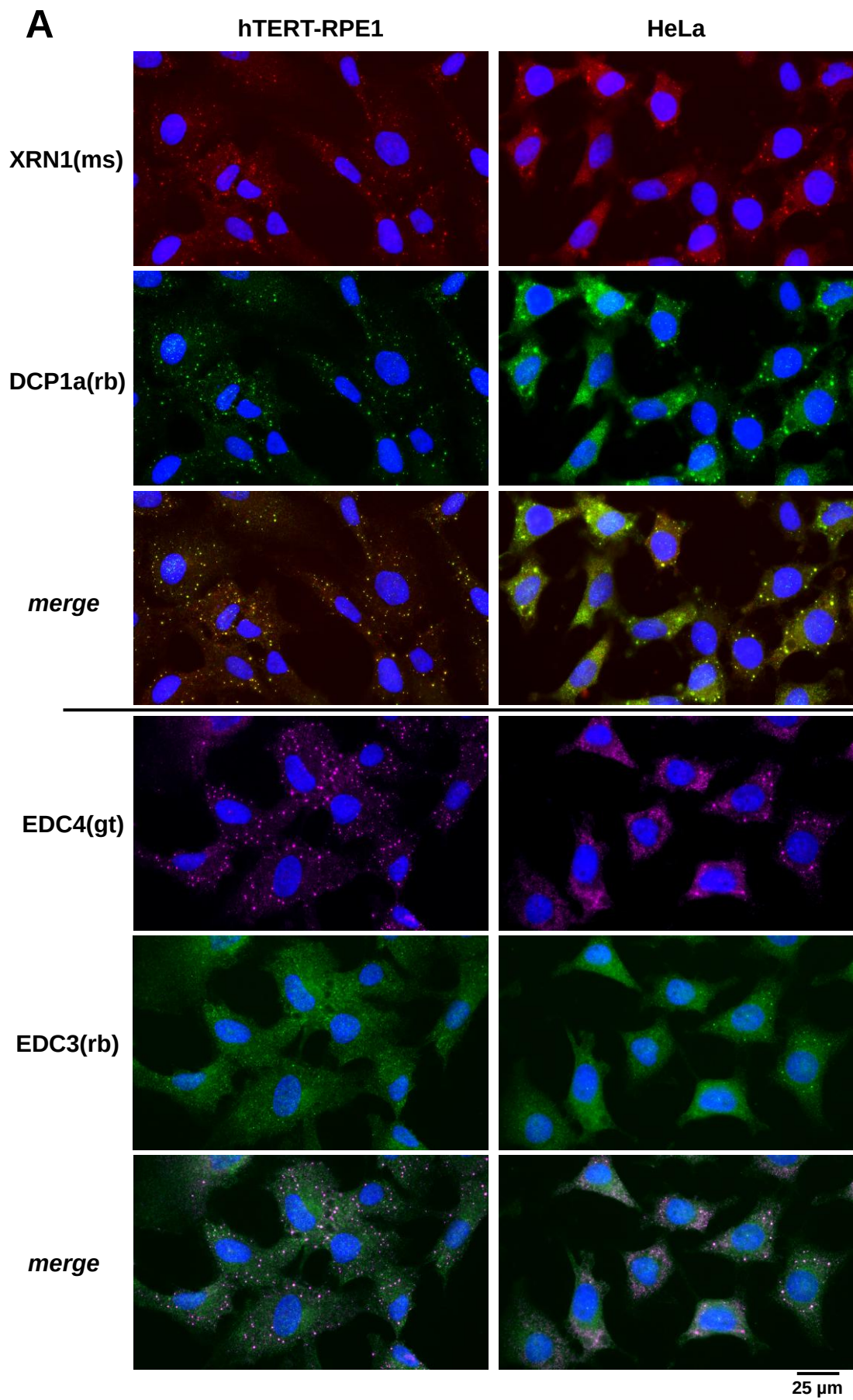
4.2.1 Vergleich der *P-body*-Zusammensetzung und IL-1 α -abhängigen *P-body*-Proteinspiegel in hTERT-RPE1-Zellen und HeLa-Zellen

Zur Identifizierung geeigneter Proteine für eine mikroskopische Visualisierung von *P-bodies* wurden als wichtige *P-body*-Komponenten DCP1a als regulatorische Untereinheit des *decapping*-Komplexes, EDC4 als *scaffolding*-Protein, EDC3 als *decapping*-Aktivator und XRN1 als 5'-3'-Exoribonuklease ausgewählt (vgl. 1.3.1). Diese vier Proteine wurden in zwei verschiedenen Kombinationen im unbehandelten Zustand mittels indirekter Immunfluoreszenz in HeLa- und hTERT-RPE1-Zellen angefärbt und ihre Koloalisationen innerhalb von *P-bodies* untersucht (Abb. 4.2 A). Die zugehörigen IF-Kontrollen befinden sich im Anhang (Abb. 11.1).

Generell zeigten die verschiedenen Antikörper sowohl innerhalb einer Zelllinie als auch zwischen den beiden Zelllinien Unterschiede in ihrem Färbeverhalten der *P-body*-Proteine. Die XRN1(ms)- und DCP1a(rb)-Antikörper-markierten Proteine zeigten in beiden Zelllinien eine diffuse zytoplasmatische Färbung von schwacher Intensität, sodass sich einzelne, größere und farbintensivere Signale gut abgrenzen ließen. Die

gemeinsame Koloalisation (*merge*) von XRN1 und DCP1a zeigte durch die Farbüberlagerung des roten und grünen Fluoreszenzsignals eine deutlich gelbe Färbung einzelner zytoplasmatischer Aggregate, die mutmaßlich den *P-bodies* entsprachen. Auch die EDC4(gt)-Antikörper-markierten Proteine zeigten eine schwache zytoplasmatische Färbung und eine deutliche Abgrenzung farbintensiver Signale in beiden Zelllinien. Im Gegensatz dazu ließ die Proteinfärbung mit dem EDC3(rb)-Antikörper besonders in den hTERT-RPE1-Zellen eine schwächere Abgrenzung der spezifischen Aggregate im Vergleich zur Zytoplasmafärbung zu, sodass in diesen Zellen die Visualisierung von *P-bodies* anhand von EDC3 unter Verwendung dieses Antikörpers nicht sinnvoll erschien. In HeLa-Zellen war eine Abgrenzung der spezifischen Aggregate zur Zytoplasmafärbung zwar schwächer ausgeprägt als für DCP1a, XRN1 und EDC4, sie war jedoch visuell möglich (weiße Signale). Dieser Unterschied zwischen den Zelllinien ließ eine geringere Expression des EDC3-Proteins in hTERT-RPE1-Zellen vermuten. Durch diese initialen Experimente konnte festgestellt werden, dass die Visualisierung spezifischer zytoplasmatischer Aggregate von *P-body*-Proteinen in hTERT-RPE1-Zellen für XRN1, DCP1a und EDC4 unter Verwendung der gegebenen Antikörper am sinnvollsten war. Daher wurde im Folgenden zur Untersuchung der IL-1-abhängigen *P-body*-Assemblierung der triple *merge* der exprimierten Proteine XRN1, DCP1a und EDC4 untersucht.

Des Weiteren fiel auf, dass sich in hTERT-RPE1-Zellen deutlich mehr und kleinere zytoplasmatische Aggregate von *P-body*-Proteinen detektieren ließen, als in HeLa-Zellen. Weiterhin schienen diese mikroskopisch sichtbaren *P-bodies* innerhalb der hTERT-RPE1-Zellpopulation homogener verteilt zu sein. Im Gegensatz zu hTERT-RPE1-Zellen wiesen auch einige HeLa-Zellen gar keine *P-bodies* auf. Aufgrund dieser Unterschiede und der Beobachtung, dass das EDC3-Protein in hTERT-RPE1-Zellen schlechter anzufärben war als in HeLa-Zellen, wurden im nächsten Schritt in beiden Zelllinien in der gesamten Zellpopulation die Proteinspiegel der untersuchten *P-body*-Proteine und P(S315)-DCP1a mittels Western Blot miteinander verglichen. Zur Untersuchung des IL-1-*signaling* und dessen Einfluss auf die Proteinspiegel der ausgewählten *P-body*-Proteine wurden beide Zelllinien zusätzlich für 1 Stunde mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unbehandelt gelassen (Abb. 4.2 B). Eine Wiederholung dieses Experiments, das technisch von Helmut Müller (AG Kracht) durchgeführt wurde, ist im Anhang zu finden (Abb. 11.2).



B

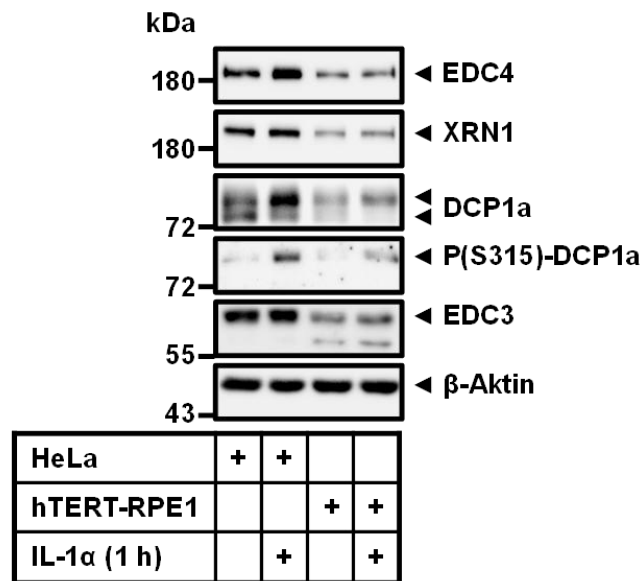


Abb. 4.2: Vergleich der Expression von *P*-body-Proteinen in HeLa- und hTERT-RPE1-Zellen. **A:** hTERT-RPE1- und HeLa-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur fixiert und eine Immunfärbung von DCP1a, EDC3, EDC4 und XRN1 durchgeführt. Verwendet wurden als Primärantikörper Anti-DCP1a(rb) der Firma Abcam, #ab47811 (markiert mit Sekundärantikörper Dylight 488), Anti-EDC4(gt) der Firma Santa Cruz, #sc-137444 (markiert mit Sekundärantikörper Cy5), Anti-XRN1(ms) der Firma Santa Cruz, #sc-165985 (markiert mit Sekundärantikörper Cy3) und Anti-EDC3(rb) der Firma Santa Cruz, sc-135013 (markiert mit Sekundärantikörper Dylight 488). Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation (Abb. 11.1). Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. **B:** hTERT-RPE1- und HeLa-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag für 1 h mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert gelassen. Die Proteine wurden mittels Speziallyse aufgereinigt, elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Je Probe wurden 40 μ g Protein aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin.

Bei Auftragung gleicher Gesamtproteinmengen je Probe konnten IL-1 α -unabhängig deutlich höhere Proteinspiegel der untersuchten *P*-body-Proteine DCP1a, EDC3, EDC4 und XRN1 in HeLa- als in hTERT-RPE1-Zellen beobachtet werden. IL-1 α -abhängig ließen sich in beiden Zelllinien geringe Schwankungen mit einer Tendenz zum IL-1 α -induzierten Anstieg der EDC3-, EDC4- und XRN1-Proteinmengen beobachten. Da sich diese Schwankungen jedoch nur bedingt reproduzieren ließen (vgl. Abb. 11.2) und nur sehr gering ausgeprägt waren, wurde diesem Effekt geringe Relevanz beigemessen, sodass von keinem IL-1 α -Einfluss auf die Proteinspiegel der *P*-body-Proteine DCP1a, EDC3, EDC4 und XRN1 ausgegangen wurde.

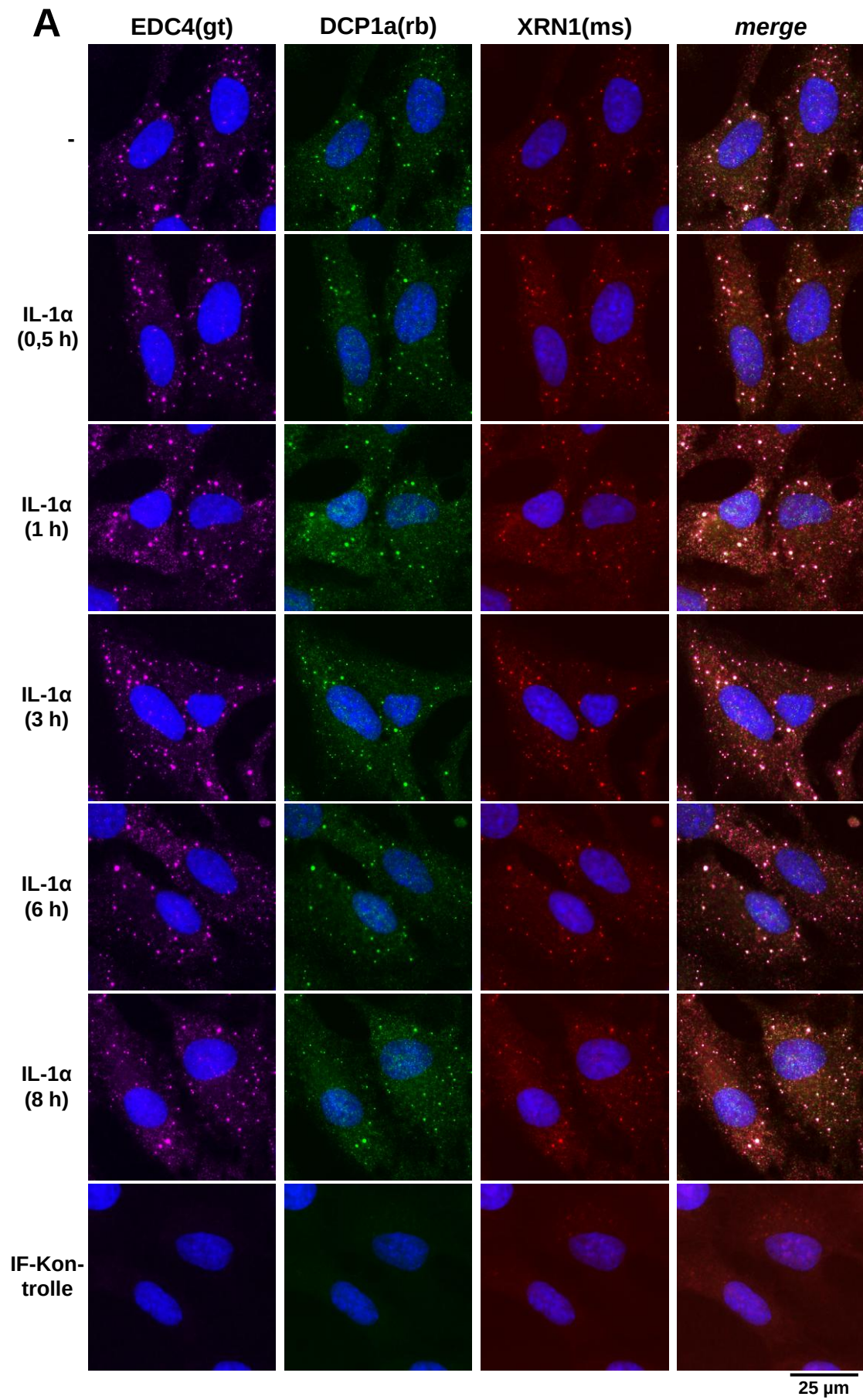
Wie zu erwarten war, ließ sich in beiden Zelllinien eine IL-1 α -abhängige Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 beobachten. Diese posttranslationale Modifikation konnte nicht nur nach Inkubation mit dem spezifischen P(S315)-DCP1a-Antikörper beobachtet werden, sondern zeigte sich auch in einer IL-1 α -induzierten höheren Bandenintensität der DCP1a-Doppelbande bei ca. 80 kDa. Es schien so, als sei diese IL-1 α -induzierte Phosphorylierung von DCP1a in HeLa-Zellen stärker ausgeprägt

als in hTERT-RPE1-Zellen, was möglicherweise durch die generell höheren *P-body*-Proteinspiegel in HeLa-Zellen erklärt werden könnte. Der β -Aktin-Spiegel als IL-1 α -unabhängige Beladungskontrolle war sowohl innerhalb der Zelllinien als auch zwischen den Zelllinien konstant.

4.2.2 IL-1 α -abhängige *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen

Zur Untersuchung der IL-1 α -abhängigen *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen wurden die Zellen für ½, 1, 3, 6 und 8 Stunden mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert (-) gelassen und die *P-body*-Anzahl pro Zelle ermittelt. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden gemäß 4.2.1 DCP1a, EDC4 und XRN1 als *P-body*-Proteine angefärbt und ihre gemeinsame Kolokalisation (*merge*) in zytoplasmatischen Foci als *P-body* definiert (Abb. 4.3). Da die *P-bodies* in hTERT-RPE1-Zellen kleiner waren als im Vergleich zu HeLa-Zellen, war eine Auszählung mittels Duolink-Software nicht zufriedenstellend möglich. Daher wurde die *P-body*-Anzahl pro Zelle mithilfe eines 4x4-Pixel-Rasters manuell ermittelt, indem sowohl die Größe der einzelnen *P-body*-Signale als auch die Farbintensität der *merges* weitgehend objektiv berücksichtigt werden konnte (vgl. 3.5.1).

Unter Verwendung der ausgewählten Primär- und Sekundärantikörper zeigte sich durch die Kolokalisation der drei *P-body*-Proteine eine recht spezifische Anfärbung der *P-bodies* in hTERT-RPE1-Zellen (weiße Signale). Inwiefern jedoch an diesen Orten eine aktive und direkte Protein/Protein-Interaktion stattgefunden hat, konnte durch diese Methode nicht erfasst werden. In der IF-Kontrolle ließen sich dabei kaum unspezifische Signale durch die Sekundärantikörper detektieren. Unter diesen Voraussetzungen zeigten sich anhand der Anzahl der weißen *merges* von DCP1a, EDC4 und XRN1 im unbehandelten Zustand 23 *P-bodies* pro Zelle (im Median). 50 % der Zellen wiesen dabei eine *P-body*-Anzahl von 16 bis 31 *P-bodies* pro Zelle auf. Die schmale Box im *box plot* zeigt, dass die *P-bodies* innerhalb der Zellpopulation recht homogen verteilt sein müssen. Nach IL-1 α -Stimulation zeigten sich unabhängig von der Inkubationszeit kleinere Schwankungen in den Medianen der *P-body*-Anzahl pro Zelle von 23 bis 25 *P-bodies*. Auch hier blieben die Boxen der einzelnen *box plots* vergleichbar zum unstimulierten Zustand schmal. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass sich auch durch IL-1 α die Homogenität der *P-body*-Verteilung in der Zellpopulation nicht verändert. Des Weiteren fiel auf, dass im Gegensatz zu HeLa-Zellen nur 0,6 % der hTERT-RPE1-Zellen gar keine *P-bodies* aufwiesen.



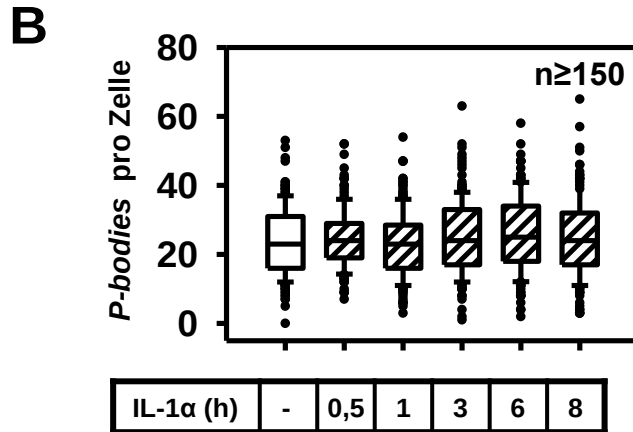


Abb. 4.3: IL-1 α -Einfluss auf die *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen. **A:** hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag für ½, 1, 3, 6 und 8 h mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert (-) gelassen. Nach Fixierung der Zellen für 5 min bei Raumtemperatur wurde eine Immunfärbung von DCP1a, EDC4 und XRN1 durchgeführt. Verwendet wurden als Primärantikörper Anti-DCP1a(rb) der Firma Abcam, #ab47811 (markiert mit Sekundärantikörper DyLight 488), Anti-EDC4(gt) der Firma Santa Cruz, #sc-137444 (markiert mit Sekundärantikörper Cy5) und Anti-XRN1(ms) der Firma Santa Cruz, #sc-165985 (markiert mit Sekundärantikörper Cy3). Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. Die Anzahl an *P-bodies* pro Zelle wurde unter Verwendung eines 4x4-Pixel-Rasters anhand der *merges* (weiße Signale) der 3 *P-body*-Komponenten ermittelt (vgl. 3.5.1). **B:** Darstellung der absoluten Anzahlen an *P-bodies* pro Zelle als *box plot* in 2 voneinander unabhängigen Experimenten und einer Gesamtzellpopulation von mindestens 150 Zellen pro Bedingung ($n \geq 150$). Mittels *Mann-Whitney rank sum test* wurden die Daten der unstimulierten Zellpopulation paarweise gegen die verschiedenen IL-1 α -Inkubationszeitpunkte mit einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Ein *Mann-Whitney rank sum test*, bei dem die Daten der unstimulierten Zellpopulation gegen die einzelnen IL-1 α -Stimulationszeitpunkte paarweise mit einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet wurden, ergab keine signifikanten Unterschiede, sodass von keinem IL-1 α -Einfluss auf die EDC4-, DCP1a- und XRN1-abhängige *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen ausgegangen wurde.

4.3 IL-1 α -induzierte Genexpression in hTERT-RPE1-Zellen

IL-1 α induziert als wichtiger proinflammatorischer Mediator über den NF- κ B-, JNK- und p38 MAPK-Signalweg die Transkription verschiedener IL-1 α -induzierbarer Gene, wie z.B. *IL6*, *IL8* und *NFKBIA*. Diese wiederum regulieren über unterschiedliche Signalkaskaden die Immunantwort im Körper. Dabei ist sowohl eine schnelle Induktion als auch eine Repression inflammatorischer Gene für eine effektive und kontrolliert ablaufende Immunantwort von klinischer Bedeutung (vgl. 1.1). Um die Dynamik der IL-1 α -abhängigen Genexpression in hTERT-RPE1-Zellen im zeitlichen Verlauf zu untersuchen, wurden die Zellen für verschiedene Inkubationszeiten mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert gelassen und die mRNA-Spiegel der drei

wichtigen IL-1 α -induzierbaren Gene *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* auf Einzelzell- und Gesamtzelebene gemessen.

4.3.1 Gesamtzellanalyse der IL-1 α -induzierten Genexpression von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA*

Zur Untersuchung der Induktion der Genexpression IL-1-regulierter Gene (*IL6*, *IL8*, *NFKBIA*) in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer wurde eine *real time*-PCR (RTqPCR) verwendet. Die Zellen wurden dafür für ½, 1, 3, 6 und 8 Stunden mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert gelassen, die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA-Mengen von *IL6*, *IL8*, *NFKBIA* und *GUSB* ermittelt. Das IL-1 α -unabhängige Gen *GUSB* wurde in jedem Experiment als Referenzgen verwendet. Die Normierung erfolgte jeweils anhand der unbehandelten Probe (Abb. 4.4).

Für alle drei Gene zeigte sich mit Beginn der IL-1 α -Stimulation eine Steigerung der mRNA-Expressionsrate auf ein Maximum nach 1 Stunde und einen darauffolgenden Abfall nach 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation. Dabei ergaben sich zwischen den drei Genen jedoch deutliche Unterschiede im Bezug auf die Induktionsstärke und mRNA-*steady-state-level* bei längerer IL-1 α -Inkubation. Für *IL6* zeigte sich nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation ein 45-facher Anstieg der Expressionsrate im Vergleich zur unbehandelten Probe. Diese sank nach 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation auf eine 26- bis 29-fache Induktion ab. Im Vergleich dazu zeigte sich für *IL8* ein deutlich stärkerer Anstieg der mRNA-Expressionsrate nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation mit einer 290-fachen Induktion. Ähnlich wie für *IL6* sank auch für *IL8* der mRNA-Gehalt nach 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation auf einen noch relativ hohen konstanten Spiegel mit 170- bis 180-facher Induktion im Vergleich zum basalen mRNA-Gehalt ab. Für *NFKBIA* zeigte sich mit einer 35-fachen Induktion der Genexpression nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation im Vergleich die geringste Induktionsstärke. Im Unterschied zu den anderen beiden Genen sank jedoch die Expressionsrate nach 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation auf eine 5-fache Induktion ab, sodass damit annähernd die basale Transkriptmenge erreicht wurde. Des Weiteren sei angemerkt, dass sich für die *IL8*-Messungen nach IL-1 α -Stimulation größere Standardabweichungen detektieren ließen als für *IL6* und *NFKBIA*. Die Ct-Werte für *GUSB* zeigten innerhalb der drei Versuche IL-1 α -unabhängige Schwankungen von bis zu 0,8 Ct-Werten. Dies spricht dafür, dass *GUSB* als Referenzgen zur experimentellen Kontrolle geeignet war.

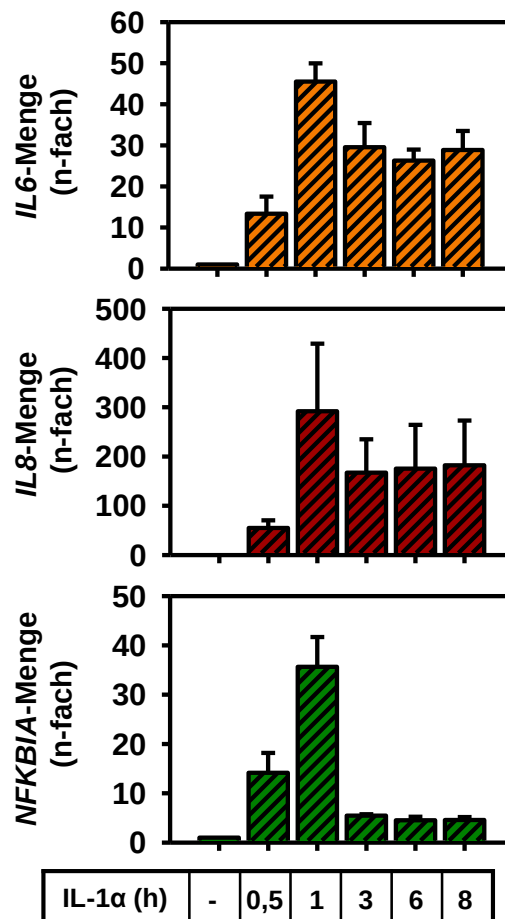


Abb. 4.4: RTqPCR der IL-1 α -abhängigen Genexpression von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA*. hTERT-RPE1-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit IL-1 α [10 ng/ml] für ½, 1, 3, 6 und 8 h behandelt oder unstimuliert gelassen. Die RNA wurde mittels NucleoSpin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Normiert auf die unstimulierte Probe, wurden in jeder Probe die relativen mRNA-Mengen der *IL6*-, *IL8*- und *NFKBIA*-Gene mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode anhand einer RTqPCR ermittelt. *GUSB* diente dabei als Referenzgen. Dargestellt sind je Gen die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) in 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Da die Kurvenverläufe der drei Gene zum Teil deutliche Unterschiede aufwiesen und die RTqPCR lediglich relative Angaben in Bezug auf die mRNA-Gehalte nach den verschiedenen IL-1 α -Inkubationszeitpunkten in der gesamten Zellpopulation zuließ, wurde daraufhin die IL-1 α -abhängige Genexpression als Einzelzellanalyse untersucht.

4.3.2 Einzelzellanalyse der IL-1 α -induzierten Genexpression von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA*

Auf Einzelzellebene wurde eine RNA-FISH verwendet, um die Induktion der *IL6*-, *IL8*- und *NFKBIA*-Gene in Abhängigkeit von der IL-1 α -Inkubationszeit zu untersuchen. Diese Methode ermöglichte nicht nur eine Quantifizierung der Transkriptmenge in einer einzelnen Zelle, sondern auch eine Abbildung der Lokalisation von mRNAs. Die Zellen wurden dafür analog zu 4.3.1 für ½, 1, 3, 6 und 8 Stunden mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert (-) gelassen. Mit Hilfe der Duolink-Software wurden dann

die absoluten Transkriptmengen pro Zelle analysiert. Zur experimentellen Kontrolle wurde in jedem Experiment als IL-1 α -unabhängige Gen die *ACTB*-mRNA angefärbt (Abb. 4.5).

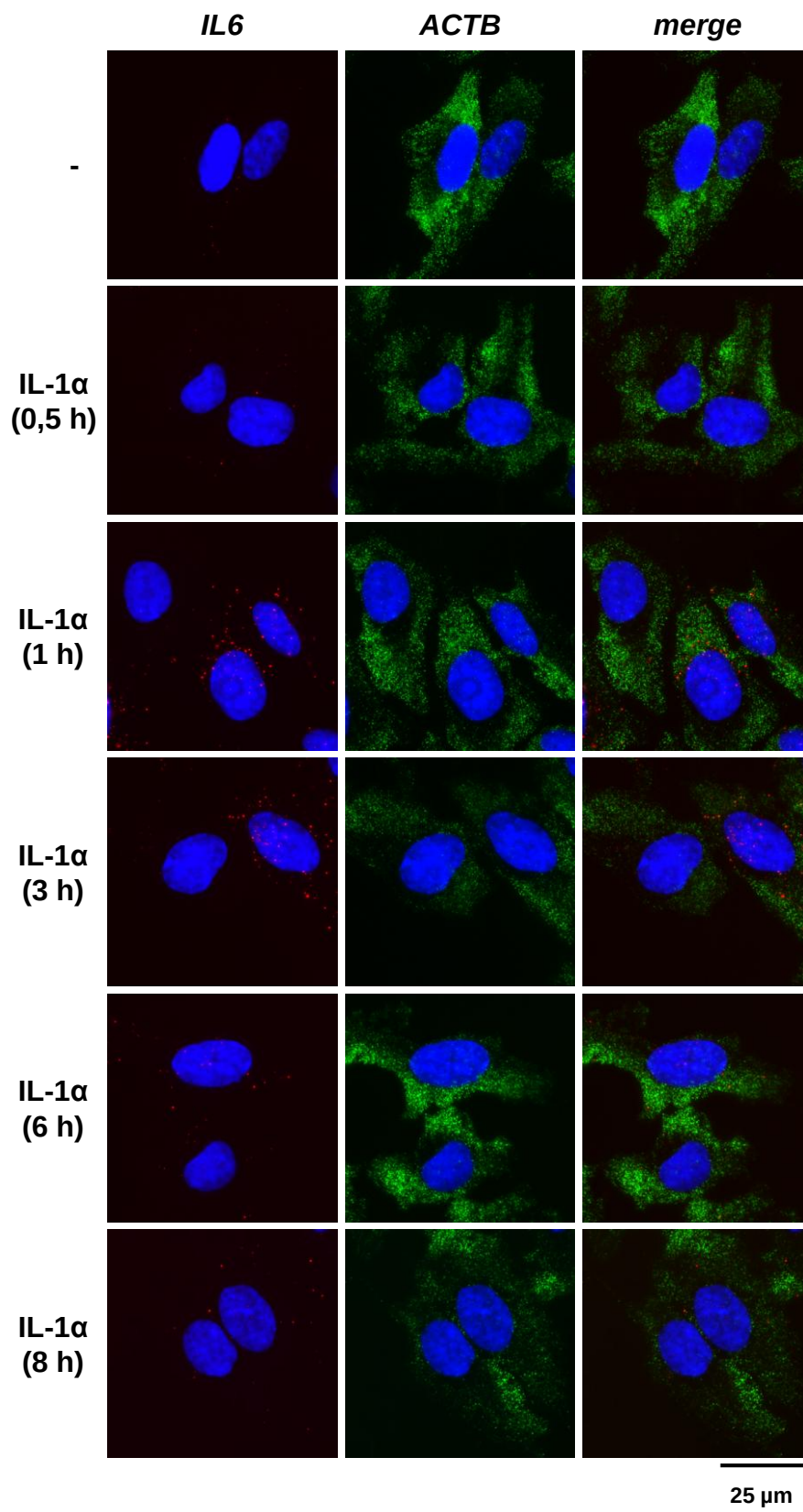
Insgesamt ließ sich feststellen, dass die Kurvenverläufe der IL-1 α -induzierten Genexpression der Gesamtzellanalyse gut mit den Ergebnissen der Einzelzellanalyse übereinstimmen (vgl. Abb. 4.4). Nach Beginn der IL-1 α -Stimulation zeigten alle drei Gene eine Steigerung auf ein Maximum nach 1 Stunde und einen darauffolgenden mehr oder weniger starken Abfall der Expressionsrate. Diese Experimente konnten allerdings zusätzlich zur Gesamtzellanalyse deutliche genspezifische Unterschiede in Bezug auf die basalen mRNA-Gehalte und in der Verteilung der Transkripte innerhalb der Zellpopulation aufzeigen.

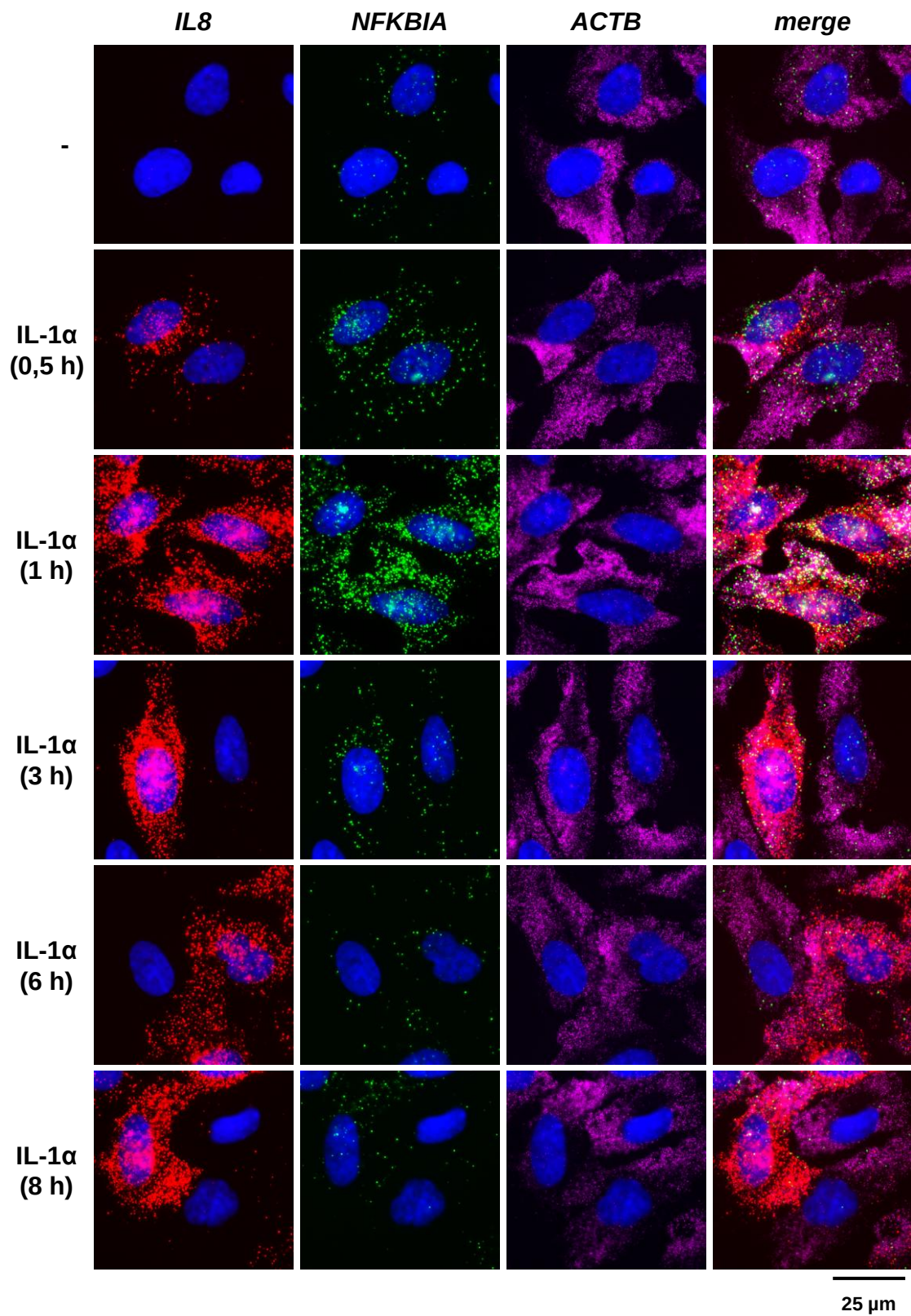
Im unstimulierten Zustand war ein geringer basaler Spiegel an *IL6*-mRNAs (Median: 9 Transkripte pro Zelle) zu detektieren, welcher nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation auf ein Maximum (Median: 26 Transkripte pro Zelle) anstieg. Mit längerer Inkubationsdauer sank der Transkriptgehalt langsam ab, erreichte jedoch nach 8 Stunden noch nicht den basalen Zustand (Median: 14 Transkripte pro Zelle). Vereinzelt zeigten sich Zellen mit relativ vielen *IL6*-Transkripten im Vergleich zur Gesamtzellpopulation. Diese Beobachtung spiegelte sich anhand der vielen Ausreißer im *box plot* bei 1, 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation wieder, die die höheren Mittelwerte im Vergleich zu den Medianen erklären. Für *IL8* ließen sich im unstimulierten Zustand kaum Transkripte detektieren (Median: 4 Transkripte pro Zelle), sodass der basale mRNA-Spiegel für *IL8* im Vergleich zu *IL6* und *NFKBIA* am geringsten war. Mit beginnender IL-1 α -Stimulation stieg die *IL8*-Transkriptmenge am stärksten auf ein Maximum nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation an (Median: 311 Transkripte pro Zelle). Hier war die beginnende IL-1 α -induzierte Genexpression anhand der vermehrten Transkripte im Zellkern besonders gut zu erkennen. Mit längerer IL-1 α -Inkubation sank die *IL8*-Transkriptmenge jedoch nicht in allen Zellen auf das basale Niveau ab. Es zeigte sich vielmehr eine Heterogenität der Transkriptmengen innerhalb der Zellpopulation. Entsprechend zeigte der *box plot* für 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation große Boxen von minimal 34 bis maximal 423 Transkripte pro Zelle und einen weniger starken Abfall der Mediane (Median bei 8 h IL-1 α -Inkubation: 211 Transkripte pro Zelle). Diese Beobachtung in der Einzelzellanalyse kann die hohen Transkriptmengen nach 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation in der RTqPCR erklären. Für *NFKBIA* ließ sich im

Vergleich zu *IL6* und *IL8* der höchste basale Transkriptspiegel (Median: 25 Transkripte pro Zelle) detektieren, welcher mit IL-1 α -Stimulation auf ein Maximum nach 1 Stunde anstieg (Median: 211 Transkripte pro Zelle). Mit längerer IL-1 α -Inkubationsdauer sank der *NFKBIA*-Transkriptspiegel im Gegensatz zu *IL6* und *IL8* zügiger ab und näherte sich nach 8 Stunden dem basalen mRNA-Gehalt (Median: 43 Transkripte pro Zelle). Im Vergleich zu *IL6* und *IL8* waren die *NFKBIA*-Transkripte im unstimulierten Zustand und bei allen IL-1 α -Inkubationszeitpunkten homogener in der gesamten Zellpopulation verteilt. Der Gehalt an *ACTB*-mRNA in den Zellen war bei allen Versuchsbedingungen bis auf kleinere Schwankungen mit 318 bis 387 Transkripten pro Zelle im Median nahezu konstant.

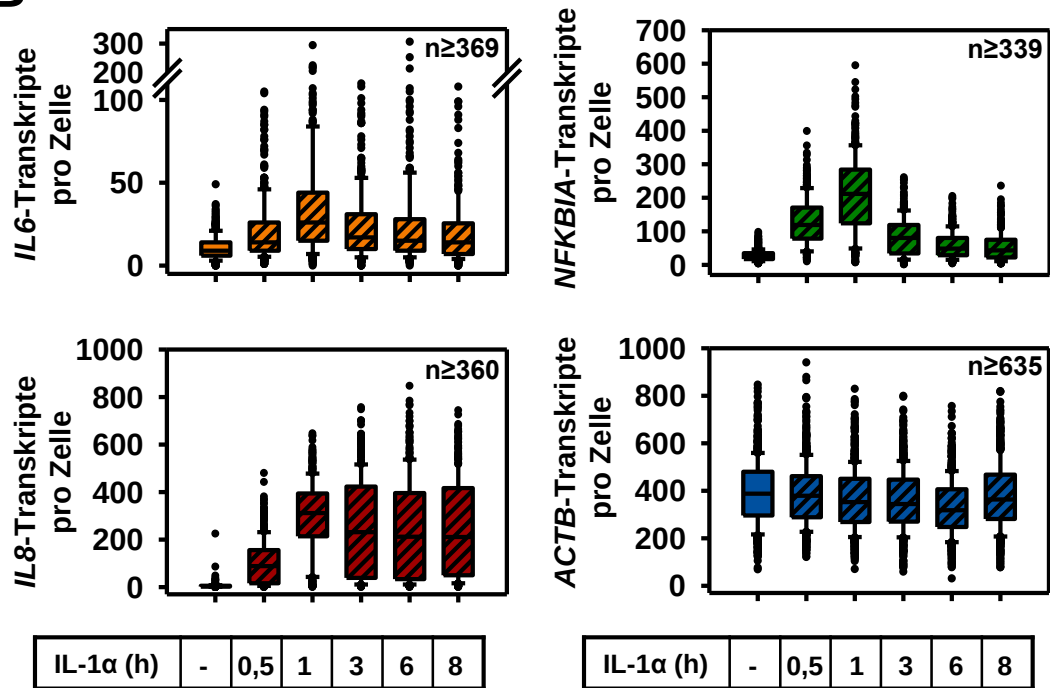
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hTERT-RPE1-Zellen auf einen IL-1 α -Stimulus mit einer schnellen Änderung der Signaltransduktion und infolgedessen der Genexpression reagierten, was hier anhand von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* exploriert wurde. Dabei konnte beobachtet werden, dass der basale mRNA-Gehalt von *NFKBIA* deutlich höher lag, als es für *IL6* und *IL8* der Fall war. Außerdem konnten für längere IL-1 α -Inkubationszeitpunkte (3 h, 6 h, 8 h) für *IL6* und besonders für *IL8* lang anhaltend hohe mRNA-Spiegel innerhalb einzelner Zellen detektiert werden, während für *NFKBIA* der mRNA-Gehalt zu diesen Zeitpunkten schon recht rapide abgesunken war. Des Weiteren zeigte sich im Gegensatz zu *NFKBIA* basal und IL-1 α -induziert eher eine heterogene Verteilung der *IL6*- und *IL8*-Transkripte pro Zelle. Diese Ergebnisse suggerierten, dass sich womöglich die basalen und IL-1 α -induzierten mRNA-Stabilitäten der drei Gene unterscheiden. Diese sollten im Folgenden anhand von Messungen der relativen Transkriptmengen der drei Transkripte nach Transkriptionseinhibition untersucht werden.

A





B



C

	IL6		IL8		NFKBIA		ACTB	
	Median	MW	Median	MW	Median	MW	Median	MW
Unstimuliert	9,00	10,72	4,00	5,37	25,00	27,64	387,00	391,31
IL-1α (0,5 h)	14,00	20,89	88,00	103,20	119,00	128,97	379,00	384,43
IL-1α (1 h)	26,00	38,13	311,00	297,37	211,00	209,78	352,00	362,90
IL-1α (3 h)	17,00	25,61	231,00	246,10	80,00	83,20	344,00	358,53
IL-1α (6 h)	15,00	26,55	212,00	236,16	48,00	58,51	318,00	330,04
IL-1α (8 h)	14,00	22,30	211,00	243,22	43,00	52,10	363,00	378,47

Abb. 4.5: RNA-FISH zur Bestimmung der mRNA-Mengen für IL6, IL8, NFKBIA und ACTB nach IL-1α-Stimulation. A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag mit IL-1α [10 ng/ml] für ½, 1, 3, 6 und 8 h behandelt oder unstimuliert (-) gelassen. Nach Fixierung der Zellen über Nacht bei 4°C wurde eine RNA-FISH mit Markierung von IL6-, IL8-, NFKBIA- und ACTB-mRNA durchgeführt. Verwendet wurden dafür verschiedene Sondentypen und das Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit der Firma Affymetrix. Als experimentelle Kontrolle diente die Anfärbung von ACTB-mRNA. Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. Die Quantifizierung der Anzahl der Transkripte erfolgte mittels Duolink-Software. B: Quantitative Darstellung der Anzahl der Transkripte pro Zelle in einer Gesamtzellpopulation von mindestens 339 Zellen pro Bedingung (n≥339) in drei voneinander unabhängigen Experimenten. C: Zusammenstellung der Mittelwerte (MW) und Mediane aus Abb. 4.5 B.

4.4 Bestimmung der mRNA-Stabilitäten IL-1α-induzierbarer Gene

Der mRNA-Umsatz ist ein wichtiger Einflussfaktor der Genexpression und wird u.a. durch Translationsrate, mRNA-Speicherungskapazitäten und den mRNA-Abbau beeinflusst. Die Regulation dieser Vorgänge ist wichtig, damit der Zelle zum Erhalt ihres Stoffwechsels und zellulärer Funktionen die korrekte Menge an mRNAs zur Verfügung steht (vgl. 1.2). Es wird vermutet, dass *P-bodies* bei dieser Regulation

beteiligt sein können, um die Genexpression bei der Reaktion auf verschiedene Stressoren zu beeinflussen (vgl. 1.3.2). Eine wichtige Messgröße für den mRNA-Umsatz ist die mRNA-Stabilität, die anhand der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) in Minuten (min) bestimmt werden kann (Chen et al., 2008). Sie gibt an, wie lange es dauert, bis eine gegebene Menge an mRNAs zur Hälfte reduziert wurde. In dieser Arbeit wurde die mRNA-Stabilität unter Verwendung des Transkriptionsinhibitors Actinomycin D (ActD) analysiert, welches über eine Interkalierung in die DNA die Synthese von RNA inhibiert (Hill et al., 2014).

Die beobachteten Unterschiede in der IL-1 α -abhängigen Genexpression von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* in Bezug auf die Transkriptionsinduktion und mRNA-*steady-state-level* ließen vermuten, dass sich die mRNA-Stabilitäten sowohl zwischen den drei Genen als auch IL-1 α -abhängig unterscheiden. Auch die besondere Rolle des *NFKBIA*-Gens im Autoinhibitionsprozess der IL-1 α -Antwort unterstützt diese Vermutung (vgl. 1.1.2). Im Folgenden wurden daher zunächst die basalen und IL-1 α -abhängigen mRNA-Stabilitäten von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* gemessen. Daraufhin sollte dann anhand von IF-FISH-Experimenten die Funktion von *P-bodies* in Bezug auf die Stabilisierung bzw. Destabilisierung von IL-1 α -induzierter mRNA näher untersucht werden.

4.4.1 Einfluss von IL-1 α auf die mRNA-Stabilitäten von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA*

Zur Untersuchung der IL-1 α -abhängigen mRNA-Stabilitäten von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA*, wurden Zellen für ½, 1, 3, 6 und 8 Stunden mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert gelassen. Nach Ablauf der IL-1 α -Inkubationszeit wurden die Zellen für 30, 60, 120 oder 180 Minuten mit Actinomycin D [5 μ g/ml] als Transkriptionsinhibitor behandelt oder keine Actinomycin D-Behandlung durchgeführt. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen geerntet, die RNA jeder Probe isoliert und die mRNA-Mengen von *IL6*, *IL8*, *NFKBIA* und *GUSB* mittels RTqPCR ermittelt. Das IL-1 α -unabhängige Gen *GUSB* wurde dabei in jedem Experiment als Referenzgen verwendet. Ein Pipettierschema dieser Actinomycin D-*chase*-Experimente ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

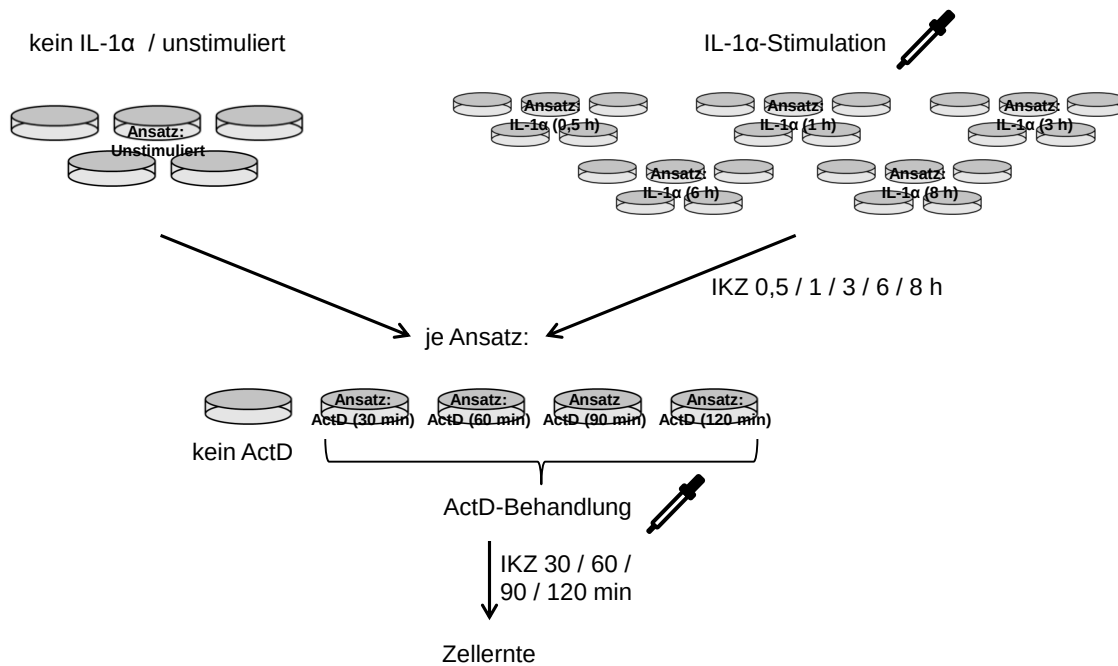


Abb. 4.6: Pipettierschema der Actinomycin D-chase-Experimente. hTERT-RPE1-Zellen wurden in insgesamt 30 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden 5 Zellkulturschalen je Ansatz für ½, 1, 3, 6 oder 8 h mit IL-1α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert gelassen. Nach Ablauf der Inkubationszeiten (IKZ) für IL-1α wurde eine Schale pro Ansatz für weitere 30, 60, 120 oder 180 min mit Actinomycin D (ActD) [5 µg/ml] behandelt oder unbehandelt gelassen, um die Transkription zu blockieren. Nach Ablauf der ActD-Inkubationszeiten wurden die Zellen geerntet und standen weiteren Versuchszwecken zur Verfügung.

Diese Versuchsbedingungen ermöglichten eine Bestimmung der Halbwertszeiten der entsprechenden mRNAs im basalen Zustand und nach IL-1α-Stimulation über eine relative Quantifizierung der mRNA-Menge nach den verschiedenen Actinomycin D-Inkubationszeitpunkten in Bezug auf die Actinomycin D-unbehandelte Probe. Die Mittelwerte der relativen mRNA-Mengen aus drei voneinander unabhängigen Versuchen (180 Minuten-Wert aus zwei unabhängigen Versuchen) wurden in Abhängigkeit von der Actinomycin D-Inkubationszeit graphisch in semi-logarithmischer Skalierung dargestellt und eine nicht-lineare Regression der Datenpunkte durch die Sigma Plot-Software durchgeführt (Abb. 4.7 A). Die Funktion für die Regression lautet:

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

Mittels Koeffizient b wurden die Halbwertszeiten [min] mittels folgender Formel berechnet:

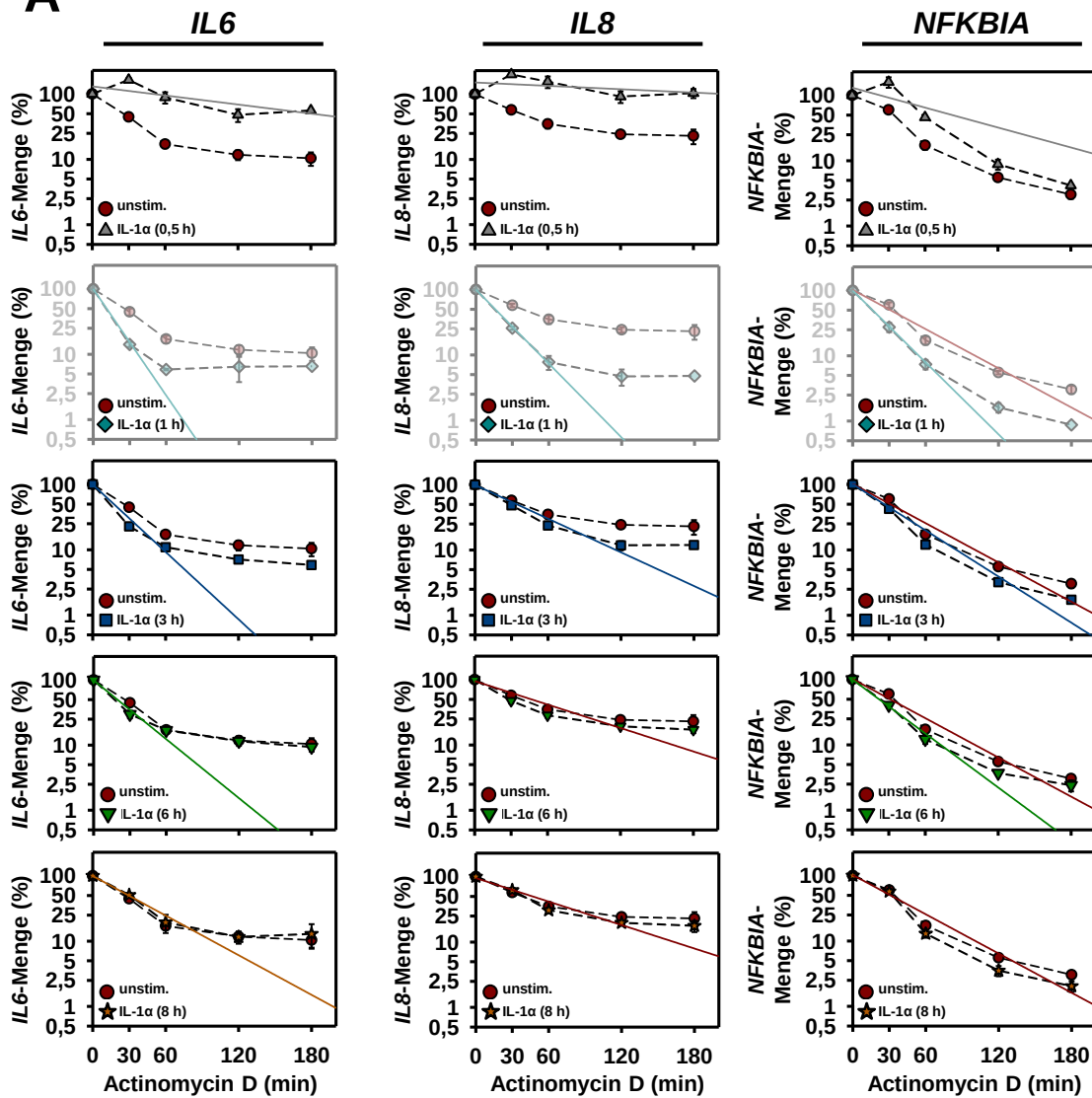
$$t_{1/2}=\ln(2)/b$$

Die absoluten IL-1α-abhängigen Halbwertszeiten wurden genspezifisch in Abb. 4.7 B dargestellt. Zusätzlich wurden die relativen Veränderungen der Halbwertszeiten nach

IL-1 α -Inkubation anhand der Normierung auf die Probe ohne IL-1 α -Stimulation berechnet und n-fach dargestellt.

Im basalen Zustand, ohne IL-1 α -Stimulation, zeigte sich die stabilste mRNA für *IL8* ($t_{1/2}$ =50 min), gefolgt von *NFKBIA* ($t_{1/2}$ =30 min) und *IL6* ($t_{1/2}$ =26 min). Mit beginnender IL-1 α -Stimulation ließ sich nach 0,5 Stunden für alle drei Gene zunächst eine Stabilisierung der Transkripte feststellen (*IL6*: $t_{1/2}$ =130 min; *IL8*: $t_{1/2}$ =347 min; *NFKBIA*: $t_{1/2}$ =59 min). Allerdings war aufgrund der wenigen *IL8*-Transkriptenmengen im basalen Zustand (vgl. 4.3.2) und nahezu unveränderten *IL8*-Mengen nach Actinomycin D-Behandlung ersichtlich, dass die Regressionsgerade für *IL8* annähernd parallel zur X-Achse verlief, sodass der errechnete Wert für die Halbwertszeit keine Aussagekraft besaß. Nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation zeigten alle drei Gene die größte mRNA-Destabilisierung (*IL6*: $t_{1/2}$ =11 Minuten; *IL8*: $t_{1/2}$ =16 Minuten; *NFKBIA*: $t_{1/2}$ =16 Minuten). Dabei sank die Stabilität der *IL8*-mRNA bei 1 Stunde IL-1 α -Inkubation im Vergleich zur basalen Stabilität mit einem *fold* von 0,3 am stärksten ab, gefolgt von *IL6* mit einem *fold* von 0,4 und *NFKBIA* mit einem *fold* von 0,5. Bei längerer IL-1 α -Inkubation näherten sich die mRNA-Stabilitäten für alle drei Gene wieder der basalen Stabilität an (nach 8 h IL-1 α : *IL6*: $t_{1/2}$ =30 min; *IL8*: $t_{1/2}$ =44 min; *NFKBIA*: $t_{1/2}$ =27 min). Die Standardabweichungen waren für alle Gene zu allen Actinomycin D-Behandlungszeitpunkten gering.

A



B

	<i>IL6</i>		<i>IL8</i>		<i>NFKBIA</i>	
	HWZ (min)	HWZ (n-fach)	HWZ (min)	HWZ (n-fach)	HWZ (min)	HWZ (n-fach)
unstimuliert	26,3	1,0	50,2	1,0	30,0	1,0
IL-1α (0,5 h)	130,8	5,0	346,6	6,9	59,2	2,0
IL-1α (1 h)	11,1	0,4	15,9	0,3	16,4	0,5
IL-1α (3 h)	17,5	0,7	35,0	0,7	25,6	0,9
IL-1α (6 h)	20,0	0,8	36,5	0,7	21,9	0,7
IL-1α (8 h)	29,7	1,1	44,1	0,9	27,4	0,9

Abb. 4.7: IL-1α-abhängige mRNA-Stabilitäten von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* in hTERT-RPE1-Zellen. A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag zuerst für ½, 1, 3, 6 oder 8 h mit IL-1α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert (unstim.) gelassen. Nach Ablauf der IL-1α-Inkubationszeiten wurden die Zellen für weitere 30, 60, 120 oder 180 min mit Actinomycin D [5 µg/ml] behandelt oder unbehandelt gelassen

und anschließend geerntet. Die RNA wurde mittels NucleoSpin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Normiert auf die jeweilige Probe ohne Actinomycin D-Behandlung wurden die relativen mRNA-Mengen der *IL6*-, *IL8*- und *NFKBIA*-Gene mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode anhand einer RTqPCR ermittelt. *GUSB* diente dabei als Referenzgen. Dargestellt sind je Gen die Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) in semi-logarithmischer Skalierung in drei voneinander unabhängigen Experimenten (180 min-Wert in zwei unabhängigen Experimenten). Mit Hilfe der SigmaPlot-Software wurde eine nicht-lineare Regression der Datenpunkte durchgeführt, um in Abhängigkeit von der IL-1 α -Inkubationszeit die Halbwertszeiten in Minuten zu berechnen. **B:** Darstellung der IL-1 α -abhängigen absoluten Halbwertszeiten (HWZ) [min] von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA*, sowie die relativen Veränderungen (n-fach) der mRNA-Halbwertszeiten normiert auf die jeweilige Halbwertszeit der Probe ohne IL-1 α -Inkubation, welche in jedem Graph mitgeführt wurde.

4.4.2 Analyse der Lokalisation von *IL8*- und *NFKBIA*-mRNAs in Bezug auf

EDC4 bei Transkriptionsinhibition

Zur Analyse der Funktion von *P-bodies* in Bezug auf Stabilierungs- und Destabilisierungsvorgänge von mRNAs in hTERT-RPE1-Zellen sollte im Folgenden die Lokalisation von *P-bodies* und Transkripten nach Veränderung der mRNA-Stabilität für *IL8* und *NFKBIA* näher untersucht werden. Zur Visualisierung von mRNAs und Proteinen eignete sich eine Immuno-RNA-*in situ* Hybridisierung (IF-FISH), die eine Kombinationsmethode aus indirekter Immunfluoreszenz und RNA-FISH darstellt. Als *P-body*-Marker in hTERT-RPE1-Zellen wurde das EDC4-Protein (markiert über den (rb)-Antikörper der Firma Cell Signaling) ausgewählt, da sich Aggregate vom EDC4-Protein gut vom unspezifisch angefärbten Zytoplasma abgrenzen ließen und weitere *P-body*-Proteine (z.B. DCP1a und XRN1) mit diesen kolokalisierten (vgl. Abb. 4.2). Ein identifiziertes spezifisches Signal von EDC4 wurde also im Folgenden als *P-body* bezeichnet.

Um verschiedene IL-1 α -abhängige mRNA-Stabilitätszustände abzubilden, wurden die Zellen für 1 und 3 Stunden mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert gelassen. Somit konnte der basale Zustand der untersuchten mRNAs mit erwartet hoher Stabilität, ein Destabilisierungszustand mit der größten Instabilität und ein wiederkehrender Stabilisierungszustand abgebildet werden (vgl. Abb. 4.7). Nach Ende der IL-1 α -Inkubationszeit wurden die Zellen analog zu 4.4.1 mit Actinomycin D als Transkriptionsinhibitor behandelt. Allerdings wurden für diese Experimente zur Untersuchung der Dynamik der Abbaurate deutlich mehr Inkubationszeitpunkte ausgewählt, um eine mögliche transiente Aggregation von *P-bodies* und mRNAs präziser darstellen zu können. Dementsprechend wurden die Zellen für 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten mit Actinomycin D [5 $\mu\text{g/ml}$] behandelt oder unbehandelt (-) gelassen (Abb. 4.8 A). Pro Bedingung wurde mittels Duolink-Software die Anzahl an *IL8*- und *NFKBIA*-Transkripten pro Zelle detektiert und als *box plot* dargestellt. Zusätzlich wurden die Mediane der jeweiligen Transkriptanzahl pro Zelle in

Abhängigkeit von den Actinomycin D-Behandlungszeitpunkten als *spline-curve* in grau aufgezeigt. Manuell wurde mit Hilfe eines 4x4-Pixel-Rasters (vgl. 3.5.1) die Anzahl an *P-bodies* pro Zelle ermittelt und ebenfalls in Form eines *box plots* dargestellt. Des Weiteren wurde manuell in mindestens 100 Zellen pro Bedingung der Anteil an Kolo-kalisationen von Transkripten und *P-bodies* (*merges*) pro Zelle in Prozent [%] ermittelt. Dieser Anteil wurde als Mittelwert und einfache Standardabweichung dargestellt (Abb. 4.8 C). In Abbildung 4.8 B ist eine schematische Zusammenstellung der möglichen Lokalisationen von *P-body* und Transkript zueinander zu sehen. Zustand a) zeigt ein kräftig angefärbtes Transkript, das vollständig im *P-body* zu lokalisieren ist und ein weißes Signal im *merge* erzeugt. Zustand b) zeigt eine partielle Überlagerung von *P-body* und Transkript, sodass lediglich der Überlagerungsort weiß erscheint. Zustand c) zeigt ein schwach angefärbtes Transkript, das sich ebenfalls vollständig im *P-body* zu befinden scheint, wie es die Einzelkanäle abbilden. Der *merge* bleibt allerdings aufgrund des kräftigen *P-body*-Fluoreszenzsignals grün. Zustand d) zeigt ein Transkript, das räumlich vom *P-body* getrennt ist. Entsprechend verhält es sich für Transkripte mit roten Fluoreszenzsignalen, die mit *P-bodies* gelbe *merges* erzeugen. Für die Quantifizierung des Anteils an Kolo-kalisationen/*P-bodies* in einer Zelle wurden Zustand a) bis c) als *merges* berücksichtigt. Da der Anteil an Kolo-kalisationen von Transkripten und *P-bodies* pro Zelle einerseits von der Transkriptmenge und andererseits von der *P-body*-Anzahl abhängig war, wurde mit Hilfe des *fisher's-exact-test* analysiert, ob die *P-body*-Anzahl und die *merges* pro Zelle (grün) oder die Transkriptmenge und die *merges* pro Zelle (rot) voneinander unabhängige Variablen darstellen (Abb. 4.8 D). Anhand einer 4-Felder-Tafel wurden dafür jeweils die Daten der Actinomycin D-behandelten Probe gegen die der Actinomycin D-unbehandelten Probe getestet.

Wie in 4.2.2 ließ sich auch in diesen Versuchen, bis auf kleinere Schwankungen, eine IL-1 α -unabhängige *P-body*-Assemblierung feststellen. Der Median an *P-bodies* pro Zelle lag ohne Actinomycin D-Behandlung IL-1 α -unabhängig zwischen 22 und 24. Nach 15 bis 60 Minuten Actinomycin D-Behandlung zeigten sich kleinere Schwankungen in den Medianen von +/- 3 *P-bodies* pro Zelle. Dann fiel auf, dass die *P-body*-Anzahl mit längerer Transkriptionsinhibition über 90 und 120 Minuten sowohl im unstimulierten Zustand als auch nach vorheriger IL-1 α -Stimulation stetig abzunehmen schien. Nach 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung fiel der Median im

unstimulierten Zustand auf lediglich 11, bei vorheriger IL-1 α -Stimulation für 1 Stunde auf 14, und nach vorheriger 3-stündiger IL-1 α -Stimulation auf 15 *P-bodies* pro Zelle ab.

Erwartungsgemäß sanken durch die Actinomycin D-vermittelte Transkriptionseinhibition die Transkriptspiegel von *IL8* und *NFKBIA* stetig ab, wie auch die *spline*-Kurven in grau demonstrieren. Ausgenommen davon waren jedoch die Zellen ohne IL-1 α -Behandlung, die mit längerer Transkriptionseinhibition eine relativ konstante und geringe *IL8*-Menge von 5-6 Transkripten pro Zelle im Median enthielten. Nach 1 Stunde IL-1 α -Stimulation zeigte sich dann ein starker Anstieg der *IL8*-Transkripte pro Zelle (Median: 329 Transkripte pro Zelle). Nach Transkriptionseinhibition ließ sich hier anhand der Steigung der *spline*-Kurve die stärkste Abnahme des *IL8*-Transkriptspiegels zwischen 15 und 45 Minuten Actinomycin D-Behandlung auf 132 Transkripte pro Zelle im Median nach 45 Minuten detektieren. Nach 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung war der Transkriptgehalt dann bereits auf 31 Transkripte pro Zelle im Median abgesunken. Nach 3 Stunden IL-1 α -Stimulation zeigte sich wie auch in 4.3.2 eine große Box, wobei der Median im Vergleich zu 1 Stunde IL-1 α -Stimulation nur leicht abgesunken war (Median: 248 Transkripte pro Zelle). Durch die Actinomycin D-Behandlung konnte nach 3 Stunden IL-1 α -Inkubation die stärkste Abnahme der *IL8*-Transkriptmenge pro Zelle zwischen 15 und 30 Minuten detektiert werden. Nach 120 Minuten Actinomycin D-Inkubation war der Transkriptspiegel dann bereits auf 49 Transkripte pro Zelle im Median abgesunken.

Für *NFKBIA* ließ sich basal im Vergleich zu *IL8* wie in 4.3.2 eine höhere Transkriptmenge detektieren (Median: 27 Transkripte pro Zelle), welche mit der stärksten Reduktion zwischen 15 und 45 Minuten auf 4 Transkripte pro Zelle im Median nach 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung sank. Nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation zeigte sich ein starker IL-1 α -induzierter Anstieg der Genexpression (Median: 279 Transkripte pro Zelle). Nach Transkriptionseinhibition sank der Transkriptgehalt mit der stärksten Reduktion zwischen 15 und 45 Minuten auf 9 Transkripte pro Zelle nach 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung. Nach 3 Stunden IL-1 α -Inkubation war die Transkriptmenge im Vergleich zur einstündigen IL-1 α -Stimulation erwartungsgemäß bereits stark abgesunken (Median: 83 Transkripte pro Zelle). Mit andauernder Actinomycin D-Behandlung sank diese auch hier am stärksten zwischen 15 und 45 Minuten ab. Nach 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung konnten schließlich 5 Transkripte pro Zelle im Median gezählt werden.

Im unstimulierten Zustand zeigten sich für *IL8* unabhängig von der Actinomycin D-Behandlung kaum Kolokalisationen von Transkripten und *P-bodies*. Da sich unter der verwendeten Methode kaum Veränderungen in den Transkriptspiegeln nach Actinomycin D-Behandlung detektieren ließen, zeigte der *fisher's-exact-test* keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Actinomycin D-unbehandelten Zellen. Für *NFKBIA* ließ sich ohne Actinomycin D-Behandlung ein Anteil von 8 % *merges/P-bodies* feststellen, welcher bis 30 Minuten Actinomycin D-Behandlung recht konstant blieb und dann stetig abfiel. Da für *NFKBIA* im Gegensatz zu *IL8* auch im unstimulierten Zustand eine Actinomycin D-vermittelte Reduktion des Transkriptspiegels detektierbar war, zeigte der *fisher's-exact-test* bezogen auf die Transkriptmenge für die 30, 45 und 60 Minuten Actinomycin D-Behandlungszeitpunkte signifikante Unterschiede des Anteils an *merges/P-bodies* im Vergleich zu den Actinomycin D-unbehandelten Zellen auf. Angesichts der Actinomycin D-induzierten Veränderung der *P-body*-Anzahl, die sich in allen *IL-1 α* -Bedingungen erst nach 90 Minuten ausprägte, zeigte sich hier erst nach 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung ein signifikanter Unterschied.

Mit Anstieg der Transkriptspiegel stiegen nach 1 Stunde *IL-1 α* -Inkubation für beide Transkripte die Anteile an *merges/P-bodies* auf 27 % für *IL8* und 29 % für *NFKBIA* an. Dieser Anteil blieb bis 60 Minuten Actinomycin D-Behandlung für beide Transkripte relativ konstant oder stieg sogar noch an. Nach 90 Minuten Actinomycin D-Inkubation sank der Anteil an Kolokalisationen ab und lag nach 120 Minuten bei 15 % für *IL8* und 13 % für *NFKBIA*. Der *fisher's-exact-test* zeigte unter Berücksichtigung der Änderung der Transkriptgehalte für beide Transkripte nach 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Actinomycin D-unbehandelten Zellen an. Da sich die *P-body*-Anzahl auch hier erst nach 90 Minuten Actinomycin D-Behandlung änderte und der Anteil an Kolokalisationen bis dahin recht konstant blieb, zeigte der *fisher's-exact-test* hier unter Berücksichtigung der Änderung der *P-body*-Anzahl für beide Transkripte keine signifikanten Unterschiede an. Lediglich für *NFKBIA* zeigte sich nach 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung ein signifikanter Unterschied im Anteil an *merges/P-bodies* im Vergleich zu den Actinomycin D-unbehandelten Zellen.

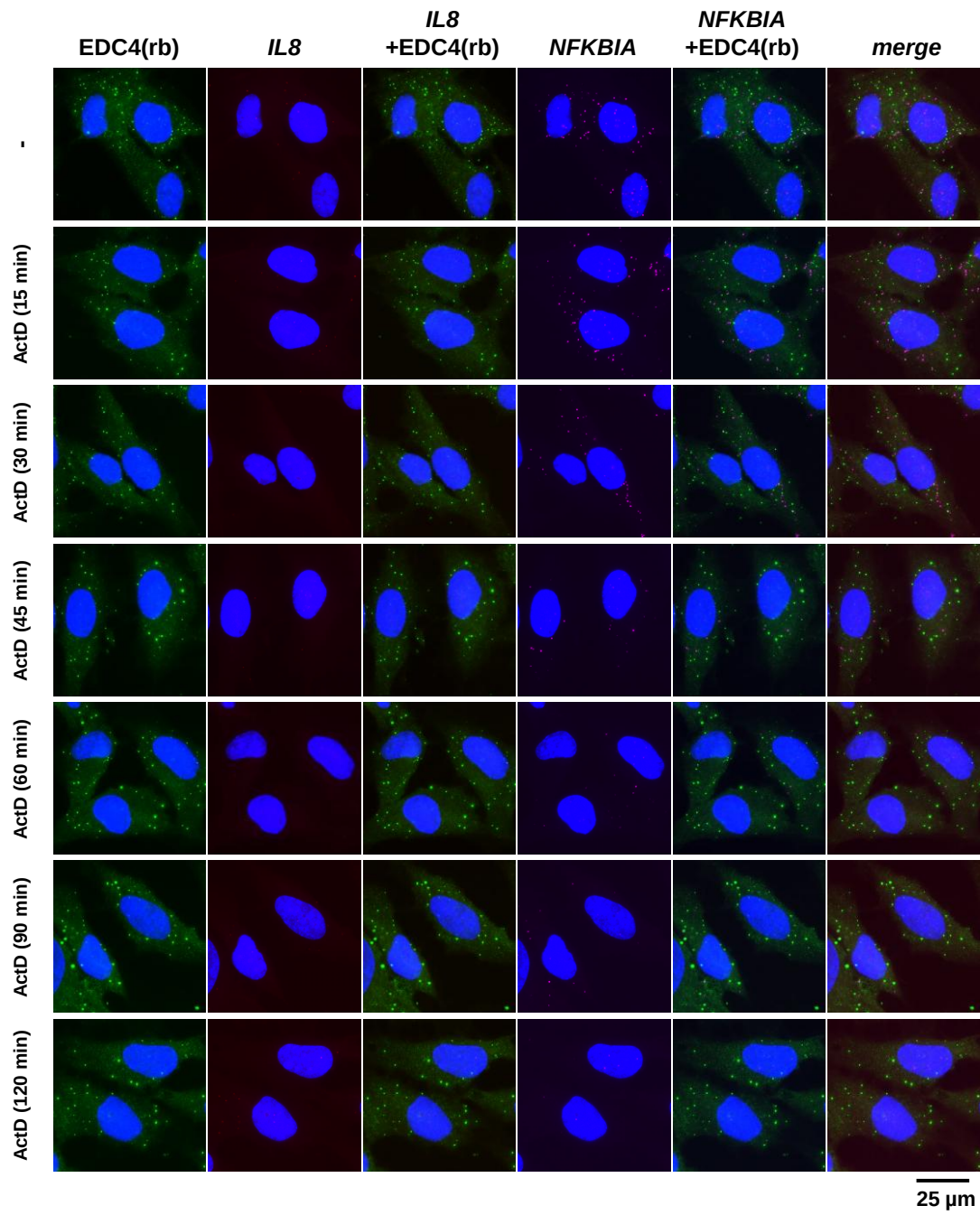
Nach 3 Stunden *IL-1 α* -Inkubation ließ sich für *IL8* mit 23 % *merges/P-bodies* ein geringerer Anteil an Kolokalisationen von Transkripten und *P-bodies* beobachten als

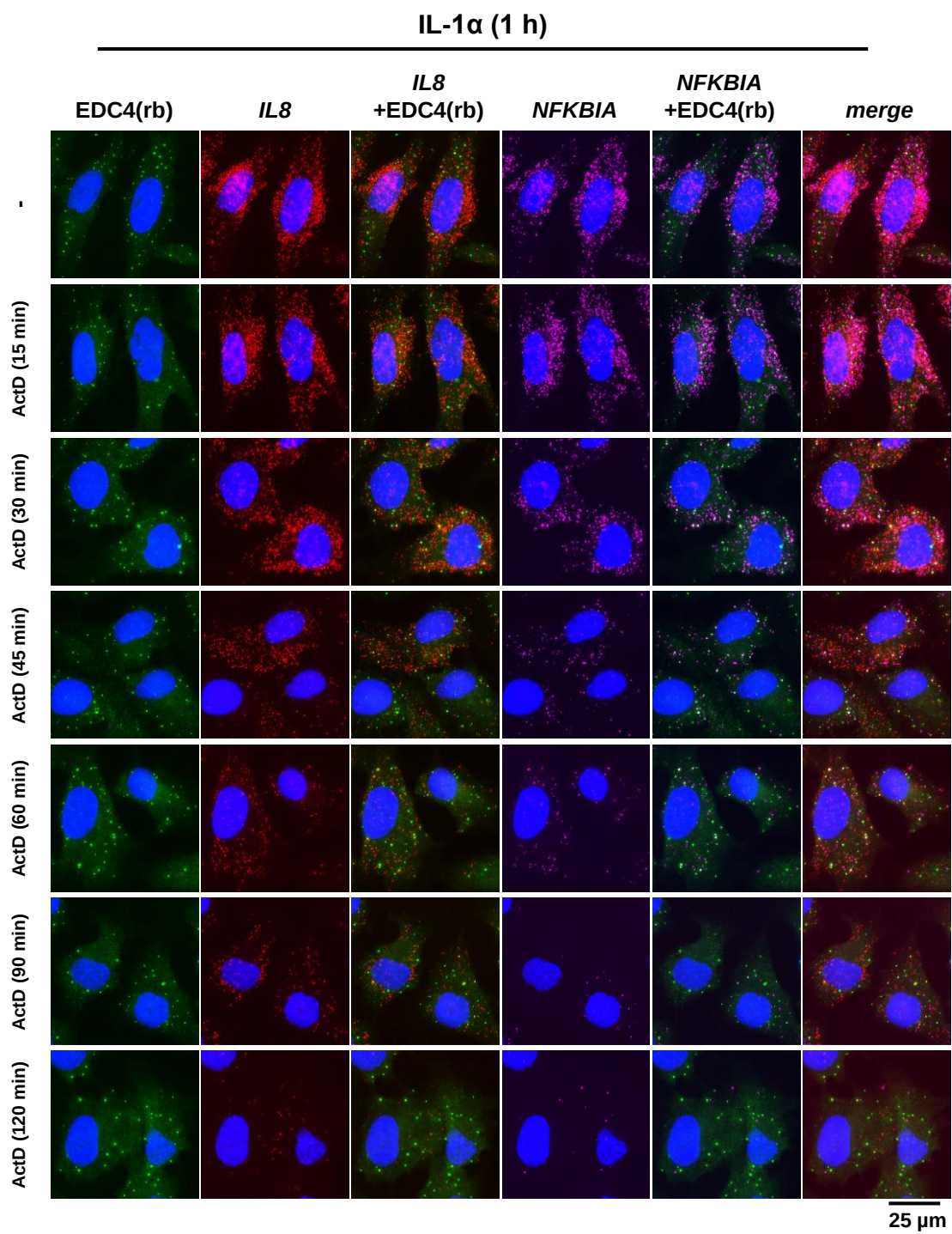
nach 1 Stunde. Auch hier blieb dieser Anteil mit längerer Actinomycin D-Inkubation relativ konstant oder stieg minimal an, sodass nach 120 Minuten Actinomycin D-Inkubation noch 20 % *merges/P-bodies* detektiert werden konnten. Entsprechend zeigte der *fisher's-exact-test* unter Berücksichtigung der Änderung der Transkriptmengen nach 45, 60, 90 und 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung signifikante Unterschiede an. Für *NFKBIA* ließ sich nach 3 Stunden IL-1 α -Inkubation mit 20 % *merges/P-bodies* ebenfalls ein geringerer Anteil beobachten als nach einstündiger IL-1 α -Inkubation. Hier blieb der Anteil an Kolo-kalisationen von Transkripten und *P-bodies* bis 30 Minuten Actinomycin D-Behandlung nahezu konstant und sank nach 45 Minuten stetig ab, sodass nach 120 Minuten lediglich 5 % *merges/P-bodies* beobachtet werden konnten. Unter Berücksichtigung der Änderung der Transkriptspiegel konnte der *fisher's-exact-test* jedoch trotzdem signifikante Unterschiede nach 30-90 Minuten Actinomycin D-Behandlung, und unter Berücksichtigung der Änderung der *P-body*-Anzahl nach 90 und 120 Minuten Actinomycin D-Behandlung, im Vergleich zur Actinomycin D-unbehandelten Probe zeigen.

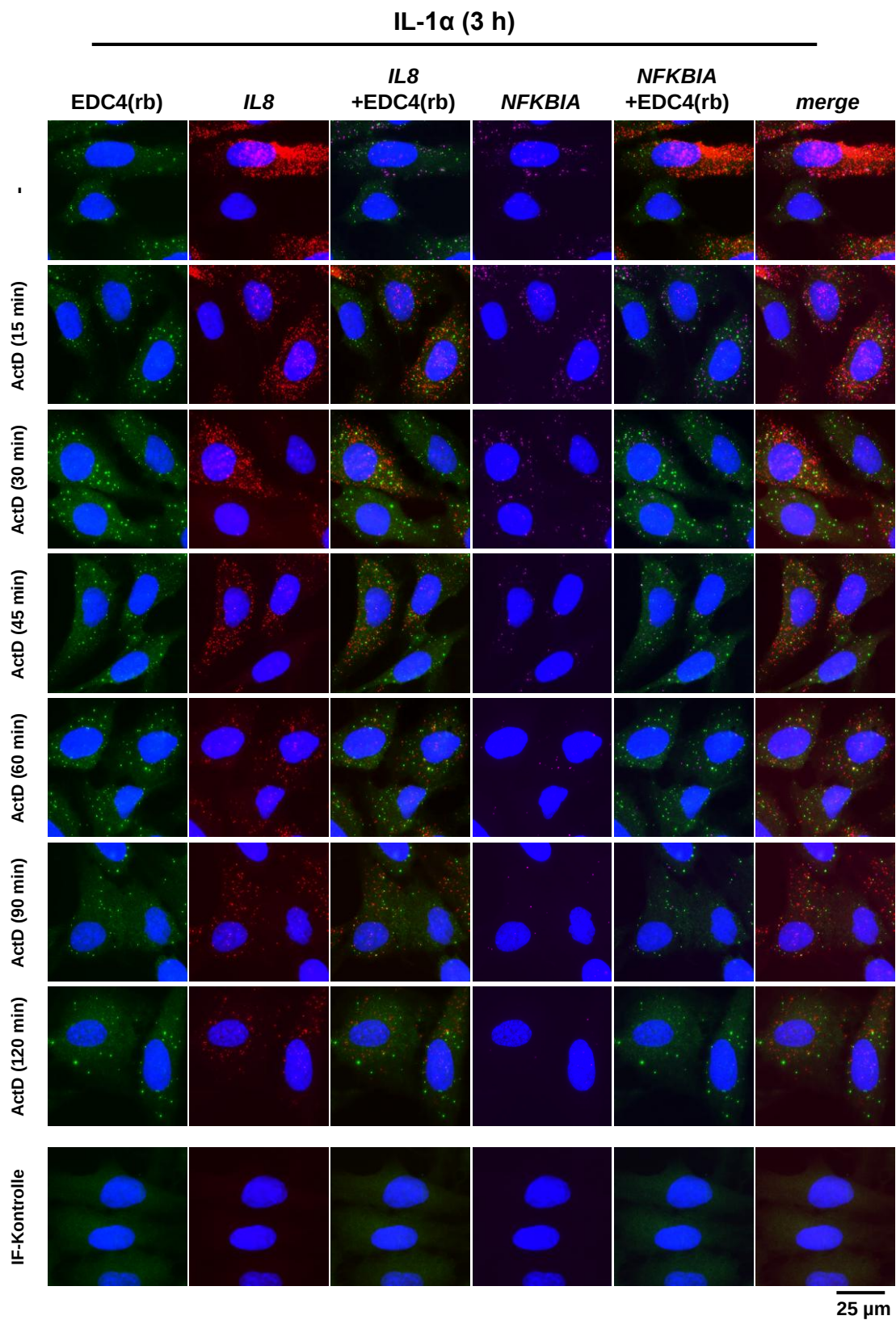
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich durch die Actinomycin D-vermittelte Transkriptionsinhibition auch auf Einzelzellebene eine mehr oder weniger starke Reduktion des mRNA-Gehalts detektieren ließ, wie die mRNA-Stabilitätsmessungen in 4.4.1 bereits gezeigt haben. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die *P-body*-Anzahl pro Zelle mit längerer Actinomycin D-Behandlung (90 Minuten) beginnt zu sinken. Wenn die Transkriptmengen von *NFKBIA* und *IL8* stark abgesunken war, ließ sich trotzdem noch ein recht hoher Anteil an *merges/P-bodies* detektieren, sodass sich unter Berücksichtigung der Abnahme der Transkriptmenge pro Zelle im Vergleich zu den Actinomycin D-unbehandelten Zellen mittels *fisher's-exact-tests* signifikante Unterschiede feststellen ließen. Inwiefern dieser Effekt jedoch biologisch relevant ist, bleibt zunächst offen.

A

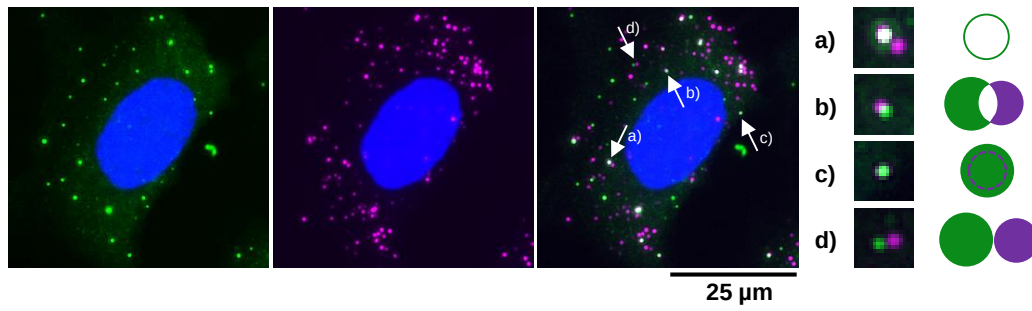
unstimuliert



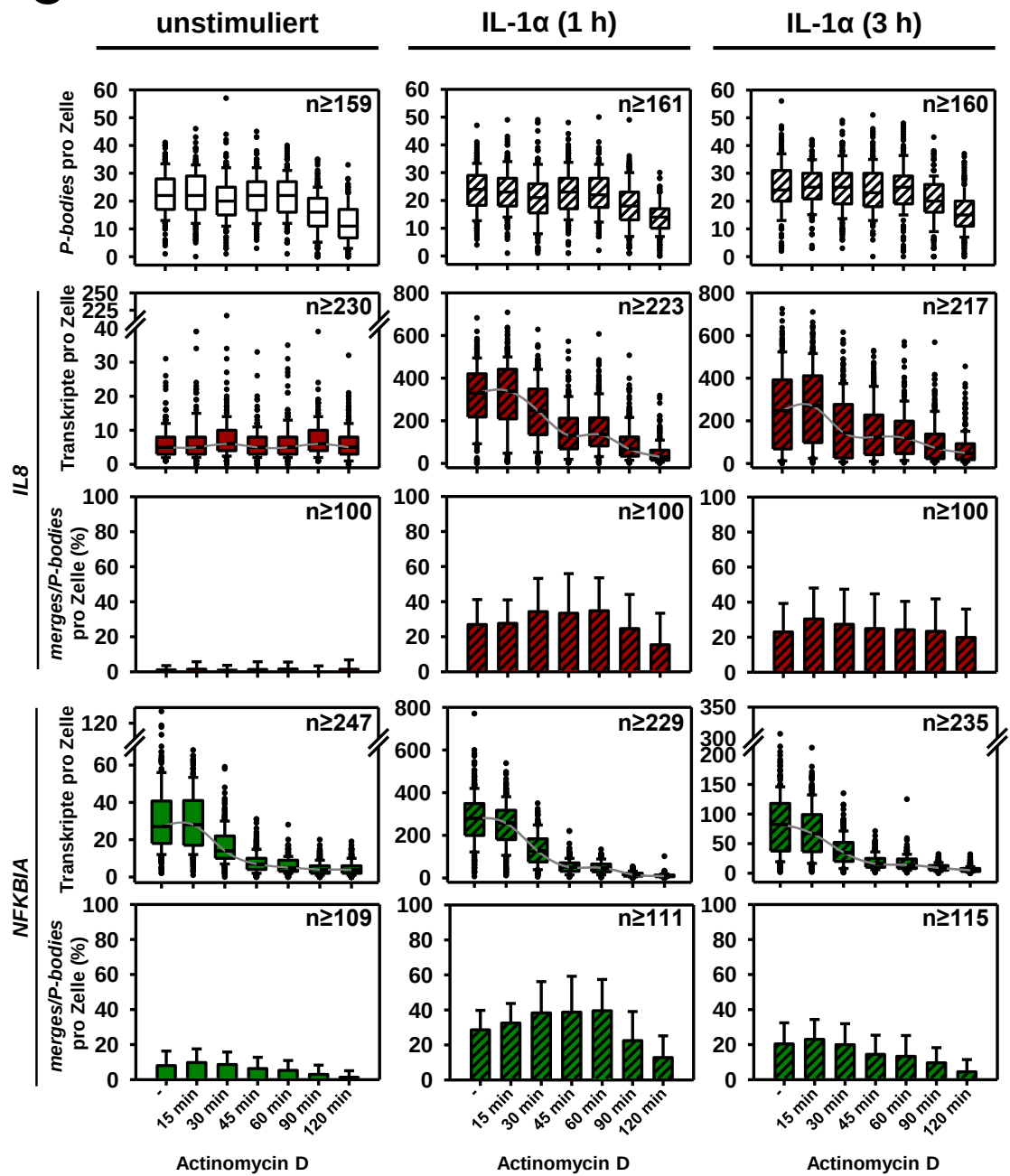




B



C



D

unstimuliert						IL-1 α (1 h)					
IL8			NFKBIA			IL8			NFKBIA		
ActD (min)	merges/P-bodies (%)	Test nach Fisher	merges/P-bodies (%)	Test nach Fisher		ActD (min)	merges/P-bodies (%)	Test nach Fisher	merges/P-bodies (%)	Test nach Fisher	
-	1,08	-	8,00	-		-	26,96	-	28,63	-	
15	1,48	n.s.	9,75	n.s.		15	27,62	n.s.	32,45	n.s.	
30	0,96	n.s.	8,62	n.s.	*	30	34,27	n.s.	38,30	n.s.	***
45	1,32	n.s.	6,29	n.s.	**	45	33,37	n.s.	38,74	n.s.	***
60	1,59	n.s.	5,29	n.s.	**	60	34,77	n.s.	39,56	n.s.	***
90	0,76	n.s.	2,99	n.s.	n.s.	90	24,64	n.s.	22,51	n.s.	***
120	1,45	n.s.	1,33	*	n.s.	120	15,37	n.s.	12,77	**	***

IL-1 α (3 h)					
IL8			NFKBIA		
ActD (min)	merges/P-bodies (%)	Test nach Fisher	merges/P-bodies (%)	Test nach Fisher	
-	23,01	-	20,41	-	
15	30,36	n.s.	22,99	n.s.	n.s.
30	27,37	n.s.	19,93	n.s.	**
45	24,93	n.s.	14,43	n.s.	***
60	24,22	n.s.	13,30	n.s.	***
90	23,34	n.s.	9,63	*	***
120	19,86	n.s.	4,51	***	n.s.

Bezogen auf die P-body-Anzahl

Bezogen auf die Transkriptmenge

n.s.

nicht signifikant

*

p $\leq$ 0,05

**

p $\leq$ 0,001

p $\leq$ 0,0001

Abb. 4.8: Veränderungen der IL-1 α -abhängigen mRNA-steady-state-level von *IL8* und *NFKBIA* und ihre Lokalisation zu EDC4-positiven *P-bodies* nach Transkriptionsinhibition durch Actinomycin D. **A:** hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag zunächst für 1 oder 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert gelassen. Nach Ablauf der IL-1 α -Inkubationszeiten wurden die Zellen für weitere 15, 30, 45, 60, 90 oder 180 min mit Actinomycin D [5 μ g/ml] behandelt oder unbehandelt (-) gelassen. Nach Fixierung der Zellen über Nacht bei 4°C wurde eine IF-FISH mit Markierung der *IL8*- und *NFKBIA*-mRNAs, sowie einer Immunfärbung des EDC4-Proteins durchgeführt. Verwendet wurden dafür genspezifische Sonden und das Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit der Firma Affymetrix. Verwendet wurde als Primärantikörper Anti-EDC4(rb) der Firma Cell Signaling, #2548S (markiert mit Sekundärantikörper Dylight 488). Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. Die Quantifizierung der Anzahl der Transkripte erfolgte mittels Duolink-Software. Die Anzahl an *P-bodies* pro Zelle und der Anteil an Kolokalisationen von Transkripten und *P-bodies* pro Zelle (*merges*) wurde manuell mittels eines 4x4-Pixel-Rasters ermittelt (vgl. 3.5.1). **B:** Schematische Darstellung der möglichen Lokalisationen von *NFKBIA*-Transkript und *P-body* zueinander. **C:** Quantitative Darstellung der Anzahl an Transkripten (Mediane mittels *spline*-Kurve in grau hervorgehoben) und *P-bodies* pro Zelle als *box plot*, sowie der Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) der Anteile an *merges/P-bodies* in zwei bis drei voneinander unabhängigen Experimenten und einer Gesamtzellpopulation von mindestens 100 Zellen pro Bedingung (n $\geq$ 100). **D:** Zusammenfassende tabellarische Darstellung der Mittelwerte an *merges/P-bodies*. Anhand des Vergleichs der Actinomycin D-unbehandelten Zellen zu den Actinomycin D-behandelten Zellen wurde mittels *fisher's-exact-tests* untersucht, ob die *P-body*-Anzahl und *merges* pro Zelle (grün) bzw. die Transkriptmenge und *merges* pro Zelle (rot) voneinander unabhängige Variablen darstellen.

4.5 Veränderung der *P-body*-Zusammensetzung durch Überexpression ausgewählter *P-body*-Proteine in hTERT-RPE1-Zellen

Um die Funktion von spezifischen *P-body*-Proteinen bei der *P-body*-Assemblierung näher zu untersuchen, sollte diese im Folgenden anhand der Überexpression von EDC4 und DCP1a in hTERT-RPE1-Zellen untersucht werden. Die Überexpression wurde durch Transfektion eines HA-gekoppelten EDC4-Proteins und eines *green fluorescent protein* (GFP)-gekoppelten DCP1a-Proteins mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation erzielt. Dabei sollten sich HA-EDC4 und GFP-DCP1a wie das jeweilige endogene Protein verhalten (Tritschler et al., 2009). Zunächst war es allerdings notwendig, die Transfektionseffizienz in hTERT-RPE1-Zellen durch die Durchführung eines Glycerolschocks zu optimieren.

4.5.1 Etablierung einer effizienten Überexpression mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation

Um in hTERT-RPE1-Zellen eine gute Transfektionseffizienz zu erzielen, wurde zunächst getestet, ob die Durchführung eines Glycerolschocks infolge der Transfektion das Transfektionsergebnis verbesserte. Grund dafür war, dass ein Glycerolschock unter anderem durch eine Destabilisierung von lysosomalen und endosomalen Membranen und einer daraus resultierenden erhöhten intrazellulären Freisetzung von Kopräzipitaten die Transfektionseffizienz erhöhen kann (Batard et al., 2001).

In IBIDI μ -Slides VI wurden die Zellen dafür mit einem Expressionsvektor für ein Fusionsprotein von GFP und DCP1a (peGFP-DCP1a) sowie für den Kontrollvektor (peGFP-C1-LV) transfiziert (Abb. 4.9). Je Bedingung wurde infolge der Transfektion ein Glycerolschock durchgeführt oder direkt gewaschen. Die Transfektion von GFP-gekoppelten Proteinen ermöglichte eine direkte Visualisierung der Transfektionseffizienz aufgrund der Eigenfluoreszenz des GFPs im Mikroskop ohne Fixierung der Zellen. Manuell wurde der prozentuale Anteil an transfizierten Zellen im Bezug auf die Gesamtpopulation ermittelt und als Transfektionseffizienz in Prozent [%] angegeben.

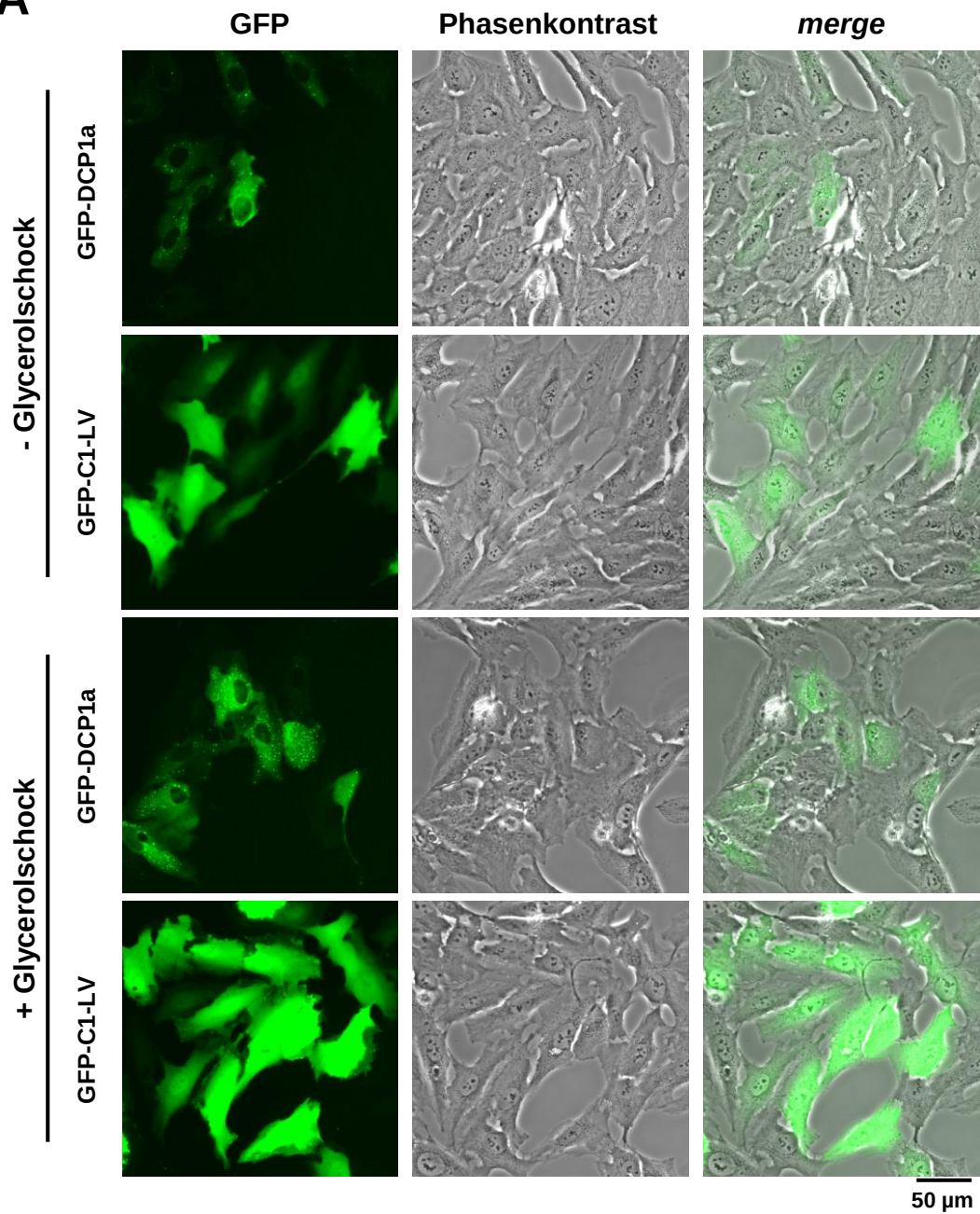
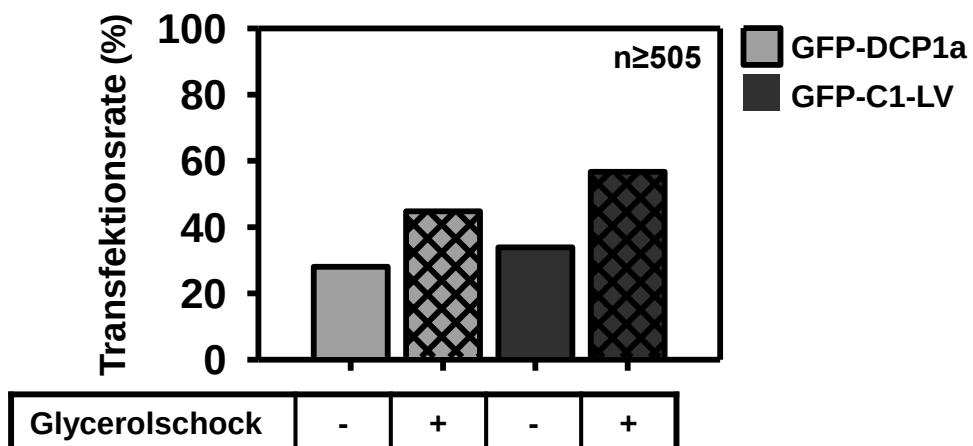
A**B**

Abb. 4.9: Veränderung der Transfektionseffizienz nach Glycerolschock in hTERT-RPE1-Zellen. A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag mit GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a) und dem Kontrollvektor (peGFP-C1-LV) mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert. Nach 5-stündiger Kultivierung wurde das Transfektionsmedium entfernt und jeweils ein Glycerolschock durchgeführt oder direkt gewaschen. Nach weiterer Kultivierung für 20-24 h erfolgten die Bildaufnahme am DMi8-Mikroskop und der LasX-Software. B: Darstellung der jeweiligen Mittelwerte der prozentualen Transfektionsrate in einer Zellpopulation von mindestens 505 Zellen pro Bedingung ($n \geq 505$).

Insgesamt zeigten hTERT-RPE1-Zellen eine recht geringe Transfektionseffizienz, die sich jedoch nach Durchführung eines Glycerolschocks verbesserte. In Bezug auf die Transfektion von GFP-DCP1a ohne Durchführung eines Glycerolschocks konnte in 28 % der Zellen ein GFP-Signal nachgewiesen werden. Mit Glycerolschock stieg dieser Anteil auf 45 %. Für die Leervektorkontrolle zeigte sich insgesamt eine höhere Transfektionseffizienz. Sie stieg durch den Glycerolschock von 34 % auf 57 %. Daher wurde in den folgenden Versuchen nach der Transfektion von Expressionsvektoren mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation standardmäßig ein Glycerolschock durchgeführt.

4.5.2 Einfluss der Überexpression von DCP1a auf die *P-body*-Assemblierung

Zur Analyse der *P-body*-Assemblierung nach Überexpression von DCP1a wurden hTERT-RPE1-Zellen in IBIDI μ -Slides VI mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation mit GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a) oder dem Leervektor als Kontrolle (peGFP-C1-LV) transfiziert. Als weitere Kontrolle dienten parentale Zellen. Zur Verbesserung der Transfektionseffizienz wurde nach der Transfektion ein Glycerolschock durchgeführt (vgl. 4.5.1). Nach 20- bis 24-stündiger Inkubation wurde unter Verwendung einer indirekten Immunfluoreszenz EDC4 als endogenes *P-body*-Protein angefärbt (Abb. 4.9 A). Die *P-body*-Anzahl pro Zelle wurde anhand der *merges* von GFP-DCP1a und EDC4 (in den Kontrollzellen nur anhand von EDC4-Assemblierungen) manuell mittels 4x4-Pixel-Rasters (vgl. 3.5.1) ermittelt (Abb. 4.9 C). Dabei wurde sowohl für GFP-DCP1a als auch für den Leervektor anhand der Farbintensität von GFP provisorisch unterschieden, ob das transfizierte Protein schwach (Expressionsgrad I) oder stark (Expressionsgrad II) exprimiert wurde (Abb. 4.9 B). Die zugehörigen IF-Kontrollen befinden sich im Anhang (Abb. 11.3).

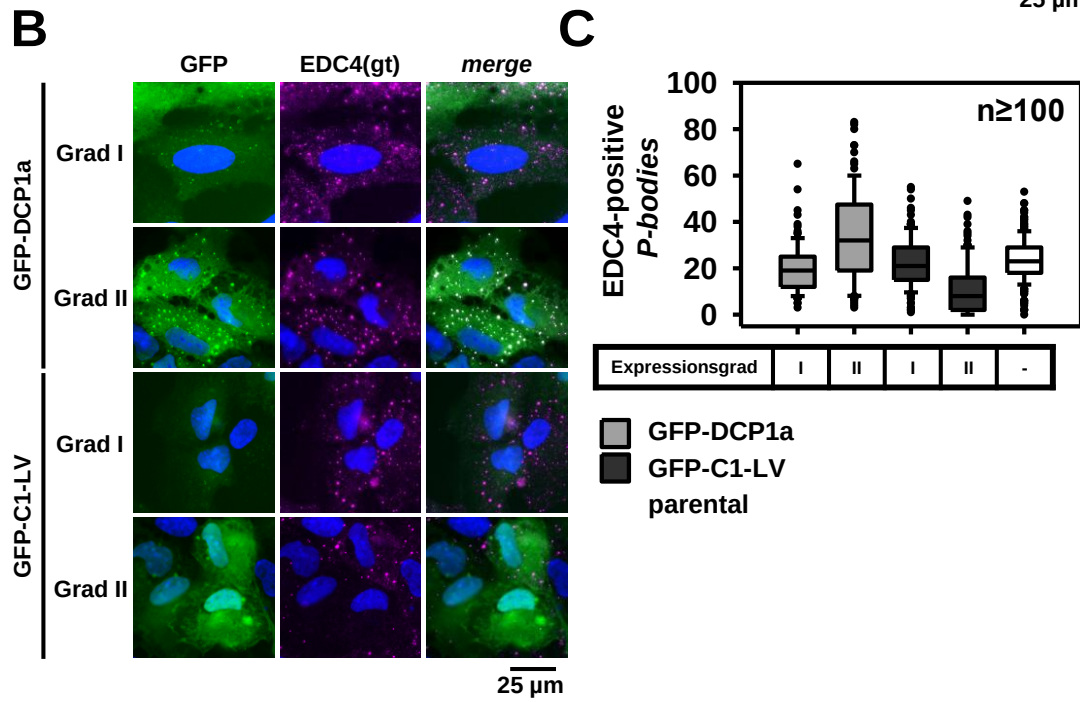
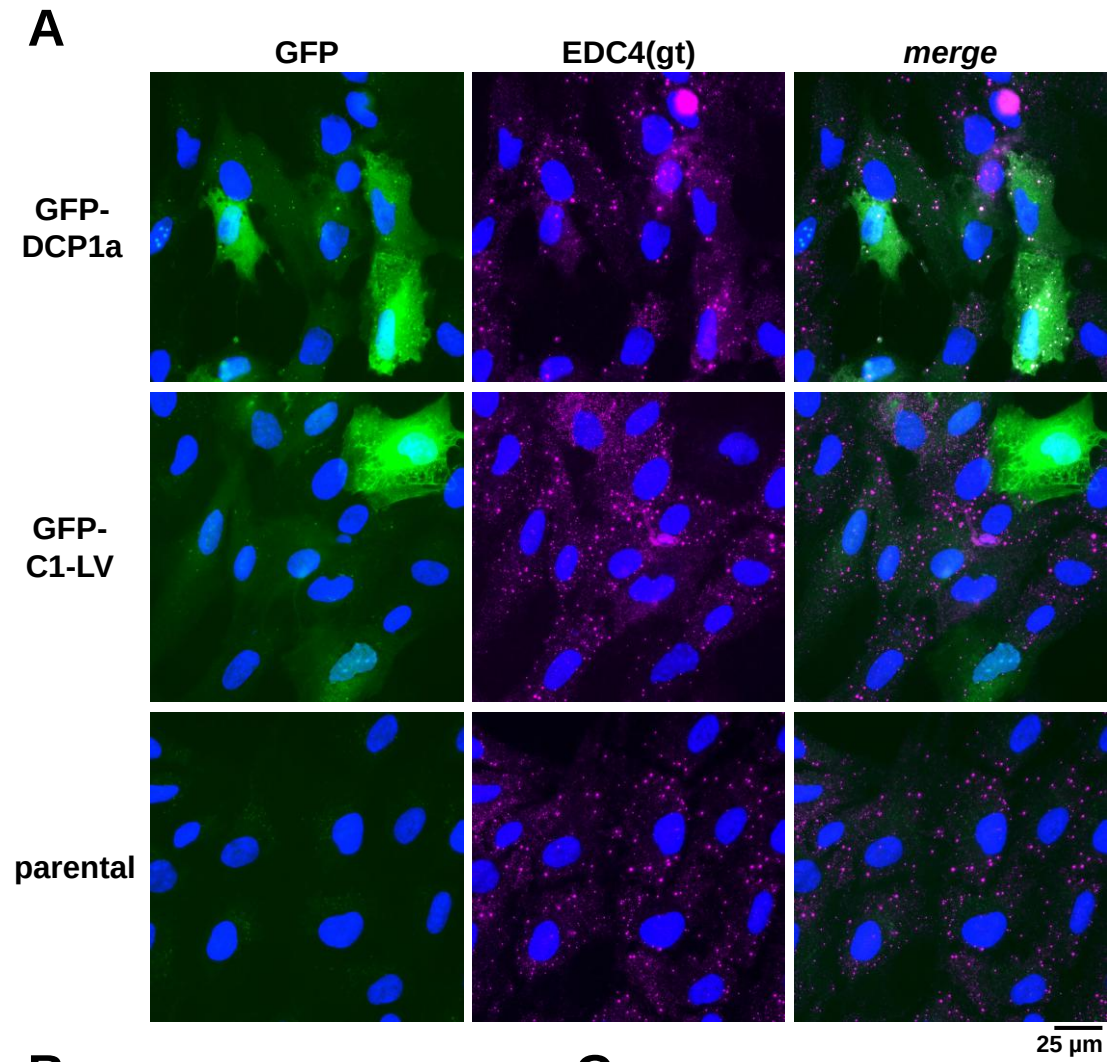


Abb. 4.10: *P-body*-Assemblierung nach Überexpression von DCP1a. **A:** hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag mit GFP-DCP1a (peGFP-DCP1a) oder dem Kontrollvektor (peGFP-C1-LV) mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert. Nach 5-stündiger Kultivierung wurde das Transfektionsmedium entfernt und ein Glycerolschock durchgeführt. Nach weiterer Kultivierung für 20-24 h erfolgte nach Fixierung der Zellen für 5 min bei Raumtemperatur eine Immunfärbung von EDC4. Verwendet wurden als Primärantikörper Anti-EDC4(gt) der Firma Santa Cruz, #sc-137444 (markiert mit Sekundärantikörper Cy5). Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation (Abb. 11.3). Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. Die Anzahl an *P-bodies* pro Zelle wurde unter Berücksichtigung einer provisorischen Einschätzung der Expressionsgrade pro Zelle in starke oder schwache Expression mittels eines 4x4-Pixel-Rasters anhand der *merges* von GFP-DCP1a und EDC4 ermittelt. **B:** Übersichtliche Darstellung der provisorisch ermittelten unterschiedlichen Expressionsgrade (I und II) anhand der Intensität der GFP-Färbung. **C:** Darstellung der absoluten Anzahlen an *P-bodies* pro Zelle als *box plot* in 2 voneinander unabhängigen Experimenten und einer Gesamtzellpopulation von mindestens 100 Zellen pro Bedingung ($n \geq 100$).

Es zeigte sich, dass bei Überexpression von DCP1a *P-body*-ähnliche Strukturen gebildet werden können, in denen das endogene EDC4-Protein kumuliert. Die Quantifizierung der *P-body*-Anzahl zeigte bei starker Überexpression von GFP-DCP1a eine deutlich höhere interzelluläre Variabilität der *P-body*-Anzahl mit einer Erhöhung des Medians auf 32 *P-bodies* pro Zelle im Vergleich zu den parental Zellen (Median: 23 *P-bodies* pro Zelle). Die höhere Variabilität spiegelt sich in einer großen Box im *box plot* wider. Bei schwacher Überexpression von GFP-DCP1a war der Median mit 19 *P-bodies* pro Zelle nahezu vergleichbar mit den parental Zellen. Es fiel allerdings in der Leervektor-Kontrolle auf, dass durch starke Überexpression von GFP die *P-body*-Anzahl im Vergleich zu den parental Zellen stark reduziert war (Median: 8 *P-bodies* pro Zelle), während sie bei schwacher GFP-Expression mit den parental Zellen als vergleichbar angesehen werden konnte (Median: 21 *P-bodies* pro Zelle). Dieser Befund spricht dafür, dass eine starke GFP-Expression einen Stressor für die Zellen darstellt, der die *P-body*-Aggregation beeinflusst, sodass dieses Ergebnis in eingeschränkter Weise zu interpretieren ist. Da bei hoher Expressionsrate von GFP-DCP1a jedoch, obwohl die Leervektor-transfizierten Zellen bei starker GFP-Expression eine Hemmung der *P-body*-Assemblierung zeigten, trotzdem eine Induktion der *P-body*-Assemblierung möglich war, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt vermutlich (wenn der Transfektionsstress unberücksichtigt bleibt) noch stärker ausgeprägt ist.

4.5.3 Einfluss der Überexpression von EDC4 auf die *P-body*-Assemblierung

Zur Analyse der *P-body*-Assemblierung nach Überexpression von EDC4 wurden hTERT-RPE1-Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation mit λ N-HA-EDC4 (pCIneo- λ N-HA-EDC4) oder dem Kontrollvektor (pCIneo- λ N-HA-LV) transfiziert. Als weitere Kontrolle dienten parentale Zellen. Zur Verbesserung der Transfektionseffizienz wurde auch hier nach der Transfektion ein Glycerolschock durchgeführt. Nach 20- bis 24-stündiger Inkubation wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt, bei der

das HA-Protein und DCP1a als endogenes *P-body*-Protein angefärbt wurde (Abb. 4.11 A). Die *P-body*-Anzahl pro Zelle wurde anhand der *merges* von λ N-HA-EDC4 und DCP1a (in den Kontrollzellen nur anhand von DCP1a-Assemblierungen) manuell mittels 4x4-Pixel-Rasters ermittelt (vgl. 3.5.1) (Abb. 4.11 C). Dabei wurde anhand der Farbintensität des HA-Antikörpers provisorisch unterschieden, ob das transfizierte Protein schwach (Expressionsgrad I) oder stark (Expressionsgrad II) exprimiert wurde (Abb. 4.11 B). Eine schwache (Über)expression bzw. ektopische Expression von EDC4 fand sich in Zellen, die ein ubiquitäres zytoplasmatisches Grünsignal aber noch deutlich leuchtende *P-body* Foci sowohl im Grünkanal als auch in der DCP1a-Färbung im Rotkanal aufwiesen. Dagegen war eine starke Überexpression von EDC4 durch ein hohes Grünsignal und das Fehlen von *P-body* Foci im Grün- und Rotkanal gekennzeichnet. Im Unterschied zur Transfektion des GFP-C1-LV zeigte sich hier in den Leervektor-transfizierten Zellen optisch keine Farbabstufung im Vergleich zu den parentalen Zellen, sodass nicht zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen unterschieden werden konnte. Daher wurde die *P-body*-Anzahl pro Zelle in diesem Kanal in allen Zellen ermittelt. Die zugehörigen IF-Kontrollen befinden sich im Anhang (Abb. 11.4).

Bei starker Überexpression von EDC4 zeigte sich somit eine starke Reduktion der *P-body*-Anzahl pro Zelle auf einen Median von 0 *P-bodies* pro Zelle, da sich auch für DCP1a keine mikroskopisch sichtbaren Aggregationen ausfindig machen ließen. Bei schwacher Überexpression von EDC4 kolokalisierten *P-body*-ähnliche Aggregationen von λ N-HA-EDC4 mit Aggregationen von DCP1a, sodass die *P-body*-Anzahl mit einem Median von 22 *P-bodies* pro Zelle mit den parentalen Zellen (Median: 24 *P-bodies* pro Zelle) vergleichbar war. Die Leervektor-transfizierten Kontrollzellen zeigten währenddessen im Vergleich zu den parentalen Zellen eine leichte Zunahme der *P-body*-Anzahl pro Zelle auf einen Median von 27 *P-bodies* pro Zelle. Somit konnte in hTERT-RPE1-Zellen bei starker Überexpression von EDC4 eine Auflösung der *P-bodies* beobachtet werden.

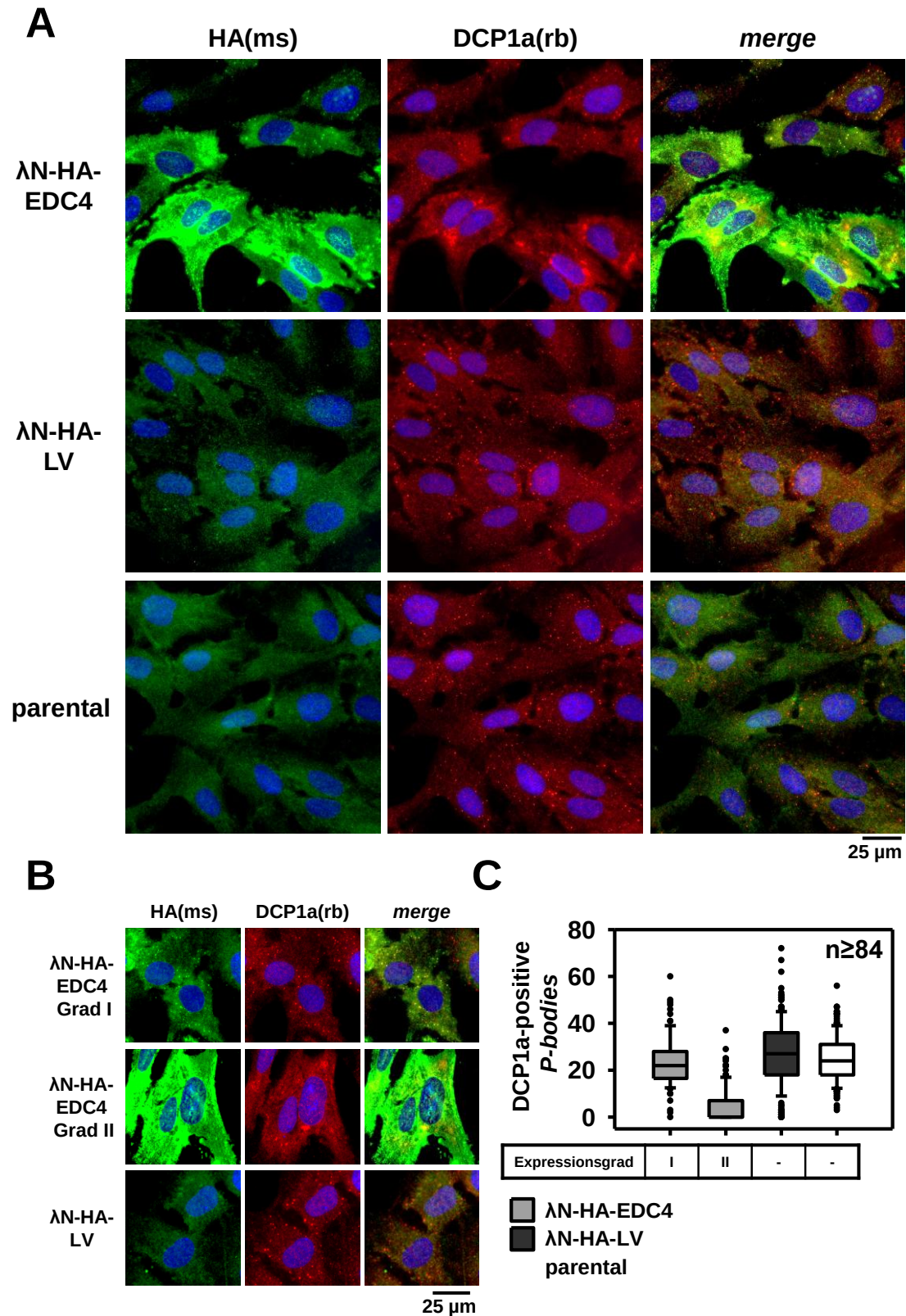


Abb. 4.11: *P*-body-Assemblierung nach Überexpression von EDC4. A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag mit λ N-HA-EDC4 (pCneo- λ N-HA-EDC4) oder dem Kontrollvektor (pCneo- λ N-HA-LV) mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert. Nach 5-stündiger Kultivierung wurde das Transfektionsmedium entfernt und ein Glycerolschock durchgeführt. Nach weiterer Kultivierung für 20-24 h erfolgte nach Fixierung der Zellen für 5 min bei Raumtemperatur eine Immunfärbung von DCP1a und HA. Verwendet wurden als Primärantikörper Anti-DCP1(rb) der Firma Abcam, #ab47811 (markiert mit Sekundärantikörper Cy3) und Anti-HA(ms) der Firma Roche, #1583816001 (markiert mit Sekundärantikörper DL 488). Der Zellkern wurde mittels

Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation (Abb. 11.4). Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. Die Anzahl an *P-bodies* pro Zelle wurde mittels 4x4-Pixel-Rasters anhand der *merges* von λ N-HA-EDC4 und DCP1a ermittelt (vgl. 3.5.1). **B:** Übersichtliche Darstellung der provisorisch ermittelten unterschiedlichen Expressionsgrade (I und II) anhand der Intensität der HA-Färbung. **C:** Darstellung der absoluten Anzahlen an *P-bodies* pro Zelle als *box plot* in zwei voneinander unabhängigen Experimenten und einer Gesamtzellpopulation von mindestens 84 Zellen pro Bedingung ($n \geq 84$).

4.6 Funktionsanalyse von *P-bodies* anhand eines siRNA-vermittelten *knockdowns* ausgewählter *P-body*-Proteine in hTERT-RPE1-Zellen

Zur detaillierten Analyse der Funktion ausgewählter *P-body*-Proteine sollte ein *knockdown* der Exoribonuklease XRN1 und des *scaffolding*-Proteins EDC4 etabliert und die *P-body*-Aggregation und -Zusammensetzung untersucht werden. Da hTERT-RPE1-Zellen aufgrund der Transfektion von pGRN145 nicht nur hTERT-immortalisiert, sondern auch Puromycin-resistent sind, war eine Puromycin-Selektion nicht möglich (Katoh et al., 2017; unveröffentlichte Daten der AG Kracht). Daher wurde ein transienter siRNA-vermittelter *knockdown* mit Hilfe des HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen durchgeführt, mit dem auch in nicht-selektierbaren Zellen ein starker *knockdown* erzielt werden kann (vgl. 3.1.5). Um den Einfluss des Transfektionsvorgangs auf die Zellen zu berücksichtigen, wurden die Zellen mit siRNAs transfiziert, die keine Ziel-mRNA in der Zelle findet. Dabei handelte es sich in dieser Arbeit um die mRNA des Enzyms Luciferase. Dies ist ein Enzym, das in Gegenwart von Sauerstoff die Oxidation von Luciferin katalysiert, bei der eine Biolumineszenz entsteht (Greer & Szalay, 2002). Dieses Enzym befindet sich unter anderem in Glühwürmchen und nicht in menschlichen Zellen, sodass es als Kontrolle geeignet war (Greer & Szalay, 2002).

4.6.1 Funktioneller *knockdown* von XRN1

In der AG Kracht haben Experimente in HeLa-Zellen mit stabiler XRN1-Depletion eine Reduktion der *P-body*-Anzahl und eine Größenzunahme der einzelnen *P-bodies* im Vergleich zu den Kontrollzellen gezeigt (Tenekeci, 2018). Des Weiteren konnte eine Stabilisierung von *IL8*- und *NFKBIA*-Transkripten und eine selektive Lokalisierung von *NFKBIA*-Transkripten in *P-bodies* beobachtet werden (Tenekeci, 2018). In Analogie dazu sollte im Folgenden die *P-body*-Assemblierung, die relative Lokalisation von Transkripten zu *P-bodies* und der Einfluss auf die *IL-1 α* -abhängige Genexpression von *IL8* und *NFKBIA* bei transientem siRNA-vermitteltem XRN1-*knockdown* in hTERT-RPE1-Zellen als primäre diploide Zelllinie untersucht werden. Der Umstand, dass die Zellen nach Transfektion nicht mit Hilfe von Puromycin zu selektieren waren, machte

es zunächst nötig, geeignete Transfektionsbedingungen ausfindig zu machen, unter denen ein möglichst starker *knockdown* von XRN1 erzielt werden konnte, der sowohl im Immunoblot als auch in der Immunfluoreszenz-Analyse, unabhängig von einem möglichen Phänotyp, detektierbar sein sollte.

4.6.1.1 Etablierung eines transienten *knockdowns* von XRN1 in hTERT-RPE1-Zellen mittels Transfektion von siRNAs

Um einen transienten siRNA-vermittelten *knockdown* von XRN1 in hTERT-RPE1-Zellen zu etablieren, wurden die Zellen zunächst in 60 mm Zellkutschalen transfiziert und der XRN1-*knockdown* in der Gesamtzellpopulation anhand eines Western Blots quantifiziert. Dafür wurden zwei verschiedene siRNAs gegen XRN1-mRNA der Firma Qiagen getestet (siXRN1 I und siXRN1 II), die in verschiedene Stellen der mRNA interferierten. Diese beiden siRNAs wurden einzeln und als Gemisch (*pool*) transfiziert. Dafür erfolgte die Transfektion von 50 nM siRNAs mit anschließender 48-stündiger Inkubation. Diese Versuchsbedingungen wurden nach Angaben des Herstellers und Daten aus der AG Kracht ausgewählt. Als experimentelle Kontrolle dienten Zellen, die mit siRNAs gegen *Luciferase*-mRNA (siLuciferase) transfiziert wurden. Eine weitere Kontrolle in diesem Experiment stellte eine Probe dar, bei der der Transfektionsvorgang lediglich mit serumfreiem Medium und HiPerFect-Transfektionsreagenz ohne siRNAs vollzogen wurde (HiPerFect). Für die Quantifizierung der relativen Proteinmenge von XRN1 mittels Image Lab-Software wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen β -Aktin-Menge auf die siLuciferase transfizierte Probe normiert (Abb. 4.12).

Alle drei Proben, die mit siRNAs gegen XRN1-mRNA transfiziert wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrolle (siLuciferase) eine deutliche Reduktion der Proteinmenge von XRN1. Die Probe, die mit beiden siRNAs gegen XRN1-mRNA als *pool* transfiziert wurde, zeigte in der relativen Quantifizierung mit einer Restproteinmenge von 11 % den stärksten *knockdown* (Restproteinmenge siXRN1 I: 24 %; Restproteinmenge siXRN1 II: 18 %). Daher wurde in den folgenden Experimenten ausschließlich der *pool* der beiden siXRN1 (siXRN1*Pool*) verwendet. Wider Erwarten war durch das Transfektionsreagenz im Vergleich zur siLuciferase-transfizierten Probe ein Anstieg der XRN1-Proteinmenge auf 128 % zu beobachten. Die Proteinspiegel von EDC4 und DCP1a schienen durch den *knockdown* von XRN1 im Vergleich zur Kontrolle minimal zu sinken. β -Aktin war als Beladungskontrolle konstant.

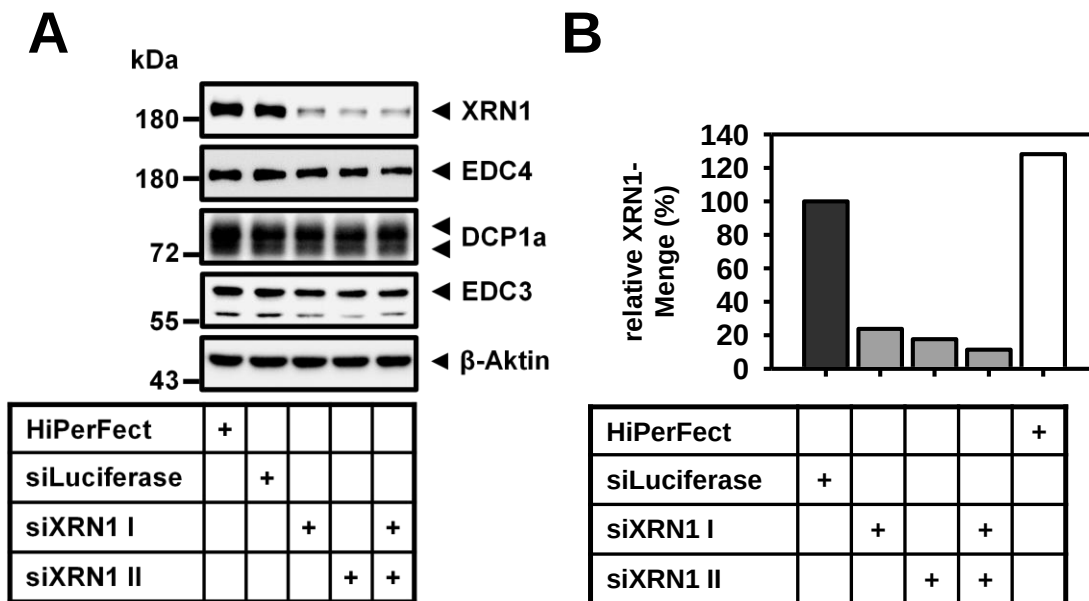


Abb. 4.12: Knockdown von XRN1 mittels Transfektion von siRNAs [50 nM] in hTERT-RPE1-Zellen. A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen geerntet. Die Proteine wurden als Ganzzellextrakt isoliert, elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Je Probe wurden 30 µg Protein aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin. **B:** Quantitative Darstellung der relativen XRN1-Proteinmenge normiert auf die siLuciferase-transfizierte Probe.

In einer Wiederholung dieses Experiments (Abb. 11.5) konnte der XRN1-*knockdown* mit dem *pool* der beiden siRNAs gegen XRN1-mRNA in der Gesamtpopulation schwächer nachgewiesen werden, woraus sich eine 38 %-ige Restproteinexpression ergab. Der beobachtete Anstieg der XRN1-Proteinmenge durch das Transfektionsreagenz wurde nicht mehr beobachtet. Des Weiteren schien auch in diesem Experiment die Depletion von XRN1 die Proteinmengen von DCP1a und EDC4 leicht zu reduzieren.

Da sich in Bezug auf die *knockdown*-Effizienz von XRN1 quantitative Unterschiede in den beiden Experimenten ergeben hatten, sollte in einem weiteren Experiment herausgefunden werden, ob die gewählten Transfektionsbedingungen generell für einen siRNA-vermittelten XRN1-*knockdown* optimal waren. Dafür wurde die Transfektion von siXRN1*Pool* in den hTERT-RPE1-Zellen zusätzlich im Vergleich zu gut transfizierbaren HeLa-Zellen durchgeführt (Tenekeci, 2018), wobei mittels Image Lab-Software die Quantifizierung der relativen Proteinmenge von XRN1 unter Berücksichtigung der jeweiligen β-Aktin-Menge vorgenommen und auf die zelltypspezifische siLuciferase-transfizierte Probe normiert wurde (Abb. 4.13).

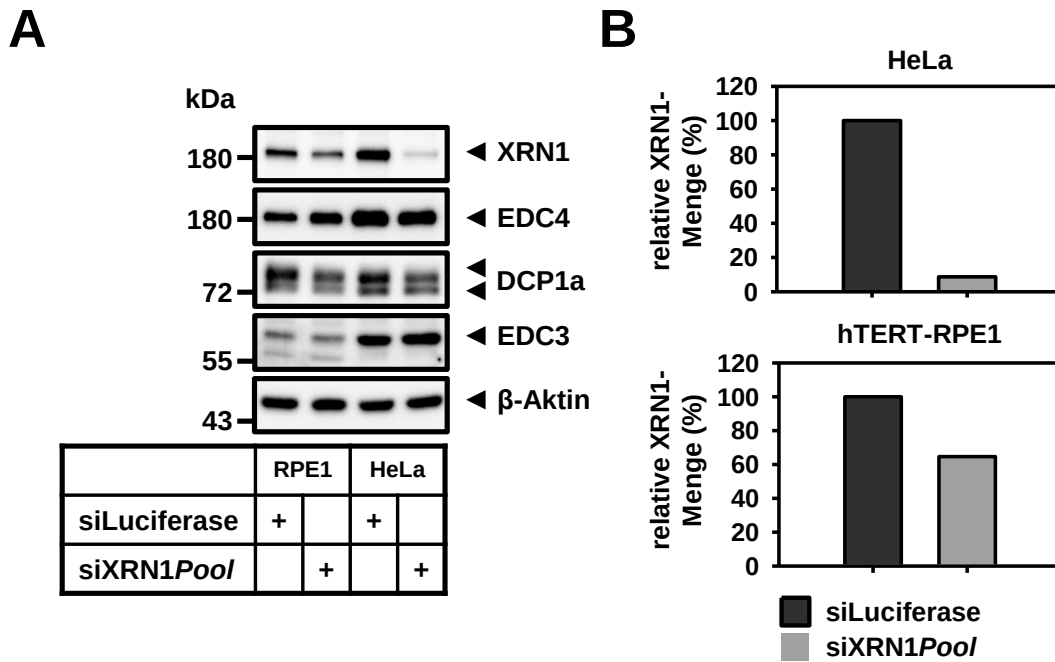


Abb. 4.13: Vergleich der *knockdown*-Effizienz von XRN1 mittels Transfektion von siRNAs [50 nM] in hTERT-RPE1- und HeLa-Zellen. **A:** hTERT-RPE1- und HeLa-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 48-stündiger Kultivierung im Inkubator wurden die Zellen geerntet. Die Proteine wurden mittels Speziallyse aufgereinigt, elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Je Probe wurden 30 µg Protein aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin. **B:** Quantitative Darstellung der relativen XRN1-Proteinmenge normiert auf die zelltypspezifische siLuciferase-transfizierte Probe.

Unter gleichen Transfektionsbedingungen ließ sich in HeLa-Zellen erwartungsgemäß ein starker XRN1-*knockdown* mit lediglich 9 % Restprotein feststellen, während der *knockdown* in hTERT-RPE1-Zellen mit 62 % Restprotein in diesem Experiment vergleichsweise schwach erschien. Des Weiteren ließen sich in hTERT-RPE1-Zellen wie in Abb. 4.2 B erneut reduzierte Proteinspiegel der *P-body*-Proteine EDC4, EDC3, DCP1a und XRN1 im Vergleich zu HeLa-Zellen beobachten. Speziell in diesem Experiment schienen in siXRN1Pool-transfizierten hTERT-RPE1-Zellen die Proteinspiegel von EDC4 im Gegensatz zum Vorexperiment zu steigen. Aufgrund der experimentell abhängigen minimalen Schwankungen wurde insgesamt kein Einfluss des XRN1-*knockdowns* auf die Proteinspiegel von EDC3, EDC4 und DCP1a angenommen. Aufgrund des Umstandes, dass sich hTERT-RPE1-Zellen generell schlecht transfizieren ließen (vgl. 4.5.1) und unter den gewählten Transfektionsbedingungen prinzipiell ein deutlicher XRN1-*knockdown* erreicht werden konnte, wurde der siRNA-vermittelte XRN1-*knockdown* in hTERT-RPE1-Zellen als annehmbar, jedoch variabel eingestuft. Da die Western Blot-Experimente zur *knockdown*-Effizienz ohne Selektion durchgeführt wurden, konnte nicht unterschieden werden, ob bei Vorliegen eines

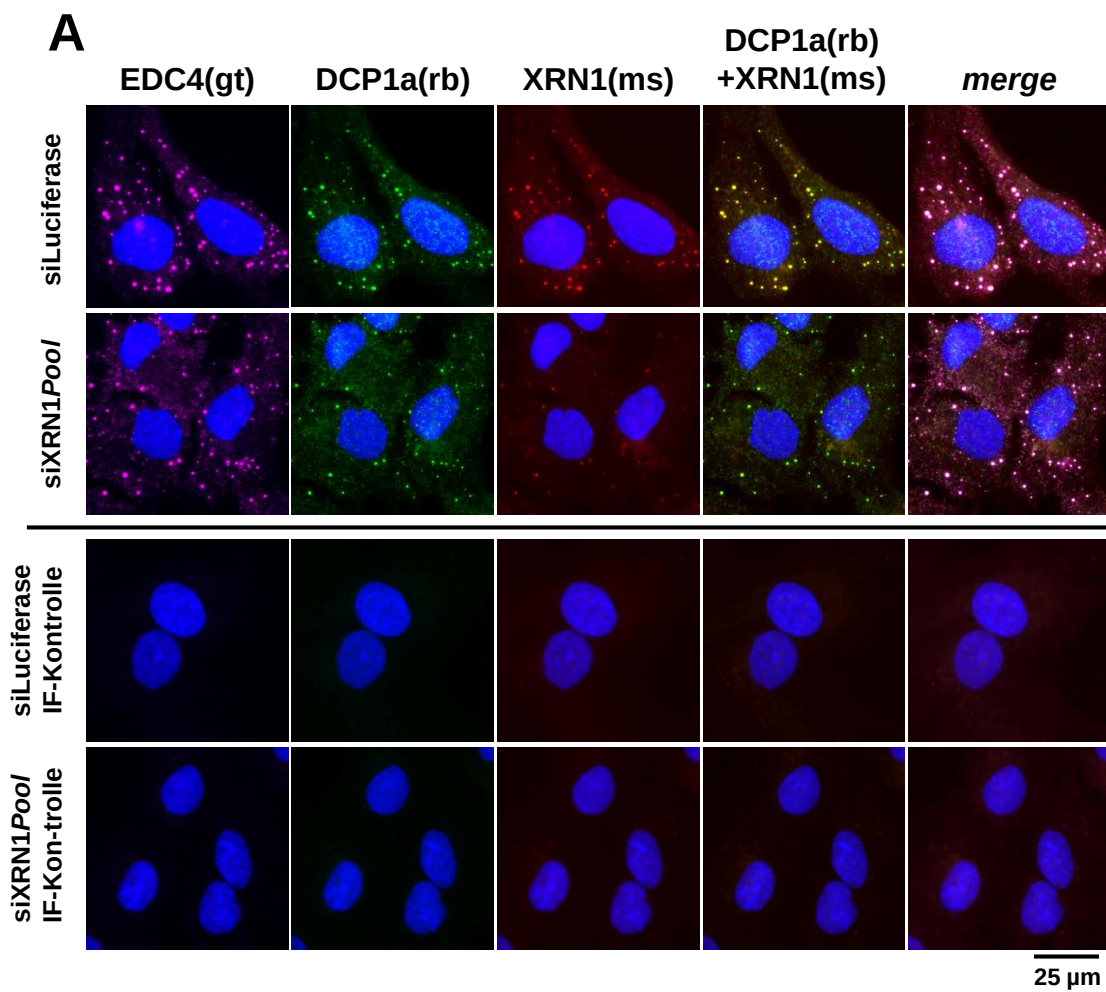
schlechten *knockdowns* die gesamte Zellpopulation eine gleichmäßig geringe Abnahme der XRN1-Proteinmenge zeigte, oder ob es sich um einen heterogenen *knockdown* mit einer stärkeren Reduktion der XRN1-Menge in einzelnen Zellen handelte. Daher wurden die gewählten Transfektionsbedingungen für eine genauere Einzelzellanalyse zur *P-body*-Assemblierung und IL-1 α -abhängigen Genexpression verwendet.

4.6.1.2 Einfluss der XRN1-Proteinmenge auf die *P-body*-Assemblierung

Die *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen wurde nach XRN1-Depletion unter Verwendung einer indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Dafür wurden die Zellen wie in 4.6.1.1 mit 50 nM siRNAs transfiziert und für 48 Stunden kultiviert. Verwendet wurde der *pool* der beiden siRNAs gegen *XRN1*-mRNA und siLuciferase als Kontrolle. Als weitere Kontrolle dienten parentale hTERT-RPE1-Zellen. Wie in 4.2.2 wurden EDC4, DCP1a und XRN1 als *P-body*-Proteine angefärbt und die *P-body*-Anzahl pro Zelle anhand des *merges* von EDC4, DCP1a und XRN1 manuell mittels 4x4-Pixel-Rasters (vgl. 3.5.1) ermittelt (Abb. 4.14). Weiterhin wurden unter Verwendung des *Mann-Whitney rank sum tests* die Daten der siLuciferase-transfizierten Zellpopulation paarweise gegen die der parentalen und siXRN1*Pool*-transfizierten Zellen bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet.

Es ließ sich wie erwartet eine Reduktion der Färbeintensität des XRN1-Proteins in den siXRN1*Pool*-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachten, wobei das Fluoreszenzsignal im Zytoplasma und in den einzelnen spezifischen *P-body*-Signalen nicht vollständig verschwand. Somit zeigte der *merge* von DCP1a in grün und XRN1 in rot keine Gelbfärbung, wie es in den Kontrollzellen zu beobachten war, sondern eher eine Grünfärbung. Es ist jedoch anzumerken, dass zwar der Hauptteil der siXRN1*Pool*-transfizierten Zellpopulation diese Grünfärbung aufwies, jedoch ließen sich auch Zellen mit einer deutlichen Gelbfärbung detektieren. Demzufolge wurde in der siXRN1*Pool*-transfizierten Zellpopulation optisch zwischen Zellen mit einem XRN1-*knockdown*, die im *merge* von DCP1a und XRN1 grün erschienen, und Zellen mit keinem bzw. einem schwachen XRN1-*knockdown*, die im *merge* von DCP1a und XRN1 gelb erschienen, unterschieden. Die manuelle Quantifizierung der *P-body*-Anzahl pro Zelle zeigte durch Depletion von XRN1 eine signifikante Reduktion (Median: 16 *P-bodies* pro Zelle) im Vergleich zu den siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen (Median: 23 *P-bodies* pro Zelle). Der *Mann-Whitney rank sum test* ergab keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die *P-body*-Anzahl pro Zelle in den

siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen und den parentalen Zellen (Median: 21 *P-bodies* pro Zelle). Daraus lässt sich schließen, dass die *P-body*-Anzahl nicht großartig durch den Transfektionsstress beeinflusst wurde. Es kommt hinzu, dass sich die *P-body*-Anzahl der siXRN1*Pool*-transfizierten Zellpopulation, die optisch keine Reduktion der Färbeintensität des XRN1-Proteins zeigte (Median: 23 *P-bodies* pro Zelle), nicht-signifikant von den siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen unterschieden. Daraus lässt sich folgern, dass die Auswertungsstrategie, die den *knockdown* anhand des *merges* von DCP1a und XRN1 identifiziert, verwendbar war.



B

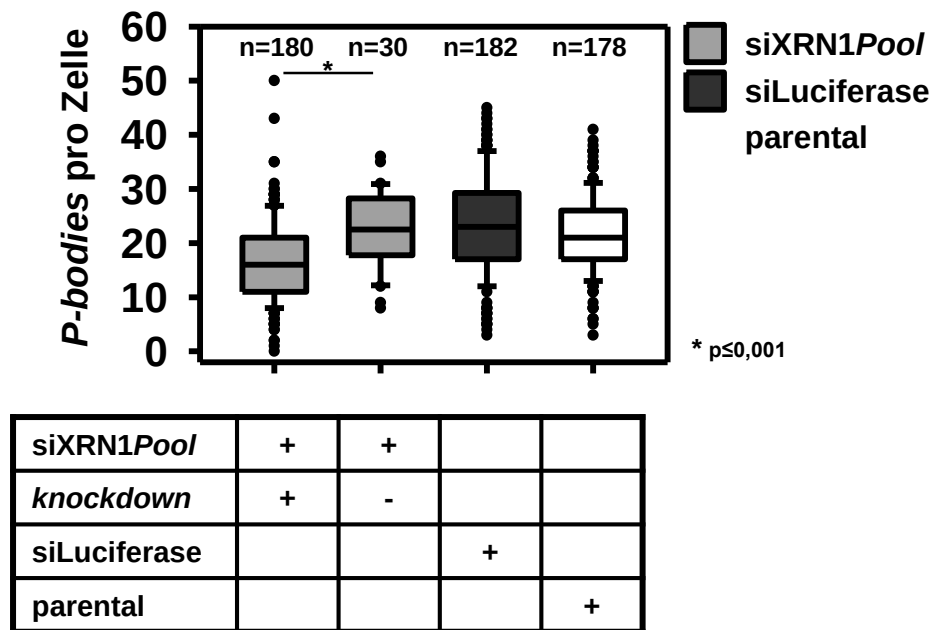


Abb. 4.14: P-body-Assemblierung nach transientem XRN1-knockdown in hTERT-RPE1-Zellen. A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur fixiert und eine Immunfärbung von DCP1a, EDC4 und XRN1 durchgeführt. Verwendet wurden als Primärantikörper Anti-DCP1a(rb) der Firma Abcam, #ab47811 (markiert mit Sekundärantikörper Dylight 488), Anti-EDC4(gt) der Firma Santa Cruz, #sc-17444 (markiert mit Sekundärantikörper Cy5) und Anti-XRN1(ms) der Firma Santa Cruz, #sc-165985 (markiert mit Sekundärantikörper Cy3). Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. Die Anzahl an P-bodies pro Zelle wurde mittels eines 4x4-Pixel-Rasters anhand der merges der drei P-body-Komponenten ermittelt (vgl. 3.5.1). Der XRN1-knockdown wurde anhand der DCP1a/XRN1-merges identifiziert. B: Darstellung der absoluten Anzahlen an P-bodies pro Zelle als box plot in zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mittels eines Mann-Whitney rank sum tests wurden die Daten der siLuciferase-transfizierten Zellpopulation paarweise gegen die der parental und der siXRN1Pool-transfizierten Zellen bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet.

4.6.1.3 Einfluss der XRN1-Proteinmenge auf die IL-1 α -abhängige Genexpression von IL8 und NFKBIA und relative Lokalisation von NFKBIA-mRNA zu EDC4

Die IL-1 α -abhängige Genexpression von IL8 und NFKBIA, eingeschlossen der subzellulären Lokalisation von NFKBIA und EDC4 als P-body-Protein, wurde nach siRNA-vermitteltem XRN1-knockdown unter Verwendung einer IF-FISH und Markierung von IL8- und NFKBIA-mRNA untersucht. Dafür wurden die Zellen nach 4.6.1.1 mit 50 nM siRNAs transfiziert, 48 Stunden kultiviert und im Anschluss für 1 und 3 Stunden mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert (-) gelassen. Verwendet wurde ebenfalls der pool der beiden siRNAs gegen XRN1-mRNA. Als Kontrolle dienten siLuciferase-transfizierte und parentale Zellen. Zur Identifizierung des XRN1-knockdowns wurde XRN1 und EDC4 angefärbt. EDC4 sollte dabei wie in 4.4.2 die Lokalisation der P-bodies abbilden (Abb. 4.15 A). Als XRN1-Antikörper

wurde wie in der indirekten Immunfluoreszenz der XRN1(ms)-Antikörper der Firma Santa Cruz verwendet. Die Anzahl an Transkripten pro Zelle wurde mittels Duolink-Software untersucht (Abb. 4.15 B). Die basalen *IL8*- und *NFKBIA*-mRNA-Mengen sind separat in Abbildung 4.15 C dargestellt. Die Anzahl an *P-bodies* pro Zelle (Abb. 4.15 E) und der prozentuale Anteil an Koloalationen von *NFKBIA*-mRNAs und *P-bodies* (Abb. 4.15 D) wurde wie in 4.4.2 mithilfe des 4x4-Pixel-Rasters (vgl. 3.5.1) ermittelt. Die zugehörigen IF-Kontrollen befinden sich im Anhang (Abb. 11.7).

Zunächst ließ sich beobachten, dass der XRN1-Antikörper in der IF-FISH eine eindeutige aber weniger ausgeprägte Farbintensität zeigte als in der alleinigen indirekten Immunfluoreszenz (vgl. Abb. 4.2 A). Die spezifischen *P-body*-Signale erschienen in den Kontrollzelllinien kleiner, waren jedoch trotzdem gut von der diffusen Zytoplasmafärbung abzugrenzen. Die siXRN1*Pool*-transfizierte Zellpopulation zeigte in einem Teil der Zellen eine komplette Depletion von *P-body*-Signalen und eine Färbeintensität des Zytoplasmas ähnlich der IF-Kontrolle. Dieser Umstand ermöglichte es, auch in der IF-FISH eine Selektion der Zellen mit vorhandenem XRN1-*knockdown* vorzunehmen, die in diesem Fall anhand der XRN1-Färbung durchgeführt wurde. In den folgenden Experimenten wurden daher nur die siXRN1*Pool*-transfizierten Zellen, die optisch eine XRN1-Depletion zeigten, berücksichtigt (siXRN1*Pool*(XRN1-KD)).

Für *IL8* zeigte sich bei Depletion von XRN1 (Median: 2 Transkripte pro Zelle) und in den beiden Kontrollzelllinien (Mediane: siLuciferase: 2 Transkripte pro Zelle, parental: 1 Transkript pro Zelle) wie in 4.3.2 ein niedriger basaler Transkriptspiegel. Im XRN1-*knockdown* fielen jedoch mehr Ausreißer nach oben auf, sodass der Mittelwert (MW: 12,7 Transkripte pro Zelle) deutlich über dem der Kontrollzelllinien (MW: siLuciferase: 7,3 Transkripte pro Zelle; parental: 5,5 Transkripte pro Zelle) lag (Mittelwerte nicht dargestellt). Der Vergleich der Mittelwerte zeigte somit eine 1,7-fache Induktion der basalen *IL8*-Menge durch den *knockdown* in Bezug auf die siLuciferase-transfizierte Zellpopulation. An dieser Stelle wurde ein *Mann-Whitney rank sum test* durchgeführt, mittels dessen die Daten der siLuciferase-transfizierten Zellpopulation paarweise gegen die der parental Zellen und Zellen mit XRN1-*knockdown* bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet wurden. Dieser gab die Induktion der basalen *IL8*-Menge durch den XRN1-*knockdown* im Vergleich zu den siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen als signifikant ($p=0,039$) an. Nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation zeigte sich erwartungsgemäß eine starke Induktion der IL-1 α -abhängigen

Genexpression in allen drei Zelllinien mit einem starken Anstieg des *IL8*-Transkriptspiegels (Mediane: siXRN1Pool(XRN1-KD): 340 Transkripte pro Zelle; siLuciferase: 324 Transkripte pro Zelle; parental: 311 Transkripte pro Zelle), während nach 3 Stunden IL-1 α -Inkubation aufgrund der heterogenen Verteilung der Transkripte in den Zellpopulationen erwartet große Boxen im *box plot* zu beobachten waren. Allerdings sanken in allen drei Zellpopulationen die Mediane (Mediane: siXRN1Pool(XRN1-KD): 380 Transkripte pro Zelle; siLuciferase: 364 Transkripte pro Zelle; parental: 318 Transkript pro Zelle) im Vergleich zu den Medianen bei 1 Stunde IL-1 α -Inkubation nicht ab, sondern blieben eher auf gleichem Niveau, sodass die Boxen im Vergleich zu 4.3.2 etwas nach oben verschoben waren.

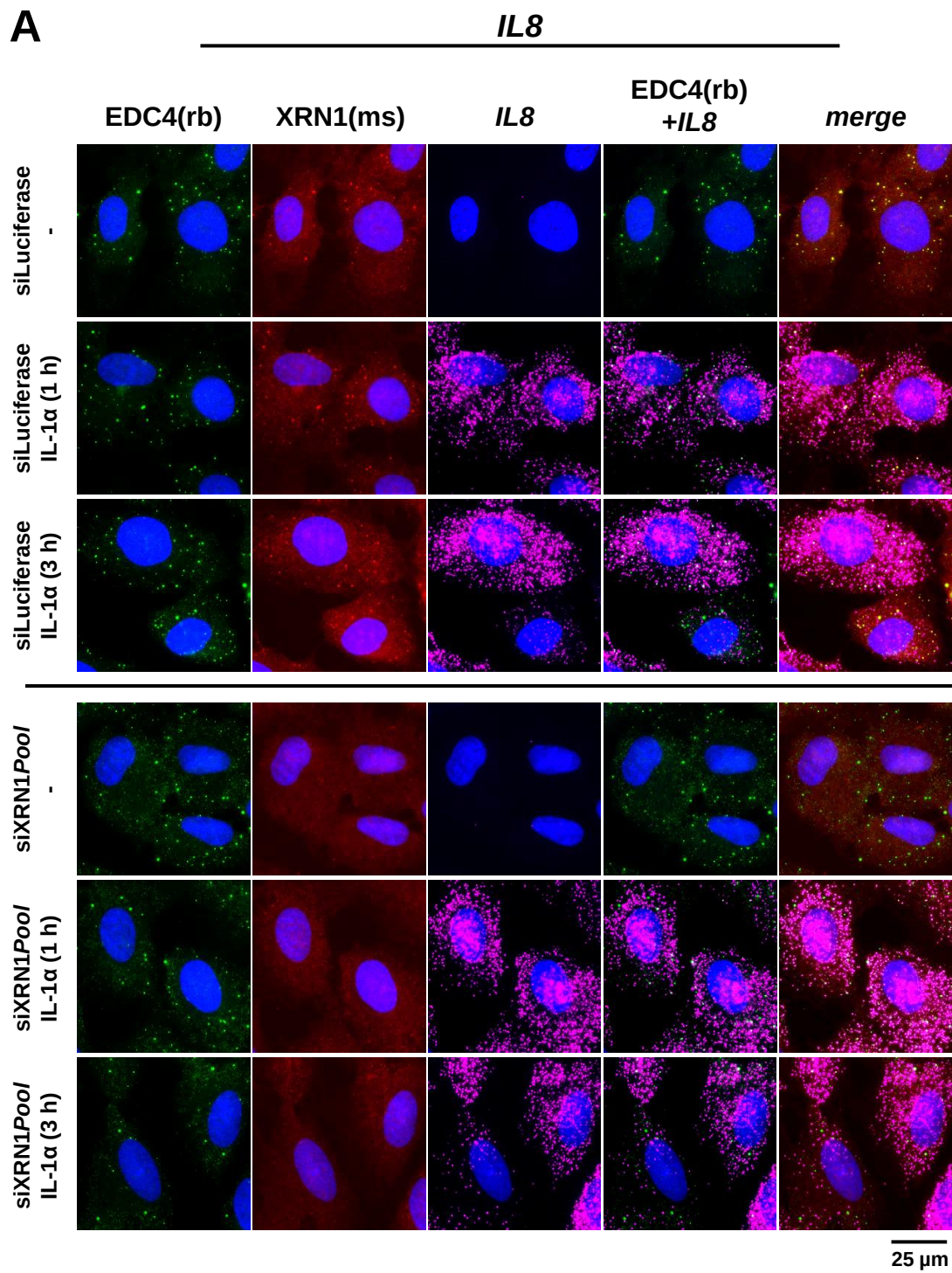
Für *NFKBIA* zeigte sich im XRN1-*knockdown* (Median: 46 Transkripte pro Zelle) ein höherer basaler Transkriptspiegel als in den beiden Kontrollzelllinien (Median: siLuciferase: 24 Transkripte pro Zelle; parental: 24 Transkripte pro Zelle). Der *Mann-Whitney rank sum test* konnte die 1,8-fache Erhöhung des basalen *NFKBIA*-Transkriptmenge im XRN1-*knockdown* im Vergleich zu den Kontrollzelllinien als signifikanten Unterschied angeben. Für *NFKBIA* ließen sich wie für *IL8* nach IL-1 α -Stimulation zwischen den drei Zellpopulationen keine deutlichen Unterschiede feststellen. Nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation stiegen die Transkriptgehalte in allen drei Zelllinien stark an (Mediane: siXRN1Pool(XRN1-KD): 281 Transkripte pro Zelle; siLuciferase: 266 Transkripte pro Zelle; parental: 291 Transkripte pro Zelle) und sanken nach 3 Stunden erwartungsgemäß schnell wieder ab (Mediane: siXRN1Pool(XRN1-KD): 120 Transkripte pro Zelle; siLuciferase: 112 Transkripte pro Zelle; parental: 99 Transkripte pro Zelle).

Die starken Anteile an Kolokalisationen von *NFKBIA*-mRNAs und *P-bodies*, die in HeLa-Zellen beobachtet wurden, konnten in hTERT-RPE1-Zellen mit XRN1-*knockdown* nicht reproduziert werden (Tenekeci, 2018). Der Anteil an Kolokalisationen von *NFKBIA*-mRNAs und *P-bodies* lag basal mit 12 % im XRN1-*knockdown* jedoch trotzdem doppelt so hoch wie in den siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen mit 6 %. IL-1 α -induziert zeigten sich keine weiteren Unterschiede. Nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation lag der Anteil an Kolokalisationen von *NFKBIA*-mRNAs und *P-bodies* im *knockdown* bei 32 % und in den Kontrollzellen bei 30 %, während er nach 3 Stunden im *knockdown* bei 25 % und in den Kontrollzellen bei 24 % lag.

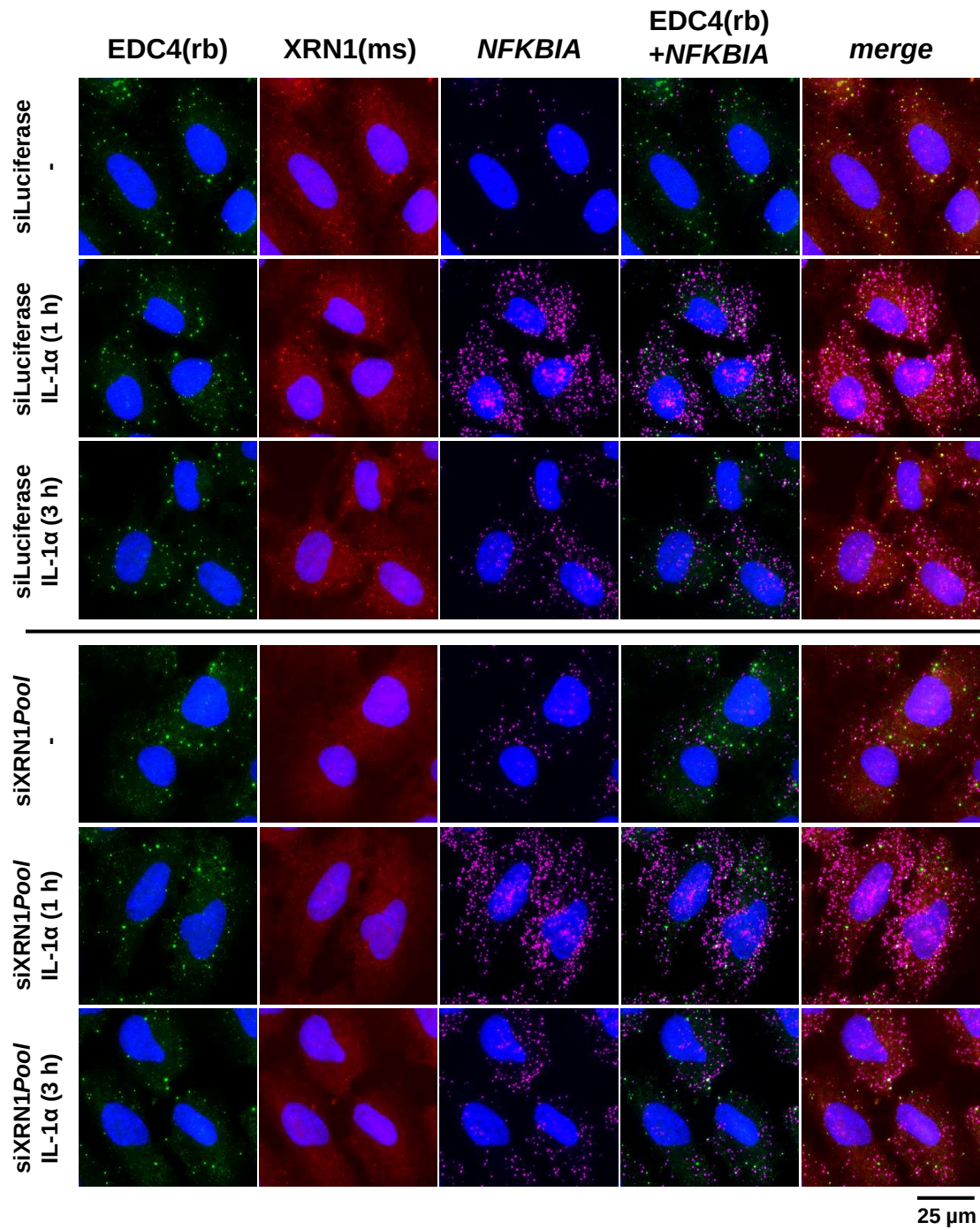
Des Weiteren ließ sich bei Depletion von XRN1 wie in 4.6.1.2 eine IL-1 α -unabhängige Reduktion der *P-body*-Anzahl pro Zelle beobachten. Der Median im XRN1-*knockdown* lag IL-1 α -unabhängig bei 13 bis 14 *P-bodies* pro Zelle und in den siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen bei 22 *P-bodies* pro Zelle.

Zusammenfassend konnte also in der IF-FISH durch den transienten XRN1-*knockdown* in hTERT-RPE1-Zellen eine Induktion der *NFKBIA*-mRNA-Menge und schwächer auch der *IL8*-mRNA-Menge im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden, während dies für die IL-1 α -induzierten Transkriptspiegel nicht zutraf. In einer einmalig durchgeführten RTqPCR in hTERT-RPE1-Zellen konnten diese Effekte ohne Selektion auch auf Gesamtzellebene nachgewiesen werden (Abb. 11.6). Der korrespondierende Western Blot ist in Abb 4.13 (*lane* 1 und 2) dargestellt und zeigt mit einer XRN1-Restproteinmenge von 62 % zwar einen recht schwachen *knockdown*, dennoch ließ sich basal eine 2,0-fach erhöhte *IL8*-mRNA-Menge und eine 1,4-fach erhöhte *NFKBIA*-mRNA-Menge im Vergleich zu den siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen nachweisen. Somit könnten die erhöhten basalen Transkriptspiegel IL-1 α -abhängiger Gene auf eine mRNA-Stabilisierung durch Depletion von XRN1 hinweisen.

A



NFKBIA



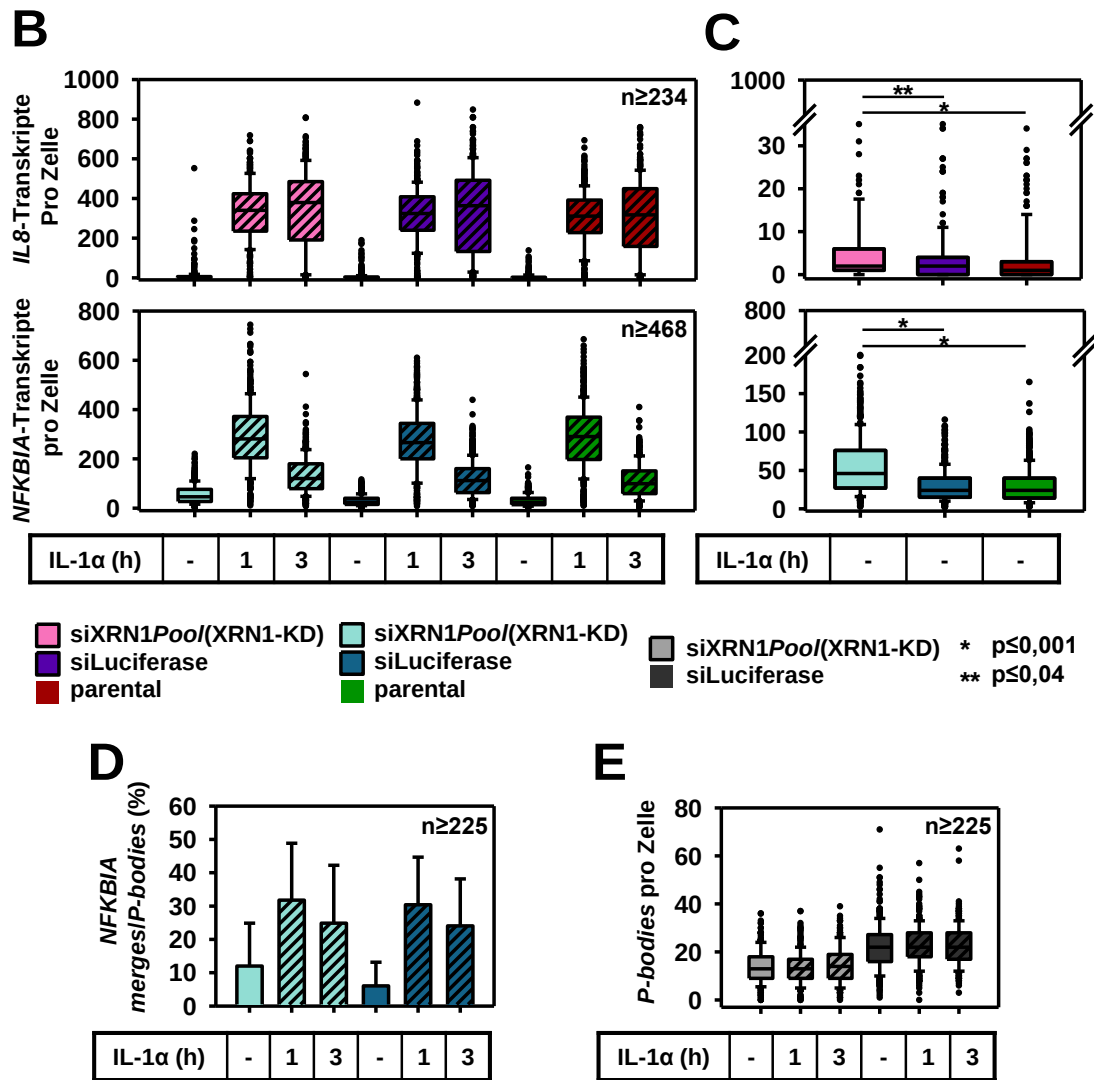


Abb. 4.15: Veränderung der Genexpression von *IL8* und *NFKBIA* und subzelluläre Lokalisation von *NFKBIA*-mRNA zu EDC4 nach transientem *XRN1*-knockdown in hTERT-RPE1-Zellen. A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen für 1 h und 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert (-) gelassen. Daraufhin wurden sie über Nacht bei 4°C fixiert und eine IF-FISH mit Markierung von *IL8*- und *NFKBIA*-mRNA und eine Immunfärbung von EDC4 und XRN1 durchgeführt. Verwendet wurden dafür genspezifische Sonden und das Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit der Firma Affymetrix. Als Primärantikörper wurde Anti-EDC4(rb) der Firma Cell Signaling, #2548S (markiert mit Sekundärantikörper Dylight 488) und Anti-XRN1(ms) der Firma Santa Cruz, #sc-165985 (markiert mit Sekundärantikörper Cy3) verwendet. Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation. Diese sind in Abb. 11.7 dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. Die Quantifizierung der Anzahl der Transkripte erfolgte mittels Duolink-Software. Die Anzahl an *P*-bodies pro Zelle und der Anteil an Kolo-kalisationen von Transkripten mit *P*-bodies pro Zelle wurde manuell mittels eines 4x4-Pixel-Rasters ermittelt (vgl. 3.5.1). Der XRN1-knockdown wurde anhand der XRN1-Färbung identifiziert (siXRN1Pool(XRN1-KD)). **B:** Quantitative Darstellung der Anzahl an Transkripten pro Zelle als box plot in 2-3 voneinander unabhängigen Experimenten und n≥234. **C:** Separate Darstellung der Anzahl an Transkripten pro Zelle als box plot im unstimulierten Zustand. Mittels Mann-Whitney rank sum test wurden die Daten der siLuciferase-transfizierten Zellpopulation paarweise gegen die parental und die siXRN1Pool-transfizierten Zellen bei einem Signifikanzniveau von p=0,05 getestet. **D:** Quantitative Darstellung der Mittelwerte ($\pm$ Standardabweichung) der Anteile an Kolo-kalisationen von *NFKBIA*-Transkripten und *P*-bodies pro Zelle (merges/*P*-bodies) in drei voneinander unabhängigen Experimenten und n≥225. **E:** Quantitative Darstellung der Anzahl an *P*-bodies pro Zelle als box plot in drei voneinander unabhängigen Experimenten und n≥225.

4.6.2 Funktioneller *knockdown* von EDC4

In dieser Arbeit konnte bereits bei starker Überexpression von EDC4 eine Auflösung der *P-bodies* in hTERT-RPE1-Zellen beobachtet werden, während weitere Versuche in der AG Kracht auch bei stabiler Depletion von EDC4 in HeLa-Zellen eine Auflösung der *P-body*-Assemblierung zeigten (Tenekeci, 2018). Des Weiteren konnte in dieser Zelllinie wie auch bei Depletion von XRN1 eine Stabilisierung von *IL8*- und *NFKBIA*-Transkripten festgestellt werden (Tenekeci, 2018). Im Folgenden sollte in hTERT-RPE1-Zellen analog zu 4.6.1 die *P-body*-Assemblierung und der Einfluss auf die IL-1 α -abhängige Genexpression von *IL8* und *NFKBIA* nach transientem siRNA-vermittelten EDC4-*knockdown* untersucht werden.

4.6.2.1 Etablierung eines transienten *knockdowns* von EDC4 in hTERT-RPE1-Zellen mittels Transfektion von siRNAs

Zur Etablierung eines geeigneten siRNA-vermittelten EDC4-*knockdowns* in hTERT-RPE1-Zellen wurde analog zu 4.6.1.1 der *knockdown* in der Gesamtzellpopulation anhand eines Western Blots analysiert. Als Transfektionsbedingungen wurden zunächst 50 nM siRNAs transfiziert und eine Inkubationsdauer von 48 Stunden gewählt. Es wurden auch hier zwei verschiedene siRNAs der Firma Qiagen einzeln (siEDC4 I und siEDC4 II) bzw. in Kombination (*pool*) gegen *EDC4*-mRNA getestet. Als experimentelle Kontrolle dienten Zellen, die mit siLuciferase transfiziert wurden. Für die Quantifizierung der relativen Proteinmenge von EDC4 mittels Image Lab-Software wurde unter Berücksichtigung der jeweiligen β -Aktin-Menge auf die siLuciferase transfizierte Probe normiert (Abb. 4.16).

Wider Erwarten zeigte sich sowohl durch Transfektion der einzelnen siRNAs gegen *EDC4*-mRNA als auch des *pools* eine nur geringe Abnahme des EDC4-Proteinspiegels (Restproteinmengen: *pool*: 75 %, siEDC4 I: 71 %, siEDC4 II: 72 %). β -Aktin als Beladungskontrolle war konstant. Somit schienen die gewählten Transfektionsbedingungen für den XRN1-*knockdown* geeignet, jedoch für einen EDC4-*knockdown* unzureichend zu sein.

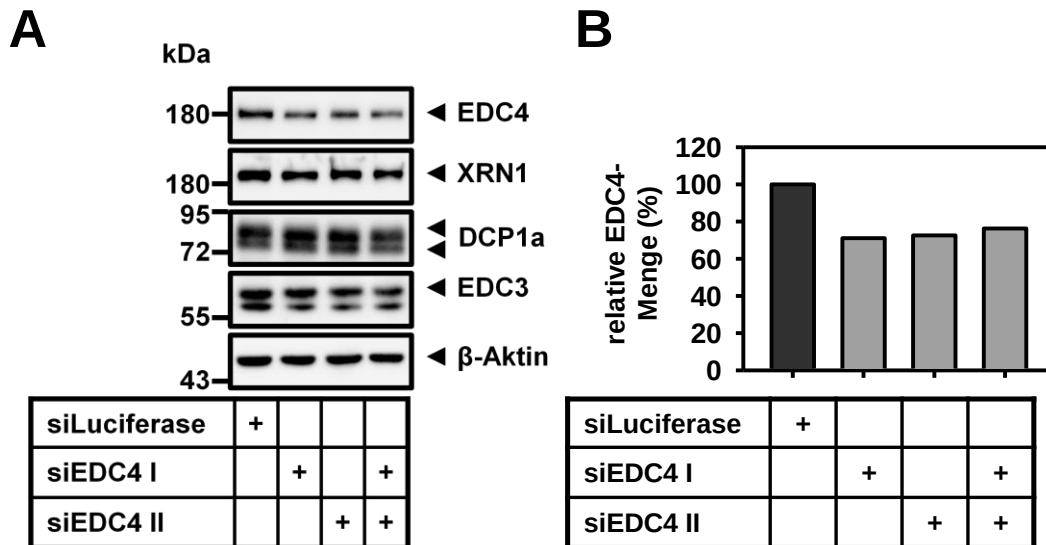


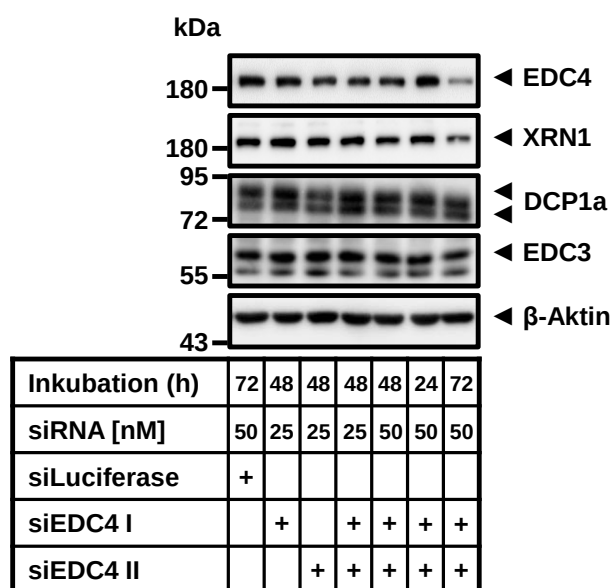
Abb. 4.16: Knockdown von EDC4 mittels Transfektion von siRNAs [50 nM] in hTERT-RPE1-Zellen. **A:** hTERT-RPE1-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 48-stündiger Kultivierung im Inkubator wurden die Zellen geerntet. Die Proteine wurden mittels Speziallyse aufgereinigt, elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Je Probe wurden 30 µg Protein aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin. **B:** Quantitative Darstellung der relativen EDC4-Proteinmenge normiert auf die siLuciferase-transfizierte Probe.

Daher mussten im nächsten Schritt die Transfektionsbedingungen verändert werden. Auf der einen Seite wurde mit 25 nM eine geringere Konzentration an zu transfizierenden siRNAs gewählt und auf der anderen Seite wurde die Kultivierungszeit nach Transfektion auf 24 Stunden verkürzt und auf 72 Stunden verlängert. Zum Vergleich des *knockdown*-Erfolges zum vorherigen Experiment wurden die Zellen außerdem mit 50 nM siRNAs transfiziert und für 48 Stunden kultiviert. Aufgrund der ähnlichen *knockdown*-Effizienzen der einzelnen siRNAs und dem *pool* wurden die Ansätze analog zu 4.6.1 auf den *pool* beschränkt. Als Kontrollzellpopulation wurden aus versuchstechnischen Gründen lediglich 50 nM siLuciferase transfiziert und die Zellen für 72 Stunden kultiviert (Abb. 4.17).

Zunächst ließ sich feststellen, dass auch in diesem Versuch nach Transfektion von 50 nM siEDC4*Pool* mit 48-stündiger Kultivierung kein suffizienter EDC4-*knockdown* resultierte (Restproteinmenge: 82 %). Eine Reduktion der siRNA-Konzentration auf 25 nM zeigte kaum eine Verbesserung des *knockdown*-Erfolgs (siEDC4*Pool* Restproteinmenge: 62 %), während eine Reduktion der Kultivierungszeit auf 24 Stunden ebenfalls zu keiner relevanten Verringerung der EDC4-Proteinmenge führte. Bei Transfektion von 50 nM siEDC4*Pool* und 72-stündiger Kultivierungszeit konnte jedoch eine akzeptable Depletion von EDC4 auf eine Restproteinmenge von

31 % erzielt werden, sodass die Analyse der *P-body*-Assemblierung und der IL-1 α -induzierten Genexpression unter diesen Transfektionsbedingungen umgesetzt werden konnte. Des Weiteren ließ sich durch die Depletion von EDC4 beobachten, dass der Proteinspiegel von XRN1 im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert wurde, während er für DCP1a und EDC3 unverändert erschien. β -Aktin als Beladungskontrolle war in diesem Experiment konstant. Eine Wiederholung dieses Experiments mit den hier gezeigten suffizienten Transfektionsbedingungen befindet sich im Anhang (Abb. 11.9) .

A



B

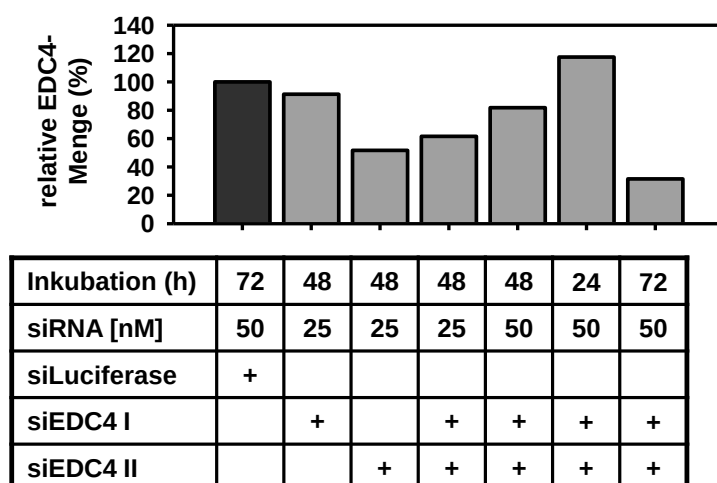
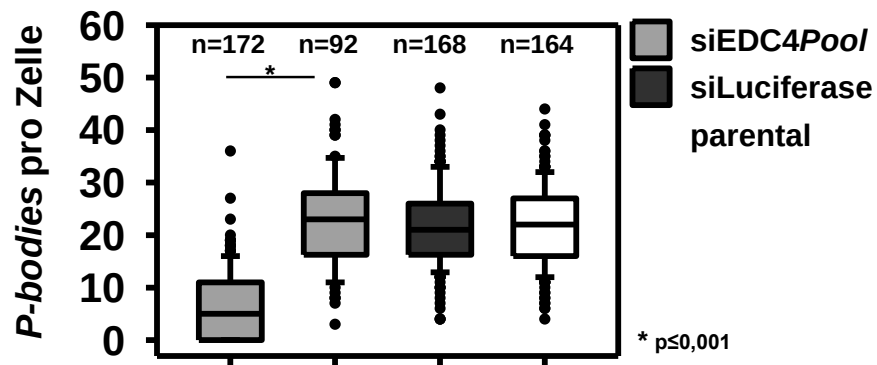
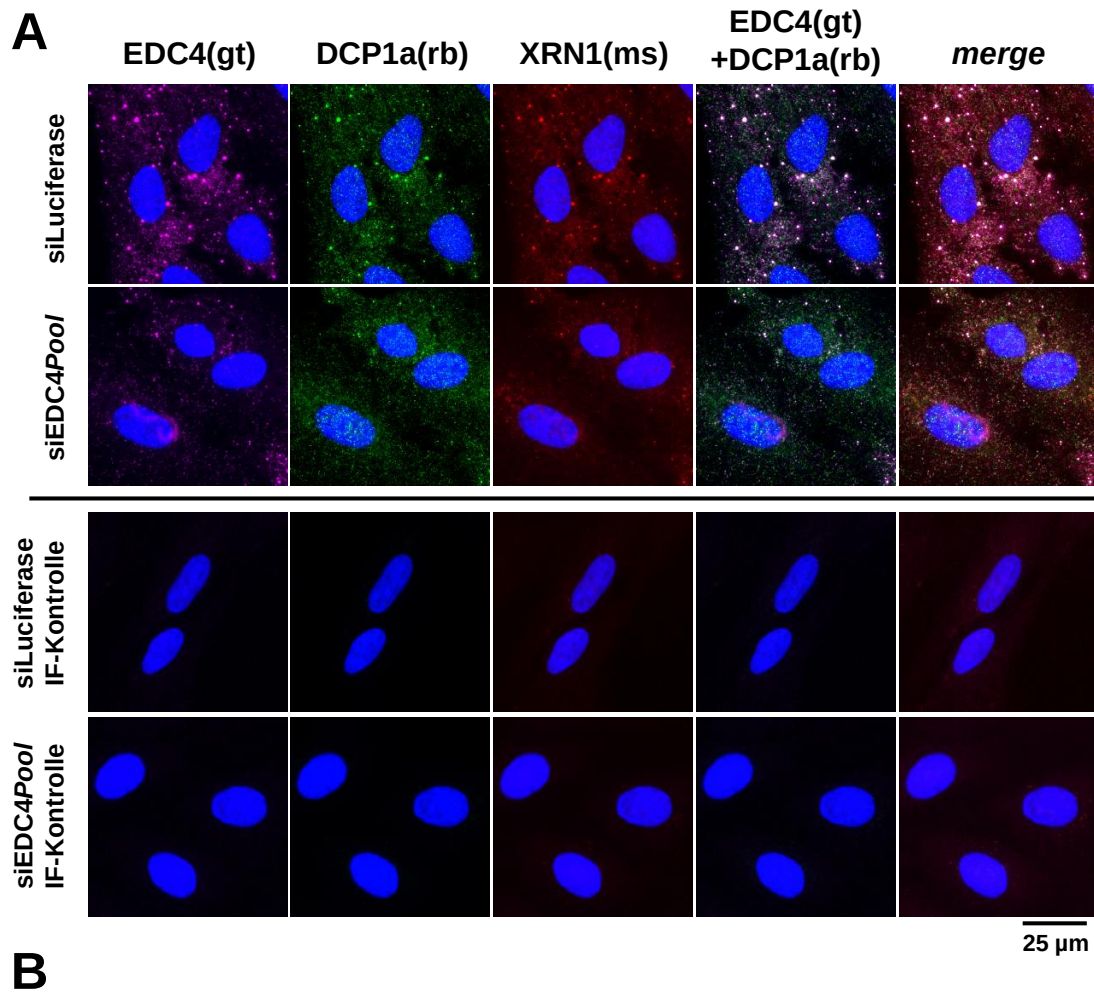


Abb. 4.17: Modifizierung der Transfektionsbedingungen für den siRNA-vermittelten EDC4-knockdown.
A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 25 bzw. 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 24-, 48- oder 72-stündiger Kultivierung wurden die Zellen geerntet. Die Proteine wurden mittels Speziallyse aufgereinigt, elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Je Probe wurden 30 μ g Protein aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente β -Aktin. **B:** Quantitative Darstellung der relativen EDC4-Proteinmenge normiert auf die siLuciferase-transfizierte Probe.

4.6.2.2 Einfluss der EDC4-Proteinmenge auf die *P-body*-Assemblierung

Die *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen wurde nach EDC4-*knockdown* analog zu 4.6.1.2 mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Dafür wurden die Zellen nach 4.6.2.1 mit 50 nM siRNAs transfiziert und für 72 Stunden kultiviert. Verwendet wurde der *pool* der beiden siRNAs gegen EDC4-mRNA (siEDC4*Pool*) und siLuciferase als Kontrolle. Als weitere Kontrolle dienten parentale hTERT-RPE1-Zellen. Wie in 4.2.2 wurden EDC4, DCP1a und XRN1 als *P-body*-Proteine angefärbt und die *P-body*-Anzahl pro Zelle anhand des *merges* von EDC4, DCP1a und XRN1 manuell mittels 4x4-Pixel-Rasters (vgl. 3.5.1) ermittelt (Abb. 4.18). Weiterhin wurden mittels *Mann-Whitney rank sum tests* die Daten der siLuciferase-transfizierten Zellpopulation paarweise gegen die der parentalen und siEDC4*Pool*-transfizierten Zellen bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet.

Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Farbintensität von EDC4 in den siEDC4*Pool*-transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. Neben einer deutlichen Reduktion des Fluoreszenzsignals im Zytoplasma ließ sich außerdem eine Reduktion der *P-body*-Anzahl pro Zelle beobachten. Jedoch zeigte sich auch hier die Reduktion des EDC4-Proteins nicht in allen transfizierten Zellen. Der EDC4-*knockdown* wurde dementsprechend anhand des *merges* von EDC4 und DCP1a identifiziert, wobei im Falle einer Reduktion von EDC4 eine stärkere zytoplasmatische Grünfärbung sichtbar war. Auch in diesen Experimenten konnte so in der siEDC4*Pool*-transfizierten Zellpopulation zwischen starker und schwacher bzw. nicht vorhandener Depletion von EDC4 unterschieden werden. Die Quantifizierung der *P-body*-Anzahl pro Zelle zeigte im EDC4-*knockdown* erwartungsgemäß eine signifikante Reduktion auf 5 *P-bodies* pro Zelle im Median im Vergleich zu den Kontrollzellen. In 28 % der Zellen ließen sich sogar gar keine *P-bodies* detektieren. Im Gegensatz zum XRN1-*knockdown* konnte im Falle des EDC4-*knockdowns* daher ein spezifischer Phänotyp identifiziert werden. Auch in diesem Versuch zeigten die siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen (Median: 21 *P-bodies* pro Zelle), die parentalen Zellen (Median: 22 *P-bodies* pro Zelle) und die siEDC4*Pool*-transfizierten Zellen ohne optische Reduktion des EDC4-Proteins (Median: 23 *P-bodies* pro Zelle) eine vergleichbare *P-body*-Assemblierung und keine signifikanten Unterschiede im *Mann-Whitney rank sum test*. Dies spricht wiederum für eine gute Kategorisierung der siEDC4*Pool*-transfizierten Zellpopulation.



siEDC4Pool	+	+		
knockdown	+	-		
siLuciferase			+	
parental				+

Abb. 4.18: P-body-Assemblierung nach transientem EDC4-knockdown in hTERT-RPE1-Zellen. A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 72-stündiger Kultivierung wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur fixiert und eine Immunfärbung von DCP1a, EDC4 und XRN1 durchgeführt. Verwendet wurden als Primärantikörper Anti-DCP1a(rb) der Firma Abcam, #ab47811 (markiert mit Sekundärantikörper DyLight 488), Anti-

EDC4(gt) der Firma Santa Cruz, #sc-13744 (markiert mit Sekundärantikörper Cy5) und Anti-XRN1(ms) der Firma Santa Cruz, #sc-165985 (markiert mit Sekundärantikörper Cy3). Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. Die Anzahl an *P-bodies* pro Zelle wurde mittels eines 4x4-Pixel-Rasters anhand der *merges* der drei *P-body*-Komponenten ermittelt (vgl. 3.5.1). Der EDC4-*knockdown* wurde anhand der EDC4/DCP1a-*merges* identifiziert. **B:** Darstellung der absoluten Anzahlen an *P-bodies* pro Zelle als *box plot* in zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Mittels eines *Mann-Whitney rank sum tests* wurden die Daten der siLuciferase-transfizierten Zellpopulation paarweise gegen die der parentalen und die der siEDC4Pool-transfizierten Zellen bei einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ getestet.

4.6.2.3 Einfluss der EDC4-Proteinmenge auf die IL-1 α -abhängige Genexpression von *IL8* und *NFKBIA*

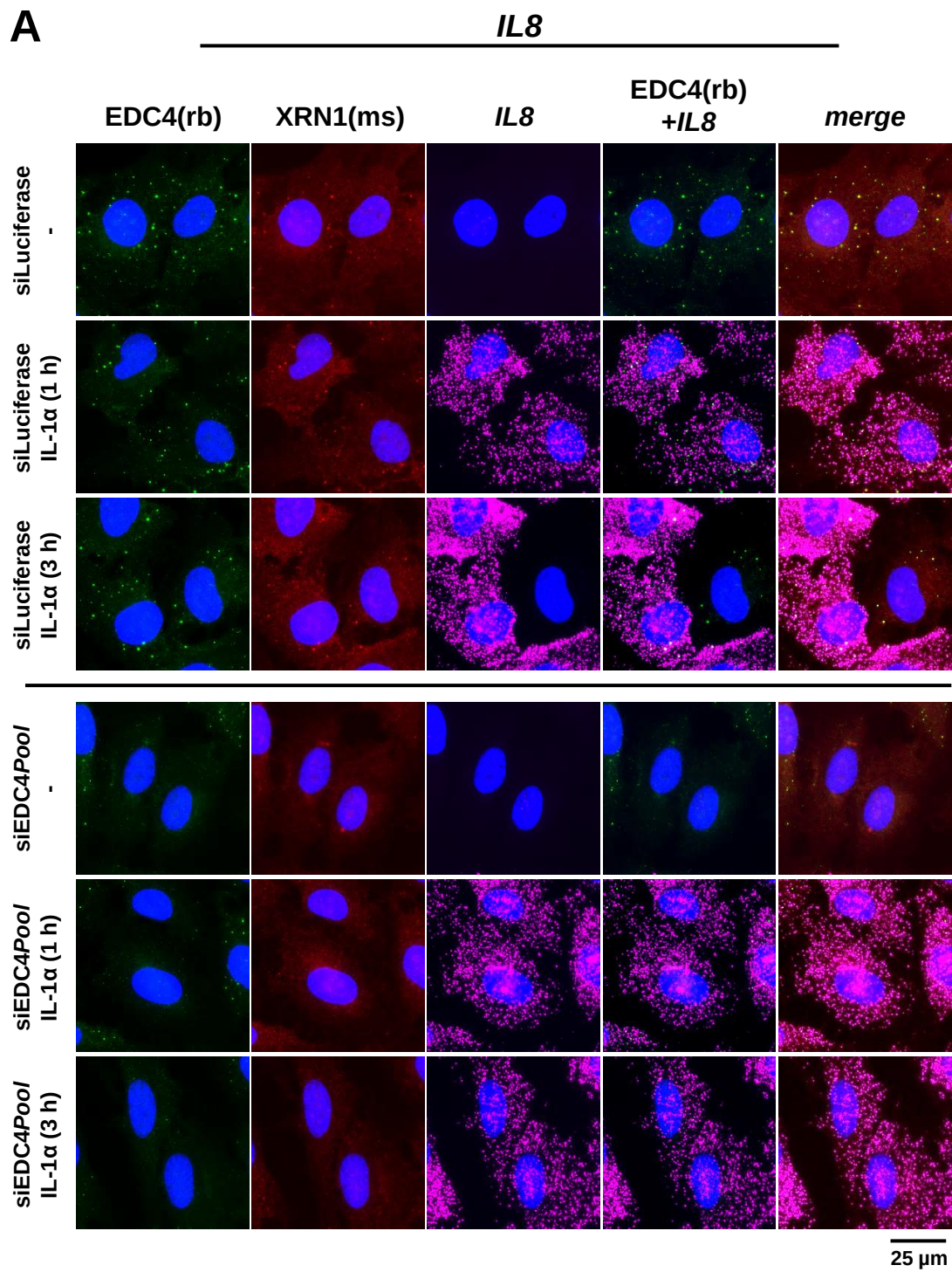
Die IL-1 α -abhängige Genexpression von *IL8* und *NFKBIA* wurde nach siRNA-vermitteltem EDC4-*knockdown* wie in 4.6.1.3 unter Verwendung einer IF-FISH und Markierung von *IL8*- und *NFKBIA*-mRNA untersucht. Dafür wurden die Zellen mit 50 nM siRNAs transfiziert, 72 Stunden kultiviert und nachfolgend für 1 bzw. 3 Stunden mit IL-1 α [10 ng/ml] stimuliert oder unstimuliert (-) gelassen. Verwendet wurde der *pool* der beiden siRNAs gegen *EDC4*-mRNA. Als Kontrolle dienten siLuciferase-transfizierte und parentale Zellen. Zur Identifizierung des EDC4-*knockdowns* wurde EDC4 und weiterhin XRN1 als zusätzlicher *P-body*-Marker angefärbt. Da im EDC4-*knockdown* ein eindeutiger Phänotyp identifiziert werden konnte, wurden in diesem Experiment lediglich die Zellen berücksichtigt, in denen sich keine *P-bodies* detektieren ließen (siEDC4Pool(EDC4-KD)). Die Anzahl an Transkripten pro Zelle wurde mittels Duolink-Software bestimmt (Abb. 4.19). Die basalen *IL8*- und *NFKBIA*-mRNA-Mengen sind in Abbildung 4.19 C separat dargestellt. Die IF-Kontrollen sind im Anhang zu finden (Abb. 11.8).

Im unstimulierten Zustand zeigte sich für *IL8* in allen drei Zellpopulationen ein geringer Transkriptspiegel mit je 1 Transkript pro Zelle im Median. Der *Mann-Whitney rank sum test* ergab hier keine signifikanten Unterschiede. Nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation konnte ein starker Anstieg der Transkriptmenge pro Zelle auf 435 in den siLuciferase-transfizierten Zellen und 434 in den parentalen Zellen beobachtet werden, während sich im EDC4-*knockdown* ein etwas geringerer Anstieg auf 348 Transkripte pro Zelle zeigte. Nach 3-stündiger IL-1 α -Inkubation ließen sich wie in 4.6.1.3 relativ große Boxen der Transkriptanzahl pro Zelle sowie kein Absinken der Mediane im Vergleich zur Transkriptmenge nach 1 Stunde (Mediane: siEDC4Pool(EDC4-KD): 374 Transkripte pro Zelle; siLuciferase: 433 Transkripte pro Zelle; parental: 450 Transkripte pro Zelle), nachweisen.

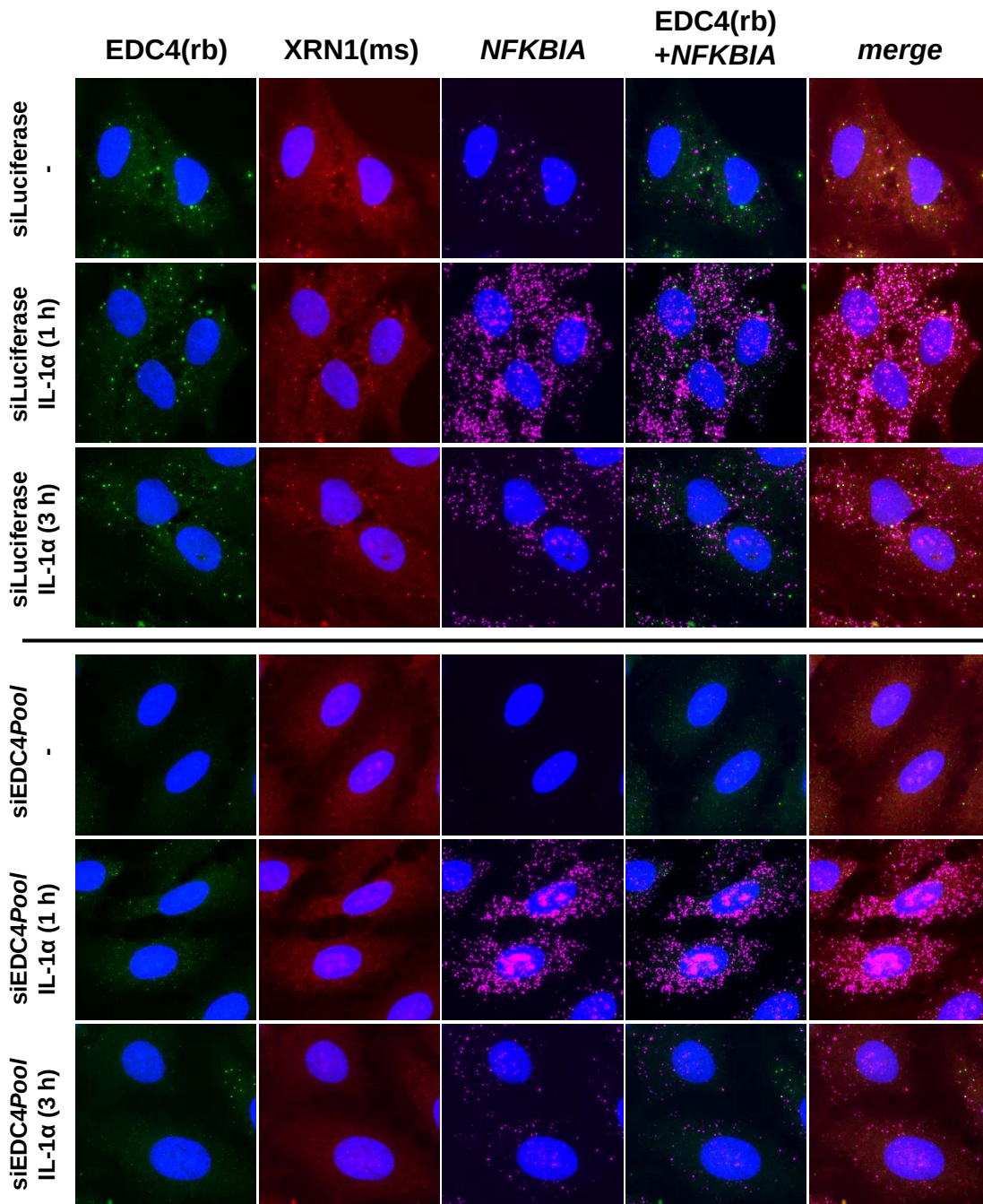
Für *NFKBIA* zeigte sich im unstimulierten Zustand bei Depletion von EDC4 (Median: 14 Transkripte pro Zelle) unter Anwendung eines *Mann-Whitney rank sum test* eine signifikante Verringerung der Transkriptmenge auf ein 0,4-faches der siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen (Median: 37 Transkripte pro Zelle). In den parental Zellen ließen sich mit 30 Transkripten pro Zelle im Median ebenfalls eine leicht, jedoch signifikant reduzierte basale *NFKBIA*-Transkriptmenge im Vergleich zu den siLuciferase-transfizierten Kontrollzellen beobachten. Nach IL-1 α -Stimulation zeigten sich zwischen den drei Zelllinien bis auf kleinere Schwankungen keine Unterschiede der Transkriptgehalte. Nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation stiegen die Transkriptmengen pro Zelle auf 364 Transkripte im EDC4-*knockdown*, in den siLuciferase-transfizierten Zellen auf 365 und in den parental Zellen auf 424 an. Nach 3 Stunden IL-1 α -Inkubation sanken die Transkriptspiegel pro Zelle erwartungsgemäß wieder rapide ab (Mediane siEDC4*Pool*(EDC4-KD): 136 Transkripte pro Zelle; siLuciferase: 171 Transkripte pro Zelle; parental: 157 Transkripte pro Zelle).

Zusammenfassend konnte also durch einen transienten EDC4-*knockdown* in hTERT-RPE1-Zellen eine Verringerung des basalen *NFKBIA*-Transkriptspiegels im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Während sich für *IL8* keine Veränderungen auf basalem Niveau zeigten, konnte eine gering ausgeprägte IL-1 α -induzierte Reduktion der *IL8*-Transkriptspiegel im EDC4-*knockdown* detektiert werden. In einer einmalig durchgeführten RTqPCR in hTERT-RPE1-Zellen konnten die Effekte auf den basalen *NFKBIA*-mRNA-Spiegel auch auf Gesamtzelebene ohne Selektion nachgewiesen werden (Abb. 11.9 C). Hier zeigte sich im Vergleich zu den siLuciferase-transfizierten Zellen eine Reduktion der basalen *NFKBIA*-Transkriptmenge auf ein 0,7-faches. Gleichwohl ließ sich auch eine Reduktion des basalen *IL8*-mRNA-Spiegels auf ein 0,5-faches im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachten, was sich in der IF-FISH nicht detektieren ließ. Der korrespondierende Western Blot in diesem Versuch zeigte eine EDC4-Restproteinmenge von 44 %. Diese Reduktion der basalen mRNA-Menge von *IL8* und *NFKBIA* könnte auf eine mRNA-Destabilisierung infolge der durch Depletion von EDC4 verursachten Auflösung der *P-bodies* hinweisen.

A



NFKBIA



25 μm

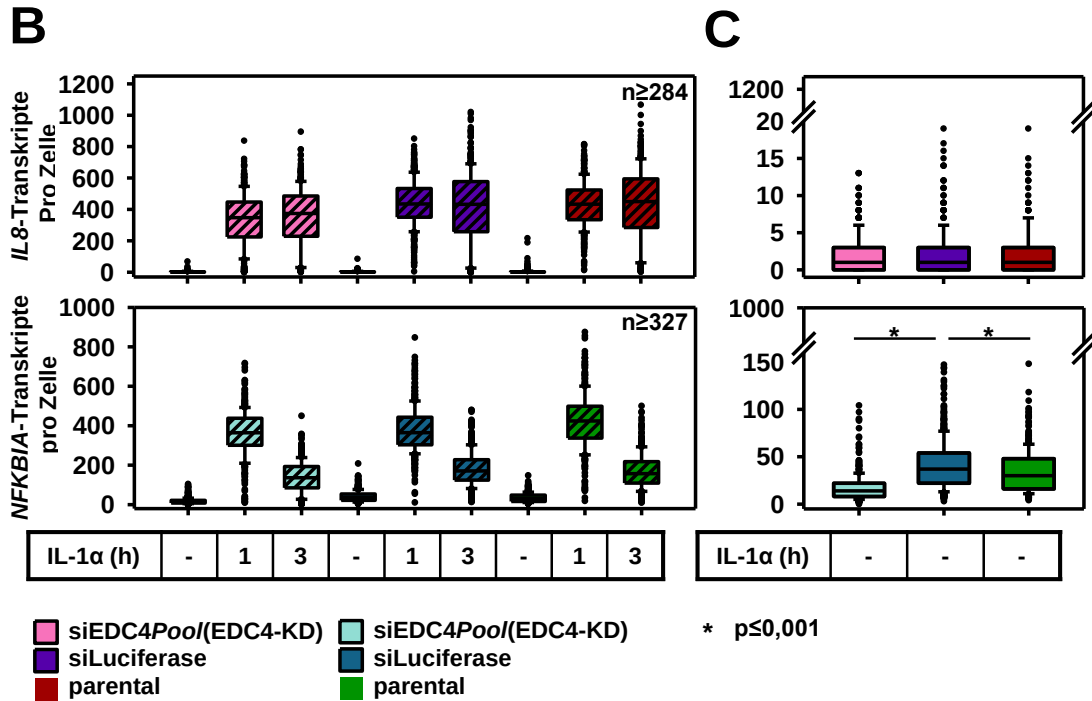


Abb. 4.19: Veränderung der Genexpression von *IL8* und *NFKBIA* nach transientem EDC4-knockdown in hTERT-RPE1-Zellen. A: hTERT-RPE1-Zellen wurden in IBIDI μ -Slides VI ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 72-stündiger Kultivierung wurden die Zellen für 1 und 3 h mit IL-1 α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert (-) gelassen. Daraufhin wurden sie über Nacht bei 4°C fixiert und eine IF-FISH mit Markierung von *IL8*- und *NFKBIA*-mRNA und eine Immunfärbung von EDC4 und XRN1 durchgeführt. Verwendet wurden dafür genspezifische Sonden und das Quantigene View RNA ISH Cell Assay Kit der Firma Affymetrix. Als Primärantikörper wurde Anti-EDC4(rb) der Firma Cell Signaling, #2548S (markiert mit Sekundärantikörper Dylight 488) und Anti-XRN1(ms) der Firma Santa Cruz, #sc-165985 (markiert mit Sekundärantikörper Cy3) verwendet. Der Zellkern wurde mittels Hoechst 33342 angefärbt. Als IF-Kontrolle dienten Zellen ohne Primärantikörperinkubation. Diese sind in Abb. 11.8 dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software. Die Quantifizierung der Anzahl der Transkripte erfolgte mittels Duolink-Software. Für den EDC4-knockdown wurden nur Zellen berücksichtigt, die keine *P-bodies* enthielten (siEDC4Pool(EDC4-KD)). **B:** Quantitative Darstellung der Anzahl an Transkripten als *box plot* in drei voneinander unabhängigen Experimenten und einer Gesamtzellpopulation von mindestens 284 Zellen pro Bedingung (n ≥ 284). **C:** Separate Darstellung der Anzahl an Transkripten pro Zelle als *box plot* im unstimulierten Zustand. Mittels *Mann-Whitney rank sum tests* wurden die Daten der siLuciferase-transfizierten Zellpopulation paarweise gegen die parental und die siXRN1Pool-transfizierten Zellen bei einem Signifikanzniveau von p=0,05 getestet.

5 Diskussion

5.1 IL-1 α ist ein starker Stimulus für hTERT-RPE1-Zellen und induziert eine andauernde intrazelluläre Entzündungsaktivität

Die Stimulation von hTERT-RPE1-Zellen mit IL-1 α für verschiedene Inkubationszeiten zeigte schnelle Änderungen der NF- κ B-Signaltransduktion und der Genexpression der IL-1-induzierbaren Zielgene *IL6*, *IL8* und *NFKBIA*. Diese Zellpopulation, die zu ca. 80 % auf IL-1 α anspricht (vgl. Abb. 4.1), zeigte in der Gesamt- (vgl. Abb. 4.4) und Einzelzellanalyse (vgl. Abb. 4.5) eine Steigerung der Transkriptmenge der drei Gene auf ein Maximum nach 1 Stunde mit darauffolgender starker Abnahme für *NFKBIA* bzw. weniger starker Abnahme für *IL8* und *IL6* bei längerer IL-1 α -Inkubation. Im basalen Zustand zeigten RNA-FISH-Ergebnisse deutlich höhere Transkriptgehalte pro Zelle für *NFKBIA* als für *IL6* und *IL8*. Obwohl die Messung der Genexpression und die Auswertung bei beiden Methoden unterschiedlich erfolgt (als relativer Unterschied basierend auf Ct-Werten aus einer PCR bzw. durch die direkte Auszählung von Hybrisierungssignalen pro Zelle), ließen sich die Gesamt- und Einzelzellanalyse sehr gut miteinander vereinbaren und ergänzten sich in ihrem Informationsgewinn, sodass eine repräsentative Darstellung der zytokininduzierten Genexpression in hTERT-RPE1-Zellen erzeugt werden konnte.

In der RTqPCR ließen sich besonders nach 1, 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation im Vergleich zu *IL6* und *NFKBIA* große Standardabweichungen für *IL8* beobachten, welche durch interexperimentelle Variabilitäten erklärt werden können. Diese Variabilität wurde u.a. durch Faktoren wie Zelldichte, Alter des IL-1 α -Reagenz und Passage der Zellen beeinflusst. Als Ursache dafür, dass sich jedoch lediglich für das *IL8*-Gen größere Standardabweichungen zeigten, kann außerdem die äußerst geringe basale mRNA-Transkriptmenge angeführt werden (vgl. Abb. 4.5), da minimale Schwankungen im basalen Zustand die Standardabweichung bei größeren Induktionswerten stärker beeinflussen als bei geringeren Induktionswerten wie für *IL6*.

Tenekeci konnte in HeLa-Zellen vergleichbare basale mRNA-*steady-state-level* für *IL8* und *NFKBIA* und ähnliche Kurvenverläufe für *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* nach IL-1 α -Inkubation beobachten. Obwohl der Anteil der Zellen, die nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation eine p65-Translokation in den Zellkern zeigten, lediglich bei ca. 60 % lag, ließen sich in HeLa-Zellen nach 1 Stunde für *IL6* und *IL8* größere relative mRNA-

Unterschiede (*folds*) detektieren als in hTERT-RPE1-Zellen (Tenekeci, 2018). Allerdings zeigten sich im Unterschied zu hTERT-RPE1-Zellen nach 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation auch für *IL6* und *IL8* rapide Abnahmen der Transkriptmengen, wie es in beiden Zelllinien für *NFKBIA* der Fall war (Tenekeci, 2018). Um diese Unterschiede zu erklären, ist es wichtig zu berücksichtigen, dass sich die biologischen Funktionen der jeweiligen kodierenden Proteine von *NFKBIA* im Vergleich zu *IL6* und *IL8* unterscheiden. Während IL-6 und IL-8 als proinflammatorische Zytokine bzw. als Chemokine direkt zur Entzündungsreaktion beitragen, sorgt das durch *NFKBIA* codierte I κ B α -Protein über einen negativen *feedback-loop* für eine Inhibierung der IL-1-Antwort (vgl. 1.1.2). Es erscheint sinnvoll, dass der Zelle basal ein gewisser Spiegel an *NFKBIA*-mRNA zur Verfügung steht, um ausreichend Protein zu synthetisieren, sodass eine mögliche basale NF- κ B-Aktivität, die z.B. in Tumorzelllinien oft erhöht, effizient und aktiv kontrolliert wird (Taniguchi & Karin, 2018). Da in beiden Zelllinien der *NFKBIA*-Gehalt nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation maximal ist und daraufhin rapide sank, ist davon auszugehen, dass das IL-1 α -signaling bei Inkubationszeiten über einer Stunde hinaus bereits gehemmt wird (vgl. 1.1.3). Daher müssen zelltypspezifische Unterschiede existieren, die die hohen mRNA-Spiegel von *IL6* und *IL8* nach 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation in einzelnen hTERT-RPE1-Zellen aufrechterhalten.

Die RNA-FISH zeigte als genaue Untersuchungsmöglichkeit von Einzelzellen nach längerer IL-1 α -Inkubation (3, 6, 8 h) besonders für *IL8* eine heterogene Verteilung der Transkripte innerhalb der hTERT-RPE1-Zellpopulation. So ließen sich in einem Teil der Population ähnlich viele Transkripte detektieren wie nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation, während ein anderer Teil kaum Transkripte aufwies. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass möglicherweise die synthetisierte mRNA nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation in einzelnen Zellen stabilisiert und gespeichert wird. Diese Hypothese konnte jedoch bereits wie in 5.2 dargestellt widerlegt werden. Die Tatsache, dass sich diese auffallend stark erhöhten Transkriptspiegel für *IL8* und auch für *IL6* nur in einzelnen Zellen zeigten, spricht eher für starke IL-1 α -vermittelte parakrine Effekte zwischen den einzelnen Zellen, die dafür sorgten, dass die *IL6*- und *IL8*-Genexpression auch bei IL-1 α -Inkubation über 1 Stunde hinaus aufrecht gehalten wird, wenngleich die IL-1 α -Antwort innerhalb der Zellpopulation durch die IL-1 α -induzierte *NFKBIA*-Genexpression und Proteinsynthese von I κ B α zum größten Teil bereits abgeschaltet

wurde. In diesem Zusammenhang identifizierten Weiterer et al. positive autoregulatorische IL-8-abhängige *feedback loops*, die zu einer andauernden IL-1 α -Antwort mit infolge Sekretion von IL-6 und IL-8 geführt haben (Weiterer et al., 2020). Die anhaltende Entzündungsantwort, die sich hier beispielhaft in einzelnen Zellen beobachten ließ, konnte auch im Rahmen von Untersuchungen zum inflammatorischen *signaling* anhand der Synthese von Caspase-5 nach IL-1 β - und LPS-Stimulation in hTERT-RPE1-Zellen beobachtet werden. Dabei konnte eine signifikant erhöhte mRNA-Syntheserate bzw. Aktivität von Caspase-5 auch noch nach 6 bzw. 24 Stunden Behandlung detektiert werden (Bian et al., 2011). Sogar nach 24 Stunden IL-1 β -Stimulation konnten im Vergleich zu den unstimulierten Zellen signifikant erhöhte IL-8-Sekretionsspiegel festgestellt werden, die durch die Behandlung mit einem Caspase-Inhibitor signifikant sanken (Bian et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die IL-1 α -induzierte Genexpression von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* in hTERT-RPE1-Zellen mit einem Maximum nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation gut mit bereits bekannten Beobachtungen in HeLa-Zellen vereinbaren lässt. Allerdings zeigten sich für *IL6* und *IL8* unter andauernder IL-1 α -Inkubation anhaltend höhere Transkriptspiegel in einzelnen Zellen. Derartig anhaltende Entzündungsantworten ausgehend von einzelnen Zellen, die sich in einer ansonsten homogenen Zellpopulation stochastisch anders verhalten, könnten bei der Pathogenese der diabetischen Retinopathie und altersbedingter Makuladegeneration, bei der RPE-Zellen beteiligt sein sollen, eine Rolle spielen (An et al., 2006; Kim et al., 2014; Raj & Van Oudebaarden, 2008).

5.2 Regulation der mRNA-Stabilitäten von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* durch IL-1 α und ihre mögliche biologische Relevanz

Die mRNA-Stabilität ist eine wichtige Messgröße des mRNA-Umsatzes und wird durch verschiedene Mechanismen wie den mRNA-Abbau reguliert (vgl. 1.2). Die Regulation des mRNA-Umsatzes wiederum beeinflusst Genexpression und Proteinsynthese und ist daher essenziell zur Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels (Chen et al., 2008). Zur Untersuchung des mRNA-Umsatzes wurden die basalen und IL-1 α -induzierten mRNA-Stabilitäten von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* nach Transkriptionshemmung durch Actinomycin D mittels RTqPCR gemessen. Dabei zeigten sich basal für *IL6* und *NFKBIA* vergleichbare mRNA-Halbwertszeiten mit 26 bzw. 30 Minuten, während die

IL8-mRNA-Halbwertszeit mit 50 Minuten höher war. Nach 30 Minuten *IL-1α*-Inkubation stieg die Stabilität der drei Transkripte deutlich an, sodass sich für *IL8* kaum Veränderungen der mRNA-Spiegel durch Transkriptionseinhibition detektieren ließen. Für alle drei Gene zeigten die mRNAs nach 1 Stunde *IL-1α*-Stimulation die größte Destabilisierung mit Halbwertszeiten von 11 bis 16 Minuten, während sie bei längerer *IL-1α*-Inkubation wieder stabilisiert wurden und sich der basalen Stabilität annäherten. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Einzelzellanalyse in Bezug auf die Transkriptmengen pro Zelle nach *IL-1α*-Stimulation (vgl. 4.3.2) lässt sich folgern, dass die geringen Mengen an *IL6*- und *IL8*-mRNAs, sowie die recht große Menge an *NFKBIA*-mRNAs, die sich im unstimulierten Zustand in den Zellen befinden, relativ stabil sind, sodass auch bei einer geringen Transkriptionsrate ausreichend Transkripte für ein Aufrechterhalten der basalen Zellfunktion verfügbar sind.

Da mit beginnender *IL-1α*-Inkubation (*IL-1α* (0,5 h)) die mRNA-Stabilität der drei Gene zunächst ansteigt und mehr mRNAs gebildet werden, werden in dieser Phase offenbar Transkription und mRNA-Abbauprozesse in eine entgegengesetzte Richtung koordiniert, um schnell sehr viele Transkripte zu erzeugen. Diese Stabilisierung kann u.a. durch eine transiente Aktivierung des p38-MAP-Kinase-Signalwegs erklärt werden, der eine Stabilisierung von AU-reichen mRNAs beinhaltet (Holtmann et al., 1999). Dieser Mechanismus ist auch biologisch sinnvoll: Mit beginnender Stimulation von Zellen durch *IL-1α*, einem effektiven Entzündungsmediator, sollen schnell entsprechende proinflammatorische mRNAs synthetisiert (und translatiert) werden, damit die Zelle rasch auf die Umwelt reagieren kann. Eine Stabilisierung der vorhandenen und zum Teil bereits synthetisierten mRNAs kann diese schnelle Reaktion begünstigen, indem z.B. der mRNA-Abbau aktiv transient gehemmt wird. Es fällt allerdings auf, dass die mRNA-Stabilität von *IL8* und *IL6* viel stärker anstieg als für *NFKBIA*. Diese Beobachtung kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass aufgrund des bereits höheren basalen *NFKBIA*-Transkriptspiegels eine derart starke transiente Stabilisierung nicht nötig ist.

Nach 1 Stunde *IL-1α*-Inkubation sanken die mRNA-Stabilitäten aller drei Transkripte deutlich ab, was für eine aktive, Stimulus-induzierte mRNA-Degradation und Proteinsynthese spricht. Die genauen Mechanismen dieses *IL-1*-induzierten mRNA-Abbaus auf dem Höhepunkt der Transkription sind nicht bekannt (Jurida et al., 2015; Weiterer et al., 2020). Aber nur so können die Spiegel inflammatorischer mRNAs nach

dem Abschalten der Transkription auch wieder im Zeitverlauf der IL-1 α -Exposition reduziert werden. Durch längere IL-1 α -Inkubation wurden die mRNAs der drei Gene wieder stabiler, wobei kein IL-1 α -abhängiger Unterschied zwischen der mRNA von *NFKBIA* im Vergleich zur *IL6*- und *IL8*-mRNA beobachtet werden konnte, der erklären würde, warum sich nach 3, 6 und 8 Stunden IL-1 α -Inkubation noch recht hohe Transkriptmengen in einzelnen Zellen detektieren ließen. Zu diesen Zeitpunkten spielen vermutlich die in 1.1.3 bereits erwähnten Autoregulationsmechanismen zur Termination der IL-1-Antwort eine Rolle, die für eine Hemmung der Genexpression sorgen, wodurch immer weniger mRNAs resynthetisiert werden und die vorhandenen intrazellulären mRNAs immer mehr abgebaut werden können.

Bei genauer Betrachtung der Kurvenverläufe der Transkriptmengen fällt auf, dass die Transkriptmengen aller drei Transkripte nach 0,5 Stunden IL-1 α -Inkubation und folgenden 30 Minuten Actinomycin D-Behandlung höher liegen als ohne Actinomycin D-Behandlung (vgl. Abb. 4.7 A). Da Actinomycin D als Zytostatikum massiv zellulären Stress verursacht, wäre es denkbar, dass Actinomycin D anfänglich selbst als Stressor (z.B. über die Phosphorylierung von JNK) eine intrazelluläre Signaltransduktion bewirkt und so die Transkriptspiegel von *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* beeinflusst, während die Wirkung der globalen Transkriptionshemmung im Zellkern erst etwas später auftritt (Chen et al., 2008; Ho & Li, 2010; Yokoyama et al., 2017). Diese intrinsische mRNA-stabilisierende Wirkung von Actinomycin D fällt vermutlich nur nach 0,5 Stunden IL-1 α -Inkubation auf, da hier die mRNAs maximal stabilisiert werden, ansonsten ist dieser Effekt offenbar als vernachlässigbar anzusehen.

Interessanterweise zeigen HeLa-Zellen vergleichbare basale und IL-1 α -abhängige Halbwertszeiten für *IL6*-, *IL8*- und *NFKBIA*-mRNAs, obwohl sich die mRNA-*steady-state-level* bei längerer IL-1 α -Inkubation zum Teil unterscheiden (vgl. 5.1) (Tenekeci, 2018). Auch U2OS-Zellen weisen ähnliche basale mRNA-Stabilitäten auf (Tenekeci et al., 2016). Dabei zeigen HeLa- und U2OS-Zellen basal sogar noch stabilere *IL8*-mRNAs im Vergleich zu hTERT-RPE1-Zellen (Tenekeci et al., 2016; Tenekeci, 2018). Auch nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation lässt sich in HeLa-Zellen eine maximale Destabilisierung von *IL6*-, *IL8*- und *NFKBIA*-mRNAs beobachten, die bei längerer IL-1 α -Inkubation wieder stabilisiert werden (Tenekeci, 2018). Diese vergleichbaren Befunde der Zelllinien lassen darauf schließen, dass, obwohl HeLa- und hTERT-RPE1-Zellen unterschiedlich stark auf IL-1 α reagieren und zum Teil unterschiedliche mRNA-

steady-state-level aufweisen, der mRNA-Umsatz über ähnliche Signalmechanismen reguliert sein muss.

5.3 IL-1 α hat keinen Einfluss auf die DCP1a-, EDC4- und XRN1-abhängige *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen

Da vermutet wird, dass *P-bodies* durch die Kontrolle von mRNA-Abbauprozessen und bzw. oder mRNA-Speicherungsvorgängen bei der Regulation des mRNA-Umsatzes und somit der mRNA-Stabilität eine Rolle spielen (vgl. 1.3.2), war es sinnvoll, unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse zur mRNA-Stabilität die *P-body*-Assemblierung im Zusammenhang mit IL-1 α -induzierten mRNAs zu analysieren. Die Untersuchung der IL-1 α -abhängigen *P-body*-Assemblierung anhand der Anzahl der DCP1a-, EDC4- und XRN1-positiven *P-bodies* ergab in hTERT-RPE1-Zellen keine Veränderung der *P-body*-Assemblierung im Vergleich zur unstimulierten Zellpopulation (vgl. Abb. 4.3). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, dass die *P-body*-Assemblierung durch IL-1 α gefördert würde. Dieser IL-1 α -induzierte Anstieg mit einem Maximum nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation konnte in HEK293IL-1R-Zellen und weniger stark ausgeprägt auch in HeLa-Zellen beobachtet werden (Rzeczkowski et al., 2011; Tenekeci, 2018). Dabei ist anzumerken, dass HEK293- und HeLa-Zellen verbreitete humane Tumorzelllinien darstellen, während hTERT-RPE1-Zellen als humane, diploide nicht-Tumorzelllinie einzuordnen ist.

Bei näherer Betrachtung der *P-body*-Formierung in hTERT-RPE1-Zellen und HeLa-Zellen fallen bereits im unstimulierten Zustand zelltypspezifische Unterschiede auf (vgl. Abb. 4.2 A). Diese Beobachtung überrascht nicht, da Studien gezeigt haben, dass die Anzahl und Größe von *P-bodies* in verschiedenen Organismen und Geweben variieren können (Aizer et al., 2014). Insgesamt lassen sich vier charakteristische Unterschiede in der *P-body*-Assemblierung zwischen den beiden Zelllinien hervorheben: (1) Die *P-body*-Verteilung ist in HeLa-Zellen deutlich inhomogener, wobei ein recht großer Anteil keine *P-bodies* ausweist (Tenekeci, 2018). In hTERT-RPE1-Zellen hingegen ist die *P-body*-Verteilung innerhalb der Zellpopulation sehr homogen. Es lassen sich nahezu keine Zellen detektieren, die überhaupt keine *P-bodies* aufweisen. (2) Die *P-bodies* in HeLa-Zellen erscheinen optisch größer als in hTERT-RPE1-Zellen. (3) Die *P-body*-Anzahl ist in hTERT-RPE1-Zellen mit 23 *P-bodies* pro Zelle im Median im unstimulierten Zustand deutlich höher als in HeLa-Zellen mit

durchschnittlich 6,5 *P-bodies* pro Zelle (Tenekeci, 2018). (4) Trotzdem zeigen sich im Vergleich zu HeLa-Zellen durchweg geringere absolute Proteinspiegel der *P-body*-Proteine DCP1a, EDC3, EDC4 und XRN1 in hTERT-RPE1-Zellen (vgl. Abb. 4.2 B). Da *P-bodies* eine Funktion bei der Regulation des mRNA-Umsatzes zugesprochen wird, wären als Erklärung für diese grundlegende zelltypspezifische *P-body*-Assemblierung komplexe Unterschiede in diversen Regulationsmechanismen des basalen zellulären Stoffwechsels wie Genexpressionsrate, mRNA-Speicherung, mRNA-Abbau und Translationsinitiation denkbar. Weiterhin sei angemerkt, dass *P-body*-Proteine wie DCP1a, EDC4 und XRN1 auch außerhalb ihrer Aggregation in den „klassischen“ *P-bodies* in mikroskopisch nicht sichtbaren mRNPs lokalisiert sein können (vgl. 1.3.2), wodurch eine diffuse Zytoplasmafärbung in der indirekten Immunfluoreszenz entsteht, die sich spezifisch von der alleinigen Färbung des Sekundärantikörpers in der IF-Kontrolle unterscheiden lässt (vgl. Abb. 4.3 A). Es wäre daher denkbar, dass sich die *P-body*-Proteine des *decappings* und 5'-3'-mRNA-Abbaus in hTERT-RPE1-Zellen womöglich mehr innerhalb von *P-bodies* konzentrieren als im umgebenden Zytoplasma, weshalb sie im Vergleich zu HeLa-Zellen trotz geringerem Proteinspiegel recht viele *P-bodies* enthalten. Tenekeci konnte mit Hilfe von Immuno-*proximity ligation assay* (PLA)-Experimenten aufgezeigt, dass viele direkten Interaktionen der untersuchten *P-body*-Proteine in HeLa-Zellen außerhalb von *P-bodies* stattfinden (Tenekeci, 2018). Um diese Behauptung zu überprüfen, könnten in weiterführenden Experimenten die Protein/Protein-Interaktionen der untersuchten *P-body*-Proteine im Vergleich zu HeLa-Zellen auch in hTERT-RPE1-Zellen mittels PLA untersucht werden (Mayr-Buro et al., 2019).

Trotz dieser grundlegenden Unterschiede in der *P-body*-Assemblierung zwischen den beiden Zelllinien ist es eine interessante Frage, warum die mikroskopisch sichtbare *P-body*-Assemblierung bei Anstieg des zytoplasmatischen *pools* an mRNAs, wie es nach IL-1 α -Stimulation der Fall ist, in hTERT-RPE1-Zellen nicht gefördert wird (Rzeczkowski et al., 2011; Collier & Parker, 2004). Als Erklärung dafür kann eine verminderte Stimulierbarkeit der Zellen durch IL-1 α aufgrund einer hohen Induktionsrate von nahezu 80 % p65-Translokationen in den Zellkern (vgl. Abb. 4.1), einer starken Induktion der Genexpression IL-1-abhängiger Gene (vgl. Abb. 4.4 und Abb. 4.5) sowie einer Induktion der posttranslationalen Phosphorylierung von DCP1a (vgl. Abb. 4.2 B) als Erklärung ausgeschlossen werden. Es wäre allerdings denkbar,

dass, obwohl die Anzahl an DCP1a-, EDC4- und XRN1-positiven *P-bodies* IL-1 α -unabhängig zu sein scheint, dennoch eine Größenzunahme der einzelnen *P-bodies* als Zeichen einer IL-1 α -abhängigen Induktion der *P-body*-Zusammenlagerung stattfindet, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Des Weiteren wäre es möglich, dass DCP1a, EDC4 und XRN1 in hTERT-RPE1-Zellen effizienter funktionieren, sodass eine Induktion der *P-body*-Assemblierung bei Aktivierung der proinflammatorischen Genexpression nicht nötig ist. Auch die Beobachtung des verringerten Proteingehalts der untersuchten *P-body*-Proteine in hTERT-RPE1-Zellen im Vergleich zu HeLa-Zellen könnte diese Hypothese unterstützen. Um dies zu untersuchen, könnten *decapping*-Assays als weiterführende Experimente durchgeführt werden.

Da sich in hTERT-RPE1-Zellen trotz fehlender Induktion der *P-body*-Assemblierung IL-1 α -abhängige posttranslationale Modifikationen von *P-body*-Proteinen am Beispiel der Phosphorylierung von DCP1a beobachten ließen, bleibt die Funktion von *P-bodies* bzw. *P-body*-Proteinen im proinflammatorischen *signaling* weiterhin relevant. Möglicherweise haben die beschriebene posttranslationalen IL-1-abhängigen Modifikationen von DCP1a in dieser Zelllinie weniger starke Auswirkungen auf die Regulation der *P-body*-Assemblierung als es in HEK293IL-1R- und HeLa-Zellen der Fall ist oder weisen noch andere, *P-body*-unabhängige Funktionen auf (Rzeczkowski et al., 2011; Tenekeci et al., 2016). Für DCP1a wurde z.B. in einigen wenigen Arbeiten gezeigt, dass es auch in den Zellkern translozieren kann und eine schwache transkriptionelle Aktivität aufweist (Mayr-Buro et al., 2019; Rzeczkowski et al., 2011).

5.4 Dynamik von mRNA-Umsatz und subzellulärer Lokalisation von *IL8*- und *NFKBIA*-mRNAs zu EDC4 nach Transkriptionseinhibition

Zur näheren Untersuchung der Funktion von *P-bodies* bzw. ihrer Proteine wurde mittels IF-FISH die Lokalisation von *IL8*- und *NFKBIA*-mRNAs in Relation zu EDC4 als spezifischen *P-body*-Marker im basalen und IL-1 α -induzierten Zustand mit darauffolgender Transkriptionseinhibition durch Actinomycin D untersucht (vgl. Abb. 4.8). Dabei wurden die Transkriptspiegel, die *P-body*-Anzahl und der Anteil an *merges/P-bodies* für die jeweiligen Transkripte nach verschiedenen Actinomycin D-Inkubationszeitpunkten ermittelt.

Die Analyse der Transkriptmengen pro Zelle zu den unterschiedlichen Stimulationszeitpunkten zeigte (mit Ausnahme der basalen *IL8*-Transkriptmenge) anschaulich, dass durch längere Actinomycin D-Behandlung die Transkriptmengen immer weiter sanken. Dieses ist für Transkripte mit einer induzierbaren Genexpression und einer instabilen mRNA zu erwarten und demonstriert daher auch die korrekte Funktionalität des verwendeten Modellsystems. Im basalen Zustand zeigte sich in Bezug auf die *IL8*-mRNAs kaum eine Änderung der Transkriptspiegel infolge der Actinomycin D-Behandlung. Dies spricht dafür, dass die basal geringen Spiegel an *IL8*-mRNA kaum transtriptionell reguliert erscheinen und somit sehr stabile mRNAs darstellen.

Die größten Änderungen der Transkriptspiegel von *IL8* und *NFKBIA* wurden im basalen Zustand (ausgenommen *IL8*) und nach vorheriger IL-1 α -Stimulation für 15 bis 45 Minuten Actinomycin D-Behandlung beobachtet. Die Analyse der Koloalisationen von Transkripten und *P-bodies* pro Zelle zeigte (mit der Ausnahme von *IL8* im basalen Zustand), dass ein gewisser und konstant bleibender Prozentsatz an Transkripten in *P-bodies* aufzufinden ist. Dabei stieg der Anteil an *merges/P-bodies* durch IL-1 α -Stimulation deutlich an, ein Effekt, der aber im Wesentlichen auf den induzierten Transkriptanzahlen beruhte. Der Anteil an *merges/P-bodies* blieb (ausgenommen der basalen *IL8*-Transkriptmenge) mit abnehmenden Transkriptmengen nach Actinomycin D-Behandlung über einen Zeitraum von bis zu 60 Minuten nahezu konstant oder stieg leicht an. Erst nach längerer Actinomycin D-Behandlung, wenn die Transkriptgehalte pro Zelle schon weit abgesunken waren, fielen auch die Anteile an *merges/P-bodies*. Der Abfall der Anteile an *merges/P-bodies* folgte somit der Reduktion der Transkriptmengen zeitlich versetzt. Weiterhin konnte mit andauernder Actinomycin D-Behandlung auch eine Reduktion der *P-body*-Anzahl pro Zelle beobachtet werden.

Kritisch betrachtet sei an dieser Stelle anzuführen, dass der Anteil an Koloalisationen von Transkripten und *P-bodies* lediglich anhand von zweidimensionalen Bildern ausgewertet wurde, sodass nicht mit absoluter Sicherheit gewährleistet werden kann, dass die gezählten *merges* auch tatsächlich Transkripte darstellen, die sich in *P-bodies* befanden. Eine Auswertung unter Durchführung eines Z-Stapels, der eine dreidimensionale Darstellung ermöglicht, wäre eine alternative Methode, um den Anteil an *merges/P-bodies* genauer zu analysieren. Des Weiteren ist zu bedenken, dass vor

allem bei großen Transkriptanzahlen pro Zelle der Anteil an zufälligen Überlagerungen von Transkript und *P-bodies* ansteigt. Allerdings ließen sich auch nach 1 Stunde IL-1 α -Inkubation mit infolge 45 bzw. 60-minütiger Actinomycin D-Inkubation, als der Transkriptspiegel pro Zelle schon recht stark abgesunken war und der zufällige Fehler somit kleiner wurde, noch relativ viele *merges/P-bodies* pro Zelle detektieren.

Die Beobachtung, dass der starke Abfall der Transkriptmenge dem Abfall der *merges/P-bodies* für stabile (basal) und instabile (1 Stunde IL-1 α -Stimulation) mRNAs zeitlich vorausging, suggeriert, dass die erhöhten Anteile an *merges/P-bodies* nach Actinomycin D-Behandlung nicht nur zufällig beobachtet wurden. Erst nach 90-minütiger Actinomycin D-Behandlung, wenn die Transkriptmenge pro Zelle unter eine womöglich kritische Schwelle abgesunken war, war auch der Anteil an *merges/P-bodies* und gleichwohl die *P-body*-Anzahl pro Zelle gesunken. Die meisten Transkripte ließen sich jedoch zu jedem Zeitpunkt außerhalb von *P-bodies* detektieren. In Bezug auf die Funktion von *P-bodies* könnten diese Ergebnisse dahin interpretiert werden, dass bei anhaltender Hemmung des Nachschubs an Transkripten im basalen und IL-1 α -induzierten Zustand, die Zelle essenzielle Transkripte innerhalb von *P-bodies* vorübergehend speichert, und diese Komplexe erst bei anhaltender Transkriptionseinhibition ins Zytoplasma freigibt, da dort womöglich der Bedarf an mRNAs zur Proteinsynthese ansteigt (Abb. 5.1). Zur Überprüfung dieser Hypothese könnten in weiterführenden Experimenten *live-cell-imaging*-Versuche durchgeführt werden, bei denen mRNAs markiert werden und diese von ihrer Transkription bis zu ihrer Translation bzw. ihrem Abbau verfolgt werden können (Horvathova et al., 2017, Tutucci et al., 2018; Voigt et al., 2019).

Eine Reduktion der *P-body*-Anzahl nach Transkriptionseinhibition durch Actinomycin D ist aufgrund einer Abnahme des zytoplasmatischen *pools* an mRNA mehrfach in der Literatur beschrieben und konnte auch im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden (vgl. 1.3.2). Cougot et al. konnten in HEK293-Zellen nach 4-stündiger Actinomycin D-Behandlung eine signifikante Reduktion der *P-body*-Anzahl pro Zelle feststellen, während nach 8 Stunden keine *P-bodies* mehr detektiert werden konnten (Cougot et al., 2004). Es muss allerdings beachtet werden, dass HEK293-Zellen deutlich weniger *P-bodies* besitzen als hTERT-RPE1-Zellen (Cougot et al., 2004). In dieser Arbeit konnte eine beginnende Reduktion der *P-body*-Anzahl pro Zelle bereits nach 90 Minuten Actinomycin D-Behandlung festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung

dafür ist, dass die Transkriptmengen pro hTERT-RPE1-Zelle im Vergleich zu HEK293-Zellen möglicherweise schneller absinkt und daher die *P-body*-Assemblierung zu einem früheren Zeitpunkt beeinflusst wird. Des Weiteren wäre es denkbar, dass sich Änderungen der *P-body*-Assemblierung in Zellpopulationen, die eine höhere Anzahl an *P-bodies* pro Zelle enthalten und in denen diese homogener verteilt sind, wie es in hTERT-RPE1-Zellen der Fall ist, schneller bemerkbar machen.

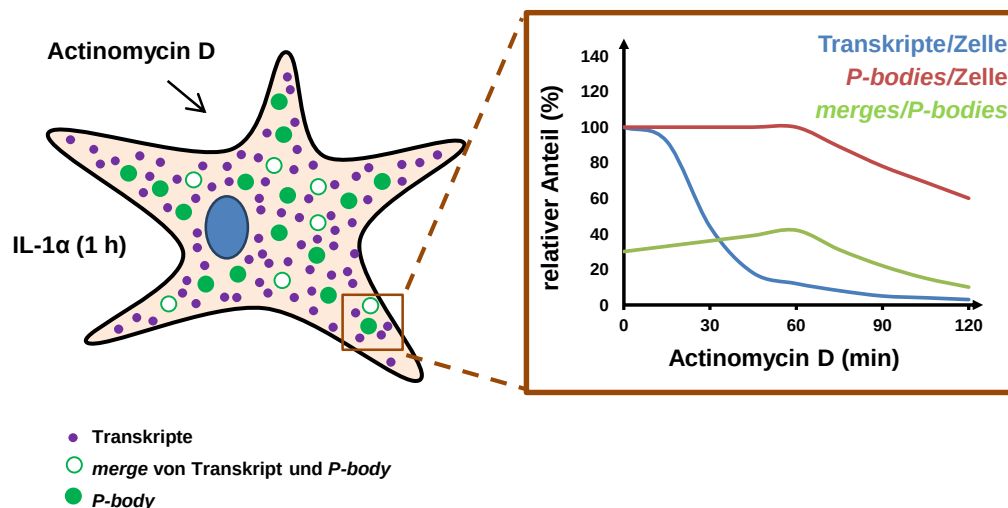


Abb. 5.1: Veränderungen der Transkriptmengen, *P-body*-Anzahl und Anteile an Kolokalisationen von Transkripten und *P-bodies* nach Transkriptionsinhibition durch Actinomycin D. Nach 1-stündiger IL-1α-Stimulation und darauffolgender Transkriptionsinhibition durch ActD sanken die Transkriptmengen proinflammatorischer Gene rapide ab. Der Anteil an Kolokalisationen von Transkripten und *P-bodies* (*merges/P-bodies*) sowie die *P-body*-Anzahl pro Zelle blieben zunächst konstant oder stiegen leicht an und sanken erst nach 60-minütiger ActD-Behandlung. Dieser Befund kann auf eine transiente Speicherung von Transkripten in *P-bodies* hinweisen, die so lange aufrecht erhalten wird, bis die zytoplasmatischen Transkriptmengen unter einen bestimmten Schwellenwert abfällt. Bei anhaltender Transkriptionsinhibition lösen sich die Aggregate aus Transkripten und *P-body*-Komponenten aufgrund eines erhöhten Transkriptbedarfs zur Proteinsynthese auf und werden ins Zytoplasma freigegeben werden. Vereinfachte graphische Darstellung des relativen Anteils (%) an Transkripten pro Zelle (normiert auf die Transkriptanzahl ohne ActD-Behandlung), an *P-bodies* pro Zelle (normiert auf die *P-body*-Anzahl ohne ActD-Behandlung) und der *merges/P-bodies*.

5.5 Erhöhte intrazelluläre Proteinspiegel von DCP1a und EDC4 beeinflussen die *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen

Anhand einer Überexpression von DCP1a und EDC4 sollte analysiert werden, inwiefern die intrazelluläre Konzentration dieser Proteine für die Regulation der *P-body*-Assemblierung von Relevanz ist. Dafür wurden in verschiedenen Experimenten die Expressionsvektoren pCIneo-λN-HA-EDC4 und peGFP-DCP1a und ihre entsprechenden Kontrollvektoren in hTERT-RPE1-Zellen transfiziert. Die Etablierung dieser Überexpressionen zeigte, dass es sich bei hTERT-RPE1-Zellen um eine schlecht zu transfizierende Zelllinie handelt (vgl. Abb. 4.9). Dennoch konnte aufgrund der Möglichkeit der probatorischen optischen Selektion von transfizierten Zellen aufgrund

der Eigenfluoreszenz von GFP bzw. der indirekten Immunfluoreszenz des HA-Proteins eine ausreichend große Zellpopulation ausgewertet werden.

Die Expression von GFP-DCP1a zeigte ein ähnliches Verhalten wie endogenes DCP1a (vgl. Abb. 4.10). Es konnte beobachtet werden, dass hTERT-RPE1-Zellen bei schwacher und starker DCP1a-Überexpression *P-body*-ähnliche Strukturen bildeten, die EDC4 rekrutieren. Bei schwacher Überexpression von DCP1a zeigte sich dabei eine vergleichbare *P-body*-Assemblierung wie in den Kontrollzellen, während bei starker Überexpression die *P-body*-Anzahl pro Zelle anstieg. Es könnte angenommen werden, dass es ein „Optimum“ der DCP1a Expression gibt, welches für die normale, physiologische Assemblierung von *P-body*-Strukturen benötigt wird. Unterhalb dieses Expressionsniveaus sinkt die *P-body*-Anzahl ab, während es bei extremer Überexpression sogar zu einem dominant negativen Effekt und zur Sequestrierung von *P-bodies* kommen könnte. Letzteres Phänomen konnte in einzelnen Zellen beobachtet werden. In der AG Kracht konnten ähnliche Befunde auch in HeLa-Zellen erhoben werden. Auch hier zeigte sich eine Rekrutierung von EDC4 und eine Induktion der *P-body*-Assemblierung nach Überexpression von DCP1a (Tenekeci, 2018). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass DCP1a allein die *P-body*-Bildung fördern kann. Inwiefern diese Verstärkung der *P-body*-Aggregation jedoch die *decapping*-Aktivität beeinflusst, konnte anhand dieser Versuche nicht festgestellt werden. Dafür könnte in weiterführenden Experimenten die *decapping*-Aktivität nach Überexpression von DCP1a z.B. anhand eines *decapping*-Assays untersucht werden (Rezczkowski et al., 2011).

Weiterhin konnte durch Expression von λ N-HA-EDC4 eine Erhöhung der intrazellulären EDC4-Proteinspiegel erzielt werden. Da in den Kontrollzellen, die mit dem entsprechenden Leervektor transfiziert wurden, optisch nicht zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen unterschieden werden konnte, ließ sich in diesem Fall nicht mit absoluter Sicherheit sagen, dass das HA-tag im Gegensatz zu GFP keinen Einfluss auf die *P-body*-Assemblierung hat. Es lässt sich jedoch, unter Annahme einer erfolgreichen Transfektion, sagen, dass das tag allein nicht zu einer Auflösung der *P-body*-Strukturen geführt hat. Wie auch in HeLa-Zellen konnte in hTERT-RPE1-Zellen bei starker Überexpression von EDC4 eine deutliche Reduktion der *P-body*-Anzahl bis hin zu einem kompletten Verlust beobachtet werden (Tenekeci, 2018). Bei schwacher Überexpression hingegen zeigte sich eine ähnliche *P-body*-Assemblierung

wie in den Kontrollzellen. Dieser Befund steht somit im Einklang mit der Auffassung, dass die *P-body*-Assemblierung in humanen Zellen entscheidend von der korrekten Menge an EDC4 abhängig ist, wie man es von einem *scaffolding*-Protein erwarten würde (Burack & Shaw, 2000; Chang et al., 2014; Seto et al., 2015; Tenekeci, 2018).

5.6 XRN1 reguliert die *P-body*-Assemblierung und senkt den basalen mRNA-*steady-state-level*

Zur Untersuchung der Funktion der 5′-3′-Exoribonuklease XRN1 für die Regulation der *P-body*-Assemblierung und die IL-1 α -induzierten Genexpression wurde ein transienter siRNA-vermittelter *knockdown* erzielt. Obwohl nach Quantifizierung der Proteinmengen im Western Blot der *knockdown* nicht absolut war, konnte dennoch in der indirekten Immunfluoreszenz eine deutlich sichtbare Reduktion der Farbintensität des XRN1-Proteins in einem Teil der Zellpopulation beobachtet werden (vgl. Abb. 4.14), die sich auch in der IF-FISH rekapitulieren ließ (vgl. Abb. 4.15), sodass eine optische Selektion der Zellen mit einer Reduktion des XRN1-Proteins möglich war.

Die Analyse der *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen zeigte bei Depletion von XRN1 eine statistisch signifikante Reduktion der *P-body*-Anzahl um etwa 30 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu konnten Sheth & Parker in Hefezellen bei Depletion von XRN1 einen signifikanten Anstieg der *P-body*-Anzahl und -Größe beobachten, wobei mRNA-Abbau-Produkte in *P-bodies* zu kumulieren schienen (Sheth & Parker, 2003). Diese Kumulation wurde auch besonders bei ektopisch exprimierten mRNAs mit polyG-Abschnitten in der 3′ UTR deutlich, die nicht komplett abgebaut werden und sich daher in der Zelle anhäufen (Sheth & Parker, 2003). Als Ursache für diese Unterschiede kommt als Erklärung eher kein zu schwacher *knockdown* in hTERT-RPE1-Zellen in Frage, da HeLa-Zellen mit stabiler und langfristiger XRN1-Depletion ähnliche Befunde wie in hTERT-RPE1-Zellen zeigen. Dieser *knockdown* wurde in der AG Kracht mittels CRISPR/Cas9-System erzielt und demonstrierte zusätzlich eine Größenzunahme einzelner *P-body*-Signale (Tenekeci, 2018). Diese Größenzunahme ließ sich optisch nicht in hTERT-RPE1-Zellen reproduzieren, wurde jedoch auch nicht spezifisch vermessen. Es muss daher eher ein zelltypspezifischer Unterschied zwischen Hefe- und humanen Zellen vorliegen, der die unterschiedliche *P-body*-Assemblierung bei XRN1-Depletion erklärt.

Mittels IF-FISH wurde in hTERT-RPE1-Zellen untersucht, inwiefern die Depletion von XRN1 die basale und IL-1 α -induzierte Genexpression von *IL8* und *NFKBIA* beeinflusst (vgl. Abb. 4.15). Zunächst einmal sei erwähnt, dass in den Kontrollzelllinien für beide Transkripte ähnliche Befunde erhoben wurden wie in 4.3.2, was darauf schließen lässt, dass der Transfektionsstress in Bezug auf proinflammatorische Genexpression wenig Einfluss auf die Zellen zu haben schien. Es fiel jedoch auf, dass nach 3 Stunden IL-1 α -Inkubation die Mediane und Boxen im *box plot* für *IL8* in Relation zu den Daten nach 1 Stunde IL-1 α -Stimulation etwas nach oben verschoben sind. Da dieses Resultat sowohl bei Depletion von XRN1 als auch in den beiden Kontrollzelllinien zu beobachten war, kommen als Erklärung dafür nur versuchstechnische Unterschiede zu den vorherigen Experimenten in Betracht. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Zellpopulation in der IF-FISH zum Zeitpunkt der IL-1 α -Stimulation aufgrund der längeren Inkubationszeit im Brutschrank etwas dichter war als in der FISH, obwohl die Zelldichten für die jeweiligen Versuche gut getestet wurden (vgl. 3.1.2.1). Das würde zumindest auch die in 5.1 aufgestellte Hypothese der starken interzellulären parakrinen Effekte unterstützen, die aufgrund höherer Zelldichte stärker zur Ausprägung kommen würden.

Die Analyse der IL-1 α -abhängigen Genexpression zeigte bei XRN1-Depletion im Vergleich zu den Kontrollzelllinien eine Erhöhung des basalen *NFKBIA*- und *IL8*-Transkriptspiegels, was sich auch tendenziell in einer einmalig durchgeführten RTqPCR auf Gesamtzellebene ohne Selektion reproduzieren ließ. Die IL-1 α -induzierten Transkriptmengen schienen durch die Inhibierung des 5'-3'-mRNA-Abbaus unbeeinflusst, sodass, bezogen auf die basale Transkriptmenge, von einer geringeren Induktion des mRNA-*steady-state-levels* im Vergleich zu den Kontrollzellen ausgegangen werden kann. Gemessen wurde diese jedoch nicht. In der AG Kracht konnte in HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem XRN1-*knockdown* ebenfalls eine basale und auch eine IL-1 α -induzierte Stabilisierung von *NFKBIA*- und *IL8*-mRNAs beobachtet werden, die mit einem erhöhten basalen Transkriptspiegel und einer kompensatorisch geringeren IL-1 α -abhängigen Induktion der mRNA-*steady-state-level* einher gingen (Tenekeci, 2018). Diese Befunde sprechen für eine mRNA-Stabilisierung durch Inhibition des 5'-3'-mRNA-Abbaus. Zur Bestätigung dieser Hypothese könnten in weiterführenden Experimenten bei stabilem XRN1-*knockdown*

unter Verwendung einer RTqPCR die basalen und IL-1 α -induzierten mRNA-*steady-state-level* und entsprechende mRNA-Stabilitätsmessungen durchgeführt werden.

Einzelzellanalysen von HeLa-Zellen mit stabilem CRISPR/Cas9-vermitteltem XRN1-*knockdown* in der AG Kracht haben des Weiteren eine selektive Lokalisation von *NFKBIA*-Transkripten in verbleibenden größeren *P-bodies* gezeigt, die im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne IL-1 α -Stimulation von ca. 6 % auf ca. 76 % *merges/P-bodies* anstieg (Tenekeci, 2018). Dieser erhöhte Anteil an Kolokalisationen von *NFKBIA*-mRNAs und *P-bodies* ließ sich ebenfalls nach IL-1 α -Stimulation nachweisen und könnte darauf hinweisen, dass *P-bodies* eher eine mRNA-Speicherfunktion besitzen (Tenekeci, 2018). Diese Beobachtung wurde zum Anlass genommen, den Anteil an Kolokalisationen von *NFKBIA*-mRNAs und *P-bodies* in hTERT-RPE1-Zellen zu ermitteln, konnte jedoch nicht in diesem Maße reproduziert werden. Diese zum Teil unterschiedlichen Befunde in HeLa-Zellen und hTERT-RPE1-Zellen können möglicherweise durch die unterschiedlichen XRN1-*knockdown*-Bedingungen erklärt werden. Während in HeLa-Zellen mittels CRISPR/Cas9-System ein starker und dauerhafter *knockdown* erzielt werden konnte, konnte in hTERT-RPE1-Zellen nur ein siRNA-vermittelter transienter, heterogener und weniger stark ausgeprägter *knockdown* erreicht werden. So kann es einerseits möglich sein, dass der XRN1-*knockdown* in hTERT-RPE1-Zellen nicht komplett genug war, um eine verstärkte Rekrutierung von *NFKBIA* in *P-bodies* zu erzielen. Andererseits wäre es denkbar, dass die verstärkte Rekrutierung von *NFKBIA*-mRNAs in die *P-bodies* eine langfristige Anpassung darstellt und bei einer transienten XRN1-Depletion noch nicht vorhanden ist. Diese Hypothese könnte überprüft werden, indem parentale HeLa-Zellen mit siXRN1 transfiziert werden und eine IF-FISH durchgeführt wird, in der EDC4 und *NFKBIA*-mRNAs angefärbt werden. Unterschiede in zelltypspezifischen Regulationsmechanismen der RNA-Zusammensetzung von *P-bodies* stellen eine weitere Erklärung für die verstärkte Lokalisation von *NFKBIA*-mRNAs in *P-bodies* bei Depletion von XRN1 dar. Für einen genaueren Vergleich der Ergebnisse zu HeLa-Zellen mit stabilem XRN1-*knockdown*, wäre es sinnvoll auch in hTERT-RPE1-Zellen einen stabilen CRISPR/Cas9-vermittelten XRN1-*knockdown* zu etablieren, wobei ein anderer Selektionsvorgang gewählt werden müsste (Ran et al., 2013).

Unter Berücksichtigung aller Befunde aus den Experimenten zur Depletion von XRN1 in hTERT-RPE1-Zellen lässt sich zusammenfassen, dass XRN1 in seiner Funktion als

5'-3'-Exoribonuklease für einen erhöhten mRNA-Abbau und damit für eine Verringerung der mRNA-Stabilität sorgt und die *P-body*-Bildung (IL-1 α -unabhängig) fördert. Die Beobachtungen, dass bei Depletion von XRN1 der basale mRNA-Spiegel ansteigt, während zeitgleich die *P-body*-Assemblierung gehemmt wird, stehen im Widerspruch zu der in der Literatur vertretenden Auffassung, dass bei Anstieg des zytoplasmatischen *pools* an mRNAs die *P-body*-Assemblierung gefördert würde (Teixeira et al., 2005). Die Konstellation in dieser Arbeit kann für eine Funktion von *P-bodies* im 5'-3'-mRNA-Abbau sprechen, sodass aufgrund der Depletion der 5'-3'-Exoribonuklease vermehrt alternative Abbauewege im Zytoplasma angeschaltet werden und die *P-body*-Anzahl abnimmt. Wenn diese Hypothese zutreffen würde, würde man jedoch wahrscheinlich eine deutlichere Reduktion der *P-body*-Anzahl erwarten. Vielmehr wäre es denkbar, dass *P-bodies* als temporärer Speicherort fungieren und bei stabilisierten mRNAs, wie es nach kurzfristiger Hemmung des 5'-3'-mRNA-Abbaus der Fall ist, diese Rolle in gewissem Maße aufgeben, da diese bei stabilisierten mRNAs nicht nötig ist. Das könnte dann dazu führen, dass sich ein Teil der *P-bodies* durch eine Freisetzung von mRNAs und *P-body*-Proteinen ins Zytoplasma auflösen, wo die mRNAs dann translatiert oder durch alternative Abbauewege abgebaut werden können (Abb. 5.2). Inwiefern der *knockdown* diese beiden wichtigen Schritte des Metabolismus beeinflusst, müsste in weiteren gezielten Experimenten geklärt werden. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass in HeLa-Zellen mit stabilem XRN1-*knockdown* beobachtet werden konnte, dass die erhöhte Stabilität von *NFKBIA*-mRNAs keinen Einfluss auf den I κ B α -Proteinspiegel hat (Tenekeci, 2018). Bei langfristiger Depletion von XRN1 könnte dann zusätzlich eine Regulation der RNA-Zusammensetzung der *P-bodies* von Bedeutung sein, damit z.B. eine erhöhte *NFKBIA*-mRNA-Stabilität abgepuffert werden kann.

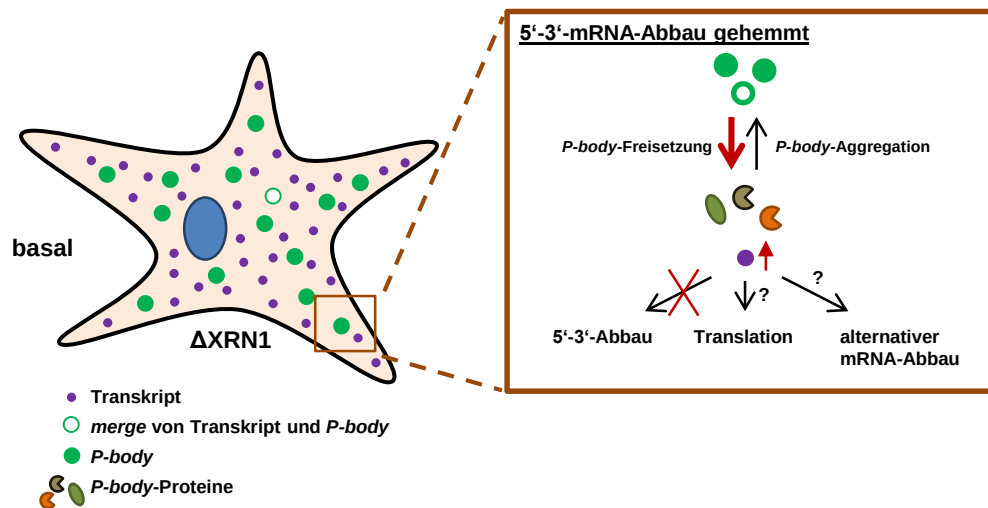


Abb. 5.2: Modell des Einflusses der Depletion von XRN1 auf die *P-body*-Assemblierung und das basale mRNA-steady-state-level. Durch Depletion von XRN1 konnte eine Reduktion der *P-body*-Anzahl pro Zelle sowie ein erhöhter basaler Transkriptspiegel beobachtet werden, was auf eine indirekte Stabilisierung von mRNAs durch den XRN1-Verlust hindeutet. Da *P-bodies* ein dynamisches Verhalten der Assemblierung zeigen, ist eine Dynamik zugunsten der Freisetzung von stabilisierten mRNAs und mRNA-Abbau-Proteinen in das Zytoplasma denkbar. Im Zytoplasma können mRNAs bei inhibiertem 5'-3'-mRNA-Abbau in alternative Abbauewege eingeschleust werden (z.B. über das Exosome) oder zur Proteinsynthese genutzt werden.

5.7 EDC4 reguliert die *P-body*-Assemblierung und erhöht den basalen mRNA-steady-state-level

Zur Funktionsanalyse des *scaffolding*-Proteins EDC4 bei der Regulation der *P-body*-Assemblierung und der IL-1 α -induzierten Genexpression wurde ebenfalls ein transienter siRNA-vermittelter *knockdown* erzielt. Da im Western Blot unter Verwendung der gleichen Transfektionsbedingungen wie für XRN1 der EDC4-*knockdown* nicht hinreichend war, wurde hier die Inkubationszeit nach Durchführung der Transfektion verlängert, wodurch der *knockdown* effizienter wurde. Eine mögliche Erklärung dafür wäre im Vergleich zu XRN1 eine erhöhte Stabilität des EDC4-Proteins in hTERT-RPE1-Zellen. Auch hier konnte in der indirekten Immunfluoreszenz (vgl. Abb. 4.18) eine deutlich sichtbare Reduktion der Farbintensität des Proteins beobachtet und sogar ein Phänotyp ohne sichtbare *P-bodies* identifiziert werden. Anhand dieses Phänotyps wurde dann in der IF-FISH (vgl. Abb. 4.19) der EDC4-*knockdown* identifiziert und analysiert.

Die Analyse der *P-body*-Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen zeigte bei Depletion von EDC4 eine signifikante Reduktion der *P-body*-Anzahl um etwa 76 % im Vergleich zu den Kontrollzellen, wobei sich weiterhin in 28 % der Zellen gar keine *P-bodies* mehr detektieren ließen. Da im unbehandelten Zustand kaum hTERT-RPE1-Zellen ohne *P-bodies* zu beobachten waren, ist dies ein deutliches Unterscheidungsmerkmal. Dieser

Befund konnte in der AG Kracht ebenfalls in HeLa-Zellen mit CRISPR/Cas9-vermitteltem stabilem EDC4-*knockdown* erhoben werden (Tenekeci, 2018). Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass bei starker EDC4-Überexpression die *P-body*-Assemblierung ebenfalls inhibiert wurde (im Sinne eines dominant negativen Effektes wie für DCP1a weiter oben diskutiert), unterstützen diese Daten die in anderen Spezies und Modellsystemen erhobene Beobachtung, dass die Konzentration an EDC4 entscheidend zur *P-body*-Assemblierung in humanen Zellen beiträgt (Chang et al., 2014; Eulalio et al. 2007a, Seto et al., 2015; Tenekeci, 2018). Daraufhin wurde, unter Kenntnis der reduzierten *P-body*-Bildung bei Depletion von EDC4, dessen Einfluss auf die Genexpression analysiert.

Dafür wurde mittels IF-FISH untersucht, inwiefern der *knockdown* von EDC4 die basale und IL-1 α -induzierte Genexpression verändert. Dabei konnte im Vergleich zu den Kontrollzelllinien bei starker Depletion von EDC4 eine signifikante Reduktion des basalen *NFKBIA*-Transkriptspiegels beobachtet werden, was sich auch in einer einmalig durchgeführten RTqPCR auf Gesamtzelebene reproduzieren ließ. Diese zeigte zusätzlich eine Reduktion des basalen *IL8*-Transkriptspiegels, welcher in der IF-FISH vermutlich aufgrund der generell geringen basalen Transkriptmengen nicht zu beobachten war. Nach IL-1 α -Stimulation konnten im Vergleich zu den Kontrollzellen keine relevanten Veränderungen der Transkriptspiegel beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte in der AG Kracht in HeLa-Zellen mit stabilem EDC4-*knockdown*, ähnlich zum *XRN1-knockdown*, eine basale und IL-1 α -induzierte Stabilisierung von *NFKBIA*- und *IL8*-mRNAs beobachtet werden, die ebenfalls mit einem erhöhten basalen Transkriptspiegel und einer kompensatorisch geringeren IL-1 α -abhängigen Induktion der mRNA-*steady-state-level* einhergingen (Tenekeci, 2018). Dieser Befund in HeLa-Zellen kann durch die Beobachtung erklärt werden, dass EDC4 die *decapping*-Aktivität und damit den mRNA-Abbau fördert (Fenger-Gron et al., 2005). Eine Reduktion des basalen Transkriptspiegels bei kompletter Auflösung der *P-bodies*, wie es in dieser Arbeit in hTERT-RPE1-Zellen zu beobachten war, spricht hingegen eher für eine Reduktion der mRNA-Stabilität durch den EDC4-*knockdown* oder auch für eine Kompensation im Sinne des „*transcript bufferings*“ (Braun & Young, 2014). Auch in diesem Fall könnten weiterführende spezifische mRNA-Stabilitätsmessungen und Messung der mRNA-Transkription diese Hypothese näher untersuchen.

Als Grund für diese unterschiedlichen Befunde bezüglich der Genexpression in HeLa- und hTERT-RPE1-Zellen kann erneut die unterschiedliche Methodik zum Erreichen des EDC4-*knockdowns* angeführt werden. Allerdings konnte sowohl durch den starken und stabilen CRISPR/Cas9-vermittelten EDC4-*knockdown* in HeLa-Zellen als auch durch den transienten siRNA-vermittelten *knockdown* in hTERT-RPE1-Zellen, wenn auch nur in einzelnen Zellen, eine komplette Depletion der *P-bodies* erreicht werden, sodass eine zu geringe *knockdown*-Effizienz in hTERT-RPE1-Zellen als Erklärung ausgeschlossen werden kann. Es kommt hinzu, dass in der IF-FISH lediglich Zellen ohne *P-bodies* berücksichtigt wurden. Vielmehr muss die mRNA-Stabilisierung bei Depletion von EDC4 in HeLa-Zellen eine langfristige Anpassung darstellen oder es müssen zellspezifische Unterschiede in der Regulation des mRNA-Abbaus, zum Beispiel eine verminderte Förderung des *decappings* durch EDC4, oder der Translation existieren. Daher wäre es einerseits sinnvoll in weiterführenden Experimenten zu testen, inwiefern die Proteinsynthese z.B. von I κ B α und die *decapping*-Aktivität durch den *knockdown* beeinflusst werden. Andererseits würden Untersuchungen der IL-1 α -abhängigen Genexpression bei Transfektion von siEDC4 in HeLa-Zellen bzw. bei Erreichen eines stabilen EDC4-*knockdowns* in hTERT-RPE1-Zellen Klarheit über die oben genannten Hypothesen für den unterschiedlichen Einfluss von EDC4 schaffen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass EDC4 in seiner Funktion als *scaffolding*-Protein des *decapping*-Komplexes (und XRN1) in der richtigen Konzentration für eine *P-body*-Assemblierung in humanen Zellen eine essenzielle Rolle spielt, sodass bei starker Depletion von EDC4 keine *P-body*-Assemblierung mehr möglich ist und die dort lokalisierten mRNAs inklusive der *P-body*-Proteine ins Zytoplasma freigegeben werden müssen. Dadurch verliert die Zelle die spezifische Funktion der *P-bodies*. Jedoch zeigt sich infolgedessen in hTERT-RPE1-Zellen wider Erwarten keine Erhöhung, sondern eine Reduktion des basalen *NFKBIA*-Transkriptspiegels, was die Speicherhypothese von *P-bodies* unterstützt (Abb. 5.3). Bei Depletion von EDC3 und des C-Terminus von Lsm4 in Hefezellen, wodurch, wie bei Depletion von EDC4, die *decapping*-Aktivität reduziert sein sollte, konnten Huch & Nissan ebenfalls eine verminderte *P-body*-Formation sowie eine mRNA-Destabilisierung beobachten (Huch & Nissan, 2017). Als Erklärung für diese Beobachtung nahmen sie an, dass *P-bodies* als Speicher von Proteinen des mRNA-Abbaus fungieren, welche bei Inhibierung der *P-body*-Assemblierung ins Zytoplasma freigesetzt würden, wo der mRNA-Abbau ubiquitär

stattfindet (Huch & Nissan, 2017). Diese Hypothese ist vereinbar mit den in dieser Arbeit eruierten Befunden zur Depletion von EDC4. Inwiefern bei Depletion von EDC4 in hTERT-RPE1-Zellen jedoch tatsächlich der 5'-3'-mRNA-Abbau, alternative Abbauewege im Zytoplasma oder sogar die Proteinsynthese gefördert werden, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

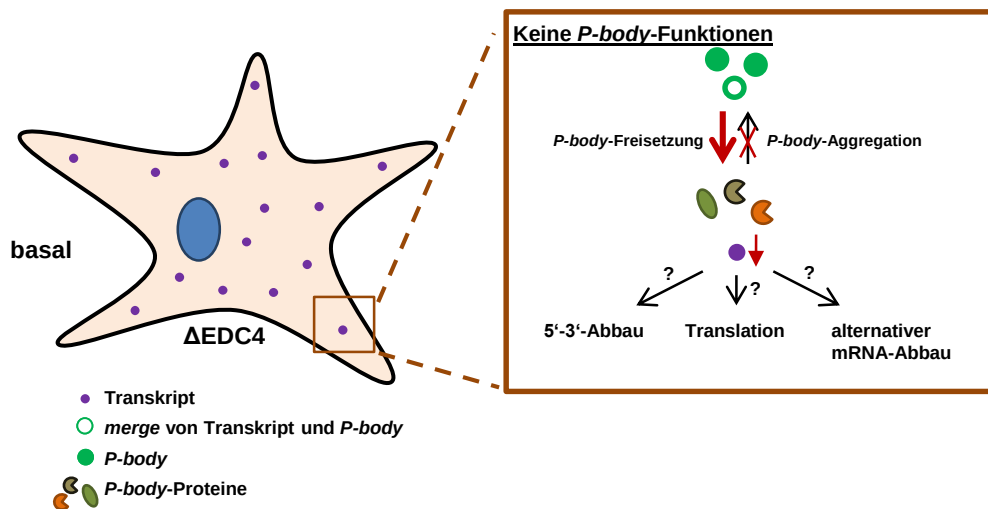


Abb. 5.3: Modell des Einflusses der Depletion von EDC4 auf die P-body-Assemblierung und das basale mRNA-steady-state-level. Durch Depletion von EDC4 konnte eine Auflösung der P-bodies sowie ein reduzierte basaler Transkriptspiegel beobachtet werden. mRNAs und mRNA-Abbau-Proteine werden ins Zytoplasma freigesetzt, wo der mRNA-Spiegel aufgrund von mRNA-Abbau-Prozessen und Proteinsynthesewegen beeinflusst wird. Diese Beobachtungen deuten auf eine Induktion der mRNA-Stabilität durch EDC4 hin. Da EDC4 ebenfalls für eine Assemblierung von P-bodies sorgt, wäre es denkbar, dass diese als Orte der Speicherung für mRNAs und mRNA-Abbau-Proteine fungieren.

5.8 Ausblick

Insgesamt konnte in dieser Arbeit anhand der Untersuchung der IL-1-Antwort in hTERT-RPE1-Zellen eine Relevanz von P-bodies bzw. P-body-Proteinen im basalen und Stress-induzierten mRNA-Metabolismus gezeigt werden. Für die Beantwortung der Frage nach der spezifischen Funktion von P-bodies konnten einige Anhaltspunkte geliefert und Hypothesen aufgestellt werden, welche jetzt in weiterführenden Experimenten näher untersucht werden können.

Zur Interpretation der Ergebnisse in dieser Arbeit bleiben vor allem in Bezug auf die Regulation der Zytokin-vermittelten Genexpression und Proteinsynthese noch einige Aspekte ungeklärt. Um nähere Aussagen über die Beeinflussung der Translation nach IL-1 α -Stimulation treffen zu können, wäre es sinnvoll, in weiterführenden Experimenten die Proteinsyntheseraten der untersuchten IL-1-abhängigen Gene *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* näher zu untersuchen. Des Weiteren wäre die Durchführung von *deapping*-Assays zur Einschätzung der Aktivität des 5'-3'-mRNA-Abbaus interessant.

In Zusammenschau mit den hier durchgeführten Experimenten könnte so näher analysiert werden, wie die basalen und IL-1 α -induzierten mRNA-Spiegel insbesondere nach Actinomycin D-Behandlung und nach Depletion einzelner *P-body*-Komponenten entstehen, um so indirekt auf die Funktion von *P-bodies* schließen zu können. Ergänzend könnten PLA-Experimente, wie in HeLa-Zellen durchgeführt, nähere Auskunft über die direkten Protein/Protein-Interaktionen der mRNA-abbauenden Proteine geben, um so Orte des mRNA-Abbaus näher lokalisieren zu können (Tenekeci, 2020). Um eine direkte Aussage zur Funktion von *P-bodies* im RNA-Metabolismus machen zu können, könnten, wie bereits oben erwähnt, *live-cell-imaging*-Experimente weiterhelfen, in denen mRNAs von Synthese bis Abbau bzw. Translation verfolgt werden könnten. Zur Untersuchung der Funktion einzelner *P-body*-Proteine sollte die Etablierung eines effizienteren, dauerhaften und regulierbaren *knockdowns* in hTERT-RPE1-Zellen angestrebt werden, um möglicherweise deutlichere Effekte auf die *P-body*-Assemblierung und mRNA-Gehalte erhalten zu können. Weiterführend wären dann auch Doppel- und Dreifach-*knockdown*-Ansätze erstrebenswert.

In Bezug auf die Funktion von RPE1-Zellen in ophthalmologischen Erkrankungen wäre es interessant zu analysieren, inwiefern sich IL-1-Reaktion, mRNA-Stabilitäten und *P-body*-Status in hTERT-RPE1-Zellen von primären RPE1-Zellen unterscheiden. Speziell ein Vergleich zu RPE1-Zellen von Patienten mit bekannter diabetischer Retinopathie oder altersbedingter Makuladegeneration wäre von Bedeutung, um weitere mögliche molekulare Mechanismen in der Pathogenese zu verstehen, die in Zukunft potenzielle Ziele möglicher Therapeutika darstellen können.

6 Zusammenfassung

Entzündungsreaktionen werden von Zytokinen, einschließlich Mitgliedern der Interleukin-1-Familie, gesteuert und koordiniert. Die Bindung von IL-1 an seinen heterodimeren Rezeptor initiiert Signaltransduktionskaskaden, die die *de novo* Synthese und die posttranskriptionelle Prozessierung von pro- und antiinflammatorisch wirkenden mRNAs (z.B. *IL8*, *IL6*, *NFKBIA*) regulieren. Die Interaktion von mRNAs mit Proteinen in Form von RNP-Partikeln beeinflusst den gesamten Lebenszyklus eines RNA-Moleküls, inklusive dem mRNA-Abbau. Der deadenylierungsabhängige mRNA-Abbau in 5'-3'-Richtung stellt einen Hauptweg dar, bei dem unter anderem die *decapping*-Faktoren DCP1a und DCP2, *decapping*-Aktivatoren EDC3 und EDC4 und die 5'-3'-Exoribonuklease XRN1 beteiligt sind. Diese Proteine aggregieren dynamisch mit Poly(A)-mRNAs in zytoplasmatischen Foci, die als *P-bodies* bezeichnet werden. Bisher erfolgten die meisten Untersuchungen in transformierten Säugetierzelllinien oder in Hefen. Die (patho-) physiologische Rolle von *P-bodies* in höheren Eukaryoten ist noch nicht ausreichend geklärt, es werden jedoch allgemein insbesondere zwei Hypothesen vertreten. Einerseits gibt es Hinweise, dass *P-bodies* eine Rolle beim mRNA-Abbau spielen, andererseits sprechen Beobachtungen für eine Funktion bei der Speicherung von mRNAs und *P-body*-Proteinen unter bestimmten Stressbedingungen. Veröffentlichte Daten aus der AG Kracht haben gezeigt, dass IL-1 die Phosphorylierung von DCP1a an Serin 315 über JNK und TRAF6 fördert und die *P-body*-Assemblierung in HEK293-IL1R-Zellen induziert, was auf eine Zytokin-abhängige Zusammensetzung von *P-bodies* hinweist. Ziel dieser Dissertation war es, in diesem Kontext, die Bildung und den mRNA-Gehalt von *P-bodies* nach IL-1-Stimulation in hTERT-RPE1-Zellen, als humane epitheliale und diploide Zelllinie, zu untersuchen. Untersuchungen zur Kinetik der IL-1-induzierten Genexpression weisen auf eine schnelle Induktion der NF- κ B-Zielgene *IL6*, *IL8* und *NFKBIA* auf Ebene der Transkription mit gleichzeitiger Destabilisierung am Höhepunkt der Zytokin-vermittelten mRNA-Induktion hin. Die Veränderungen der basalen und IL-1-abhängigen mRNA-Stabilitäten wurden durch eine detaillierte Visualisierung von Transkripten und *P-bodies* nach Inhibierung der Transkription durch eine Behandlung mit Actinomycin D unterstützt. Diese Daten verdeutlichen ein dynamisches Umordnen von *P-bodies* in menschlichen diploiden Zellen und können für eine vorübergehende Speicherung „wertvoller“ mRNAs während einer Zytokin-abhängigen Entzündung sprechen. Einen IL-1-abhängigen Effekt auf die Aggregation endogener *P-body*-Proteine konnte nicht verzeichnet werden. In

weiterführenden Experimenten wurde die *P-body*-Zusammensetzung durch Überexpression oder Depletion einzelner *P-body*-Proteine gestört und visualisiert. Wie auch schon in HeLa-Zellen nachgewiesen, konnte ein Auflösen der *P-bodies* durch Überexpression und Depletion von EDC4 beobachtet werden, was für eine essenzielle Rolle dieses *scaffolding*-Proteins für die *P-body*-Bildung spricht. Weiterhin konnte ein XRN1-abhängiger destabilisierender und ein EDC4-abhängiger stabilisierender Effekt auf IL-1-abhängige Transkripte beobachtet werden, was die Funktion von *P-bodies* bei der Entzündungsreaktion im menschlichen Körper hervorhebt.

7 Summary

Inflammation is controlled and coordinated by cytokines, including members of the interleukin-1 family. IL-1 binding to its heterodimeric receptor initiates signal transduction cascades that transiently regulate *de novo* synthesis and post-transcriptional processing of pro- and anti-inflammatory mRNAs (e.g. *IL8*, *IL6*, *NFKBIA*). The interaction of mRNAs with proteins to form RNP particles affects the lifecycle of an RNA molecule, including mRNA decay. The decapping factors DCP1a and DCP2, as well as the decapping activators EDC3 and EDC4 and the 5'-3'-exoribonuclease XRN1 are involved in the deadenylation-dependend pathway of mRNA-degradation in 5'-3'-direction, one of the major mRNA decay pathways. These proteins dynamically aggregate together with polyA-mRNA in cytoplasmic foci called P-bodies. The (patho-) physiological role of P-bodies in higher eukaryotic cells is still unclear. So far, most of the evidence concerning P-body formation was obtained in transformed mammalian cell lines or in yeast and has led to two hypotheses on putative P-body functions. While some early evidence points to P-bodies as sites of increased mRNA decay, other more recent observations suggest a role in storage of mRNAs and P-body proteins under conditions of stress. Published data from the working group Kracht have shown that IL-1 promotes the phosphorylation of DCP1a at serine 315 through JNK and TRAF6 and increases P-body assembly in HEK293-IL1R cells providing new evidence that alterations in P-bodies are part of the cytokine response. Within this context, the aim of this dissertation was to investigate the formation and mRNA content of P-bodies under basal and IL-1-stimulated conditions in hTERT-RPE1 cells, as a human epithelial and diploid cell line. Investigations of IL-1-dynamics reveal that *IL6*, *IL8* and *NFKBIA* as NF- κ B target genes are not only rapidly induced at the level of transcription but are simultaneously destabilized at the peak of cytokine-mediated mRNA induction. The changes in basal and IL-1-dependent mRNA stabilities were supported by detailed visualization of transcripts and P-bodies after inhibition of transcription by treatment with actinomycin D. These data show a dynamic rearrangement of P-bodies in diploid human cells and also suggest a transient storage of "valuable" mRNAs during cytokine-induced inflammation. The aggregation of endogenous P-body proteins were unaffected by IL-1. In further experiments, the P-body composition was perturbed and visualized through overexpression or depletion of individual P-body proteins. In line with recent results from HeLa cells, hTERT-RPE1 cells also showed a dissolution of P-bodies upon overexpression and depletion of EDC4, which suggests an essential role of this

scaffolding protein in P-body formation. Furthermore, an XRN1-dependent destabilizing and an EDC4-dependent stabilizing effect on IL-1-dependent transcripts could be observed, which accentuate the function of P-bodies in the cellular response to inflammatory conditions.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
AMD	<i>adenylate-uridylate-rich elements-mediated mRNA decay</i>
AP	<i>activator protein</i>
APOBEC3G	<i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide Like 3G</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	<i>adenylate-uridylate-rich elements</i>
Art	Artikel
ATCC	<i>american type cell collection</i>
ATF	<i>activating transcription factor</i>
AU	<i>adenylate-uridylate</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CARM1	<i>coactivator-associated arginine methyltransferase 1</i>
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
Ccr4/Not	<i>carbon catabolite repressor protein 4-negative on TATA</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAMP	<i>damage- / danger-associated molecular pattern</i>
DBM	<i>DCP1-binding motif</i>
DCP	<i>mRNA-decapping enzyme</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Dhh1	<i>DEAD-box RNA helicase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>desoxynucleotidtriphosphate</i>
EDC	<i>enhancer of mRNA-decapping</i>
EDEN	<i>embryo deadenylation element</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4E	<i>Eucaryotic translation initiation factor 4E</i>
EVH1	<i>enabled/VASP homology 1</i>
FAM	Carboxyfluorescein
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm/ Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
ggf	gegebenenfalls
gt	<i>goat</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEBS	<i>HEPES-buffered saline</i>

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hTERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
I κ B	<i>inhibitor of nuclear factor B</i>
IF	Indirekte Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>inhibitor of nuclear factor B Kinase</i>
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-1RAcP	Interleukin-1-Rezeptor <i>accessory</i> Protein
IRAK	IL-1 <i>receptor-associated</i> Kinase
JNK	<i>c-Jun N-terminal</i> Kinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LLPS	<i>liquid-liquid phase separation</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated</i> Proteinkinase
MAPKK	<i>mitogen-activated</i> Proteinkinase Kinase
m ⁷ G	N ⁷ -Methyl-Guanosin
MGB	<i>minor groove binder</i>
m ⁷ GDP	7-Methyl-Guanosin 5'-Diphosphate
min	Minute
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
MKP1	MAPK Phosphatase 1
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mRNP	<i>messenger</i> Ribonukleoprotein
ms	<i>mouse</i>
MYD88	<i>myleoid differentiation primary response gene 88</i>
n	Anzahl
NEMO	<i>nuclear factor-kappa B essential modifier</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
Nr	Nummer
NRD	N-terminale regulatorische Domäne
PAA	Polyacrylamid
Pab	<i>poly(A)-binding protein</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
Pat1	<i>DNA topoisomerase 2-associated protein</i>
Pan2/Pan3	<i>poly(A)-binding protein-dependent poly(A)-specific ribonuclease subunit PAN2-3</i>
PARN	<i>poly(A)-specific ribonuclease</i>
<i>P-body / P-bodies</i>	<i>processing body / processing bodies</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PLA	<i>proximity ligation assay</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	<i>polypyrimidine tract-binding</i> Protein

PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
rb	<i>rabbit</i>
RISC	<i>ribonucleic acid-induced silencing complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNP	Ribonukleoprotein
RPE1	<i>retinal pigmented epithelial</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkriptase
RTqPCR	<i>real time</i> -PCR
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
Tab.	Tabelle
TAB	<i>transforming growth factor beta-activated Kinase 1-binding Protein</i>
TAK	<i>transforming growth factor beta-activated Kinase</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline</i> + Tween 20
TD	Trimerisationsdomäne
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIR	Toll-IL-1-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TOLLIP	<i>adaptor toll-interacting Protein</i>
TRAF	Tumornekrosefaktor <i>receptor-associated factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TTP	Tristetraprolin
u.a.	unter anderem
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volt
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenprozent
wt	Wildtyp
w/v	Massenkonzentration
XRN	Exoribonuklease
z.B.	zum Beispiel

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: IL-1-induzierte Signaltransduktion.	3
Abb. 1.2: Schematische Darstellung des deadenylierungsabhängigen mRNA-Abbaus.	7
Abb. 1.3: IL-1-induzierte posttranslationale Modifikationen von DCP1a.	14
Abb. 3.1: Prinzip des siRNA-vermittelten <i>knockdowns</i> von Proteinen.	28
Abb. 3.2: Prinzip der Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung.	388
Abb. 3.3: Exemplarische Darstellung der Verwendung eines 4x4-Pixel-Rasters zur Erfassung von <i>P-bodies</i> in hTERT-RPE1-Zellen.	40
Abb. 4.1: IL-1 α -Einfluss auf die Lokalisation von p65 in hTERT-RPE1-Zellen.	43
Abb. 4.2: Vergleich der Expression von <i>P-body</i> -Proteinen in HeLa- und hTERT-RPE1-Zellen.	47
Abb. 4.3: IL-1 α -Einfluss auf die <i>P-body</i> -Assemblierung in hTERT-RPE1-Zellen.	50
Abb. 4.4: RTqPCR der IL-1 α -abhängigen Genexpression von <i>IL6</i> , <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i>	52
Abb. 4.5: RNA-FISH zur Bestimmung der mRNA-Mengen für <i>IL6</i> , <i>IL8</i> , <i>NFKBIA</i> und <i>ACTB</i> nach IL-1 α -Stimulation.	57
Abb. 4.6: Pipettierschema der Actinomycin D- <i>chase</i> -Experimente.	59
Abb. 4.7: IL-1 α -abhängige mRNA-Stabilitäten von <i>IL6</i> , <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i> in hTERT-RPE1-Zellen.	61
Abb. 4.8: Veränderungen der IL-1 α -abhängigen mRNA- <i>steady-state-level</i> von <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i> und ihre Lokalisation zu EDC4-positiven <i>P-bodies</i> nach Transkriptioninhibition durch Actinomycin D.	71
Abb. 4.9: Veränderung der Transfektionseffizienz nach Glycerolschock in hTERT-RPE1-Zellen.	74
Abb. 4.10: <i>P-body</i> -Assemblierung nach Überexpression von DCP1a.	76
Abb. 4.11: <i>P-body</i> -Assemblierung nach Überexpression von EDC4.	78
Abb. 4.12: <i>Knockdown</i> von XRN1 mittels Transfektion von siRNAs [50 nM] in hTERT-RPE1-Zellen.	81
Abb. 4.13: Vergleich der <i>knockdown</i> -Effizienz von XRN1 mittels Transfektion von siRNAs [50 nM] in hTERT-RPE1- und HeLa-Zellen.	82
Abb. 4.14: <i>P-body</i> -Assemblierung nach transientem XRN1- <i>knockdown</i> in hTERT-RPE1-Zellen.	85
Abb. 4.15: Veränderung der Genexpression von <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i> und subzellulären Lokalisation von <i>NFKBIA</i> -mRNA zu EDC4 nach transientem XRN1- <i>knockdown</i> in hTERT-RPE1-Zellen.	91
Abb. 4.16: <i>Knockdown</i> von EDC4 mittels Transfektion von siRNAs [50 nM] in hTERT-RPE1-Zellen.	93
Abb. 4.17: Modifizierung der Transfektionsbedingungen für den siRNA-vermittelten EDC4- <i>knockdown</i>	94
Abb. 4.18: <i>P-body</i> -Assemblierung nach transientem EDC4- <i>knockdown</i> in hTERT-RPE1-Zellen.	96
Abb. 4.19: Veränderung der Genexpression von <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i> nach transientem EDC4- <i>knockdown</i> in hTERT-RPE1-Zellen.	101

Abb. 5.1: Veränderungen der Transkriptmengen, <i>P-body</i> -Anzahl und Anteile an Kolokalisationen von Transkripten und <i>P-bodies</i> nach Transkriptionseinhibition durch Actinomycin D.	112
Abb. 5.2: Modell des Einflusses der Depletion von XRN1 auf die <i>P-body</i> -Assemblierung und das basale mRNA- <i>steady-state-level</i>	118
Abb. 5.3: Modell des Einflusses der Depletion von EDC4 auf die <i>P-body</i> -Assemblierung und das basale mRNA- <i>steady-state-level</i>	121
Abb. 11.1: IF-Kontrollen zu Abb. 4.2 A.	141
Abb. 11.2: Vergleich der Expression von <i>P-body</i> -Proteinen in HeLa- und hTERT-RPE1-Zellen (Wiederholung).	141
Abb. 11.3: IF-Kontrollen zu Abb. 4.10 A.	142
Abb. 11.4: IF-Kontrollen zu Abb. 4.11 A.	143
Abb. 11.5: <i>Knockdown</i> von XRN1 mittels Transfektion von siRNAs [50nM] in hTERT-RPE1-Zellen (Wiederholung des Experiments zu Abb. 4.12).	143
Abb. 11.6: Gesamtzellanalyse der basalen Genexpression von <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i> nach transientem XRN1- <i>knockdown</i>	144
Abb. 11.7: IF-Kontrollen zu Abb. 4.15 A.	144
Abb. 11.8: IF-Kontrollen zu Abb. 4.19 A.	145
Abb. 11.9: Gesamtzellanalyse der basalen Genexpression von <i>IL8</i> und <i>NFKBIA</i> nach transientem EDC4- <i>knockdown</i>	146

10 Literaturverzeichnis

Affymetrix (2011): User Manual QuantiGene ViewRNA ISH Cell Assay. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/QVC0001_UM18801-ViewRNA-ISH-Cell-Assay.pdf (Stand: 22.08.2018).

Aizer A, Brody Y, Wee Ler L, 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, 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.

An E, Lu X, Flippin J, Devaney JM, Halligan B, Hoffman E, Csaky K, Hathout Y (2006): Secreted proteome profiling in human RPE cell cultured derived from donors with age related macular degeneration and age matched healthy donors. *Journal of Proteome Research* **5**: 2599-2610.

Anderson P, Kedersha N (2009): RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 430-436.

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

Ashe MP, De Log SK, Sachs AB (2000): Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 833-848.

ATCC (2016): hTERT RPE-1 (ATCC CRL-4000). URL: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-4000.aspx?geo_country=de (Stand: 22.08.2018).

Bakheet T, Williams BR, Khabar KS (2006): ARED 3.0: The large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Res.* **34**: D111–114.

Batard P, Jordan M, Wurm F (2001): Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene* **270**: 61-68.

Beckham CJ, Parker R (2008): P-bodies, stress granules and viral life cycles. *Cell Host Microbe* **3**: 206-212.

Bian ZM, Elner S, Khanna H, Murga-Zamalloa CA, Patil S, Elner VM (2011): Expression and functional roles of caspase-5 in inflammatory response of human retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**: 8646-8656.

Bian ZM, Field MG, Elner SG, Elner VM (2019): Expression and regulation of alarmin cytokine IL-1 α in human retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research* **172**: 12-20.

Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU (2018): The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev* **281**: 197-232.

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* **12**: 1324-1333.

Braun KA, Young ET (2014): Coupling mRNA synthesis and decay. *Molecular and Cellular Biology* **34**: 4078-87.

Bregues M, Teixeira D, Parker R (2005): Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmatic 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* **6**: 1551–1559.

Brissoni B, Agostini L, Kropf M, Martinon F, Swoboda V, Lippens S, Everett H, Aebi N, Janssens S, Meylan E, Felberbaum-Corti M, Hirling H, Gruenberg J, Tschopp J, Burns K (2006): Intracellular trafficking of interleukin-1 receptor I requires Tollip. *Current Biology* **16**: 2265–2270.

Brown K, Park S, Kanno T, Franzoso G, Siebenlist U (1993): Mutual regulation of the transcriptional activator NF- κ B and its inhibitor, I κ B α . *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**: 211-6.

Caponigro G, Parker R (1995): Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. *Genes & Development* **9**: 2421-2432.

Carpenter S, Ricci EP, Mercier BC, Moore MJ, Fitzgerald KA (2014): Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity. *Immunology* **14**: 361-376.

Casadio R, Frigimelica E, Bossù P, Neumann D, Martin MU, Tagliabue A, Boraschi D (2001): Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1 β /IL-1R(I) complex. *FEBS Letters* **499**: 65–8.

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* **42**: 5217-5233.

Chen CYA, Ezzeddine N, Shyu AB (2008): Messenger RNA half-life measurements in mammalian cells. *Methods in enzymology* **448**: 335-357.

Coller J, Parker J (2004): Eukaryotic mRNA decapping. *Annual review of biochemistry* **73**: 861–890.

Coller JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R (2001): The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* **7**: 1717-1727.

Cougot N, Babajko S, Séraphin B (2004): Cytoplasmatic 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.

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.

Didierlaurent A, Brissoni B, Velin D, Aebi N, Tardivel A, Käslin E, Sirard JC, Angelov G, Tschopp J, Burns K (2006): Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Molecular and Cellular Biology* **26**: 735-742.

Dinarello CA (1996): Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **37**: 2095-2147.

Dinarello CA (2000): Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**: 503-508.

Dinarello CA, Simon A, Van der Meer JWM (2012): Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature* **11**: 633-652.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E (2007a): P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Molecular and Cellular Biology* **27**: 3970-3981.

Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E (2007b): P bodies: At the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature* **8**: 9-22.

Fabian MR, Sonenberg N (2012): The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: A look under the hood of miRISC. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 586-593.

Franks TM, Lykke-Andersen J (2008): The control of mRNA decapping and P-body formation. *Molecular Cell* **32**: 605-615.

Fenger-Grøn M, Fillmann 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.

Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S. Interleukin-6 (2018): Designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nature Reviews Drug Discovery* **17**: 395-412.

Gaestel M, Kotlyarov A, Kracht M (2009): Targeting innate immunity protein kinase signaling in inflammation. *Nature Reviews* **8**: 480-499.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A (2013): The Interleukin-1 family: Back to the future. *Immunity* **39**: 1003-1018.

Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ (2007): The highways and byways of mRNA decay. *Nature Review Molecular Cell Biology* **8**: 113-126.

Gauldie J, Richards C, Northemann W, Fey G, Baumann H (1989): IFN β /BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* **557**: 46-58.

- Greer LF, Szalay AA (2002): Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* **17**: 43-74.
- Hagemann GS, Mullins RF (1999): Molecular composition of drusen as related to substructural phenotype. *Molecular Vision* **5**: 28.
- Hammond MEW, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, Giedlin MA, Mullenbach G, Tekamp-Olson P (1995): IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type 1 IL-8 receptors. *The Journal of Immunology* **155**: 1428-1433.
- Hao S, Baltimore D (2009): The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nature Immunology* **10**: 281–288.
- Hieronymus H, Silver PA (2004): A system view of mRNP biology. *Genes & Development* **18**: 2845-2860.
- Hill CR, Cole M, Errington J, Malik G, Boddy AV, Veal GJ (2014): Characterisation of the clinical pharmacokinetics of actinomycin D and the influence of ABCB1 pharmacogenetic variation on actinomycin D disposition in children with cancer. *Clin Pharmacokinet* **53**: 741-751.
- Holtmann H, Enninga J, Kälble S, Thiefes A, Dörrie 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 N, Cooper JA, Rech K, Kracht M (1999): Induction of interleukin-8 synthesis 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.
- 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.
- Horvathova I, Voigt F, Kotrys AV, Zhan Y, Artus-Revel CG, Eglinger J, Stadler MB, Giorgetti L, Chao JA (2017): The dynamics of mRNA turnover revealed by single-molecule imaging in single cells. *Molecular Cell* **68**: 615-625.
- Hubstenberger A, Courel M, Bénard M, Souquere S, Ernoult-Lange M, Chouaib R, Yi Z, Marlot JB, Munier A, Fradet M, Daunesse M, Bertrand E, Oierren G, Mozziconacci J, Kress M, Weil D (2017): P-body purification reveals the condensation of repressed mRNA regulons. *Molecular Cell* **68**: 144-157.
- 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.
- Jain S, Parker R (2013): The discovery and analysis of P-bodies. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **768**: 23-43.
- Jurida L, Soelch J, Bartkuhn M, Handschick K, Müller H, Newel D, Weber A, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Bhuju S, Saul VV, Schmitz ML, Kracht M (2015): The activation of IL-1-induced enhancers depends on TAK1 kinase activity and NF- κ B p65. *Cell Reports: Cell Press* **10**: 726-739.

- 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.
- Katoh Y, Michisaka S, Nozaki S, Funabashi T, Hirano T, Takei R, Nakayama K (2017): Practical method for targeted disruption of ciliarelated genes by using CRISPR/Cas9-mediated homology-independent knock-in system. *Molecular Biology of the Cell* **28**: 898-906.
- Kawai T, Akira S (2007): TLR signaling. *Seminars in Immunology* **19**: 24-32.
- 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.
- Kim D, Park M, Lim S, Choi J, Kim J, Han H, Kandu TK, Park J, Yoon K, Park S, Park J, Heo Y, Park S (2014): High-glucose induced CARM1 expression regulates apoptosis of human retinal pigment epithelial cells via histon 3 arginine 17 dimethylation: Role in diabetic retinopathy. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **560**: 36-43.
- Kishimoto T (2010): IL-6: From its discvery to clinical applications. *International Immunology* **22**: 347-352.
- Krause A, Holtmann H, Eickemeier S, Winzen R, Szamel M, Resch K, Sakaltvala J, Kracht M (1998): Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for Interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal ccarcinoma cell line KB. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 23681-23689.
- Kshirsagar M, Parker R (2004): Identification of Edc3p as an enhancer of mRNA decapping in saccharomyces cerevisiae. *Genetics* **166**: 729-739.
- Langeberg CJ, Welch WRW, McGuire JV, Ashby A, Jackson AD, Chapman EG (2020): Biochemical characterization of yeast Xrn1. *Biochemistry* **59**: 1493-1507.
- Lin Y, Protter D, Rosen MK, Parker R (2015): Formation and maturation of phase seperated liquid droplets by RNA binding proteins. *Molecular Cell* **60**: 208-219.
- Luo Y, Na Z, Slavoff SA (2018): P bodies: Composition, properties and functions. *Biochemistry* **57**: 2424-2431.
- Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C (2019): Interleukin-1 and related cytokines in the regulation of Inflammation and immunity. *Immunity* **50**: 778-795.
- Mayr-Buro C, Schlereth E, Beuerlein K, Tenekeci U, Meier-Soelch J, Schmitz ML, Kracht M. (2019): Single-cell analysis of multiple steps of dynamic NF-kappaB regulation in interleukin-1alpha-triggered tumor cells using proximity ligation assays. *Cancers* **11**.
- Mendoza H, Campbell DG, Burness K, Hastie J, Ronkina N, Shim JH, Arthur JSC, Davis RJ, Gaestel M, Johnson GL, Ghosh S, Cohen P (2008): Roles for TAB1 in regulating the IL-1-dependent phosphorylation of the TAB3 regulatory subunit and activity of the TAK1 complex. *Biochemical Society* **409**: 711-722.

Mitchell SF, Parker R (2014): Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Molecular Cell* **54**: 547-558.

Möertl S, Angermeier M, Eckardt-Schupp F (2007): Highly efficient transfection of a human epithelial cell line with chemically synthesized siRNA using siLentFect lipid reagent. Bio-Rad Laboratories. URL: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5439.pdf (Stand: 22.12.2019).

Moraes KCM, Wilusz CJ, Wilusz J (2006): CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA* **12**: 1084–1091.

Mülhardt C (2013): Der Experimentator - Molekularbiologie / Genomics, 7. Auflage, Springer Spektrum: 103-108, 240-242.

Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W (2017): Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* **17**: 559-572.

Nathans R, Chu CY, Serquina AK, Lu CC, Cao H, Rana TM (2009): Cellular microRNA and p-bodies modulate host-HIV-1 interactions. *Molecular Cell* **34**: 696-709.

Novartis Pharma (2020): Fachinformation Ilaris®150 mg/ml Injektionslösung. URL: <https://www.fachinfo.de/pdf/021500> (Stand: 05.01.2021).

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.

Pautz A, Linker K, Hubrich T, Korhonen R, Altenhöfer S, Kleinert H (2006): The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is involved in the post-transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase expression. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 32294–32302.

Qiagen (2010): Flexible RNAi technologies you can relay on. RNAi Brochure. URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=0489bb98-dc9a-4b3a-9f12-e9e94cd7218f&lang=en>. (Stand: 22.12.2019).

Radons J, Dove S, Neumann D, Altmann R, Botzki A, Martin MU, Falk W (2003): The interleukin 1 (IL-1) receptor accessory protein Toll/IL-1 receptor domain: Analysis of putative interaction sites in vitro mutagenesis and molecular modeling. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 49145–49153.

Radhakrishnan A, Green R (2016): Connections underlying translation and mRNA stability. *Journal of Molecular Biology* **428**: 3558–3564.

Raj A, van Oudenaarden A. (2008): Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. *Cell* **135**: 216-26.

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.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2008): Duale Reihe Biochemie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag: 490.

Rehm H, Letzel T (2016): Der Experimentator - Proteinbiochemie / Proteomics, 7. Auflage, Springer Spektrum: 3-28.

Rzeczkowski K, Beuerlein K, Müller 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.

Sakurai H, Miyoshi H, Mizukami J, Sugita T (2000): Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Letters* **474**: 141-145.

Sachsenweger M, Klauß V, Nasemann J, Ugi I (2003): Duale Reihe Augenheilkunde, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag: 248-249.

Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M (2004): NF- κ B: A multifaceted transcription factor regulated at several levels. *ChemBioChem* **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 (2012): Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews Genetic* **13**: 246-259.

Schwartz D, Decker CJ, Parker R (2003): The enhancer of decapping proteins, Edc1p und Edc2p, bind RNA and stimulate the activity of decapping enzyme. *RNA* **9**: 239-251.

Seto E, Yoshida-Sugitani R, Kobayashi T, Toxama-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.

Shatkin AJ (1976): Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* **9**: 645-653.

She M, Decker CJ, Svergun DI, Round A, Chen N, Muhlrads 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 cytoplasmatic processing bodies. *Science* **300**: 805-808.

Sobi (2020): Fachinformation Kineret® 100 mg/0,67 ml Injektionslösung in einer Fertigspritze. URL: https://sobi-deutschland.de/sites/default/files/Kineret%20100%20mg%20067%20ml%20Injektionsloesung%20in%20einer%20Fertigspritze_Stand%20April%202020.pdf (Stand: 05.01.2021).

Taniguchi K, Karin M (2018): NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology* **18**: 309-324.

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 (2018): Transcript specific uncoupling of mRNA decay, translation and processing body assembly. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Tenekeci U, Poppe M, Beuerlein K, Buro C, Müller 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.

Timmers HTM, Tora L (2018): Transcript buffering: A balancing act between mRNA synthesis and mRNA degradation. *Molecular Cell* **72**: 10-17.

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. *Arthritis & Rheumatism* **50**: 3118-3128.

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* **106**: 21591-21596.

Turner MD, Nedjaj B, Hust T, Pennington DJ (2014): Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta* **1843**: 2563-2582.

Tutucci E, Vera M, Biswas J, Garcia J, Parker R, Singer RH (2018): An improved MS2 system for accurate reporting of the mRNA life cycle. *Nature Methods* **15**: 81-89.

Uesono Y, Toh-e A (2002): Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 13848-13855.

Voigt F, Gerbracht JV, Boehm V, Horvathova I, Eglinger J, Chao JA, Gehring NH (2019): Detection and quantification of RNA decay intermediates using XRN1-resistant reporter transcripts. *Nature Protocols* **14**: 1603-1633.

Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010): Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Science Signaling* **3**: 1-6.

Weiterer SS, Meier-Soelch J, Georgomanolis T, Mizi A, Beyerlein A, Weiser H, Brant L, Mayr-Buro C, Jurida L, Beuerlein K, Muller H, Weber A, Tenekeci U, Dittrich-Breiholz O, Bartkuhn M, Nist A, Stiewe T, van IWF, Riedlinger T, Schmitz ML, Papantonis A, Kracht M. (2020): Distinct IL-1alpha-responsive enhancers promote acute and coordinated changes in chromatin topology in a hierarchical manner. *The EMBO Journal* **39**: e101533.

Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CYA, Shyu AB, Müller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H (1999): The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region targeted mechanism. *The EMBO Journal* **18**: 4969-4980.

Wooff Y, Man SM, Aggio-Bruce R, Natoli R, Fernando N (2019): IL-1 family members mediate cell death, inflammation and angiogenesis in retinal degenerative diseases. *Frontiers in Immunology* **10**: 1618.

Xia T, Rizzolo J (2017): Effects of diabetic retinopathy on the barrier functions of retinal pigment epithelium. *Vision Research* **139**: 72-81.

Yokoyama C, Sueyoshi Y, Ema M, Mori Y, Takaishi K, Hisatomi H (2017): Induction of oxidative stress by anticancer drugs in the presence and absence of cells. *Oncology Letters* **14**: 6066-6070.

Youn JY, Dyakov BJA, Zhang J, Knight JDR, Vernon RM, Forman-Kay JD, Gingras AC (2019): Properties of stress granule and p-body proteomes. *Molecular Cell* **17**: 286-294.

Zandi E, Chen Y, Karin M (1998): Direct phosphorylation of I κ B by IKK α and IKK β : Discrimination between free and NF- κ B-bound substrate. *Science* **281**: 1360-1363.

Zandi E, Karin M (1999): Bridging the gap: Composition, regulation and physiological function of the I κ B kinase complex. *Molecular and Cellular Biology* **19**: 4547-4551.

Zhang B, Herman PK (2019): It is all about the process(ing): P-body granules and the regulation of signal transduction. *Current Genetics*. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00294-019-01016-3> (Stand: 01.12.2019).

11 Anhang

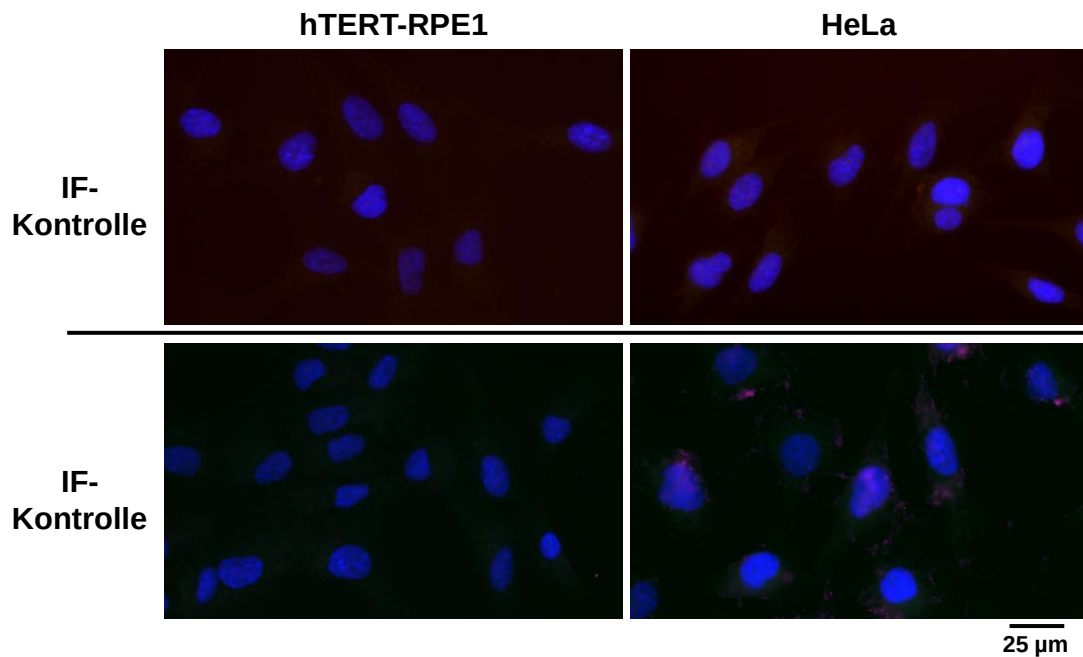


Abb. 11.1: IF-Kontrollen zu Abb. 4.2 A. Zugehörige IF-Kontrollen mit Hoechstfärbung des Zellkerns ohne Primärantikörperinkubation, durchgeführt in hTERT-RPE1- und HeLa-Zellen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMI8-Mikroskop mit der LasX-Software.

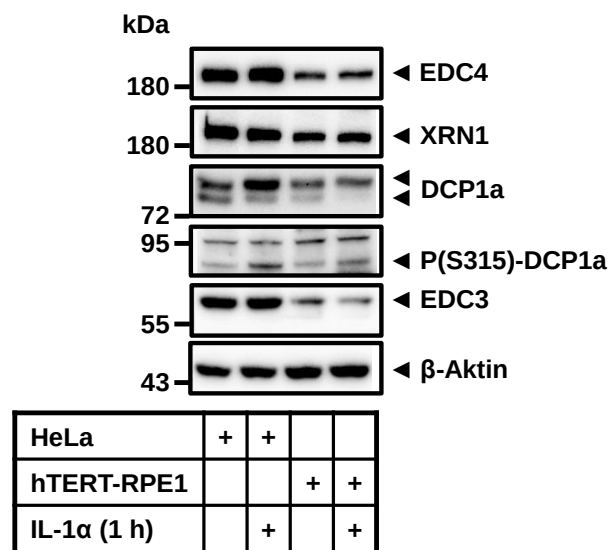


Abb. 11.2: Vergleich der Expression von P-body-Proteinen in HeLa- und hTERT-RPE1-Zellen (Wiederholung). hTERT-RPE1- und HeLa-Zellen wurden in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag für 1 h mit IL-1α [10 ng/ml] behandelt oder unstimuliert gelassen. Die Proteine wurden mittels Speziallyse aufgereinigt. Die elektrophoretische Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht und Übertragung mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran wurde von Helmut Müller (AG Kracht) durchgeführt. Je Probe wurden 25 µg Protein aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin.

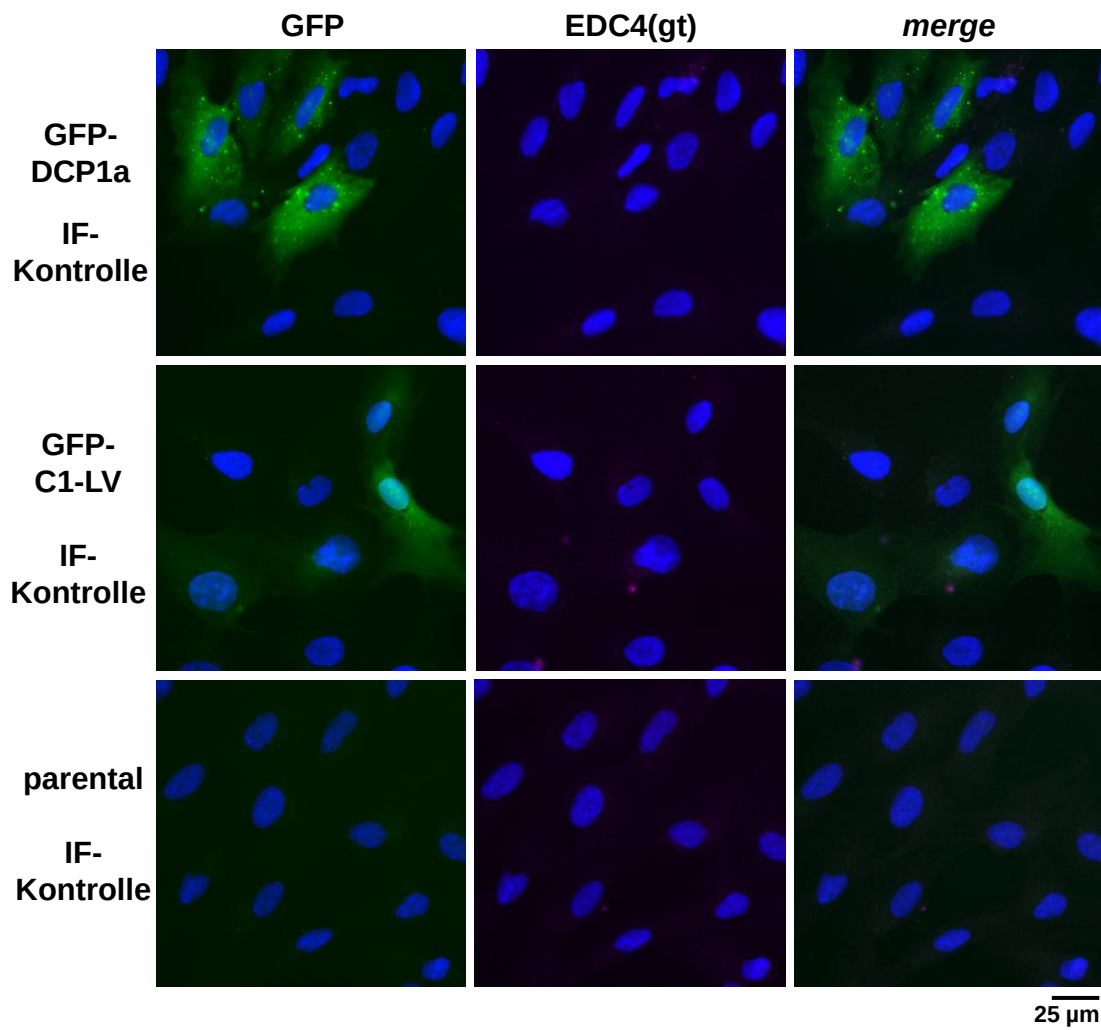


Abb. 11.3: IF-Kontrollen zu Abb. 4.10 A. Zugehörige IF-Kontrollen mit Hoechstfärbung des Zellkerns und ohne Primärantikörperinkubation von hTERT-RPE1-Zellen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software.

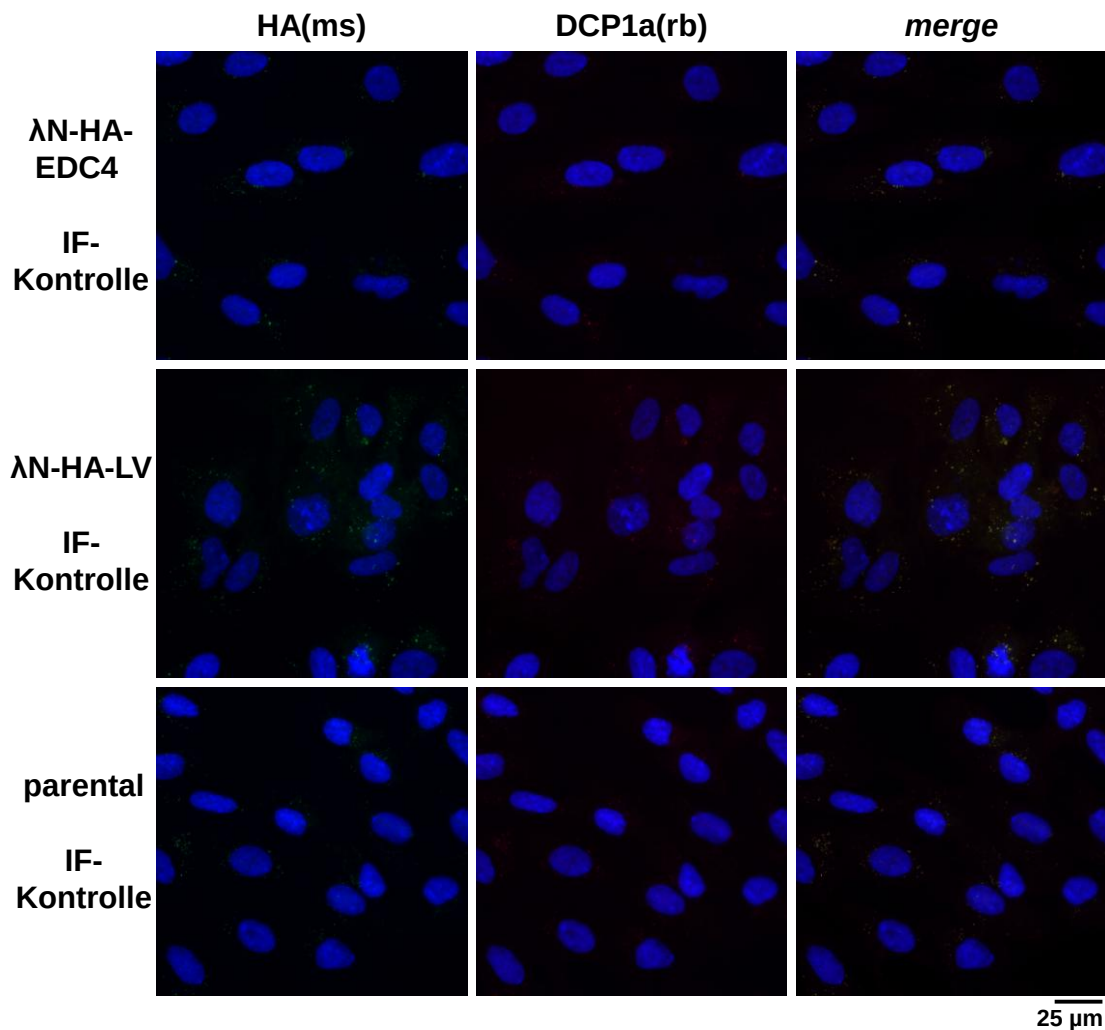


Abb. 11.4: IF-Kontrollen zu Abb. 4.11 A. Zugehörige IF-Kontrollen mit Hoechstfärbung des Zellkerns und ohne Primärantikörperinkubation von hTERT-RPE1-Zellen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software.

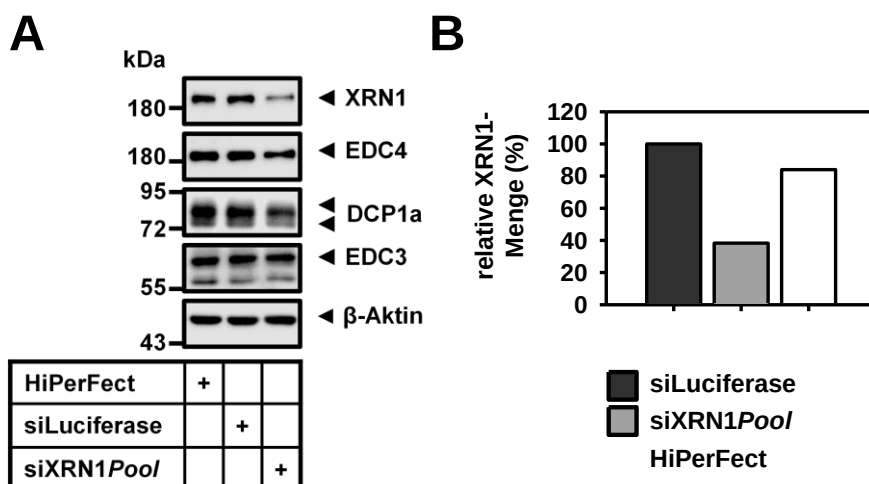


Abb. 11.5: Knockdown von XRN1 mittels Transfektion von siRNAs [50nM] in hTERT-RPE1-Zellen (Wiederholung des Experiments zu Abb. 4.12). **A:** hTERT-RPE1-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen geerntet. Die Proteine wurden mittels Spezialanalyse aufgereinigt, elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Je Probe wurden 30 µg Protein aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin. **B:** Quantitative Darstellung der relativen XRN1-Proteinmenge normiert auf die siLuciferase-transfizierte Probe.

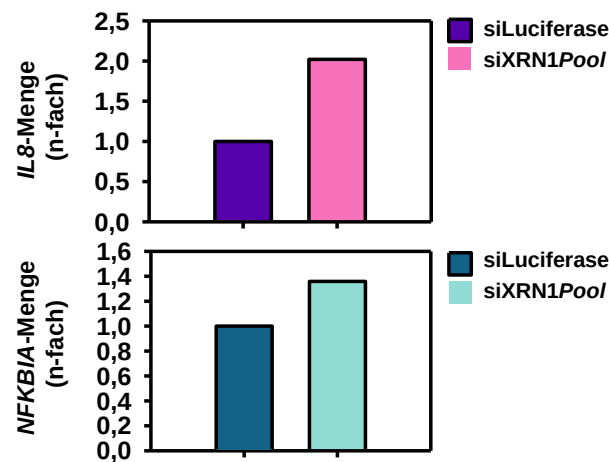


Abb. 11.6: Gesamtzellanalyse der basalen Genexpression von *IL8* und *NFKBIA* nach transientem *XRN1*-knockdown. hTERT-RPE1-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 48-stündiger Kultivierung wurden die Zellen geerntet. Aus der Hälfte des Zellpellets wurde die RNA mittels NucleoSpin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert und mittels reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Normiert auf die siLuciferase-transfizierte Probe wurden die relativen mRNA-Mengen (hier dargestellt) der *IL8*- und *NFKBIA*-Gene mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode anhand einer RTqPCR ermittelt. *GUSB* diente dabei als Referenzgen. Aus der anderen Hälfte wurden die Proteine mittels Speziallyse aufgereinigt, elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Der korrespondierende Western Blot ist in Abb. 4.13 (lane 1 und 2) zu sehen.

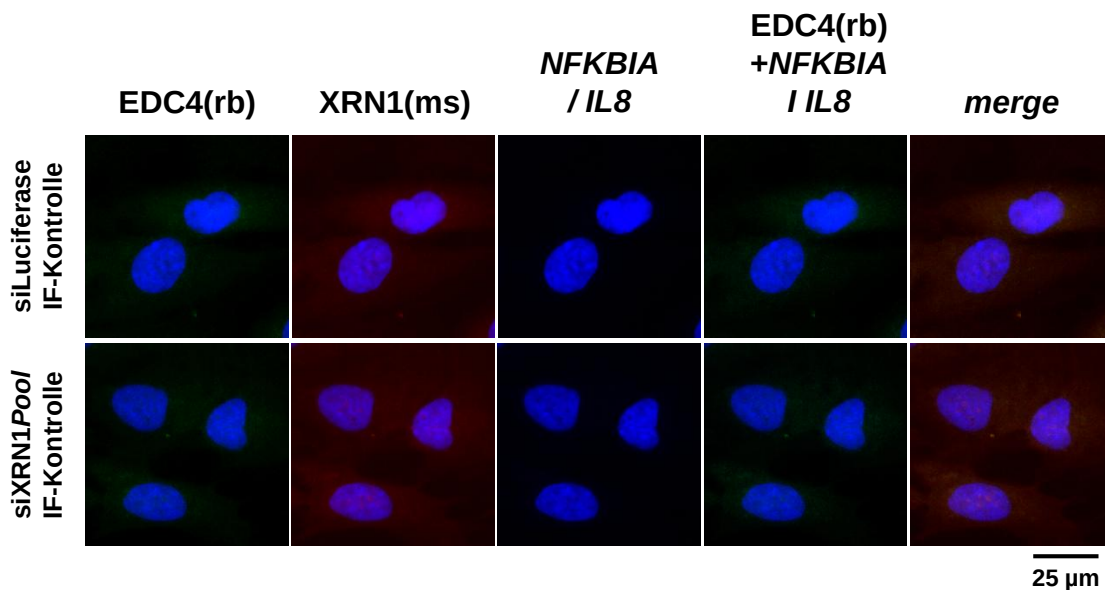


Abb. 11.7: IF-Kontrollen zu Abb. 4.15 A. Zugehörige IF-Kontrollen mit Hoechstfärbung des Zellkerns ohne Primärantikörperinkubation und ohne Inkubation mit genspezifischen Sonden in siLuciferase- und siXRN1Pool-transfizierten hTERT-RPE1-Zellen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software.

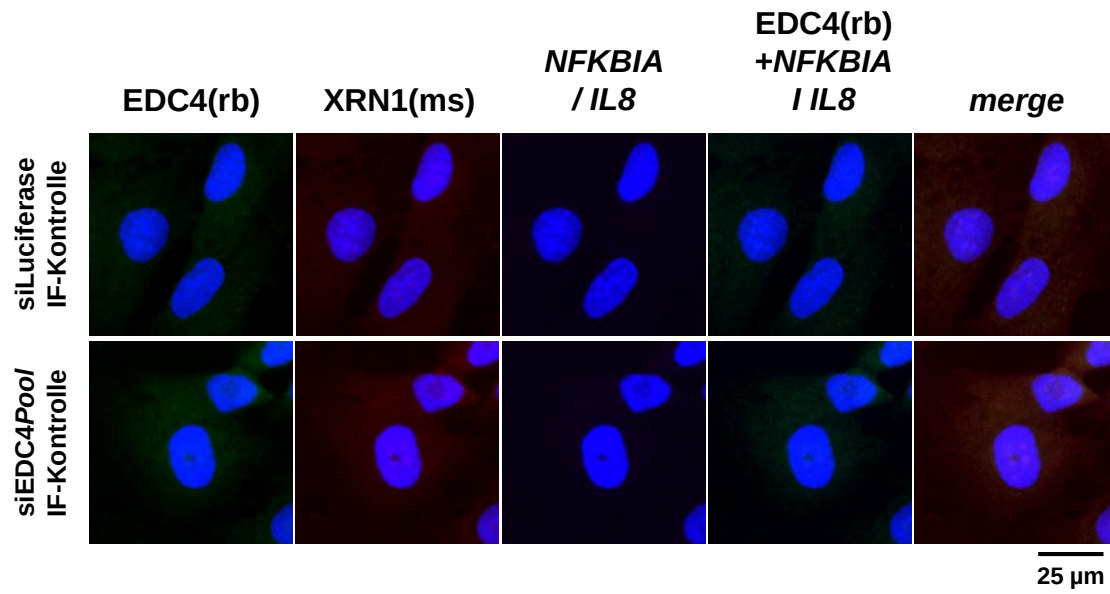


Abb. 11.8: IF-Kontrollen zu Abb. 4.19 A. Zugehörige IF-Kontrollen mit Hoechstfärbung des Zellkerns ohne Primärantikörperinkubation und ohne Inkubation mit genspezifischen Sonden in siLuciferase- und siEDC4Pool-transfizierten hTERT-RPE1-Zellen. Die Aufnahme der Bilder erfolgte am DMi8-Mikroskop mit der LasX-Software.

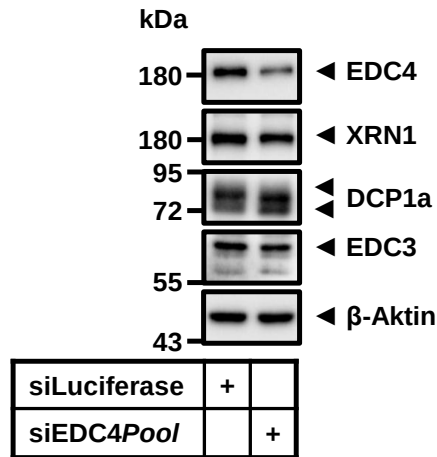
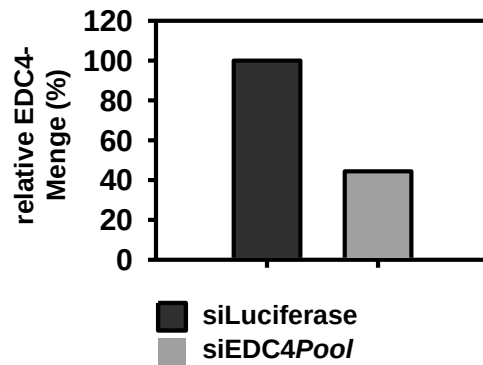
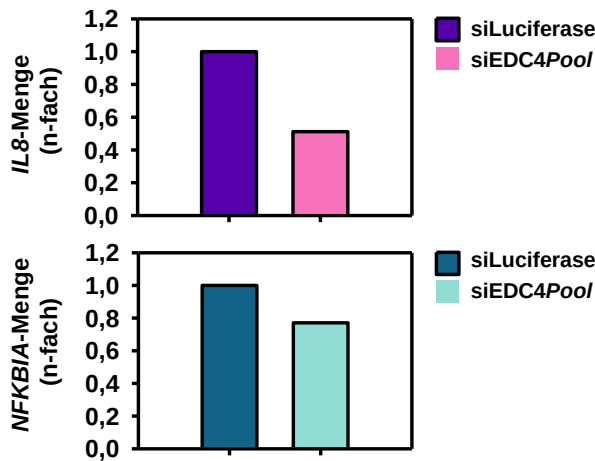
A**B****C**

Abb. 11.9: Gesamtzellanalyse der basalen Genexpression von *IL8* und *NFKBIA* nach transientem EDC4-knockdown. hTERT-RPE1-Zellen wurden in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 50 nM siRNAs mittels HiPerFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen transfiziert. Nach 72-stündiger Kultivierung wurden die Zellen geerntet. **A:** Aus der Hälfte des Zellpellets wurden die Proteine mittels Spezialyse aufgereinigt, elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und im Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Je Probe wurden 30 µg Protein aufgetragen. Als Beladungskontrolle diente β-Aktin. **B:** Quantitative Darstellung der relativen EDC4-Proteinmenge normiert auf die siLuciferase-transfizierte Probe. **C:** Aus der anderen Hälfte wurde die RNA mittels NucleoSpin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel isoliert und mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Normiert auf die siLuciferase-transfizierte Probe, wurden die relativen mRNA-Mengen (hier dargestellt) der *IL8*- und *NFKBIA*-Gene mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode anhand einer RTqPCR ermittelt. *GUSB* diente dabei als Referenzgen.

12 Publikationsverzeichnis

Posterbeiträge

Verena Maßmann, Christin Mayr-Buro, Ulas Tenekeci, Michael Kracht: Inflammatory cytokines induce molecular remodeling of ribonucleoprotein complexes in immortalized diploid retinal epithelial cells. Science Day 2017, Gießen.

13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. 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. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Michael Kracht, der mir eine Promotion in der Pharmakologie über ein anspruchsvolles und interessantes Thema mit einer strukturierten Erarbeitung ermöglichte. Die gemeinsamen Erörterungen und Diskussionen meiner Daten riefen immer neue Ideen für weiterführende Experimente sowie Interpretationsmöglichkeiten hervor, mit dem Ziel das Bestmögliche mit dieser Arbeit zu Erreichen.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. Christin Mayr-Buro für die engagierte und geduldige Betreuung im Labor und Unterstützung bei der Auswertung und Interpretation meiner Versuchsergebnisse auch über die Zeit meines Medizinstudiums hinaus. Ich bin sehr dankbar für die vielen motivierenden Gespräche und Ratschläge und schließlich auch Korrekturlesung meiner Arbeit.

Natürlich möchte ich mich auch für die tolle Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bei allen Mitarbeitern des Rudolf-Buchheim-Instituts, insbesondere Dr. Ulaş Tenekeci, Helmut Müller, Dr. Johanna Meier-Sölch, Sinah-Sophia Weiterer und Hendrik Weiser, bedanken. Ich habe mich von Anfang an in der Arbeitsgruppe sehr wohl gefühlt und habe gerne an Betriebsausflügen und auch privaten Veranstaltungen teilgenommen.

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich während meiner gesamten Ausbildung und darüber hinaus immer unterstützt haben. Danke Elena und Julia, dass Ihr immer ein offenes Ohr für mich habt. Danke Konni, dass Du Dir die Zeit genommen hast, meine Arbeit auf Fehler zu korrigieren, die ich am Ende selber nicht mehr wahrgenommen habe. Ein besonderer Dank gilt auch meinem Freund Kai, der mir in Bezug auf die Arbeit vor allem bei technischen Fragen und ansonsten in allen Lebenslagen zur Seite steht.

Danke, dass Ihr alle immer an mich glaubt!

Verena