

**Systematische Analyse der zytokinabhängig regulierten Protein:Protein-
Interaktionen von *Decapping*-Faktoren mittels *Proximity Ligation Assays***

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

vorgelegt von Hartung, Lili, geb. Tedzhoyan
aus Tiflis

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Rudolf-Buchheim Institut für Pharmakologie

Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht

Gutachter: Prof. Dr. Klaudia Giehl

Tag der Disputation: 14.07.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die klinische Bedeutung von IL-1 α	1
1.2	Die Interleukin (IL)-1 Familie	2
1.3	Der IL-1 α Signalweg	4
1.4	Der mRNA-Abbau.....	5
1.5	<i>Processing bodies (P-bodies)</i>	7
1.6	Funktion der <i>P-bodies</i> beim Abbau und der Speicherung von mRNAs.....	8
1.7	Die <i>P-body</i> Komponenten DCP1a, DCP2, EDC4 und XRN1	10
1.8	Virusinfektion und <i>P-bodies</i>	12
1.9	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material	15
2.1	Verbrauchsmaterialien.....	15
2.2	Geräte.....	15
2.2.1	Allgemeine Geräte.....	15
2.2.2	Zellkultur	15
2.2.3	Elektrophorese-, Westerblotting- und Photographiesystem.....	16
2.2.4	Mikroskopie und Photometrie	16
2.2.5	Software und Programme	16
2.3	Zentrifugen	17
2.4	Chemikalien und Lösungsmittel	17
2.5	Puffer und Lösungen	17
2.6	Medien	18
2.7	Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien.....	19
2.8	Marker	19
2.9	Antikörper.....	20
2.9.1	Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	20

2.9.2	Antikörper für das <i>Proximity Ligation Assay</i>	21
2.9.3	Antikörper für den Westernblot	22
2.10	Rekombinante Proteine	23
2.11	Eingesetzte Zelllinie.....	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 Fixierung von Zellen	24
3.1.4	Infektion von Zellen mit humanem Coronavirus 229E.....	25
3.2	Zellbiologische Techniken	25
3.2.1	Indirekte Immunfluoreszenz (IF)	25
3.2.2	<i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA)	26
3.2.3	Indirekte Immunfluoreszenz (IF)- <i>Proximity-Ligation-Assay</i> (IF-PLA)	29
3.3	Proteinbiochemische Methoden	30
3.3.1	Lysate zur Immunodetektion im Westernblot.....	30
3.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	31
3.3.3	Diskontinuierliche SDS-PAGE	31
3.3.4	Westernblot und Immunodetektion mittels <i>enhanced chemiluminescence</i> (ECL)- Reaktion	32
4	Ergebnisse	34
4.1	Einfluss von IL-1 auf den Proteinlevel der <i>Decapping</i> Enzyme	34
4.2	Detektion von <i>P-bodies</i> mittels Markierung von DCP1a, XRN1, EDC3 und EDC4 durch Immunfluoreszenz.....	37
4.3	Anwendung des <i>Proximity Ligation Assays</i> : Einfluss von IL-1 auf die DCP1a, EDC4 und XRN1 Expression auf Einzelzellebene	41
4.4	Anwendung des <i>Proximity Ligation Assays</i> : Untersuchung von heteromeren Protein:Protein-Interaktionen zwischen EDC4, XRN1 und DPC1a	44

4.5	IL-1 α abhängige Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von <i>Decapping</i> Enzymen unter zusätzlicher Markierung von <i>P-bodies</i> mittels Verwendung der Immunfluoreszenz-PLA	47
4.6	Vergleichende Analyse der IL-1 induzierten p53 Translokation in den Zellkern und der Proteininteraktion von DCP1a:EDC4	66
4.7	Einfluss einer HCoV-229E Infektion auf die Protein:Protein-Interaktion von EDC4:XRN1	72
5	Diskussion	77
5.1	Die Methode des <i>Proximity Ligation Assay</i>	77
5.2	Der Einfluss von IL-1 auf die Ausbildung von <i>P-bodies</i> und auf die Expression von <i>P-body</i> Komponenten.....	79
5.3	Die PLA zur Erfassung der Ausbildung von Heterodimeren der <i>P-body</i> Faktoren ..	80
5.4	Regulation der <i>P-body</i> Bildung durch <i>liquid-liquid phase separation</i> abhängige Prozesse.....	81
5.5	Detektion von <i>P-bodies</i> und die Lokalisation der <i>P-body</i> Komponenten.....	85
5.6	Die Einfluss einer Coronavirus Infektion auf die <i>P-body</i> Elemente	88
6	Zusammenfassung/ <i>Abstract</i>	90
6.1	Zusammenfassung	90
6.2	<i>Abstract</i>	91
7	Abkürzungsverzeichnis	92
8	Abbildungsverzeichnis	94
9	Tabellenverzeichnis.....	96
10	Literaturverzeichnis.....	97
11	Anhang	105
12	Ehrenwörtliche Erklärung	106
13	Danksagung.....	107

1 Einleitung

1.1 Die klinische Bedeutung von IL-1 α

Das Immunsystem schützt den menschlichen Körper vor verschiedenen Noxen; dazu gehören beispielsweise schädliche Mikroorganismen, virusbefallene Zellen oder körpereigene entartete Zellen. Um die Immunantwort zu koordinieren, kommunizieren die Zellen des Abwehrsystems durch Zytokine. Zytokine sind kleine Polypeptide, welche für die Regulation der Zellantworten bei Infektionen, Entzündungen und Stress (z.B. durch Hitze) verantwortlich sind. Zytokine können u.a. unterteilt werden in Interleukine, Tumornekrose-Faktoren, koloniestimulierende Faktoren, Chemokine und Interferone (Schmitz et al., 2011). Ein wichtiger Regulator des Immunsystems ist das proinflammatorische Interleukin 1 (IL-1). Bisher wurden 11 Mitglieder der IL-1 Familie charakterisiert. Es wird größtenteils von Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen produziert. Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF α) können nach Erkennen von Pathogenen anhand von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) oder durch Zellschaden anhand von *danger-associated molecular patterns* (DAMP) von fast allen Zellen mit Zellkern synthetisiert und ausgeschüttet werden (Gaestel et al., 2009). Dabei stellt IL-1 α auch einen wichtigen Mediator für autoinflammatorische, entzündliche, degenerative und autoimmune Prozesse dar. So können die frei gesetzten Zytokine aus einer Zelle zur Stimulierung derselben Zelle führen, sodass z.B. eine Infektion zügiger vom Immunsystem erkannt wird und die Immunantwort schneller erfolgt. Sobald die Infektion unter Kontrolle gebracht wurde, werden entzündungshemmende Zytokine sezerniert. Sind die Mechanismen von Selbstverstärkung und Hemmung im Ungleichgewicht, können in der Folge Erkrankungen wie z. B. die rheumatoide Arthritis oder die systemisch juvenile idiopathischen Arthritis entstehen (Boraschi et al., 2018, Dinarello, 2010, Dinarello, 2018, Schmitz et al., 2011).

Wie wichtig die Regulation von IL-1 im Körper ist, zeigt sich durch die effektive Behandlung verschiedener Entzündungserkrankungen mit Anakinra, einem humanen rekombinanten IL-1 Antagonist, welcher durch die kompetitive Hemmung am Interleukin-1 Rezeptor Typ 1 IL-1R1 Rezeptor wirkt (Dinarello, 2009). Seit dem Jahr 2000 besitzt Anakinra eine Zulassung in Deutschland für die Behandlung einer rheumatoiden Arthritis mit unzureichendem Ansprechen auf Methotrexat sowie einer systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis (Dinarello et al., 2012). Durch die

Benutzung von Anakinra bei Kindern und Jugendlichen zur Behandlung der systemisch juvenilen idiopathischen Arthritis konnte der Einsatz von Steroiden gesenkt werden. Zudem zeigte auch der Einsatz von Canakinumab, einem humanisierten monoklonalen anti-IL-1 β Antikörper, welcher IL-1 β selektiv und langfristig bindet und zur Neutralisierung dessen führt, eine deutliche Wirkung bei beispielsweise dem Still-Syndrom, einem der drei Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrome (CAPS), sowie bei dem familiären Mittelmeerfieber. Die Ursache der CAPS ist eine Mutation in dem Gen, welches für das Protein Cryopyrin kodiert. Cryopyrin reguliert Apoptose- und Entzündungs-Signalwege. Durch diese Mutation kommt es zu einer vermehrten oder spontanen Produktion von Interleukin-1 β und zur übermäßigen Auslösung von Entzündungsreaktionen im Körper. Die Nutzung von Canakinumab führt zur Besserung der Symptomatik. Des Weiteren wurden Zusammenhänge zwischen der IL-1 Produktion und Tumorentstehung nachgewiesen: hierbei spielt IL-1 offenbar eine essentielle Rolle für das Wachstum, die Angiogenese und die Metastasierung von Krebszellen (Lewis et al., 2006).

1.2 Die Interleukin (IL)-1 Familie

Wie zuvor bereits erwähnt, besteht die Interleukin 1-Familie aus 11 Mitgliedern (siehe Tabelle 1.1); hierbei haben sieben Proteine eine agonistische Aktivität, drei sind Rezeptorantagonisten und ein Zytokin hat eine entzündungshemmende Wirkung (Boraschi et al., 2018, Dinarello, 2018, Garlanda et al., 2013).

Tabelle 1.1: Mitglieder der IL-1 Familie

Name (alt. Name)	Rezeptor	Korezeptor	Eigenschaft
IL-1 α (IL-1F1)	IL-1R1 IL-1R2	IL-1R3	Agonist
IL-1 β (IL-1F2)	IL-1R1 IL-1R2	IL-1R3	Agonist
IL-1Ra (IL-1F3)	IL-1R1		Antagonist für IL-1 α und IL-1 β
IL-18 (IL-1F4)	IL-1R5	IL-1R7	Agonist
IL-33 (IL-1F11)	IL-1R4	IL-1R3	Agonist
IL-36 α (IL-1F6)	IL-1R6	IL-1R3	Agonist
IL-36 β (IL-1F7)	IL-1R6	IL-1R3	Agonist
IL-36 γ (IL-1F8)	IL-1R6	IL-1R3	Agonist

IL-36Ra (IL-1F5)	IL-1R6	Antagonist für IL-36 α , IL-36 β und IL-36 γ
IL-37 (IL-1F7)	IL-18Ra	Entzündungshemmend
IL-38(IL-1F10)	IL-1Rrp2 (IL-36R)	Antagonistisch
	IL-1R8	
	IL-1R9	
	IL-1R10	

IL-1 α zeigt je nach Zelle unterschiedliche Wirkungen: so führt es im zentralen Nervensystem zum Temperaturanstieg (IL-1 α ist ein endogenes Pyrogen) (Dinarello, 2009). In der Leber führt IL-1 α u.a. über IL-6 (einem IL-1 Zielgen) zur Ausschüttung von Akute Phase-Proteinen wie C-reaktivem Protein (CRP) und Fibrinogen sowie zur Hemmung des α 1-Antitrypsins (Garlanda et al., 2013). Im Endothel führt IL-1 zur Rekrutierung von Leukozyten durch die Induktion der Ausschüttung von Chemokinen wie Interleukin-8 und der Expression von Adhäsionsmolekülen, welche dafür sorgen, dass Immunzellen aus dem Blut gezielt in das entzündete Gewebe übertreten können, um dort lokal die Entzündung zu initiieren und zu kontrollieren (Baggiolini et al., 1994). Zudem aktiviert IL-1 α die Zellen des angeborenen (Monozyten) und des erworbenen (Lymphozyten) Immunsystems. Das IL-1 α -Vorläuferprotein wird erst durch eine proteolytische Spaltung zur reifen IL-1 α Form (Dinarello, 1996). Sowohl das Vorläuferprotein als auch die reife Form sind biologisch aktiv. Das Vorläuferprotein wird dauerhaft in Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, der Lunge, der Leber und der Niere sowie den Endothelzellen und Astrozyten produziert (Garlanda et al., 2013). Kommt es zum Zelltod durch Nekrose, beispielsweise durch einen Myokardinfarkt oder eine Tumornekrose, wird das Vorläuferprotein ausgeschüttet und führt zur lokalen, sterilen Kaskade von inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen (Chen et al., 2007).

IL-1 β hat biologisch ähnlichen Eigenschaften wie IL-1 α . Jedoch ist das Vorläuferprotein inaktiv und IL-1 β wird erst nach enzymatischer Prozessierung biologisch aktiv. IL-1 β wird größtenteils in hämatopoetischen Zellen produziert wie Monozyten, Gewebsmakrophagen und Dendritischen Zellen und wirkt in der Regel systemisch (Dinarello, 2011).

1.3 Der IL-1 α Signalweg

Obwohl IL-1 α und IL-1 β von zwei verschiedenen Genen kodiert werden (*IL1A* und *IL1B*), sind beide Proteine in der Lage, an den spezifischen IL-1 Rezeptor (IL-1R1) auf der Zellmembran zu binden (Dinarello et al., 2012). Der IL-1 Rezeptor ist ein Transmembranprotein, bestehend aus einem extrazellulären Teil mit drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einem transmembranem Segment und einer zytoplasmatischen Domäne (Vigers et al., 1997).

Sobald IL-1 an den extrazellulären IL-1R1 Rezeptor bindet, wird der Co-Rezeptor IL-1R3 (früher als IL-1-Rezeptor akzessorisches Protein (IL-1 RAcP) bezeichnet), ebenfalls ein Transmembranprotein, rekrutiert und dieses führt zu einer Konformationsänderung der extrazellulären IL-1R-Rezeptordomäne und zur Dimerisierung der intrazellulären Toll-IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne des IL-1Rezeptors und des IL-1R3 (Boraschi et al., 2018, Dinarello et al., 2010). Es bildet sich ein Multiproteinkomplex durch die Anlagerung der intrazellulären Proteine MYD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) und IRAK4 (*interleukin-1 receptor associated kinase 4*).

Durch die Autophosphorylierung von IRAK4 und die Phosphorylierung von IRAK1 und IRAK2 wird TRAF 6 (*tumor necrosis factor receptor associated factor 6*) rekrutiert. Der Proteinkomplex aus IRAK1, IRAK2 und TRAF 6 dissoziiert anschließend ins Zytosol (Brikos et al., 2007). Im Zytosol findet dann die TRAF6-vermittelte K63-abhängige Ubiquitylierung vieler Proteine statt, unter anderem der Kinase TAK1 (*TGF- β activated kinase 1*) (Weber et al., 2010). Nach der Rekrutierung von TAK1 induziert dieses eine Signalkaskade, die schlussendlich die Aktivierung von NF- κ B- (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*), JNK- (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38 MAP-Kinase- (*mitogen-activated protein kinase*) Signalwegen bewirkt (Hansen et al., 2013).

Der NF- κ B-Signalweg sorgt für die Expression von Genen, welche für Entzündungen und Immunreaktionen wichtig sind. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B besteht aus fünf Untereinheiten: p65, RelB, c-Rel, p100 (Vorläufer von p52) und p105 (Vorläufer von p50) (Hoffmann et al., 2006, Rothwarf and Karin, 1999). Nach der Aktivierung von TAK1 sorgt dieses für die Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes (IKK-Komplex). Unstimuliert liegt das NF κ B-Heterodimer durch das Inhibitorprotein I κ B α (*inhibitor of NF- κ B*) im Zytosol inaktiviert vor (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Durch IKK erfolgt der proteolytische Abbau von I κ B α durch das Proteasom, sodass die NF- κ B-

Untereinheit in den Zellkern translozieren und dort an die Promotoren der IL-1-Zielgene binden kann und dadurch die Transkription dieser aktiviert (Karin and Ben-Neriah, 2000). Da zu den IL-1 α -Zielgenen auch der Inhibitor I κ B α gehört, führt dies nach der Bildung der I κ B α -mRNA und dem anschließend neu synthetisiertem I κ B α -Protein zu einer negativen Rückkopplung. Dabei bindet I κ B α wieder an den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Hierbei bindet I κ B α an die konservierte *nuclear localisation site* (NLS) Bindungsstelle der NF- κ B Proteine und verhindert somit, dass das NF- κ B Dimer in den Zellkern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor wirken kann. Des Weiteren sorgt die Bindung von I κ B α am NF- κ B zur Unterbindung einer Interaktion von NF- κ B an seinen Ziel-DNA (Schmitz et al., 2004, Tran et al., 1997).

Schlussendlich führt die IL-1-Stimulation zur massiven Regulation von Genen: hierzu zählt die induzierte Expression von weiteren Zytokinen (IL-2, IL-6, TNF α , IL-1 α und IL-1 β) (Weber et al., 2010), Chemokinen (IL-8 (CXCL8), CXCL2, CCL20) sowie Enzymen wie PTGS2 (COX-2) (Sankar Ghosh et al., 1998).

1.4 Der mRNA-Abbau

Es gibt verschiedene Mechanismen für die Regulation der Genexpression. Hierzu zählen beispielsweise die verstärkte oder verminderte Transkriptionsrate oder aber durch der Abbau bzw. die Stabilisierung der mRNA. Letzteres erfordert die Bindung von RNA-bindenden Proteinen an bestimmten Sequenzen der mRNA, welche dann direkt oder indirekt zu einer Stabilisierung der mRNA führen oder einen Abbau der mRNA einleiten.

Als wichtige Sequenzbereiche zur Proteinbindung an mRNAs sind die Adenin-reichen Regionen (AREs) zu erwähnen, bestehend aus sich wiederholenden Sequenzen mit einer Länge von 50-150 Nukleotiden. Diese Sequenzelemente finden sich häufig in der untranslatierten Region (UTRs) von kurzlebigen mRNAs, zu welchen beispielsweise die für inflammatorische Proteine kodierenden mRNAs gehören (Eulalio et al., 2007a). Mit AU-reichen Regionen können spezifische, teilweise gut charakterisierte RNA-bindende Proteine interagieren. Beispielsweise führt die Interaktion des Proteins TTP (Tristetraprolin) oder analoger destabilisierender Proteine mit mRNA zur Degradation dieser (Brooks and Blackshear, 2013, Chou et al., 2006, Garneau et al., 2007). Hierbei wird angenommen, dass der schnelle Abbau durch den sogenannten *ARE mediated mRNA decay* (AMD) über eine Interaktion der RNA-bindenden Proteine mit spezifischen mRNA-Degradationsproteinen vermittelt wird.

Dadurch kann beispielsweise ein schneller Abbau von proinflammatorischen-mRNAs wie *IL8* oder *IL6*, erfolgen.

Der Abbau der mRNA kann prinzipiell über zwei verschiedene Wege ausgeführt werden. Der erste Schritt des Abbaus ist bei beiden identisch und beginnt mit der Deadenylierung des Poly(A)-Schwanzes durch den Ccr4/Pop2(Caf1)/Not-Komplex bestehend aus 7 Untereinheiten und den beiden *Core*-Proteinen CCR4 und POP2 (or CAF1) (Jain and Parker, 2013, Yamashita et al., 2005). Der 3'-Poly(A)-Schwanz schützt die mRNA vor der Degradation und eine Verkürzung kann daher als wichtiger initialer Schritt zum Abbau der mRNA gewertet werden.

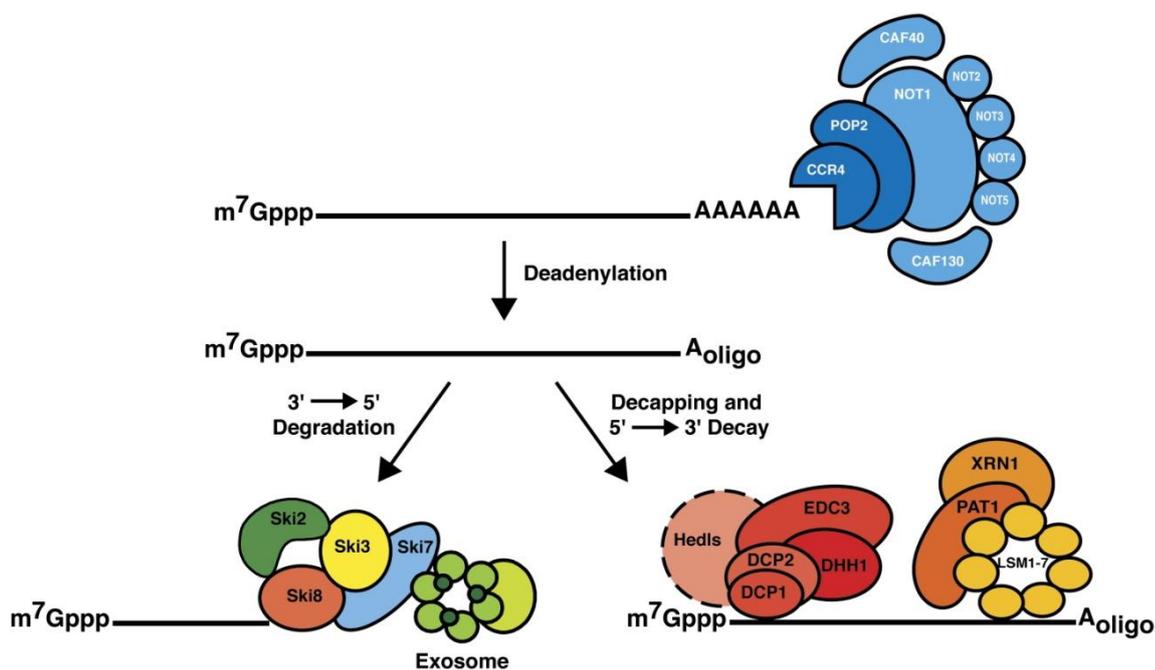


Abbildung 1.4.1 Prinzipielle Schritte des mRNA-Abbaus (Parker and Sheth, 2007). Der Abbau der mRNA wird durch das Entfernen des Poly(A)-Schwanzes durch den Ccr4/Pop2(Caf1)/Not-Komplex eingeleitet. Anschließend kann der Abbau auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Hierbei kommt es entweder zur Degradation in 3'-5'-Orientierung durch das Exosom und den sogenannten SKI-Komplex oder es erfolgt der 5'-3'-Abbau. Dieser wird durch das *Decapping*, dem Entfernen der 5'-N7-Methyl-Guanosin-Gruppe, initiiert, woraufhin die mRNA durch die Exoribonuklease XRN1 abgebaut wird. Reproduziert aus Parker and Sheth, 2007 mit der Lizenznummer:4644691041705.

Die weitere Degradation kann zum einen in 3'-5'-Orientierung erfolgen. Dies kann durch das Exosom erfolgen, welches den Ski2/Ski3/Ski8-Komplex und die Ski7-Proteine als Kofaktoren benutzt. Die 3'-5'-Degradation durch das Exosom (Anderson and Parker, 1998, Garneau et al., 2007, Parker and Song, 2004) wird durch den SKI-Komplex reguliert. Der mRNA-Abbau kann auch in 5'-3'-Orientierung erfolgen. Die mRNA besitzt am 5'-Ende eine *Cap*-Struktur, bestehend aus einem N7-Methyl-Guanosin-Triphosphat. Diese *Cap*-Struktur sorgt im Rahmen der Translation dafür, dass

Translations-Initiationsfaktoren wie eIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*) binden und die ribosomalen Untereinheiten rekrutieren können, um die Translation der mRNA einzuleiten (Ramanathan et al., 2016, Shuman, 1995). Beim *Decapping* platzieren sich die *Decapping*-Faktoren DCP1 (*mRNA decapping protein 1*) und DCP2 (*mRNA-decapping protein 2*) an die deadenylierte mRNA menschlicher Zellen. Hierbei ist DCP1 der Kofaktor von DCP2, während DCP2 die enzymatische Aktivität besitzt. Nach Entfernung des N7-Methyl-Guanosin-Diphosphates durch den *Decapping* Komplex wird das 5' monophosphorylierte Ende der mRNA von XRN1 erkannt und die RNA sodann rasch in einzelne Nukleotide abgebaut (Garneau et al., 2007, Kulkarni et al., 2010). Weitere Faktoren, welche am *Decapping* beteiligt sind, sind die EDC (*Enhancer of decapping*) Proteine 1-3, der LSM1-7-Komplex (*Sm-like proteins numbered 1-7*), PAT1 (*Protein associated with topoisomerase II*), DDX6 (*ATP-dependent RNA helicase DDX6*) sowie EDC4 (*Enhancer of mRNA-decapping protein 4*) (Eulalio et al., 2007a).

1.5 Processing bodies (P-bodies)

Processing-bodies (P-bodies) gehören zu den zytoplasmatischen Ribonukleoprotein-Granula, in denen eine Akkumulation von untranslatierter mRNA und Komponenten des 5'-3'-Abbaus, z.B. der *Decapping*-Faktoren, *Decapping*-Aktivatoren und weiteren Komponenten der Deadenylierung gefunden wurde (Cougot et al., 2004, Sheth and Parker, 2003). Zudem konnten weitere Proteinkomponenten des miRNA-Abbaus, der ARE-mRNA und des NMD-Abbaus (*nonsense mediated decay*) in *P-bodies* nachgewiesen werden (Franks and Lykke-Andersen, 2007, Kedersha et al., 2005, Liu et al., 2005, Pillai et al., 2005, Sen and Blau, 2005, Sheth and Parker, 2006). Als membranlose Organellen weisen *P-bodies* Gemeinsamkeiten mit anderen Ribonukleoprotein-Komplexen wie beispielsweise den Stress-Granula auf, jedoch unterscheiden sie sich von diesen in der Zusammensetzung der Proteine und auch in ihrer Funktion. Bestimmte Proteine kommen aber sowohl in Stress-Granula, als auch in *P-bodies* vor, können durch Stress in der Zelle induziert werden und miteinander interagieren (Stoecklin and Kedersha, 2013). Hierzu zählen beispielsweise eIF4E (*Eukaryotic translation initiation factor*) (Andrei et al., 2005), sowie die Exoribonuklease XRN1 (Kedersha et al., 2005, Bashkirov et al., 1997).

P-bodies sind zirkuläre dynamische Strukturen im Zytoplasma mit einem Durchmesser von 150-340 nm und einer durchschnittlichen Länge von 244 nm, welche häufig in der

Nähe von Ribosomen und Mitochondrien aufzufinden sind (Cougot et al., 2012, Eulalio et al., 2007a). Seltener sind sie in der Nähe von Kernhüllen oder der Plasmamembranen lokalisiert. Die in *P-bodies* enthaltenen Proteine können aus den Strukturen dissoziieren oder weitere Proteine rekrutieren (Andrei et al., 2005). Dasselbe gilt auch für die in *P-bodies* enthaltenen mRNAs, welche in das Zytoplasma dissoziieren und anschließend translatiert werden können. Demzufolge können *P-bodies* auch als mRNA-Speicherorte genutzt werden (Kedersha et al., 2005).

P-bodies sind zum Teil an den Mikrotubuli des Zytoskeletts verankert und können entlang dieser innerhalb der Zelle transportiert werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass Mikrotubuli einen Einfluss auf die Zahl und Größe von *P-bodies* haben; so konnte mittels Nocodazol (ein synthetisches Benzimidazol, welches an Mikrotubuli bindet und die weitere Bindung und Polymerisation von Monomeren inhibiert) die Anzahl und Größe der *P-bodies* gesteigert werden (Aizer et al., 2008). Membranlose Organellen wie beispielsweise *P-bodies* und Stress-Granula können eine unterschiedliche Viskosität analog eines Flüssigkeitstropfens aufweisen. Die Übergänge zwischen diesen Zuständen werden als *liquid-liquid phase transitions* bezeichnet (Banani et al., 2017).

1.6 Funktion der *P-bodies* beim Abbau und der Speicherung von mRNAs

Durch die Kolokalisation der mRNA und mRNA-abbauender Proteine in *P-bodies* wurde zunächst angenommen, dass diese ein Ort des mRNA-Abbaus sind. (Eulalio et al., 2007a). Eine Hemmung der Transkription durch beispielsweise die Verwendung von Actinomycin D führt zu einer Reduzierung der *P-body* Zahl (Cougot et al., 2004). Daher wird vermutet, dass die Anzahl der mRNAs in der Zelle mit der Menge an *P-bodies* korreliert (Andrei et al., 2005, Yang et al., 2004). Jedoch demonstrierten die neusten Ergebnisse auch, dass *P-bodies* nicht für den Abbau von mRNA benötigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen auch ohne mikroskopisch nachweisbare *P-bodies* in der Lage waren, mRNAs abzubauen (Eulalio et al., 2007b). Die genaue Funktion der *P-bodies* bezüglich des mRNA-Abbaus ist daher noch nicht vollständig geklärt.

Die Zahl der *P-bodies* wird in einem dynamischen Prozess reguliert und durch äußere Einflüsse wie beispielsweise Stress beeinflusst (Kedersha et al., 2005). Es konnte

nachgewiesen werden, dass die Größe und das Vorhandensein dieser dynamischen Granula auch abhängig vom Zellzyklus und Proliferationsstatus der Zellen ist. So wurde in HeLa-Zellen gezeigt, dass in der späten S- und G2-Phase mehr *P-bodies* in der Zelle vorhanden sind als in der frühen S-Phase (Yang et al., 2004). Auch proliferierende Zellen weisen mehr *P-bodies* auf. Während der Mitose lösen sich diese Foci auf und bilden sich erst wieder in der späten G1 Phase neu. Dies kann mit der Theorie vereinbart werden, dass die *P-body* Anzahl mit der RNA-Menge korreliert, welche während der Mitose in der Zelle reduziert ist.

P-bodies konnten nicht nur in menschlichen Zellen, sondern auch in Hefen gefunden werden (Sheth and Parker, 2003, Teixeira and Parker, 2007). Versuche in Hefezellen zeigten, dass *P-bodies* auch als Ort der mRNA-Speicherung dienen könnten. Diese Theorie konnte anhand von Glukosemangel-Experimenten unterstützt werden, innerhalb derer spezifische mRNAs der Hefezellen in *P-bodies* transportiert wurden und deshalb nicht mehr translatiert werden konnten (Zid and O'Shea, 2014). Nach Zugabe von Glukose wurden die mRNAs wieder freigegeben und konnten erneut translatiert werden (Bregues et al., 2005).

Das mRNA-*Decapping* stellt einen Schlüsselschritt der mRNA Regulation dar, denn durch die Entfernung der 5'-*Cap* stoppt die mRNA-Translation und der Abbau wird eingeleitet. Normalerweise binden die Translations-Initiationsfaktoren an die 5'-*Cap* Struktur und leiten die Translation ein. Durch das Entfernen dieser Kappe kann die mRNA nicht mehr translatiert werden. Ein *Recapping* (also die Bildung einer neuen 5'-*Cap*) kann durch den Translations-Initiationsfaktor eIF4E auch außerhalb des Zellkerns stattfinden. Es ist somit möglich, dass in *P-bodies* mRNAs ohne 5'-*Cap* zwischenzeitlich gelagert und bei Bedarf nach dem *Recapping* wieder der Translation zugeführt werden (Ignatichkina et al., 2015, Otsuka et al., 2009, Schoenberg and Maquat, 2009) .

Die genaue Verteilung der molekularen Komponenten zwischen den *P-bodies* und dem Zytoplasma ist noch unklar. Der 5'-3'-Abbau der mRNAs findet daher nicht nur in den *P-bodies* statt, entsprechend wurden die Komponenten des *Decappings* und der 5'-3'-Degradation auch außerhalb dieser Granula im Zytosol entdeckt (Anderson and Kedersha, 2009, Eulalio et al., 2007a, Franks and Lykke-Andersen, 2008).

1.7 Die *P-body* Komponenten DCP1a, DCP2, EDC4 und XRN1

Der *Decapping* Komplex besteht aus einer Reihe von Proteinen: DCP2, EDC3, EDC4, LSm14A, Pat, LSm1-7-Komplex, DDX6 und DCP1a. Die *P-body* Komponenten DCP1, DCP2 und EDC4 sind an dem *Decapping* der mRNA beteiligt. DCP1a und das homologe Protein DCP1b sind Coaktivatoren von DCP2. DCP1a und DCP1b werden von unterschiedlichen Genen kodiert (Lykke-Andersen, 2002), jedoch wird davon ausgegangen, dass sich beide Proteine funktionell ähnlich verhalten, wobei in den meisten verfügbaren Studien DCP1a untersucht wurde (Fenger-Gron et al., 2005). Während in Hefezellen die Interaktion von DCP1a und DCP2 direkt erfolgt, haben Studien in eukaryotischen Zellen gezeigt, dass diese zusätzlich ein *scaffold* Protein, EDC4, benötigen, um miteinander interagieren zu können (She et al., 2008). DCP1a besteht aus einer N-terminalen *enabled* / *vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1* EVH1-Domäne und der C-terminalen Region, welche drei antiparallele α -Helices beinhaltet (die sogenannte TD-Region). DCP1a ist in der Lage, über seinen C-Terminus zu trimerisieren, was von essenzieller Bedeutung für die Interaktion von DCP1a, DCP2 und EDC4 ist (Tritschler et al., 2009).

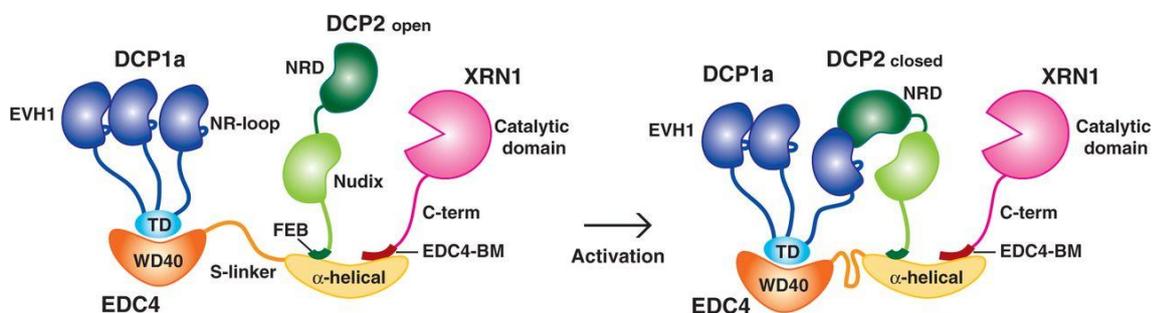


Abbildung 1.7.1 Schematische Darstellung des humanen *Decapping* Komplexes und seiner Interaktionen mit EDC4 und XRN1 (Chang et al., 2014). Über die WD40-Bindungsstelle von EDC4 interagiert DCP1a mit EDC4, weiterhin binden DCP2 und XRN1 am C-terminalen Ende von EDC4. DCP1a kann über die EVH1-Domäne mit der NRD-Region von DCP2 interagieren, wodurch eine Konformationsänderung und damit die enzymatische Aktivität von DCP2 induziert wird. Nach dem *Decapping* der mRNA durch DCP2 kann diese dann an die Exoribonuklease XRN1 weiter geleitet werden. Die Trimerisierung von DCP1a ist für die Bindung an EDC4 und DCP2 erforderlich. (Reproduziert aus Chang et al., 2014 mit der Lizenznummer: 4644691488815)

Hierbei wird DCP1a als Co-Faktor von DCP2 benötigt und stabilisiert dessen geschlossene Konformation. Dabei dockt die *NR-loop*-Region von DCP1a an die NRD-Region von DCP2 an. Es wird angenommen, dass DCP1a und DCP2 allein in menschlichen Zellen nicht effektiv miteinander interagieren können. Die Interaktion

wird durch EDC4 ermöglicht, welches als *scaffold* Protein dient und den kritischen Schritt des *Decappings* erleichtert (Chang et al., 2014, Tritschler et al., 2009).

DCP2 gehört zu der *Nudix*-Familie und besteht aus der N-Terminal regulierten Domäne (NRD) und der katalytisch aktiven (*Nudix*) Domäne, sowie der C-terminalen variablen Domäne und dem C-terminalen Phenylalanin-reichen (FEB) Bereich, worüber DCP2 in der Lage ist, mit EDC4 zu interagieren (Chang et al., 2014). DCP2 katalysiert die Hydrolyse der *Cap*-Struktur und sorgt somit für die Entfernung der N7-Methyl-Guanosin-Gruppe der mRNAs. Zudem besitzt DCP2 zwei zusätzliche Regionen, bekannt als Box A und Box B, welche die *Nudix*-Region flankieren (van Dijk et al., 2002). Box A wird die Fähigkeit zur Erleichterung der Interaktion zwischen DCP1a und DCP2 zugesprochen, während Box B für die RNA-Bindung zuständig sein soll (She et al., 2006, She et al., 2008).

Das EDC4-Protein dient in menschlichen Zellen als eine zusätzliche funktionelle Komponente; es weist Bindungsstellen für DCP1a, DCP2 und XRN1 auf und ermöglicht dadurch die Bindung zwischen DCP1a und DCP2 (Fenger-Gron et al., 2005). Hierfür besitzt EDC4 am N-Terminus eine WD40-Region und am C-Terminus die α -helicale Domäne.

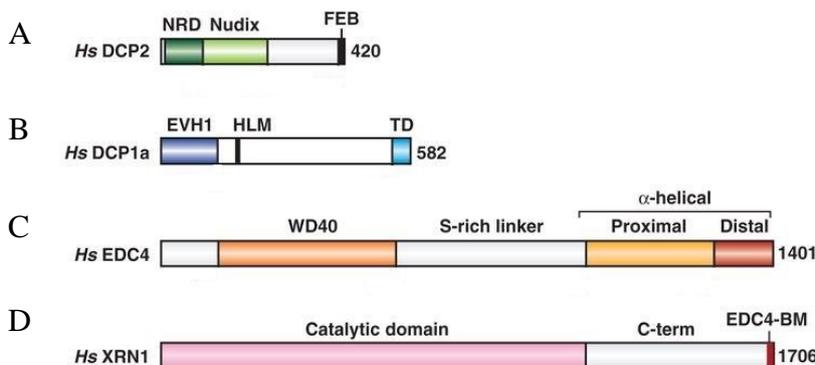


Abbildung 1.7.2 Schematische Domänen-Struktur der *P-body*-Komponenten DCP2, DCP1, EDC4 und XRN1. (Chang et al., 2014). Die Proteindomänen von DCP2, DCP1a, EDC4 und XRN1 wurden schematisch von N- zu C-Terminus dargestellt. Die Größe der jeweiligen Proteine in Aminosäuren wurde rechts aufgeführt. **A**) DCP2 besteht aus einer regulatorischen NRD-Region (dunkelgrün), der katalytischen Domäne, der sogenannten *Nudix*-Domäne (hellgrün), der Phenylalanin-reichen EDC4-Bindedomäne (schwarz) und aus einer C-terminalen variablen Region (weiß). **B**) DCP1a setzt sich aus der EVH1-Domäne (dunkelblau), der C-terminalen Domäne bestehend aus der Trimerisierungsdomäne (TD, hellblau) und der kurzen helikalen Leucin-reichen Region (HLM) zusammen. **C**) EDC4 besteht aus der WD40-Domäne (orange) und der proximalen (gelb) und distalen (rot) α -helikalen Region. **D**) Die Exoribonuklease XRN1 besteht aus der katalytischen Domäne (rosa) und dem EDC4-Bindemotiv (EDC4-BM), welche durch die C-terminale variable Region miteinander verbunden sind (reproduziert und modifiziert aus Chang et al., 2014 mit der Lizenznummer: 4644691488815).

Das α -helikale Ende von EDC4 interagiert simultan mit XRN1 und DCP2. DCP2 bindet hierbei mit seiner phenylalanin-reichen C-terminalen Domäne (FEB-Region) an das α -helikale Ende von EDC4, wobei DCP1 an die WD40-Region bindet. Dadurch wird die Interaktion der EVH1-Domäne von DCP1 und der NRD-Domäne von DCP2 erleichtert (Chang et al., 2014). XRN1 besteht aus einer N-terminalen katalytischen Domäne und einer C-terminalen Region (Chang et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass XRN1 bei Wirbeltieren an EDC4 durch das C-terminale EDC4-*binding motif* (EDC4-BM) bindet. Somit kommt EDC4 eine wichtige Rolle bei dem Zusammenführen der *Decapping* Komplexe und der XRN1 Exoribonuklease zu (Braun et al., 2012).

1.8 Virusinfektion und *P-bodies*

Eine virale Infektion stört den Ablauf des Stoffwechsels einer Zelle auf verschiedenen Ebenen. Das Virus sorgt dafür, dass DNA-Replikation und RNA-Synthese hauptsächlich für die Amplifizierung des viralen Genoms und der Protein-Synthese verwendet werden. So kodieren die viralen Gene alle für die Transkription und Replikation benötigten Enzyme, jedoch nicht für ribosomalen Proteine. Das Virus ist demnach abhängig von der Translationsmaschinerie der Wirtszelle (Walsh and Mohr, 2011). Virale Infektionen können auch einen Einfluss auf die Formation von *P-bodies* haben. Das Poliovirus (ein Plus-Strang RNA-Virus) beispielsweise sorgt für die Störung von *P-bodies*. Hierbei beschleunigte das Poliovirus den Abbau der Exoribonuklease XRN1, der 3'-Deadenylase-Komponente PAN3 (*poly(A)-specific ribonuclease subunit*) sowie des *Decapping* Enzyms DCP1a, welche wichtige Faktoren für die *P-body*-Formation darstellen (Dougherty et al., 2011). Dieses führt zu einer Auflösung und einer Reduktion der *P-body* Anzahl in der Zelle nach der Infektion durch das Poliovirus (Dougherty et al., 2011). Weitere Bestandteile der *P-bodies*, welche ebenfalls eine bedeutende Rolle für dessen Assemblierung spielen, wie beispielsweise EDC3 und EDC4, sind von diesem Virus-bedingten Abbau jedoch nicht betroffen.

Viele weitere RNA-Viren wie beispielsweise das Rotavirus, das West-Nil-Virus, das Dengue-Virus, das Influenzavirus und das Coxsackie-Virus führen durch verschiedene Mechanismen zu einer Reduktion der *P-bodies* Anzahl nach einer Infektion (Poblete-Duran et al., 2016). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die *P-body* Anzahl während der Infektion abhängig vom Virus-Typ reduzierte und zusätzlich bestimmte *P-body* Komponenten in der Zelle relokalisiert wurden (Tsai and Lloyd, 2014).

Das humane Coronavirus 229E (HCoV-229E) gehört zu den Plus-Strang RNA-Viren der Familie der Coronaviridae. Zahlreiche Erkrankungen werden durch Plus-Strang RNA-Viren verursacht, wie beispielsweise Hepatitis C oder das West-Nil-Fieber (Beckham and Parker, 2008). Ein Drittel aller Viren besitzt ein Plus-Strang RNA-Genom, sodass die im Virus enthaltene RNA von der Wirtszelle direkt in virusspezifische Proteine translatiert werden kann. Nach der Synthese der virusspezifischen Proteine, welche Transkriptions- und Replikationsfaktoren beinhalten, werden diese rekrutiert und dienen dann zur Bildung eines Transkriptions-/Replikationskomplexes (Beckham and Parker, 2008).

Das CoV ist für die Infektion des oberen Respirationstrakts verantwortlich und wird durch Tröpfcheninfektion verbreitet. Bis 2020 waren sechs humanpathogene CoV-Typen bekannt, wovon HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 und HCoV-HKU1 eine Infektion der oberen Atemwege verursachen. Das 2003 entdeckte SARS-CoV ist Auslöser des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS) (Graham et al., 2013). Zudem wurde Ende 2019 ein neues Coronavirus entdeckt, das sogenannte SARS-CoV-2, welches ebenfalls wie das 2013 entdeckte Virus zu akuten schweren respiratorischem Syndrom führt (Guo et al., 2020) und sich zu einer weltweiten Pandemie ausbreitete.

Es wird davon ausgegangen, dass RNA-Viren mit der mRNA-Abbaumaschinerie und *P-body*-Komponenten interagieren, um zu vermeiden, dass das Virusgenom abgebaut wird. Je nach Virus-Typ konnten verschiedene Effekte auf *P-bodies* nachgewiesen werden. So konnte beispielsweise nach einer Infektion mit Flaviviridae, wozu auch die bereits erwähnten West-Nil- und Dengue-Viren zählen, welche ebenfalls Plus-Strang RNA-Viren sind, gezeigt werden, dass die *P-body* Bildung reduziert wurde (Emara and Brinton, 2007).

In menschlichen Zellen wurde gezeigt, dass eine West-Nil-Virus Infektion eine Reduzierung der *P-bodies* Anzahl bewirkte und gleichzeitig eine Rekrutierung der *P-body* Komponenten LSM1, GW182, DDX3, DDX6 und XRN1 zu der viralen Replikationsmaschinerie bewirkte, wodurch die virale Replikation gefördert wurde (Chahar et al., 2013).

Das Dengue-Virus ist Auslöser des Dengue-Fiebers, des Dengue-hämorrhagisches Fiebers und des Dengue-Schock-Syndroms. In einer Studie konnte für dieses Virus gezeigt werden, dass die virale RNA über die 5'- und 3'-untranslatierte Region (UTRs)

mit den genannten Proteinen interagiert und dadurch die Assemblierung der *P-bodies* hemmt (Ward et al., 2011).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Verschiedene Studien deuteten darauf hin, dass *P-bodies* und die in ihnen enthaltenen Komponenten des *Decapping Pathways* ein intrazelluläres System darstellen, um posttranskriptionell durch die (direkte oder indirekte) Regulation des mRNA-Abbaus bzw. der Translation mRNA Spiegel auf äußere Reize hin zu regulieren. Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von *P-body* Komponenten und ihrer individuellen Protein:Protein Wechselwirkungen in einzelnen mit IL-1 stimulierten oder Virus-infizierten Zellen mithilfe des *Proximity Ligation Assays*. Hierfür sollten systematisch verschiedene Antikörperpaare miteinander kombiniert und die Anzahl an endogenen Proteinkomplexen sowie ihre subzelluläre Verteilung in unbehandelten, Zytokin-stimulierten und Virus-infizierten humanen Epithelzelllinien quantifiziert werden.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterialien

Alle in dieser Doktorarbeit verwendeten Plastikwaren und Einwegprodukte wie Reaktionsgefäße, Falkonröhrchen oder Pipettenspitzen wurden von den Firmen Brand, Eppendorf, Greiner, Neolab, Nunc, Omnilab, Roth, Nerbe Plus oder Sarstedt bezogen.

2.2 Geräte

2.2.1 Allgemeine Geräte

Tabelle 2.1: Allgemeine Geräte

Gerät	Hersteller
Hybridisierungssofen HB-1D	Thermo-DUX
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage FI310	Fischer
Kühl- und Gefrierschränke	Heraeus, Bosch
Multipette	Eppendorf
Eismaschine	Ziegra
Pipetten	Eppendorf

2.2.2 Zellkultur

Tabelle 2.2: Zellkultur

Gerät	Hersteller
Wasserbad	GFL
Sterilwerkbank Lamin Air HB 2472	Thermo Scientific
Brutschrank CO2 Autozero	Thermo Scientific

2.2.3 Elektrophorese-, Westerblotting- und Photographiesystem

Tabelle 2.3: Elektrophorese-, Westerblotting und Photographiesystem

Gerät	Hersteller
Chemi Doc Touch Imaging System	Bio-Rad
Elektrophorese Power Supply EPS 600, 601 und 3500 Spectrophotometer	Pharmacia Biotech
Gel iX Imager UV-Transilluminator	INTAS
Mighty Small II	Hoefer
Mupid-exU	Takara
PerfectBlue 'Semi-Dry'-Blotter, Sedec	VWR Peqlab

2.2.4 Mikroskopie und Photometrie

Tabelle 2.4: Mikroskopie und Photometrie

Gerät	Hersteller
DMIRE2 Fluoreszenzmikroskop	Leica
DMIL	Leica
DMi8 Fluoreszenzmikroskop	Leica
DMIRB	Leica
ND-1000 Spectrophotometer	Nano Drop
Microplate Spectrophotometer	Molecular Devices
μ-Slide VI0.4 (ibiTreat)	Ibidi

2.2.5 Software und Programme

Tabelle 2.5: Software und Programme

Programm	
Adobe Photoshop	Version 7.0
Bio-Rad Image Lab	Version 5.0 build 18
ImageJ	Version 1.52a
Leica FW4000	Version 1.2.1
Leica LasX	Version 1.5.1.13187
Sigma Plot	Version 11.0 und 12.5
GraphPad Prism	Version 8

2.3 Zentrifugen

Tabelle 2.6: Zentrifugen

Gerät	Hersteller
TJ-25 Zentrifuge	Beckman Coulter
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf

2.4 Chemikalien und Lösungsmittel

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Baker, Biomol, Fluka, Invitrogen, Merck, Pharmacia, Promega, Roth, Roche, Serva und Sigma bezogen.

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.7: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Spezial-Lysepuffer (pH 7,05)	10 mM Tris
	30 mM Natriumpyrophosphat
	50 mM NaCl
	1 % Triton X-100
	2 mM Na ₃ VO ₃
	50 mM NaF
	20 mM β -Glycerophosphat
	1 mg/ml Pepstatin
	5 mg/ml Leupeptin
	200 mM PMSF
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1 M Tris
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1 M Tris
10 x Laemmli-Laufpuffer	250 mM Tris
	1,92 M Glycin
	1 % (w/v) SDS

1 x Westernblotpuffer (<i>semi-dry</i>)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Ponceau-Rot Färbelösung	0,1 % (w/v) Ponceau S 5 % (v/v) Essigsäure
TBS-Puffer 10 x (pH 7,4)	100 mM Tris 1,5 M NaCl
TBST 1 x	TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20
TAE	40 mM Tris 0,11 % (v/v) Essigsäure 1 mM EDTA
Magermilchlösung	5 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBST-Puffer
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄

2.6 Medien

Tabelle 2.8: Medien

Medium	Zusammensetzung
DMEM-Vollmedium (<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)	10 % (v/v) FKS 20 µg/ml Streptomycin 20 U/ml Penicillin 2 mmol/l L-Glutamin
Einfriermedium	DMEM-Vollmedium 10 % FKS (v/v) 10 % DMSO (v/v)

2.7 Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Tabelle 2.9: Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien

Kit/Material	Hersteller
Amersham™ ECL™ Western blotting detection reagent	GE Healthcare (#RPN2106)
96-Well F96 MicroWell™ Platten	Thermo Scientific, Nunc
Filterpapier	Whatman
4% Paraformaldehyd-Lösung in PBS	Santa Cruz (#sc-281692)
Duolink In Situ Detection Reagents Orange	Sigma-Aldrich (#DUO92007-100RXN)
Gel Blotting Paper GB005	GE Healthcare (#10426994)
Hank's BSS	PAN (#P04-32505)
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific (#H3570)
Immobilion Western Chemiluminescent HRP-Substrate	Merck Millipore (#WBKLS0500)
Normal Donkey Serum	Jackson ImmunoResearch (#017-000-121)
PVDF-Membran	Millipore
PLA-Probe anti-Goat Minus	Sigma-Aldrich (#DUO92006-100RXN)
PLA-Probe anti-Mouse Minus	Sigma-Aldrich (#DUO92004-100RXN)
PLA-Probe anti-Mouse Plus	Sigma-Aldrich (#DUO92001-100RXN)
PLA-Probe anti-Rabbit Minus	Sigma-Aldrich (#DUO92005-100RXN)
PLA-Probe anti-Rabbit Plus	Sigma-Aldrich (#DUO92002-100RXN)
Ponceau S	Serva (#33429)
Roti-Load 1	Carl Roth (#K929.3)
Roti-Quant	Carl Roth (#K015.1)
Saponin	Sigma-Aldrich (#S4521-10G)
Trypsin/EDTA Solution	PAN Biotech (#P10-023100)

2.8 Marker

Tabelle 2.10: Marker

Marker	Hersteller
PageRuler™ PreStained Protein Ladder	Thermo Scientific (#26616)

2.9 Antikörper

2.9.1 Antikörper für die Immunfluoreszenz

Tabelle 2.11: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung pro Ansatz
DCP1a (Maus, Monoklonal)	Abnova, H00055802-M06, Lot#E3261-3G4	1:100
EDC3 (H-300) (Kaninchen, Polyklonal)	Santa Cruz, sc-135013, Lot#D1510	1:100
EDC4 (S-15) (Ziege, Polyklonal)	Santa Cruz, sc-137444, Lot#B1910	1:50
NFκB p65 (C-20) (Kaninchen, Polyklonal)	Santa Cruz, sc-372, Lot#E3014	1:100
NFκB p65 (F-6) (Maus, Monoklonal)	Santa Cruz, sc-8008, Lot#K0513	1:100
N-Protein (HCoV)	Igenase Hybridoma (Überstand)	1:100
XRN1 (C-1) (Maus, Monoklonal)	Santa Cruz, sc-165985, Lot#G2910	1:100
XRN1 (Kaninchen, Polyklonal)	Abcam ab70259	1:100

Tabelle 2.12: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung pro Ansatz
Cy3 Esel-anti Kaninchen IgG	Merck Millipore (#AP182C)	1:200
Cy3 Esel-anti-Maus IgG	Merck Millipore (#AP192C)	1:200
Cy3 Esel-anti-Ziege IgG	Merck Millipore (#AP180C)	1:200
Cy5 Esel-anti-Ziege IgG	Abcam (ab97117)	1:300
Dylight 488 Esel-anti-Maus IgG	ImmunoReagents (#DkxMu- 003D488NHSX)	1:200
Dylight 488 Esel-anti-Ziege IgG	Thermo Fisher Scientific (#SA5-10086)	1:100
Dylight 488 Esel-anti-Kaninchen IgG	ImmunoReagents (#DkxRb- 003D488NHSX)	1:100

2.9.2 Antikörper für das *Proximity Ligation Assay*

Tabelle 2.13: Primärantikörper für die PLA

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung pro Ansatz
DCP1a (Maus, Monoklonal)	Abnova, H00055802-M06 Lot#E3261-3G4	1:100
DCP1a (Kaninchen, Polyklonal)	Abcam ab 47811, Lot#1647811	1:100
DCP2(Kaninchen, Polyklonal)	Abcam ab28658, Lot#GR86092	1:200
EDC3 (H-300) (Kaninchen, Polyklonal)	Santa Cruz, sc-135013, Lot#D1510	1:100
EDC4 (S-15) (Ziege, Polyklonal)	Santa Cruz, sc-137444 Lot#B1910	1:100
EDC4 (Ge-1) (Kaninchen, Polyklonal)	Cell Signaling, 2548S	1:100
EDC4 (H-12) (Maus, Monoklonal)	Santa Cruz, SAMPLE, sc- 376382, Lot#I0216	1:100
XRN1 (C-1) (Maus, Monoklonal)	Santa Cruz, sc-165985, Lot#G2910	1:100
XRN1(Kaninchen, Polyklonal)	Abcam ab70259	1:200

2.9.3 Antikörper für den Westernblot

Tabelle 2.14: Primärantikörper für den Westernblot

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung pro Ansatz
β-Aktin (C4) (Maus, Monoklonal)	Santa Cruz, sc-47778	1:10000 in TBS-T 5% Milch
P-DCP1 (Kaninchen, Polyklonal)	Pickcell, Serum Fraction B, S315	1:300 in TBS-T
DCP1a (Maus, Monoklonal)	Abnova, H00055802-M06 , Lot#E3261-3G4	1:1000 in TBS-T
DCP2 (Kaninchen, Polyklonal)	Abcam ab28658, Lot#GR86092	1:1000 in TBS-T
EDC3 (H-300) (Kaninchen, Polyklonal)	Santa Cruz, sc-135013, Lot#D1510	1:500 in TBS-T
EDC4 (Ge-1) (Kaninchen, Polyklonal)	Cell Signaling, 2548S	1:1000 in TBS-T
NFκB p65 (C-20)(Kaninchen, Polyklonal)	Santa Cruz, sc372, Lot#E3014	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
NFκB p65 (F-6) (Maus, Monoklonal)	Santa Cruz, sc-8008, Lot#K0513	1:1000 in TBS-T, 5% Milch
NFκB p-p65 (p-S536) (Kaninchen, Monoklonal)	Cell Signaling, 3033, Phosphorylierung: Serin 536	1:1000 in TBS-T, 5% BSA
XRN1 (Kaninchen, Polyklonal)	Sigma-Aldrich, SAB4200028- 200UL, Lot#119K4794	1:700 in TBS-T

Tabelle 2.15: Sekundärantikörper für den Westernblot

Sekundärantikörper	Hersteller
Ziege-Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert (Polyklonal)	Dako, „P0448“
Ziege-Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert (Polyklonal)	Dako, „P0447“

2.10 Rekombinante Proteine

Tabelle 2.16: Verwendete rekombinante Proteine

rekombinantes Protein	Stocklösung	Herkunft
humanes, rekombinantes IL-1 α	10 μ g/ml in DMEM	Prof. Dr. Saklatvala, London, England
humanes, rekombinantes IL-1 α	10 μ g/ml in DMEM	Prof. Dr. Michael Kracht, Gießen

2.11 Eingesetzte Zelllinie

Tabelle 2.17: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Herkunft
HeLa (Weiterer et al., 2020)	humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen	AG Schmitz (Universität Gießen)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die in Stickstoff gelagerten Zellen wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend mit dem auf 37°C vorgewärmten komplettierten Zellkulturmedium (DMEM) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Überführung der resuspendierten Zellen in die Zellkulturschalen mit vorgelegtem Medium.

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA überschichtet und dann nach kurzer Zeit wieder abgesaugt. Nach der Inkubation der Zellen mit 37°C im Brutschrank, lösten sich diese von der Platte ab, da das Trypsin (eine sogenannte Endopeptidase) die Zell-Zell-Verbindungen auf Grundlage von Peptidbindungen löst und konnten nun mit eiskaltem Einfriermedium (30% FKS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)) auf die gekühlten Kryoröhrchen aliquotiert werden. Die Kryoröhrchen wurden dann bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.2 Kultivieren und Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 96% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ in DMEM-Medium kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 4-5 Tage. Zunächst wurde der Überstand der Zellen abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen zunächst mit warmen PBS gewaschen und mit 1-2 ml Trypsin/EDTA von der Schale gelöst. Die Zellen wurden dann in frischem Medium resuspendiert und im definierten Verhältnis auf neue Zellkulturschalen mit vorgelegtem DMEM-Vollmedium verteilt.

3.1.3 Stimulation und Fixierung von Zellen

Die Zellen wurden mit dem Zytokin IL-1 α zu unterschiedlichen Zeitpunkten stimuliert. Zur Kontrolle der Behandlung diente eine unbehandelte Probe. Für die Stimulation in μ -Slide VI^{0,4} Ibdis wurde die Stammlösung von IL-1 α von 10 μ g/ml Stammlösung auf 10ng/ml in Medium verdünnt. Die Zellen in μ -Slide VI^{0,4} Ibdis wurden anschließend mit 4%igem Paraformaldehyd in PBS fixiert.

Bei der Stimulation in 60 mm bzw. 100 mm Schalen für die Westernblots wurden das Zytokin IL-1 α bzw. Anisomycin (Stammlösung 25 mg/ml auf 10 μ g/ml verdünnt) direkt zum Vollmedium gegeben. Die Zellen wurden auf Eis geerntet. Zunächst wurden die

Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, in PBS mit Verwendung eines *scrapers* mechanisch abgelöst und im Anschluss für 5min bei 500xg und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden entweder direkt lysiert oder das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.4 Infektion von Zellen mit humanem Coronavirus 229E

Die HeLa-Zellen wurden ein Tag vorher ausgesät und 1 h vor der Infektion bei 33°C, 6% CO₂ inkubiert. Das HCoV-229E (*gene bank accession no.* AF304460) wurde in dieser Arbeit verwendet, welches von Prof. Dr. John Ziebuhr zur Verfügung gestellt wurde (AG Ziebuhr, Universität Gießen). Das HCoV-229E Virus wurde bei 4°C für 30 Minuten aufgetaut. Der Virusstock wurde im dreifachen Überschuss in die μ -Slide VI^{0,4} Ibdidis oder in 60 mm Schalen gegeben und 24 h bei 33°C, 6% CO₂ inkubiert.

Die Ansätze in μ -Slide VI^{0,4} Ibdidis wurden mit 4%igem Paraformaldehyd in HBSS fixiert und die Ansätze in den 60 mm Schalen wurden für spätere Westernblots geerntet.

3.2 Zellbiologische Techniken

3.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Durch die indirekte Immunfluoreszenz ist es möglich, Proteine und deren Lokalisation innerhalb der Zelle unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet zunächst ein spezifischer Primärantikörper an ein Zielprotein. Ein fluorophor gekoppelter Sekundärantikörper bindet anschließend an die Fc-Domäne des Primärantikörpers. Dadurch ist unter dem Fluoreszenzmikroskop das entsprechende Protein indirekt markiert und kann dann detektiert werden.

Als Vorbereitung wurden 30 μ l mit einer Zellzahl von 9000 Zellen je Kanal in die μ -Slide VI Ibdidis ausgesät und nach 1 h im Brutschrank bei 37°C, 96% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ mit 100 μ l DMEM-Medium aufgefüllt. Nach 24 h wurden die Zellen entweder mit IL-1 α behandelt (siehe Kapitel 3.1.3) oder mit HCoV-229E infiziert (siehe Kapitel 3.1.4). Nach der Behandlung der Zellen an den jeweiligen Zeitpunkten, wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 150 μ l Hank's Puffer (HBSS) gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 100 μ l 4%igem Paraformaldehyd in HBSS für 5 Minuten. Anschließend wurden die Zellen zweimal innerhalb von 5 Minuten mit 150 μ l HBSS gewaschen. Um die unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers zu blocken, wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 100 μ l 10% Normal Goat

Serum (in Hank's Puffer/ 0,1% Saponin) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 100 µl Primärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur. Die Antikörper wurden wie in Kapitel 2.9.1 angegeben in einer Verdünnung in HBSS mit 0,1% Saponin angesetzt. Die Zellen wurden danach dreimal für 10 Minuten mit 150 µl HBSS/ 0,1% Saponin gewaschen bevor die Inkubation für 2 h mit 100 µl Cy3-, FITC- oder Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper (in Hank's Puffer/ 0,1% Saponin) im Dunklen erfolgte. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal für 10 Minuten mit 150 µl Hank's Puffer gewaschen. Die Zellkernfärbung erfolgte mithilfe von 100 µl einer 1 µM Hoechst-Lösung (Stocklösung 1 mM, welche in HBSS verdünnt wurde) für 5 Minuten im Dunklen. Das Hoechst 33342 interkaliert zwischen den benachbarten Basen der DNA und sorgt dadurch indirekt zur Färbung der Zellkerne. Abschließend wurden die Zellen innerhalb von 5 Minuten zweimal mit Hank's Puffer gewaschen und für die Dauerlagerung mit 70 µl 30%igem Glycerollösung (in HBSS verdünnt) eingedeckt. Die Fluoreszenzbilder wurden an Leica Mikroskopen DM IRE2 bzw. DMi8 aufgenommen. Die Bearbeitung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der FW4000 oder LasX Software.

3.2.2 Proximity Ligation Assay (PLA)

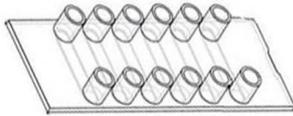
Der *Proximity Ligation Assay*, auch PLA genannt, ist eine äußerst sensitive Methode die zum Nachweis von Protein:Protein-Interaktionen, Quantifizierung von Protein-Modifikationen oder Proteinexpression (durch zwei Antikörper, die an verschiedenen Epitopen desselben Proteins binden) *in situ* dient. Zudem ist es mit der PLA möglich, die Interaktion von zwei Proteinen, welche maximal 30 nm auseinander liegen, als fluoreszierenden *Spot* zu detektieren (Soderberg et al., 2006). Dabei werden zwei Primärantikörper, welche aus verschiedenen Spezies generiert wurden, gegen die gewünschten Proteine oder unterschiedliche Epitope desgleichen Proteins verwendet. Anschließend wurden zwei oligonukleotidgekoppelte Sekundärantikörper benutzt, welche miteinander hybridisieren und durch eine Ligase verknüpft werden. Im Anschluss kommt es zur signalverstärkenden *Rolling-Circle*-Amplifikation dieser Oligonukleotide. Darauf folgend können die komplementären fluorophorgekoppelten Oligonukleotidsonden an die DNA-Sequenz hybridisieren und so der Proteinkomplex oder das Protein als roter *Spot* unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (Soderberg et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde das Duolink In Situ Kit Bioscience von der Firma Sigma Aldrich nach Modifikation der Herstellerangaben verwendet.

Zunächst wurden 30 µl einer definierten Zelldichte in µ-Slide VI Ibidi ausgesetzt und 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit IL-1 α behandelt (siehe Kapitel 3.1.3). Nach der Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Zeitpunkten, wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 150 µl Hank's Puffer (HBSS) gewaschen und mit 100 µl einer 4%igen Paraformaldehyd in HBSS für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach erfolgt die Permeabilisierung der Zellen mit Hank's Puffer + 0,1% Saponin für zweimal 5 Minuten. Anschließend werden die unspezifischen Bindungsstellen für die Primärantikörper durch die Blockinglösung (Duolink Kit) für 30 Minuten bei 37°C im Hybridisierungsöfen geblockt. Die 50 µl Primärantikörper wurden wie in Kapitel 2.9.2 angegebener Verdünnung in *Antibody-Diluent* für 1 h bei 37°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen dreimal 5 Minuten mit 150 µl Waschlösung A (Duolink Kit) gewaschen und mit den Sekundärantikörpern, PLA Sonden (Duolink in situ anti-Kaninchen, anti-Maus oder anti-Ziege mit jeweils PLUS oder MINUS; verdünnt 1:5 in *Antibody-Diluent*) für 1 h bei 37°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Erneut wurden die Zellen dreimal mit 150 µl Waschlösung A für 5 Minuten gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit 50 µl Ligaselösung (Duolink Kit) verdünnt in HLPC aqua für 30 Minuten bei 37°C. Nun werden die Zellen dreimal 2 Minuten mit 150 µl Waschlösung A gewaschen. Die nächsten Schritte erfolgen im abgedunkelten Raum, da im *Amplification* der Fluoreszenzfarbstoff enthalten ist. Nach der Nutzung des Waschlösung A wurden die Zellen mit 50 µl Polymeraselösung (Duolink Kit, verdünnt in Aqua) für 100 Minuten bei 37°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Waschlösung B (Duolink Kit) gewaschen und der Zellkern mit Hoechst 33342 in HBSS (1 µM) für 5 min angefärbt. Als Kontrollen dienten Zellen welche nur jeweils mit einem Primärantikörper oder ohne Primärantikörper inkubiert wurden. Die Zellen werden schlussendlich mit 70 µl einer 30%igen Glycerollösung eingedeckt.

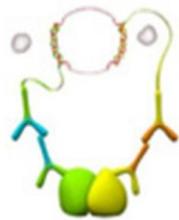
Die Fluoreszenzbilder wurden mittels der Leica Mikroskope DM IRE2 bzw. DMi8 aufgenommen und mit Hilfe der zugehörigen Software FW4000 oder LasX bearbeitet.

1. Aussäen, fixieren und permeabilisieren der Zellen in Ibisid



300 000 Zellen/ml je 30µl pro Slot

4. Inkubation mit Ligase-Lösung



7. Quantifizierung mittels Duolink Image Tool

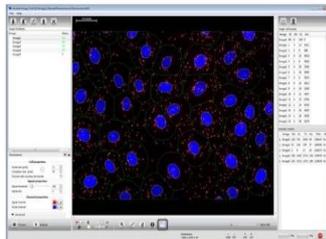
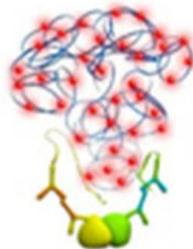


Fig 12. Analysis of an image from a fluorescence microscope.

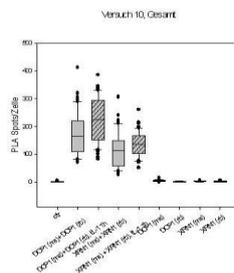
2. Inkubation mit primären Antikörpern



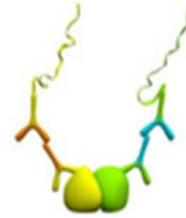
5. Inkubation mit Polymerase-Lösung, Amplifikation und Hydrolisierung mit fluorophorgekoppelten Oligonuklotiden



8. Auswertung der Daten mit SigmaPlot



3. Inkubation mit PLA Probes (oligonukleotidegekoppelter Sekundärantikörper)



6. Mikroskopieren, Aufnahme der Bilder am Fluoreszenzmikroskop

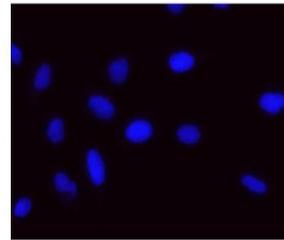


Abbildung 3.2.1 Bildliche Darstellung der Funktionsweise des Proximity Ligation Assay. Zunächst erfolgt die Bindung der spezifischen Primärantikörper an das Protein mit einer anschließenden Bindung des oligonukleotidegekoppelten Sekundärantikörpers (auch PLA-Probe genannt). Durch die Ligation werden die zwei gegenläufigen Oligonukleotidsequenzen miteinander ligiert, wenn diese in einem Abstand von maximal 30 nm zueinander liegen. Zuletzt findet die Inkubation mit der Polymerase statt, welche für die Amplifikation der ringförmigen DNA-Struktur verantwortlich ist. Dazu erfolgt durch die Polymerase ein besonderes Replikationsverfahren, die sogenannte signalverstärkende *Rolling-Circle-Amplifizierung*. Hierbei erfolgt diese an einer geöffneten Stelle der DNA, sobald die Polymerase ansetzt, welche sodann nur in eine Richtung arbeitet, dabei um den inneren Strang wandert und wie ein rollender Kreis einen neuen einzelnen DNA Strang erstellt. Danach erfolgt die Anlagerung der fluorophorgekoppelten, komplementären Oligonukleotide, welche sich letztendlich an die amplifizierte DNA anlagern und die Signale des PLAs darstellen. Mittels des Fluoreszenzmikroskops wurden Bilder aufgenommen, welche dann mit Hilfe des *Duolink Image Tool* ausgewertet wurden. Danach wurden die Daten mit *SigmaPlot* und *GraphPad Prism* analysiert und graphisch dargestellt. (Abbildung modifiziert nach <http://www.sigmaldrich.com/technical-documents/articles/biology/duolink-pla-applications.html#Protein-Protein%20Interaction> 13.05.2021)

3.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)-*Proximity-Ligation-Assay* (IF-PLA)

Die IF-PLA ist eine Kombination aus indirekter Immunfluoreszenz und *Proximity Ligation Assay*. Sie dient dazu die Interaktion von zwei Proteinen, die maximal 30 nm auseinander liegen in der PLA als fluoreszierenden *Spot* zu detektieren und zusätzlich ein weiteres Protein mit einer anderen fluoreszierenden Farbe in der IF zu markieren und zu erkennen, wie sie innerhalb der Zelle zueinander lokalisiert sind (Pacchiana et al., 2014).

Wie zuvor in der PLA (siehe Kapitel 3.1.2) beschrieben wurden 30 µl einer definierten Zelldichte 24 h vorher in µ-Slide VI Ibidi ausgesetzt und im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die Zellen entweder mit IL-1 α behandelt (siehe Kapitel 3.1.3) oder mit HCoV-229E infiziert (siehe Kapitel 3.1.4). Wie bei der normalen PLA erfolgte nun das Waschen, die Permeabilisierung und das Blocken der unspezifischen Bindungsstellen für die Primärantikörper (siehe Kapitel 3.2.2).

Anschließend wurden 100 µl Primärantikörper in der in Kapitel 2.9.2 angegebenen Verdünnung für die Antikörper, welche in der PLA verwendet wurde und in Kapitel 2.9.1 angegebener Verdünnung für die Antikörper, welche für die Immunfluoreszenz verwendet wurde, in *Antibody-Diluent* für 1 h bei 37°C im Hybridisierungsöfen inkubiert.

Daraufhin wurden die Zellen dreimal 5 Minuten mit 150 µl Waschpuffer A gewaschen und mit 50 µl PLA Sonden (Duolink in situ anti-Kaninchen, anti-Maus oder anti-Ziege mit jeweils PLUS oder MINUS; 1:5 verdünnt in *Antibody-Diluent*) sowie ein sekundärer Antikörper mit Fluoreszenzkoppelung ebenfalls in *Antibody-Diluent* (angegebene Verdünnung siehe Kapitel 2.9.1) für 1 h bei 37°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Die Kontrollen für die IF-PLA erfolgten ohne die Zugabe von Primärantikörper.

Das weitere Vorgehen der Inkubation mit der Ligase, der Polymerase, sowie die Kernfärbung entsprachen dem Protokoll der standardmäßig durchgeführten PLA (vgl. Kapitel 3.2.2).

Die Fluoreszenzbilder wurden an Leica Mikroskopen DM IRE2 bzw. DMi8 aufgenommen. Die Bearbeitung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der FW4000- oder LasX-Software.

Eine abgeänderte Methode der IF-PLA, welche ebenfalls verwendet wurde, ist die sogenannte IF-PLA mit Kernaufschluss.

Die IF-PLA mit Kernaufschluss wurde verwendet, um sicher zu stellen, dass die Proteine im Zellkern ebenfalls detektiert werden.

Zu Beginn wurden wie auch bei der normalen IF-PLA 30 µl einer definierten Zelldichte in µ-Slide VI Ibidi ausgesetzt und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Waschung mit PBS zweimal für jeweils 5 min. Die Zellen wurden mit 100 µl 0,1 M Tris-Cl für 10 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit 100 µl 0,1% Saponin/0,1% Triton-X/PBS für 10 min permeabilisiert. Nun wurden die Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht mit 100 µl 40% Glycerol/PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte dreimal für 1 min das Einfrieren und Wiederauftauen der Zellen in flüssigem Stickstoff. Die Zellen wurden dann erneut zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und mit 100 µl Blockinglösung für 30 min bei 37°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Das weitere Vorgehen der Inkubation mit den Primärantikörpern, den PLA-Probes und den Sekundärantikörpern, sowie der Ligase und der Polymerase entsprachen dem Protokoll der standardmäßig durchgeführten IF-PLA. Auch die Auswertung der Bilder entsprach der Vorgehensweise des Standardprotokolls der IF-PLA.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Lysate zur Immunodetektion im Westernblot

Bei der Zelllyse wurde auf Eis gearbeitet, um die proteolytische Inaktivierung von Proteinen und weitere katalytische Reaktionen zu verhindern. Zunächst wurden die Zellen in PBS geerntet (siehe Kapitel 3.1.3) und das Pellet entweder direkt lysiert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Das Pellet wurde mit dem sogenannten Speziallysepuffer, welches für die Extraktion von Proteinen aus einer ganzen Zelle bestimmt ist, resuspendiert, gevortext und dann für 15 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 10600 rpm bei 4°C. Der entstandene Überstand entspricht dem Lysat mit Gesamtprotein. Dieses wurde in ein 1,5 ml Gefäß überführt und die Proteinmenge konnte mittels Bradford bestimmt werden oder wurde bei -80°C eingefroren.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die gleiche Menge an Protein in einer Gelelektrophorese einzusetzen, wird die Proteinkonzentration der Zellysate mittels Bradford-Methode bestimmt. Diese Methode beruht auf der Bindung des *Coomassie Brilliant Blue* G-250 Farbstoffes an Proteine in saurer Lösung, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 zu 595 nm verschiebt (Bradford 1976).

Zunächst werden die Proben 1:300 in PBS verdünnt und 100 µl dieser Verdünnung werden auf einer 96-Well-Platte vorgelegt. Parallel wird eine BSA (*bovine serum albumin*)-Eichreihe (von 0 bis 35 µg/ml in PBS) ebenfalls in das Well pipettiert. Es wurden 100 µl des Bradfordreagenz (bestehend aus Roti-Quant 40% in ddH₂O) dazugegeben, und nach 5 min erfolgt die Messung der Extinktion der Proben bei 596 nm im *Microplate Spectrophotometer*. Der Proteingehalt der Proben wird in Relation zu der vorgelegten Standardreihe unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

3.3.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Bei der Analyse der Zellysate wird die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Dabei trennen sich die Proteine in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung in der Gelmatrix auf. Bestimmend dabei ist die Acrylamid-Konzentration des verwendeten Trenngels; je kleiner das Molekulargewicht, desto höher prozentig sollte die Acrylamid-Konzentration des Gels sein. Üblicherweise wurden in dieser Arbeit die 7,5 - 8%ige Trenngele sowie 5%ige Sammelgele verwendet. Durch das SDS-Polyacrylamid-Gel tragen die Proteine eine negative Ladung und migrieren im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.

Die proteinhaltigen Proben werden mit 4x Lämmli-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht, sodass sie denaturieren. Anschließend können die Taschen des Sammelgels mit den Proben beladen werden, als Größenmarker wird dabei 5 µl *PageRuler PreStained Protein Ladder* genutzt.

Anschließend wird das Gel mit Ponceau S Färbelösung angefärbt, um den qualitativen Transfer auf dem Gel zu überprüfen.

Tabelle 3.1 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele

Lösung (ml)	7,5%iges Trenngel	8%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
ddH ₂ O	2,66	2,46	2,81
Trenngelpuffer	4,6	4,6	-
Sammelgelpuffer	-	-	0,63
50% (v/v) Glycerol	1,08	1,08	0,45
2% (w/v) SDS	0,6	0,6	0,25
30% (w/v) Acrylamid	3,0	3,2	0,84
40% (w/v) APS	0,036	0,036	0,015
TEMED	0,024	0,024	0,01
Gesamt	12	12	5

3.3.4 Westernblot und Immunodetektion mittels *enhanced chemiluminescence (ECL)*-Reaktion

Als Westernblot wird der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Membran bezeichnet. Hierbei erfolgte dies mit dem sogenannten *semi dry*-Verfahren.

Zunächst wurde die verwendete PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran in Methanol aktiviert und das Gel (siehe Kapitel 3.3.3) darüber positioniert. Ober- und unterhalb wurden die PVDF Membran und das Gel in je zwei Lagen Filterpapier (Dicke 1,2 mm), welche zuvor in Blotpuffer getaucht wurden, eingebettet. Der Proteintransfer fand über 2 h bei 0,75 mA/cm² statt.

Um zu überprüfen, ob dies erfolgreich war, wurde die Membran mit 0,1% Ponceau S Lösung angefärbt. Das Ponceau S lagert sich dabei an die positiv geladenen Aminogruppen an und ermöglicht hierdurch das Anfärben der Proteinbanden auf der Membran. Nach der Dokumentation wurde zur Entfärbung der Membran TBST verwendet. Um die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu blocken, wurde diese in 5% Magermilch in TBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Blocken erfolgte die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper in einer Verdünnung in 5% Magermilch oder BSA gelöst in TBST (siehe Kapitel 2.9.3) schwenkend über Nacht bei 4°C. Um anschließend die überschüssigen und nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wird die Antikörperlösung entfernt und die Membran viermal je 5 min schwenkend mit TBST gewaschen. Sodann erfolgt die Inkubation mit dem *horseradish peroxidase* HRP-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 1 h in einer 1:2000 bis 1:5000 Verdünnung in 5% Magermilch/TBST. Erneut erfolgt das Waschen der Membran mit TBST. Die Enzym-Substrat-Reaktion der HRP mit ECL-Reagenz *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent* oder *Immobilion Western Chemiluminescent* ermöglicht die Detektion der Proteine auf der Membran. Dies wurde mit dem *Chemi Doc Touch Imaging System* registriert und dokumentiert.

Um weitere Antikörper auf derselben Membran zu detektieren, wurde diese für 1 min mit Methanol äquilibriert, um die noch gebundenen Sekundärantikörper zu inaktivieren, und erneut mit 5% Magermilch/TBST geblockt.

4 Ergebnisse

Im Verlauf der Arbeit sollte die Proteininteraktionen der *P-body* Komponenten nach IL-1 α Stimulation und Virusinfektion in einzelnen HeLa-Zellen untersucht werden. Hierfür wurde hauptsächlich der *Proximity Ligation Assay (PLA)* verwendet, sowie der neu in der Arbeitsgruppe etablierte Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assay (IF-PLA)*, eine Kombination der Immunfluoreszenz und des *Proximity Ligation Assays*, welches die simultane Detektion der Interaktion von zwei Proteinen ermöglicht und eine zusätzliche Markierung eines weiteren Proteins.

4.1 Einfluss von IL-1 auf den Proteinlevel der *Decapping* Enzyme

Um den Einfluss von IL-1 auf die Proteinlevel der *Decapping* Enzyme DCP1a, XRN1, EDC4, EDC3 und DCP2 in HeLa-Zellen in analoger Art und Weise zu ermitteln, wurden die Zellen für 30 min, 1 h und 3 h mit IL-1 stimuliert oder zusätzlich für 1 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Anisomycin, einem starken Modulator von Stresssignalwegen und *P-bodies* (Rzeczkowski et al., 2011) behandelt. Im Anschluss wurden die Proben lysiert und im Westernblot analysiert. Hierbei wurden Antikörper gegen β -Aktin und phospho-p65 als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung des Gels bzw. der IL-1 Stimulation verwendet.

Die Proteinkomplexe von DCP2, EDC3, XRN1 und EDC4 zeigten nach der IL-1 Stimulation eine gleichbleibende Proteinmenge.

Die in der Arbeitsgruppe Kracht bereits beschriebene IL-1 abhängige Induktion der DCP1a Phosphorylierung an Serin 315 konnte auch in diesen Experimenten in HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Rzeczkowski et al., 2011). DCP1a zeigt eine Doppelbande, die nach 30 minütiger Stimulation mit IL-1 eine Zunahme der Intensität der oberen Bande aufweist und nach 60 Minuten das Maximum erreicht. Dieses Phänomen wird durch kovalent gebundene Phosphatgruppen an DCP1a verursacht, sodass sich das Molekulargewicht und das Laufverhalten in der SDS-PAGE verändern. Nach 3 h wird eine Gleichverteilung der Banden beobachtet. Da das phosphorylierte Protein DCP1a mit dem phosphorylierungsspezifischen Antikörper schwerer zu detektieren war, wurde der zusätzliche Ansatz mit Anisomycinbehandlung für 1 h verwendet und als Positivkontrolle mitgeführt. Die Behandlung mit Anisomycin sorgt für eine deutliche und lang anhaltende Phosphorylierung von DCP1a, vermutlich im

Kontext der Inhibierung der Translation und der Auflösung von *P-bodies*, wie sie durch diese Substanz beschrieben wurden (Rzeczkowski et al, 2011).

Nach einer Stimulation mit IL-1 wird NFκB p65 am Serin 356 phosphoryliert und die Aktivität hierdurch reguliert (Schmitz et al., 2004). Nach 30 Minuten IL-1 Stimulation stieg die Phosphorylierung von p65 und nahm im weiteren Verlauf wieder ab, so dass die erfolgreiche Stimulation der Zellen mit IL-1a auch im Westernblot demonstriert werden konnte.

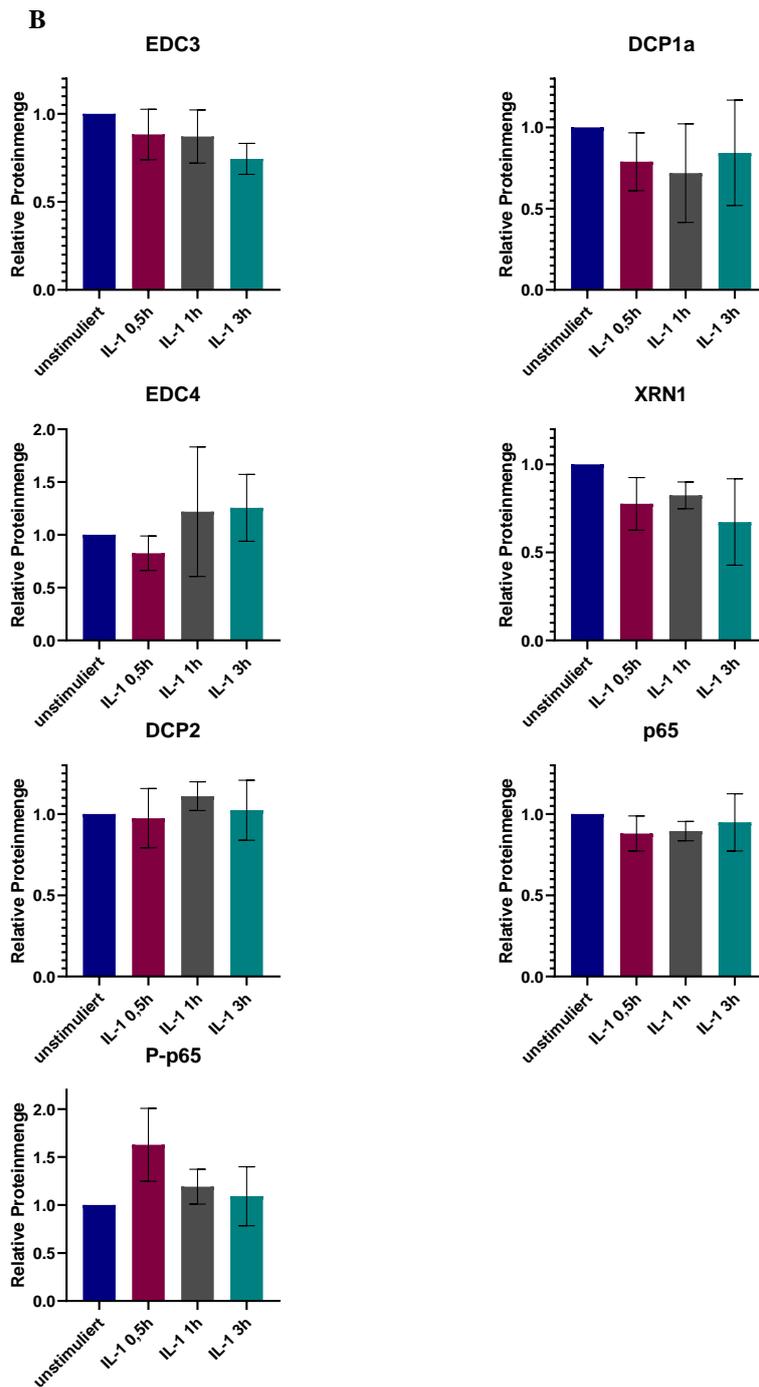
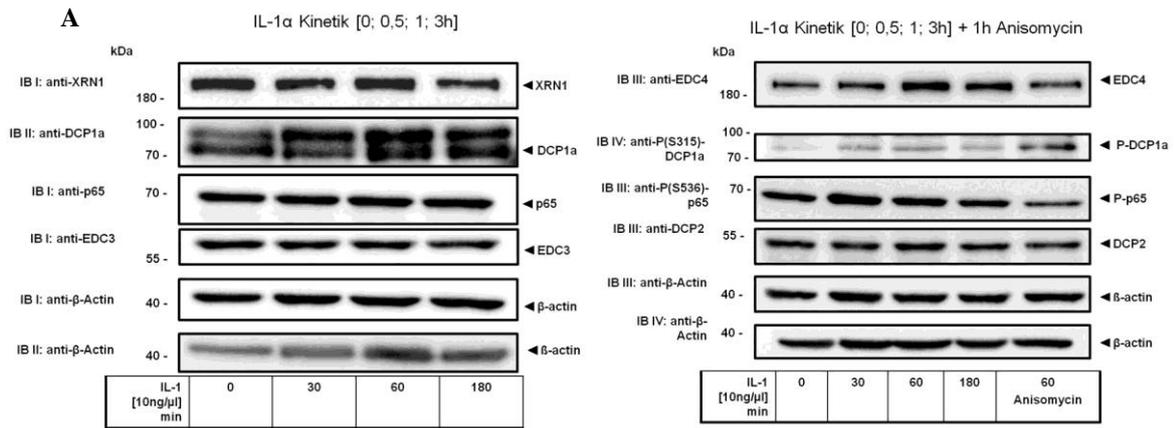


Abbildung 4.1.1 Analyse des Einflusses von IL-1 auf die totalen Proteinlevel von *P-body* Komponenten. **A:** HeLa-Zellen wurden entweder für 0,5 h; 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml), für 1 h mit 10 µg/ml Anisomycin behandelt oder unbehandelt gelassen und nachfolgend Ganzzellextrakte der Proteine präpariert. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der charakteristischen *P-body* Proteine und von Proteinen des IL-1-Signalwegs anhand von Westernblots. Der Nachweis von β-Aktin diente hierbei als Beladungskontrolle. **B:** Densitometrische Auswertung (mittels *Image Lab* von *Bio-Rad Laboratories*) der Westernblot Ergebnisse aus (A) aus drei unabhängigen biologischen Replikaten als Mittelwert (± Standardabweichung) normalisiert auf β-Aktin. Die Proteinmengen in unbehandelten Zellen wurden auf 1 gesetzt.

4.2 Detektion von *P-bodies* mittels Markierung von DCP1a, XRN1, EDC3 und EDC4 durch Immunfluoreszenz

In der Arbeitsgruppe Kracht wurden bereits vor dem Zeitpunkt des Beginns der Promotionsarbeit umfangreiche zeitkinetische Experimente zur IL-1-abhängigen *P-body* Regulation durchgeführt. Diese zeigten, dass durch IL-1 α Stimulation in HEK293 Zellen mit stabil transfizierten IL-1R die Zahl der *P-bodies* pro Zelle steigt (Rzeczkowski et al 2011).

Zunächst wurde der Einfluss von IL-1 α auf die Regulation der *P-bodies* in humanen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa-Zellen) untersucht. Dies erfolgt unter der Verwendung der Triple-Immunfluoreszenz, welche durch die Nutzung verschiedener Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen und gt=Ziege) und ihrer fluorophorgekoppelten Sekundärantikörper, die spezifische, gleichzeitige Detektion dreier *P-body* Proteine erlaubt.

Es wurden Antikörper für die zeitgleiche Detektion von DCP1a, XRN1 und EDC4, sowie DCP1a, EDC3 und EDC4 und zudem EDC3, XRN1 und EDC4 verwendet. Als Sekundärantikörper wurden in der indirekten Triple-Immunfluoreszenz an die Fluorophore Cy3, Cy5 und Dylight 488 gekoppelte IgGs genutzt, um die Kolokalisation der Proteine in *P-bodies* zu untersuchen.

Die Kolokalisation von drei Proteinen wird als weißer *Spot* sichtbar. Die Analyse der *P-bodies* mittels Einzelzellanalyse zeigte im Median keine statistisch signifikante Veränderung der *P-body* Anzahlen pro Zelle nach Stimulation mit IL-1 (Abbildung 4.2.2). Daher erfolgte eine verfeinerte Untersuchung von Subpopulationen einzelner Zellen, die besser die beobachtbare Heterogenität der *P-bodies* pro Zelle abbilden sollte. Die Zellen wurden hierfür anhand ihrer *P-body* Zahl in 5 Kategorien unterteilt und die prozentuale Verteilung in der Gesamtpopulation in einem Graphen dargelegt. Es wurde zwischen Zellen ohne *P-bodies*, mit 1-5 *P-bodies*, 6-10 *P-bodies*, 11-15 *P-bodies* und > 15 *P-bodies* unterschieden.

Mit diesem Verfahren zeigte sich in der Triple-IF für DCP1a, XRN1 und EDC4 nach IL-1 Stimulation ein Anstieg der Zellen mit 6-10 *P-bodies* von 16% auf 21% nach IL-1 Stimulation. Auch verringerte sich die Zahl der Zellen ohne *P-bodies* von 37% auf 27%, und es stieg die Zahl der Zellen mit 1-5 *P-bodies* von 43% auf 49%.

Diese Entwicklung zeigte sich bei den *P-body* Markern DCP1a, EDC3 und EDC4, auch wenn nicht so deutlich wie bei der Kombination DCP1a, XRN1 und EDC4. Hier sieht man den leichten prozentualen Anstieg der Zellen ohne *P-bodies* von 2% auf 6%. Die Zahl der Zellen mit 11-15 *P-bodies* steigt hierbei ebenfalls marginal von 43% auf 47%. Hierfür sinkt die Zahl der Zellen mit 6-10 *P-bodies* von 22% auf 16%. Die Zahl der Zellen ohne *P-bodies* ist in dieser Antikörperkombination fast gleichbleibend geblieben von 32% auf 31%.

Bei der Antikörperkombination EDC3, XRN1 und EDC4 wurde EDC3 mit *Dylight* 488 gekoppelt und zeigte unter dem Mikroskop eine geringe Signalintensität. Dies erklärt sich möglicherweise dadurch, dass das Protein EDC3 kleiner ist als XRN1 und EDC4 und bei den *merges* der Kanäle fast überstrahlt wird. Die Interaktion von EDC3, XRN1 und EDC4 weist nach Stimulation mit IL-1 eine Steigung der Zellzahl ohne *P-bodies* von 41% auf 46%. Zudem nimmt die Zahl der Zellen mit 6-10 *P-bodies* von 14% auf 8% ab. Die Zellzahl mit 11-15 *P-bodies* sowie die Anzahl der Zellen mit 1-5 *P-bodies* sind nach der Stimulation fast gleichbleibend.

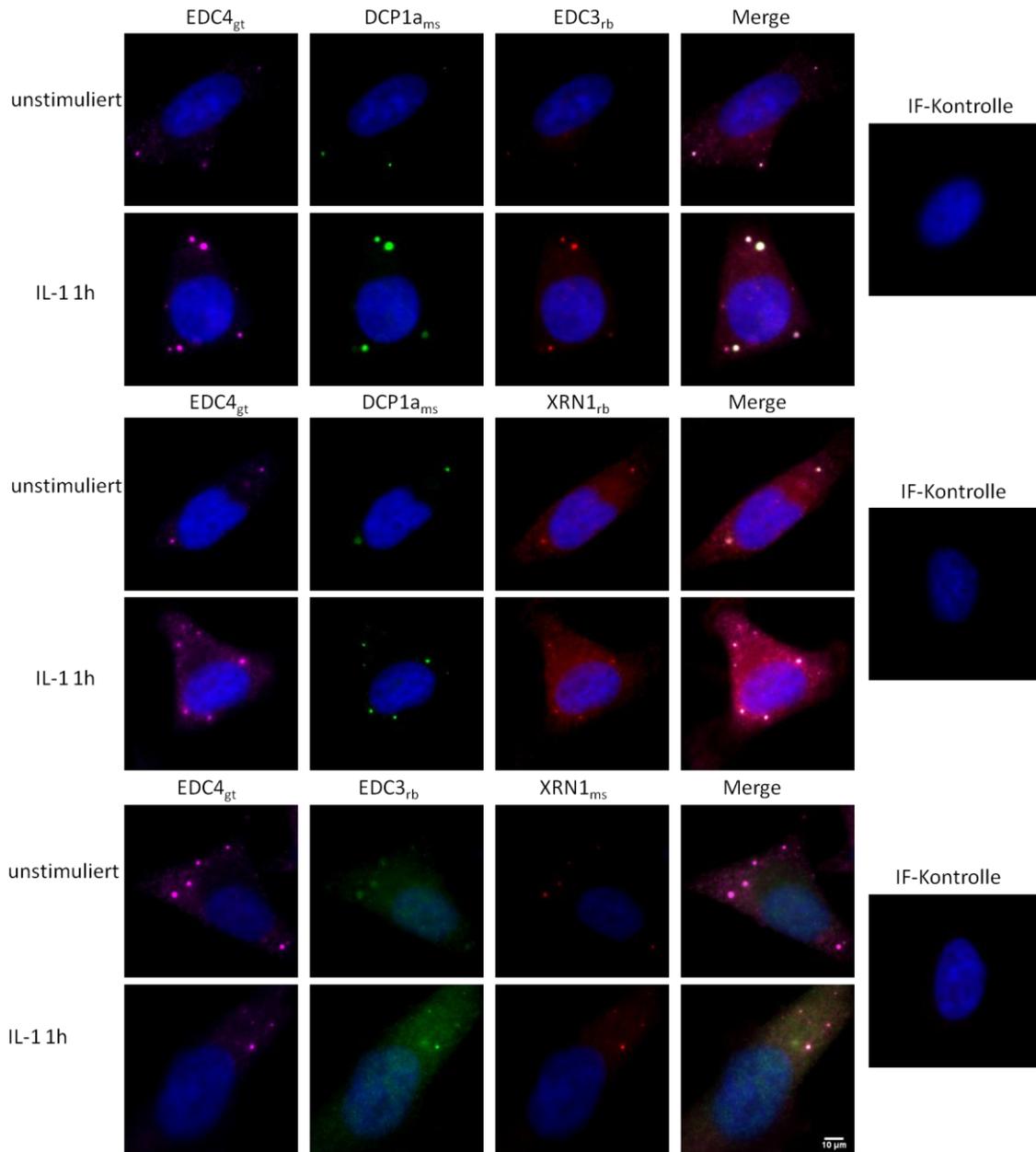


Abbildung 4.2.1 Indirekte Triple-Immunfluoreszenz zur Detektion von *P-bodies*. .

HeLa-Zellen wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unbehandelt verwendet. Anschließend erfolgte die Analyse der *P-bodies* durch indirekte Immunfluoreszenz mittels Primärantikörpern gegen DCP1a_{ms}, EDC3_{rb}, XRN1_{ms}, XRN1_{rb} und EDC4_{gt} aus verschiedenen Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen und gt=Ziege). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Die Kontrolle der Spezifität der Immunfluoreszenz erfolgte durch Zugabe der Sekundärantikörper (Dylight 488 Kontrolle, Cy3 Kontrolle, Cy5 Kontrolle) ohne Primärantikörper. Der Messbalken entspricht 10 μm.

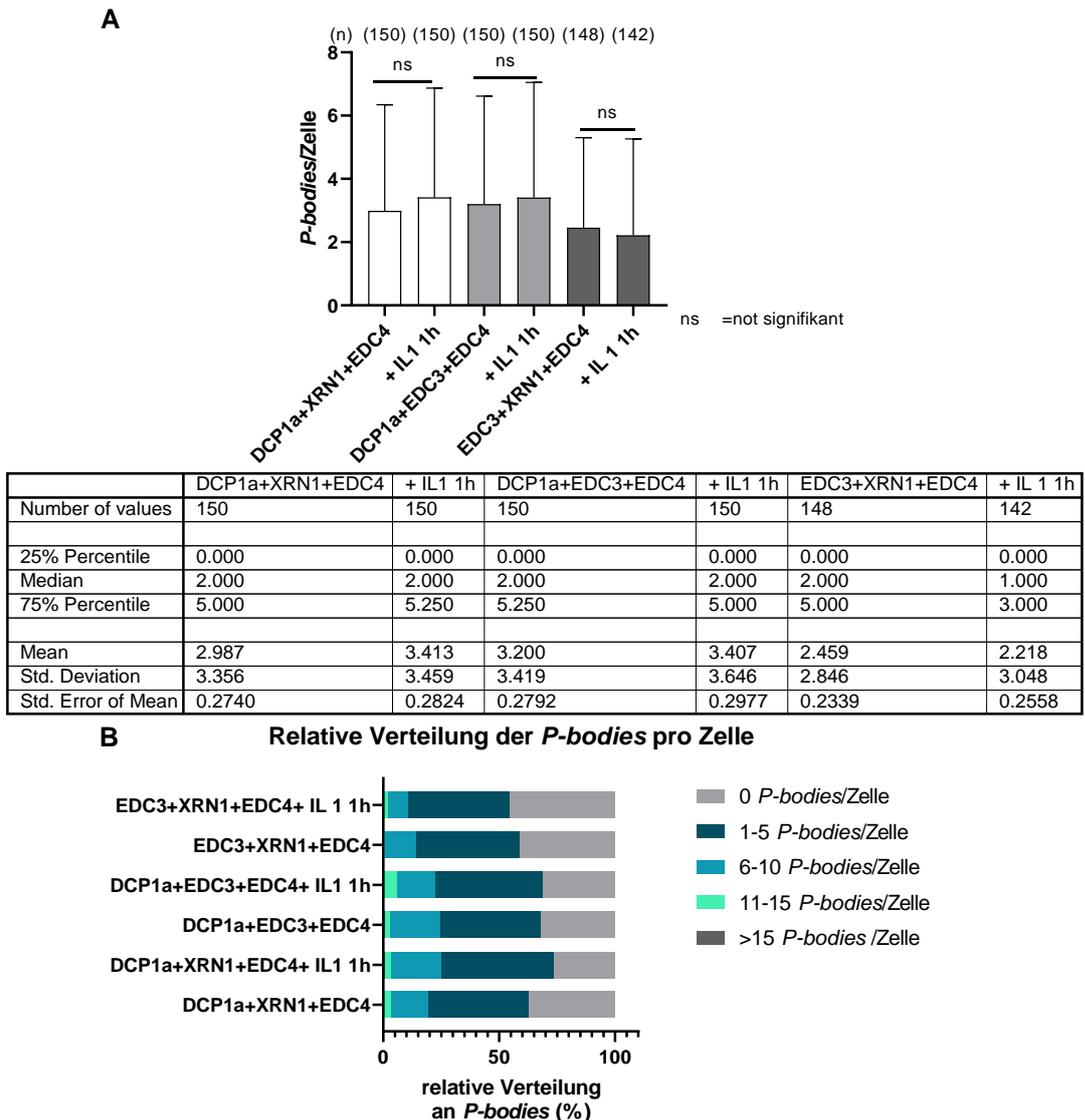


Abbildung 4.2.2 Quantifizierung der Regulation von *P*-bodies nach IL-1 Stimulation.

Die HeLa-Zellen wurden nach der Aussaat in Ibidi μ -Slides mit IL-1 (10 ng/ml) für 1 h behandelt oder unstimuliert belassen. Anschließend erfolgte die indirekte Immunfluoreszenz (IF) mit den Antikörpern gegen DCP1a, EDC4, EDC3 oder XRN1. Es wurden zwei biologisch unabhängige Experimente mit mindestens 142 Zellen durchgeführt. Die IF-Kontrolle erfolgte ohne Zugabe der jeweiligen Primärantikörper. **A:** Die Auswertung der gezählten *P*-bodies erfolgte in einer quantitativen Darstellung der *P*-body Anzahlen pro Zelle. Die Signifikanzanalyse wurde mithilfe des Wilcox-Mann-Whitney-Tests durchgeführt. **B:** Quantitative Darstellung der *P*-bodies prozentual in der Gesamtpopulation in einem gestapelten Diagramm. Dabei erfolgte eine Unterteilung in Zellen ohne (0) *P*-bodies, 1-5 *P*-bodies, 6-10 *P*-bodies, 11-15 *P*-bodies und >15 *P*-bodies.

4.3 Anwendung des *Proximity Ligation Assays*: Einfluss von IL-1 auf die DCP1a, EDC4 und XRN1 Expression auf Einzelzellebene

Zur Untersuchung des Einflusses von IL-1 auf die Expression der *P-body* Proteine DCP1a, EDC4 und XRN1 auf Einzelzellebene wurde die Technik des *Proximity Ligation Assays* genutzt. Hierbei wurden zur Detektion der Expression dieser Proteine zwei Antikörper aus unterschiedlichen Spezies verwendet, welche an unterschiedliche Epitope desselben Proteins binden. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 α für 1 h stimuliert oder unstimuliert belassen. Zur Auswertung wurden die PLA-Signale pro Zelle ermittelt und graphisch mittels *GraphPad Prism* dargestellt.

Es zeigte sich, dass abhängig von der Konstellation der Antikörper sich unterschiedliche Signalzahlen in der PLA ergeben. So waren die höchsten PLA-Signale und dementsprechend die höchste Expression bei der Detektion von DCP1 zu vermerken, mit im Median 229 *Spots* pro Zelle in unstimulierten Zellen. Es wurde die Antikörperkombination DCP1_{a_{ms}}:DCP1_{rb} genutzt. Diese hohe Zahl an PLA-Signalen ist möglicherweise durch die Trimerisierung des Proteins zu erklären (Tritschler et al., 2009).

Die niedrigsten PLA-Signale pro Zelle waren bei der Antikörperkombination von XRN1_{ms}:XRN1_{rb} (im Median 121 *Spots* pro Zelle im unstimulierten Zellen) zu registrieren.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen unstimulierten und den IL-1 stimulierten HeLa-Zellen bezüglich der DCP1a oder XRN1 Expression. Die Signifikanzanalyse wurde mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests durchgeführt, da die Messwerte starke Streuungen aufweisen und nicht normalverteilt sind. Dies zeigte sich auch durch die Unterschiede zwischen dem Mittelwert (arithmetisches Mittel) und dem Median der Messwerte. Durch die Unempfindlichkeit des Medians gegenüber starken Streuungen, wurde dieser hier für Vergleiche der nicht normalverteilten Daten verwendet.

Bei der Detektion von EDC4 fiel ein signifikanter Anstieg der Expression auf Einzelzellebene auf: hier sah man eine Steigerung der PLA-Signale im Median von 129 auf 142 nach IL-1 Stimulation (Mittelwert 134 auf 150). Zusätzlich fiel auf, dass eine geringere Anzahl an DCP1a und XRN1 Proteinen auch nukleär lokalisiert sind,

während EDC4 zytoplasmatisch lokalisiert ist, in Übereinstimmung mit (David Gerecht et al., 2010, Haimovich et al., 2013, Tishinov and Spang, 2020).

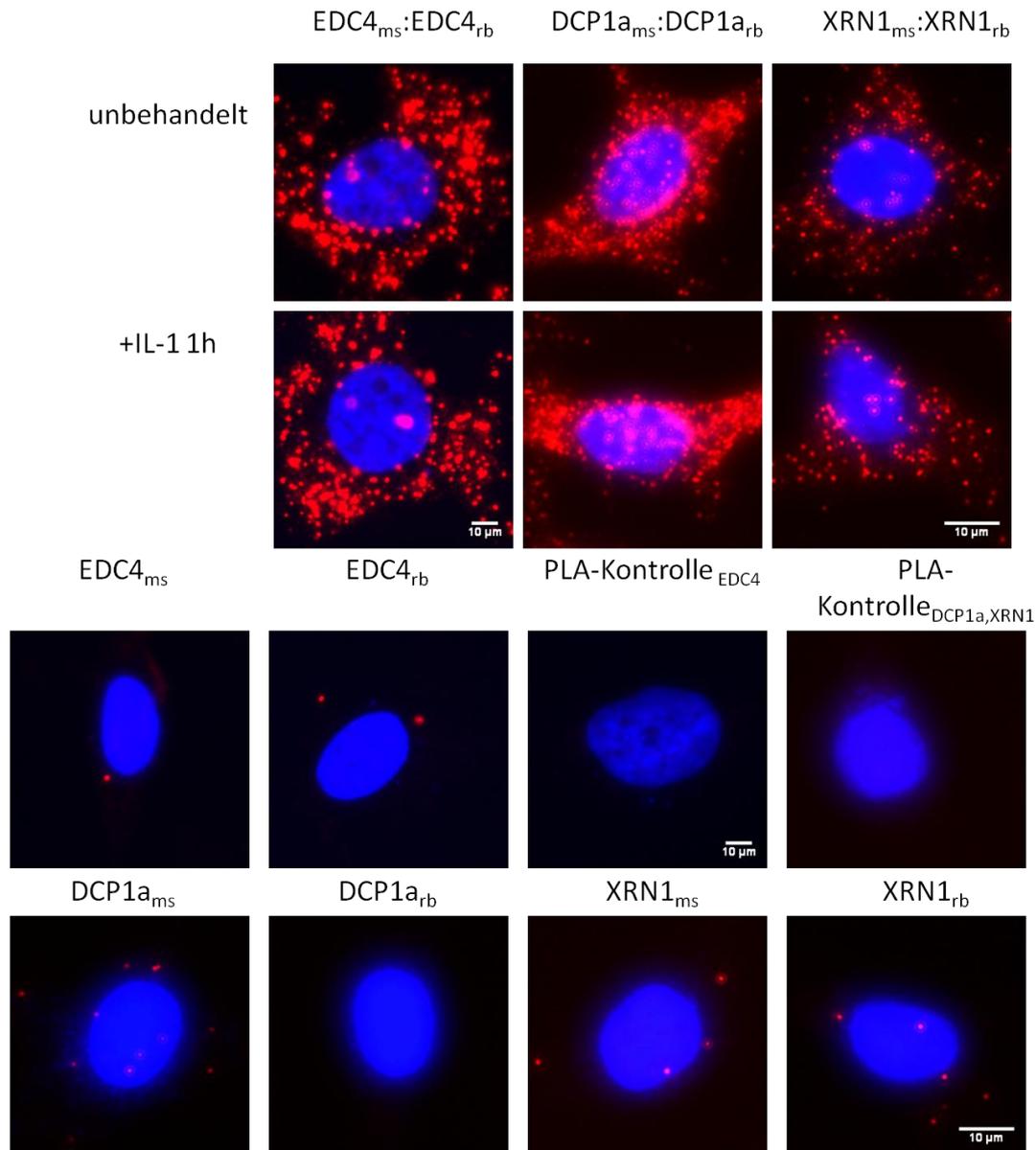
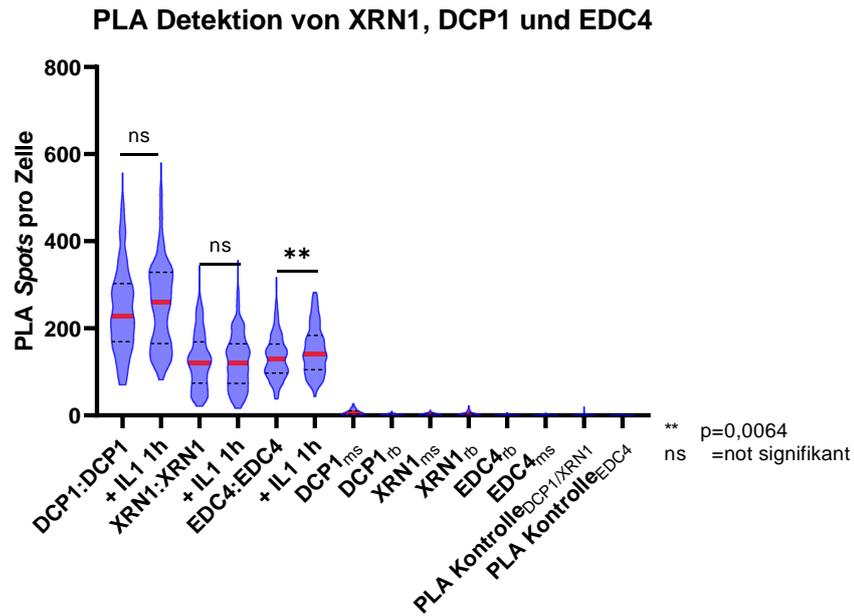


Abbildung 4.3.4.31 Detektion der Expression von EDC4, XRN1 und DCP1a nach IL-1 Stimulation mittels Proximity Ligation Assays. HeLa-Zellen wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unstimuliert verwendet. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteine EDC4, XRN1 und DCP1a durch Verwendung zweier Antikörper unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen), welche gegen das gleiche Protein gerichtet sind. Die roten Spots weisen das PLA-Signal an und damit die detektierten Proteine. Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen der Primärantikörper wurde in der PLA jeweils nur ein Primärantikörper verwendet, um die unspezifischen Hintergrundsignale sichtbar zu machen und zu quantifizieren. Als weitere Negativkontrollen für die PLA wurden Ansätze ohne Primärantikörper aber mit beiden Sekundärantikörpern und allen Detektionsreagenzien durchgeführt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der Messbalken entspricht 10 μm. Da die Versuche zur Detektion von EDC4 an einem anderen Mikroskop erfolgten als die von XRN1 oder DCP1a, sind bei EDC4:EDC4-Interaktionen sowie der EDC4 Kontrollen andere Maßstäbe vorzufinden.



	DCP1:DCP1	+ IL1 1h	XRN1:XRN1	+ IL1 1h	EDC4:EDC4	+ IL1 1h	DCP1 _{ms}	DCP1 _{rb}	XRN1 _{ms}	XRN1 _{rb}	EDC4 _{ms}	EDC4 _{rb}	PLA Kontrolle _{DCP1/XRN1}	PLA Kontrolle _{EDC4}
Number of values	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	235	235	200	235
25% Percentile	169.3	165.0	74.00	73.75	97.00	105.0	3.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Median	228.5	259.5	121.5	120.0	128.5	141.5	6.000	1.000	2.000	3.000	1.000	0.000	1.000	0.000
75% Percentile	302.5	328.8	169.0	164.3	163.8	183.5	11.00	3.000	4.000	5.000	2.000	2.000	1.000	0.000
Mean	242.4	254.4	127.0	124.0	134.0	149.8	7.285	1.730	2.770	3.890	1.021	0.9872	0.9300	0.07660
Std. Deviation	98.34	99.98	64.54	62.46	49.68	55.18	6.070	1.733	2.147	4.081	1.397	1.332	1.832	0.4168
Std. Error of Mean	6.954	7.070	4.564	4.417	3.513	3.902	0.4292	0.1225	0.1518	0.2885	0.09115	0.08687	0.1366	0.02718

Abbildung 4.3.2 Quantifizierung der Expression von XRN1, EDC4 und DCP1a auf Einzelzellebene.

Die Detektion der DCP1a-, XRN1- und EDC4-Expression erfolgte mit zwei unterschiedlichen Antikörpern aus verschiedenen Spezies. Dazu wurden die HeLa-Zellen mittels 10 ng/ml IL-1 für 1 h behandelt und anschließend mittels *Proximity Ligation Assay* analysiert. Zur Kontrolle wurde eine unbehandelte Gruppe mitgeführt. Es wurden Zellen aus 3 biologisch unabhängigen Experimenten (für EDC4:EDC4) und 4 biologisch unabhängigen Versuchen für XRN1:XRN1 und DCP1a:DCP1a mit insgesamt 200 Zellen ausgewertet. Die PLA Kontrollen erfolgten ohne Zugabe der entsprechenden Primärantikörper oder mit jeweils nur einem Primärantikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der rote Balken stellt den Median dar. Die Signifikanzanalyse wurde mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Nach veränderter Lagerung des PLA-Kits wurde bei zwei der vier Versuche bei der Antikörperkombination DCP1a:DCP1a die Belichtungszeit angepasst.

4.4 Anwendung des *Proximity Ligation Assays*: Untersuchung von heteromeren Protein:Protein- Interaktionen zwischen EDC4, XRN1 und DPC1a

Zur Untersuchung der zytoplasmatischen Proteinkomplexe der verschiedenen *P-body* Faktoren und ihrer Lokalisation wurden mithilfe des *Proximity Ligation Assays* die Proteininteraktionen zwischen DCP1a_{rb}:XRN1_{ms}, EDC4_{rb}:XRN1_{ms} und EDC4_{rb}:DCP1a_{ms} untersucht. Die in Ibidi Zellkulturgefäßen ausgesäten Zellen wurden mit 10 ng/ml für 1 h IL-1α stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend erfolgte die Anwendung des PLAs nach dem Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.2.2). Auch bei diesen Versuchen zeigten sich unterschiedliche PLA-Signale in Abhängigkeit von der

Antikörperkombination. Die Signifikanzanalyse wurde mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests durchgeführt, da die Messwerte nicht normalverteilt waren.

So zeigte sich die höchste Zahl an PLA-Signalen bei der Kombination von EDC4 und DCP1a mit im Median ca. 170 *Spots* pro Zelle. Die niedrigsten PLA-Signale wurden bei der Kombination von EDC4:XRN1 detektiert. Die Interaktionen von DCP1a:XRN1 und EDC4:DCP1a scheinen von der IL-1 Stimulation unabhängig zu sein. Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen bei diesen Antikörperkombinationen.

Dagegen war die Interaktion von EDC4 und XRN1 nach der Behandlung mit IL-1 signifikant erhöht und stieg im Median von 57 auf 70 PLA-Signale pro Zelle.

Durch die hohen Signalzahlen der Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen konnte indirekt gezeigt werden, dass der Großteil dieser Interaktionen außerhalb von *P-bodies* stattfinden muss, da normalerweise die durchschnittliche Zahl an *P-bodies* pro Zelle anhand eigener (siehe Abbildung 4.2.2) oder publizierter Daten bei 2 bis 10 liegt, je nach Zellart (Bashkirov et al., 1997, Cougot et al., 2012).

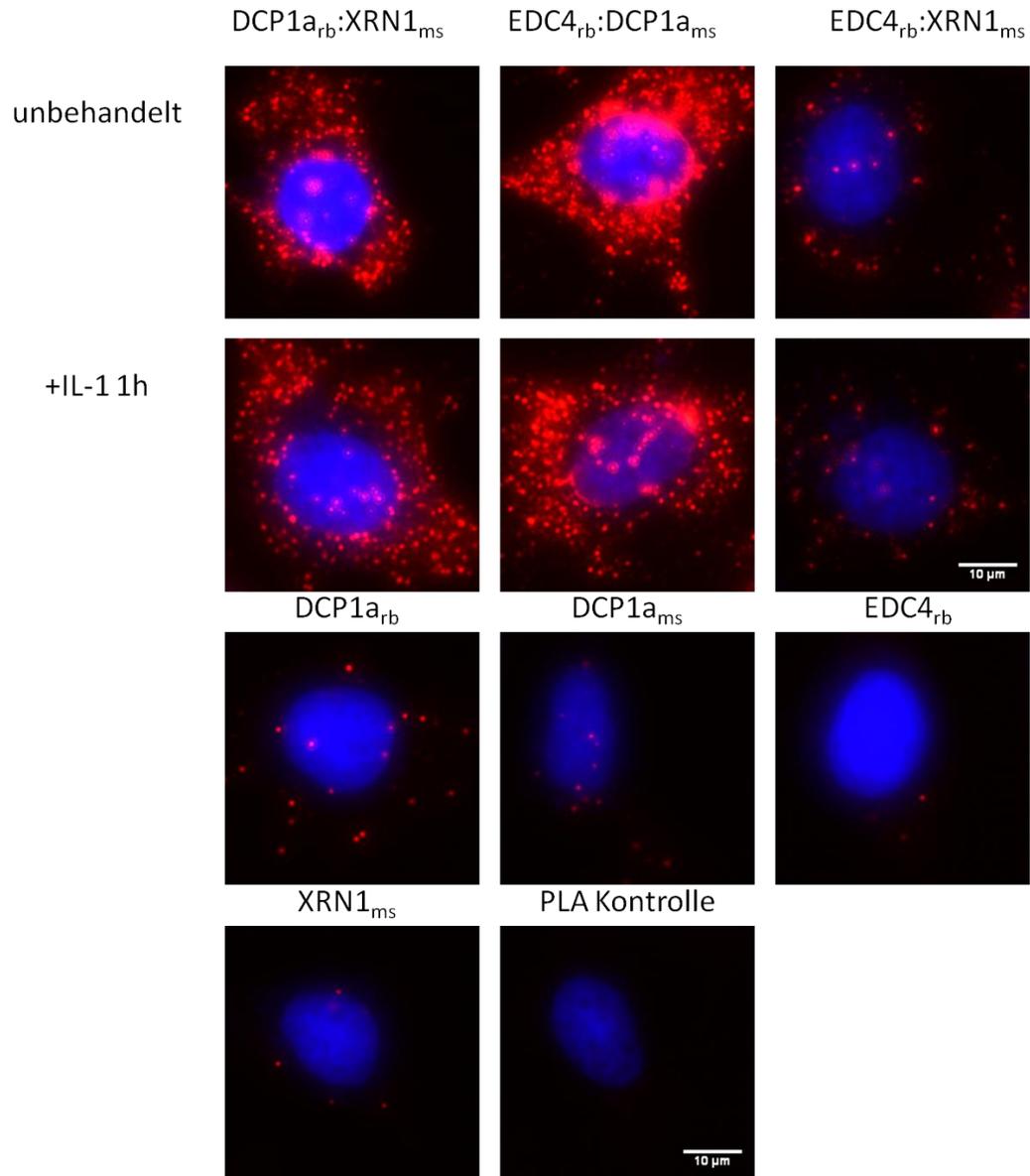
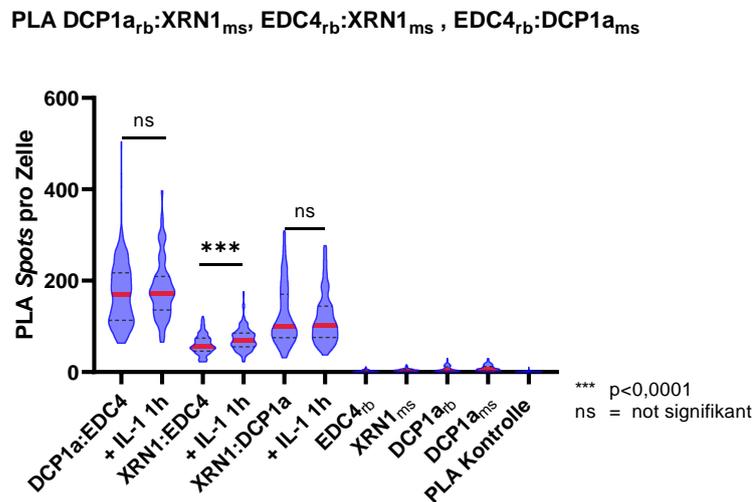


Abbildung 4.4.1 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von Decapping-Faktoren nach IL-1 Stimulation. Die Interaktion von DCP1a, EDC4 und XRN1 wurde in HeLa-Zellen durch Anwendung des *Proximity Ligation Assays* analysiert. Die Zellen wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unbehandelt belassen. Zur Kontrolle wurden unstimulierte Zellen mitgeführt. Als Kontrolle von unspezifischen Reaktionen der Primärantikörper wurden hierfür Zellen mit der Zugabe jeweils nur eines Primärantikörpers verwendet, welches anschließend zur Definition des unspezifischen Hintergrundsignals diente. Die PLA Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Der Messbalken entspricht 10 µm. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342.



	DCP1a:EDC4	+ IL-1 1h	XRN1:EDC4	+ IL-1 1h	XRN1:DCP1a	+ IL-1 1h	EDC4 _{rb}	XRN1 _{ms}	DCP1a _{rb}	DCP1a _{ms}	PLA Kontrolle
Number of values	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
25% Percentile	113.0	135.8	45.75	55.00	75.00	75.75	1.000	1.000	2.000	3.000	0.000
Median	169.5	172.5	56.50	70.00	100.5	102.0	1.000	3.000	4.000	6.000	0.000
75% Percentile	217.3	209.0	74.00	85.00	170.0	144.0	4.000	5.000	11.00	12.25	1.000
Mean	172.5	182.6	60.43	72.58	124.5	116.6	2.313	3.547	6.433	8.600	0.7200
Std. Deviation	71.63	65.26	21.42	25.54	65.03	54.53	2.315	2.955	6.506	6.740	1.286
Std. Error of Mean	5.849	5.329	1.749	2.085	5.310	4.452	0.1890	0.2413	0.5312	0.5503	0.1050

Abbildung 4.4.2 Detektion von Protein:Protein-Interaktionen von Decapping-Faktoren. Die dargestellten Ergebnisse resultieren aus drei biologisch unabhängigen Experimenten mit insgesamt 150 Zellen. Es wurden Interaktionen zwischen DCP1a_{rb}:XRN1_{ms}, EDC4_{rb}:XRN1_{ms} und EDC4_{rb}:DCP1a_{ms} in HeLa-Zellen gemessen. Die PLA Kontrollen erfolgten ohne Primärantikörper oder mit jeweils einem der beiden verwendeten Primärantikörper. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der rote Balken stellt den Median dar. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-1 behandelt für 1 h oder unbehandelt gelassen. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Wilcox-Mann-Whitney-Test.

4.5 IL-1α abhängige Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von Decapping Enzymen unter zusätzlicher Markierung von P-bodies mittels Verwendung der Immunfluoreszenz-PLA

Die Experimente zur Untersuchung der Interaktionen von DCP1a, XRN1, DCP2, EDC3 und EDC4 wurden mit Hilfe des Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assays* (IF-PLA) durchgeführt (Pacchiana et al., 2014). Diese wurde neu in der Arbeitsgruppe Kracht durch Dr. Ulaş Tenekeci und Dr. Christin Mayr Buro etabliert (siehe Kapitel 3.2.3). Es folgte die systematische Analyse der Protein:Protein-Interaktionen und deren relative Lokalisation zu *P-bodies* unter Verwendung der *IF-PLA*, wobei EDC4 als

Marker für *P-bodies* diene. Um den Einfluss des Zytokins IL-1 auf *P-bodies* zu untersuchen, wurden die Zellen für 30 min, 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unbehandelt belassen. Es wurden folgende Protein:Protein-Interaktionen in dieser Arbeit durch spezifische Antikörper Kombinationen untersucht: α -DCP1_{a_{ms}}: α -XRN1_{rb}, α -EDC3_{rb}: α -DCP1_{a_{ms}}, α -EDC3_{rb}: α -XRN1_{a_{ms}}, α -DCP2_{rb}: α -DCP1_{a_{ms}}, α -DCP2_{rb}: α -XRN1_{ms}. Zeitgleich erfolgte jeweils die Detektion der *P-bodies* durch EDC4_{gt} Anfärbung mit *Dylight* 488.

In diesen Versuchen wurde durch die verschiedenen Kombinationen der Antikörper in der PLA eine variable Anzahl der Signale detektiert.

Bei der Verwendung der Antikörperkombination α -DCP1_{a_{ms}}: α -XRN1_{rb} zeigten sich keine Unterschiede zwischen IL-1 stimulierten und unbehandelten Zellen. Bei der Detektion der *P-bodies* durch die EDC4-spezifische Anfärbung war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu vermerken. Es fiel jedoch auf, dass innerhalb der Zelle die DCP1a:XRN1 Komplexe vermehrt außerhalb von *P-bodies* anzutreffen waren. Eine Kolo-kalisation dieser Komplexe ist sehr gering, sodass man nur vereinzelt *Merges* von PLA-Signal und *P-body* detektieren konnte. Dies war jedoch zu erwarten gewesen, da pro Zelle deutlich weniger *P-bodies* vorhanden sind als PLA-Signale. Um eine quantitative Darstellung der Ergebnisse zu erhalten, erfolgte die Auswertung der gezählten *P-bodies* pro Zelle prozentual in einem gestapelten Diagramm mit der Einteilung in Zellen mit 0 *P-bodies*, 1-5 *P-bodies*, 6-10 *P-bodies*, 11-15 *P-bodies* und >15 *P-bodies*. Dabei sieht man in diesem Diagramm (Abbildung 5.4.2), dass nach 30 min Stimulation mit IL-1 die Zahl der *P-bodies* in den Zellen steigt, da der Anteil an Zellen mit 6-10 *P-bodies* von 22,7% auf 34,7% zunimmt. Auch in den anderen Abschnitten sorgte die Stimulation für eine Steigerung der Zellen mit mehr *P-bodies* und eine Reduktion der Zellen ohne *P-bodies* von 19% auf 16%. Diese wird dann nach 1 h Stimulation wieder langsam rückläufig und nach 3 h fast wieder auf ein basales Niveau zurückreguliert. Diese Tendenz kann man auch gut in der Abbildung 5.1.2. sehen, da hier die Zellen nach 1 h Stimulation mit IL-1 einen leichten Anstieg der Zellen mit mehr *P-bodies* aufwiesen als ohne Stimulation, wenn diese auch nicht signifikant war. Aber auch hier zeigte sich innerhalb der Zellpopulation eine Verschiebung der *P-body* Zahl pro Zelle nach der Zytokin Stimulation.

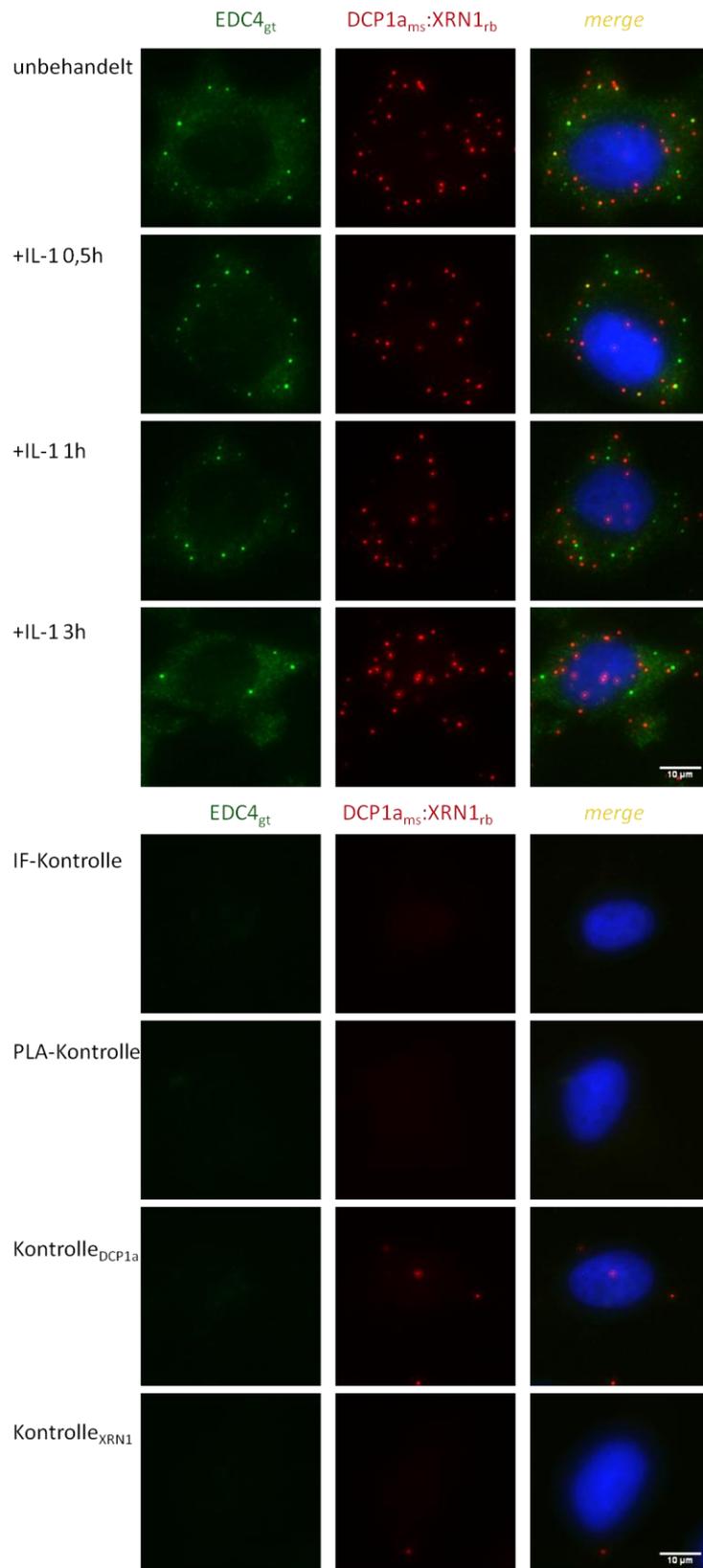
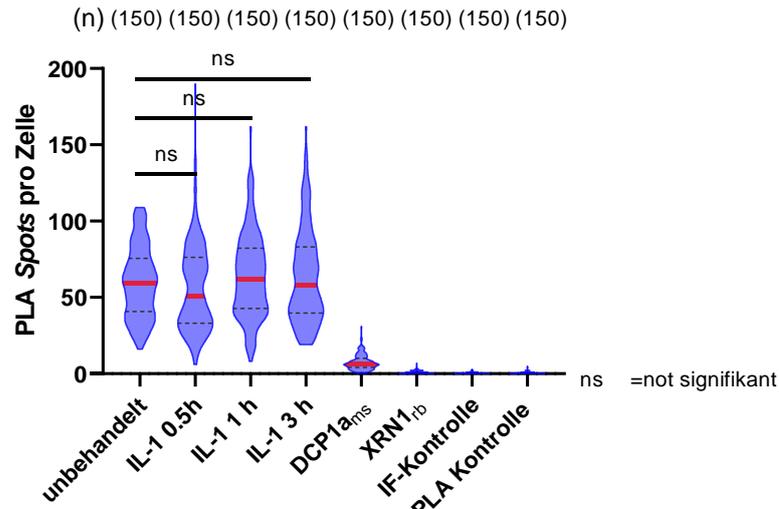


Abbildung 4.5.1 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von DCP1a_{ms}:XRN1_{rb} Proteinkomplexen im Verhältnis zur Lokalisation von EDC4-positiven *P-bodies* HeLa-Zellen wurden für 0,5 h, 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Interaktion

von DCP1a und XRN1, ihre räumliche Nähe zu *P-bodies* und ihre Lokalisation wurde in HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assays* (IF-PLA) analysiert. Es erfolgte die Detektion der Interaktion von DCP1a:XRN1 mittels Primärantikörpern unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen) in der PLA, sowie die zeitgleiche Detektion der *P-bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper der entsprechenden dritten Spezies (gt=Ziege). Die IF und die PLA Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen der Primärantikörper wurden die Kontrollen mit der Zugabe eines Primärantikörpers verwendet, welches anschließend zur Definition des unspezifischen Hintergrundsignals dient. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der Messbalken entspricht 10 µm.

A IF-PLA DCP1a:XRN1+EDC4



	unbehandelt	IL-1 0.5h	IL-1 1 h	IL-1 3 h	DCP1a _{ms}	XRN1 _{rb}	IF-Kontrolle	PLA Kontrolle
Number of values	150	150	150	150	150	150	150	150
25% Percentile	40.75	33.00	42.75	39.75	4.000	0.000	0.000	0.000
Median	59.50	51.00	62.00	58.00	6.000	1.000	0.000	0.000
75% Percentile	75.50	76.25	82.25	83.00	10.00	1.000	1.000	1.000
Mean	59.98	56.85	64.28	63.62	7.380	0.8733	0.4133	0.5267
Std. Deviation	23.30	29.03	27.59	30.63	5.032	1.070	0.7253	0.8724
Std. Error of Mean	1.902	2.370	2.253	2.501	0.4109	0.08737	0.05922	0.07123

B

Heterogene Verteilung von *P-bodies* in einzelnen Zellen in der IF-PLA DCP1a:XRN1+EDC4

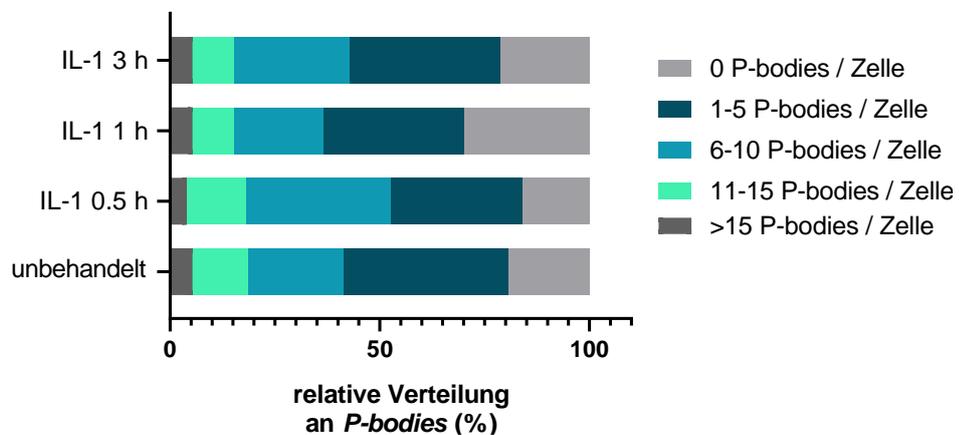


Abbildung 4.5.2 Quantifizierung von DCP1a_{ms}:XRN1_{rb} Komplexen und EDC4_{gt}-markierten *P-bodies*. Die Detektion von DCP1a:XRN1 und EDC4 erfolgte mittels dreier unterschiedlicher Antikörper aus verschiedenen Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen, gt=Ziege). Dazu wurden die HeLa-Zellen mittels 10 ng/ml IL-1 für 0,5 h; 1 h und 3 h stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen und anschließend mittels Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assay* analysiert. Es wurden 3 biologisch unabhängige Experimente mit insgesamt 150 Zellen ausgewertet. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. A: Darstellung der PLA-Signale pro Zelle. Der rote Balken stellt den Median dar. B: Prozentuale Verteilung der Zellen mit EDC4-positiven *P-bodies* (%). Die Einteilung der *P-bodies* erfolgte in Zellen mit 0 *P-bodies*, 1-5 *P-bodies*, 6-10 *P-bodies*, 11-15 *P-bodies* und >15 *P-bodies*.

Bei der Verwendung der Antikörperkombination α -EDC3_{rb}: α -XRN1_{ms} zeigte sich die niedrigste PLA-Signalanzahl. Auch hier war kein signifikanter Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen messbar. Bei der Detektion der *P-bodies* zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Zellen und Zellen nach 30 min IL-1 Stimulation (der Median stieg hier von 7 auf 10 *P-bodies* pro Zelle), sowie unbehandelten Zellen und Zellen nach 3 h IL-1 Stimulation (Median bei 8 *P-bodies* pro Zelle). Durch die Verwendung des gestapelten Diagramms wird dies noch deutlicher: der prozentuale Anteil der Zellen ohne *P-bodies* wird nach 30 min IL-1 Stimulation mehr als halbiert (von 12% auf 5%), während der prozentuale Anteil der Zellen mit *P-bodies* deutlich zunimmt. So stieg der Anteil der Zellen mit >15 *P-bodies* von 9% auf 20% nach der 30 minütigen Stimulation mit IL-1 deutlich an und auch der Anteil der Zellen mit 11-15 *P-bodies* erhöhte sich von 17% auf 27%.

Nach 1 h Stimulation sank die prozentuale Menge der Zellen mit *P-bodies* leicht ab, wenn auch nicht auf das basale Niveau: die anteilige Menge der Zellen mit >15 *P-bodies* sank auf 15% . Ebenso reduzierte sich Anteil von Zellen mit 11-15 *P-bodies* pro Zelle auf 17% .

Nach 3 h Stimulation erfolgte erneut eine deutliche Steigerung der prozentualen Anteile der Zellen mit *P-bodies*. So zeigte sich nach 3 h Stimulation der Zellen mit IL-1 im Vergleich zu den unstimulierten Zellen eine deutliche Steigerung der Anteile der Zellen mit *P-bodies* >15 von initial 9% ohne Stimulation auf 22% nach 3 h IL-1 Stimulation. Hierfür sank der Anteil an Zellen mit 6-10 *P-bodies* von 36% auf 24% im Vergleich mit den unbehandelten Zellen, während die Zahl der Zellen ohne *P-bodies* auf 8% abnahm.

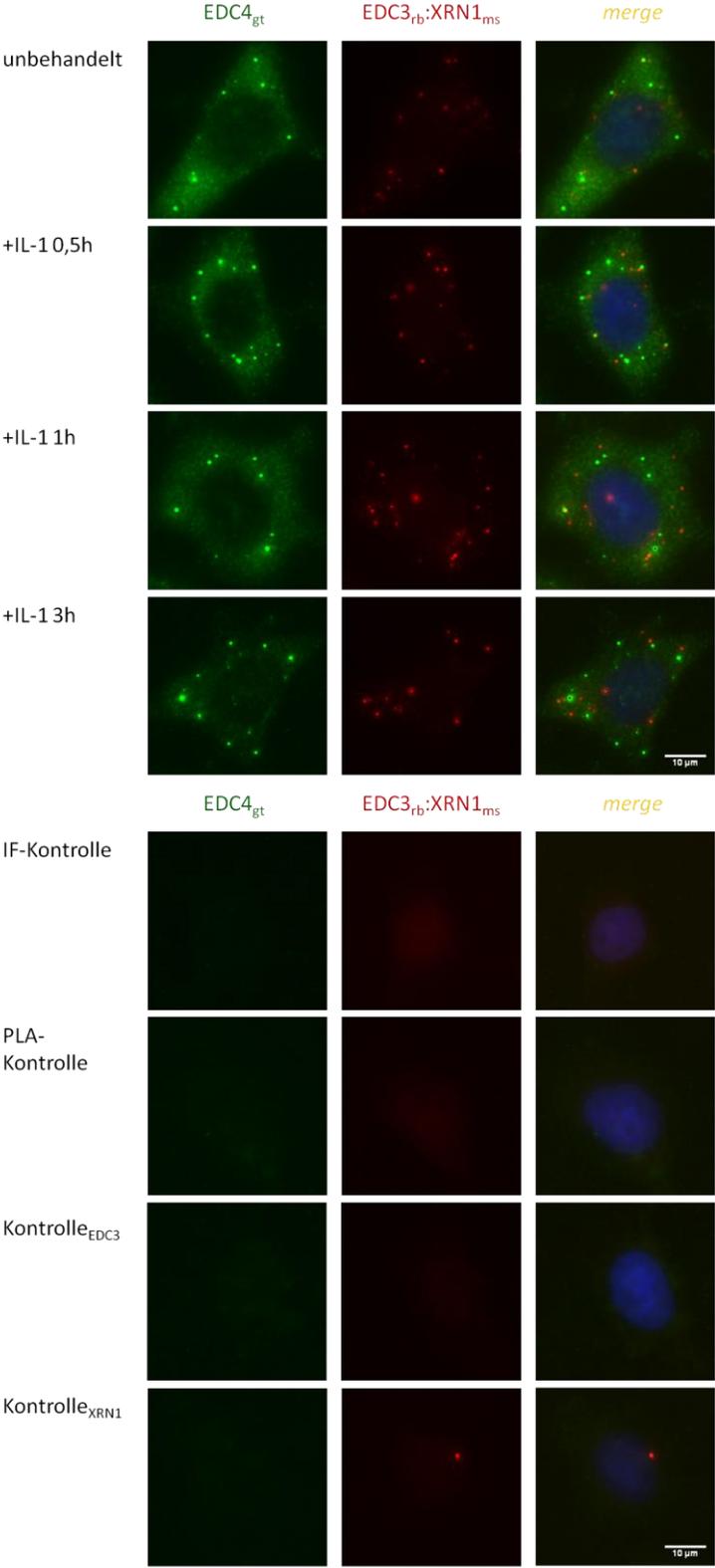
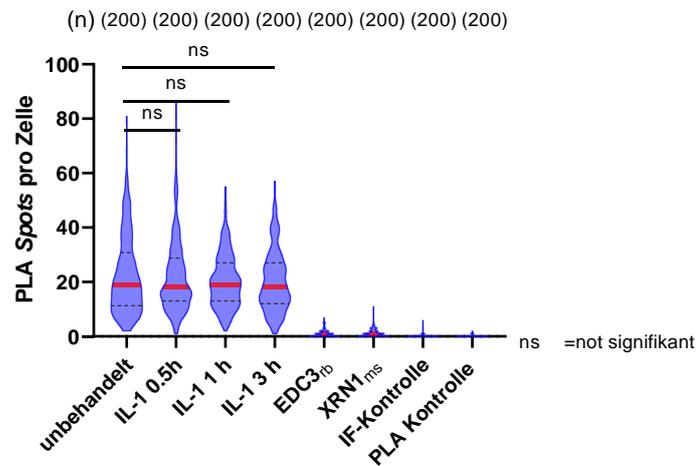


Abbildung 4.5.3. Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von EDC3_{rb}:XRN1_{ms} Proteinkomplexen im Verhältnis zur der Lokalisation von EDC4-positiven *P*-bodies. HeLa-Zellen wurden für 0,5 h, 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Interaktion von EDC3 und XRN1, ihre räumliche Nähe zu *P*-bodies und ihre Lokalisation wurde in HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assays* (IF-PLA) analysiert. Es erfolgte die Detektion der Interaktion von EDC3:XRN1 mittels Primärantikörpern unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen) in der PLA, sowie die zeitgleiche Detektion der *P*-bodies durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper der entsprechenden dritten Spezies (gt=Ziege). Die IF und die PLA Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen der Primärantikörper wurden die Kontrollen mit der Zugabe eines Primärantikörpers verwendet, welches anschließend zur Definition des unspezifischen Hintergrundsignals diente. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der Messbalken entspricht 10 µm.

A

IF-PLA EDC3:XRN1+EDC4



	unbehandelt	IL-1 0.5h	IL-1 1 h	IL-1 3 h	EDC3 _{rb}	XRN1 _{ms}	IF-Kontrolle	PLA Kontrolle
Number of values	200	200	200	200	200	200	200	200
25% Percentile	11.25	13.00	13.00	12.00	0.000	0.000	0.000	0.000
Median	19.00	18.00	19.00	18.00	1.000	1.000	0.000	0.000
75% Percentile	30.75	28.75	27.00	27.00	1.750	2.000	0.000	0.000
Mean	22.61	22.50	20.50	20.34	1.020	1.140	0.1850	0.1450
Std. Deviation	14.39	14.22	9.962	11.31	1.393	1.511	0.6656	0.4181
Std. Error of Mean	1.018	1.005	0.7044	0.7995	0.09847	0.1068	0.04706	0.02957

B

Heterogene Verteilung von *P*-bodies in einzelnen Zellen in der IF-PLA EDC3:XRN1+EDC4

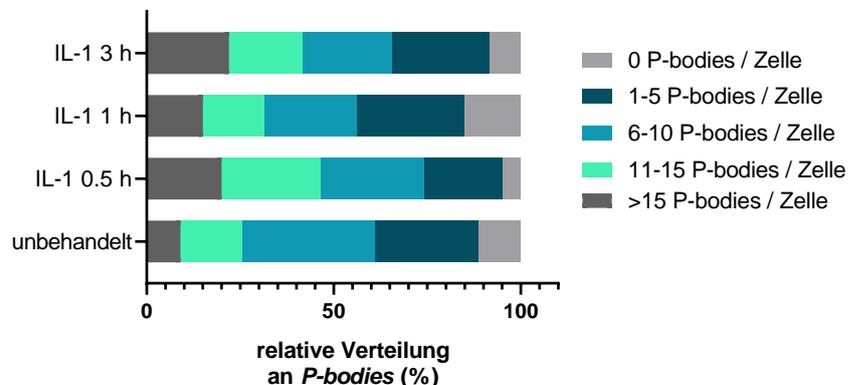


Abbildung 4.5.4 Quantifizierung von EDC3_{rb}:XRN1_{ms} Komplexen und EDC4_{gt}-markierten *P-bodies*. Die Detektion von EDC3:XRN1 und EDC4 erfolgte mittels dreier unterschiedlicher Antikörper aus verschiedenen Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen, gt=Ziege). Dazu wurden die HeLa-Zellen mittels 10 ng/ml IL-1 für 0,5 h, 1 h und 3 h stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen und anschließend mittels Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assay* analysiert. Die IF-Kontrollen wurden ohne Primärantikörper durchgeführt. Die PLA Kontrollen erfolgten ohne Primärantikörper oder mit einem Primärantikörper. Es wurden 4 biologisch unabhängige Experimente mit insgesamt 200 Zellen ausgewertet. **A:** Darstellung der PLA-Signale pro Zelle. Der rote Balken stellt den Median dar. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. **B:** Prozentuale Verteilung der Zellen mit EDC4-positiven *P-bodies* (%). Die Einteilung der *P-bodies* erfolgte in Zellen mit 0 *P-bodies*, 1-5 *P-bodies*, 6-10 *P-bodies*, 11-15 *P-bodies* und >15 *P-bodies*.

Bei der Analyse der Interaktion von α -EDC3_{rb}: α -DCP1a_{ms} fiel eine hohe Anzahl von Interaktionen außerhalb von *P-bodies* auf. Hier gab es ebenfalls keine Unterschiede zwischen Zellen mit oder ohne IL-1 Stimulation. Auch bei der Betrachtung der *P-bodies* war kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen detektierbar. Bei der quantitativen Darstellung der Verteilung der zellulären *P-body* Anzahl in der Gesamtpopulation zeigten sich leichte Schwankungen. So fand sich auch hier eine deutliche Erhöhung der prozentualen Anteile der Zellen mit 11-15 *P-bodies* und >15 *P-bodies* nach einer Stimulation mit 30 min IL-1. Es zeigte sich eine Verschiebung der Zellen mit mehr *P-bodies* innerhalb der Zellpopulation. Die prozentuale Menge der Zellen mit 11-15 *P-bodies* stieg von 13% auf 21,5% an, und auch der Anteil der Zellen mit >15 *P-bodies* stieg von 7% bei unbehandelten Zellen auf 12% nach 30min IL-1 Stimulation an. Dieses Phänomen nahm anschließend nach 1 h Stimulation wieder ab und näherte sich nach 3 h dem Ursprungszustand an.

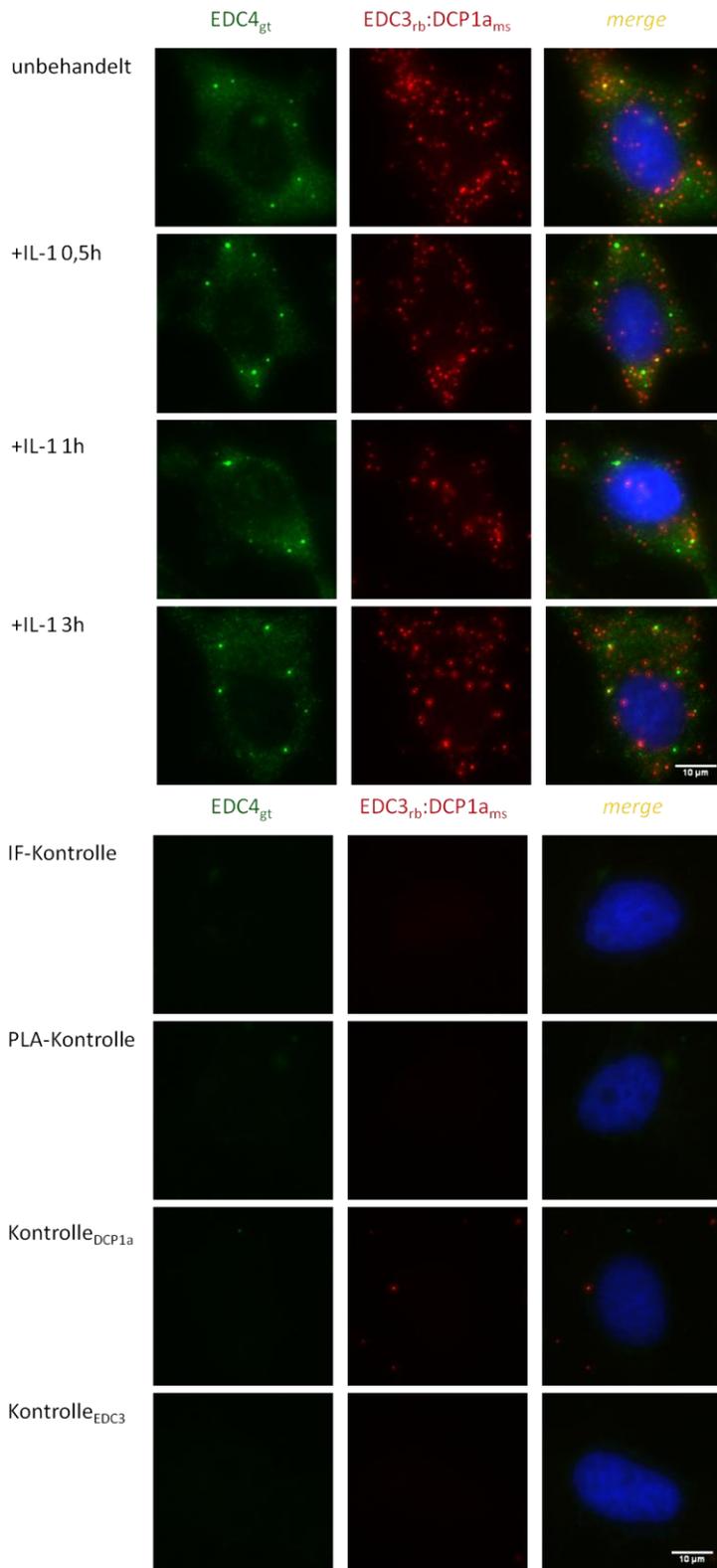
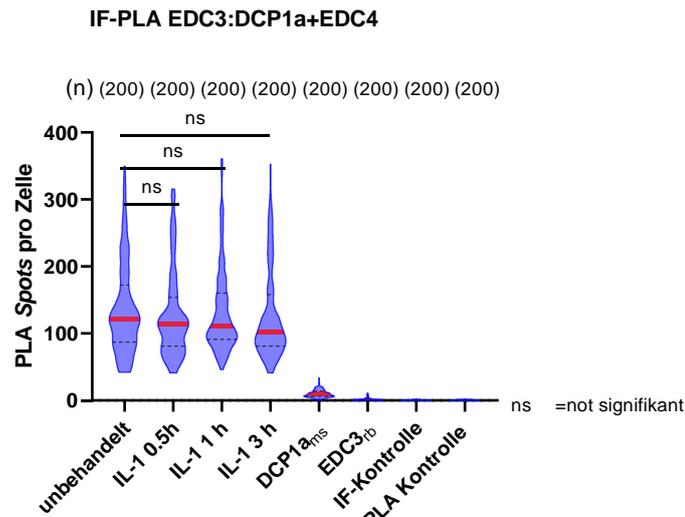


Abbildung 4.5.5 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von EDC3_{rb}:DCP1a_{ms} Proteinkomplexen im Verhältnis zur der Lokalisation von EDC4-positiven *P-bodies*. HeLa-Zellen wurden für 0,5 h, 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Interaktion von EDC3 und DCP1a, ihre räumliche Nähe zu *P-bodies* und ihre Lokalisation wurde in HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assays* (IF-PLA) analysiert. Es erfolgte die Detektion der Interaktion von EDC3:DCP1a mittels Primärantikörpern unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen) in der PLA, sowie die zeitliche Detektion der *P-bodies* durch eine indirekte

Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper der entsprechenden dritten Spezies (gt=Ziege). Die IF und die PLA Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen der Primärantikörper wurden die Kontrollen mit der Zugabe eines Primärantikörpers verwendet, welches anschließend zur Definition des unspezifischen Hintergrundsignals diente. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der Messbalken entspricht 10 μm .

A



	unbehandelt	IL-1 0.5h	IL-1 1 h	IL-1 3 h	DCP1a _{ms}	EDC3 _{rb}	IF-Kontrolle	PLA Kontrolle
Number of values	200	200	200	200	200	200	200	200
25% Percentile	87.00	81.25	91.00	81.00	6.000	0.000	0.000	0.000
Median	121.0	113.5	111.0	102.0	9.000	1.000	0.000	0.000
75% Percentile	172.0	153.8	160.3	158.0	13.75	2.000	0.000	1.000
Mean	135.7	128.7	133.9	127.1	9.905	1.585	0.2450	0.3300
Std. Deviation	67.88	65.52	63.24	67.20	5.689	2.146	0.4539	0.5024
Std. Error of Mean	4.800	4.633	4.472	4.752	0.4023	0.1518	0.03209	0.03552

B

Heterogene Verteilung von P-bodies in einzelnen Zellen in der IF-PLA EDC3:DCP1a+EDC4

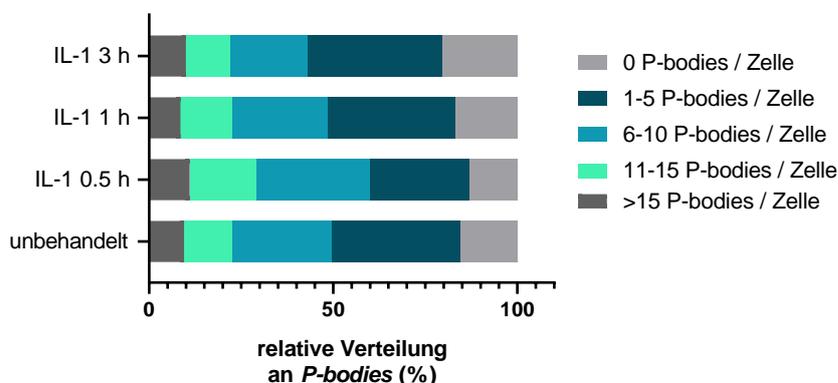


Abbildung 4.5.6 Quantifizierung von EDC3_{rb}:DCP1a_{ms} Komplexen und EDC4_{gt}-markierten P-bodies. Die Detektion von EDC3:DCP1a und EDC4 erfolgte mittels dreier unterschiedlicher Antikörper aus verschiedenen Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen, gt=Ziege). Dazu wurden die HeLa-Zellen mittels 10 ng/ml IL-1 für 0,5 h; 1 h und 3 h stimuliert oder als Kontrolle unbehandelt belassen und anschließend mittels Immunfluoreszenz-Proximity-Ligation-Assay analysiert. Die IF-Kontrollen wurden ohne Primärantikörper durchgeführt. Die PLA Kontrollen erfolgten ohne Primärantikörper oder mit einem Primärantikörper. Es wurden 4 biologisch unabhängige Experimente mit insgesamt 200 Zellen ausgewertet. **A:** Darstellung der PLA-Signale pro Zelle. Der rote Balken stellt den Median dar. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. **B** Prozentuale Verteilung der Zellen mit EDC4-positiven P-bodies (%). Die Einteilung der P-bodies erfolgte in Zellen mit 0 P-bodies, 1-5 P-bodies, 6-10 P-bodies, 11-15 P-bodies und >15 P-bodies.

Bei der Untersuchung der Interaktion von α -DCP2_{rb}: α -DCP1a_{ms} fiel die höchste PLA-Signalzahl auf. Dies könnte möglicherweise durch die Trimerisierung des Faktors

DCP1a zu erklären sein und durch die Tatsache, dass DCP2 als katalytische Einheit des *Decappings* den DCP1a Co-Faktor benötigt. Die vorangegangenen PLA Versuche mit der Antikörperkombination DCP1_{ams}:DCP1_{arb} zeigten eine vergleichbare Anzahl der PLA-Signale (also die Proteinexpression von DCP1a auf Einzelzellebene) wie die Interaktion von DCP1_{ams}:DCP2_{rb}. Das könnte die Vermutung bestätigen, dass das Protein DCP1a größtenteils mit DCP2 als Komplex im Zytoplasma vorzufinden war. Die hohe Zahl der Interaktionen dieser Proteine fand zum großen Teil wiederum außerhalb der *P-bodies* statt. Auch hier schien die IL-1 Stimulation keinen Einfluss auf die Interaktion von DCP2:DCP1a zu haben, wodurch es keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Zellen gab. Bei der quantifizierten Analyse der Zellen auf Einzelzellebene sieht man wie zuvor bei den anderen Antikörperkombinationen eine leichte Zunahme der *P-bodies* in den Zellen nach 30 min Stimulation mit IL-1. Hierbei stieg der prozentuale Anteil der Zellen mit >15 *P-bodies* von 5% auf 8% an und auch die Menge der Zellen mit 6-10 *P-bodies* stieg von 27% auf 33% leicht an. Nach 1 h Stimulation fand ein geringfügiger Rückgang der *P-body* Zahl statt, und anschließend zeigte sich nach 3 h Stimulation eine Rückregulation der *P-body* Anzahl fast wieder auf ein basales Niveau.

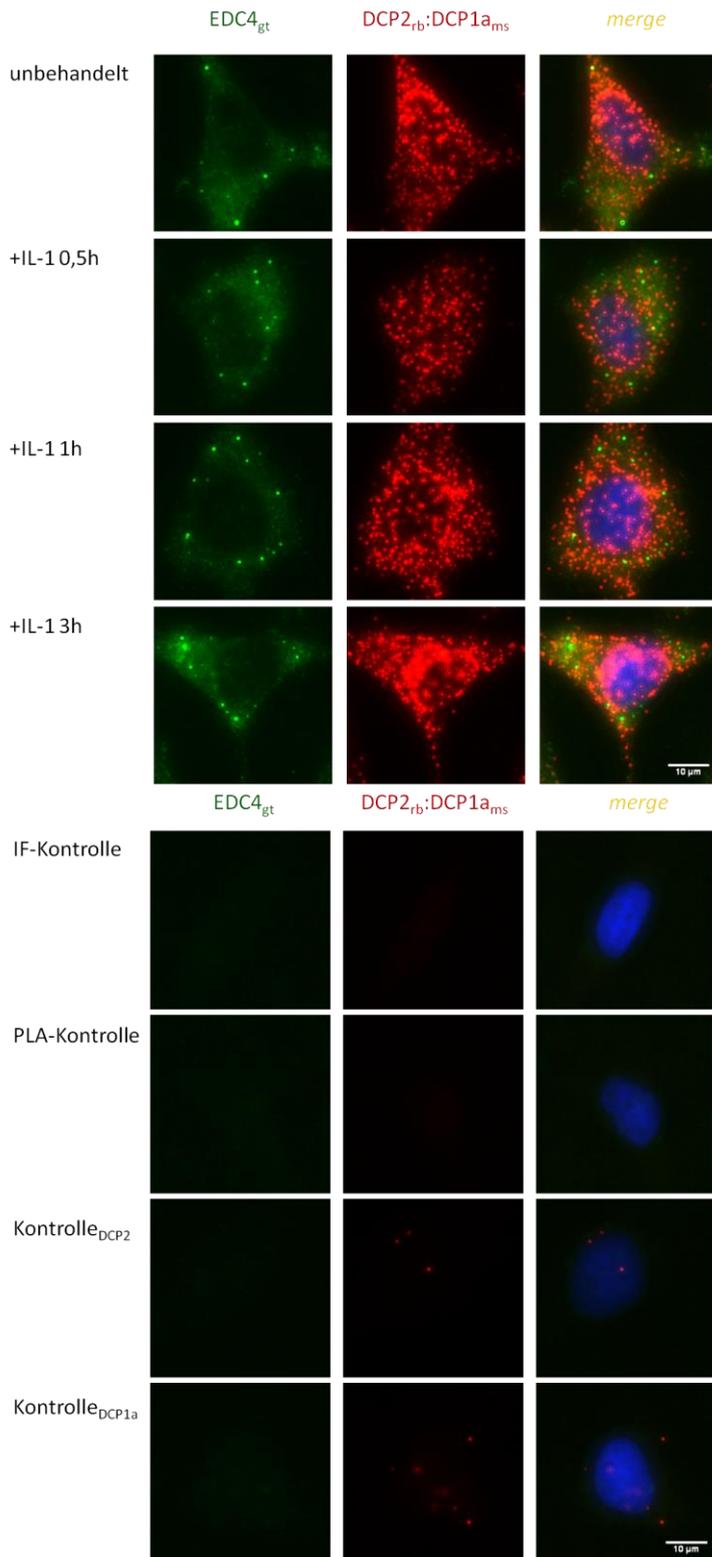
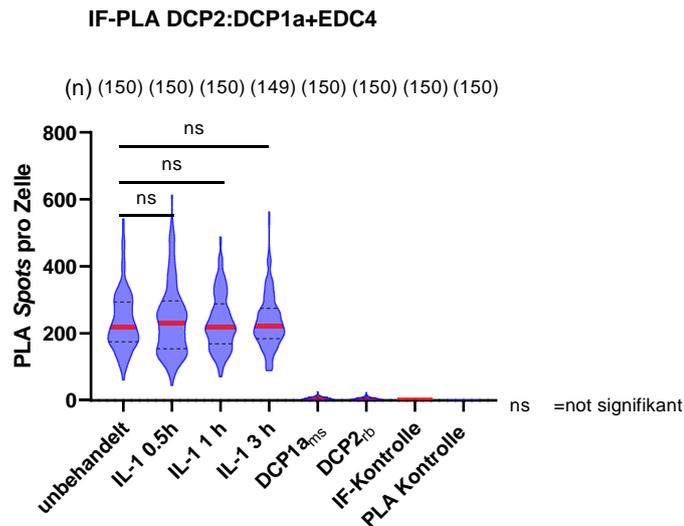


Abbildung 4.5.7 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von DCP2_{rb}:DCP1a_{ms} Proteinkomplexen im Verhältnis zur der Lokalisation von EDC4-positiven *P-bodies*. HeLa-Zellen wurden 0,5 h, 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Interaktion von DCP2 und DCP1a, ihre räumliche Nähe zu *P-bodies* und ihre Lokalisation wurde in HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assays* (IF-PLA) analysiert. Es erfolgte die Detektion der Interaktion von DCP2:DCP1a mittels Primärantikörpern unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen) in der PLA, sowie die zeitliche Detektion der *P-bodies* durch eine indirekte

Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper der entsprechenden dritten Spezies (gt=Ziege). Die IF und die PLA Kontrollen wurden jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen der Primärantikörper wurden die Kontrollen mit der Zugabe eines Primärantikörpers verwendet, welches anschließend zur Definition des unspezifischen Hintergrundsignals diente. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der Messbalken entspricht 10 μm .

A



	unbehandelt	IL-1 0.5h	IL-1 1 h	IL-1 3 h	DCP1a _{ms}	DCP2 _{rb}	IF-Kontrolle	PLA Kontrolle
Number of values	150	150	150	149	150	150	150	150
25% Percentile	174.8	154.5	169.0	184.0	3.000	2.000	0.000	0.000
Median	217.5	230.5	219.0	223.0	6.000	5.000	0.000	0.000
75% Percentile	293.8	297.0	288.3	275.0	9.000	7.000	0.000	0.000
Mean	236.9	241.4	234.5	236.2	6.533	5.260	0.1533	0.2200
Std. Deviation	90.11	107.2	84.45	81.83	4.503	3.938	0.3615	0.4759
Std. Error of Mean	7.358	8.756	6.895	6.704	0.3677	0.3215	0.02952	0.03885

B

Heterogene Verteilung von P-bodies in einzelnen Zellen in der IF-PLA DCP2:DCP1a+EDC4

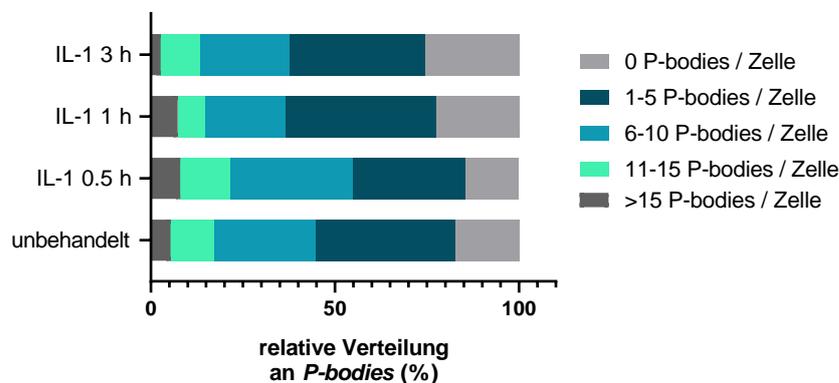


Abbildung 4.5.8 Quantifizierung von DCP2_{rb}:DCP1a_{ms} Komplexen und EDC4_{gt}-markierten P-bodies. Die Detektion von DCP2:DCP1a und EDC4 erfolgte mittels dreier unterschiedlicher Antikörper aus verschiedenen Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen, gt=Ziege). Dazu wurden die HeLa-Zellen mittels 10 ng/ml IL-1 für 0,5 h; 1 h und 3 stimuliert oder als Kontrolle unbehandelt belassen und anschließend mittels Immunfluoreszenz-Proximity-Ligation-Assay analysiert. Die IF-Kontrollen wurden ohne Primärantikörper durchgeführt. Die PLA Kontrollen erfolgten ohne Primärantikörper oder mit einem Primärantikörper. Es wurden 3 biologisch unabhängige Experimente mit mindestens 149 Zellen ausgewertet. Bei einem der 3 Versuche musste die Belichtungszeit nach dem Aliquotieren der Polymerase angepasst werden. **A:** Darstellung der PLA-Signale pro Zelle. Der rote Balken stellt den Median dar. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. **B:** Prozentuale Verteilung der Zellen mit EDC4-positiven P-bodies (%). Die Einteilung der P-bodies erfolgte in Zellen mit 0 P-bodies, 1-5 P-bodies, 6-10 P-bodies, 11-15 P-bodies, und >15 P-bodies.

Die Analyse der Antikörperkombination α -DCP2_{rb}: α -XRN1_{ms} zeigte nach Stimulation keine signifikanten Schwankungen. Hier waren sehr viele Interaktionen zwischen DCP2:XRN1 zu finden, jedoch sind diese subzellulären Proteinkomplexe größtenteils

außerhalb von *P-bodies* lokalisiert. Die Zahl der *P-bodies* zeigte kaum Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen. Nach 30 min IL-1 Stimulation war die prozentuale Verteilung der *P-bodies* innerhalb der Population fast gleichbleibend. Nach 1 h Stimulation war eine marginale Verschiebung innerhalb der Population zu sehen: eine schwache Abnahme der Anteile der Zellen mit 11-15 *P-bodies* und >15 *P-bodies* und demgegenüber eine prozentuale Zunahme der Zellen mit 6-10 *P-bodies*. Nach 3 h Stimulation war eine geringe Abnahme der Zellen mit >15 *P-bodies* (von 6,7% auf 4,7%) und 6-10 *P-bodies* (von 30% auf 23%) und eine Zunahme der Zellen mit 11-15 *P-bodies* (von 10% auf 14%) und 1-5 *P-bodies* (von 34% auf 41%) zu beobachten. Die Zahl der Zellen ohne *P-bodies* blieb während der Stimulation annähernd konstant.

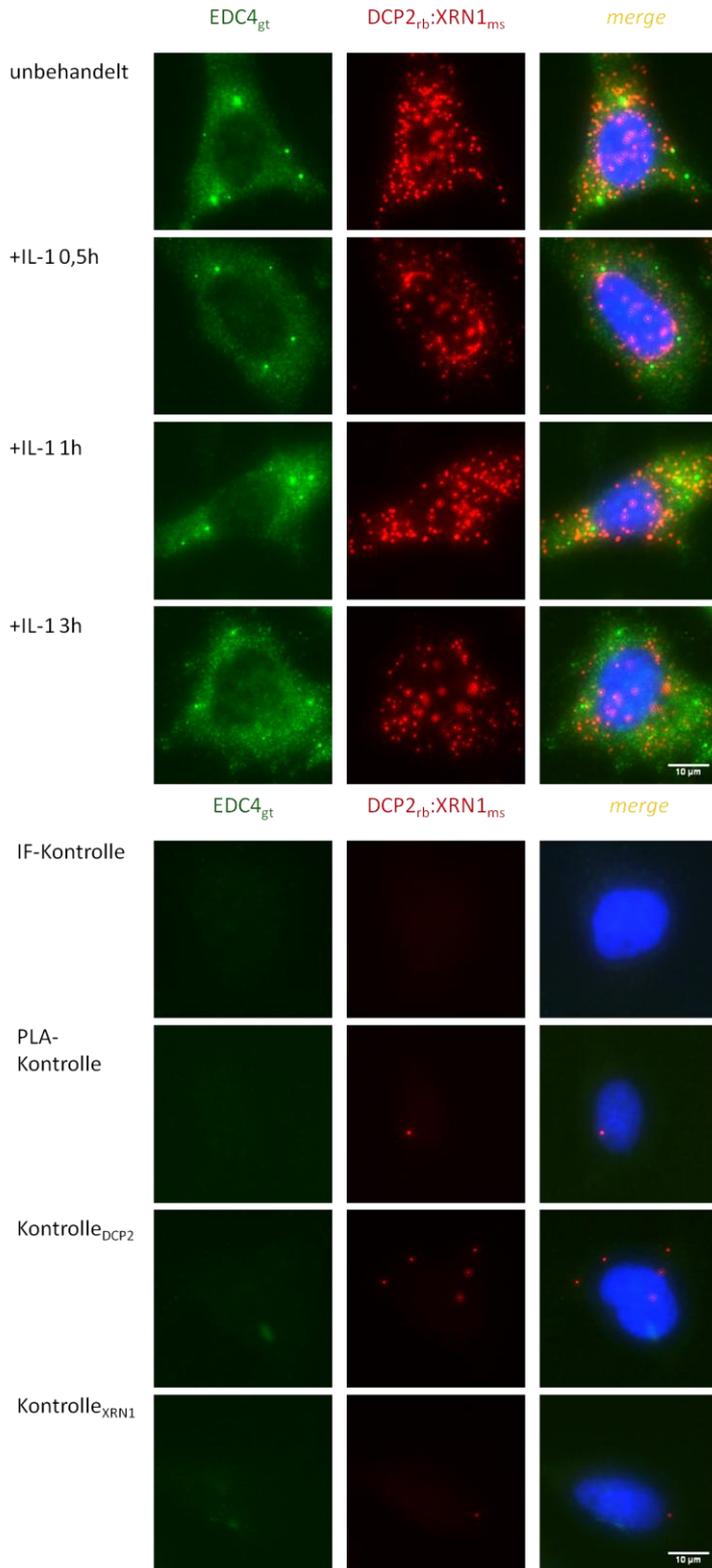


Abbildung 4.5.9 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von DCP2_{rb}:XRN1_{ms} Proteinkomplexen im Verhältnis zur der Lokalisation von EDC4-positiven *P-bodies*. HeLa-Zellen wurden für 0,5 h, 1 h und 3 h mit IL-1 (10 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Interaktion von DCP2 und XRN1, ihre räumliche Nähe zu *P-bodies* und ihre Lokalisation wurde in HeLa-Zellen durch Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assays* (IF-PLA) analysiert. Es erfolgte die Detektion der Interaktion von DCP2:XRN1 mittels Primärantikörpern unterschiedlicher Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen) in der PLA, sowie die zeitgleiche Detektion der *P-bodies* durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem Primärantikörper der entsprechenden dritten Spezies (gt=Ziege). Die IF und die PLA Kontrollen wurden

jeweils ohne Primärantikörper durchgeführt. Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen der Primärantikörper wurden die Kontrollen mit der Zugabe eines Primärantikörpers verwendet, welches anschließend zur Definition des unspezifischen Hintergrundsignals diente. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der Messbalken entspricht 10 µm.

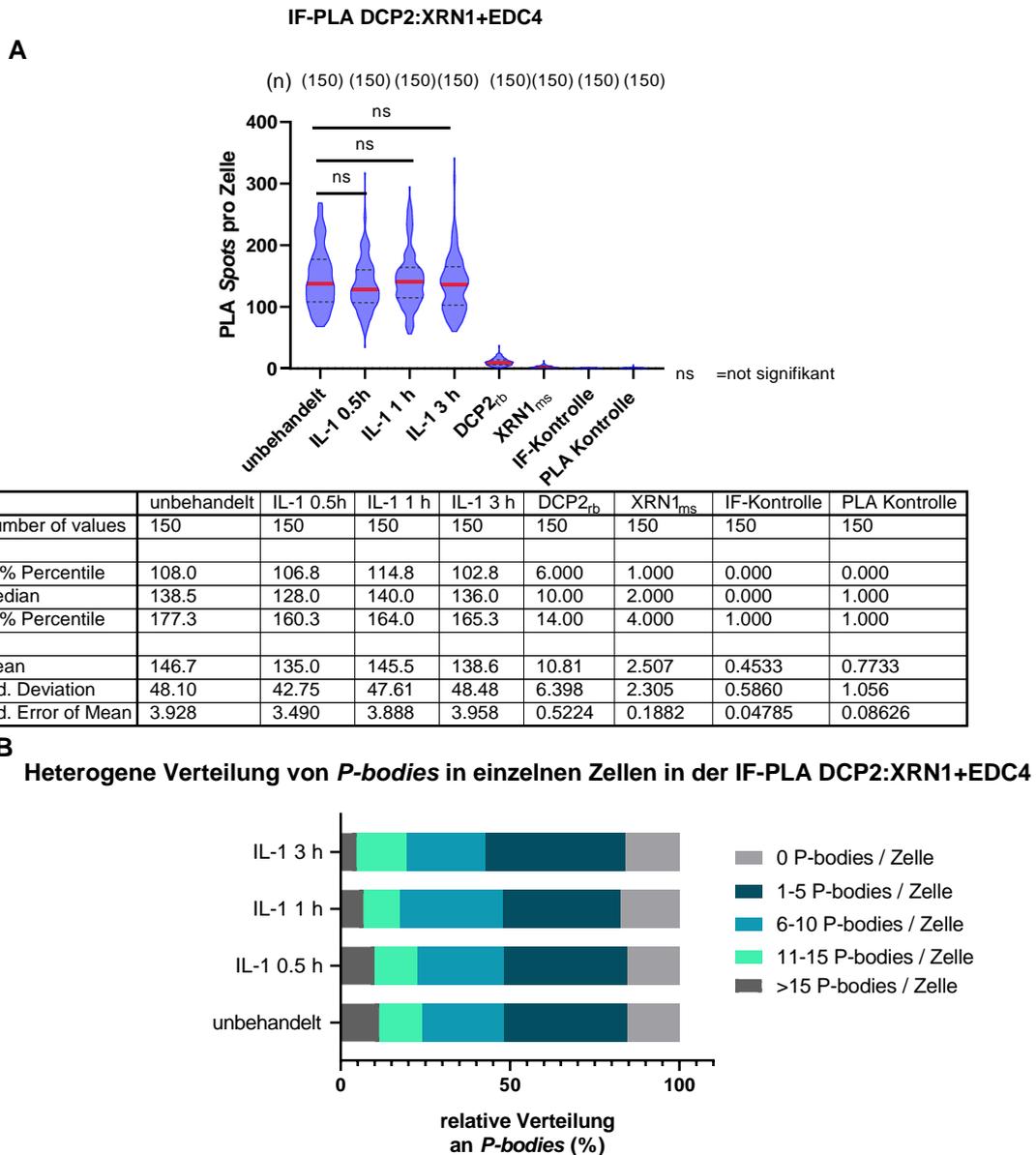


Abbildung 4.5.10 Quantifizierung von DCP2_{rb}:XRN1_{ms} Komplexen und EDC4_{gt}-markierten P-bodies. Die Detektion von DCP2:XRN1 und EDC4 erfolgte mittels dreier unterschiedlicher Antikörper aus verschiedenen Spezies (ms=Maus, rb=Kaninchen, gt=Ziege). Dazu wurden die HeLa-Zellen mittels 10 ng/ml IL-1 für 0,5 h; 1 h und 3 h stimuliert oder als Kontrolle unbehandelt belassen und anschließend mittels Immunfluoreszenz-Proximity-Ligation-Assay analysiert. Die IF-Kontrollen wurden ohne Primärantikörper durchgeführt. Die PLA Kontrollen erfolgten ohne Primärantikörper oder mit einem Primärantikörper. Es wurden 3 biologisch unabhängige Experimente mit insgesamt 150 Zellen ausgewertet. **A:** Darstellung der PLA-Signale pro Zelle. Der rote Balken stellt den Median dar. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. **B:** Prozentuale Darstellung der Zellen mit EDC4-positiven P-bodies. Die Einteilung der P-bodies erfolgte in Zellen mit 0 P-bodies, 1-5 P-bodies, 6-10 P-bodies, 11-15 P-bodies und >15 P-bodies.

Zusammenfassend konnten bei der systematischen Auswertung der Kolo-kalisation der PLA-Signale und den *P-bodies* insgesamt nur wenige *Merges* detektiert werden, da die meisten *Decapping* Komplexe außerhalb von *P-bodies* detektiert wurden. Je nach Antikörperkombinationen sind zudem unterschiedlich starke Überlagerungen der Signale zu detektieren. So zeigt sich häufiger auch eine partielle Kolo-kalisation mit dem *P-body* Marker EDC4. Diese Effekte könnten durch Proteindimere hervorgerufen worden sein, die gerade im Begriff sind, in *P-bodies* zu lokalisieren oder diese zu verlassen. Ein ähnliches Phänomen wurde bei Übergängen zwischen Stress-Granula und *P-bodies* beschrieben (Ohn et al., 2008). Diese Hypothese müsste allerdings durch weitere Experimente überprüft werden.

Ein experimenteller bedingter Artefakt durch die kombinierte IF /PLA ist eher unwahrscheinlich, da die Zahl der *P-bodies* in der alleinig durchgeführten IF (siehe Abbildung 4.2.2) nicht höher ist, als die Zahl der *P-bodies*, welche mittels IF-PLA durchgeführt wurden.

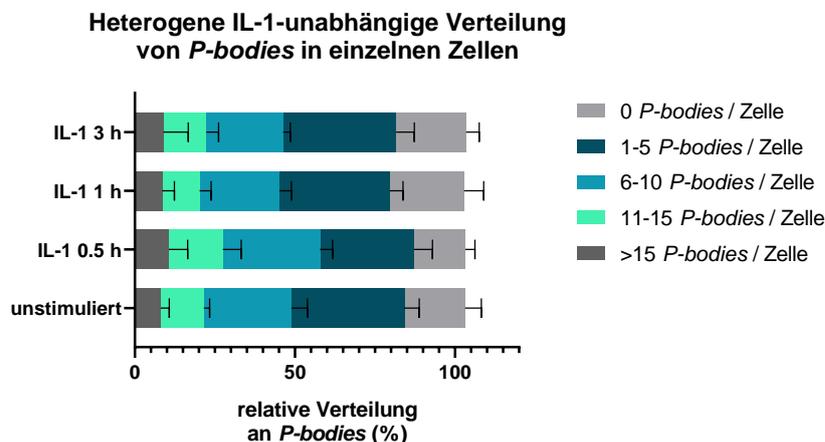
Für die meisten der getesteten Protein:Protein Interaktionen von *Decapping*-Faktoren kann festgestellt werden, dass weder die Anzahl an (Hetero-)Dimeren noch die Anzahl an *Merges* mit *P-bodies* nennenswert durch IL-1 reguliert waren. Die einzige in der alleinigen PLA durch IL-1 regulierte EDC4:XRN1-Interaktion (siehe Abbildung 4.4.2) wurde in diesem experimentellen Design nicht getestet. Diese Kombination in der IF-PLA durchzuführen, wäre ebenfalls interessant gewesen. Dieses Experiment konnte aber nicht durchgeführt werden, da zu dieser Zeit keine passenden weiteren Antikörper zur Markierung der *P-bodies* zur Verfügung standen.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass die parentalen HeLa-Zellen in Bezug auf die *P-body* Anzahl heterogen auf die IL-1 Stimulation reagieren.

Dieses wird besonders deutlich, wenn die Messungen der *P-body* Anzahl aus allen individuellen PLA Experimenten Ansätzen noch einmal separat zusammengefasst und dargestellt werden. Hierbei sieht man einen statistisch nicht signifikanten IL-1-abhängigen Anstieg der *P-bodies* in einer kleinen Fraktion von Zellen nach 30 minütiger Stimulation, welche die höchste *P-body* Anzahl pro Zelle aufweisen.

In der genauen Analyse des Graphen zeigte sich nach 0.5 h Stimulation mit IL-1 im Durchschnitt eine Zunahme der Zellen mit mehr *P-bodies*, während die Zahl der Zellen ohne *P-bodies* im Durchschnitt von 19% bei unbehandelten Zellen auf 16% abnahm. Die Zahl der Zellen mit 6-10 *P-bodies*/Zelle stieg von 13,5 % im Durchschnitt auf

16,9% an. Auch die relative Verteilung der Zellen in der Subgruppe mit >15 *P-bodies* änderte sich von 8,1% in unstimulierten Zellen auf 10,6% im Durchschnitt nach 0,5 h IL-1 Stimulation. Allerdings waren anhand von statistischen Tests keine dieser Veränderungen signifikant.



	>15 <i>P-bodies</i> / Zelle			11-15 <i>P-bodies</i> / Zelle			6-10 <i>P-bodies</i> / Zelle			1-5 <i>P-bodies</i> / Zelle			0 <i>P-bodies</i> / Zelle		
	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N
unstimuliert	8.100	2.671	5	13.500	1.748	5	27.300	4.992	5	35.300	4.646	5	19.000	5.021	5
IL-1 0.5 h	10.600	5.899	5	16.900	5.754	5	30.367	3.913	5	29.333	5.798	5	16.000	3.009	5
IL-1 1 h	8.567	3.774	5	11.700	3.583	5	24.900	3.734	5	34.433	4.173	5	23.200	6.185	5
IL-1 3 h	8.937	7.780	5	13.381	3.854	5	23.966	2.268	5	35.349	5.644	5	21.867	4.089	5

Abbildung 4.5.11 Zusammenfassung der Anzahl an EDC4-markierten *P-bodies* über alle durchgeführten Experimente.

Prozentuale Darstellung der Zellen mit EDC4-positiven *P-bodies* aller Experimente mit der jeweiligen Einteilung der Subgruppen mit Fehlerbalken (n=850 Zellen). Die Einteilung der *P-bodies* erfolgte in Zellen mit 0 *P-bodies*, 0-5 *P-bodies*, 6-10 *P-bodies*, 11-15 *P-bodies* und >15 *P-bodies*. Die Signifikanzanalyse der Subgruppen erfolgte mittels Kruska-Wallis Test, da die Daten nicht normalverteilt waren. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen innerhalb der Subgruppen.

4.6 Vergleichende Analyse der IL-1 induzierten p65 Translokation in den Zellkern und der Proteininteraktion von DCP1a:EDC4

Die bisherigen Ergebnisse zeigten einen sehr schwachen bzw. variablen Zusammenhang zwischen der *P-body* Bildung und der zytokinabhängigen Stimulation der HeLa-Zellen mit IL-1, vor allem aufgrund der ausgeprägten Heterogenität der IL-1 Antwort in den untersuchten Zellen. Um dieses Phänomen weiter zu differenzieren und zu untersuchen, ob die Interaktion der *Decapping* Komplexes tatsächlich weitestgehend unabhängig vom IL-1 Stimulus vonstattengeht, wurden mittels der IF-PLA die Zellen identifiziert, welche nach einer einstündigen IL-1 Stimulation eine Translokation von NFκB p65 in den Zellkern aufwiesen, um die Zellen, welche auf den Stimulus reagiert oder eben nicht reagiert hatten, bei der Auswertung getrennt analysieren zu können. Wie zuvor,

wurden die Zellen mit 10 ng/ml IL-1 α für 1 h stimuliert oder unbehandelt belassen und anschließend mittels des IF-PLA Protokolls mit Kernaufschluss behandelt (siehe Kapitel 3.2.3).

Die Ergebnisse bestätigten, dass HeLa-Zellen nicht homogen auf die Stimulation mit IL-1 reagieren, da nur ungefähr 50 bis 60 % der Zellen nach einer einstündigen Stimulation mit einer Translokation von NF κ B p65 in den Zellkern reagierten. Wie in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 1.3), erfolgt nach Bindung und Aktivierung des heterodimeren IL-1 Rezeptorkomplexes durch eine zytoplasmatische Signalkaskade die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs. Hierbei erfolgt durch eine Aktivierung des I κ B-Kinase-Komplexes ein proteolytischer Abbau von I κ B α durch das Proteasom, sodass die NF- κ B-Untereinheiten in den Zellkern translozieren, dort an die Promotoren der IL-1-Zielgene binden und dadurch die Transkription aktivieren können (Karin and Ben-Neriah, 2000). Dementsprechend kann die Translokation von NF- κ B in den Zellkern als ein Maß für die Reaktivität der Zelle auf die IL-1 α Stimulation verwendet werden.

Die Quantifizierung der Antikörperkombination von DCP1_{ms}:EDC4_{gt} in der PLA kombiniert mit dem Antikörper p65_{rb} in der IF zeigte insgesamt 50,5% der Zellen, welche auf die IL-1 Stimulation mit einer NF κ B p65 Translokation in den Zellkern reagiert hatten. Bei der Antikörperkombination DCP1_{rb}:EDC4_{gt} in der PLA zusammen mit einer IF gegen p65_{ms} zeigten 57% der Zellen eine Translokation von NF κ B p65 in den Zellkern nach der einstündigen IL-1 Stimulation.

Da in vorherigen Ergebnissen gezeigt wurde, dass die Zahl der Interaktionen von DCP1a und EDC4 nach einer Stimulation mit IL-1 gleichbleibend ist, wurde diese Antikörperkombination für eine Subgruppen Analyse gewählt. Bei der Untersuchung der Interaktion von DCP1a_{ms}:EDC4_{gt} ist kein Unterschied in Abhängigkeit von der NF κ B p65 Translokation in den Zellkern ersichtlich. Hierbei ist die Zahl der PLA-Signale im Median vergleichbar mit der vorangegangenen Versuchsreihe, in der eine PLA ohne zusätzliche Immunfärbung unter Verwendung der DCP1a_{ms} und EDC4_{rb} Antikörpern durchgeführt wurde (siehe Abbildung 4.4.2).

Zur weiteren Untersuchung der Ergebnisse erfolgte derselbe Versuchsaufbau in der IF-PLA mit Kernaufschluss, jedoch mit Primärantikörpern anderer Spezies. So wurde in

der IF der NF κ B p65_{ms} Primärantikörper verwendet und in der PLA die EDC4_{gt} und DCP1a_{rb} Antikörper.

Des Weiteren wiesen die verwendeten Primärantikörper unspezifische Bindungen auf, welche sich in den Kontrollslots zeigten. Die Primärantikörper, welche effizienter und spezifischer binden, können die Sensitivität der PLA Methode deutlich verbessern. In den Kontrollen zeigte der DCP1a_{ms} Primärantikörper im Median ca. 10 PLA-Signale während der DCP1a_{rb} im Median ca. 6 Signale pro Zelle aufwies. Der EDC4_{gt} Antikörper in der Antikörperkombination mit DCP1a_{ms} zeigte im Median ca. 4 PLA *Spots* auf, während der gleiche EDC4_{gt} Antikörper in der Kombination mit DCP1a_{rb} im Median 7 Signale pro Zelle in der Kontrolle aufwies. Insgesamt erschienen diese Ergebnisse trotz der unterschiedlich verwendeten Primärantikörper vergleichbar, was auf eine hohe Spezifität der Primärantikörper hinweist.

Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante IL-1-abhängige Zunahme von EDC4:DCP1a-Interaktionen in beiden Subgruppen (mit bzw. ohne p65 Signal im Zellkern), also unabhängig von einer p65 Translokation. Diese Experimente ergaben daher keine zusätzliche Information in Bezug auf die schwache und variable Regulation der Interaktionen von *P-body* Proteinen oder der Anzahl an *P-bodies* durch IL-1.

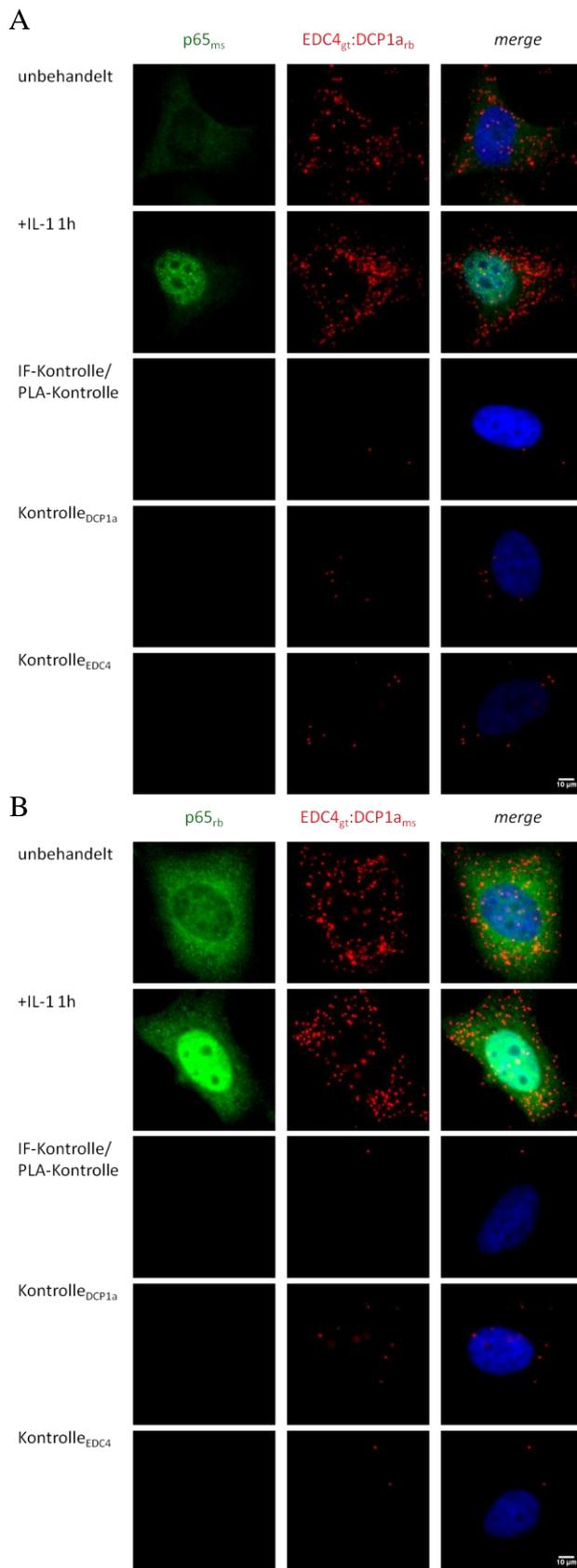
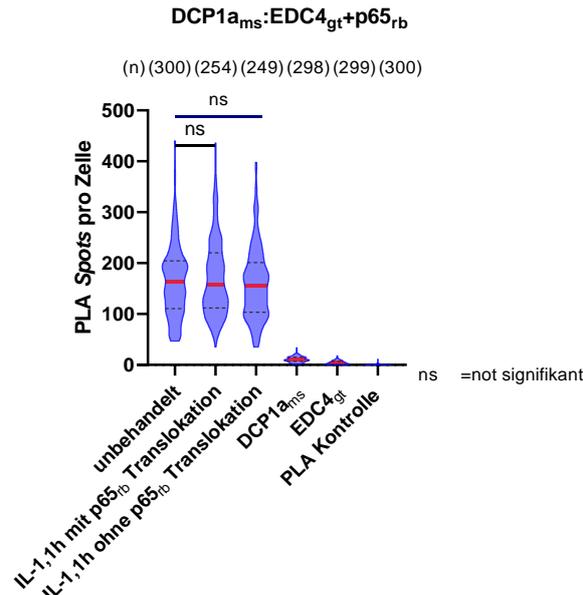


Abbildung 4.6.1 Kombination aus p65 NF-κB IF und PLA zum Nachweis einer EDC4:DCP1-Interaktion spezifisch in IL-1stimulierten Zellen. HeLa-Zellen wurden für 1 h mit IL-1 (10 ng/ml) behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend erfolgte in einer IF-PLA mittels Kernaufschluss die Analyse der IL-1-vermittelten, nukleären Lokation von NFκB p65 in den Zellkern mittels eines anti-p65-

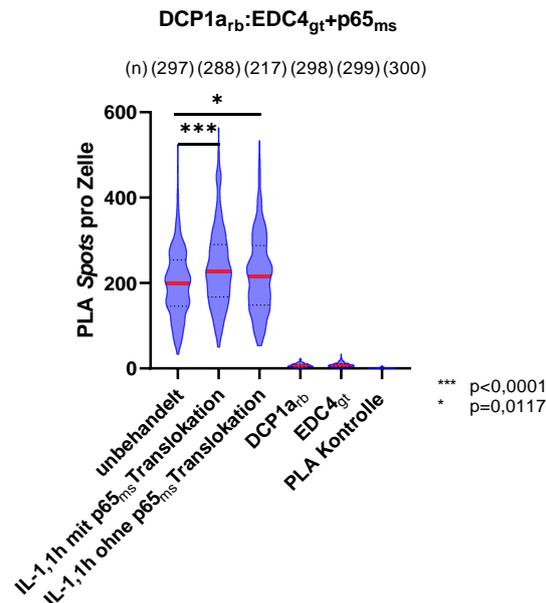
Antikörpers in der indirekten Immunfluoreszenz sowie die synchrone Analyse der Interaktion von EDC4:DCP1 mittels PLA. Der Messbalken entspricht 10 μm . Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. **A:** Es wurden in der PLA die Primärantikörper EDC4_{gt}:DCP1a_{rb} verwendet und in der IF p65_{ms}. **B:** Es wurden in der PLA die Primärantikörper EDC4_{gt}:DCP1a_{ms} verwendet und in der IF p65_{rb}.

A



	unbehandelt	IL-1,1h mit p65 _{rb} Translokation	IL-1,1h ohne p65 _{rb} Translokation	DCP1 _{a_{ms}}	EDC4 _{gt}	PLA Kontrolle
Number of values	300	254	249	298	299	300
25% Percentile	110.8	111.8	103.5	7.000	1.000	0.000
Median	162.5	158.0	156.0	10.00	4.000	0.000
75% Percentile	204.3	220.3	201.0	15.00	7.000	1.000
Mean	165.4	172.4	159.8	10.93	4.378	0.8200
Std. Deviation	71.48	76.50	70.48	5.585	3.659	1.429
Std. Error of Mean	4.127	4.800	4.466	0.3235	0.2116	0.08248

B



	unbehandelt	IL-1,1h mit p65 _{ms} Translokation	IL-1,1h ohne p65 _{ms} Translokation	DCP1 _{a_{rb}}	EDC4 _{gt}	PLA Kontrolle
Number of values	297	288	217	298	299	300
25% Percentile	145.5	167.0	148.0	4.000	4.000	0.000
Median	199.0	226.0	216.0	6.000	7.000	0.000
75% Percentile	254.0	290.0	287.5	10.00	10.00	1.000
Mean	199.0	235.3	221.5	7.111	7.829	0.7333
Std. Deviation	79.19	94.45	92.33	4.391	5.252	1.128
Std. Error of Mean	4.595	5.565	6.268	0.2544	0.3037	0.06514

Abbildung 4.6.2 Quantifizierung der PLA-Signale der kombinierten p65 NF- κ B IF und EDC4:DCP1a in der PLA. Die Versuchsdurchführung ist in der Legende von Abb.5.5.1 detailliert beschrieben. Es wurden 3 biologisch unabhängige Experimente mit mehr als 200 Zellen ausgewertet. **A:** Die Gesamtzahl der PLA-Signale von DCP1a_{ms}:EDC4_{gt} wurde graphisch dargestellt. Es wurden mindestens 249 Zellen ausgewertet. **B:** Die Gesamtzahl der PLA-Signale von DCP1a_{rb}:EDC4_{gt} wurde graphisch dargestellt. Es wurden mindestens 217 Zellen ausgewertet. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

4.7 Einfluss einer HCoV-229E Infektion auf die Protein:Protein-Interaktion von EDC4:XRN1

Die Infektion einer Zelle mit einem RNA-Virus aktiviert häufig ebenfalls proinflammatorische Signalwege. Um eine mögliche Regulation von Proteinkomplexen aus *P-body* Faktoren mit der sensitiven kombinierten IF-PLA Methode in einem weiteren biologischen Modell zu untersuchen, wurden Infektionsversuche mit einem humanen Coronavirus in HeLa-Zellen durchgeführt.

HCoV-229E ist ein Plus-Strang RNA-Virus. Um die infizierten HeLa-Zellen von den nicht infizierten zu unterscheiden, wurde die Expression des Nukleokapsid (N) Proteins als Hinweis auf die erfolgte Infektion der Zelle gewertet. Das N-Protein enthält N-terminal eine RNA-bindungs Domäne (Tang et al., 2005). Es stellt das Kapsid des viralen Genoms dar, sorgt für den Schutz der viralen RNA, für den erleichterten Eintritt in die Wirtszelle und ist essenziell für die virale Replikation (Almazán et al., 2004).

Die vorherigen Versuche in der PLA zeigten, dass die Interaktion zwischen EDC4_{rb}:XRN1_{ms} nach der Stimulation mit IL-1 für 1 h signifikant angestiegen ist. Um zu sehen, ob dieser Effekt sich auch im Falle einer Virusinfektion darstellt, wurde diese Proteininteraktion unter einer Virusinfektion untersucht.

In dieser IF-PLA mit Virusinfektion wurde die Proteininteraktion zwischen EDC4 und XRN1 in der PLA als roter *Spot* markiert und das N-Protein mit Hilfe von *Dylight* 488 grün angefärbt. Infolgedessen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop die infizierten Zellen von den nicht infizierten durch die grüne Markierung differenziert werden. Es wurden Antikörper aus drei verschiedenen Spezies verwendet: EDC4_{gt}:XRN1_{rb} und das anti-N-Protein_{ms}. Nach der Infektion der HeLa-Zellen konnte in 84% der Zellen das N-Protein nachgewiesen werden. Die noch nicht infizierten Zellen wurden gesondert graphisch dargestellt (hier 58 Zellen aus 3 biologisch unabhängigen Experimenten). Je Ansatz wurden mindestens 100 Zellen von insgesamt drei biologischen Replikaten untersucht (N=3). Die PLA den EDC4_{gt}:XRN1_{rb} Antikörpern ergab im Median 150

Signale pro Zelle bei den nicht infizierten Zellen, während bei der Kombination von EDC4_{rb}:XRN1_{ms} im Median 57 Signale pro Zelle detektiert wurden. Dies demonstriert wie zuvor die Bedeutung der Antikörperabhängigkeit der PLA Methode.

Bei der Analyse der Daten wurde evident, dass sowohl die infizierten Zellen (insgesamt 84% der Zellen) als auch die in derselben Probe befindlichen nicht infizierten Zellen, (16% der ausgewerteten Zellen) eine signifikant geringere Interaktion von EDC4:XRN1 aufwiesen.

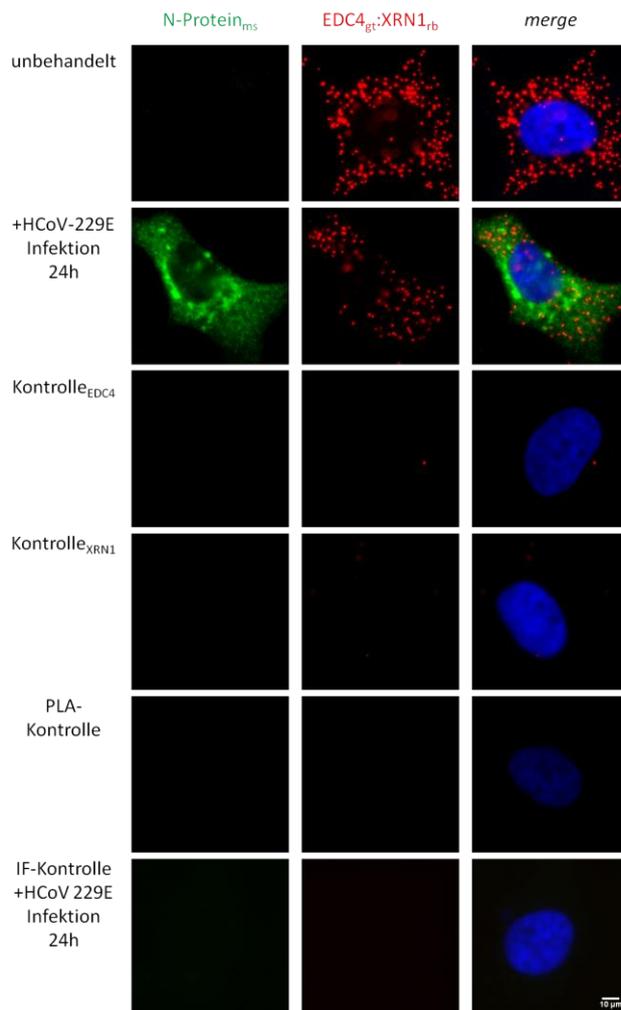
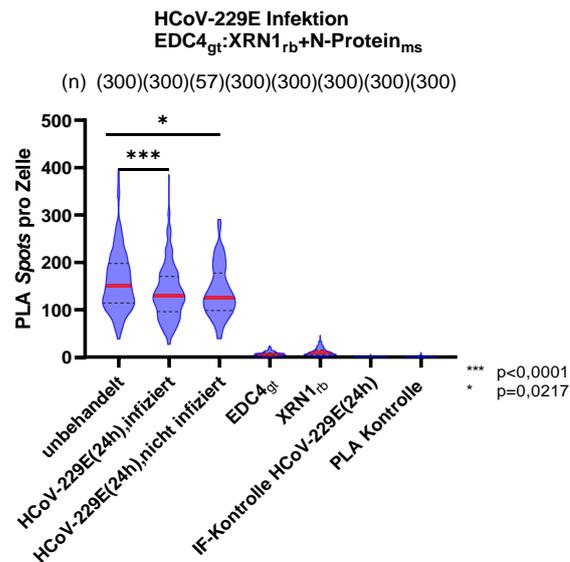


Abbildung 4.7.1 Einfluss der HCoV-229E Infektion auf die Interaktion von EDC4_{gt}:XRN1_{rb}. HeLa-Zellen wurden für 24 h mit HCoV-229E infiziert oder unbehandelt belassen. Es erfolgte die Detektion der Interaktion von EDC4_{gt}:XRN1_{rb} mittels Primärantikörper unterschiedlicher Spezies (gt=Ziege, rb=Kaninchen) in der PLA, sowie die simultane Detektion der Infektion der Zellen durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem N-Protein Antikörper der entsprechenden dritten Spezies (ms=Maus). Die dargestellten Ergebnisse resultieren aus drei biologisch unabhängigen Experimenten mit insgesamt 300 Zellen. Die IF-Kontrolle erfolgte ebenfalls eine Infektion mit HCoV-229E für 24h. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hoechst 33342. Der Messbalken entspricht 10 µm.



	unbehandelt	HCoV-229E(24h),infiziert	HCoV-229E(24h),nicht infiziert	EDC4 _{gt}	XRN1 _{rb}	IF-Kontrolle HCoV-229E(24h)	PLA Kontrolle
Number of values	300	300	57	300	300	300	300
25% Percentile	114.3	96.00	98.50	4.000	5.000	0.000	0.000
Median	150.0	129.0	126.0	6.000	9.000	0.000	0.000
75% Percentile	198.0	170.5	177.5	9.000	15.00	0.000	1.000
Mean	160.2	135.9	139.0	6.930	11.13	0.08333	0.8267
Std. Deviation	64.35	57.10	54.71	4.661	8.265	0.6359	1.234
Std. Error of Mean	3.715	3.297	7.247	0.2691	0.4772	0.03672	0.07122

Abbildung 4.7.2 Quantifizierung Einfluss der HCoV-229E Infektion auf die Interaktion von EDC4_{gt}:XRN1_{rb}. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus drei biologisch unabhängigen Experimenten mit insgesamt mindestens 300 Zellen. Die PLA Ergebnisse der 58 nicht infizierten Zellen, welche keine N-Protein Signal in der IF aufwiesen, wurden getrennt dargestellt. Es wurden Antikörper aus drei unterschiedlichen Spezies verwendet (ms=Maus, rb=Kaninchen, gt=Ziege). Die IF-Kontrollen wurden ohne Primärantikörper durchgeführt. Die PLA Kontrollen erfolgten ohne Primärantikörper oder nur mit einem einzelnen Primärantikörper. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Wilcox-Mann-Whitney-Test.

Diese Daten zeigen, dass es in der Zellkultur im Rahmen der CoV Infektion zu direkten und indirekten Effekten auf die Proteininteraktionen von EDC4:XRN1 kommt. Für die deutlich abnehmende Interaktion von EDC4:XRN1 gibt es zwei prinzipielle Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnten die Proteine über auto- und parakrine Mechanismen tatsächlich in geringerem Ausmaß miteinander interagieren, zum anderen könnten im Rahmen der Infektion die Proteinlevel verändert sein. Um Letzteres zu untersuchen, erfolgte eine Analyse der Expression von EDC4 und XRN1 in Zellextrakten mittels eines Westernblots. Hierfür wurden HuH7 Zellen und HeLa-Zellen jeweils für 24 h mit HCoV-229E infiziert. Es wurde jeweils nur ein Experiment durchgeführt. In beiden Zelllinien wurde eine Virus-induzierte Verminderung der EDC4 Menge beobachtet, die darauf hindeutet, dass EDC4 abgebaut wird. In den HUH7 Zellen zeigt sich der Abbau von EDC4 deutlicher als in den HeLa-Zellen. Bei der densitometrischen Auswertung der Westernblots ergab sich eine relative Proteinmenge

von EDC4 nach der Infektion mit dem HCoV-229E von 27%. Auch in den HeLa-Zellen wurde für XRN1 und EDC4 nach der Infektion eine geringere relative Proteinmenge beobachtet, allerdings war diese Reduktion im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen sehr schwach.

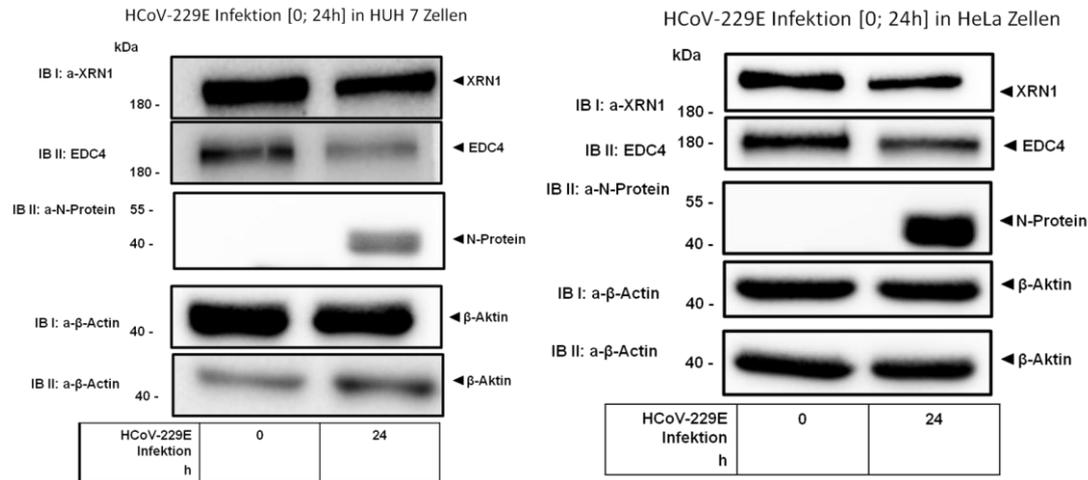
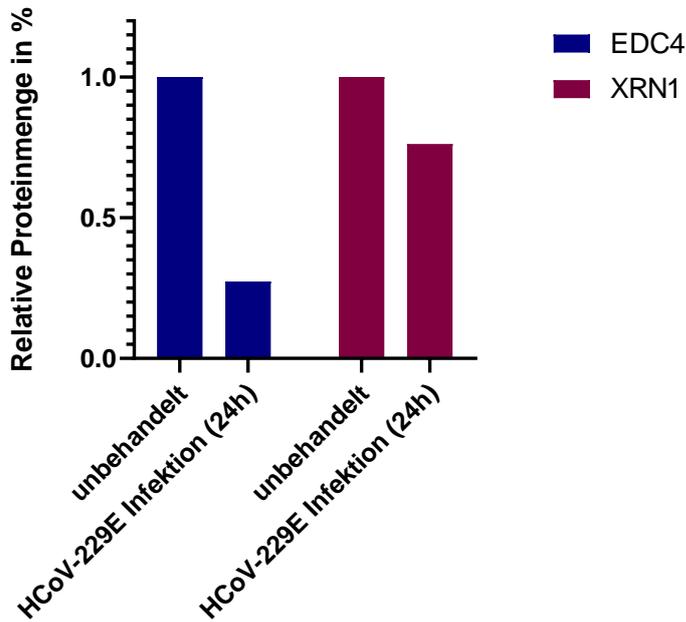


Abbildung 4.7.3 Einfluss der HCoV-229E Infektion auf die Proteinspiegel von XRN1 und EDC4 in HuH7 und HeLa-Zellen. HUH7 und HeLa-Zellen wurden 24 h in 60 cm² Schalen mit HCoV-229E (*multiplicity of infection* (MOI) = 1) für 24 Stunden infiziert oder unbehandelt belassen. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der EDC4 und XRN1 Proteine mittels Westernblot Analysen von Ganzzellextrakten der Proteine. β-Aktin- Antikörper dienten hierbei als Beladungskontrolle. Die Infektion wurde mittels Antikörpern gegen das N Protein überprüft.

HCoV-229E Infektion in HUH7 Zellen



HCoV-229E Infektion in HeLa Zellen

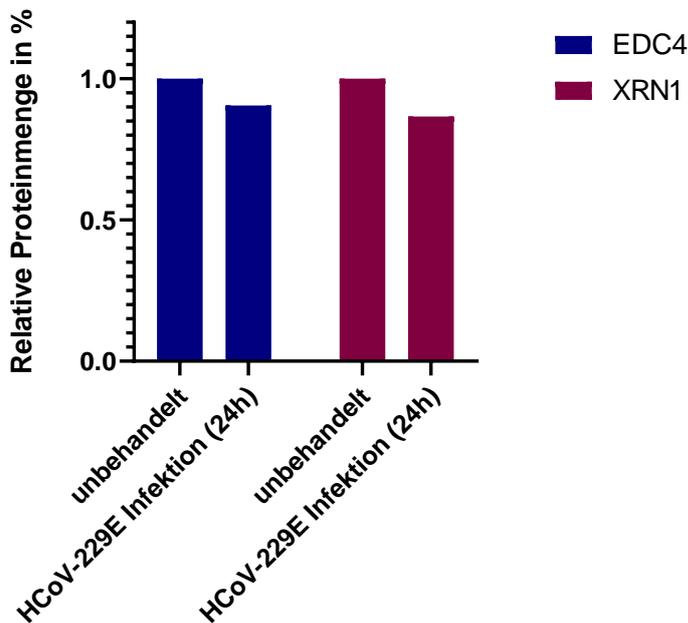


Abbildung 4.7.4 Quantifizierung der XRN1 und EDC4 Proteinmenge. Die in Abb. 5.6.3 gezeigten Proteinbanden der Westernblots wurden über eine densitometrische Auswertung (mittels *Image Lab* von *Bio-Rad Laboratories*) quantifiziert, wobei die Bandenintensität der EDC4 und XRN1 Banden auf die β -Aktin Proteinmenge normiert wurde. Die Darstellung erfolgte relativ zu der Proteinbandenintensität der nicht infizierten Kontrollzellen.

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Protein:Protein Wechselwirkungen von prototypischen *P-body* Komponenten und ihre mögliche Regulation durch Zytokine oder RNA-Viren auf Einzelzellebene zu untersuchen. Vorbefunde innerhalb der Arbeitsgruppe Kracht hatten bereits gezeigt, dass die IL-1 Stimulation der HEK293IL-1R Zellen zu einem Anstieg von *P-bodies* führen kann (Rzeczkowski et al., 2011). Es war daher eine interessante Frage, ob dieses auch in anderen Zellsystemen beobachtet werden kann und ob es möglich ist, einzelne Heterodimere von *P-body* Komponenten mit sensitiven Messmethoden zu erfassen und zu quantifizieren.

5.1 Die Methode des *Proximity Ligation Assay*

Die Methode des *Proximity Ligation Assay* wurde bereits vorher in der Arbeitsgruppe Kracht etabliert und erfolgreich für die Erfassung verschiedener Regulationsschritte des NF- κ B Signalweges verwendet (Mayr-Buro et al., 2019). Um die Spezifität des Assays zu untersuchen, wurde in den Versuchsreihen zeitgleich immer eine Reihe mit Negativkontrollen mitgeführt, wobei jeweils nur einer bzw. keiner der beiden Primärantikörper mitgeführt wurde. Hierdurch wurden die einzelnen unspezifischen Bindungsereignisse sowohl der Primärantikörper, als auch der Sekundärantikörper und ihre Spezifität überprüft.

Die Methode des *Proximity Ligation Assay* ist sehr spezifisch, da sie antikörperbasiert funktioniert. Zudem sollte bedacht werden, dass durch die PLA nur Proteininteraktionen detektiert werden können, die innerhalb einer Distanz von ca. 30 nm vorliegen (Cougot et al., 2012, Eulalio et al., 2007a, Soderberg et al., 2006). Zusätzlich ist sie bedingt durch die *Rolling-Circle*-Amplifikation und die Vervielfältigung des Fluoreszenzsignals auch sehr sensitiv (Mayr-Buro et al., 2019, Packer and Trapnell, 2018, Ren et al., 2018). Die Spezifität ist vom verwendeten Antikörper (hierbei sowohl der Primär- als auch der Sekundärantikörper) abhängig. Dieses zeigt sich in der vorliegenden Arbeit bei der Messung der gleichen Proteininteraktionen unter Verwendung unterschiedlicher Primärantikörper. Daher ist es auch nicht in allen Fällen möglich, die absolute Anzahl an PLA-Signalen direkt miteinander zu vergleichen.

Beispielsweise liegt bei der Antikörperkombination EDC4_{rb}:XRN1_{ms} die Zahl der *Spots* im Median ohne IL-1 Stimulation bei 60. Bei Untersuchung dieser Proteininteraktion

mittels anderer Primärantikörper gegen die gleichen Proteine (EDC4_{gt}:XRN1_{rb}), ergab sich aber im Median eine Anzahl von 150 *Spots* pro Zelle. Dasselbe zeigte sich auch bei der Antikörperkombination von DCP1a und XRN1. Auch hier erfolgte bei denselben verwendeten Sekundärantikörpern bei der Verwendung der Primärantikörper von α -DCP1a_{rb}: α -XRN1_{ms} im Median 60 *Spots* während bei der Antikörperkombination von α -DCP1a_{ms}: α -XRN1_{rb} im Median 80 *Spots* pro Zelle aufweist.

Auch bei den Negativkontrollen ergaben sich Unterschiede, allerdings auf sehr niedrigem Niveau. Im Median zeigten die Antikörperkontrollen von EDC4_{gt} 6 *Spots* und von EDC4_{rb} 1 *Spot* pro Zelle, während es im Median pro Zelle 9 PLA-Signale bei XRN1_{rb} und 3 *Spots* bei XRN1_{ms} waren. Insgesamt zeigte sich daher, dass die absoluten Zahlen der Proteininteraktionen bei Verwendung verschiedener Primär- oder Sekundärantikörper nicht inter-experimentell direkt miteinander verglichen werden sollten.

Bei wiederholten Versuchen sowie variierten Antikörperkombinationen fiel auf, dass die vermehrten *Spots* auch häufig durch den Sekundärantikörper PLA-*Probe anti-Goat* verursacht werden, vermutlich aufgrund vermehrter unspezifischer Bindungen und hierdurch erhöhter Anzahl an PLA-Signalen.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zum Teil an unterschiedlichen Fluoreszenzmikroskopen aufgenommen. Dabei wurde festgestellt, dass Unterschiede in der Gesamtspotanzahl zwischen den so generierten Wiederholungen der Experimente abhängig vom Mikroskop auftreten können. Exemplarisch ist die Interaktion der Proteine DCP1a und XRN1 aufzuzeigen. Bei der Antikörperkombination DCP1a_{rb}:XRN1_{ms} zeigte sich in den Versuchen am DMIRE2 Fluoreszenzmikroskop im Median 100 Signale pro Zelle. Bei derselben Untersuchung dieser Proteininteraktion bei gleicher Antikörperkombination wurden durch die bessere Auflösung und die lichtstärkere Kamera des Leica DMi8 Mikroskops im Median 150 Signale pro Zelle detektiert. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die mikroskopisch detektierten *Decapping* Komplexe in einer Zelle von der Auflösung des Mikroskops abhängig sind. So wäre es möglich, dass kleinere *Decapping* Subkomplexe existieren, welche eine vergleichbare Funktion wie *P-bodies*, jedoch nicht deren Größe aufweisen, und daher bei weniger sensitiven Mikroskopen nicht detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Methode des *Proximity Ligation Assays* sehr sensitiv ist, aber ihre Präzision sowohl vom verwendeten Primär- als auch Sekundärantikörper abhängt und zudem die Auflösung des Mikroskops eine wichtige Rolle spielt.

5.2 Der Einfluss von IL-1 auf die Ausbildung von *P-bodies* und auf die Expression von *P-body* Komponenten

P-bodies sind zytoplasmatische, dynamische Foci aus Ribonukleoproteinen (RNPs) und untranslatierter mRNA. Die Bildung dieser Granula kann bei Stress von der Zelle durch beispielsweise signalabhängige Modifikationen reguliert werden (Rzeczkowski et al., 2011). Vermutlich stellen *P-bodies* dynamische mRNA-Speicherorte für wichtige, spezifische Proteine dar, deren schnelle Transkriptions-unabhängige Expression auf eine veränderte Bedingung unerlässlich ist (Hubstenberger et al., 2017). Diese Vermutung wird durch Beobachtungen unterstützt, nach denen Glukoseentzug, osmotischer Stress und UV-Strahlung dazu führen, dass *P-bodies* in ihrer Zahl und Größe variieren (Teixeira et al., 2005).

Wie eingangs erwähnt, war durch vorherige Experimente bereits bekannt, dass durch die IL-1 Stimulation die Zahl der *P-bodies* in HEK293IL-1R Zellen global ansteigen kann (Rzeczkowski et al., 2011). Diese Beobachtung konnte in dieser Dissertation in HeLa-Zellen so nicht bestätigt werden. Bei dem statistischen Test der Subgruppen zeigte sich keine Signifikanz unter den stimulierten und unstimulierten Zellen.

In dieser Arbeit wurde nicht nur die Anzahl an *P-bodies* in der indirekten Immunfluoreszenz vermessen, sondern die PLA wurde auch genutzt, um die Expression und subzelluläre Verteilung der *P-body* Proteine durch die Verwendung von zwei gegen das gleiche Protein gerichteten Antikörpern zu erfassen. Hierbei zeigte sich, dass der größte Anteil der in der PLA messbaren *P-body* Faktoren außerhalb von *P-bodies* lokalisiert war (Aizer et al., 2008, Jonas and Izaurralde, 2013, Leung and Sharp, 2013). Außerdem zeigten sich auffällige Unterschiede in der Gesamtanzahl an PLA-Signalen für bestimmte *P-body* Proteine.

Dieses war besonders deutlich für DCP1a der Fall. Wie zuvor erläutert, besteht die Struktur des DCP1a aus einem C-terminalen Ende, welches sich aus drei antiparallelen α -Helices zusammensetzt (TD-Region). Diese α -Helices ermöglichen DCP1a eine Trimerisierung und hierdurch die Entstehung des *Decapping* Komplexes und

Interaktion mit DCP2 und EDC4 (Chang et al., 2014). Die Trimerisierung ist essenziell bei eukaryotischen Zellen für die Aktivität von DCP2 und damit des *Decappings*. Durch die PLA Methode mittels der Antikörper DCP1a_{ms}:DCP1a_{rb} wird DCP1a detektiert. Es zeigte sich nur ein geringer Anstieg des DCP1a Proteins nach der IL-1 Stimulation, welcher nicht signifikant war. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Westernblot Analysen überein (siehe Abbildung 4.1.1). Offenbar wird DCP1a durch IL-1 über eine veränderte Phosphorylierung und nicht über eine veränderte Proteinexpression reguliert (Rzeczkowski et al., 2011)

Durch die sehr hohe Zahl der Signale bei der Detektion von DCP1a, liegt die Vermutung nahe, dass mittels der Antikörper nicht nur die Proteinexpression erfasst wird, sondern auch die Trimerisierung des Proteins. Zudem wird ersichtlich, dass DCP1a nicht nur in den *P-body* Komplexen lokalisiert, sondern auch zu einem großen Teil im Zytoplasma.

Bei der Detektion der Expression von XRN1 auf Einzelzellebene mittels PLA zeigte sich bei der Stimulation mit IL-1 keinerlei Unterschiede zur unstimulierten Kontrollgruppe. Das Ergebnis konnte mittels des Westernblots nochmals verifiziert werden: hier zeigte sich bei der densitometrischen Auswertung des Proteins XRN1 ein gleichbleibender gesamter Proteinlevel in der Zelle nach Stimulation.

Die Detektion des Proteins EDC4 in der PLA zeigte nach der Stimulation mit IL-1 einen diskreten signifikanten Anstieg der Proteinexpression. Bei der Untersuchung der Proteinmenge von EDC4 im durchgeführten Westernblot zeigte sich dieser Anstieg des gesamten Proteinlevels nach IL-1 Stimulation nicht. Möglicherweise kann durch die Methode der PLA die Zunahme der Proteinmenge feiner quantifiziert und besser detektiert werden, als mittels des Westernblots.

5.3 Die PLA zur Erfassung der Ausbildung von Heterodimeren der *P-body* Faktoren

Bei der Antikörperkombination von EDC4:XRN1 in der PLA stieg die Zahl der Proteininteraktionen nach 1 h IL-1 Stimulation leicht, jedoch signifikant an (siehe Abbildung 4.4.2). Dieses ist möglicherweise spezifisch, da ein analoger Effekt für die DCP1a:EDC4 oder DPC1a:XRN1-Interaktionen nicht beobachtet wurde. Eine mögliche Erklärung wäre, dass IL-1 dafür sorgt, dass EDC4 vermehrt mit der Exoribonuklease XRN1 interagiert und diese aus dem Zytoplasma rekrutiert, um bestimmte IL-1-

abhängige induzierte mRNAs auch wieder abzubauen. In diesem Fall könnte der induzierbare Anteil der EDC4:XRN1 Komplexe eine Rolle bei der typisch zu beobachtenden transienten Expression IL-1 induzierter mRNAs übernehmen (Bandman et al., 2002, Holtmann et al., 1999, Weber et al., 2010, Winzen et al., 1999).

Eine weitere Erklärung der signifikant steigenden Zahl der Proteininteraktion von EDC4 und XRN1 ergibt sich aus dem Strukturmodell des humanen *Decapping* Komplexes, wie es von Chang et al. 2014 vorgestellt wurde. Hierbei kommt es durch die Konformationsänderung des *Decapping* Komplexes von einer offenen zu einer geschlossenen, aktiven Form über die Interaktion von DCP1 und DCP2 mittelbar ebenfalls zu einer Zunahme der Interaktion von EDC4 und XRN1. EDC4 spielt hierbei eine entscheidende Rolle als *scaffold* oder Gerüst Protein, um die Wechselwirkung von DCP1, DCP2 und XRN1 zu vermitteln (Bandman et al., 2002). Dieses ist auch evolutionär gesehen interessant, da EDC4 im Menschen, aber nicht in der Hefe vorkommt, und somit als zusätzlicher *P-body* Faktor in Säugern im Laufe der Evolution neue Funktionen bei der Regulation von mRNA übernommen hat (Braun et al., 2012, Jonas and Izaurralde, 2013).

5.4 Regulation der *P-body* Bildung durch *liquid-liquid phase separation* abhängige Prozesse

Nahezu alle zytoplasmatischen Ribonukleoprotein Granula inklusive der Stress-Granula und *P-bodies* verfügen über keine für eine Zellorganelle typische Lipiddoppelmembran (Lin et al., 2015). Somit besitzen diese Granula keine definierte Abgrenzung zum Zytoplasma der Zelle. Nach den neusten Erkenntnissen geht man davon aus, dass sowohl *P-bodies* als auch Stress-Granula die Eigenschaft eines Flüssigkeitstropfens besitzen (Banani et al., 2017). Somit sind sie in der Lage, einen sogenannten *liquid-liquid phase separation (LLPS)* Mechanismus zu nutzen, um ihre Formation zu koordinieren (Uversky, 2017). Die dynamischen Änderungen der Granula Struktur und Lokalisation hängen dabei von Protein:Protein-Interaktionen, Protein:mRNA-Interaktionen sowie den Kontaktflächen dieser Komplexe Faktoren aus dem Zytoplasma ab (Dundr and Misteli, 2010).

Auf Proteinebene spielen für Bildung der Granula sogenannte *intrinsically disordered regions* (IDRs), Proteinfragmente, *low-complexity sequences* und *short linear motifs* (SLiMs) eine zentrale Rolle (Riback et al., 2017).

Viele *P-body* Proteine, beispielsweise ein Großteil der *Decapping*-Faktoren besitzen sogenannte IDRs und SLiMs (Jonas and Izaurralde, 2013).

Diese *Decapping*-Aktivatoren DCP2, DCP1a haben einen ähnlichen Aufbau und gemeinsame Strukturmerkmale: so besitzen sie eine globulär gefaltete Domäne mit einer konstanten Region, welche häufig von Domänen geringer Komplexität flankiert wird oder zwei konstante Regionen miteinander verbindet (Jonas and Izaurralde, 2013). Diese konstanten Regionen sind konserviert, während sich die Sequenz und Länge der Domänen mit geringer Komplexität zwischen Eukaryonten ändern kann. Letztere beinhalten die IDRs und SLiMs, welche neueren Studien zufolge grundlegende Funktionen erfüllen: Zunächst ermöglichen die SLiMs Regionen die Bindung an die gefalteten Domänen ihrer spezifischen Partner (Luo et al., 2018) und ferner können sie die lokale Akkumulation von mRNA Regulatoren, *Decapping*-Aktivatoren und mRNA fördern (Eulalio et al., 2007a).

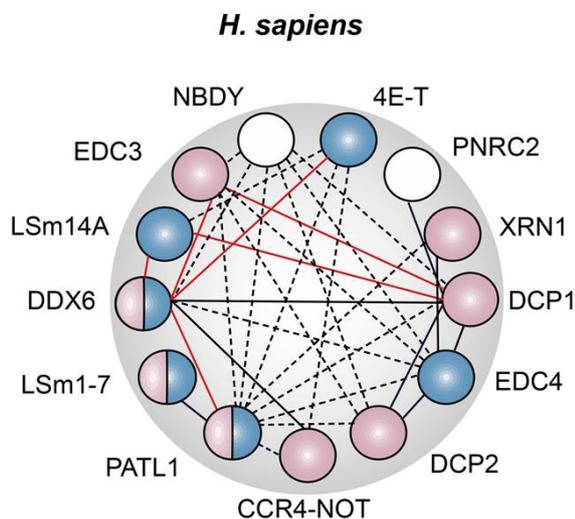


Abbildung 5.4.1 Experimentell bestätigte direkte und indirekte Interaktionen zwischen verschiedenen *P-body* Komponenten.

Die blau eingezeichneten Proteine sind wichtig für die Bildung und Assemblierung von *P-bodies*. Die rosa gekennzeichneten Faktoren interagieren direkt mit mRNAs. Durchgezogene schwarze Linien zeigen eine direkte Interaktion zwischen diesen Proteinen. Die gestrichelten Linien deuten auf eine mögliche indirekte Interaktion hin, während die roten Linien sich gegenseitig ausschließende Interaktionen anzeigen. (Luo et al., 2018) (Erlaubnis zur Reproduktion: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.7b01162>, 09.03.2020)

Ein weiteres Argument für die Funktion der *liquid-liquid phase separation* bei der *P-body* Assemblierung, ist der bereits durch *Live Cell Imaging* in der Fluoreszenzmikroskopie beschriebene dynamische Charakter der *P-bodies* (Andrei et al., 2005), welcher einen schnellen Austausch von *P-body* Komponenten und mRNA mit dem Zytoplasma nahelegt (Kedersha et al., 2005). Zusätzliche Forschungsergebnisse zeigen bei der Beobachtung der Dynamik von *P-bodies*, dass diese eine kugelförmige Form besitzen, die ähnlich wie bei einem Tropfen einer Flüssigkeit für eine ausreichende Oberflächenspannung sorgt (Kroschwald et al., 2015). Ferner konnte gezeigt werden, dass zwei *P-bodies* miteinander verschmelzen können und ihre kugelförmige Morphologie danach weiter aufrecht erhalten oder sofort wieder einnehmen (Luo et al., 2018). Überdies konnte mithilfe von Hexanediol, einem Alkohol, welches schwache Wechselwirkungen zwischen Molekülen stört und in dieser Studie als Indikator für *LLPS* verwendet wurde, gezeigt werden, dass dies zur reversiblen Auflösung von *P-bodies* führt in Hefezellen *in vivo* (Kroschwald et al., 2015).

Diese neuen Erkenntnisse bieten eine Erklärungsmöglichkeit der in dieser Arbeit erhobenen Befunde, nach denen viele der detektierten Protein:Protein-Interaktionen von *Decapping* Komplexen hauptsächlich außerhalb von *P-bodies*, im Zytoplasma, aufzufinden sind (Aizer et al., 2008, Jonas and Izaurralde, 2013, Leung et al., 2006). Durch die Dynamik der *P-body* Komponenten ist es vorstellbar, dass diese Proteine schnell die *P-bodies* verlassen oder gerade erst aus dem Zytoplasma rekrutiert werden. Die mikroskopischen Untersuchungen erforderten eine Fixierung der Zellen und die in der PLA Analyse erfassten Proteininteraktionen, müssen daher vor allem als eine "Momentaufnahme" des aktuellen zellulären Zustands gewertet werden (Aizer et al., 2008, Andrei et al., 2005, Leung et al., 2006, Kedersha et al., 2005).

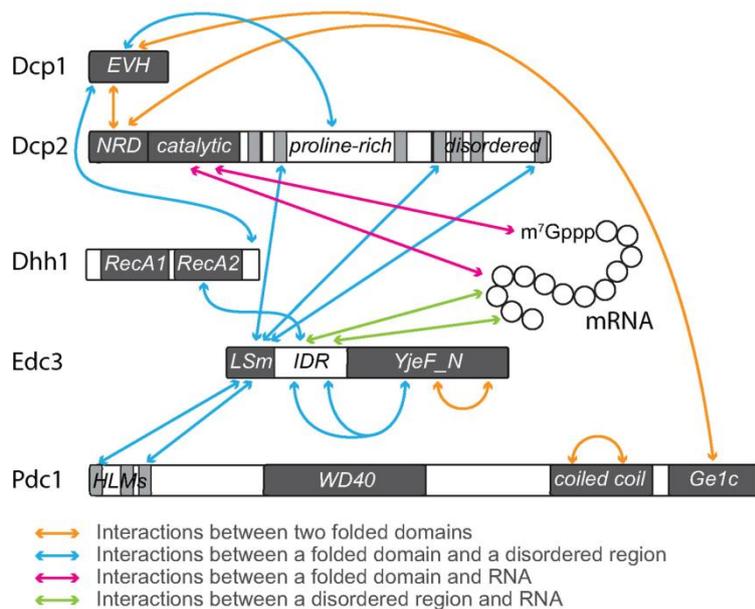


Abbildung 5.4.2 Inter- und intramolekulare Wechselwirkungen für den LLPS. Die Linien geben die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen wieder, welche für die Ausbildung des LLPS essenziell sind. Diese fördern die Ausbildung von LLPS durch Protein:Protein Wechselwirkung zwischen den IRDs Regionen und mRNA (Schutz et al., 2017) (Lizenznummer: 4644720136209)

Eine weitere Erklärung für die teilweise beobachtbare partielle Überlagerung der PLA-Interaktionssignale mit denen der *P-body* Signale ergibt sich aus den Größenverhältnissen der hier untersuchten molekularen Komplexe. *P-bodies* weisen eine ungefähre Größe von ca. 150-340 nm auf (Aizer et al., 2008, Cougot et al., 2012, Eulalio et al., 2007a, Hubstenberger et al., 2017, Souquere et al., 2009). Die maximale Entfernung zur Bildung eines PLA-Spots zwischen zwei interagierenden Proteinen beträgt weniger als 30-40 nm, eingeschlossen der Größe der verwendeten Antikörper und der konjugierten Oligonukleotide, (Soderberg et al., 2006). So kann es möglicherweise dazu kommen, dass, wenn die zu untersuchenden Proteine tatsächlich miteinander interagieren, aber an den äußeren Bereichen der *P-bodies* lokalisiert sind, die Distanz zwischen ihnen so groß ist, dass kein PLA-Signal zustande kommt.

Wie bereits erwähnt, zeigten die Versuchsergebnisse, dass die *Decapping*-Faktoren sowie die Exoribonuklease XRN1 größtenteils außerhalb von *P-bodies* im Zytoplasma lokalisiert sind. Daher könnte der größte Anteil des mRNA-Abbaus tatsächlich außerhalb von *P-bodies* erfolgen. Diese Annahme wird durch neuere Studien zunehmend unterstützt. So konnte mittels eines neu entwickelten fluoreszierenden Biosensors, welcher in lebenden Zellen den mRNA-Abbau detektiert, gezeigt werden, dass innerhalb von *P-bodies* kein mRNA-Abbau stattfindet (Horvathova et al., 2017).

Auch andere Studien in Hefezellen legten die Vermutung nahe, dass die Funktion der *P-bodies* eher darin besteht, ein (transienter) Speicherort für *Decapping* und Abbaufaktoren zu sein, welche dann bei Bedarf ins Zytoplasma umverteilt werden, um dort einen vermehrt anfallenden Bedarf an mRNA-Abbau zu bewerkstelligen (Huch and Nissan, 2017). Weiterhin werden in *P-bodies* nicht nur die Proteinfaktoren des *Decappings* / mRNA-Abbaus gespeichert (oder auch sequestriert), sondern auch die mRNAs selbst. Dieses ermöglicht den Zellen, „wertvolle“ mRNAs in Stresssituationen vorübergehend in ein inaktives Zellkompartiment zu translozieren und nach Überleben der Stresssituation diese wieder schnell der energieintensiven Translation zuzuführen, ohne dass die mRNA neu über Transkriptionsprozesse gebildet werden muss (Hubstenberger et al., 2017, Parker and Sheth, 2007, Standart and Weil, 2018). Für die genauere Bestätigung der pathophysiologischen Relevanz dieser Theorien wären hochauflösende *Live Cell Imaging* Untersuchungen mit modernen mikroskopischen Techniken vor allem auch in pathologisch veränderten Zell- oder Organsystemen notwendig (Chen et al., 2018, Chu et al., 2020, Khater et al., 2020).

5.5 Detektion von *P-bodies* und die Lokalisation der *P-body* Komponenten

Bei der Untersuchung der Proteininteraktionen von *P-body* Komponenten mittels des Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assays* (IF-PLA) wurden systematisch die heteromeren Protein:Protein-Komplexe von EDC3, DCP1a, DCP2 und XRN1 in Relation zu EDC4-positiven *P-bodies* unter der Verwendung von verschiedenen Antikörperkombinationen analysiert. Eine derartige Analyse war zum Zeitpunkt der Dissertation in der Literatur nicht vorhanden.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass (im Vergleich zu der PLA gegen dieselben Faktoren) eine kleinere Anzahl an *P-body* Komponenten konstitutiv im Zytoplasma als Heterodimere miteinander interagiert. Global sind diese Interaktionen in HeLa-Zellen nicht durch IL-1 reguliert, allerdings zeigen sich Unterschiede der Zytokinresponsivität innerhalb der jeweiligen untersuchten Zellpopulationen.

Dies wird vor allem bei der verfeinerten Analyse anhand der *P-body* Zahl pro Zelle in 0 *P-bodies*, 1-5 *P-bodies*, 6-10 *P-bodies*, 11-15 *P-bodies* und >15 *P-bodies* am deutlichsten. Innerhalb der Zellpopulation verschiebt sich nach 30 min IL-1 Stimulation

die prozentuale Verteilung der *P-bodies* pro Zelle nach oben, auch wenn dieses nicht signifikant ist.

Mittels der Translokation von NFκB p65 konnte gezeigt werden, dass HeLa-Zellen nicht homogen auf die Stimulation reagieren und nur ein gewisser Prozentsatz (ca. 50-60% der Zellen) auf die IL-1 Stimulation reagierten (siehe Kapitel 4.6).

So könnte man annehmen, dass die *P-body* Komponenten nach der IL-1 Stimulation sich in ihrer Zusammensetzung ändern, dies jedoch nicht detektiert werden konnte, da in den durchgeführten Versuchen keine Unterscheidung zwischen den inhomogen reagierenden Zellen gemacht wurde. Deshalb sollten die Untersuchungen zusätzlich unter der Kontrolle der Reaktivität der Zellen auf Stimulus erfolgen, beispielsweise durch die NFκB p65 Translokation in den Zellkern.

Die Analyse von *P-bodies* in Studien hatte gezeigt, dass in Hefezellen die *P-body* Assemblierung von mehreren Faktoren abhängig ist. Zum einen sind es die diversen Protein:Protein-Interaktion sowie die Protein:mRNA-Interaktion, welche zur Assemblierung eines *P-bodies* beitragen (Chowdhury et al., 2014, Rajyaguru et al., 2012, Schwartz et al., 2003).

Zum anderen zeigen neueste Arbeiten, dass EDC4 als *scaffold* Protein für die Ausbildung von *P-bodies* wichtig ist. So konnten in der Arbeitsgruppe Kracht durchgeführte Versuche mittels eines CRISPR/Cas9-vermittelten *knockdowns* von EDC4 zeigen, dass dies zur einer nahezu kompletten Auflösung der *P-body*-Assemblierung führt (Tenekeci et al., 2016). Dies verifiziert die in vorangegangenen Arbeiten gezeigten Daten, nach denen die siRNA-vermittelte Depletion von EDC4 zur Aufhebung der *P-body* Strukturen führt (Seto et al., 2015). Offenbar dient auch eine Wechselwirkung zwischen mRNA und dem DCP1a:DCP2 *Decapping* Komplex sowie den *scaffold* Proteinen EDC3 und Pdc1 zur Ausbildung von *P-bodies in vitro* (Schutz et al., 2017). *In-vitro* Versuche haben ergeben, dass die *LLPS* dafür sorgt, dass die enzymatische Aktivität von DCP1a:DCP2 *Decapping* herunter reguliert wird und die mRNA vor dem Abbau geschützt wird (Schutz et al., 2017). Dieses Ergebnis impliziert, dass die Rolle der *P-bodies* eher in einer vorübergehenden Speicherung von mRNAs sowie *Decapping* und mRNA-Abbau Komplexen besteht.

Zur Ausbildung von *P-bodies* ist die IDR Region von EDC3 von großer Bedeutung, da diese sowohl für die Interaktion von mRNA-*Decapping*-Faktoren wichtig ist, als auch für die Interaktion mit der mRNA.

Bei der Betrachtung der Abbildung der inter- und intramolekularen Wechselwirkungen zeigt sich dieses möglicherweise auch in den PLA Ergebnissen.

Die Zahl der Interaktionen zwischen DCP1:DCP2 in der PLA beträgt im Median 218 pro Zelle. Bei der Detektion des Proteins DCP1a finden sich im Median 229 *Spots* pro Zelle. Dies würde darauf hindeuten, dass fast der gesamte Anteil des DCP1a Proteins innerhalb der Zelle in einem Komplex mit DCP2 vorliegt.

Die Untersuchung der Wechselwirkung von EDC3 und DCP1 ergibt dagegen im Median 121 Signale pro Zelle, obwohl diese, wie in Abbildung 5.4.2 gezeigt, keine direkten intermolekularen Wechselwirkungen untereinander besitzen sollten.

Dieses kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass DCP1 meistens in einem Komplex mit DCP2 in der Zelle anzutreffen ist und dieses indirekt eine räumliche Nähe zu EDC3 ermöglicht, allerdings nur für eine Subgruppe aller DCP2:DCP1a Komplexe (Chang et al., 2014, Jonas and Izaurralde, 2013, Valkov et al., 2016). Dementsprechend finden sich in der PLA auch eine vergleichsweise hohe Anzahl an EDC3:DCP1a Signalen in der PLA (Aumiller and Keating, 2016, Fromm et al., 2014, Schutz et al., 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *Decapping* Komponenten hauptsächlich im Zytoplasma und nicht in *P-bodies* zu finden sind und somit auch die Interaktion zwischen den *Decapping*-Proteinen mittels der PLA zum Großteil zur Detektion dieser Subkomplexe außerhalb der *P-bodies* geführt hat. Während der Untersuchung der Interaktionen zwischen den *Decapping*-Proteinen zeigte sich keine signifikante IL-1 abhängige Änderung der genannten Interaktionen, mit der Ausnahme von EDC4:XRN1 Komplexen. Letzterer Befund könnte auf eine spezifisch gesteigerte *Decapping* / Exonuklease Aktivität in der IL-1 Antwort oder in anderen Entzündungsreaktionen hindeuten und es wäre daher interessant, diese Befunde gezielter mit weiteren Methoden in anderen (Modell) Systemen zu überprüfen.

5.6 Die Einfluss einer Coronavirus Infektion auf die *P-body* Elemente

Exemplarisch wurde in dieser Arbeit auch noch der Einfluss einer Stresssituation durch eine Infektion mit RNA-Viren auf die *P-body* Assemblierung und die Interaktion von *P-body* Faktoren untersucht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion von Zellen durch das HCoV-229E dazu führt, dass die Zahl der detektierten Interaktionen von XRN1 und EDC4 signifikant reduziert wird und dieses mit einer Störung der Ausbildung von *P-bodies* einhergeht. Diese Daten validieren damit die Fähigkeit von PLA Assays, solche biologisch relevanten und drastischen Veränderungen der *P-bodies* / *P-body* Faktoren zu erfassen.

Eine Reihe von Erklärungsmöglichkeiten kommt für die Virus-induzierten Änderungen im *P-body* System in Frage. So wäre eine Überlegung, dass während einer Infektion der Zellen mit dem Coronavirus die *P-body* Assemblierung verhindert wird, weil voll funktionsfähige *P-bodies* / *P-body* Faktoren vielleicht zum Abbau der viralen mRNAs beitragen. In diesem Fall hätten *P-bodies* / *P-body* Faktoren eine wie auch immer geartete antivirale Funktion. So führt eine Infektion einer Zelle mit dem West-Nil-Virus (WNV) zu einem Rückgang der *P-body* Zahlen (Emara and Brinton, 2007). Eine weitere Studie zeigte bei der genauen Analyse, dass die Infektion mit dem WNV in HeLa-Zellen zur Folge hat, dass die Proteine Lsm1, GW182, DDX3, DDX6 und XRN1 aus *P-bodies* an Virusreplikationszentren rekrutiert wurden (Chahar et al., 2013). Welche Funktion diese Proteine für die Replikation des Virus haben könnten, ist bisher ungeklärt.

Eine weitere Hypothese wäre, dass die Zahl der Interaktionen von EDC4 und XRN1 sinkt, weil beide oder eines der Proteine durch die Infektion abgebaut werden und hierdurch eine Ausbildung von *P-bodies* beeinträchtigt wird.

Da bereits in anderen Studien gezeigt wurde, dass EDC4 als *scaffold* Protein eine essenzielle Rolle für die Ausbildung und Formation von *P-bodies* spielt (Braun et al., 2012, Chang et al., 2014), hätte auch der Abbau von EDC4 in den Zellen, eine signifikante Senkung der *P-body* Zahlen zur Folge.

Dementsprechend zeigten präliminäre Westernblot Untersuchungen in zwei unterschiedlichen Zelllinien eine (schwache) Reduktion der EDC4 Proteinmenge

sowohl in den HeLa als auch in HUH7 Zellen. Möglicherweise ist dieses durch einen Virus-induzierten Abbau bedingt. Alternativ könnte die Synthese von EDC4 reduziert sein.

Die Annahme, dass das Coronavirus beispielsweise einen Abbau von Proteinen in den Zellen auslöst, wäre jedoch vergleichbar mit dem Poliovirus (ebenfalls ein Plus-Strang RNA-Virus), welches nach der Infektion einer Zelle eine Virus-induzierte Spaltung von DCP1a mittels einer Virusprotease verursacht und zusätzlich einen Proteasom induzierten Abbau von XRN1 und PAN3 bewirkt (Dougherty et al., 2011). So wäre denkbar, dass Coronaviren ebenfalls in der Lage sind, bestimmte Proteine der *P-body* Komplexe abzubauen und hierdurch die Zahl der Interaktionen von EDC4 und XRN1 nach einer Infektion zu senken.

Die Ergebnisse der nur einmalig gegen Ende der experimentellen Arbeiten durchgeführten Westernblots bedürfen jedoch einer genauen Überprüfung, da frühere in der Arbeitsgruppe mehrfach durchgeführten Versuche zeigen konnten, dass es durch die Infektion von HeLa oder HUH7 Zellen mit HCoV-229E zur keiner Degradierung der Proteine EDC4 und XRN1 kommt (Poppe, 2017). Jedoch wurde eine Virus-vermittelte Dephosphorylierung von EDC4 am Serin 741 beobachtet, deren Funktion unbekannt ist (Poppe, 2017).

Möglicherweise führt diese Dephosphorylierung von EDC4 am Serin 741 zu einer Konformationsänderung des Proteins und reduziert so die Interaktion mit XRN1. So könnte die in dieser Arbeit beobachtete signifikante Abnahme der Interaktion von EDC4 und XRN1 nach der Infektion der Zellen erklärt werden.

Eine phosphorylierungsabhängige Änderung der Proteinkonformation von EDC4 könnte z.B. mittels NMR-Spektroskopie *in vitro* untersucht werden.

Weiterhin wäre es wichtig, in Coronavirus-infizierten Zellen die anderen heterodimeren Interaktionen von *P-body* Faktoren mit den hier gezeigten PLA Techniken zu untersuchen und die globale *Decapping* Aktivität der Zellen mittels immunpräzipitierten DCP2 Komplexen *in vitro* zu quantifizieren (Rzeczkowski et al., 2011), um die Effekte der RNA-Virusinfektion auf das *P-body* System besser verstehen zu können.

6 Zusammenfassung/ *Abstract*

6.1 Zusammenfassung

Processing bodies (P-bodies) sind rundliche, membranlose, zytoplasmatische Ribonukleoprotein-Strukturen, welche *Decapping* Komplexe, Komponenten des 5'-3' mRNA-Abbaus sowie untranslatierte mRNA enthalten. Durch das Zytokin Interleukin (IL)-1 kommt es innerhalb einer Zelle zur Aktivierung einer IL-1 induzierten proinflammatorischen Signalkaskade, bestehend aus den NFκB, JNK und p38 MAP Kinase Signalwegen gefolgt von einer Reprogrammierung der Genexpression, die zur NFκB-induzierten mRNA Expression von Zytokinen (IL-6), Chemokinen (IL-8), sowie IκBα, dem negativen Regulator von NFκB, führt. In dieser Arbeit wurde durch die kürzlich in der Arbeitsgruppe etablierte Methode des Immunfluoreszenz-*Proximity-Ligation-Assays* untersucht, ob IL-1 einen Einfluss auf die Proteininteraktionen der *Decapping* Komplexe ausübt und wie diese sich zur der Anzahl an *P-bodies* verhalten. Es zeigte sich, dass in humanen epithelialen HeLa Karzinomzellen ein Großteil der *Decapping*-Faktoren in Subkomplexen außerhalb der *P-bodies* lokalisiert ist und nur ein sehr kleiner Teil dieser Proteine sich zu einem gegebenen Zeitpunkt in *P-bodies* befindet. Darüber hinaus konnte durch IL-1 mittels der PLA eine signifikante Zunahme der EDC4 Proteinexpression auf Einzelzellebene beobachtet werden. Die dimeren Interaktionen von DCP1a, DCP2, EDC4, EDC3 und XRN1 waren konstitutiv nachweisbar und bis auf die Interaktion von EDC4 und XRN1 nicht IL-1 reguliert. Dagegen führte eine Infektion der Zellen mit dem humanen Coronavirus 229E (HCoV-229E) zu einer Reduktion der Interaktion von EDC4 und XRN1 auf Einzelzellebene. Insgesamt zeigte sich durch die Stimulation mit IL-1 keine signifikante Zunahme der *P-bodies*. Eine inhomogene Reaktion der HeLa-Zellen auf IL-1 fand sich auch hinsichtlich der Aktivierung des NFκB Signalwegs, da nur ca. 50-60% der Zellen eine nukleäre Translokation von p65 NFκB aufwiesen. Zusammenfassend zeigen diese systematischen Analysen, dass eine Reihe an Antikörper Kombinationen geeignet sind, um die verschiedenen Protein:Protein Interaktionen von *P-body* Komponenten auf dem endogenen Expressionslevel in einzelnen Zellen sensitiv und spezifisch nachzuweisen. Da der größte Teil dieser Komplexe ausserhalb von *P-bodies* lokalisiert ist, unterstützen diese Daten zudem das Modell, nach dem *P-bodies* Speicher- und nicht Abbauorte von mRNAs sind.

6.2 Abstract

Processing bodies (P-bodies) are round, membraneless, cytoplasmic ribonucleoprotein structures containing decapping complexes, components of the 5'-3' mRNA degradation pathway, and untranslated mRNA. The cytokine interleukin (IL)-1 results in the activation within a cell of an IL-1-induced proinflammatory signaling cascade consisting of the NF κ B, JNK, and p38 MAP kinase signaling pathways followed by reprogramming of gene expression leading to NF κ B-induced mRNA expression of cytokines (IL-6), chemokines (IL-8), and I κ B α , the negative regulator of NF κ B. In this work, the immunofluorescence proximity ligation assay method recently established in the group was used to investigate whether IL-1 exerts an influence on the protein interactions of the decapping complexes and how these relate to the number of P-bodies. It was shown that in human epithelial HeLa carcinoma cells, the majority of decapping factors are localized in subcomplexes outside P-bodies and only a very small fraction of these proteins are present in P-bodies at any given time. In addition, a significant increase in EDC4 protein expression at the single cell level was observed upon IL-1 treatment using the PLA. The dimeric interactions of DCP1a, DCP2, EDC4, EDC3, and XRN1 were constitutively detectable and, except for the interaction of EDC4 and XRN1, were not IL-1 regulated. In contrast, infection of cells with human coronavirus 229E (HCoV-229E) resulted in a reduction in the interaction of EDC4 and XRN1 at the single cell level. Overall, stimulation with IL-1 did not produce a significant increase in P-bodies. An inhomogeneous response of HeLa cells to IL-1 was also found with respect to activation of the NF κ B signaling pathway, as only approximately 50-60% of cells exhibited nuclear translocation of p65 NF κ B. In summary, these systematic analyses demonstrate that a number of antibody combinations are suitable for sensitive and specific detection of the various protein:protein interactions of P-body components at the endogenous expression level in single cells. Furthermore, since the majority of these complexes localize outside of P-bodies, these data support the model that P-bodies are storage rather than degradation sites of mRNAs.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	anti-
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	<i>adenin rich elements</i> , Adenin-reichen Regionen
BSA	Rinder-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
DAMP	<i>damage associated molecular patterns</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunden
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt solution</i> , Hank's Puffer
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
kD	Kilodalton
l	Liter
LLPS	<i>liquid-liquid phase separation</i>
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Anzahl der Zellen
N	Anzahl der Versuche
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunden
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle

TBS	„Tris buffered saline“
TBST	TBS mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
x g	Erdbeschleunigung

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.4.1 Prinzipielle Schritte des mRNA-Abbaus (Parker and Sheth, 2007).	6
Abbildung 1.7.1 Schematische Darstellung des humanen <i>Decapping</i> Komplexes und seiner Interaktionen mit EDC4 und XRN1 (Chang et al., 2014).....	10
Abbildung 1.7.2 Schematische Domänen-Struktur der <i>P-body</i> -Komponenten DCP2, DCP1, EDC4 und XRN1. (Chang et al., 2014).	11
Abbildung 3.2.1 Bildliche Darstellung der Funktionsweise des <i>Proximity Ligation</i> <i>Assay</i>	28
Abbildung 4.1.1 Analyse des Einflusses von IL-1 auf die totalen Proteinlevel von <i>P-</i> <i>body</i> Komponenten.	37
Abbildung 4.2.1 Indirekte Triple-Immunfluoreszenz zur Detektion von <i>P-bodies</i>	39
Abbildung 4.2.2 Quantifizierung der Regulation von <i>P-bodies</i> nach IL-1 Stimulation.	40
Abbildung 4.3.4.31 Detektion der Expression von EDC4, XRN1 und DCP1a nach IL-1 Stimulation mittels <i>Proximity Ligation Assays</i>	43
Abbildung 4.3.2 Quantifizierung der Expression von XRN1, EDC4 und DCP1a auf Einzelzebene.	44
Abbildung 4.4.1 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von <i>Decapping-</i> Faktoren nach IL-1 Stimulation.	47
Abbildung 4.4.2 Detektion von Protein:Protein-Interaktionen von <i>Decapping-</i> Faktoren.	47
Abbildung 4.5.1 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von DCP1a _{ms} :XRN1 _{rb} Proteinkomplexen im Verhältnis zur der Lokalisation von EDC4-positiven <i>P-</i> <i>bodies</i>	49
Abbildung 4.5.2 Quantifizierung von DCP1a _{ms} :XRN1 _{rb} Komplexen und EDC4 _{gt} - markierten <i>P-bodies</i>	51
Abbildung 4.5.3. Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von EDC3 _{rb} :XRN1 _{ms} Proteinkomplexen im Verhältnis zur der Lokalisation von EDC4-positiven <i>P-</i> <i>bodies</i>	53
Abbildung 4.5.4 Quantifizierung von EDC3 _{rb} :XRN1 _{ms} Komplexen und EDC4 _{gt} - markierten <i>P-bodies</i>	54

Abbildung 4.5.5 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von EDC3 _{rb} :DCP1a _{ms} Proteinkomplexen im Verhältnis zur der Lokalisation von EDC4-positiven <i>P-bodies</i>	55
Abbildung 4.5.6 Quantifizierung von EDC3 _{rb} :DCP1a _{ms} Komplexen und EDC4 _{gt} -markierten <i>P-bodies</i>	57
Abbildung 4.5.7 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von DCP2 _{rb} :DCP1a _{ms} Proteinkomplexen im Verhältnis zur der Lokalisation von EDC4-positiven <i>P-bodies</i>	59
Abbildung 4.5.8 Quantifizierung von DCP2 _{rb} :DCP1a _{ms} Komplexen und EDC4 _{gt} -markierten <i>P-bodies</i>	61
Abbildung 4.5.9 Analyse der Protein:Protein-Interaktionen von DCP2 _{rb} :XRN1 _{ms} Proteinkomplexen im Verhältnis zur der Lokalisation von EDC4-positiven <i>P-bodies</i>	63
Abbildung 4.5.10 Quantifizierung von DCP2 _{rb} :XRN1 _{ms} Komplexen und EDC4 _{gt} -markierten <i>P-bodies</i>	64
Abbildung 4.5.11 Zusammenfassung der Anzahl an EDC4-markierten <i>P-bodies</i> über alle durchgeführten Experimente.	66
Abbildung 4.6.1 Kombination aus p65 NF-κB IF und PLA zum Nachweis einer EDC4:DCP1-Interaktion spezifisch in IL-1stimulierten Zellen.	69
Abbildung 4.6.2 Quantifizierung der PLA-Signale der kombinierten p65 NF-κB IF und EDC4:DCP1a in der PLA.	72
Abbildung 4.7.1 Einfluss der HCoV-229E Infektion auf die Interaktion von EDC4 _{gt} :XRN1 _{rb}	73
Abbildung 4.7.2 Quantifizierung Einfluss der HCoV-229E Infektion auf die Interaktion von EDC4 _{gt} :XRN1 _{rb}	74
Abbildung 4.7.3 Einfluss der HCoV-229E Infektion auf die Proteinspiegel von XRN1 und EDC4 in HuH7 und HeLa-Zellen.	75
Abbildung 4.7.4 Quantifizierung der XRN1 und EDC4 Proteinmenge.	76
Abbildung 5.4.1 Experimentell bestätigte direkte und indirekte Interaktionen zwischen verschiedenen <i>P-body</i> Komponenten.	82
Abbildung 5.4.2 Inter- und intramolekulare Wechselwirkungen für den <i>LLPS</i>	84

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Mitglieder der IL-1 Familie.....	2
Tabelle 2.1: Allgemeine Geräte	15
Tabelle 2.2: Zellkultur	15
Tabelle 2.3: Elektrophorese-, Westerblotting und Photographiesystem.....	16
Tabelle 2.4: Mikroskopie und Photometrie	16
Tabelle 2.5: Software und Programme	16
Tabelle 2.6: Zentrifugen	17
Tabelle 2.7: Puffer und Lösungen.....	17
Tabelle 2.8: Medien	18
Tabelle 2.9: Kits, gebrauchsfertige Reagenzien und Materialien	19
Tabelle 2.10: Marker.....	19
Tabelle 2.11: Primärantikörper für die Immunfluoreszenz.....	20
Tabelle 2.12: Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz	20
Tabelle 2.13: Primärantikörper für die PLA.....	21
Tabelle 2.14: Primärantikörper für den Westerblot.....	22
Tabelle 2.15: Sekundärantikörper für den Westernblot	22
Tabelle 2.16: Verwendete rekombinante Proteine	23
Tabelle 2.17: Verwendete Zelllinien	23
Tabelle 3.1 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele	32

10 Literaturverzeichnis

- AIZER, A., BRODY, Y., LER, L. W., SONENBERG, N., SINGER, R. H. & SHAVTAL, Y. 2008. The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Mol Biol Cell*, 19, 4154-66.
- ALMAZÁN, F., GALÁN, C. & ENJUANES, L. 2004. The Nucleoprotein Is Required for Efficient Coronavirus Genome Replication. *Journal of Virology*, 78, 12683-12688.
- ANDERSON, J. S. & PARKER, R. P. 1998. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J*, 17, 1497-506.
- ANDERSON, P. & KEDERSHA, N. 2009. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 430-6.
- ANDREI, M. A., INGELFINGER, D., HEINTZMANN, R., ACHSEL, T., RIVERA-POMAR, R. & LUHRMANN, R. 2005. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA*, 11, 717-27.
- AUMILLER, W. M. & KEATING, C. D. 2016. Phosphorylation-mediated RNA/peptide complex coacervation as a model for intracellular liquid organelles. *Nature Chemistry*, 8, 129-137.
- BAGGIOLINI, M., DEWALD, B. & MOSER, B. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol*, 55, 97-179.
- BANANI, S. F., LEE, H. O., HYMAN, A. A. & ROSEN, M. K. 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 285-298.
- BANDMAN, O., COLEMAN, R. T., LORING, J. F., SEILHAMER, J. J. & COCKS, B. G. 2002. Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. *Ann N Y Acad Sci*, 975, 77-90.
- BASHKIROV, V. I., SCHERTHAN, H., SOLINGER, J. A., BUERSTEDDE, J. M. & HEYER, W. D. 1997. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol*, 136, 761-73.
- BECKHAM, C. J. & PARKER, R. 2008. P bodies, stress granules, and viral life cycles. *Cell Host Microbe*, 3, 206-12.
- BORASCHI, D., ITALIANI, P., WEIL, S. & MARTIN, M. U. 2018. The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev*, 281, 197-232.
- BRAUN, J. E., TRUFFAULT, V., BOLAND, A., HUNTZINGER, E., CHANG, C. T., HAAS, G., WEICHENRIEDER, O., COLES, M. & IZAURRALDE, E. 2012. A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat Struct Mol Biol*, 19, 1324-31.
- BRENGUES, M., TEIXEIRA, D. & PARKER, R. 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*, 310, 486-9.
- BRIKOS, C., WAIT, R., BEGUM, S., O'NEILL, L. A. & 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. *Mol Cell Proteomics*, 6, 1551-9.
- BROOKS, S. A. & BLACKSHEAR, P. J. 2013. Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*, 1829, 666-79.

- CHAHAR, H. S., CHEN, S. & MANJUNATH, N. 2013. P-body components LSM1, GW182, DDX3, DDX6 and XRN1 are recruited to WNV replication sites and positively regulate viral replication. *Virology*, 436, 1-7.
- CHANG, C. T., 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 Res*, 42, 5217-33.
- CHANG, J. H., XIANG, S., XIANG, K., MANLEY, J. L. & TONG, L. 2011. Structural and biochemical studies of the 5'→3' exoribonuclease Xrn1. *Nat Struct Mol Biol*, 18, 270-6.
- CHEN, C. J., KONO, H., GOLENBOCK, D., REED, G., AKIRA, S. & ROCK, K. L. 2007. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*, 13, 851-6.
- CHEN, Y., LIU, W., ZHANG, Z., ZHENG, C., HUANG, Y., CAO, R., ZHU, D., XU, L., ZHANG, M., ZHANG, Y. H., FAN, J., JIN, L., XU, Y., KUANG, C. & LIU, X. 2018. Multi-color live-cell super-resolution volume imaging with multi-angle interference microscopy. *Nat Commun*, 9, 4818.
- CHOU, C. F., MULKY, A., MAITRA, S., LIN, W. J., GHERZI, R., KAPPES, J. & CHEN, C. Y. 2006. Tethering KSRP, a decay-promoting AU-rich element-binding protein, to mRNAs elicits mRNA decay. *Mol Cell Biol*, 26, 3695-706.
- CHOWDHURY, A., KALURUPALLE, S. & THARUN, S. 2014. Pat1 contributes to the RNA binding activity of the Lsm1-7-Pat1 complex. *RNA*, 20, 1465-75.
- CHU, C. C., PINNEY, J. J., WHITEHEAD, H. E., RIVERA-ESCALERA, F., VANDERMEID, K. R., ZENT, C. S. & ELLIOTT, M. R. 2020. High-resolution quantification of discrete phagocytic events by live cell time-lapse high-content microscopy imaging. *J Cell Sci*, 133.
- COUGOT, N., BABAJKO, S. & SERAPHIN, B. 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol*, 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. *J Mol Biol*, 420, 17-28.
- DAVID GERECHE, P. S., TAYLOR, M. A. & PORT, J. D. 2010. Intracellular localization and interaction of mRNA binding proteins as detected by FRET. *BMC Cell Biol*, 11, 69.
- DINARELLO, C., AREND, W., SIMS, J., SMITH, D., BLUMBERG, H., O'NEILL, L., GOLDBACH-MANSKY, R., PIZARRO, T., HOFFMAN, H., BUFLER, P., NOLD, M., GHEZZI, P., MANTOVANI, A., GARLANDA, C., BORASCHI, D., RUBARTELLI, A., NETEA, M., VAN DER MEER, J., JOOSTEN, L., MANDRUP-POULSEN, T., DONATH, M., LEWIS, E., PFEILSCHIFTER, J., MARTIN, M., KRACHT, M., MUEHL, H., NOVICK, D., LUKIC, M., CONTI, B., SOLINGER, A., KELK, P., VAN DE VEERDONK, F. & GABEL, C. 2010. IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol*, 11, 973.
- DINARELLO, C. A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87, 2095-147.
- DINARELLO, C. A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*, 27, 519-50.
- DINARELLO, C. A. 2010. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol*, 40, 599-606.
- DINARELLO, C. A. 2011. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117, 3720-32.

- DINARELLO, C. A. 2018. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*, 281, 8-27.
- DINARELLO, C. A., SIMON, A. & VAN DER MEER, J. W. 2012. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 11, 633-52.
- DOUGHERTY, J. D., WHITE, J. P. & LLOYD, R. E. 2011. Poliovirus-Mediated Disruption of Cytoplasmic Processing Bodies. *Journal of Virology*, 85, 64-75.
- DUNDR, M. & MISTELI, T. 2010. Biogenesis of nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a000711.
- EMARA, M. M. & BRINTON, M. A. 2007. Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9041-6.
- EULALIO, A., BEHM-ANSMANT, I. & IZAURRALDE, E. 2007a. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 9-22.
- EULALIO, A., BEHM-ANSMANT, I., SCHWEIZER, D. & IZAURRALDE, E. 2007b. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, 27, 3970-81.
- FENGER-GRON, M., FILLMAN, C., NORRILD, B. & LYKKE-ANDERSEN, J. 2005. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol Cell*, 20, 905-15.
- FRANKS, T. M. & LYKKE-ANDERSEN, J. 2007. TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev*, 21, 719-35.
- FRANKS, T. M. & LYKKE-ANDERSEN, J. 2008. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol Cell*, 32, 605-15.
- FROMM, S. A., KAMENZ, J., NOLDEKE, E. R., NEU, A., ZOCHER, G. & SPRANGERS, R. 2014. In vitro reconstitution of a cellular phase-transition process that involves the mRNA decapping machinery. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53, 7354-9.
- GAESTEL, M., KOTLYAROV, A. & KRACHT, M. 2009. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 480-99.
- GARLANDA, C., DINARELLO, C. A. & MANTOVANI, A. 2013. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39, 1003-18.
- GARNEAU, N. L., WILUSZ, J. & WILUSZ, C. J. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 113-26.
- GRAHAM, R. L., DONALDSON, E. F. & BARIC, R. S. 2013. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 11, 836-48.
- GUO, Y. R., CAO, Q. D., HONG, Z. S., TAN, Y. Y., CHEN, S. D., JIN, H. J., TAN, K. S., WANG, D. Y. & YAN, Y. 2020. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res*, 7, 11.
- HAIMOVICH, G., MEDINA, D. A., CAUSSE, S. Z., GARBER, M., MILLÁN-ZAMBRANO, G., BARKAI, O., CHÁVEZ, S., PÉREZ-ORTÍN, J. E., DARZACQ, X. & CHODER, M. 2013. Gene expression is circular: factors for mRNA degradation also foster mRNA synthesis. *Cell*, 153, 1000-11.
- HANSEN, B., DITTRICH-BREIHZOLZ, O., KRACHT, M. & WINDHEIM, M. 2013. Regulation of NF-kappaB-dependent gene expression by ligand-induced endocytosis of the interleukin-1 receptor. *Cell Signal*, 25, 214-28.

- HOFFMANN, A., NATOLI, G. & GHOSH, G. 2006. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene*, 25, 6706-16.
- HOLTMANN, H., WINZEN, R., HOLLAND, P., EICKEMEIER, S., HOFFMANN, E., WALLACH, D., MALININ, N. L., COOPER, J. A., RESCH, K. & KRACHT, M. 1999. Induction of Interleukin-8 Synthesis Integrates Effects on Transcription and mRNA Degradation from at Least Three Different Cytokine- or Stress-Activated Signal Transduction Pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 6742-6753.
- HORVATHOVA, I., VOIGT, F., KOTRYS, A. V., ZHAN, Y., ARTUS-REVEL, C. G., EGLINGER, J., STADLER, M. B., GIORGETTI, L. & CHAO, J. A. 2017. The Dynamics of mRNA Turnover Revealed by Single-Molecule Imaging in Single Cells. *Mol Cell*, 68, 615-625 e9.
- HUBSTENBERGER, A., COUREL, M., BENARD, M., SOUQUERE, S., ERNOULT-LANGE, M., CHOUAIB, R., YI, Z., MORLOT, J. B., MUNIER, A., FRADET, M., DAUNESSE, M., BERTRAND, E., PIERRON, G., MOZZICONACCI, J., KRESS, M. & WEIL, D. 2017. P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Mol Cell*, 68, 144-157 e5.
- HUCH, S. & NISSAN, T. 2017. An mRNA decapping mutant deficient in P body assembly limits mRNA stabilization in response to osmotic stress. *Sci Rep*, 7, 44395.
- IGNATOCHKINA, A. V., TAKAGI, Y., LIU, Y., NAGATA, K. & HO, C. K. 2015. The messenger RNA decapping and recapping pathway in Trypanosoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 6967-72.
- JAIN, S. & PARKER, R. 2013. The discovery and analysis of P Bodies. *Adv Exp Med Biol*, 768, 23-43.
- JONAS, S. & IZAURRALDE, E. 2013. The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev*, 27, 2628-41.
- KARIN, M. & BEN-NERIAH, Y. 2000. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annual Review of Immunology*, 18, 621-663.
- KEDERSHA, N., STOECKLIN, G., AYODELE, M., YACONO, P., LYKKE-ANDERSEN, J., FRITZLER, M. J., SCHEUNER, D., KAUFMAN, R. J., GOLAN, D. E. & ANDERSON, P. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*, 169, 871-84.
- KHATER, I. M., NABI, I. R. & HAMARNEH, G. 2020. A Review of Super-Resolution Single-Molecule Localization Microscopy Cluster Analysis and Quantification Methods. *Patterns (N Y)*, 1, 100038.
- KROSCHWALD, S., MAHARANA, S., MATEJU, D., MALINOVSKA, L., NUSKE, E., POSER, I., RICHTER, D. & ALBERTI, S. 2015. Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules. *Elife*, 4, e06807.
- KULKARNI, M., OZGUR, S. & STOECKLIN, G. 2010. On track with P-bodies. *Biochem Soc Trans*, 38, 242-51.
- LEUNG, A. K., CALABRESE, J. M. & SHARP, P. A. 2006. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18125-30.
- LEUNG, A. K. & SHARP, P. A. 2013. Quantifying Argonaute proteins in and out of GW/P-bodies: implications in microRNA activities. *Adv Exp Med Biol*, 768, 165-82.
- LEWIS, A. M., VARGHESE, S., XU, H. & ALEXANDER, H. R. 2006. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as

- a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*, 4, 48-48.
- LIN, Y., PROTTER, D. S., ROSEN, M. K. & PARKER, R. 2015. Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. *Mol Cell*, 60, 208-19.
- LIU, J., VALENCIA-SANCHEZ, M. A., HANNON, G. J. & PARKER, R. 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7, 719-23.
- LUO, Y., NA, Z. & SLAVOFF, S. A. 2018. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*, 57, 2424-2431.
- LYKKE-ANDERSEN, J. 2002. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol*, 22, 8114-21.
- MAYR-BURO, C., SCHLERETH, E., BEUERLEIN, K., TENEKECI, U., MEIER-SOELCH, J., SCHMITZ, M. L. & 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 (Basel)*, 11.
- OECKINGHAUS, A. & GHOSH, S. 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a000034.
- OHN, T., KEDERSHA, N., HICKMAN, T., TISDALE, S. & ANDERSON, P. 2008. A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat Cell Biol*, 10, 1224-31.
- OTSUKA, Y., KEDERSHA, N. L. & SCHOENBERG, D. R. 2009. Identification of a cytoplasmic complex that adds a cap onto 5'-monophosphate RNA. *Mol Cell Biol*, 29, 2155-67.
- PACCHIANA, R., ABBATE, M., ARMATO, U., DAL PRA, I. & CHIARINI, A. 2014. Combining immunofluorescence with in situ proximity ligation assay: a novel imaging approach to monitor protein-protein interactions in relation to subcellular localization. *Histochem Cell Biol*, 142, 593-600.
- PACKER, J. & TRAPNELL, C. 2018. Single-Cell Multi-omics: An Engine for New Quantitative Models of Gene Regulation. *Trends Genet*, 34, 653-665.
- PARKER, R. & SHETH, U. 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*, 25, 635-46.
- PARKER, R. & SONG, H. 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 121.
- PILLAI, R. S., BHATTACHARYYA, S. N., ARTUS, C. G., ZOLLER, T., COUGOT, N., BASYUK, E., BERTRAND, E. & FILIPOWICZ, W. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309, 1573-6.
- POBLETE-DURAN, N., PRADES-PEREZ, Y., VERA-OTAROLA, J., SOTO-RIFO, R. & VALIENTE-ECHEVERRIA, F. 2016. Who Regulates Whom? An Overview of RNA Granules and Viral Infections. *Viruses*, 8.
- POPPE, M. 2017. *Untersuchung der humanen Coronavirus-induzierten Wirtsreaktion auf mRNA- und Proteomebene*.
- RAJYAGURU, P., SHE, M. & PARKER, R. 2012. Scd6 targets eIF4G to repress translation: RGG motif proteins as a class of eIF4G-binding proteins. *Mol Cell*, 45, 244-54.
- RAMANATHAN, A., ROBB, G. B. & CHAN, S. H. 2016. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res*, 44, 7511-26.

- REN, X., KANG, B. & ZHANG, Z. 2018. Understanding tumor ecosystems by single-cell sequencing: promises and limitations. *Genome Biol*, 19, 211.
- RIBACK, J. A., KATANSKI, C. D., KEAR-SCOTT, J. L., PILIPENKO, E. V., ROJEK, A. E., SOSNICK, T. R. & DRUMMOND, D. A. 2017. Stress-Triggered Phase Separation Is an Adaptive, Evolutionarily Tuned Response. *Cell*, 168, 1028-1040 e19.
- ROTHWARF, D. M. & KARIN, M. 1999. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE*, 1999, RE1.
- RZECZKOWSKI, K., BEUERLEIN, K., MULLER, H., DITTRICH-BREIHOLZ, O., SCHNEIDER, H., KETTNER-BUHROW, D., HOLTSMANN, H. & KRACHT, M. 2011. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies. *J Cell Biol*, 194, 581-96.
- SANKAR GHOSH, MICHAEL J. MAY, A. & KOPP, E. B. 1998. NF- κ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annual Review of Immunology*, 16, 225-260.
- SCHMITZ, M. L., MATTIOLI, I., BUSS, H. & KRACHT, M. 2004. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chembiochem*, 5, 1348-58.
- SCHMITZ, M. L., 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 (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813, 2165-2175.
- SCHOENBERG, D. R. & MAQUAT, L. E. 2009. Re-capping the message. *Trends Biochem Sci*, 34, 435-42.
- SCHUTZ, S., NOLDEKE, E. R. & SPRANGERS, R. 2017. A synergistic network of interactions promotes the formation of in vitro processing bodies and protects mRNA against decapping. *Nucleic Acids Res*, 45, 6911-6922.
- SCHWARTZ, D., DECKER, C. J. & PARKER, R. 2003. The enhancer of decapping proteins, Edc1p and Edc2p, bind RNA and stimulate the activity of the decapping enzyme. *RNA*, 9, 239-51.
- SEN, G. L. & BLAU, H. M. 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, 7, 633-6.
- SETO, E., YOSHIDA-SUGITANI, R., KOBAYASHI, T. & TOYAMA-SORIMACHI, N. 2015. The Assembly of EDC4 and Dcp1a into Processing Bodies Is Critical for the Translational Regulation of IL-6. *PLoS One*, 10, e0123223.
- SHE, M., DECKER, C. J., CHEN, N., TUMATI, S., PARKER, R. & SONG, H. 2006. Crystal structure and functional analysis of Dcp2p from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Struct Mol Biol*, 13, 63-70.
- SHE, M., DECKER, C. J., SVERGUN, D. I., ROUND, A., CHEN, N., MUHLRAD, D., PARKER, R. & SONG, H. 2008. Structural basis of dcp2 recognition and activation by dcp1. *Mol Cell*, 29, 337-49.
- SHETH, U. & PARKER, R. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300, 805-8.
- SHETH, U. & PARKER, R. 2006. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell*, 125, 1095-109.
- SHUMAN, S. 1995. Capping enzyme in eukaryotic mRNA synthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 50, 101-29.
- SODERBERG, O., GULLBERG, M., JARVIUS, M., RIDDERSTRALE, K., LEUCHOWIUS, K.-J., JARVIUS, J., WESTER, K., HYDBRING, P.,

- BAHRAM, F., LARSSON, L.-G. & LANDEGREN, U. 2006. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Meth*, 3, 995-1000.
- SOUQUERE, S., MOLLET, S., KRESS, M., DAUTRY, F., PIERRON, G. & WEIL, D. 2009. Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells. *J Cell Sci*, 122, 3619-26.
- STANDART, N. & WEIL, D. 2018. P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage. *Trends Genet*.
- STOECKLIN, G. & KEDERSHA, N. 2013. Relationship of GW/P-bodies with stress granules. *Adv Exp Med Biol*, 768, 197-211.
- TANG, T. K., WU, M. P., CHEN, S. T., HOU, M. H., HONG, M. H., PAN, F. M., YU, H. M., CHEN, J. H., YAO, C. W. & WANG, A. H. 2005. Biochemical and immunological studies of nucleocapsid proteins of severe acute respiratory syndrome and 229E human coronaviruses. *Proteomics*, 5, 925-37.
- TEIXEIRA, D. & PARKER, R. 2007. Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 18, 2274-87.
- TEIXEIRA, D., SHETH, U., VALENCIA-SANCHEZ, M. A., BRENGUES, M. & PARKER, R. O. Y. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*, 11, 371-382.
- TENEKECI, U., POPPE, M., BEUERLEIN, K., BURO, C., MULLER, H., WEISER, H., KETTNER-BUHROW, D., PORADA, K., NEWEL, D., XU, M., CHEN, Z. J., BUSCH, J., SCHMITZ, M. L. & KRACHT, M. 2016. K63-Ubiquitylation and TRAF6 Pathways Regulate Mammalian P-Body Formation and mRNA Decapping. *Mol Cell*, 62, 943-957.
- TISHINOV, K. & SPANG, A. 2020. Decapping complex is essential for functional P-body formation and is buffered by nuclear localization. *bioRxiv*, 2020.09.07.285700.
- TRAN, K., MERIKA, M. & THANOS, D. 1997. Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 5386-5399.
- TRITSCHLER, F., BRAUN, J. E., 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 21591-6.
- TSAI, W. C. & LLOYD, R. E. 2014. Cytoplasmic RNA Granules and Viral Infection. *Annu Rev Virol*, 1, 147-70.
- UVERSKY, V. N. 2017. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. *Curr Opin Struct Biol*, 44, 18-30.
- VALKOV, E., MUTHUKUMAR, S., CHANG, C. T., JONAS, S., WEICHENRIEDER, O. & IZAURRALDE, E. 2016. Structure of the Dcp2-Dcp1 mRNA-decapping complex in the activated conformation. *Nat Struct Mol Biol*, 23, 574-9.
- VAN DIJK, E., COUGOT, N., MEYER, S., BABAJKO, S., WAHLE, E. & SERAPHIN, B. 2002. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J*, 21, 6915-24.
- VIGERS, G. P., ANDERSON, L. J., CAFFES, P. & BRANDHUBER, B. J. 1997. Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. *Nature*, 386, 190-4.
- WALSH, D. & MOHR, I. 2011. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol*, 9, 860-75.

-
- WARD, A. M., BIDET, K., YINGLIN, A., LER, S. G., HOGUE, K., BLACKSTOCK, W., GUNARATNE, J. & GARCIA-BLANCO, M. A. 2011. Quantitative mass spectrometry of DENV-2 RNA-interacting proteins reveals that the DEAD-box RNA helicase DDX6 binds the DB1 and DB2 3' UTR structures. *RNA Biol*, 8, 1173-86.
- WEBER, A., WASILIEW, P. & KRACHT, M. 2010. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal*, 3, cm1.
- WEITERER, S. S., 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, I. W. F., RIEDLINGER, T., SCHMITZ, M. L., PAPANTONIS, A. & KRACHT, M. 2020. Distinct IL-1alpha-responsive enhancers promote acute and coordinated changes in chromatin topology in a hierarchical manner. *EMBO J*, 39, e101533.
- WINZEN, R., KRACHT, M., RITTER, B., WILHELM, A., CHEN, C. Y., SHYU, A. B., MULLER, 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. *EMBO J*, 18, 4969-80.
- YAMASHITA, A., CHANG, T. C., YAMASHITA, Y., ZHU, W., ZHONG, Z., CHEN, C. Y. & SHYU, A. B. 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 1054-63.
- YANG, Z., JAKYMIW, A., WOOD, M. R., EYSTATHIOY, T., RUBIN, R. L., FRITZLER, M. J. & CHAN, E. K. 2004. GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *J Cell Sci*, 117, 5567-78.
- ZID, B. M. & O'SHEA, E. K. 2014. Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast. *Nature*, 514, 117-21.

11 Anhang

12 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.“

Ort/Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Promotion stets unterstützt haben.

Einen besonderes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Michael Kracht für die Möglichkeit am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie zu promovieren. Insbesondere für die fachliche Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit möchte ich danken.

Darüberhinaus geht mein Dank an alle Mitarbeiter des Rudolf-Buchheim-Instituts für Pharmakologie in Gießen für die tatkräftige Unterstützung und die Einarbeitung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Christin Mayr-Buro für die hilfreichen und produktiven Diskussionen, die Motivation, die Unterstützung und die Geduld bedanken. Vielen lieben Dank für die Bereitschaft mehrfach die Ergebnisse zu diskutieren und für die Hilfe und die Ratschläge im Laboralltag.

Schließlich möchte ich meinem Vater und meiner Schwester für das Verständnis und die langjährige Hilfe danken. Insbesondere danke ich meinen Paten Monika, Dieter, Karin und Manfred für die jahrelange tatkräftige Hilfe in der Schule und die moralische Unterstützung im Studium.

Danken möchte ich außerdem meinem Ehemann Michael, der mich in allen Lebenslagen stets unterstützt und ermutigt hat.