





# Einfluss des RNA bindenden Proteins AUF1 auf die CD83 Expression

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,  
Department Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Christina Ehlers**  
aus Neumünster

Januar 2008



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von  
April 2003 bis November 2007  
unter Anleitung von Prof. Dr. Joachim Hauber  
und Betreuung von Prof. Dr. Wolfgang Deppert  
im Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie  
an der Universität Hamburg  
in der Abteilung Zellbiologie und Virologie  
angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert

2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Hauber

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Mai 2008



Für meine Eltern





## **Danksagung**

**Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht breite Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.**

**Ganz besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Joachim Hauber für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und für seine stets engagierte Betreuung und Unterstützung.**

**Prof. Dr. Wolfgang Deppert danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter seitens der chemischen Fakultät der Universität Hamburg zu betreuen.**

**Ein ganz großes Dankeschön geht an Dr. Jan Chemnitz, der mir durch zahlreiche Ideen, fachliche Diskussionen und wertvolle Ratschläge immer wieder weitergeholfen hat und mich so manches Mal neu motiviert hat.**

**Cordula Grüttner danke ich für die vielen hilfreichen Unterstützungen bei meinen Experimenten, besonders für die Hilfe bei den FACS Analysen.**

**Bettina Abel sei herzlich für die fleissige Durchführung der Realtime PCR Analysen gedankt.**

**Susann Schirmer und Marcel Krepstakies danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.**

**Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung 4 möchte ich ganz herzlich für die tolle Zeit am HPI danken. Es hat immer viel Spaß gemacht mit euch!**

**Britta Keyser und Susann Schirmer danke ich für die lustige Zeit in der „Wilden Weiber WG“. Ich werde diese besondere Zeit in Hamburg nie vergessen!**

**Carolin Kellersmann, Marcel Krepstakies und Nina Albrecht danke ich für ihre Freundschaft und für die vielen schönen und lustigen Stunden, die wir miteinander verbracht haben.**

**Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt und an mich geglaubt haben. Ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen!**



***Inhaltsverzeichnis***

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
3.1	Die Regulation der Genexpression	4
3.2	RNA interference	12
3.3	Dendritische Zellen und der Oberflächenmarker CD83	15
3.4	AUF1 – Ein RNA-bindendes Protein	18
3.5	Ziel dieser Arbeit	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>23</b>
4.1	Bakterienstämme	23
4.2	Eukaryotische Zelllinien	23
4.3	<b>Medien</b>	<b>24</b>
4.3.1	Medien für die Anzucht von Bakterien	24
4.3.2	Medien für Gewebekulturen	25
4.3.3	Medien für primäre Zellen	25
4.3.4	Medienzusätze	25
4.4	<b>Nukleinsäuren</b>	<b>26</b>
4.4.1	Oligonukleotide	26
4.4.2	Plasmid-DNA	29
4.4.3	Sonstige Nukleinsäuren	32
4.5	<b>Enzyme</b>	<b>32</b>
4.5.1	Restriktionsendonukleasen	32
4.5.2	Sonstige Enzyme	32
4.6	<b>Proteinstandards</b>	<b>33</b>
4.7	<b>Antikörper</b>	<b>33</b>
4.7.1	Primäre Antikörper	33
4.7.2	Sekundäre Antikörper	34
4.7.3	Antikörper zur FACS Analyse	34
4.8	<b>Reagenzsysteme (Kits)</b>	<b>35</b>
4.9	<b>Chemikalien und Materialien</b>	<b>35</b>
4.9.1	Feinchemikalien	35
4.9.2	Materialien	37
4.10	<b>Lösungen und Puffer</b>	<b>37</b>

<b>5</b>	<b>METHODEN</b>	<b>43</b>
5.1	<b>Bakterienkulturen</b>	<b>43</b>
5.1.1	Kulturen für die Plasmidisolierung	43
5.1.2	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zur Transformation	43
5.1.3	Transformation von Plasmid-DNA	44
5.2	<b>DNA/RNA-Methoden</b>	<b>44</b>
5.2.1	DNA-Standardmethoden	44
5.2.2	Polymerase-Kettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction", PCR)	45
5.2.3	Hybridbildung von Oligonukleotiden	53
5.2.4	Isolierung von gesamtzellulärer RNA	53
5.2.5	RNA-Fraktionierung zur Trennung von nukleärer und zytoplasmatischer RNA	54
5.2.6	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)	54
5.2.7	In vitro Transkription zur Herstellung synthetischer RNA	55
5.2.8	Klonierungen	56
5.3	<b>Zellkultur</b>	<b>58</b>
5.3.1	Kultivierung von adhären wachsenden Zellen	58
5.3.2	Kultivierung von nicht-adhären wachsenden Zellen	58
5.3.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	58
5.4	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>59</b>
5.4.1	Transfektionen	59
5.4.2	p24-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von rekombinanten Lentiviren	61
5.4.3	Luziferase-Reportergenassay	62
5.4.4	Infektion von Zellen mit selbstinaktivierenden replikationsinkompetenten Lentiviren zur stabilen Expression von siRNA gegen AUF1	63
5.4.5	Bestimmung der Stabilität von CD83 mRNA	64
5.4.6	Aktivierung von Jurkat- und MonoMac6 Zellen	66
5.4.7	Isolierung von Monozyten aus Buffy Coats mit anschließender Reifung zu dendritischen Zellen	66
5.4.8	Färbung von Zellen mit Antikörpern für die FACS Analyse	68
5.4.9	FACS Analyse	68
5.5	<b>Proteinmethoden</b>	<b>69</b>
5.5.1	Ernte von Zellen zur Gewinnung von Proteinlysat	69
5.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford	70
5.5.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
5.5.4	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	70
5.5.5	Immunoblot (Westernblot)	70
5.5.6	Nichtkovalente Bindung von Antikörpern an Protein G Sepharose (PGS)	71
5.5.7	Bestimmung der de novo-Synthese von CD83-Protein durch <sup>35</sup> S-Markierung und Immunpräzipitation	71
5.5.8	Reinigung von GST-Proteinen aus Bakterien (Batch-Verfahren)	73
5.5.9	Reinigung von GST-Proteinen aus Bakterien (ÄKTA)	74
5.5.10	<i>RNA-Mobility-Shift</i> -Experimente zur Bestimmung von Protein-RNA-Interaktionen	75
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>77</b>
6.1	<b>Protein / RNA-Interaktionen</b>	<b>78</b>
6.1.1	Nachweis einer AUF1 / CD83 mRNA Interaktion im <i>RNA-Mobility-Shift</i> -Experiment	78
6.2	<b>Einfluss von AUF1 auf die Expression von CD83</b>	<b>82</b>
6.2.1	Charakterisierung einer biologischen Funktion	82
6.2.2	Untersuchung der CD83-Protein-Expression in Abhängigkeit von AUF1	84
6.2.3	Untersuchung der Spezifität des CD83-PRE-Elements für den Effekt	87
6.2.4	Untersuchung der CD83 mRNA Mengen unter Einfluss von AUF1	89
6.2.5	Einfluss von AUF1 auf die Stabilität der CD83 mRNA	91

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>6.3</b>	<b>Einfluss von AUF1-spezifischer RNA Interferenz (RNAi) auf die CD83 Expression</b>	<b>94</b>
6.3.1	Herstellung stabiler Zelllinien mit Hilfe rekombinanter Lentivirus-Vektoren	94
6.3.2	Auswirkung einer reduzierten AUF1 Expression auf die CD83 Expression	96
6.3.3	Auswirkung einer reduzierten AUF1 Expression auf die intrazelluläre Verteilung der CD83 mRNA	98
6.3.4	Auswirkung einer Reduktion der AUF1 Expression auf die Stabilität der CD83 mRNA	100
<b>6.4</b>	<b>Untersuchungen in autologen Zellsystemen (in vivo)</b>	<b>102</b>
6.4.1	CD83 Expression während der Aktivierung von MonoMac6 Zellen	102
6.4.2	CD83 mRNA Level während der Aktivierung von MonoMac6 Zellen	104
6.4.3	CD83 Expression während der Aktivierung von U937 Zellen und Jurkat Zellen	105
6.4.4	CD83 Expression in dendritischen Zellen	108
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>122</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>125</b>



# 1 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC, *dendritic cells*) sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC, *antigen presenting cells*) des Immunsystems, die in der Lage sind, selbst naive T-Zellen zu stimulieren. Das Glykoprotein CD83 ist ein wichtiger Oberflächenmarker reifer DC und spielt eine entscheidende Rolle in der DC-vermittelten Induktion der T-Zell Immunantwort.

Kürzlich wurde gezeigt, dass der Transport der CD83 mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma der Zelle in Anwesenheit des RNA-bindenden Proteins HuR und des Kernexportrezeptors CRM1 stattfindet. HuR bindet dabei ein *cis*-aktives RNA-Element in der CD83 mRNA, welches als PRE (*Posttranscriptional Regulatory Element*) bezeichnet wird. Ein weiteres RNA-bindendes Protein ist AUF1. Im Zusammenhang mit ARE-enthaltenden (AU-rich Elements) RNAs ist AUF1 als Gegenspieler (Antagonist) von HuR bekannt, da es im Regelfall zur Destabilisierung von ARE-enthaltenden RNAs führt, während HuR deren Stabilisierung unterstützt.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob AUF1, genau wie HuR, in der Lage ist, die CD83 mRNA zu binden und hinsichtlich der CD83 Expression eventuell einen biologischen Effekt auszuüben. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass AUF1 spezifisch und direkt an das PRE-Element der CD83 mRNA bindet. Daraufhin wurde ein potentieller Einfluss des AUF1 Proteins auf die Prozessierung der CD83 mRNA untersucht. Dabei zeigte sich in heterologen COS7 Zellen, dass die Interaktion von AUF1 mit der CD83 mRNA zu einer verstärkten Expression von CD83 führt. Diese Expressionssteigerung scheint nicht durch eine Veränderung auf der Ebene der mRNA hervorgerufen zu werden, da weder die Gesamtmengen an mRNA, noch die Stabilität oder der Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma beeinflusst waren. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die gesteigerte CD83-Expression durch einen translatorischen Einfluss von AUF1 zustande kommt. Untersuchungen der *de novo* Synthese von CD83 Protein bestätigten dann den Einfluss von AUF1 auf die Translation von CD83 mRNA. Darüberhinaus konnte in autologen T-Zellen nachgewiesen werden, dass eine Inhibition von AUF1 mit Hilfe von RNA Interferenz (RNAi) zwar nicht wie bei der Inhibition von HuR zu einer Unterbrechung, aber zu einer stark verzögerten Expression von CD83 führt. Schließlich ergaben Untersuchungen mit primären humanen dendritischen Zellen, dass auch in diesen

Immunzellen AUF1 für die effiziente Expression des wichtigen Oberflächenmoleküls CD83 benötigen.

Durch die Identifizierung von AUF1 als wichtiger Regulator der CD83 Expression konnte ein weiterer Beitrag zur Aufklärung der besonderen posttranskriptionellen Regulation des CD83 Transkripts geleistet werden.



## 2 Summary

Dendritic cells (DC) are the most potent antigen presenting cells (APC) of the immune system and are able to sensitize even naïve T cells. The glycoprotein CD83 is an important surface marker of mature DC and plays a crucial role in the DC-mediated induction of the T cell immune response.

Recently, it has been shown that CD83 mRNA is transported from the nucleus to the cytoplasm via the RNA-binding protein HuR and the nuclear export factor CRM1. In this context HuR binds an *cis*-active RNA-element in CD83 mRNA, which has been termed *Posttranscriptional Regulatory Element* (PRE).

Another RNA-binding protein is AUF1, which is known with respect to ARE (*AU-rich Elements*) containing mRNAs to act as an antagonist of HuR. Usually AUF1 induces the degradation of ARE-containing mRNAs, whereas HuR mediates their stabilisation.

The aim of this work was to investigate whether AUF1, like HuR, is able to bind CD83 mRNA and, furthermore, to analyze a potential effect of AUF1 on CD83 expression.

In fact, it could be shown that AUF1 is indeed able to bind specifically and directly to the PRE within CD83 mRNA. Moreover, it could be demonstrated that the interaction of AUF1 with the CD83 mRNA in heterologous transfected COS7 cells results in an increased expression of CD83. This increase is not caused by a change in RNA turnover, because neither the total amount of cellular CD83 mRNA, nor RNA stability or the rate of nuclear mRNA export was affected by AUF1. These results indicated, that the increase in CD83 expression is caused by an stimulatory effect of AUF1 on the translation of CD83. The subsequent investigation of the *de novo* synthesis of CD83 confirmed this notion. Furthermore, it was shown in autologous T cells, that the inhibition of AUF1 by RNA interference (RNAi) resulted in a pronounced delay in CD83 expression. Finally it was shown in primary human dendritic cells that AUF1 is also required for efficient expression of the CD83 surface molecule in these functionally important immune cells.

In sum, the identification of AUF1 as an important regulator of CD83 expression contributed to the further elucidation of the complex mechanisms involved in the posttranscriptional regulation of CD83 mRNA.

## 3 Einleitung

### 3.1 Die Regulation der Genexpression

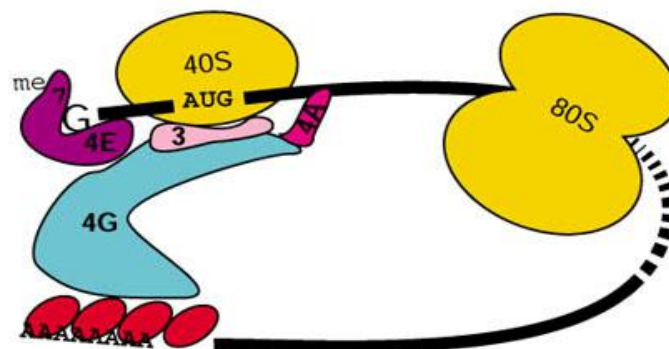
Die genetische Information wird in der Zelle von der DNA über die *messenger* RNA (mRNA) zum Protein transferiert. Hierbei handelt es sich um einen komplexen und in unterschiedlichen Stufen regulierten Vorgang, der zahlreiche Steuerungs- und Kontrollmechanismen einschliesst. Auch für Gene, die einer eher einfachen Regulation unterliegen, ist eine präzise Einhaltung bestimmter Regulationsprozesse unerlässlich, um eine exakte und effiziente Genexpression zu garantieren (Wilusz et al., 2001). Um diese Garantie zu gewährleisten, haben eukaryotische Zellen eine komplizierte Genexpressionsmaschinerie entwickelt, die den Weg vom nativen Transkript über unterschiedliche mRNA-Protein-Komplexe bis zum fertigen Genprodukt steuert und kontrolliert. Prinzipiell kann die Zelle auf jeder Ebene der Genexpression regulatorisch eingreifen, wobei die posttranskriptionelle Kontrolle der eukaryotischen Genexpression eine entscheidende Rolle bei der Zellteilung, der Zelldifferenzierung und bei der Antwort auf exogene stimulierende Faktoren spielt. Hierzu ist im Folgenden der generelle Ablauf beschrieben: Die Synthese der mRNAs findet im Zellkern statt. Hier entsteht nach der Transkription der DNA zuerst eine Vorläufer-mRNA. Diese RNA enthält neben den kodierenden Bereichen (Exons) auch nicht kodierende Introns und am 5'- und 3'- Ende nicht-translatierte Bereiche. Dieses Transkript wird anschließend im Zellkern durch das Zusammenspiel vieler verschiedener Proteine prozessiert. Dazu gehört das Anfügen einer 7-Methyl-Guanylat-Struktur an das 5'-Ende der RNA (*capping*), wodurch die RNA vor nukleolytischem Abbau geschützt ist (Dreyfuss et al., 1996, Wilusz et al., 2001). Anschließend entfernt ein Spliceosomenkomplex, der aus unterschiedlichen *small nuclear* RNAs (snRNAs) und Proteinen besteht, die Intron-Bereiche aus der Vorläufer mRNA. Am Polyadenylierungssignal (AAUAAA) erfolgt der dritte Schritt der Prozessierung. Ein Proteinkomplex schneidet die RNA am AAUAAA und fügt ihr am 3'-Ende eine Sequenz von ca. 200 Adenosinribonukleotiden (PolyA) hinzu. Dieses PolyA-Ende hat, ähnlich wie die *cap*-Struktur, eine stabilisierende Funktion und schützt die RNA vor dem Abbau (Hollams et al., 2002, Mangus et al., 2003).

Die reife mRNA muss nun vom Zellkern durch die Kanäle des Kernporenkomplexes (*nuclear pore complex*, NPC) in das Zytoplasma der Zelle transportiert werden. Hierfür interagiert die mRNA mit Komponenten der zellulären Transportmaschinerie und bildet einen Protein-RNA-Komplex, der auch als hnRNP (*heterogenous nuclear Ribonucleoprotein*) Partikel bezeichnet wird (Pemberton and Paschal, B. M., 2005). Der Export der RNA wird durch Kernexportsignale (*Nuclear Export Signal*, NES) vermittelt. Bei diesen Signalen handelt es sich meist um Signaltbereiche von RNA-bindenden Proteinen. Diese Signaltbereiche dienen wiederum als Erkennungsstellen für Exportfaktoren, die an diese Proteine binden und dann entweder direkt oder über weitere Adapterproteine mit den Nukleoporinen der Kernporen interagieren, um so den Export der mRNA aus dem Zellkern zu vermitteln (Cullen, 2000, Keene, 2003). Bisher sind zwei unterschiedliche Transportwege genauer beschrieben worden: Der TAP/NXF1-Weg und der CRM1-Exportweg. In Metazoen wird die überwiegende Anzahl an zellulären mRNAs über den TAP/NXF1-Weg aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Es existiert aber auch eine kleine Subpopulation zellulärer Transkripte, die über den vollkommen unverwandten CRM1-Exportweg befördert werden (Keene, 2003, Schutz et al., 2006). Hierzu gehört auch die mRNA, die für das CD83-Oberflächenprotein von dendritischen Zellen kodiert, worauf später noch genauer eingegangen wird. Der CRM1-Exportweg wird zudem von bestimmten Retroviren, wie z. B. HIV-1 (Humanes Immundefizienz Virus Typ 1) und HTLV-I (Humanes T-Zell Leukämie Virus Typ I) zum Transport unvollständig gespleisster und ungespleisster viraler mRNAs aus dem Zellkern in das Zytoplasma ausgenutzt (Hakata et al., 2002).

Nach dem Transport der RNA in das Zytoplasma kann die RNA weiter zu ihrem Bestimmungsort gebracht werden. Da eukaryotische Zellen in unterschiedliche subzelluläre Kompartimente unterteilt sind, besteht eine weitere Möglichkeit der Regulation der Genexpression, indem die Aufenthaltsbereiche von mRNAs auf bestimmte Gebiete im Zytoplasma begrenzt werden (Jansen, 2001).

Ist die mRNA an ihrem Zielort angelangt, wird sie in das entsprechende Protein translatiert. Die Initiation der Translation geschieht durch diverse Wechselwirkungen zwischen Proteinen, die an die RNA gebunden sind. So interagiert beispielsweise das PolyA bindende Protein (*polyA binding Protein*, PABP) mit dem *cap*-bindenden Protein eIF4E und dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G, wodurch es zu einer

Zirkularisierung der RNA kommt (Mangus et al., 2003, Mitchell and Tollervey, D., 2001, Wilkinson and Shyu, A. B., 2002). Dann wird die RNA von weiteren Initiationsfaktoren, der 40S Ribosomen-Untereinheit sowie der Initiations-tRNA nach dem nächsten AUG Startcodon abgesucht. Das Ribosom entsteht durch die zusätzliche Bindung der 60S Ribosomen-Untereinheit und die Translation beginnt, bis ein Stop-Codon im jeweiligen Leserahmen erreicht wird. Die zirkuläre Konformation der mRNA schützt das 3'- und das 5'-Ende vor dem Angriff von Deadenylen und „decapping“-Enzymen. Allerdings steht diese Translations-Konformation in einer ständigen Konkurrenz mit den unterschiedlichen RNA-abbauenden Enzymen, sodass im Laufe der Translationszyklen, die die Ribosomen durchlaufen, das PolyA-Ende der RNA immer weiter verkürzt wird. Irgendwann ist ein kritischer Wert erreicht und der RNA-Protein-Komplex zerfällt. Nun ist die mRNA nicht mehr vor dem Abbau geschützt und wird schließlich degradiert (Mangus et al., 2003, Wilusz et al., 2001). Bei dem Vorgang der Translation und dem Vorgang des mRNA-Abbaus handelt es sich also um zwei eng miteinander verknüpfte Prozesse, die nahezu zeitgleich stattfinden bzw. stattfinden können. Der Abbau von mRNAs ist die Folge eines komplex geregelten Zusammenwirkens der 5'-cap-Struktur, der 5'-nicht-translatierten Region (*untranslated region*, UTR), der kodierenden Sequenz, der 3'-nicht-translatierten Region (3'UTR) und des polyA-Endes (Guhaniyogi and Brewer, G., 2001).



**Abb. 1 Schematische Darstellung der RNA-Zirkularisierung (nach Mangus et al. 2003)**

Wechselwirkungen zwischen den PolyA-bindenden Proteinen mit eIF4G und eIF4E führen zur Zirkularisierung der mRNA. Durch Bindung weiterer Initiationsfaktoren (eIF3 und eIF4A) und der ribosomalen Untereinheiten kommt es zur Translation der mRNA. Die zirkuläre Konformation schützt die mRNA vor vorzeitiger Degradation.

Da mRNAs nur transiente Zwischenprodukte im Fluss der genetischen Information darstellen, muss ihre Lebensdauer begrenzt sein. Die Lebensdauer ist dabei unter anderem abhängig von verschiedenen intra- und extrazellulären Konditionen und kann durch unterschiedliche Effizienzen in der Rekrutierung der mRNA-Degradationsmaschinerie geregelt werden. Im Allgemeinen wird die RNA von ihren Enden her abgebaut. Das 3'-polyA-Ende wird durch Deadenylasen entfernt, während die 5'-*cap*-Struktur durch spezifische *decapping* Enzyme abgebaut wird. Anschließend wird der RNA-Körper durch Exonukleasen mit 5'→3' oder 3'→5' Prozessivität abgebaut. In welche Richtung der Abbau geschieht, hängt davon ab, welche Enzymkombinationen in dem jeweiligen Zelltyp vorliegen, bzw. welche Enzyme am effektivsten zum mRNP-Komplex rekrutiert werden können (Parker and Song, H., 2004). Zusätzlich existiert auch noch die Möglichkeit der endonukleolytischen RNA-Degradation, welche bei dem sequenzspezifischen Abbau der mRNA durch den RNA-induzierten *Silencing* Komplex (RISC) in Verbindung mit endogenen *small interfering* RNAs (siRNA) eine wichtige Rolle spielt (Hutvagner, 2005, Sontheimer and Carthew, R. W., 2005, Zamore and Haley, B., 2005).

Die allgemeine RNA-Degradationsmaschinerie wird ausserdem für die Eliminierung von anormalen mRNAs benötigt (*nonsense mediated decay*, NMD). Dabei handelt es sich beispielsweise um RNAs, die ein verfrühtes translatorisches Stop-Signal besitzen (nonsense mRNA) oder denen dieses Signal gänzlich fehlt (nonstop mRNA) (Maquat, 2002, Maquat, 2004). Solche schadhaften mRNAs können durch vielfältige Mechanismen entstehen, wie genetische Mutationen, fehlerhaftes Spleissen und unvollständige Polyadenylierung. Die effiziente Entfernung solcher RNAs ist wichtig, um die Zelle vor schädlichen Einflüssen durch falsch terminierte Proteine zu schützen. Die Erkennung dieser RNAs erfolgt durch die funktionelle Einbindung der Ribosomen. Diese sind im Fall von nonsense- oder nonstop Transkripte nicht in der Lage, die Translation korrekt zu beenden. Diese unzulässige Termination führt zur Rekrutierung der entsprechenden Degradationsenzyme (Amrani et al., 2004, Maquat, 2002).

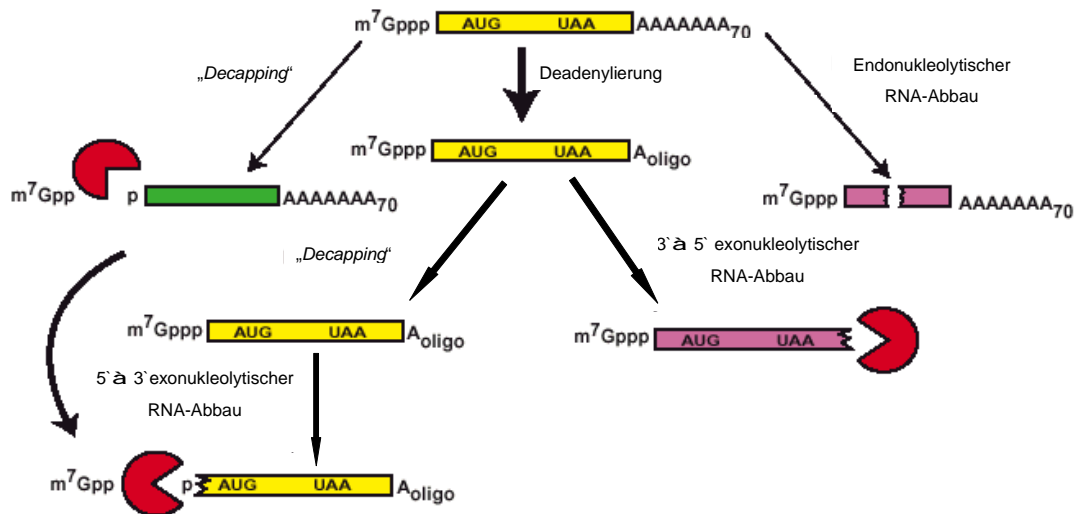


Abb. 2 Übersicht der unterschiedlichen RNA-Abbauwege (nach Collier und Parker 2004)

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass RNAs an speziellen subzellulären Orten in der Zelle abgebaut werden. Es gibt diskrete zytoplasmatische Orte, wo eine Anhäufung von mRNA-degradierenden Faktoren besteht. Diese Orte werden als *processing bodies* (P-bodies, PBs) bezeichnet. Diese P-bodies scheinen sich um mRNPs (*messenger Ribonucleoprotein*) zu formen, die nicht aktiv translatiert werden (Teixeira et al., 2005). Damit mRNAs für diese Degradationsstrukturen zugänglich sind, müssen sie von den Orten der Translation entfernt werden. Diese Aufgabe scheint von spezifischen *microRNAs* (miRNAs) und dem RISC-Komplex erfüllt zu werden (Liu et al., 2005). Ein weiterer Beweis für den Abbau von RNAs in P-bodies konnte dadurch erbracht werden, dass sowohl eine allgemeine als auch eine mRNA-spezifische Inhibition der Degradation zu einer Akkumulation der RNA-Intermediate in eben diesen subzellulären Strukturen führt (Cougot et al., 2004, Sheth and Parker, R., 2003).

Eine weitere den P-bodies verwandte Struktur in eukaryotischen Zellen sind die sogenannten *stress granules* (SGs). Diese dienen als temporäre Speicher für mRNAs und beinhalten mRNAs, die sich in einem translatorisch inaktiven Zustand befinden. Zusätzlich sind 40S ribosomale Untereinheiten und die mRNA-bindenden Proteine TIA-1 und TIAR in diesen Zellkompartimenten enthalten (Gilks et al., 2004). In Stresssituationen ist es für die Zelle wichtig, ihre „*housekeeping*“ Transkripte

„einzufrieren“, um die Translationsmaschinerie ganz für die Synthese von Hitzeschockproteinen, bestimmten Transkriptionsfaktoren und anderen für die Reparatur der Zelle wichtigen Faktoren nutzen zu können. Ist die Stresssituation überstanden, lösen sich die SGs wieder auf und die zurückgehaltenen mRNAs werden entweder wieder translatiert oder ebenfalls in den *P-bodies* abgebaut (Anderson and Kedersha, N., 2002, Kedersha et al., 2005).

Die Regulation der Genexpression kann durch Beeinflussung der RNA-Stabilität und der Translation sehr effektiv reguliert werden. Die exakte Steuerung dieser beiden Prozesse erlaubt der Zelle, sehr schnell auf extra- und intrazelluläre Stimuli zu reagieren. Unterschiedliche Sequenzelemente auf der mRNA kontrollieren ihre Halbwertszeit, indem sie entweder die Degradation stimulieren oder inhibieren. In Säugerzellen sind die bekanntesten dieser *cis*-aktiven Instabilitätselemente die AU-reichen Elemente (*AU-rich elements*, ARE) (Barreau et al., 2005). Diese befinden sich im Regelfall im 3' untranslatierten Bereich der mRNA und zeichnen sich durch einen 50 bis 150 Nukleotide umfassenden Bereich aus, der reich an Adenin- und Uracilbasen ist. Kennzeichnend für AREs sind die typischen AUUUA-Pentamersequenzen, die häufig auch überlappen können. In Abhängigkeit von der Anzahl und der Verteilung der AUUUA-Sequenzen sind die AU-reichen Sequenzen in drei Klassen eingeteilt worden (Chen and Shyu, A. B., 1995). AREs der Klasse I enthalten mehrere einzeln verteilte AUUUA-Motive innerhalb einer U-reichen Region. Klasse II-AREs befinden sich auf den mRNAs der meisten Zytokine, sie besitzen im Regelfall etwa zwei überlappende UUAUUUA(U/A)(U/A) Nonamere. Die AREs der Klasse III sind sehr viel weniger definiert, sie besitzen zwar eine U-reiche Region, aber keine AUUUA-Motive. Das am besten dokumentierte Beispiel für ein Typ III ARE befindet sich im 3'UTR der *c-jun* mRNA (Peng et al., 1996).

AREs fördern die schnelle zytoplasmatische Degradation von mRNAs, indem sie mRNA-abbauende Enzyme direkt an das RNA-Substrat rekrutieren (Guhaniyogi and Brewer, G., 2001). In manchen Fällen führen sie auch zu einem Translationsstopp (Grosset et al., 2004). Diese AREs befinden sich meist auf ERG mRNAs (*early response gene*), wie z. B. den Zytokinen (Tumornekrosisfaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), *c-myc*, *c-fos*, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF)) und Hitzeschockproteinen (hsp70, hsc70). Diese Genprodukte benötigen eine

sehr präzise Steuerung ihrer räumlichen und zeitlichen Expression, da sie im Fall von externer Stimulation (z. B. Stress) sehr schnell für eine Immunantwort, Entzündungsreaktion oder für andere Stressreaktionen oder Reparaturmechanismen zur Verfügung stehen müssen. Daher werden mRNAs, die für solche regulatorischen Proteine kodieren, ständig transkribiert, prozessiert und aus dem Zellkern exportiert. In ruhenden, nicht gestressten Zellen werden diese mRNAs jedoch sehr schnell wieder abgebaut, da die durch sie kodierten Genprodukte nicht benötigt werden, bzw. eine permanente Expression von Zytokinen den gesamten Organismus stark schädigen und sogar zu dessen Tod führen kann (Lu et al., 2006b). Durch äussere Reize, wie Immunstimulation, UV-Licht oder Hitzeschock, ist die Zelle aber innerhalb kürzester Zeit in der Lage, die entsprechenden mRNAs zu stabilisieren, damit Zytokine, Hitzeschockproteine oder andere Proteine translatiert werden (Guhaniyogi and Brewer, G., 2001, Wilusz et al., 2001). Es wird vermutet, dass unterschiedliche Anordnungen und Typen von AREs diese unterschiedlichen Aktivitäten gewährleisten und auch für unterschiedliche Kontrollmechanismen im ARE-vermittelten mRNA-Abbau verantwortlich sind.

Durch irrtümliche Stabilisierung von kurzlebigen ARE mRNAs kann es auch zu Tumorbildungen (Dixon et al., 2001, Lebowitz et al., 1994) oder zu fehlgesteuerten Entzündungsreaktionen kommen (Jacob et al., 1996, Kontoyiannis et al., 1999, Lu et al., 2006b). Zum Beispiel führt eine anhaltende Stabilisierung von TNF $\alpha$  mRNA durch gezielte Deletion des AREs in Mäusen zu einer TNF $\alpha$  Überproduktion. Hierdurch wird eine chronische entzündliche Arthritis hervorgerufen (Kontoyiannis et al., 1999).

Das ARE kontrolliert die Stabilität der entsprechenden mRNA durch Interaktionen mit ARE-bindenden Proteinen (Guhaniyogi and Brewer, G., 2001). Inzwischen sind eine Reihe solcher Proteine identifiziert worden:

HuR ist ein ubiquitär exprimiertes Mitglied der ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*) Familie RNA bindender Proteine (Brennan and Steitz, J. A., 2001). HuR befindet sich hauptsächlich im Zellkern, ist als nukleozytoplasmatisches *Shuttle*-Protein aber auch im Zytoplasma nachgewiesen worden. HuR ist in der Lage, eine Vielzahl von mRNAs und alle drei ARE-Klassen zu binden. Die Bindung an mRNAs führt im Regelfall zu deren Stabilisierung (Chen et al., 2002, Dean et al., 2001, Fan and Steitz, J. A., 1998, Lal et al., 2004, Raineri et al., 2004). Eine Studie beschreibt



zudem HuR auch als ein Adapterprotein für den Kernexport der ARE mRNA *c-fos* (Gallouzi and Steitz, J. A., 2001).

Im Gegensatz dazu führen die RNA-bindenden Proteine AUF1 (*ARE/poly(U)-binding/degradation factor 1*), TTP (Tristetraprolin), BRF1 (*butyrate response factor 1*) und KSPR (*K homology splicing-regulatory protein*) zu einem schnellen Abbau von verschiedenen mRNAs.

Bei Tristetraprolin (TTP) handelt es sich um ein Mitglied einer kleinen Familie von Cys-Cys-Cys-His (CCCH) Zinkfingerproteinen (Carballo et al., 1998). TTP bindet und destabilisiert unterschiedliche ARE mRNAs wie z. B.  $\text{TNF}\alpha$ , GM-CSF, IL-2, IL-3 und *c-fos* mRNAs (Carballo et al., 1998, Lai and Blackshear, P. J., 2001).

AUF1 spielt in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle. Daher wird später noch genauer auf dieses RNA-bindende Protein eingegangen.

TIA-1 (*T cell intracellular antigen-1*) und dessen eng verwandte Form TIAR (TIA related protein) gehören zur Familie der Proteine, welche RNA-Erkennungsdomänen besitzen (*RNA recognition motif*, RRM) (Beck et al., 1996). Beide Proteine besitzen drei RRM Domänen in ihren N-terminalen Regionen, welche eine hochaffine Bindung mit AREs ermöglichen (Dember et al., 1996). Wie auch schon für viele andere Komponenten des hnRNP Komplexes beschrieben wurde, sind auch TIA-1 und TIAR in der Lage, zwischen Zellkern und Zytoplasma zu pendeln. Diese Proteine können regulierend in die Translation von Proteinen eingreifen, indem sie infolge von Stressinduktion einen Großteil der zytoplasmatischen mRNAs in die zuvor erwähnten *stress granules* (SG) rekrutieren (Kedersha et al., 1999) und dadurch die Initiation der Translation dieser mRNAs verhindern. In diesem Zusammenhang fungieren TIA-1 und TIAR während der Dauer einer Stressreaktion der Zelle als Inhibitoren der Translation.

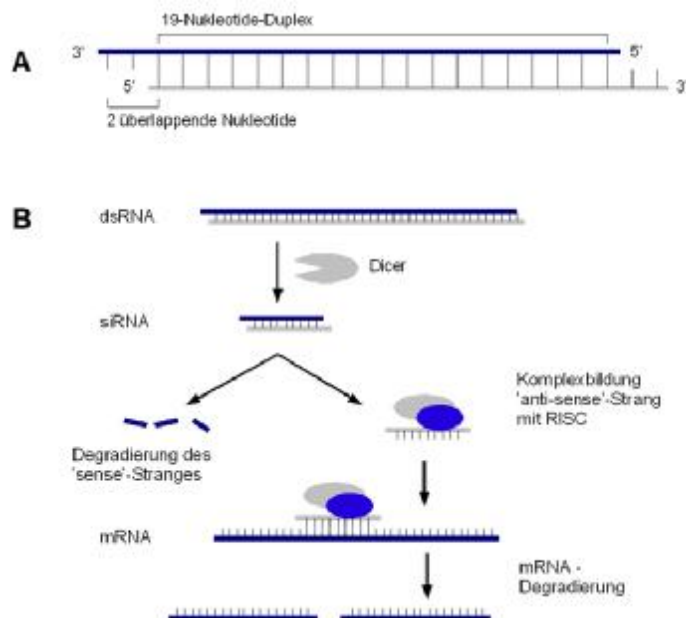
ERG mRNAs scheinen durch das Zusammenspiel dieser unterschiedlichen RNA-bindenden Proteine in ihrer Stabilität und ihrer Translation kontrolliert zu werden. Bis heute ist nicht geklärt, wie die unterschiedlichen ARE-bindenden Proteine auf molekularer Ebene zur Regulation der RNA-Stabilität, bzw. dessen Translation beitragen. Keines der genannten Proteine besitzt eine enzymatische Aktivität, was darauf hinweist, dass sie eventuell mit weiteren Proteinen interagieren, um ihre Funktion ausüben zu können.

### 3.2 RNA interference

Unter RNA *interference* (RNAi, auch *RNA-Silencing*) versteht man einen natürlichen Mechanismus in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen, der die Genexpression einzelner Gene hemmt. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Form der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression (Hannon, 2002, Meister and Tuschl, T., 2004).

Die Hauptrolle spielen kleine RNAs, die nicht für Proteine kodieren, sondern ihre Funktion durch spezifische Basenpaarung mit der Ziel-RNA ausführen. Diese RNAs können in zwei allgemeine Klassen aufgeteilt werden (Storz et al., 2005):

Zum einen gibt es RNAs, die auf dem gegenüberliegenden Strang ihrer Ziel-RNA kodiert sind und dadurch perfekte Komplementarität mit ihrer Ziel-RNA besitzen. In diesem Fall handelt es sich um die sogenannten *small interfering RNAs* (siRNAs). Sie spielen in niedrigen eukaryotischen Zellen (z. B. Pflanzen, Würmer und Insekten) neben der sequenz-spezifischen Inhibition der Genexpression auch eine große Rolle in der Virusabwehr (HIV-1, RSV, HPV, Polioviren). Die 21-25 Nukleotide umfassenden RNAs werden in der Regel aus einer doppelsträngigen RNA gebildet und führen zum Abbau der Ziel-RNA durch die zelluläre RNA-Degradationsmaschinerie. Bei dieser dsRNA als Vorläufer der siRNAs handelt es sich in vielen Fällen um Fremd-RNA, die z.B. durch Viren oder Transposons in die Zelle eingebracht wurde und nun zerstört werden soll. Die Vorläufer der siRNA werden durch die Ribonuklease RNase III (Dicer) in doppelsträngige siRNAs von ca. 22 Nukleotiden Länge geschnitten. Anschließend werden diese siRNAs in den RISC-Komplex (*RNA induced silencing complex*) eingebaut. RISC enthält neben vielen anderen Proteinen auch eine Helikase zum entwinden der siRNA, außerdem RecA, Endo- und Exonukleasen. Die Endonuklease Argonaute 2 (Ago 2) bindet die siRNA, schneidet zunächst deren Komplementärstrang und entfernt diesen. Die einzelsträngige siRNA bindet nun spezifisch die Substrat-mRNA. Dieser Komplex wird wiederum durch Ago 2 endonukleolytisch einmalig geschnitten. Die Restfragmente werden schließlich durch ebenfalls im RISC-Komplex vorhandene unspezifische Exonukleasen abgebaut (Bagasra and Prilliman, K. R., 2004, Hannon, 2002, Meister and Tuschl, T., 2004).



**Abb. 3 Aufbau einer siRNA und Mechanismus der RNA *interference***

Der allgemeine Aufbau einer siRNA ist in (A) gezeigt.

(B) Doppelsträngige RNA wird durch das Enzym Dicer in ca. 22 Nukleotide lange Fragmente geschnitten. Diese werden in den RISC-Komplex eingebaut, wo es durch das Enzym Ago2 zum Abbau des Hauptstranges kommt. Die einzelsträngige siRNA ist nun in der Lage, die komplementäre Sequenz ihrer Ziel-mRNA zu binden. Dadurch kommt es durch die RNA-Degradationsenzyme im RISC-Komplex zum Abbau der mRNA.

Eine weitere bekannte Gruppe kleiner regulatorischer RNAs sind die *microRNAs* (miRNAs). Sie werden auf separaten DNA-Abschnitten im Genom der Zelle kodiert (Pillai, 2005). Ein wichtiger Unterschied zwischen siRNAs und miRNAs ist, dass die miRNAs definierte und strangspezifische Enden besitzen, während die siRNAs überall auf der gesamten Länge der doppelsträngigen RNA-Vorlage generiert werden können.

Häufig befinden sich die Gene der miRNAs innerhalb von Intronsequenzen, die den durch die miRNA regulierten Genen benachbart sind. Durch die RNA-Polymerase II wird wie bei einer gewöhnlichen Vorläufer mRNA eine spezifisch lange RNA mit 5'-*cap*-Struktur und 3'-Polyadenylierung transkribiert. Durch einen nukleären Komplex wird hieraus ein etwa 60-75 Nukleotide langes Fragment geschnitten, welches überwiegend aus zwei gegenläufigen Abschnitten selbstkomplementärer RNA und der verbindenden 10-20 Nukleotide langen Schleife besteht und somit eine doppelsträngige RNA-*hairpin*-Struktur ergibt. Diese Struktur wird als die Vorläufer-

miRNA bezeichnet. Sie wird ins Zytoplasma exportiert und durch Dicer in eine doppelsträngige, 21 Nukleotide umfassende miRNA prozessiert. Anschließend wird diese doppelsträngige miRNA in eine dem RISC-Komplex sehr ähnliche Struktur eingebaut. Dort geschieht die weitere Prozessierung nach dem gleichen Prinzip wie bei den siRNAs (Bhattacharyya et al., 2006, Cullen, 2006).

Wie auch im siRNA-RISC-Komplex spielen in den miRNPs die Argonaut (Ago) Proteine eine wichtige Rolle (Liu et al., 2004, Meister and Tuschl, T., 2004, Pillai et al., 2004). Die Bindung von miRNAs an ihre Ziel-mRNA führt nicht wie bei der siRNA ausschließlich zu deren Abbau, sondern kann auch zur Blockierung der Translation dieser Transkripte führen, ohne dass diese abgebaut werden. Hierfür spielt die imperfekte Basenpaarung mit ihrer Ziel-RNA eine entscheidende Rolle (Storz et al., 2005). Der Mechanismus der Translationsinhibition durch miRNAs ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Es ist allerdings bekannt, dass die Ago Proteine zusammen mit den unterdrückten mRNAs in den bereits erwähnten zytoplasmatischen *processing bodies* (PBs) angereichert sind (Liu et al., 2005, Pillai, 2005, Sen and Blau, H. M., 2005). Dabei geht man davon aus, dass die Assoziation der mit *microRNAs* komplexierten mRNAs in den PBs erst erfolgt, wenn die Translationsinhibition bereits stattgefunden hat. Die Lokalisation der mRNA in den PBs führt schließlich zu deren Abbau. Neueste Untersuchungen ergaben, dass die Inaktivierung von mRNAs durch *microRNAs* durchaus auch reversibel sein kann. Es scheint die Möglichkeit zu bestehen, dass sich die miRNPs von den unterdrückten mRNAs lösen können, wodurch letztere wieder der Translationsmaschinerie zugeführt werden können. Für diesen Vorgang wird das RNA-bindende Protein HuR benötigt (Bhattacharyya et al., 2006). Dieser Mechanismus würde die Regulation der Genexpression durch miRNAs sehr viel dynamischer machen und könnte besser auf spezifische Bedürfnisse der Zelle reagieren (Bhattacharyya et al., 2006).

Inzwischen werden synthetische siRNAs eingesetzt, um mit Hilfe der RNA *interference* die Expression von spezifischen Zielgenen zu verringern. Durch die Transfektion von Zelllinien mit siRNAs, bzw. dessen Vorläufern wird durch die beschriebenen zellulären Mechanismen die mRNA des Zielgens spezifisch abgebaut. Die resultierende Verringerung der Genprodukte (*knockdown*) ermöglicht es, Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Genes zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Prinzip zum *knockdown* des AUF1-Gens angewendet.

### **3.3 Dendritische Zellen und der Oberflächenmarker CD83**

Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APC) und spielen eine zentrale Rolle im Immunsystem. Ihre Hauptaufgabe ist es, sowohl ruhende als auch naive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu stimulieren, indem sie Antigene aufnehmen und prozessieren, um sie schließlich auf ihrer Oberfläche im Kontext mit MHC-Molekülen zu präsentieren (Banchereau and Steinman, R. M., 1998, Mellman and Steinman, R. M., 2001).

Unreife DC befinden sich in peripheren, nicht-lymphoiden Geweben (Epithelien, Interstitien) und fungieren dort als Antigen-aufnehmende und -prozessierende Zellen (Banchereau et al., 2000, Mellman and Steinman, R. M., 2001). Die Aufnahme der Antigene durch Phagozytose zusammen mit weiteren inflammatorischen Reizen, lösen die terminale Differenzierung zu reifen dendritischen Zellen aus. Im Zuge dieser Reifung wandern die Zellen über afferente Lymphwege in sekundäre lymphoide Organe, wie Milz oder regionale Lymphknoten. Während dieser Wanderung prozessieren die DC die aufgenommenen Antigene und präsentieren sie schließlich an ihrer Zelloberfläche in Komplexen mit MHC Klasse I oder II Molekülen, wodurch es zur Stimulation der Antigen-spezifischen T-Lymphozyten kommt (Banchereau and Steinman, R. M., 1998, Banchereau et al., 2001, Lutz et al., 2002, Mellman and Steinman, R. M., 2001, Wan and Dupasquier, M., 2005). Die T-Zellen proliferieren und differenzieren, nachdem sie die MHC-Antigene durch ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt haben (Davis, 2004, Dustin and Chan, A. C., 2000).

Die Reifung der DC wird durch zahlreiche Zytokine beeinflusst, z. B. IL-1, TNF $\alpha$  und IL-4, aber vor allem GM-CSF (Flores-Romo, 2001, Gunn, 2003). Der Reifungsprozess zeichnet sich zusätzlich durch eine Veränderung des Phänotyps und der Funktion der dendritischen Zellen aus. Neben einer deutlichen morphologischen Veränderung kommt es auch zu einer massiven Neusynthese von Oberflächenproteinen (Banchereau et al., 2000). Während unreife DC kein CD83 auf ihrer Oberfläche tragen, ist dieses Protein auf reifen DC in großen Mengen vorhanden. Daher ist CD83 einer der bekanntesten Reifungsmarker dendritischer Zellen (Bell et al., 1999, Zhou and Tedder, T. F., 1996). Im Rahmen dieses

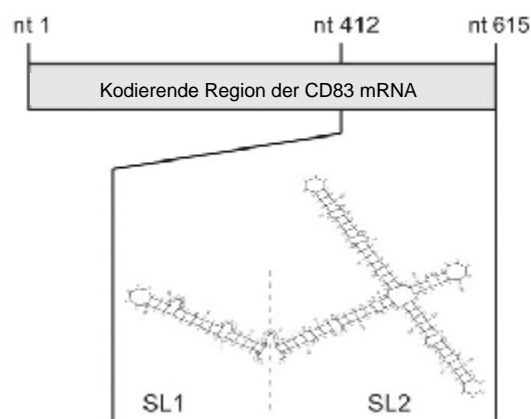
Reifungsprozesses wird zusätzlich die Expression anderer kostimulatorischer Moleküle gesteigert, wie zum Beispiel MHC-Klasse II, CD11a/c, CD80 und CD86 (Lechmann et al., 2001, Lechmann et al., 2002a).

CD83 wird auf der Oberfläche reifer DC und in geringeren Mengen auch auf T- und B-Zellen exprimiert, auf unreifen Vorläuferzellen wird es dagegen nicht gefunden (Kozlow et al., 1993, Zhou et al., 1992, Zhou and Tedder, T. F., 1995). Es handelt sich um ein 205 Aminosäuren großes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 40-45 kD. Aufgrund seiner Struktur wurde CD83 der Immunglobulin-Supergenfamilie zugeordnet. Das Protein besteht aus einem Signalpeptid, gefolgt von einer V-Typ Immunglobulin-ähnlichen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einem 39 Aminosäuren langen intrazellulären C-Terminus (Zhou et al., 1992). Die genaue Funktion von CD83 konnte bislang nicht eindeutig zugeordnet werden. Durch verschiedene Studien wird allerdings postuliert, dass CD83 eine wichtige Rolle in der effizienten Aktivierung von T-Zellen spielt. So ist zum Beispiel die CD83-Expression auf DC nach deren Infektion mit dem Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV1) stark reduziert. Infolgedessen verlieren die infizierten DC ihre immunstimulatorischen Eigenschaften (Kruse et al., 2000b). Andere Untersuchungen ergaben, dass eine Blockierung des Kernexports von CD83 mRNA ebenfalls zu einer verringerten Kapazität der T-Zell-Aktivierung führt (Kruse et al., 2000a). Ein weiterer Hinweis auf eine Funktion in der Stimulation von T-Zellen lieferte die Entdeckung einer löslichen Form von CD83. Dieses Protein besteht aus der extrazellulären Domäne von CD83 und führt zu einer starken Inhibition der T-Zell-Proliferation (Lechmann et al., 2001, Lechmann et al., 2002b, Scholler et al., 2002). Diese Entdeckung hat eine zusätzliche Bedeutung erhalten, als diese lösliche Form in humanem Blutserum von gesunden Patienten entdeckt wurde (Hock et al., 2001, Kozlow et al., 1993). Die immunsuppressiven Eigenschaften von löslichem CD83 konnten im Tiermodell auch anhand der Autoimmunerkrankung EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) untermauert werden. Hierbei konnten die mit der Krankheit einhergehenden Lähmungen durch Applikation von löslichem CD83 in Mäusen fast vollständig verhindert werden (Zinser et al., 2004a).

Die besondere Rolle von CD83 zeigt sich schon vor der Oberflächenexpression des Moleküls auf der Ebene der mRNA-Prozessierung. Kürzliche Studien ergaben, dass

die CD83 mRNA nicht wie der Großteil der zellulären mRNAs über den TAP/NXF1-Weg, sondern über den speziellen CRM1-Kernexportweg in das Zytoplasma befördert wird (Schutz et al., 2006, Zinser et al., 2004b). Damit gehört die CD83 mRNA zu einer kleinen Subpopulation an zellulären Transkripten, wie beispielsweise rRNAs oder snRNAs, die über diesen ungewöhnlichen Weg transportiert werden.

Wir haben in früheren Studien neue Einblicke in den Exportmechanismus von CD83 erlangt, indem wir die Beteiligung des RNA-bindenden Proteins HuR am Kernexport der CD83 mRNA nachweisen konnten (Prechtel et al., 2006). HuR repräsentierte bisher ein nukleozytoplasmatisches *Shuttle*-Protein, welches an ARE-enhaltende Sequenzen im 3'UTR von ERG-RNAs bindet und dadurch zur Stabilisierung der entsprechenden Transkripte beiträgt (Barreau et al., 2005). Nach neuesten Erkenntnissen bindet HuR ebenfalls hochspezifisch an ein strukturiertes RNA-Element im kodierenden Bereich der CD83 mRNA, welches als *Posttranscriptional Regulatory Element* (PRE) bezeichnet wurde (Prechtel et al., 2006). Dieses Element besteht aus zwei strukturierten Bereichen, die als SL1 und SL2 (SL = *Stem-loop*) bezeichnet werden. Dabei vermittelt HuR den Kernexport der CD83 mRNA und hat dabei keinen Einfluss auf deren Stabilität (Prechtel et al., 2006). Kürzlich wurde in diesem Zusammenhang auch der bekannte HuR-Ligand APRIL als Adapter identifiziert, der HuR mit dem CRM1-Kernexportrezeptor verbindet (Fries et al., 2007).

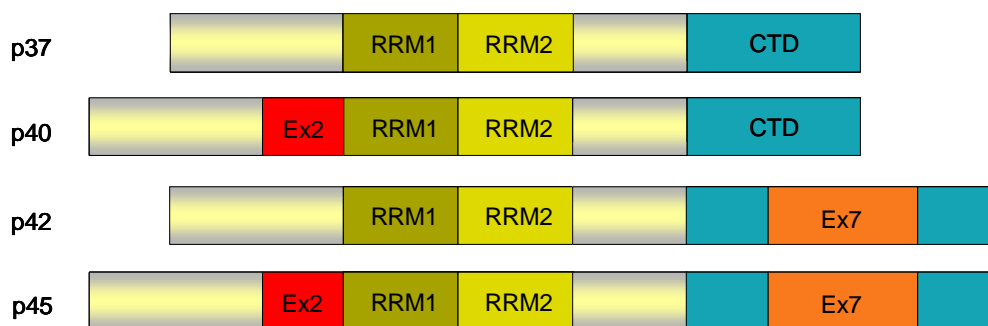


**Abb. 4** Theoretisch berechnete Struktur des *Posttranscriptional Regulatory Element* (PRE) (Prechtel et al., 2006).

Das strukturierte Element besteht aus zwei *stem loops* (SL1 und SL2) und befindet sich in der kodierenden Region der CD83 mRNA im Bereich der Nukleotide 412-615.

### 3.4 AUF1 – Ein RNA-bindendes Protein

Ein bekannter Antagonist von HuR in Bezug auf die ARE-vermittelte Stabilisierung von ERG mRNAs ist das Protein AUF1 (*ARE/poly(U)-binding/degradation factor 1*). Hierbei handelt es sich um das zuerst identifizierte ARE-bindende Protein (Brewer, 1991, Zhang et al., 1993). Es besteht aus einer Familie von vier Isoformen, die entsprechend ihrer Masse mit p37, p40, p42 und p45 bezeichnet sind. Alle Isoformen sind aus einer alternativ gespleißten Vorläufer mRNA hervorgegangen (Wagner et al., 1998, Wilson and Brewer, G., 1999). Sie unterscheiden sich durch ein 19 Aminosäuren umfassendes Exon 2 im N-Terminus (p40), ein Exon 7 mit 49 Aminosäuren im C-terminalen Bereich (p42) und durch die Insertion beider Exons bei der größten Isoform (p45). Die kleinste Isoform, AUF1p37, enthält keine dieser beiden Sequenzen.



**Abb. 5 Schematische Darstellung der vier Isoformen von AUF1.**

Die Isoform p40 enthält das Exon 2 (Ex2) im N-terminalen Bereich, p42 enthält das Exon 7 (Ex7) im C-terminalen Bereich, p45 besitzt beide Exons und p37 keine der beiden genannten Exons. Zusätzlich besitzen alle Isoformen zwei RNA *recognition motif* (RRM1+2) und eine C-terminale Domäne (CTD), die nur im ununterbrochenen Zustand (p37 + p40) ein putatives Kernlokalisierungssignal beinhaltet.

Die AUF1-Proteine gehören zur großen Familie der hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) und werden daher auch als hnRNP D bezeichnet (Wagner et al., 1998). AUF1 befindet sich hauptsächlich im Zellkern, ist aber in der Lage, zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma zu pendeln. Eine intakte C-terminale Region in den Isoformen p37 und p40 beinhaltet ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS), welches für den nukleären Import benötigt wird. Diese C-terminale Region ist in den beiden größeren Isoformen p42 und p45 durch das Exon 7 unterbrochen, was zu einer Aufhebung der Kernimportaktivität führt. Exon 7 wiederum enthält Sequenzen,



die den Kernexport der entsprechenden AUF1 Isoformen ermöglicht. Es wird vermutet, dass es durch Bildung von Heterokomplexen aus unterschiedlichen Isoformen zu einem „*Co-Shuttling*“ kommt (Chen et al., 2004, Sarkar et al., 2003a). AUF1 besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Klasse I und Klasse II AREs. Dies ist auf zwei zentrale RNA-Erkennungsmotive (RRM, RNA *recognition motif*) in Kombination mit einem Alanin-reichen Sequenzbereich im N-Terminus und einer kurzen Glutamin-reichen Region im C-terminalen Bereich zurückzuführen. Desweiteren scheint eine Multimerisierung der AUF1-Isoformen die Bindungseigenschaften an ARE-Sequenzen im 3'UTR von mRNAs zu unterstützen. Allerdings ist bisher wenig über die Stöchiometrie und Funktion der AUF1-Proteinkomplexe bekannt (Wilson et al., 1999). Bisher ergaben die meisten Untersuchungen in unterschiedlichen Zelllinien, dass eine Überexpression von AUF1 mit einem verstärkten ARE mRNA Abbau korreliert (Buzby et al., 1999, He and Schneider, R., 2006, Loflin et al., 1999, Sarkar et al., 2003b, Wilson and Brewer, G., 1999). Dabei besitzt die kleinste Isoform AUF1p37 die größte Destabilisierungsaktivität und geht von allen vier Isoformen die stärkste Bindung mit der ARE-Sequenz ein (Loflin et al., 1999, Sarkar et al., 2003b). Der Abbau von mRNA durch AUF1 wird mit der Assoziation von AUF1 mit den Proteasomen in Verbindung gebracht (Laroia et al., 1999). Andere Studien zeigen, dass die Rekrutierung von AUF1 zu den Exosomen und *Processing bodies* (*P bodies*) den Abbau der entsprechenden Ziel-mRNAs zur Folge hat (Kedersha et al., 2005). Ausserdem wurde eine Assoziation von AUF1 mit unterschiedlichen Proteinen gezeigt, die am Abbau von mRNA beteiligt sind, wie den Hitzeschockproteinen hsc70 und hsp70, dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G und dem polyA-Bindeprotein (PABP). Für den Abbau der mRNA ist es erforderlich, dass AUF1 von eIF4G abgespalten und Ubiquitin-abhängig in den Proteasomen abgebaut wird. Während eines Hitzeschocks ist hsp70 in der Lage, AUF1 im Zellkern zurückzuhalten und dadurch eine Stabilisierung von ARE-enthaltenen mRNAs zu erreichen (Laroia et al., 1999, Laroia and Schneider, R. J., 2002).

Bei AUF1 handelt es sich um ein Protein, das an den Serinen Ser<sup>83</sup> und Ser<sup>87</sup> phosphoryliert ist. Diese beiden Aminosäuren befinden sich im Exon 2, welches nur bei den Isoformen p40 und p45 exprimiert wird. Außerdem sind sie in relativer Nähe zum N-terminalen Ende der ersten RNA-bindenden Domäne lokalisiert (Wilson et al., 2003a). Durch Aktivierung von ruhenden monozytären Zellen gehen die

Phosphorylierungen verloren. Diese Beobachtung geht mit der verringerten Bindung von AUF1p40 an IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  mRNAs einher. Zusätzlich kommt es zu einer Stabilisierung dieser ERG mRNAs (Wilson et al., 2003b). Diese Ergebnisse könnten auf eine Regulation der Stabilität von ERG mRNAs durch die Phosphorylierung von AUF1 hindeuten.

Kürzlich wurde gezeigt, dass AUF1-defiziente Mäuse (AUF1<sup>-/-</sup>) nach einer LPS-induzierten Immunabwehr einen schweren endotoxischen Schock erlitten, der durch eine Überproduktion von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hervorgerufen wurde. Diese Überproduktion war darauf zurückzuführen, dass durch fehlendes AUF1 keine Destabilisierung der entsprechenden mRNAs stattfinden konnte. AUF1 spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Abschwächung der Entzündungsreaktion, indem es den selektiven Abbau proinflammatorischer Zytokine unterstützt (Lu et al., 2006b). Der Mechanismus, mit dem AUF1 den schnellen Abbau von ARE-enhaltener RNA fördert, ist bis heute nur ansatzweise verstanden.

Es gibt allerdings auch Studien, die einen stabilisierenden Effekt von AUF1 unter bestimmten Umständen beschreiben. Beispielsweise wurde gezeigt, dass eine Überexpression von AUF1 in NIH 3T3 Zellen zu einer Stabilisierung von ARE-enhaltenen Reporter-RNAs führt (Xu et al., 2001). In diesem Zusammenhang wurde AUF1 auch als Bestandteil des  $\alpha$ -Globin mRNA-Stabilitätskomplexes beschrieben (Kiledjian et al., 1997, Loflin et al., 1999).

Andere Untersuchungen lieferten Hinweise darauf, dass AUF1 nicht nur die Stabilität der mRNA beeinflussen kann, sondern auch auf der Ebene der Translation die Genexpression regulieren kann. So ist z. B. die Translation von *c-myc* mRNA durch die Reduktion der AUF1-Expression in einer ARE-abhängigen Weise reduziert. Dabei bleibt die vorhandene Menge an *c-myc* mRNA unberührt (Liao et al., 2007). Darüberhinaus wurde AUF1 zusammen mit dem Hitzeschockprotein hsp70 im Komplex mit der Laktatdehydrogenase M (LDH) in den translatorisch aktiven Fraktionen der Polysomen nachgewiesen. LDH ist in der Lage, die mRNA des *granulocyte-macrophage colony stimulating factors* (GM-CSF) zu binden. Die Lokalisation des LDH-AUF1-hsp70-Komplexes in den Polysomen entsteht nur im Fall von gebundener GM-CSF mRNA und scheint an der aktiven Translation beteiligt zu sein (Pioli et al., 2002). Eine weitere Studie konnte eine Interaktion von AUF1 mit dem Protein DENR/DRP nachweisen. Dieses Protein spielt eine Rolle bei der

Identifikation des Startcodons bei der Translationsinitiation und geht seinerseits Interaktionen mit dem Protein MCT-1 ein, welches mit der *cap*-Struktur wechselwirken und auf diesem Weg die Translation unterschiedlicher Transkripte steuern kann. AUF1 scheint durch die Regulation der DENR/DRP Proteinmengen in diesen Mechanismus eingreifen zu können (Mazan-Mamczarz and Gartenhaus, R. B., 2007).

Die beiden RNA-bindenden Proteine HuR und AUF1 wechselwirken mit einer großen Zahl von ERG mRNAs, die ein ARE beinhalten. Dabei führen sie meist gegensätzliche Einflüsse auf die Stabilität der jeweiligen Ziel-mRNA aus. Endogenes HuR und AUF1 sind in der Lage, dieselbe Ziel-mRNA an unterschiedlichen Sequenzen zu binden. Dabei können beide Proteine gleichzeitig an dieselbe mRNA binden oder aber miteinander konkurrieren, so dass nur eines der beiden Proteine eine Bindung mit der mRNA eingehen kann (Lal et al., 2004). Diese Bedingungen können durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst sein, wie beispielsweise die RNA Sequenz, das Mengenverhältnis der Proteine, die Stresssituation der Zelle und den Ort des Ribonukleoprotein-Komplexes in der Zelle (Blaxall et al., 2002, Lal et al., 2004). Die These, dass das Verhältnis zwischen HuR und AUF1 eine wichtige Rolle in der Regulation des mRNA-Abbaus spielen könnte, wird auch durch die Erkenntnis unterstützt, dass beide Proteine nahezu die gleiche Gewebeverteilung besitzen. Sie werden beide am stärksten in den Lymphozyten des Thymus und der Milz exprimiert (Lu and Schneider, R. J., 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass es auch eine direkte Wechselwirkung zwischen HuR und AUF1 gibt, was die enge funktionelle Interaktion dieser beiden RNA-bindenden Proteine unterstreicht (David et al., 2007).

Es wurde bereits nachgewiesen, dass HuR am Export der CD83 mRNA durch dessen Bindung an ein strukturiertes Element im kodierenden Bereich der CD83 mRNA beteiligt ist (Prechtel et al., 2006). Für die vorliegende Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass AUF1 als bekannter Gegenspieler von HuR im Zusammenhang mit ARE-enthaltenen mRNAs ebenfalls an der posttranskriptionellen Prozessierung der CD83 mRNA beteiligt ist.

### **3.5 Ziel dieser Arbeit**

CD83 ist ein Oberflächenprotein, das auf reifen dendritischen Zellen (DC) exprimiert wird. CD83 spielt eine wichtige Rolle in der effizienten DC-vermittelten Aktivierung von T-Zellen. Der genaue Mechanismus ist bisher allerdings noch nicht bekannt.

Die genaue Kenntnis der Mechanismen, die der CD83 Expression zugrunde liegen, könnte nicht nur das Verständnis der posttranskriptionellen Genregulation, sowie der DC-vermittelten T-Zell Aktivierung verbessern, sondern auch wichtige Grundlagen und neuartige Zielstrukturen für die zukünftige Entwicklung potentieller immuntherapeutischer Ansätze liefern.

Wir konnten in früheren Studien ein neues *cis*-aktives Element innerhalb der kodierenden Region der CD83 mRNA identifizieren, welches als Bindestelle für HuR, einem nukleozytoplasmatischem *Shuttle*-Protein, dient (Prechtel et al., 2006). Die Interaktion von HuR mit der CD83 mRNA vermittelt dabei deren Kernexport.

Das Ziel dieser Dissertation war es, die Rolle von AUF1 als bekannter Antagonist von HuR in der Regulation der CD83-Genexpression zu untersuchen. Hierdurch sollten weitere Einblicke in die posttranskriptionelle Prozessierung der CD83 mRNA gewonnen werden. Dazu sollten zuerst Bindungsstudien durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob AUF1 in der Lage ist, das *cis*-aktive Element der CD83 mRNA direkt zu binden. Darüberhinaus sollte der regulatorische Einfluss einer möglichen AUF1-Bindung auf die Expression von CD83 funktionell charakterisiert werden.

## 4 Material

### 4.1 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> XL2-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F <sup>-</sup> proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn 10 (tet <sup>R</sup> ) Amy Cam <sup>R</sup> ] (Stratagene, Heidelberg)
<i>Escherichia coli</i> XL10-Gold	Tet <sup>r</sup> Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F <sup>'</sup> proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ] (Statagene, Heidelberg)
<i>Epicurian Coli</i> <sup>®</sup> XL1-Blue	<i>supercompetent cells</i> recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F <sup>'</sup> proAB lacI <sup>r</sup> ZΔM15 Tn 10 (Tet <sup>r</sup> )] <sup>c</sup> (Stratagene, La Jolla, CA)
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) (Stratagene, Heidelberg)

### 4.2 Eukaryotische Zelllinien

COS7	(CV1 Origin SV40), Zelllinie, die durch Behandlung der Zelllinie CV1 mit deletiertem SV40-Virus entstanden ist und das große T-Antigen von SV40 überexprimiert (ATCC Nr. CRL-1651). Vektoren, die den SV40 Replikationsursprung enthalten, erlauben deshalb eine starke transiente Überexpression. CV1 ist aus immortalisierten Nierenzellen der grünen Meerkatze etabliert worden (JENSEN et al., 1964).
293T	Humane, embryonale Nierenzelllinie; exprimiert das große T-Antigen des SV40 Virus (ATCC Nr. CRL-11268).

HeLa <i>tet off</i>	Humane, epitheliale Zelllinie, die aus einem Cervix Karzinom isoliert wurde und den Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator tTA stabil exprimiert.
Jurkat T	Humane T-Lymphozytenzelllinie. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ralph Kehlenbach (Universität Göttingen).
MonoMac6	Humane Monozyten-Zelllinie (Ziegler-Heitbrock et al., 1988).
U937	Humane Monozyten-Zelllinie (ATCC Nr. CRL-1593.2).

## 4.3 Medien

### 4.3.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

#### **Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)**

10 g/l Bacto-Typton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 8 g/l NaCl; 1 g/l Glucose. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf pH 7,2 eingestellt.

#### **Luria-Bertani-Agarplatten (LB-Platten)**

15 g Agar wurden in 1 l LB-Medium gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 55°C wurde 1 mg/ml Ampicillin zugegeben.

#### **NZY-Broth**

10 g NZ Amin (Casein Hydrolysat), 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl wurden in einem Liter Wasser gelöst und nach Einstellen des pH-Wertes mit NaOH auf 7,5 autoklaviert. Vor Gebrauch wurden 12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>, 12,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> und 10 ml einer 2 M steril-filtrierte Glukoselösung oder 20 ml einer 20% (w/v) Glukoselösung zugegeben und das Ganze steril filtriert.

#### **Thym-Broth** (zur Herstellung kompetenter Bakterien)

2% (w/v) Bacto-Trypton, 5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 0,1 M NaCl, 0,01 M MgCl<sub>2</sub>.

#### 4.3.2 Medien für Gewebekulturen

**DMEM** (*Dulbeccos Modified Eagle Medium*; Biochrom, Berlin)

Zur Kultivierung von COS7- und HeLa-Zellen;

Zugabe von 10% (v/v) FKS, 3,75 mg/ml NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM L-Glutamin, teilweise 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin.

**DMEM** ohne L-Cystein/Methionin (Gibco Ltd. Schottland)

Depletionsmedium zur [<sup>35</sup>S]-Markierung von Proteinen.

**RPMI-1640 Medium** (Gibco BRL, Eggenstein)

Zur Kultivierung von Jurkat- und MonoMac6-Zellen;

Zugabe von 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, teilweise 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin.

**OptiMEM** (Gibco BRL, Eggenstein)

Serumreduziertes Medium zur Transfektion von Zellen.

#### 4.3.3 Medien für primäre Zellen

**RPMI-1640 Medium** (Gibco BRL, Eggenstein)

Zur Kultivierung von Monocyten / Dendritischen Zellen aus Buffy Coats;

Zugabe von 5 ml HEPES (1 M) pH 7,0; 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin und 1% humanes, inaktiviertes AB Serum (PAN Biotech, Aidenbach); (DC-RPMI).

#### 4.3.4 Medienzusätze

Chloroquine

Sigma (München)

Cycloheximid

Antibiotikum, wirkt hemmend auf die Translation in Eukaryoten, was zur Inhibierung der Proteinsynthese und somit zu Zellwachstumsarrest und Zelltod führt; Sigma (St. Louis)

Dialysiertes FKS	hitzeinaktiviert bei 56°C für 30 min.; PAN Biotech (Aidenbach)
DMSO	Sigma (München)
Fötale Kälber-Serum (FKS)	hitzeinaktiviert für 30 min. bei 56°C; Gibco BRL (Eggenstein) oder Biomol (Hamburg) oder PAA (Linz)
Fungizone	Gibco BRL (Eggenstein)
L-Glutamin	Sigma (München)
Ionomycin	Sigma (München)
NaHCO <sub>3</sub>	7,5% (w/v) Fertiglösung, Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL (Eggenstein)
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i> ; Sigma (München)
Puromycin	Sigma (München)
Sodium Pyruvat	100 mM Fertiglösung, Biochrom (Berlin)
TRAN <sup>35</sup> S-LABEL™	MP Biomedicals (Irvine, CA)
Trypsin/EDTA	0,25% Lösung in 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 5 mM D(+)Glucose, 25 mM Tris/HCl, 0,01% EDTA, pH 7,0

## 4.4 Nukleinsäuren

### 4.4.1 Oligonukleotide

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide wurden von den Firmen Eurogentec (Seraing, Belgien), MWG Biotech (Ebersberg) und Sigma ARK (Taufkirchen) bezogen.

Die Sequenzen sind in 5'→3' Orientierung notiert. Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind durch Fettdruck hervorgehoben, das entsprechende Restriktionsenzym ist in Klammern angegeben. Nukleotid-Austausche sind durch Unterstreichung hervorgehoben.



*Oligonukleotide zur PCR-Amplifikation von cDNA*

- AUF1\_s2    GGTGAAGTTGTAGACTGCACTC  
5'Primer zur Amplifikation von AUF1 cDNA
- AUF1\_as2    GCTGATATTGTTCTTCGACATGG  
3'Primer zur Amplifikation von AUF1 cDNA
- CD83\_s    GGTGAAGGTGGCTTGCTCCGAAG  
5'Primer zur Amplifikation von CD83 cDNA
- CD83\_as    GAGCCAGCAGCAGGACAATCTCC  
3'Primer zur Amplifikation von CD83 cDNA
- GAPDH\_s    TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT  
5'Primer zur Amplifikation von GAPDH cDNA
- GAPDH\_as    CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC  
3'Primer zur Amplifikation von GAPDH cDNA
- HH70    ATTTAAG**GATCCCC**ATGTCTGGAGGAGCAGTTCGGCG (BamHI)  
5'PCR-Primer zur Klonierung der AUF1 Sequenz aus pET14b in  
pGEX-5x-1 und pBC12/CMV-MCS2, Einführung einer BamHI-  
Schnittstelle.
- HH71    ATTTAA**CTCGAG**TTAGTATGGTTTGTAGCTATTTTGATGAC (XhoI)  
3'PCR-Primer zur Klonierung der AUF1 Sequenz aus pET14b in  
pGEX-5x-1, Einführung einer XhoI-Schnittstelle.
- HH72    ATTTAA**CTCGAG**GTATGGTTTGTAGCTATTTTGATGAC (XhoI)  
3'PCR-Primer zur Klonierung der AUF1 Sequenz aus pET14b in  
pBC12/CMV-MCS2-Flag; Einführung einer XhoI-Schnittstelle; kein  
Stopcodon.

*Oligonukleotide für DNA-Sequenzierung*

pGEXseq\_fw CCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAG

5'Sequenzierprimer für GST-Fusionsproteine; annealt am Ende der GST-Sequenz in pGEX-5x-1.

pGEXseq\_rev CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG

3'Sequenzierprimer für pGEX5x-1 Vektor von 3' nach 5'.

MCS2#657s CAGAGCTCGTTTAGTGAAC

5'Sequenzierprimer für pBC12/CMV-MCS2.

MCS2#952as GGTGTGTAGAAGAATCCAC

3'Sequenzierprimer für pBC12/CMV-MCS2.

*Oligonukleotide zur Herstellung von kurzen DNA-Bereichen (durch Hybridisierung)*

FLAGneu1 **TCGAGGGAGGCGACTACAAAGACGATGACGACAAGTAA**  
**GCTAGCATT** (XhoI/NheI/XbaI)

5'Oligonukleotid zur Herstellung von Flag zur Fusion an AUF1 in pBC12/CMV.

FLAG neu2 **CTAGAATGCTAGCTTACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTC**  
**GCCTCCC** (XbaI/NheI/XhoI)

3'Oligonukleotid zur Herstellung von Flag zur Fusion an AUF1 in pBC12/CMV.

*Oligonukleotide für TaqMan-PCR*

1994sCD83 CTG TAC CAG CCC AGA TGT T

5'Oligonukleotid für CD83-TaqMan PCR

2207asCD83 GCA CTC TTC TTT ATT GCT TCT T

3'Oligonukleotid für CD83-TaqMan PCR

276sGAPDH	GTC ATC AAT GGA AAT CCC ATC A 5'Oligonukleotid für GAPDH-TaqMan PCR
485asGAPDH	TGG TTC ACA CCC ATG ACG AA 3'Oligonukleotid für GAPDH-TaqMan PCR
301pbGAPDH	5'-(FAM)-TCT TCC AGG AGC GAG ATC CCT C-(TAMRA)-3' Sonde für GAPDH-TaqMan PCR

#### *Sonstige Oligonukleotide*

Oligo (dT)	TTTTTTTTTTTTTTTT Oligonukleotid zur cDNA Synthese aus zellulärer mRNA.
CD83-Sonde	GCAAGTCCACATCTTCGGAGCAAGCCACCTT Oligonukleotid zur Herstellung einer radioaktiv markierten, CD83-spezifischen DNA-Sonde.

#### 4.4.2 Plasmid-DNA

##### *Expressionsvektoren*

##### **pcDNA3**

Dieser Vektor enthält den CMV-IE Promotor, der für eine starke Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen geeignet ist und die PolyA-Stelle des Rinder Wachstumshormon Gens (BGH). Darüberhinaus enthält der Vektor einen SV40-Replikationsursprung, der eine Überexpression in COS7 und 293T Zellen erlaubt, da diese das große SV40-T-Antigen exprimieren, wodurch vermutlich eine Replikation des Vektors in der transfizierten Zelle stattfindet (Naim and Roth, M. G., 1994). Weiterhin beinhaltet der Vektor eine multiple Klonierungsstelle zur Insertion von codierenden Sequenzen, die zudem von einem T7 und einem Sp6 RNA Promotor flankiert wird. Dies erlaubt zusätzlich die *in vitro* Transkription von RNA (Invitrogen).

**pBC12/CMV**

Beinhaltet den konstitutiven CMV-IE Promotor und die Ratten Präpro-Insulin II Polyadenylierungsstelle (Cullen, 1986) zur Expression in Säugerzellen.

**pGEX-5x-1**

Bakterieller Expressionsvektor. Rekombinante Proteine werden unter der Kontrolle des Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren tac-Promotor-/lac-Operator-Systems als Fusionsprotein mit N-terminaler Gluthathion-S-Transferase (GST) exprimiert. Der GST-Anteil ermöglicht die Aufreinigung des Fusionsproteins aus Bakterienkulturen, wobei im Anschluss an die Aufreinigung der GST-Anteil durch eine Protease (Faktor Xa) abgespalten werden kann (Pharmacia, Freiburg).

**pRL/CMV**

In diesem Vektor wird das Gen der *Renilla*-Luciferase (Anthozoa, *Renilla Reniformis*) unter dem konstitutiven CMV-IE-Promotor exprimiert. Er wird als interne Kontrolle für Reporteranalysen eingesetzt (Promega, USA).

*Zur Verfügung gestellte Plasmide*

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pcDNA3-CD83-wt	Enthält die gesamte humane CD83 Sequenz, einschließlich 5' und 3'UTRs, mit ATG und Stop-Codon	Hauber (HPI, Hamburg)
pcDNA3-CD83-PRE	Enthält das PRE-Element von CD83	Hauber (HPI, Hamburg)
pcDNA3-CD83-PRE $\Delta$ sub1	Enthält das PRE-Element von CD83, wobei Subloop 1 deletiert ist	Chemnitz (HPI, Hamburg)
pcDNA3-CD83-PRE $\Delta$ sub2	Enthält das PRE-Element von CD83, wobei Subloop 2 deletiert ist	Chemnitz (HPI, Hamburg)
pcDNA3-CD83-PRE $\Delta$ sub3	Enthält das PRE-Element von CD83, wobei Subloop 3 deletiert ist	Chemnitz (HPI, Hamburg)
pcDNA3-Firefly Luc-PRE	Enthält die Sequenz der Firefly-Luziferase und am 3'Ende das CD83-PRE-Element	Hauber (HPI, Hamburg)

pcDNA3-Firefly Luc	Enthält die Sequenz der Firefly-Luziferase	Hauber (HPI, Hamburg)
pUHC-CD83-wt	Enthält die gesamte humane CD83 Sequenz, einschließlich 5' und 3'UTRs unter der Kontrolle eines tet-off-Promotors	Chemnitz (HPI, Hamburg)
pcDNA3-TNF $\alpha$ ARE	Enthält das ARE-Element von TNF $\alpha$	Hauber (HPI, Hamburg)
pGEM-RRE	Enthält das RRE-Element aus HIV-1	Hauber (HPI, Hamburg)
pLKO.1-puro-AUF1	Lentiviraler Vektor, enthält die siRNA-Sequenz spezifisch gegen AUF1.	Sigma (St. Louis, USA)
pLKO.1-puro-SD	Lentiviraler Vektor, enthält eine unspezifische siRNA-Sequenz (SD, <i>scramble duplex</i> ).	Sigma (St. Louis, USA)

#### Neu konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pGEX-5x-1-AUF1p37	Enthält die Sequenz von humanem AUF1p37
pGEX-5x-1-AUF1p40	Enthält die Sequenz von humanem AUF1p40
pGEX-5x-1-AUF1p42	Enthält die Sequenz von humanem AUF1p42
pGEX-5x-1-AUF1p45	Enthält die Sequenz von humanem AUF1p45
pBC12/CMV-MCS2-AUF1p37-Flag	Enthält die Sequenz von humanem AUF1p37 mit Flag-Tag am 3'Ende
pBC12/CMV-MCS2-AUF1p40-Flag	Enthält die Sequenz von humanem AUF1p40 mit Flag-Tag am 3'Ende
pBC12/CMV-MCS2-AUF1p42-Flag	Enthält die Sequenz von humanem AUF1p42 mit Flag-Tag am 3'Ende
pBC12/CMV-MCS2-AUF1p45-Flag	Enthält die Sequenz von humanem AUF1p45 mit Flag-Tag am 3'Ende

### 4.4.3 Sonstige Nukleinsäuren

#### *DNA-Längenstandards*

100 bp DNA ladder	New England Biolabs (Frankfurt)
GeneRuler <sup>®</sup>	Fermentas (St. Leon-Roth)
SmartLadder <sup>®</sup>	Eurogentec (Seraing, Belgien)

#### *Radioaktiv markierte Nukleotide*

$\alpha$ [ <sup>32</sup> P]-dATP	Hartmann Analytik (Braunschweig)
$\alpha$ [ <sup>32</sup> P]-UTP	Hartmann Analytik (Braunschweig)
$\gamma$ [ <sup>32</sup> P]-ATP	Hartmann Analytik (Braunschweig)

#### *Nukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion*

dNTPs	Roche (Mannheim)
-------	------------------

## 4.5 Enzyme

### 4.5.1 Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Gibco/BRL (Karlsruhe) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen und in den mitgelieferten Puffersystemen nach den Angaben der Hersteller verwendet.

### 4.5.2 Sonstige Enzyme

#### Alkalische Kalbsphosphatase

( <i>Calf Intestinal Phosphatase</i> , CIP)	New England Biolabs (Ipswich, MA)
Pwo-Polymerase	Roche (Mannheim)
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega (Madison, WI)
PNGase F	New England Biolabs (Ipswich, MA)

## 4.6 *Proteinstandards*

7B-Marker	Sigma (München)
Rainbow [ <sup>14</sup> C]Methylated Protein Marker	Amersham Biosciences (Freiburg)

## 4.7 *Antikörper*

### 4.7.1 *Primäre Antikörper*

#### **Anti-AUF1**

Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, gerichtet gegen alle vier Isoformen des humanen AUF1. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Hermann Gram, Novartis (Basel). Im WB 1:3000 eingesetzt.

#### **Anti-CD83**

Monoklonaler Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen humanes CD83; Klon HB15a; Acris Antibodies GmbH (Hiddenhausen), Best. Nr.: SM1176P. Im WB 1:1000 eingesetzt.

#### **Anti- $\alpha$ Tubulin**

Monoklonaler Antikörper aus der Maus, erkennt  $\alpha$  Tubulin; Sigma (München), Best. Nr.: T5168. Im WB 1:2000 eingesetzt.

#### **Anti-GST**

Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen; erkennt GST. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Joachim Hauber (HPI, Hamburg). Im WB 1:500 eingesetzt.

#### **Anti-Flag<sup>®</sup> M2 Monoclonal Antibody**

Monoklonaler IgG<sub>1</sub> Antikörper aus der Maus, erkennt das Flag-Epitop und demzufolge entsprechende Fusionsproteine; dabei wird Flag sowohl am N-Terminus, am Met-N-Terminus oder am C-Terminus der Flag-Fusionsproteine detektiert; Sigma (Taufkirchen/ München), Best. Nr. F3165.

Im WB 1:1000 eingesetzt.

**Anti-CA (183)**

Monoklonaler Antikörper aus der Maus, erkennt eine Peptidsequenz im p24-Capsidprotein (NIH, Bethesda, MD). Wurde für den p24-ELISA eingesetzt.

**Anti-Capsid (rabbit)**

Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen. Erkennt p24-Capsidprotein. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Klaus Wieggers (HPI, Hamburg). Wurde für den p24-ELISA eingesetzt.

*4.7.2 Sekundäre Antikörper***Anti-Maus**

Mit Peroxidase gekoppelter anti-Maus Antikörper aus der Ziege (Dianova, Hamburg); im WB 1:5000 eingesetzt.

**Anti-Kaninchen**

Mit Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege (Dianova, Hamburg); im WB 1:5000 eingesetzt.

*4.7.3 Antikörper zur FACS Analyse***PE anti-human CD83**

Monoklonaler PE-konjugierter IgG Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen humanes CD83; Klon HB15e; BD Biosciences (Pharmingen), Best. Nr.: 556855.

**PE anti-human CD14**

Monoklonaler PE-konjugierter IgG Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen humanes CD14; BD Biosciences (Pharmingen), Best. Nr.: 555398.

**PE anti-human CD11c**

Monoklonaler PE-konjugierter IgG Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen humanes CD11c; BD Biosciences (Pharmingen), Best. Nr.: 555392.



### **FITC-labeled anti-*human* HLA DR**

Monoklonaler FITC-konjugierter IgG Antikörper aus der Maus, gerichtet gegen HLA DR, das humane Klasse II Antigen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Major histocompatibility complex, MHC). HLA-DR ist ein Transmembran-Glycoprotein, das hauptsächlich auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert ist.

BD Biosciences (Pharmingen), Best. Nr.: 555811.

## **4.8 Reagenzsysteme (Kits)**

Biorad Protein Assay (Bradford-Reagenz)	Biorad (München)
DNA Maxipräp-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA Minipräp-Kit	Qiagen (Hilden)
Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay System	Promega (Heidelberg)
Eppendorf <sup>®</sup> MasterMix (2,5x)	Eppendorf (Hamburg)
PNGaseF-Kit	NEB (Ipswich, USA)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QuikChange <sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, CA)
Rapid DNA Ligation Kit	Roche (Mannheim)
Riboprobe T7-Transcription System	Promega (Heidelberg)
Terminale Transferase Kit	Roche (Mannheim)
Sequenzierkit: Big Dye Terminator Kit Version 1.1	ABI (Weiterstadt)
Platinum <sup>®</sup> qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Platinum <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG	Invitrogen (Carlsbad, CA)

## **4.9 Chemikalien und Materialien**

### **4.9.1 Feinchemikalien**

Sonstige verwendete nicht spezifisch aufgeführte chemische Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences (Freiburg), Bayer (Leverkusen), BioRad (München), Roche (Mannheim), Calbiochem (La Jolla, USA), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco BRL

(Eggenstein), Merck (Darmstadt) Pharmacia (Uppsala, Schweden), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München), PEQLAB (Erlangen), Biomol (Hamburg).

In der Regel wurde der Reinheitsgrad „zur Analyse“ verwendet.

Acrylamid/Bis (29:1)	Biorad (München)
Agarose	PEQLAB (Erlangen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Amplify (Szintillationslösung)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Aprotinin	Biomol (Hamburg)
Bradford Reagenz	BioRad (München)
Bromphenolblau	Sigma (München)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Coomassie G250	Fluka (Neu-Ulm)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth (Karlsruhe)
Dextran	Sigma (München)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (München)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid (EtBr)	Biomol (Hamburg)
Glutathionsepharose 4B	Amersham Biosciences (Freiburg)
IPTG	PEQLAB (Erlangen)
Kälberserumalbumin (BSA)	Sigma (München)
Leupeptin	Biomol (Hamburg)
Luminol	Sigma (München)
Magermilchpulver	D. und F. Wulf und Co (Hamburg)
Nonidet-P40 (Igepal)	Sigma (München)
NKS (Neugeborenen Kälber-Serum)	Biochrom (Berlin)
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Biorad (München)
para-Cumarinsäure	Sigma (München)
Pefabloc	Biomol (Hamburg)
PepstatinA	Biomol (Hamburg)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma (München)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck (Darmstadt)
Polybren	Sigma (München)

---

Polyethylenimin (PEI)	Polysciences (Eppelheim)
Protein G Sepharose (PGS)	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
TriFast	PEQLAB (Erlangen)

#### 4.9.2 Materialien

Protran <sup>®</sup> Nitrocellulosemembran	Schleicher&Schüll (Dassel)
Röntgenfilme	Biomax MR, Kodak (Stuttgart)
Filterpapier	Schleicher&Schüll (Dassel)
Sterilfilter 0,45 µm / 0,22 µm	Costar (Cambridge, MA USA)
Dialysekammern	PIERCE, Perbio (St. Augustin)
Säulchen für Proteinkonzentrierung	Nanosep 10 K, Pall GmbH (Dreieich)
Whatman 3MM Papier	Whatman (Maidstone)

#### 4.10 Lösungen und Puffer

Bakterien-Lysis-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 500 mM NaCl 1% (v/v) Tween 20 Lysozym (1 Spatelspitze pro 10 ml) Aprotinin, Leupeptin (1000x) Pepstatin A, Pefabloc (200x)
Coomassie-Färbelösung	0,5% (w/v) Coomassie Blau G250 50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig
DEPC-Wasser	0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat) in MQ-H <sub>2</sub> O, über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren, 2x autoklavieren

---

ECL-Entwicklerlösung 1	18 ml H <sub>2</sub> O 2 ml 1M Tris-HCl, pH 8,5 88 µl para-Cumarinsäure (74 mg / 5 ml DMSO) 200 µl Luminol (443 mg / 10 ml DMSO)
ECL-Entwicklerlösung 2	18 ml H <sub>2</sub> O 2 ml 1M Tris-HCl, pH 8,5 30 µl 30% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
E1A-Puffer zur Zellyse	50 mM HEPES 150 mM NaCl 0,1% (v/v) NP-40 pH mit KOH zwischen 7,0 und 7,5 einstellen Lösung sterilfiltrieren
Farbmarker für Agarosegele	40% (w/v) Saccharose 1 mM EDTA III 0,25% (w/v) Bromphenolblau
Gel-Fixierungslösung	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Eisessig
10x Ladepuffer für DNA-Agarose-Gele	40% Saccharose 1 mM EDTA III 0,25% Bromphenolblau
2x Laemmli-Ladepuffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS 20% (v/v) Glyzerin 0,2 M DTT 0,5% (w/v) Bromphenolblau

---

6x Laemmli-Ladepuffer	375 mM Tris-HCl pH 6,8 1,2% (w/v) SDS 60% (v/v) Glycerin 0,2 M DTT 1,5% (w/v) Bromphenolblau
MOPS-Puffer (20x)	0,8 M MOPS (3-(N-Morpholin)-Propansulfonsäure) 200 mM NaAc 20 mM EDTA à autoklavieren
PBS-Puffer ( <i>Phosphat buffered Saline</i> , ohne CaCl <sub>2</sub> und MgCl <sub>2</sub> )	138 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Ponceau S-Färbelösung (10x)	2% (w/v) Ponceau S 30% (w/v) Trichloressigsäure 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
Protease-Inhibitoren	
Aprotinin	5 mg/ml Stammlösung in 50% Glycerin in PBS (1000x)
Leupeptin	5 mg/ml Stammlösung in 50% Glycerin in PBS (1000x)
Pepstatin A	1 mg/ml Stammlösung in Methanol (200x)
Pefabloc	25 mg/ml Stammlösung in 50% Glycerin in PBS (200x)

---

RNA-Ladepuffer	2,88 ml deionisiertes Formamid 0,32 ml 20x MOPS 1 ml Formaldehyd 0,72 ml DEPC-H <sub>2</sub> O 0,72 ml Glyzerin 0,01% (w/v) Bromphenolblau 0,01% (w/v) Xylencyanol
4% RNA-Gel	5,75 ml H <sub>2</sub> O 750 µl 10x TBE 1 ml 30% PAA (= 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid) 150 µl 50%iges Glycerin 5 µl TEMED 50 µl 10% APS
6% RNA-Gel	5,25 ml H <sub>2</sub> O 750 µl 10x TBE 1,5 ml 30% PAA (= 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid) 150 µl 50%iges Glycerin 5 µl TEMED 50 µl 10% APS
SDS Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glyzin 1% (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
5% Sammelgel	3,0 ml H <sub>2</sub> O 1,3 ml Sammelgelpuffer 0,8 ml 30% PAA (= 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid) 10 µl TEMED 30 µl 10% APS

---

Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8.8 0,4% (w/v) SDS
12% Trenngel	3,5 ml H <sub>2</sub> O 2,5 ml Trenngelpuffer 4 ml 30% PAA (= 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid) 10 µl TEMED 40 µl 10% APS
TAE-Puffer (50x)	2,0 M Tris 1,0 M NaAc 50 mM EDTA II pH 7,4 mit Essigsäure einstellen
TBE-Puffer (40x)	1,8 M Tris 1,8 M Borsäure 0,04 M EDTA
Tbf I-Puffer	30 mM KAc 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15% (v/v) Glyzerin
Tbf II-Puffer	10 mM Na-MOPS, pH 7,0 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 15% (v/v) Glyzerin
TBS Puffer ( <i>Tris Buffered Saline</i> )	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen
TBS-T-Puffer	0,2% (v/v) Tween-20 in 1 x TBS

10x WB-Transferpuffer	0,5 M Tris
(Nassblot)	1,96 M Glycin



## 5 Methoden

### 5.1 Bakterienkulturen

#### 5.1.1 Kulturen für die Plasmidisolierung

Die Vermehrung der *in vitro* rekombinierten Plasmide wurden in den *E. coli*-Stämmen XL2-Blue oder XL10 Gold (beide Stratagene, La Jolla, CA) durchgeführt. Da alle verwendeten Konstrukte ein Ampicillin-Resistenzgen enthielten, wurden die Plasmid tragenden Bakterien auf LB-Agarplatten bzw. in LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Als Vorkultur für präparative Plasmidisolierungen wurden 5 ml Übernachtkulturen in LB-Medium angesetzt. Zur Extraktion größerer DNA-Mengen wurden 250 ml LB-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben mit jeweils 5 ml Übernachtkultur beimpft und bei 37°C 12–16 Stunden im Schüttelinkubator bebrütet. Für die Langzeitlagerung wurden 750 µl Bakteriensuspension mit 750 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80°C aufbewahrt.

#### 5.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien zur Transformation

50 ml Thym-Broth-Medium wurden mit einer Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stammes von einer Stammpatte (10 mM MgSO<sub>4</sub>, ohne Antibiotikum) beimpft und ~12 Stunden bei 37°C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml Thym-Broth-Medium (ohne Antibiotikum) beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> ~0,5-0,6 bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Hauptkultur wurde anschließend für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz 15 min bei 4°C und 3000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 150 ml eiskaltem, sterilem TbfI-Puffer resuspendiert und bei 0°C für 30 min inkubiert. Der Ansatz wurde erneut 15 min bei 4°C und 3000 x g zentrifugiert und die Bakterien in 20 ml 0,1 M TbfII-Puffer resuspendiert. Dieser Ansatz wurde in Portionen von 200 µl in sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80°C aufbewahrt.

### 5.1.3 Transformation von Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 0,5 µg Plasmid-DNA, bzw. dem gesamten Ligationsansatz versetzt, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz im Wasserbad 2 min auf 42°C erwärmt (Hitzeschock), anschließend 1 min in einem Eisbad abgekühlt, zu 0,5 ml (Ligationsansatz) oder 1 ml (Plasmid-DNA) LB-Medium (ohne Ampicillin) gegeben und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 90 min wurden 50 µl der Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Klone wurden auf das Vorhandensein von rekombinanter DNA mit Hilfe der analytischen Plasmidisolierung untersucht.

## 5.2 DNA/RNA-Methoden

### 5.2.1 DNA-Standardmethoden

- Agarose-Gelelektrophorese (Biorad, München).
- Dephosphorylierungen mit alkalischer Kalbsphosphatase nach den Angaben der Hersteller.
- Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem DNA-Gel Extraktionskit der Firma Qiagen (Hilden) nach den Angaben des Herstellers.
- Fällung von Nukleinsäuren mit 10% 5 M NaCl und 2,5x Volumen Ethanol; Entfernung von Salzen mit 70% Ethanol.
- Große Plasmidpräparation mit dem MaxiPräp-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.
- Kleine Plasmidpräparation mit dem Miniprep-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers.
- Ligationen mit dem T4-Rapid-Ligation-Kit der Firma Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers.
- Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen mit einem *Beckmann DU<sup>®</sup> 640* Spektralphotometer der Firma Beckmann Coulter (Krefeld).
- Restriktionsanalysen nach den Angaben der Hersteller.

### 5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction", PCR)

Alle nicht quantitativen und semi-quantitativen PCR-Reaktionen wurden in einem thermoregulierbaren Heizblock mit Deckelheizung (GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700, ABI Weiterstadt oder PTC-200, Biozym) durchgeführt.

#### PCR zur Amplifikation von DNA für Klonierungen (Pwo-PCR)

PCR-Produkte, die zur Klonierung neuer Vektoren verwendet werden sollten, wurden mit Hilfe der Pwo-Polymerase (Roche) amplifiziert. Als Matrize dienten vorhandene Vektoren. Die Pwo-Polymerase besitzt eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität (*Proofreading*) erlaubt. Die verwendeten Primer enthielten neben den komplementären Amplifikatsequenzen auch Restriktionsschnittstellen.

Der Ansatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 µl.

Zur Vervielfältigung definierter Nukleinsäureabschnitte für Klonierungen wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

100 ng	DNA-Matrize
2,5 µl	Primer 1 (100 ng/µl)
2,5 µl	Primer 2 (100 ng/µl)
10 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
10 µl	Pwo-Puffer (10x) mit MgSO <sub>4</sub>
1 µl	Pwo-Polymerase
ad 100 µl H <sub>2</sub> O	

Für die Klonierung der AUF1-Expressionsplasmide wurde zur Amplifikation der entsprechenden AUF1 cDNAs folgendes PCR-Programmprofil verwendet:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	95°C	2 min	Initiale Denaturierung
30	94°C	15 sec	Denaturierung
	60°C	30 sec	Hybridisierung der Oligonukleotide
	72°C	2 min	Elongation
1	72°C	7 min	Finale Elongation
1	12°C	∞	

Anschließend wurden die PCR-Amplifikate in einem präparativen Gel aufgetrennt und mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits (QIAGEN) aus dem Gel isoliert.

#### *PCR zur Amplifikation von cDNA zur Analyse der Genexpression*

Zur semi-quantitativen Untersuchung der Genexpression wurde gesamtzelluläre RNA aus Zellen isoliert (siehe 5.2.4) und mittels reverser Transkription (siehe 5.2.6) in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als Matrize für die anschließende PCR-Reaktion. Für die Amplifikation wurde der 2,5x Eppendorf® Mastermix (inkl. Taq-Polymerase) verwendet. Der Ansatz erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl und wurde nach Herstellerangaben angesetzt.

12,5 µl      Eppendorf® Mastermix (2,5x)  
 x µl        cDNA  
 0,5 µl      *sense* Primer (100 pmol/µl)  
 0,5 µl      *antisense* Primer (100 pmol/µl)  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Um zu gewährleisten, dass gleiche cDNA Mengen als Matrize verwendet wurden, erfolgte die Einstellung gemäß einer internen PCR-Kontrolle. Dazu wurde das konstitutiv exprimierte Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) amplifiziert und die PCR-Produkte analysiert. cDNA-Mengenverhältnisse, die zu gleichstarken GAPDH-Signalen führten, wurden für die anschließende spezifische PCR-Reaktion beibehalten.

Die PCR wurde nach folgendem Standardprogramm durchgeführt:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	95°C	3 min	Initiale Denaturierung
20-40	95°C	30 sec	Denaturierung
	x°C 72°C	30 sec 2 min	Hybridisierung der Oligonukleotide Elongation
1	72°C	10 min	Finale Elongation
1	12°C	∞	

Die Temperatur zur Hybridbildung wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide gewählt, die sich wie folgt berechnet (Wallace-Regel):

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

Die Zykluszahl variierte zwischen 20 und 40 Zyklen und wurde in Abhängigkeit der zu amplifizierenden Produkte bestimmt. Für die Detektion von GAPDH wurden 20 bis 25 Zyklen verwendet. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit 10x DNA-Laufpuffer versetzt und mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid wurden die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 5-7 V/cm Elektrodenabstand.

### *Sequenzier-PCR*

Sequenzanalysen wurden mit dem DNA-Sequenziersystem von ABI (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) durchgeführt. Das System beruht auf der Strangabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977). Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide (ddNTPs) verwendet, die im Verlauf der PCR statistisch in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Sobald die Polymerase ein Didesoxy-Nukleotid einbaut, kommt es zum Strangabbruch, da aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe am Zuckerrest keine neue Phospho-Diester-Bindung entstehen kann. Jedes der vier Didesoxy-Nukleotide ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass die Reaktion in einem Reaktionsgefäß ablaufen kann. Ein Reaktionsansatz enthielt:

500 ng	DNA
10 pmol	Primer
8 µl	2,5x Reaktionspuffer
2 µl	<i>Big-Dye-Terminator-Mix Version 1.2</i> (ABI, Weiterstadt)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Im *Big-Dye-Terminator-Mix Version 1.2* waren fluoreszenzmarkierte ddNTPs, nicht-markierte dNTPs und eine hitzestabile DNA-Polymerase enthalten. Es wurde folgendes Programm-Profil verwendet:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	95°C	2 min	Initiale Denaturierung
20	96°C	10 sec	Denaturierung
	50°C	15 sec	Hybridisierung der Oligonukleotide
	60°C	4 min	Elongation
1	12°C	∞	

Zur Fällung der Amplifikate wurden die Produkte der Sequenzier-PCR mit 70 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 5 M NaCl und 250 µl Ethanol versetzt und für mindestens 2h bei -80°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 min bei 20.000 x g und 4°C. Die Präzipitate wurden mit 70% Ethanol gewaschen. Die gefällte DNA wurde bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

Die Sequenzanalysen wurden von der Firma Richter (Servicelabor im Institut für Pathologie der Universität Hamburg) durchgeführt. Die Auswertung der resultierenden DNA-Sequenzen erfolgte mit den Computerprogrammen „Gene Construction Kit<sup>TM</sup>“ Version 2.5 von Textco, Inc. (West Lebanon, USA) und Chromas 1.45 von Conor McCarthy (Southport, Australien).

#### *Quantitative PCR (TaqMan<sup>TM</sup>)*

Mit Hilfe der *Realtime* PCR ist es möglich, die DNA-Ausgangsmenge der eingesetzten Probe zu bestimmen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Einsatz fluoreszierender Reporterfarbstoffe, die eine Verfolgung der Reaktion in Echtzeit (engl. *realtime*) ermöglicht. Die Farbstoffmoleküle werden in die sich bildende doppelsträngige DNA eingelagert, was mit fortschreitender PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg führt, der sich proportional zur Produktmenge verhält. Je nach Wahl der Farbstoffe können diese spezifisch (TaqMan<sup>TM</sup>-Sonde) oder nicht spezifisch (SYBR<sup>®</sup>-Green) mit dem Produkt interagieren.

Die relative Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten *Threshold Cycle* oder C<sub>t</sub>-Wert. Dieser entspricht jenem PCR Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Durch serielle Verdünnung und Zuordnung der Template-Mengen zu ihren entsprechenden C<sub>t</sub>-Werten kann eine Standardkurve erstellt werden. Anhand dieser Standardkurve ist wiederum ein Rückschluss von

bekannten  $C_t$ -Werten auf Templatekonzentrationen relativ zur Standardkurve möglich.

Die *Realtime* PCR-Analysen wurde freundlicherweise von Bettina Abel durchgeführt.

### Realtime PCR mit SYBR<sup>®</sup>-Green

Diese Methode wurde für die Quantifizierung von CD83 cDNA eingesetzt.

Die Reaktion wurde im *7500 Fast* von der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA) unter Verwendung des *Platinum<sup>®</sup>SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Carlsbad CA) durchgeführt. Neben SYBR<sup>®</sup>-Green enthält ein Reaktionsansatz noch einen unspezifischen Farbstoff (Rox). Als Matrize diente cDNA.

#### Reaktionsansatz:

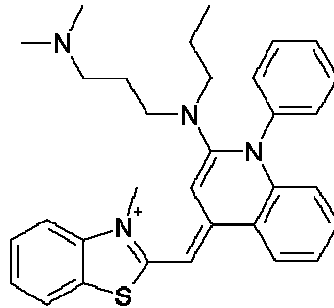
5 µl	Mastermix
0,4 µl	<i>sense</i> Primer (10 µM)
0,4 µl	<i>antisense</i> Primer (10µM)
0,2 µl	Rox
3 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl	cDNA

Das Programm für die SYBR<sup>®</sup>-Green *Realtime* PCR hatte folgendes Profil:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	50°C	2 min	
1	95°C	2 min	Denaturierung
40	95°C	15 sec	Denaturierung
	60°C	30 sec	Hybridisierung der Oligonukleotide

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup>-Green lagert sich während der PCR unspezifisch in die gebildete doppelsträngige DNA ein, wodurch die Fluoreszenz dieses Farbstoffes ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Es kann nicht unterschieden werden, ob der Anstieg der Fluoreszenz auf das korrekte Produkt, ein Artefakt oder Primer-Dimere

zurückzuführen ist. Deshalb ist es notwendig, im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse nach Angaben des Herstellers durchzuführen. Die Schmelzpunktanalyse gibt Aufschluss auf die Spezifität der detektierten Fluoreszenz. Hierfür wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird ( $50^{\circ}\text{C} \rightarrow 95^{\circ}\text{C}$ ). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird der Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül. Dabei wird der SYBR<sup>®</sup>-Green-Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.



**Abb. 6 Strukturformel des SYBR<sup>®</sup>-Green-Fluoreszenzfarbstoffes**

2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methylbenzothiazol-3-ium-Kation

### Realtime RCR mit einer spezifischen TaqMan<sup>™</sup>-Sonde

Diese Methode wurde für die Quantifizierung von GAPDH cDNA eingesetzt.

Die Reaktion wurde ebenfalls im *7500 Fast* von der Firma Applied Biosystems (Foster City, CA) unter Verwendung des *Platinum<sup>®</sup> qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Carlsbad CA) durchgeführt.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine hochspezifische quantitative PCR, bei der der sogenannte *Förster resonance energy transfer* (FRET) ausgenutzt wird. Dabei gibt ein Donor-Fluorochrom (Reporter), das durch eine Lichtquelle angeregt wird, einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (bzw. einen "dunklen" Quencher) ab. Nimmt der Abstand zwischen



Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors (Quenchers) ab, während das des Donors zunimmt.

Für diese PCR wurden GAPDH-Primer und eine spezifische GAPDH Sonde verwendet. Die verwendete Sonde lagert sich spezifisch in die doppelsträngige DNA zwischen den beiden Primern ein. Am 5'-Ende trägt die Sonde den Reporter (Donor)-Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszin (FAM) und am 3'-Ende den Akzeptor (Quencher) Rhodamin (TAMRA). Die Emission von Fluoreszin wird bei einer intakten Sonde durch die Nähe zum Quencher-Molekül unterdrückt. Wenn die Taq-Polymerase, die eine intrinsische Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'Ende abbaut, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden.

Der Reaktionsansatz enthielt neben der cDNA, den Primern und der Sonde den *Platinum<sup>®</sup> qPCR SuperMix-UDG* der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA) und setzte sich wie folgt zusammen:

5 µl	Mastermix
0,3 µl	<i>sense</i> Primer (10 µM)
0,9 µl	<i>antisense</i> Primer (10µM)
0,15 µl	GAPDH Sonde (10 µM)
2,65 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl	cDNA

Profil der *Realtime* PCR:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
40	95°C	3 min	Denaturierung
	95°C	15 sec	Denaturierung
	60°C	30 sec	Hybridisierung der Oligonukleotide

Diese GAPDH-*Realtime* PCR wurde zusätzlich als Kontrolle durchgeführt. Die mit der SYBR<sup>®</sup>-Green-Methode gemessenen CD83-Werte wurden zu den GAPDH-Signalen ins Verhältnis gesetzt. Daraus ergaben sich normierte, relative Werte.

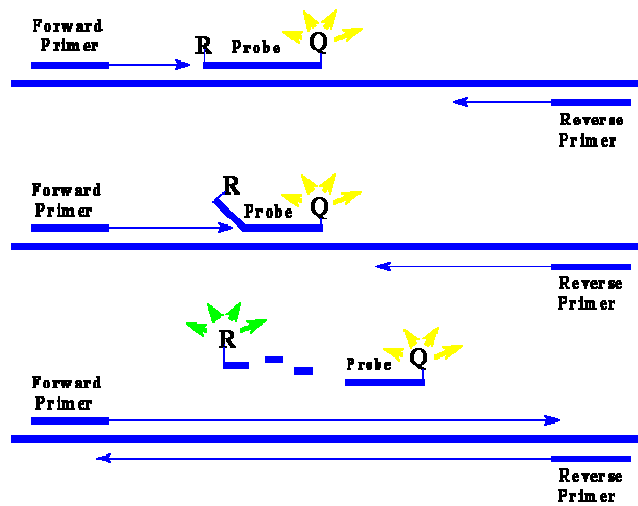


Abb. 7 Einfluss der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq DNA Polymerase auf die Sonde während der Elongationsphase einer TaqMan™ PCR.

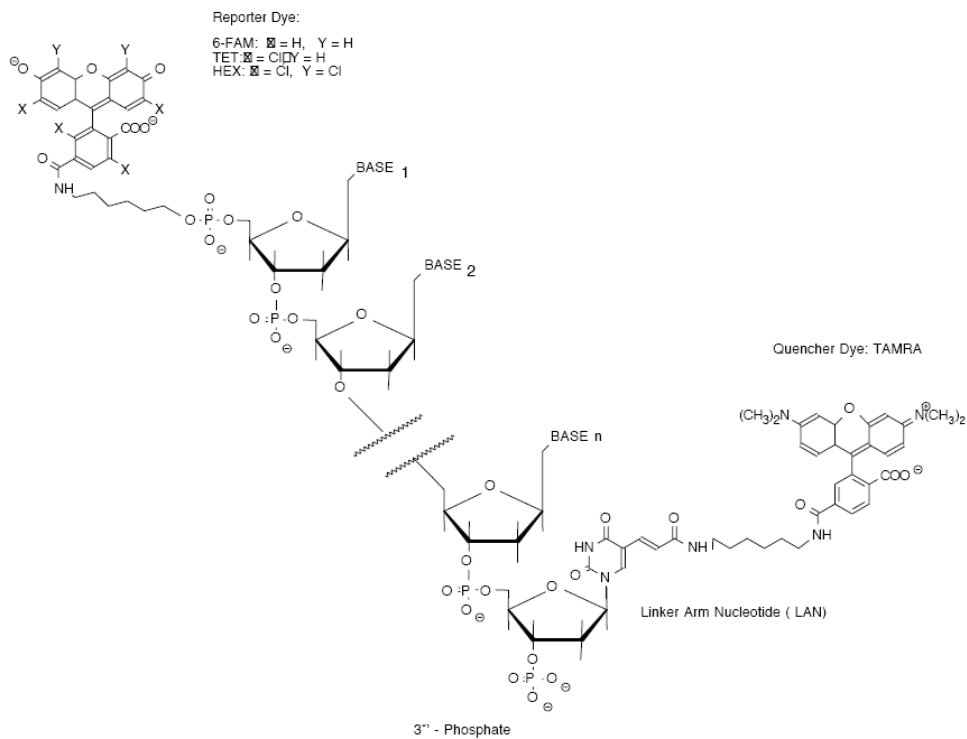


Abb. 8 Darstellung der Chemischen Struktur einer TaqMan™ PCR Sonde.

### 5.2.3 Hybridbildung von Oligonukleotiden

Für die Hybridisierung von Oligonukleotiden aufgrund von Basenkomplementarität, wurden je 3 µg Oligonukleotid in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2 min auf 90°C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz bei ausgeschaltetem Wasserbad langsam über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 5.2.4 Isolierung von gesamtzellulärer RNA

Die gesamtzelluläre RNA wurde mit Hilfe von TRIzol<sup>®</sup> Reagent isoliert. Hierfür wurden die Zellen zum Zeitpunkt der Ernte 2x mit PBS gewaschen, in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent aufgenommen und bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde der Ansatz 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 200 µl Chloroform versetzt und 1 min mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers gemixt. Es wurde erneut für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 15 min bei 8.500 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt. Zur Fällung der RNA wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min bei 8.500 x g und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das trockene RNA-Pellet wurde in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Zur Entfernung von transfizierter Plasmid-DNA wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Anschließend wurde der Verdau-Ansatz 1 min mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers suspensiert, um Proteine aus der Lösung zu extrahieren. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 8.500 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde zur Fällung der RNA mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol und einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat versetzt und für 30 min bei -80°C inkubiert. Dann wurde erneut für 20 min zentrifugiert, das RNA-Pellet gewaschen, getrocknet und in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zur besseren Löslichkeit wurde der Ansatz im Heizblock auf 65°C erhitzt und daraufhin langsam auf 37°C abgekühlt, bevor die gelöste RNA bei -80°C gelagert wurde.

### 5.2.5 RNA-Fraktionierung zur Trennung von nukleärer und zytoplasmatischer RNA

Zur RNA Fraktionierung wurden die Zellen vor der Ernte 2x mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von der Kulturschale entfernt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde 2 min bei 470 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch vorsichtiges Absaugen entfernt und das Zellpellet vorsichtig von der Gefäßwand abgelöst. Es folgte die Zugabe von 100 µl eiskaltem Lysispuffer (10 mM Hepes KOH pH 7,8; 10 mM KCl; 20% Glycerol; 0,25% NP40; 1 mM DTT) direkt auf das Zellpellet. Die entstehende Zellsuspension wurde ohne Auf- und Abpipettieren sofort 5 min bei 4°C und 470 x g zentrifugiert, wodurch die Zellkerne pelletiert wurden. 80 µl des Zytoplasma-enhaltenden Überstandes wurden mit einer flachen Kapillarspitze vorsichtig abgesaugt und in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent überführt. Das Kernpellet wurde erneut mit 100 µl Lysispuffer resuspendiert und gewaschen. Die Kerne wurden anschließend durch Zentrifugation bei 470 x g für 5 min pelletiert, der Überstand wurde entfernt und die Kerne in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent resuspendiert. Die Isolation der RNA erfolgte wie unter 5.2.4 beschrieben.

### 5.2.6 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)

Zur Untersuchung der Genexpression wurde durch reverse Transkription der mRNA eine spezifische cDNA Matrize hergestellt. Durch Verwendung eines Oligo(dT)-Primers konnte sichergestellt werden, dass nur PolyA mRNAs in cDNAs umgeschrieben wurden, welche anschließend mittels PCR amplifiziert wurden.

Zur cDNA-Synthese wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

1 µg	RNA
4 µl	5x M-MLV Reverse Transkriptase Puffer
1 µl	Oligo(dT)-Primer (100 pmol/µl)
2 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)
0,25 µl	M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
ad 20 µl H <sub>2</sub> O	

Die reverse Transkription wurde in einer PCR-Maschine unter Verwendung des folgenden Programmprofils durchgeführt:

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer	
1	25°C	10 min	Hybridisierung Primer/RNA
1	42°C	90 min	RT und cDNA-Synthese
1	99°C	5 min	Enzyminaktivierung
1	12°C	∞	

Nach der reversen Transkription wurden die Proben zur Fällung mit 250 µl H<sub>2</sub>O, 30 µl 5 M NaCl und 700 µl Ethanol versetzt und mindestens 2h bei -80°C inkubiert. Danach wurde die cDNA 30 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 5.2.7 *In vitro* Transkription zur Herstellung synthetischer RNA

Die *in vitro* Transkription zur Herstellung synthetischer RNA wurde mit dem *Riboprobe T7-Transcription System* (Promega, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Synthese radioaktiv markierter RNA wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µg	linearisiertes DNA-Template
4 µl	5x TC Puffer
2 µl	100 mM DTT
1 µl	RNAsin (40 U)
1 µl	10 mM rATP
1 µl	10 mM rGTP
1 µl	10 mM rCTP
2,4 µl	100 µM rUTP
5 µl	α [ <sup>32</sup> P]-UTP (50 µCi, 3000 Ci/mmol)
1 µl	T7-RNA-Polymerase (40 U)
ad 20 µl H <sub>2</sub> O (Ribonukleasefrei)	

Zur Herstellung nicht radioaktiv markierter („kalter“) RNA wurden die oben angegebenen rUTP Mengen durch 1 µl 10 mM rUTP ersetzt.

Der Ansatz wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl RNase-freie DNase zugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Es folgte zweimalige Extraktion der RNA durch Phenolisierung, indem 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben wurde und durch 1 min starkes schütteln eine Suspension gebildet wurde, wodurch Proteine in die organische Phase wechselten, während die RNA in der wässrigen Phase gelöst blieb. Diese wässrige Phase wurde abgenommen und durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2,5-fachem Volumen Ethanol die RNA für 30 min bei -80°C gefällt. Danach wurde die RNA 30 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Damit sich die Sekundärstruktur der RNA ausbilden konnte, wurde die RNA-Lösung zur Denaturierung auf 80°C erhitzt und langsam über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die RNA-Lösung wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 5.2.8 Klonierungen

#### *Konstruktion von pGEX-5x-1-AUF1-Konstrukten*

Um AUF1 rekombinant in Bakterien exprimieren zu können, wurden bakterielle Expressionsvektoren pGEX-5x-1 konstruiert, die die Gensequenzen der einzelnen Isoformen von AUF1 enthielten. Der Vektor enthielt vor der Klonierungsstelle bereits die Gensequenz der Gluthathion-S-Transferase (GST), so dass Fusionsproteine mit N-terminalem GST exprimiert werden konnten. GST ist in der Lage eine stabile Bindung mit Gluthathion, dem natürlichen Substrat dieser Transferase, einzugehen. Diese Affinität wird zur späteren Reinigung der Proteine aus dem Bakterienlysat ausgenutzt.

Als Ausgangsvektoren dienten die Vektoren pET14b-AUF1p37/p40/p42/p45, die freundlicherweise von Dr. Herman Gram (Novartis, Basel) zur Verfügung gestellt wurden. Sie dienten als Matrize zur Amplifikation der AUF1-Sequenzen mit Hilfe des Primerpaares HH70/HH71. Die synthetischen Oligonukleotide waren so gewählt, dass für die Ligation die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI terminal in die PCR-Amplifikate eingeführt wurden und der Leserahmen mit dem N-terminalen GST im pGEX-Vektor erhalten blieb.

Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI gespalten, über präparative Agarosegele gereinigt und anschließend eluiert.

Der pGEX-5x-1-Vektor wurde mittels Restriktionsspaltung mit den Enzymen BamHI und XhoI linearisiert, mit alkalischer Kalbsphosphatase (CIP) dephosphoryliert und ebenfalls über ein präparatives Agarosegel gereinigt. Durch Ligation wurden die AUF1-Amplifikate in den linearisierten Vektor eingeführt, woraus die gewünschten Konstrukte resultierten. Positive Klone wurden mit Hilfe von Restriktionsspaltung und DNA-Sequenzierung identifiziert.

#### *Konstruktion von pBC12-MCS2-AUF1-Flag-Konstrukten*

Zur Expression von AUF1 in eukarotischen Zelllinien, wurden Expressionsvektoren (pBC12) mit den vier Isoformen von AUF1 konstruiert. Am 3'Ende der AUF1-Sequenz wurde zusätzlich die Flag-kodierende Sequenz eingeführt, um AUF1-Proteine mit C-terminalen Flag-Epitop zu erhalten, wodurch die Detektion, bzw. Immunpräzipitation der überexprimierten Proteine ermöglicht wird.

Als Ausgangsvektoren dienten wieder die Vektoren pET14b-AUF1p37/p40/p42/p45 zur Amplifikation der AUF1-Sequenzen mit Hilfe des Primerpaares HH70/HH72. Die synthetischen Oligonukleotide waren so gewählt, dass für die Ligation die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI terminal in die PCR-Amplifikate eingeführt wurden, der Leserahmen erhalten blieb und das Stop-Codon deletiert wurde.

Die Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI gespalten, über präparative Agarosegele gereinigt und anschließend eluiert.

Die Oligonukleotide, die die Flag-Sequenz enthielten (FLAGneu1/FLAGneu2) wurden über Nacht hybridisiert. Dadurch ergaben sich am 3'Ende eine XhoI- und am 5'Ende des doppelsträngigen Oligonukleotids eine XbaI-Restriktionsschnittstelle. Zusätzlich wurde eine NheI-Schnittstelle eingeführt, die zur Identifizierung positiver Klone durch Restriktionsspaltung mit diesem Enzym diente.

Der pBC12-Vektor wurde mittels Restriktionsspaltung mit den Enzymen XhoI und XbaI linearisiert, mit alkalischer Kalbsphosphatase (CIP) dephosphoryliert und ebenfalls über ein präparatives Agarosegel gereinigt.

Die Ligation des Flag-Oligonukleotids mit dem Vektor ergab das Konstrukt pBC12-MCS2-Flag. Dieses neu erhaltene Plasmid wurde mit BamHI und XhoI geschnitten, dephosphoryliert und über ein Agarosegel gereinigt, bevor es mit den oben beschriebenen AUF1-Amplifikaten ligiert wurde.

Positive Klone wurden mit Hilfe von Restriktionsspaltung und DNA-Sequenzierung identifiziert.

## **5.3 Zellkultur**

### *5.3.1 Kultivierung von adhärenent wachsenden Zellen*

Eukaryotische Zellen wurden in Lux-Kulturflaschen der Firma Nunc (Naperville) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit in entsprechendem Medium kultiviert. Zur weiteren Kultivierung wurden die adhärenent wachsenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in frischem Kulturmedium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen verteilt.

### *5.3.2 Kultivierung von nicht-adhärenent wachsenden Zellen*

Jurkat- und MonoMac6-Zellen wurden in Zellkulturflaschen in RPMI Medium mit 10% FKS bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 80% Luftfeuchtigkeit kultiviert und alle zwei Tage 1:3 verdünnt bzw. zur Vermehrung in neue Flaschen umgesetzt.

### *5.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen*

Zum Einfrieren wurden ca.  $2 \times 10^7$  Zellen pelletiert, in 1 ml kaltem Einfriermedium (10% DMSO in FKS) aufgenommen, resuspendiert und in 1,8 ml Kryogefäße (Nunc, Naperville) überführt. Die Kryogefäße wurden anschließend, in einer Polystyrolbox verpackt, für 2 Stunden bei -20°C abgekühlt. Für weitere 24 Stunden erfolgte die Aufbewahrung der Polystyrolbox bei -80°C. Die Gefäße konnten danach dauerhaft in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden sehr schnell, innerhalb weniger Minuten, bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die flüssige Zellsuspension wurde in 50 ml warmem Kulturmedium aufgenommen. Eine kurze Zentrifugation diente dem Pelletieren der Zellen. Überstehendes Medium wurde abgesaugt, das Zellpellet in 20 ml Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Um restliches DMSO von den Zellen zu entfernen, erfolgte am nächsten Tag ein Mediumwechsel.



## 5.4 Zellbiologische Methoden

### 5.4.1 Transfektionen

#### *Transiente Transfektion von COS7-Zellen*

COS7-Zellen wurden nach der DEAE-Dextran-Methode transfiziert (McCutchan and Pagano, J. S., 1968). Dazu wurden  $2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Kulturschale ausgesät und bis zum nächsten Tag in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden mit vorgewärmtem PBS gewaschen, woraufhin der Transfektionscocktail aus PBS, 500 µg/ml DEAE-Dextran, 3 bis 4 µg/ml DNA in einem Volumen von 2000 µl zugegeben wurde. Es folgte eine Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für 30 min. Danach wurden 2 ml vorgewärmtes FC-Medium zugegeben (Kulturmedium, 2% Fungizone, 100 µM Chloroquine) und für 2,5 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Absaugen des Zellüberstandes wurde für 2,5 min 1 ml Schock-Medium (Kulturmedium, 10% DMSO) zugegeben. Das Schock-Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden für 48 Stunden in je 10 ml Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### *Transiente Transfektion von HeLa tet off Zellen*

Zur Transfektion von HeLa Zellen wurde das Transfektionsreagenz PEI (Polyethylenimin, 1 mg/ml) verwendet. Bei PEI handelt es sich um ein kationisches Polymer, welches im Komplex mit DNA durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wird. Anschließend findet eine Fusion mit zellulären Lysosomen statt. Auf Grund des niedrigen pH-Wertes innerhalb der Lysosomen quillt das PEI-Polymer auf, was schließlich zur Zerstörung der Lysosomen und Freisetzung der DNA in der Zelle führt.

Dazu wurden am Vortag  $2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Kulturschale in Kulturmedium (DMEM ohne Antibiotika) ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 50-70% konfluent.

Für das Transfektionsgemisch wurden pro Ansatz 1158 µl OptiMEM in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 6 µg DNA vermischt. Nach Zugabe von 36 µl PEI (1 mg/ml), wurde der Ansatz sofort kräftig mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers gemixt. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch für 10 min bei RT inkubiert und dann

zu den Zellkulturen gegeben, deren Medium vorher durch je 5 ml frisches Medium (ohne Antibiotika) ersetzt wurde. Der Transfektionsansatz wurde 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und danach durch je 4 ml frisches DMEM (mit Antibiotika) ersetzt. Die transfizierten Zellen wurden weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und nach 24h weiter verwendet.

#### *Transiente Transfektion von 293T-Zellen mit lentiviralen Vektoren zur Virusproduktion*

Zur Hemmung der Genexpression mittels siRNA wurden selbstinaktivierende und replikationsinkompetente lentivirale Vektoren eingesetzt. Durch Verwendung einer geeigneten Verpackungszelllinie wurden die entsprechenden viralen Partikel erzeugt. Zur Virusproduktion wurden  $2,5 \times 10^6$  293T-Zellen in 10 cm Schalen am Vorabend in Kulturmedium (DMEM ohne Antibiotika) ausgesät. Die Transfektion erfolgte mittels PEI wie bereits beschrieben, dabei wurden folgende Plasmid-DNA Konzentrationen verwendet:

3,00 µg	pLKO.1-puro (lentiviraler Vektor)
0,75 µg	pRSV-Rev
0,75 µg	pCMV-VSV-G
1,50 µg	pMDLg/pRRE

Nach 48h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Kulturüberstand, welcher die neu gebildeten Lentiviren enthielt, abgenommen und bei 350 x g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Einwegfilter mit 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert und zur Aufbewahrung bei -80°C gelagert. Zur Konzentrationsbestimmung mit Hilfe eines p24-ELISA (siehe 5.4.2 ) wurde vor dem Einfrieren ein Aliquot zellfreier Überstand abgenommen und mit 0,1 Volumen 5% (v/v) Triton X-100 inaktiviert.

#### 5.4.2 p24-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von rekombinanten Lentiviren

Die Konzentration von Lentiviren wurde durch Bestimmung des p24-Gehaltes im Zellkulturüberstandes ermittelt. Hierfür wurde ein *Sandwich*-ELISA verwendet, bei dem zuerst ein gegen das p24-Capsidprotein gerichteter Antikörper (anti-183) in einer Konzentration von 2 µg/Vertiefung (in PBS) auf einer Flachbodenplatte mit 96 Vertiefungen (Immuno Plate, MaxiSorp Surface) immobilisiert wurde. Die Kulturplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3x mit PBS/0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern, wurde für 2h bei 37°C mit 10% (v/v) NKS/PBS inkubiert und danach 3x mit PBS/0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen. Anschließend wurden in geeigneten Verdünnungen die inaktivierten Kulturüberstände auf die beschichtete Kulturplatte aufgetragen. Als Standard wurden parallel dazu definierte Capsidmengen (0,0625-4,0 ng) in Duplikaten verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer wurde die Kulturplatte zum Entfernen von ungebundenem p24-Capsidprotein 3x mit PBS/0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Capsids wurde zuerst mit Capsidantikörper (anti-Capsid, verdünnt in 10% (v/v) NKS/PBS/0,1% (v/v) Tween 20) für 1h bei 37°C inkubiert, danach unter gleichen Bedingungen mit einem Peroxidasegekoppelten anti-Kaninchen Antikörper (verdünnt in 10% (v/v) NKS/PBS/0,1% (v/v) Tween 20). Zwischen und nach den beiden Antikörperinkubationen wurde 3x mit PBS/0,05% (v/v) Tween 20 gewaschen. Außerdem wurde die Kulturplatte nach dem letzten Waschschrift 1x mit deionisiertem Wasser gewaschen, wobei das Wasser vollständig durch Ausklopfen auf Papiertüchern entfernt wurde. Zugefügtes Tetramethylbenzidin (TMB: 10 ml 0,1 M Natriumacetat pH 6,0; 100 µl TMB (Stock 10 mg/ml DMSO); 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wurde durch die Peroxidase in einen blauen Farbstoff umgesetzt. Nach 5 min wurde diese Reaktion mit 0,5 M Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein gelber Farbumschlag entstand, dessen Extinktion bei 450 nm gegen 560 nm in einem *ELISA-Reader* gemessen wurde. Die p24-Konzentration wurde aus den gemessenen Extinktionswerten mit Hilfe einer Standardgleichgeraden, unter Berücksichtigung der Verdünnung, ermittelt.

### 5.4.3 Luziferase-Reporterassay

Für den Luziferase-Reporterassay wurden COS7 Zellen mit entsprechenden Reportergenkonstrukten, die das *Firefly*-Luziferasegen enthielten, Kontrollplasmid und Effektorstrukturen transient mit der DEAE-Dextran-Methode (siehe 5.4.1) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und eine Luziferaseanalyse durchgeführt.

Das Kontrollplasmid exprimiert konstitutiv das *Renilla*-Luziferasegen und dient als interne Kontrolle, um falsche Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen auszuschließen.

Durch Zugabe des parentalen Vektors wurde die DNA-Konzentration in den einzelnen Transfektionsexperimenten konstant gehalten. Für die Transfektion wurden folgende DNA-Konzentrationen eingesetzt:

1 µg/ml Reporter	pcDNA3-Firefly Luc-PRE pcDNA3-Firefly Luc
2 µg/ml Effektor + parentaler Vektor	pBC12/CMV-MCS2-AUF1p37/40/42/45 pBC12/CMV
0,05 µg/ml Kontrollplasmid	pRL/CMV

Die Luziferaseanalyse wurde mit Hilfe des Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay Systems von Promega (Madison, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion zweimal mit angewärmtem PBS gewaschen und in je 500 µl des mitgelieferten 1x konzentrierten Lysispuffers pro 35 mm Kulturschale lysiert. Dazu wurden die Platten 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt, das Zelllysate in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 x g bei 4°C 5 min zentrifugiert, um die festen Bestandteile zu sedimentieren. Je 10 µl des Überstandes wurden in eine Vertiefung einer Messplatte mit 96 Vertiefungen überführt und zur automatischen Messung in ein Luminometer (Centro LB 960, Berthold Technologies, Bad Wildbach) eingelegt. Zur Messung wurden pro Näpfchen, angepasst an die eingesetzte Lysatmenge, je 50 µl der entsprechenden Reaktionspuffer verwendet. Die Steuerung der Messung sowie die Auswertung der Leuchtreaktion erfolgte über das gerätespezifische Computerprogramm,

MikroWin2000. Die erhaltenen Daten wurden danach mathematisch und graphisch mit dem Programm Windows Excel (Microsoft Office 2000 Premium) ausgewertet.

Um die relative Luziferaseaktivität zu bestimmen, wird das Verhältnis von spezifischem Reporter zur internen Kontrolle herangezogen: Messwert *Firefly*-Luziferase/Messwert *Renilla*-Luziferase. Für die Reporteranalysen wurde jeder Transfektionsansatz in dreifacher Ausführung angefertigt und deren Mittelwert für weitere Berechnungen eingesetzt. Die Hintergrundaktivität, die sich bei Kotransfektion von parentalen Vektoren und Reportern einstellt, wird mit dem Wert „1“ gleichgesetzt, dies entspricht 100% Aktivität. Alle anderen Messwerte werden zum Messwert der Hintergrundaktivität in Relation gesetzt und die entsprechenden Standardabweichungen automatisch berechnet.

normierter Messwert = Messwert *Firefly*-Luziferase/Messwert *Renilla*-Luziferase

relative Luziferaseaktivität = normierter Messwert/Hintergrundaktivität

#### 5.4.4 Infektion von Zellen mit selbstinaktivierenden replikationsinkompetenten

##### *Lentiviren zur stabilen Expression von siRNA gegen AUF1*

Zur Infektion von adhären Zellen mit rekombinanten Lentiviren, welche siRNAs gegen AUF1 spezifische mRNA exprimierten, wurden am Vorabend  $2 \times 10^5$  Zellen in 35 mm Kulturplatten ausgesät. Vor der Infektion wurde das Medium entfernt und pro Platte 500 ng Virus in 1 ml Kulturmedium zugegeben. Zur Erhöhung der Infektionsrate wurde 8 µg/ml Polybren zugesetzt. Um das Virus an die Zellen zu adhären, wurden die Zellen bei 800 x g für 90 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend nochmal für 2h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde der Virusüberstand abgenommen und durch 2 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

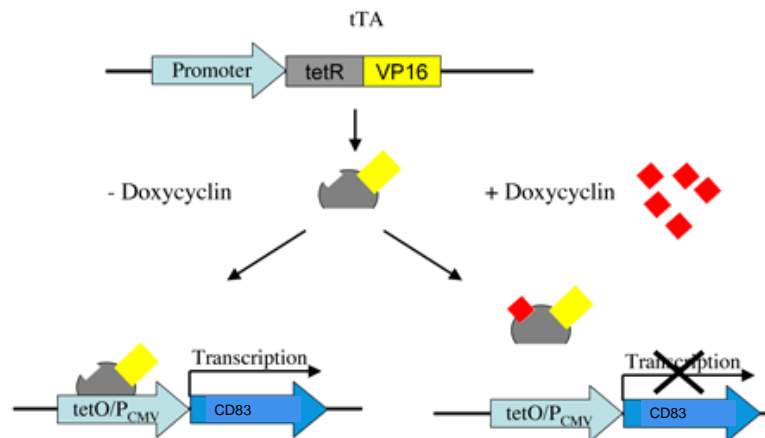
Zur Infektion von nicht-adhären Zellen wurden 3 ml Zellsuspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 800 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde auf die gleiche Weise infiziert wie die adhären Zellen. Nach der Infektion wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in 35 mm Kulturschalen überführt.

Bis zur Durchführung weiterer Experimente wurden die Zellen in Selektionsmedium mit 0,05 mg/ml Penicillin/Streptomycin und 2 µg/ml Puromycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 5.4.5 Bestimmung der Stabilität von CD83 mRNA

Die Stabilität der CD83 mRNA wurde mit Hilfe eines sogenannten *Transcriptional Pulse* Experimentes bestimmt. Hierbei wird die Transkription der CD83 mRNA unter die Kontrolle eines Tetracyclin-regulierten Promotors gestellt. Im Fall des hier benutzten *Tet off*-Systems bewirkte die Tetracyclin Zugabe eine Inhibition der CD83 Transkription (Loflin et al., 1999, Xu et al., 1998).

Es wurden HeLa *Tet off* Zellen verwendet, die konstitutiv das *Tet* Repressor-VP16 Transaktivator-Fusionsprotein exprimieren. Dieses Protein besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne des *Tet* Repressors aus *E. coli* (*TetR*) und der Transaktivierungsdomäne des VP16 Proteins aus dem Herpes-Simplex-Virus (Gossen and Bujard, H., 1992). In Abwesenheit von Tetracyclin oder des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin bindet die DNA-Bindungsdomäne des *Tet* Repressors an das *Tet response element* (TRE) im *Tet off*-Promotor des pUHC-CD83-Plasmids und bringt den VP16-Transaktivator in räumliche Nähe zum VP16-regulierten Promotor, sodass die Transkription aktiviert werden kann. Mit dem pUHC-CD83-Plasmid wurden die HeLa *tet off* Zellen transient transfiziert. Es enthält die vollständige cDNA von CD83 unter der Kontrolle eines *tet off*-Promotors. Die Transkription der CD83 cDNA kann also nur stattfinden, wenn kein Tetracyclin oder Doxycyclin anwesend ist.



**Abb. 9 Schematische Darstellung des tet off Systems (Gossen et al., 1995)**

Der Tetracyclin-Transaktivator (tTA) besteht aus einer Bindungsdomäne des *tet* Repressors (*tetR*) und der Transaktivierungsdomäne des VP16 Proteins aus dem Herpes-Simplex-Virus (VP16). tTA bindet nur in Abwesenheit von Doxycyclin an den *tet off* Promotor ( $tetO/P_{CMV}$ ) und ermöglicht so die Transkription des gewünschten Gens.

24h nach der Transfektion der HeLa *tet off* Zellen (siehe 5.4.1) wurden diese trypsiniert, in frischem DMEM mit 70 ng/ml Doxycyclin aufgenommen und auf 18 35 mm Kulturschalen verteilt. Diese geringe Menge an Doxycyclin bewirkte eine Reduktion der CD83 Transkription auf ein Minimum. Am nächsten Morgen wurde das Medium gegen Doxycyclin-freies Medium ausgetauscht, um die Transkription wieder in Gang zu setzen. Nach 4 stündiger Transkription wurde diese nun komplett abgeschaltet, indem durch einen erneuten Mediumwechsel 10 µg/ml Doxycyclin zugesetzt wurden. Ab diesem Zeitpunkt „0“ wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden Proben genommen, indem pro Zeitwert die Zellen einer 35 mm Kulturschale in TRIzol<sup>®</sup> Reagenz aufgenommen und bei -80°C gelagert wurden.

Nach 8 und 16 Stunden wurde ein Mediumwechsel mit frischem Doxycyclin durchgeführt, um einen erneuten Transkriptionsstart durch Abbau von Doxycyclin zu vermeiden.

Später wurde die Gesamt RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der *Realtime* PCR analysiert (siehe 5.2.4; 5.2.6; 5.2.2).

#### 5.4.6 Aktivierung von Jurkat- und MonoMac6 Zellen

Den Zellen wurde über Nacht das Serum entzogen, d.h. sie wurden in Kulturmedium (RPMI) mit 1% FKS gehalten. Am nächsten Tag wurde die FKS-Konzentration wieder auf 10% erhöht. 2 Stunden später wurde zum Start der Aktivierung der Zellen 0,05 µg/ml PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) und 1 µM Ionomycin bei Jurkat-Zellen, bzw. 1 µM LPS (Lipopolysaccharid) bei MonoMac6-Zellen ins Medium gegeben. Die Zellen wurden je nach Experiment entsprechend weiterverarbeitet.

#### 5.4.7 Isolierung von Monozyten aus Buffy Coats mit anschließender Reifung zu dendritischen Zellen

Buffy Coats entstehen bei der Auftrennung menschlicher Vollblutspenden in ihre Komponenten durch Zentrifugation. Es handelt sich hierbei um eine Zwischenschicht, die die Erythrozyten (rote Blutkörperchen) von dem Blutplasma trennt. Diese Schicht enthält die Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und die Thrombozyten (Blutplättchen).

Monozyten gehören zur Gruppe der Leukozyten und wurden auf folgende Weise aus dem Buffy Coat isoliert:

Ca. 50 ml Buffy Coat wurden 1:1 mit PBS-Heparin (500 ml PBS + 250 µl Liquemin N10.000 (Roche, Mannheim)) gemischt. 25 ml Buffy Coat Gemisch wurden zur Dichtegradientenzentrifugation vorsichtig über jeweils 10 ml Ficoll-Lösung (Biochrom, Berlin) in vier Blue Cap Tubes (Nunc, Wiesbaden) geschichtet und für 35 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

Das Serum in der oberen Phase wurde weitgehend abgenommen, dann wurde die Zwischenschicht, welche die peripheren mononukleären Zellen (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) enthielt, aufgenommen und in vier Blue Cap Tubes (Nunc, Wiesbaden) überführt und mit eiskaltem PBS + 1 mM EDTA auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde 8 min bei 1200 rpm und 12°C zentrifugiert. Jeweils 2 Zellpellets wurden in PBS-EDTA resuspendiert und vereinigt, auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (1000 rpm, 10 min, 12°C). Für einen weiteren Waschschritt wurden die beiden Zellpellets erneut vereinigt, in 50 ml DC-RPMI-Medium aufgenommen und bei 800 rpm für 10 min und 12°C zentrifugiert. Die PBMCs wurden erneut in 50 ml DC-



RPMI-Medium aufgenommen, ein Aliquot wurde zum Zählen der Zellen 1:25 verdünnt, der Rest bei 600 rpm für 12 min und 12°C ein letztes Mal zentrifugiert.

$8-9 \times 10^7$  PBMCs wurden in 10 ml warmen DC-RPMI-Medium auf eine 10 cm Kulturschale gegeben. Diese wurde vorher mit IgG beschichtet (8 ml PBS + 8  $\mu$ l IgG Stocklösung (Sigma, München), 10 min bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend 4x intensiv mit PBS waschen). Die Kulturplatten wurden 60 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. In dieser Zeit haften die Monozyten mit ihrem Fc-Rezeptor an den IgG-beschichteten Platten fest.

Die nicht-adhärenenten Zellen wurden mit RPMI-Medium ohne Zusätze durch viermaliges kräftiges Spülen von den Platten gewaschen.

Die adhärenenten Monozyten wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 10 ml DC-RPMI-Medium inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Monozyten mit rekombinanten Lentiviren infiziert, um eine Reduktion der Genexpression von AUF1 zu bewirken. Vor der Infektion wurde das Medium entfernt, eventuell noch vorhandene nicht adhärenente Zellen heruntergewaschen und pro Platte 2000 ng Virus in 4 ml Kulturmedium zugegeben. Die Monozyten wurden für 8h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei die Kulturschalen die ersten 4 Stunden auf einer Wippe leicht geschwenkt und danach ruhig gelagert wurden. Anschließend wurde der Virusüberstand abgenommen und durch neues DC-RPMI-Medium mit Reifungscocktail I ersetzt (Pro 10 cm Platte: 10 ml Medium + 30  $\mu$ l Reifungscocktail I (entspricht 800 U GM-CSF, 500 U IL-4)). Die Zellen wurden weiter bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

48 Stunden später wurde der Reifungscocktail II zugegeben. Dafür wurden 20  $\mu$ l Cocktail II mit 3,5 ml DC-RPMI-Medium gemischt (entspricht 400 U GM-CSF und 500 U IL-4) und zusätzlich auf die Kulturplatten gegeben.

Nach weiteren 72 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die finale Reifung zu dendritischen Zellen eingeleitet. Dafür wurden die Suspensionszellen, die sich während der letzten 120 Stunden gebildet haben, von der Kulturplatte gespült und in einem Blue Cap Tube gesammelt. Aus diesen Suspensionszellen generieren die reifen dendritischen Zellen. Diese Zellen wurden mit 1000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 50 ml frischem DC-RPMI-Medium aufgenommen. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde gezählt, der Rest erneut zentrifugiert.

Die Zellen wurden in soviel DC-RPMI-Medium aufgenommen, dass sich eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium ergab. Pro ml wurden 4,5  $\mu$ l Reifungscocktail III hinzugegeben (entspricht pro ml: 4 U GM-CSF, 20 U IL-4, 10 ng TNF $\alpha$ , 1  $\mu$ g Prostaglandin E2 (PGE 2) und 2 ng IL-1 $\beta$ ) und die Zellen in 35 mm Kulturschalen überführt.

Am folgenden Tag wurden die reifen dendritischen Zellen geerntet, für die FACS-Analyse mit Antikörpern gefärbt und fixiert (siehe 5.4.8) (Bender et al., 1996, Zhou and Tedder, T. F., 1996).

#### 5.4.8 Färbung von Zellen mit Antikörpern für die FACS Analyse

0,5 bis  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Deckel überführt und für 3 min bei 200 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen (ein Rest Flüssigkeit blieb im Gefäß). Jeweils 2  $\mu$ l Antikörperlösung (anti-CD83 Klon HB15e, anti-CD11c, anti-HLA DR, BD Biosciences, Heidelberg) wurde zugegeben und durch kurzes Schütteln auf einem Vortex-Schüttler gemischt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 30 min unter Lichtausschluss stengelassen und danach einmal mit 800  $\mu$ l Waschpuffer (PBS mit 10 mM EDTA und 2% FKS) gewaschen und in 300  $\mu$ l PBS aufgenommen. Die Zellen wurden erneut gevortext und anschließend zur Fixierung mit 300  $\mu$ l PBS/1% Paraformaldehyd versetzt. Es folgte die FACS-Analyse an einem *FACScanto* der Firma BD Biosciences (Heidelberg).

#### 5.4.9 FACS Analyse

Mit Hilfe der FACS-Analyse (*Fluorescence activated cell sorting*) können spezifische Eigenschaften von Zellen gemessen werden. Die allgemeine Bezeichnung des Verfahrens lautet Durchflusszytometrie. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht, woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Das Streulicht wird durch Zellgröße, Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre

Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können damit in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden.

Hierzu dienen mehrere Parameter: Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität (z. B. Größe und Struktur des Zellkerns usw.).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, eine Markierung bestimmter Oberflächenproteine auf den Zellen vorzunehmen. Dies geschieht durch Inkubation der Zellen mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern. So ist es möglich, speziell die Zellen, die die Fluoreszenz emittieren, zu zählen. Die Antikörper sind in diesem Fall gegen die Oberflächenproteine CD83, CD11c, CD14 und HLA-DR gerichtet.

## **5.5 Proteinmethoden**

### *5.5.1 Ernte von Zellen zur Gewinnung von Proteinlysat*

Für die Gewinnung von Proteinlysat für Westernblot wurden adhärenente Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen bevor sie anschließend in 1 ml PBS mit Hilfe eines Gummischabers von der Platte gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt wurden. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (5 min bei 200 x g und 4°C) wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet entweder bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Nichtadhärenente Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5 min bei 200 x g und 4°C), einmal mit PBS gewaschen und dann in gleicher Weise weiterverarbeitet wie adhärenente Zellen.

Zur Zellyse wurden je nach Zellmenge 50 – 300 µl E1A-Puffer mit Proteaseinhibitoren zugegeben, die Zellen kurz resuspendiert, und anschließend 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Proteinlösung mit 3x 10 Impulsen sonifiziert (Branson Sonifier B12, Danbury, USA) und anschließend 15 min bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand (Lysat) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration des Gesamtzellextraktes nach der Bradford Methode bestimmt (Bradford, 1976) (siehe 5.5.2).

### 5.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Zugabe von 2  $\mu$ l der Proteinlösung zu 1 ml Bradford Reagenz (Biorad, 1:5 mit Wasser verdünnt). Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Als Nullwert diente die Absorption von verdünntem Bradford Reagenz mit 2  $\mu$ l E1A-Lysispuffer. Mit Hilfe einer vorher ermittelten BSA-Eichgerade konnte die Proteinkonzentration der Probe berechnet werden.

### 5.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Die Gele wurden in Mini-Protean Gelkammern der Firma Biorad (München) entsprechend der Angaben unter 4.10. hergestellt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25 mA pro Gel.

Die Proteinlösungen wurden vor der Auftrennung mit 6x Laemmli-Ladepuffer versetzt und zur Denaturierung für 5 min bei 95°C erhitzt.

### 5.5.4 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Färbung der Gele erfolgte mindestens 15 min unter leichtem Schwenken in der Coomassie-Färbelösung. Anschließend wurden die gefärbten Gele mehrmals mit Gel-Fixierlösung behandelt und schließlich für 1 h mit Wärme und Vakuum auf einem Geltrockner getrocknet.

### 5.5.5 Immunoblot (Westernblot)

Die Expression von endogenen und überexprimierten Proteinen wurde mit Hilfe von Westernblotanalysen nachgewiesen. Nach Trennung der zu analysierenden Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proteine durch Nass-Blot (Biorad, München) bei 70 Volt für 45 min auf eine Protran<sup>®</sup> Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) überführt. Der Transfer wurde durch Färbung der Membran in Ponceau S-Färbelösung (siehe 4.10.)

kontrolliert. Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Membran in 5% Magermilchpulver/TBS-T (siehe 4.10.) für 30 min geschwenkt. Die Primärantikörper wurden in 5% Magermilchpulver/TBS-T verdünnt und über Nacht mit der Membran bei 4°C leicht geschwenkt. Die Membran wurde 3x 10 min mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte 1 h Inkubation mit dem Sekundärantikörper (konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase), der ebenfalls in 5% Magermilchpulver/TBS-T verdünnt war. Dann wurde wieder 3x 10 min mit TBS-T gewaschen. Für die Peroxydase-Licht-Reaktion wurden die beiden ECL-Entwicklerlösungen 1:1 gemischt und 1 min mit der Membran inkubiert. Die auftretende Chemilumineszenz wurde anschließend auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Membran wurde nach erneutem Absättigen in Milchpulverlösung für die Inkubation mit weiteren Antikörpern wieder verwendet.

#### *5.5.6 Nichtkovalente Bindung von Antikörpern an Protein G Sepharose (PGS)*

Es wurden 7 µg gereinigter Antikörper (in mind. 300 µl Gesamtvolumen E1A-Puffer) zu 20 µl Protein G Sepharose (PGS) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und unter Schwenken eine Stunde bei 4°C inkubiert. Dabei bindet das Immunglobulin mit dem Fc-Teil des IgG an das Protein G. Anschließend wurde die PGS dreimal mit kaltem E1A-Puffer gewaschen, zwischen den einzelnen Waschschritten jeweils 1 min bei 100 x g zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

#### *5.5.7 Bestimmung der de novo-Synthese von CD83-Protein durch <sup>35</sup>S-Markierung und Immunpräzipitation*

Die Synthese von CD83-Protein innerhalb eines bestimmten Zeitraumes wurde durch Markierung mit radioaktiv markierten Aminosäuren und anschließender Immunpräzipitation mit einem spezifischen anti-CD83-Antikörper untersucht.

Die jeweiligen Zellen wurden wie unter 5.4.1 beschrieben in 10 cm Kulturschalen transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 1x mit Markierungsmedium gewaschen und anschließend mit 4 ml Markierungsmedium für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ausgehungert, um den intrazellulären Cystein- und Methioninvorrat zu depletieren. Dann wurde für 30 min 200 µCi TRAN<sup>35</sup>S-LABEL™

(MP Biomedicals) pro 10 cm Schale zugesetzt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> weiter inkubiert. Die metabolisch markierten Zellen wurden vor der Ernte 2x mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Für die Immunpräzipitation wurden die Zellpellets in 300 µl E1A-Puffer wie unter 5.5.1 beschrieben lysiert, die Proteinkonzentrationen mittels Bradford (5.5.2) bestimmt und die Konzentrationen aller Proben auf den gleichen Wert eingestellt. Der Einsatz gleicher Gesamtproteinmengen für die Immunpräzipitation wurde mit Hilfe des Tubulin-Signals im Westernblot überprüft. Dafür wurde von den Lysaten jeweils gleiche Aliquots von ca. 10 µg Gesamtprotein abgenommen, mit der entsprechenden Menge 6x Laemmli-Ladepuffer versetzt und per Westernblot analysiert. Mit dem übrigen Lysat wurde die Immunpräzipitation durchgeführt. Um die Bindung von unspezifischen Proteinen an die Protein G Sepharose zu vermindern, wurden gleiche Lysatmengen mit 10% (v/v) IgG versetzt und auf 30 µl Protein G Sepharose gegeben, das Volumen gegebenenfalls mit E1A-Puffer auf 300 µl aufgefüllt und die Ansätze 20 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze bei 100 x g für 1 Minute zentrifugiert und gleiche Volumina der Überstände auf 20 µl vorher vorbereitete anti-CD83-PGS (siehe 5.5.6) überführt. Die Ansätze wurden für die spezifische Immunpräzipitation für 1 Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Proteine wurde die PGS mit den gebundenen Immunkomplexen 3x mit jeweils 1 ml E1A-Puffer gewaschen, zwischendurch für 1 min bei 100 x g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig abgenommen und das radioaktiv markierte CD83-Protein, das über den anti-CD83-Antikörper an die PGS gebunden war, durch Denaturierung von der Sepharose getrennt. Hierfür wurden 10 µl 1x Denaturierungspuffer (PNGaseF-Kit, New England Biolabs) zur Matrix hinzugegeben und die Ansätze 10 min bei 95°C inkubiert. Da es sich bei CD83 um ein stark glykolysiertes Protein handelt, musste dieses zur besseren Identifizierung in der SDS-PAGE deglykolysiert werden. Hierfür wurden 1 µl 10x NP40-Puffer, 1 µl 10x Reaktionspuffer sowie 0,3 µl PNGaseF (PNGaseF-Kit, New England Biolabs) zugegeben. Diese Ansätze wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl 6x Laemmli-Ladepuffer wurden die Proben jeweils vollständig in die Taschen eines 12%igen SDS-PAA-Gels aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie-Färbelösung gefärbt, in Gel-Fixierlösung entfärbt und zur Verstärkung des radioaktiven Signals für 30 min in Szintillationslösung (Amplify,

Amersham) unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Gel 1x mit Wasser gewaschen, auf dem Gelrockner getrocknet und autoradiographisch ausgewertet. Zusätzlich wurde eine quantitative Analyse mit einem *Fujifilm BAS-2500 Phosphorimager* (Raytest, Straubenhardt) und der AIDA Software (Raytest, Straubenhardt) durchgeführt.

#### 5.5.8 Reinigung von GST-Proteinen aus Bakterien (Batch-Verfahren)

Zur Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurden *Escherichia coli* BL21 mit pGEX-5x-1-Expressionsplasmiden, die die entsprechende Expressionskassette enthielten, transformiert. 50 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit einer frisch transformierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag mit LB Medium 1:10 verdünnt und weiter bis zu einer OD<sub>600</sub> von ~ 0,6 kultiviert. Dann erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid). IPTG wirkt als Aktivator des *lac*-Operons, indem es an den Repressor LacR bindet und damit dessen Wechselwirkung mit dem Operator inhibiert. Im Gegensatz zur Lactose wird IPTG nicht im natürlichen Metabolismus von Bakterien umgesetzt, seine Konzentration bleibt deshalb über den gesamten Expressionszeitraum konstant und das Gen bleibt aktiv. Nach 3-4 stündiger Expression bei 35°C wurden die Bakterien geerntet, indem sie 15 min bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Das Medium wurde vollständig abgenommen und die Pellets entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

Die Bakterienpellets aus 500 ml Ausgangskultur wurden in 10 ml Bakterien-Lysis-Puffer mit frisch zugesetzten Protease-Inhibitoren und Lysozym (siehe 4.10) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 3 x 10 sek auf Stufe 4-5 sonifiziert (Branson Sonifier B12, Danbury, USA). Danach wurden die festen Bestandteile durch Zentrifugation für 20 min bei 13000 x g und 4°C entfernt. Das Lysat wurde auf 500 µl Glutathionsepharose 4B (Amersham), die vorher mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 / 500 mM NaCl äquilibriert wurde, gegeben und 1 Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert, wobei die GST-Fusionsproteine an das Glutathion gebunden wurden. Danach wurde die Glutathionsepharose durch Zentrifugation bei 1500 x g bei 4°C sedimentiert und dreimal mit je 10 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 / 500 mM NaCl gewaschen. Die Elution der gebundenen GST-

Fusionsproteine erfolgte in 6 Elutionsschritten, wobei jeweils 500 µl Elutionspuffer (50 mM Tris pH 7,5 / 150 mM NaCl / 15 mM Glutathion) für 5 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken mit der Gluthathionsepharose inkubiert wurden. Das Überangebot an Gluthathion führt dabei zu einer Verlagerung der Bindung des GST-Proteins von der Gluthathionsepharose an das freie Gluthathion, sodass die gebundenden Fusionsproteine wieder frei in Lösung vorliegen. Die einzelnen Eluat-Fractionen wurden nach jeweiliger Zentrifugation bei 1500 x g abgenommen und zur vollständigen Abtrennung der Gluthathionsepharose über eine Chromatographie-Säule (Poly-Prep Chromatography Columns von BIO-RAD) filtriert. Das Eluat wurde in frischen Reaktionsgefäßen aufgefangen. Der Proteingehalt der einzelnen Eluate wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung kontrolliert, geeignete Fractionen wurden vereinigt und über Nacht gegen PBS dialysiert. Mit der Bradford-Methode wurde die Protein-Konzentration bestimmt (siehe 5.5.2). Die Proteinlösungen wurden mit 10% Glycerin versetzt, portioniert und bei -80°C gelagert.

#### 5.5.9 Reinigung von GST-Proteinen aus Bakterien (ÄKTA)

Alternativ wurden die GST-Fusionsproteine mit Hilfe der Affinitätschromatographie gereinigt. Als System diente hierfür die HPLC-Anlage *ÄKTA-Purifier* (Amersham Biosciences, Freiburg). Die Bakterienlysate (siehe 5.5.8) wurden vor der Chromatographie durch einen 0,45 µm Spritzenfilter (Costar, Cambridge, MA USA) filtriert, um das feine Schlauchsystem der HPLC-Anlage nicht zu verstopfen.

Als Affinitätssäulen wurden die *GSTrap FF 1 ml* Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Sie enthielten als Matrix *Gluthathionsepharose<sup>TM</sup> 4 Fast Flow*.

Die Methode für den Chromatographie-Lauf wurde mit Hilfe der UNICORN 4.11 Software erstellt und besaß folgendes Profil:

Die Flussgeschwindigkeit betrug 1,5 ml / min und die Proteine wurden in einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert.

Nachdem das gesamte Bakterienlysate auf die Säule aufgetragen wurde, wurden nicht gebundene Proteine mit 8 Säulenvolumen PBS von der Säule gewaschen. Anschließend folgte die Elution der GST-Fusionsproteine durch einen Anstieg der Gluthathion-Konzentration im Laufpuffer. Dafür wurde ein linearer Gradient gefahren, indem der Laufpuffer PBS über eine Länge von 5 Säulenvolumen linear von 0% auf



100% durch Elutionspuffer (50 mM Tris HCl, pH 8,0; 10 mM reduziertes Gluthathion) ersetzt wurde. Die Endkonzentration an Gluthathion betrug also 10 mM und wurde noch für weitere 2 Säulenvolumen aufrecht erhalten.

Während der Elution wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen und später mittels SDS-PAGE und Comassie-Färbung untersucht. Dafür wurden anhand des Elutionsprofils diejenigen Fraktionen ausgewählt, die bei 280 nm eine Absorption zeigten und somit Protein enthielten.

Geeignete Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen PBS dialysiert. Mit der Bradford-Methode wurde die Protein-Konzentration bestimmt (siehe 5.5.2). Die Proteinlösungen wurden mit 10% Glycerin versetzt, portioniert und bei -80°C gelagert.

#### 5.5.10 RNA-Mobility-Shift-Experimente zur Bestimmung von Protein-RNA-Interaktionen

Zum Nachweis von Interaktionen zwischen dem AUF1 Protein und dem PRE-Strukturelement in der CD83-RNA wurden *RNA-Mobility-Shift-Experimente* durchgeführt.

Hierfür wurden die Isoformen von AUF1 rekombinant in Bakterien exprimiert und über GST-Affinitätschromatographie gereinigt. Die RNA wurde durch *in vitro* Transkription hergestellt und mit  $\alpha$  [ $^{32}$ P]-UTP radioaktiv markiert.

Pro Ansatz wurde zuerst der RNA-Mix gemischt und anschließend mit dem Protein inkubiert. Der RNA-Mix bestand aus folgenden Komponenten:

0,8 $\mu$ l	RNA
1 $\mu$ l	RNasin <sup>®</sup> (40 U)
7 $\mu$ g	Hefe-RNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) (Roche, Mannheim)
5 $\mu$ g	MS2-RNA (0,8 $\mu$ g/ $\mu$ l) (Roche, Mannheim)
2,5 mM	DTT (100 mM)
6 $\mu$ l	10x PBS

Die Hefe- bzw. MS2-RNA im Überschuß dienten zum Abfangen unspezifischer Protein-RNA-Interaktionen. Die DTT-Konzentration wurde so gewählt, dass sich im

gesamten Bindungsansatz eine Konzentration von 1 mM ergab. Bei dieser DTT-Konzentration besitzt der RNase-Inhibitor RNasin<sup>®</sup> seine höchste Aktivität.

Der RNA-Mix wurde zu der bereits vorgelegten Proteinlösung (300 – 1200 ng Protein in PBS) gegeben, gut gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz mit 3 µl Glycerin versetzt und in einem 4%igen bzw. 6%igen nativen Polyacrylamidgel im TBE-Puffersystem aufgetrennt.

Die Elektrophorese erfolgte bei 50 V für ca. 2h.

Das Gel wurde auf einem Gelrockner getrocknet und autoradiographisch analysiert.

Für Konkurrenzexperimente, bei denen die Bindung der radioaktiv markierten RNA an das Protein durch einen Überschuss an nicht markierter RNA kompetitiert werden sollte, wurden steigende Mengen nicht markierter RNA zum radioaktiv markierten RNA-Mix gegeben, wobei das Gesamtvolumen immer ausgeglichen wurde. Dabei war es wichtig, dass die nicht markierte und markierte RNA gemischt wurden, bevor sie mit dem Protein in Kontakt kamen, damit keine vorzeitige Bindung an das Protein stattfinden konnte.

Zum Nachweis, dass AUF1 im Komplex mit der RNA gebunden ist, wurden RNA-*Super-Shift*-Experimente durchgeführt. Hierbei wurde durch zusätzlich im Bindungsansatz vorhandenen anti-AUF1-Antikörper ein weiterer *Shift* des radioaktiven Signals zu größeren, in der Elektrophorese weniger mobilen Komplexen erreicht.

Nachdem die „heisse“ RNA und das Protein zusammengegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden, wurden 0,25 – 0,75 µg Antikörper zupipettiert, wobei das Volumen mit PBS ausgeglichen wurde. Nachdem weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, erfolgte die Elektrophorese wie bereits oben beschrieben.

## 6 Ergebnisse

Das Glykoprotein CD83 ist der prinzipielle Oberflächenmarker reifer dendritischer Zellen (*Dendritic Cells*, DC). Er wird während des zellulären Reifungsprozesses zusammen mit kostimulatorischen Oberflächenmolekülen, wie beispielsweise CD80 und CD86, stark exprimiert. Viele Experimente deuten darauf hin, dass CD83 eine wichtige Rolle in der DC-vermittelten Induktion der T-Zell Immunantwort spielt (Lechmann et al., 2002b, Lechmann et al., 2002a).

Die mRNA von CD83 enthält in ihrem kodierenden Bereich ein hochstrukturiertes *cis*-aktives Element, welches als *Posttranscriptional Regulatory Element* (PRE) bezeichnet wird (Prechtel et al., 2006). Das zelluläre RNA-bindende Protein HuR ist in der Lage, dieses Strukturelement spezifisch zu binden und den Kernexport der CD83 mRNA mit Hilfe des CRM1 Kernexportrezeptors einzuleiten (Prechtel et al., 2006, Schutz et al., 2006).

Bisher ist HuR hauptsächlich als ARE-bindendes Protein (*AU-rich Element*, ARE) beschrieben worden, wobei diese Bindung mit einer Stabilisierung der entsprechenden RNA einhergeht (Fan and Zhang, X. G., 2005, Lal et al., 2004). Ein anderes RNA-bindendes Protein ist AUF1. Es handelt sich hierbei um ein Protein, welches ebenfalls mit AU-reichen Sequenzen im 3'UTR von ERG mRNAs interagieren kann. Die Bindung von AUF1 führt im Regelfall zu einer Destabilisierung dieser ARE-enthaltene mRNAs (He and Schneider, R., 2006, Loflin et al., 1999, Wilson and Brewer, G., 1999).

HuR und AUF1 werden oft auch als Gegenspieler (Antagonisten) bezeichnet, deren Zusammenspiel das Schicksal einer ARE-enthaltene RNA steuert, indem sie kompetitiv an ARE-Sequenzen binden. Im Gegenzug dazu sind aber auch RNP-Komplexe beschrieben worden, in denen beide Proteine gleichzeitig an dieselbe RNA gebunden sind. Desweiteren wurden auch direkte Wechselwirkungen zwischen den Proteinen HuR und AUF1 beschrieben (Blaxall et al., 2002, David et al., 2007, Lal et al., 2004).

Da die Funktion von HuR an der CD83 mRNA ausführlich untersucht wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit ein potentieller Einfluss des AUF1 Proteins auf die Prozessierung der CD83 mRNA untersucht werden.

## 6.1 Protein / RNA-Interaktionen

### 6.1.1 Nachweis einer AUF1 / CD83 mRNA Interaktion im RNA-Mobility-Shift-Experiment

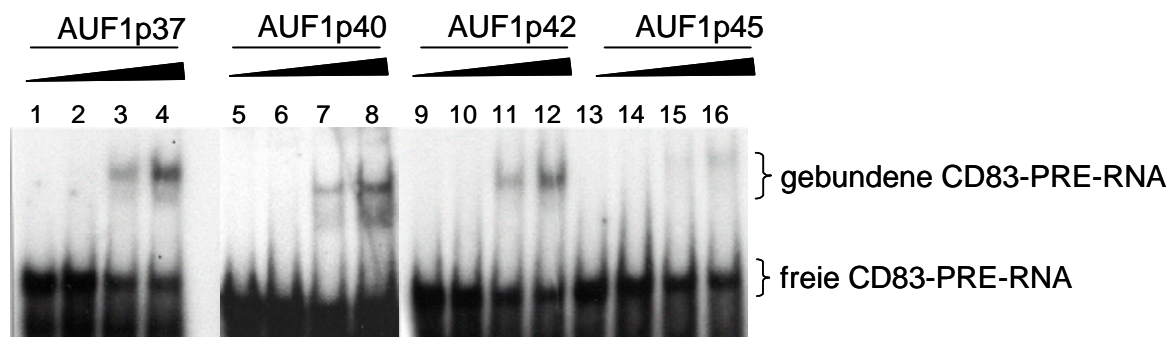
Zum Nachweis einer direkten Interaktion zwischen den Isoformen von AUF1 und dem PRE-Strukturelement der CD83 mRNA, wurden *RNA-Mobility-Shift*-Experimente durchgeführt.

Dazu wurde die zu untersuchende RNA mit Hilfe der *in vitro* Transkription von einer linearen „*Template*“ DNA (linearisierter Vektor pcDNA3-CD83-PRE) amplifiziert und dabei radioaktiv markiert. Die Markierung von RNAs erfolgte durch den Einbau von [ $\alpha^{32}$ P]-UTP. Zur Sicherstellung der korrekten Faltung der RNA wurde diese in einem Wasserbad auf 80°C erwärmt und langsam über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Diese RNA wurde mit dem entsprechenden rekombinanten Protein in Anwesenheit hoher Konzentrationen unspezifischer Kompetitor-RNAs inkubiert und anschließend auf einem nativen Polyacrylamidgel analysiert. Hat das Protein an die RNA gebunden, kann aufgrund der Komplexbildung eine Änderung des Laufverhaltens in Richtung niedrigerer Mobilität im Vergleich zur freien RNA beobachtet werden (*Shift*).

Rekombinantes GST wurde mit Hilfe des Vektors pGEX-5x-1 in *E. coli* (Stamm BL21(DE3)), rekombinantes GST-AUF1 entsprechend mit den Vektoren pGEX-5x-1-AUF1p37/p40/p42/p45 exprimiert.

Bei allen vier Isoformen kommt es zu einem „*Shift*“ der radioaktiven RNA im nativen Gel, was durch eine Bindung an das entsprechende Protein verursacht wird (siehe Abb. 10). Dieser „*Shift*“ nimmt mit steigender Proteinmenge an Intensität zu. In den Spuren 1, 5, 9 und 13 wurde GST als Kontrollprotein eingesetzt, welches nicht in der Lage ist, die RNA zu binden. Die Menge an eingesetztem GST entsprach der Proteinmenge an AUF1 in den Spuren 4, 8, 12 und 16 und betrug 1200 ng.

Alle vier Isoformen von AUF1 sind in der Lage, das Strukturelement in der CD83 mRNA zu binden, wobei die Bindung der größten Isoform AUF1p45 am schwächsten ausgeprägt zu sein scheint.



**Abb. 10** Nachweis spezifischer Bindungen aller vier Isoformen von AUF1 an das PRE-Element der CD83 mRNA mit Hilfe von *RNA-Mobility-Shift-Experimenten*.

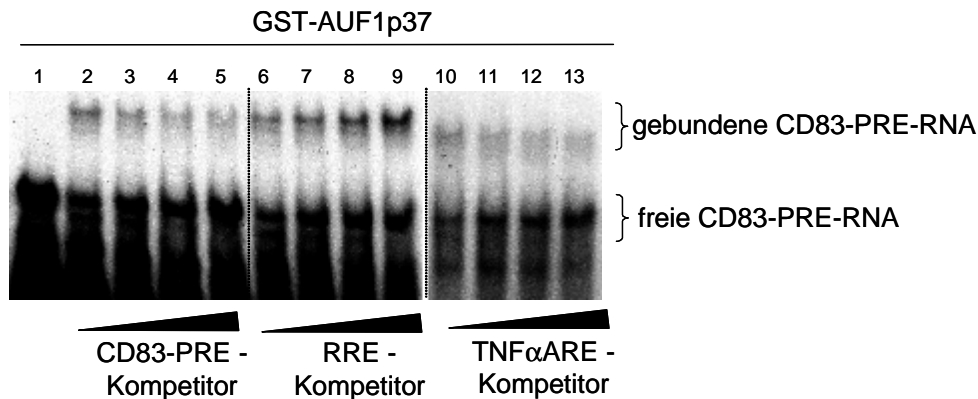
Radioaktiv markierte CD83-PRE-RNA wurde mit steigenden Mengen (500-1200 ng) AUF1-Protein inkubiert, in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

(1, 5, 9, 13: SLII-RNA + GST-Protein; 2-4: SLII-RNA + AUF1p37; 6-8: SLII-RNA + AUF1p40; 10-12: SLII-RNA + AUF1p42; 14-16: SLII-RNA + AUF1p45)

Desweiteren wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, um die Spezifität der Protein-RNA-Bindung zu bestätigen. Hierbei sollte die Bindung der radioaktiv markierten RNA an das Protein durch einen Überschuss an nicht markierter RNA kompetitiert werden. Dazu wurden steigende Mengen nicht markierte RNA zum radioaktiven RNA-Mix gegeben, wobei das Gesamtvolumen immer beibehalten wurde. Dabei war es wichtig, dass die nicht markierte und markierte RNA gemischt wurden, bevor sie mit dem Protein in Kontakt kamen, damit keine vorzeitige Bindung an das Protein stattfinden konnte. Die höchste Menge an Kompetitor-RNA entsprach einem 12,5 fachen Überschuss zur radioaktiv markierten RNA. Als spezifische Kompetitor-RNA wurden CD83-PRE RNA und das TNF $\alpha$  ARE eingesetzt. Das ARE von TNF $\alpha$  enthält eine bereits mehrfach beschriebene Bindungsstelle für AUF1 (Wilson et al., 2003b) und diente daher als positive Kontrolle. Als unspezifische Konkurrenzkontrolle (negative Kontrolle) wurde die hoch strukturierte RNA des *Rev Response Elements* (RRE) aus HIV-1 verwendet.

In Abb. 11 ist gezeigt, dass bei steigenden Mengen spezifischer TNF $\alpha$  ARE Kompetitor-RNA die nachweisbare RNA-Protein-Interaktion abnimmt, während dies bei unspezifischer Konkurrenz mit RRE RNA nicht der Fall ist. Die scheinbare Intensitätssteigerung des *Shift-Signals* bei Verwendung von unspezifischer RRE RNA als Kompetitor lässt sich durch Kompensation potentieller RNase-Aktivität erklären.

Dieses Ergebnis ist ein erster Hinweis auf eine spezifische Bindung zwischen dem CD83-PRE-Element und AUF1.



**Abb. 11 RNA-Mobility-Shift-Experimente mit Kompetitionen zur Bestätigung der Bindungsspezifität.**

Zu gleichen Mengen radioaktiv markierter RNA und gleichen Mengen AUF1p37 wurden steigende Mengen nicht markierte spezifische (CD83-PRE und TNF $\alpha$  ARE RNA) und unspezifische (RRE) RNA gegeben, bei Raumtemperatur inkubiert, in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

(1: RNA + GST-Protein; 2, 6, 10: RNA + AUF1p37; 3-5: RNA + AUF1p37 + Kompetitor CD83-PRE RNA; 7-9: RNA + AUF1p37 + Kompetitor RRE RNA; 11-13: RNA + AUF1p37 + Kompetitor TNF $\alpha$  ARE-RNA)

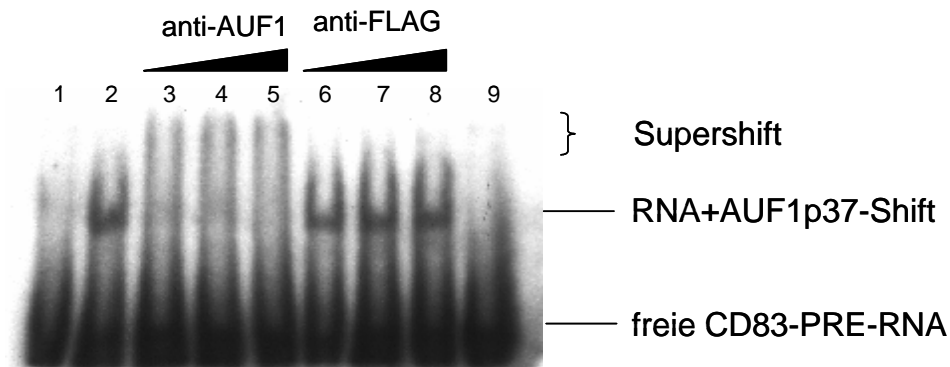
Eine weitere Möglichkeit, die Protein-RNA-Bindung zu spezifizieren, ist der sogenannte „*Super-Shift*“. Durch Zugabe von spezifischem Antikörper zum Protein-RNA-Bindungsansatz kommt es zu einer weiteren Verringerung der Mobilität während der Elektrophorese im Polyacrylamidgel, wenn dieser durch die Bindung an das Protein zu einer weiteren Vergrößerung des Komplexes führt.

In Abb. 12 wurden in den Spuren 3, 4 und 5 steigende Mengen spezifischer anti-AUF1-AK eingesetzt. Hier ist ein zusätzliches Signal mit niedrigerer Mobilität zu erkennen, während das Signal der Protein-RNA-Bindung schwächer wird. Bei diesem „*Super Shift*“ handelt es sich mehr um einen Schatten als um eine distinkte Bande, was mit der Verwendung von polyklonalem Antikörper zusammenhängen kann, da diese keine einheitliche Größe besitzen.

Kein „*Super Shift*“ und auch keine Abnahme des bindungsspezifischen Signals war zu beobachten, wenn unspezifischer anti-Flag-Antikörper eingesetzt wurde (Spuren 6 bis 8). Als Kontrollen wurden in Spur 1 die markierte RNA mit GST-Protein aufgetragen. Hier war keine Bindung zu erwarten. Um zu kontrollieren, dass der anti-

AUF1-AK nicht direkt an die CD83-PRE-RNA bindet, wurde in Spur 9 ein Ansatz ohne AUF1 aufgetragen, der nur die RNA mit dem Antikörper enthielt. Auch hier kam es zu keinem Bindungssignal.

So wurde gezeigt, dass das Protein AUF1 an dem Protein-RNA-Komplex beteiligt ist.



**Abb. 12 RNA-Super-Mobility-Shift-Experiment zur Bestätigung der Beteiligung von AUF1 am RNA-Protein-Bindungskomplex.**

Zu gleichen Mengen radioaktiv markierter RNA und gleichen Mengen AUF1p37 wurden steigende Mengen spezifischer anti-AUF1-AK und unspezifischer anti-Flag-AK zugegeben, bei Raumtemperatur inkubiert, in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

(1: RNA + GST-Protein; 2: RNA + AUF1p37; 3-5: RNA + AUF1p37 + anti-AUF1-AK; 6-8: RNA + AUF1p37 + anti-Flag-AK; 9: RNA + anti-AUF1-AK)

In einem weiteren *RNA-Mobility-Shift-Experiment* sollte der Bindungsbereich des strukturierten CD83-PRE-Elements weiter eingeschränkt werden. Für diese Feinkartierung wurden unterschiedliche Deletionsmutanten eingesetzt, bei denen jeweils einer der drei beschriebenen „Subloops“ des CD83-PRE-Elements deletiert war (siehe Abb. 13).

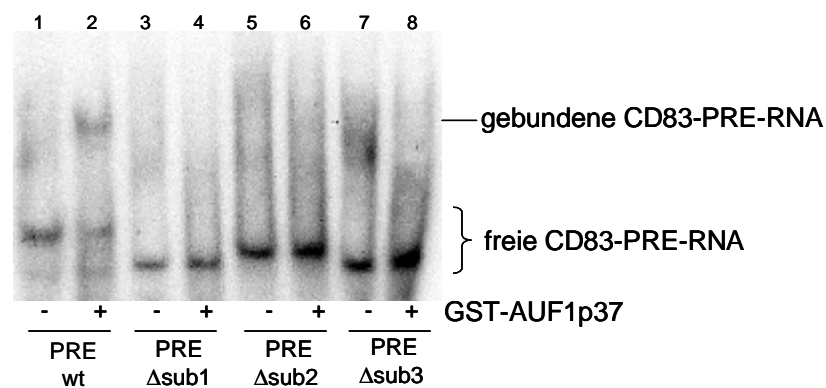


**Abb. 13 Strukturdarstellung der einzelnen Deletionsmutanten von CD83-PRE.**

Die prognostizierte Struktur des CD83-PRE-Elements besteht aus drei „Subloops“, von denen in den einzelnen Deletionsmutanten jeweils einer deletiert ist.

Bei dieser Untersuchung stellte sich heraus, dass anscheinend das gesamte strukturierte CD83-PRE RNA-Element für die Bindung essentiell ist, da nur in Spur 2

bei Verwendung der Wildtyp-RNA ein *Shift* zu erkennen ist. Alle Deletionsmutanten sind nicht in der Lage AUF1 zu binden (Abb. 14). Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis für die Spezifität der Bindung und deutet auf eine strukturspezifische und nicht sequenzspezifische Bindung hin.



**Abb. 14 RNA-Mobility-Shift-Experiment mit unterschiedlichen Deletionsmutanten von CD83-PRE.**

Die einzelnen radioaktiv markierten RNAs der CD83-PRE-Deletionsmutanten und von CD83-PRE-wt wurden mit 1200 ng GST (1, 3, 5 und 7) und 1200 ng AUF1p37 (2, 4, 6 und 8) inkubiert, in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

## 6.2 Einfluss von AUF1 auf die Expression von CD83

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden für diese Untersuchungen COS7 Zellen als heterologes Zellsystem verwendet. Diese eignen sich besonders, da sie leicht zu kultivieren und sehr effektiv zu transfizieren sind. COS7 Zellen exprimieren kein endogenes CD83, die vier Isoformen von AUF1 sind hingegen in diesen Zellen nachweisbar.

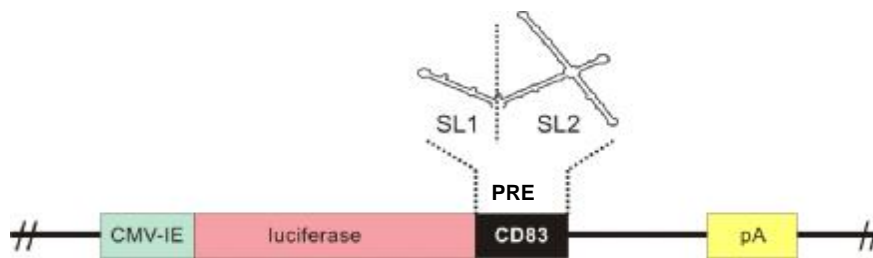
### 6.2.1 Charakterisierung einer biologischen Funktion

In vorausgehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die CD83 mRNA unter Beteiligung von HuR über den CRM1-Weg aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden kann (Prechtel et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass auch AUF1 in der Lage ist, die CD83 mRNA am PRE zu binden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die beschriebene Interaktion auch eine biologische Auswirkung zur Folge hat.



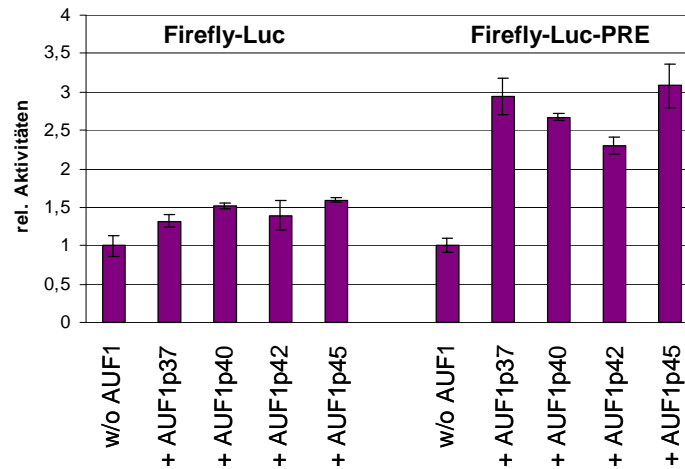
Hierfür wurden Luziferase-Reporter-Experimente durchgeführt. Das hierfür eingesetzte Reporter-Genkonstrukt ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt: Das *Firefly*-Luziferase Gen (aus *Photinus pyralis*) wird durch den sehr frühen Promotor des humanen Cytomegalievirus (CMV-IE) kontrolliert. Am 3' Ende der Luziferasesequenz befindet sich das CD83-PRE Element, d.h. nt 466 – nt 615 aus der kodierenden Region von CD83. Etwa 400 Bp vom Ende der CD83 kodierenden Sequenz entfernt folgt das Polyadenylierungssignal (Poly A).



**Abb. 15 Schematische Darstellung des Luziferase-CD83-PRE-Reporter-Genkonstruktes.**

COS7 Zellen wurden mit konstanten Mengen CD83-PRE-Reporter-Genkonstrukt und den Expressionsvektoren für die einzelnen Isoformen von AUF1 (Effektor) kotransfiziert. In einem Ansatz wurde anstatt eines AUF1-Expressionsplasmids der parentale Vektor pBC12 transfiziert (negative Kontrolle). Ebenfalls war in jedem Transfektionsansatz ein Kontrollplasmid enthalten, das für *Renilla*-Luziferase (aus *Renilla reniformis*) kodiert. Die Expression dieses *Renilla* Gens ermöglichte die interne Kontrolle der Transfektions- und Lyse-Effizienz der zu untersuchenden Zellkulturen. Somit wurde eine vergleichbare Aussage der einzelnen Transfektionsansätze möglich.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse des Reporter-Genexperimentes dargestellt. So konnte gezeigt werden, dass nur bei Anwesenheit des CD83-PRE-Elementes eine etwa dreifache Steigerung der Luziferaseaktivität bei Überexpression der vier AUF1-Isoformen zu beobachten war (Spur 6-11). Fehlt dieses Element im Reporter-Genkonstrukt, wird die Luziferaseaktivität kaum durch AUF1 beeinflusst (Spur 1-5). Damit konnte sichergestellt werden, dass die beobachteten Effekte beispielsweise nicht aufgrund von Promotoreffekten zustande kamen, sondern auf die Anwesenheit der CD83-PRE RNA in der Reporter-Gen mRNA zurückzuführen waren.

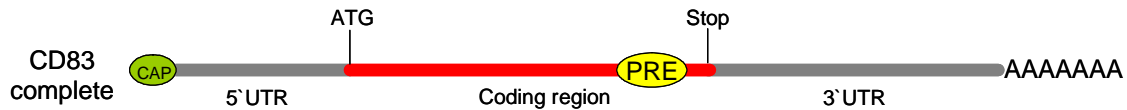


**Abb. 16 AUF1 steigert die biologische Aktivität von CD83 im Luziferase-Reporter-Experiment.**

COS7 Zellen wurden mit dem *Firefly*-Luziferase-CD83-PRE-Reporter-Genkonstrukt (Firefly-Luc-PRE) oder dem Kontroll-Reporter ohne PRE-Element (Firefly-Luc) zusammen mit den angezeigten AUF1 Expressionsplasmiden und einem internen Kontrollvektor, der die *Renilla*-Luziferase exprimiert, kotransfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellextrakte für die Luziferase-Messung vorbereitet. Als AUF1-defiziente Kontrolle wurden COS7 Zellen mit dem parentalen pBC12-Vektor transfiziert.

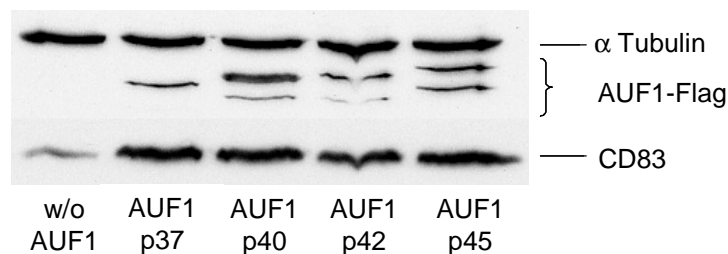
### 6.2.2 Untersuchung der CD83-Protein-Expression in Abhängigkeit von AUF1

Weiterhin sollte untersucht werden, ob AUF1 auch einen Einfluss auf die heterologe CD83 Expression ausübt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die CD83-Proteinmengen in An- und Abwesenheit von überexprimiertem AUF1 untersucht. Dazu wurden COS7 Zellen mit 1,5 µg/ml Expressionsvektor transient transfiziert, der die gesamte CD83-Sequenz einschließlich 5' und 3'UTR's besitzt (pcDNA3-CD83-wt). Die schematische Darstellung ist in Abbildung 17 gezeigt. Zusätzlich wurden 1,5 µg/ml der einzelnen Expressionsvektoren für die AUF1-Isoformen kotransfiziert, bzw. wurde in einem Ansatz das AUF1-Expressionsplasmid durch die gleiche Menge des entsprechenden parentalen Vektor ersetzt, um die CD83 Expression ohne AUF1-Überexpression zu überprüfen.



**Abb. 17 Schematische Darstellung des gesamten CD83-Konstruktes.**

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und gleiche Gesamtproteinmengen in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Expressionsverhalten von CD83 wurde mit einem CD83-spezifischen Antikörper im Westernblot überprüft. Als Ladekontrolle wurde  $\alpha$  Tubulin nachgewiesen. Die überexprimierten AUF1-Isoformen enthielten einen Flag-Tag und wurden mit Hilfe eines Flag-spezifischen Antikörpers nachgewiesen.



**Abb. 18 Steigerung der CD83 Expression durch Überexpression von AUF1.**

COS7 Zellen wurden mit einem Konstrukt, welches die gesamte CD83 Sequenz enthält, einschließlich 5' und 3'UTR, transfiziert. Zusätzlich wurden die AUF1-Expressionsplasmide und ein AUF1 defizienter Expressionsvektor (w/o AUF1) wie angezeigt kotransfiziert.

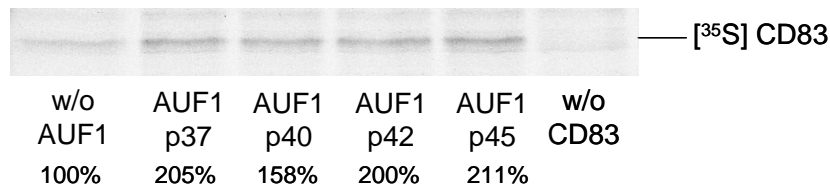
24h nach der Transfektion wurden die Proteine mit den entsprechenden Antikörpern im Westernblot detektiert.

Der Westernblot (Abbildung 18) zeigte, dass alle vier Isoformen von AUF1 in der Lage sind, die Expressionsrate an CD83 deutlich zu erhöhen.

Um einen ersten Eindruck davon zu erhalten, ob die verstärkte Expression von CD83 auf eine Steigerung der Translationsrate oder auf eine Stabilisierung des bereits produzierten Proteins zurückzuführen ist, wurden die Proteine durch den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren gekennzeichnet.

Nach 30 Minuten wurde die Radioaktivität entfernt und die *de novo* Synthese an CD83 Protein innerhalb dieses Zeitraums untersucht. Hierfür wurden COS7 Zellen mit 1  $\mu\text{g/ml}$  des oben erwähnten CD83-Expressionsplasmids und jeweils 3  $\mu\text{g/ml}$  der jeweiligen Expressionsplasmide für die AUF1-Isoformen, bzw. dem parentalen Vektor transient kotransfiziert. Nach 24 Stunden wurde die radioaktive Markierung

der gesamtzellulären Proteine durch Zugabe von [<sup>35</sup>S]-markiertem Methionin und Cystein gestartet. Nach 30 Minuten wurde das radioaktive Medium abgenommen, die Zellen geerntet und lysiert. Zur Isolierung von radioaktiv markiertem CD83 wurde dieses unter Verwendung eines spezifischen CD83-Antikörpers immunpräzipitiert, durch SDS-Gelelektrophorese separiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Autoradiographie wurde zusätzlich mit Hilfe von Phosphoimaging quantifiziert.



**Abb. 19 Erhöhung der *de novo* Synthese an CD83 durch Überexpression von AUF1.**

COS7 Zellen wurden mit einem Konstrukt, welches die gesamte CD83 Sequenz, einschließlich 5' und 3'UTR, transfiziert. Zusätzlich wurden die AUF1-Expressionsplasmide und ein AUF1 defizienter Expressionsvektor (w/o AUF1) wie angezeigt kotransfiziert.

24h nach der Transfektion erfolgte für 30 min eine radioaktive Markierung der Proteine mit [<sup>35</sup>S]. CD83 wurde unter Verwendung eines anti-CD83-Antikörpers immunpräzipitiert. Die Proben wurden elektrophoretisch getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe von Phosphoimaging.

Wie aus Abbildung 19 zu entnehmen ist, führte die Überexpression von AUF1 zu einer durchschnittlich doppelt so starken *de novo* Synthese an CD83 Protein. Ungenauigkeiten bei der Probenverarbeitung und Gelbeladung wurden durch den Vergleich unspezifischer Hintergrundbanden mit den spezifischen Signalen normiert. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte gefolgert werden, dass eine Proteinstabilisierung nicht, bzw. nicht der alleinige Grund für den Anstieg des Proteinmenge zu sein scheint.

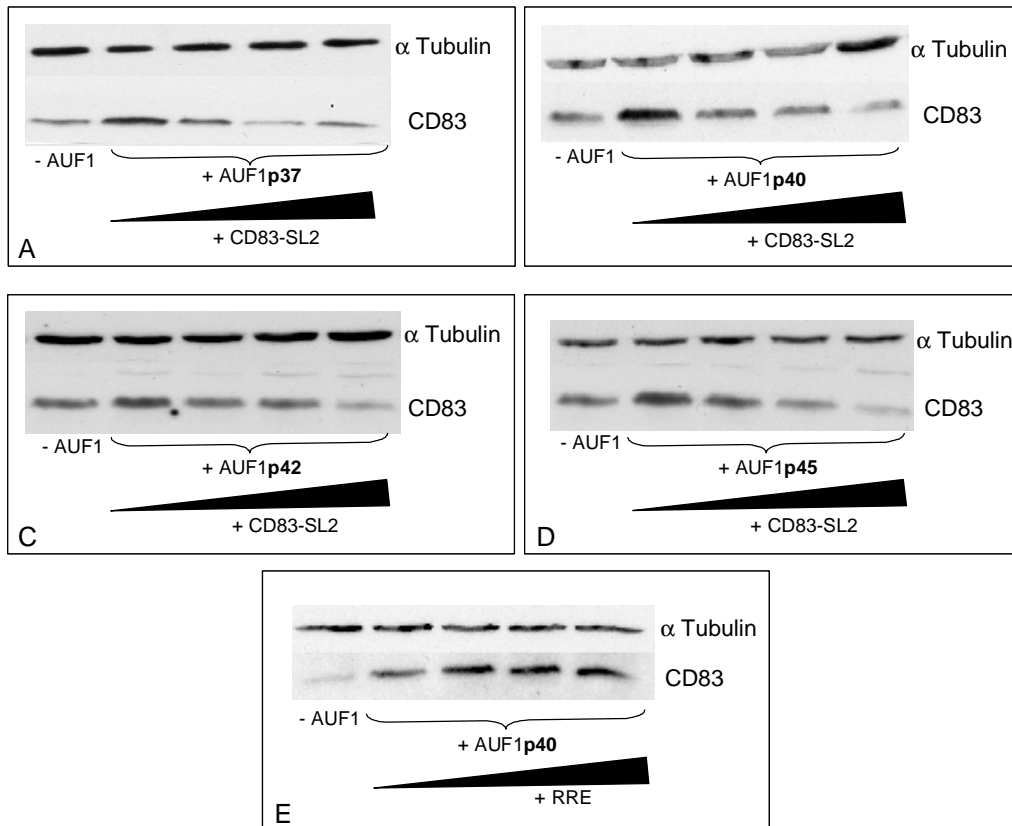
Da eine vermehrte Proteinexpression durch Beeinflussung verschiedener zellulärer Prozesse erfolgen kann, sollte in den folgenden Experimenten nun untersucht werden, ob der Effekt auf einer verstärkten Transkription der cDNA, einer positiven Beeinflussung des mRNA-Transportes aus dem Zellkern ins Zytoplasma oder auf translatorischer Ebene beruht.

### 6.2.3 Untersuchung der Spezifität des CD83-PRE-Elements für den Effekt

Bevor weitere Experimente zur Klärung der Ursache der CD83-Expressionssteigerung durchgeführt wurden, sollte noch die Spezifität des PRE-Strukturelements für den zuvor beobachteten Effekt auf die CD83 Expression bewiesen werden.

Für diese Untersuchung wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, die auf folgendem Prinzip beruhen: Wenn das PRE-Element der CD83 mRNA essentiell für den beobachteten Effekt ist, sollte ein Überschuss an isolierter PRE RNA, zusätzlich zur CD83 mRNA in der Zelle, dazu führen, dass für AUF1 ein Überangebot an Ziel-RNA vorliegt. Dies hätte zur Folge, dass im Verhältnis weniger AUF1 mit der CD83 mRNA interagiert, was im Westernblot durch sinkende Signalstärke der CD83 Proteinbanden zu erkennen wäre.

COS7 Zellen wurden mit 0,5 µg/ml des Expressionsvektors für die gesamte Länge der CD83 mRNA und 2 µg/ml der Expressionsvektoren für die AUF1 Isoformen kotransfiziert. Es wurden für jede überexprimierte Isoform mehrere Ansätze hergestellt, zu denen zusätzlich steigende Mengen eines Expressionsvektors für das PRE-Element pipettiert wurden (0-1,5 µg/ml). Die Vektormengen wurden dabei mit dem parentalen Vektor ausgeglichen. Die größte eingesetzte Menge an PRE-Expressionsvektor (Kompetitor) entsprach dabei der dreifachen Menge an CD83-Expressionsvektor.



**Abb. 20** Beteiligung des CD83-PRE-Elements an dem AUF1-vermittelten Expressionsanstieg von CD83.

COS7 Zellen wurden mit einem Konstrukt, welches die gesamte CD83 Sequenz, einschließlich 5' und 3'UTR, transfiziert. Zusätzlich wurden die AUF1-Expressionsplasmide und ein AUF1 defizienter Expressionsvektor (- AUF1) wie angezeigt kotransfiziert. A, B, C und D zeigen jeweils eine Isoform pro Konkurrenzexperiment. Zur Konkurrenz wurde zusätzlich in steigenden Mengen ein Vektor transfiziert, der das isolierte PRE-Element exprimiert (A-D), bzw. als Kontrolle ein Vektor zur Expression von RRE als unspezifischen Konkurrent (E).

24h nach der Transfektion wurden die Proteine mit den entsprechenden Antikörpern im Westernblot detektiert.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass ein Überangebot an PRE RNA tatsächlich zu einer Abnahme der CD83 Proteinmenge führt. Dieses Konkurrenzexperiment wurde für jede AUF1 Isoform durchgeführt (Abb. 20 A-D). Als Negativkontrolle wurde ein Vektor eingesetzt, der die RNA des *Rev Response Elements* (RRE) aus HIV1 exprimiert. AUF1 ist nicht in der Lage, dieses ebenfalls hochstrukturierte RNA-Element zu binden. Diese Kontrolle wurde beispielhaft mit der AUF1p40 Isoform durchgeführt und zeigt keine Beeinflussung der CD83 Expression (Abb. 20 E).

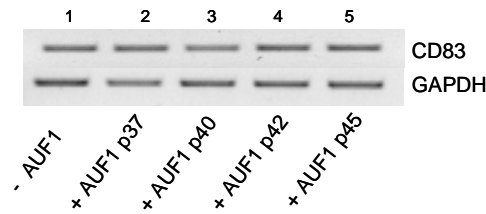
Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass das im kodierenden Bereich der CD83 mRNA vorhandene PRE-Strukturelement an der AUF1-vermittelten Steigerung der CD83 Expression beteiligt ist.

#### *6.2.4 Untersuchung der CD83 mRNA Mengen unter Einfluss von AUF1*

Zur Überprüfung, ob die gesteigerte Proteinexpression aus einer Erhöhung der Transkriptionsrate von CD83 resultiert, wurde die Genexpression von CD83 in An- und Abwesenheit von überexprimiertem AUF1 untersucht.

Hierzu wurden COS7 Zellen mit 1 µg/ml des Expressionsvektors transient transfiziert, der die gesamte CD83-Sequenz einschließlich 5' und 3'UTR's besitzt (pcDNA3-CD83-wt). Zusätzlich wurden 3 µg/ml der einzelnen Expressionsvektoren für die AUF1-Isoformen kotransfiziert, bzw. wurde in einem Ansatz das AUF1-Expressionsplasmid durch die gleiche Menge des entsprechenden parentalen Vektors ersetzt, um die CD83 mRNA ohne AUF1-Überexpression zu überprüfen.

Nach 24 Stunden wurde die gesamtzelluläre RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als interne Kontrolle für die anschließende PCR diente die Amplifikation der cDNA der konstitutiv exprimierten Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die eingesetzten Mengen der jeweiligen cDNAs wurden auf eine einheitliche GAPDH-Expression bezogen. Für die Amplifikation von CD83 mit den spezifischen Primern CD83\_s und CD83\_as (siehe 4.4.1) wurden schließlich die aus der GAPDH-PCR ermittelten cDNA-Mengen eingesetzt. Die amplifizierten Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht (siehe Abb. 21).



**Abb. 21 Keine Beeinflussung der gesamtzellulären CD83 mRNA durch AUF1 Überexpression.**

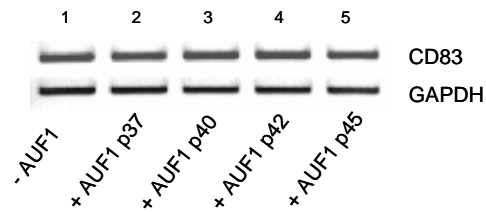
COS7 Zellen wurden mit einem Konstrukt, welches die gesamte CD83 Sequenz enthält, einschließlich 5' und 3'UTR, transfiziert. Zusätzlich wurden die AUF1-Expressionsplasmide (Spur 2-5) und ein AUF1-defizienter Expressionsvektor (Spur 1) kotransfiziert.

Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die gesamtzelluläre RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression von CD83 wurde durch Amplifikation der CD83 spezifischen cDNA mittels PCR analysiert und die Produkte durch Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Als interne Kontrolle der PCR diente die Amplifikation der GAPDH cDNA.

Abbildung 21 zeigt, dass die Gesamtmenge an CD83 mRNA von AUF1 unbeeinflusst bleibt. Eine weitere Möglichkeit für die gesteigerte Proteinexpression könnte ein verstärkter Transport von CD83 mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma der Zelle sein, sodass der zytoplasmatischen Translationsmaschinerie mehr mRNA als Matrize zur Verfügung steht und in Folge mehr Protein gebildet werden kann. Ob dies der Fall ist, kann durch Untersuchung der zytoplasmatischen CD83 mRNA Mengen festgestellt werden.

Zellen wurden wie oben beschrieben kotransfiziert. 24 Stunden danach wurden die Zellen in Kern- und zytoplasmatische Bestandteile fraktioniert (siehe 5.2.5). Die zytoplasmatische RNA wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit dieser zytoplasmatischen cDNA wurde exakt wie mit der gesamtzellulären cDNA verfahren. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt.





**Abb. 22 Keine Beeinflussung der intrazellulären Verteilung von CD83 mRNA durch AUF1 Überexpression.**

COS7 Zellen wurden mit einem Konstrukt, welches die gesamte CD83 Sequenz enthält, einschließlich 5' und 3'UTR, transfiziert. Zusätzlich wurden die AUF1-Expressionsplasmide (Spur 2-5) und ein AUF1 defizienter Expressionsvektor (Spur 1) kotransfiziert.

Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die zytoplasmatischen Zellbestandteile isoliert, die zytoplasmatische RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression von CD83 wurde durch Amplifikation der CD83 spezifischen cDNA mittels PCR analysiert und die Produkte durch Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht. Als interne Kontrolle der PCR diente die Amplifikation der GAPDH cDNA.

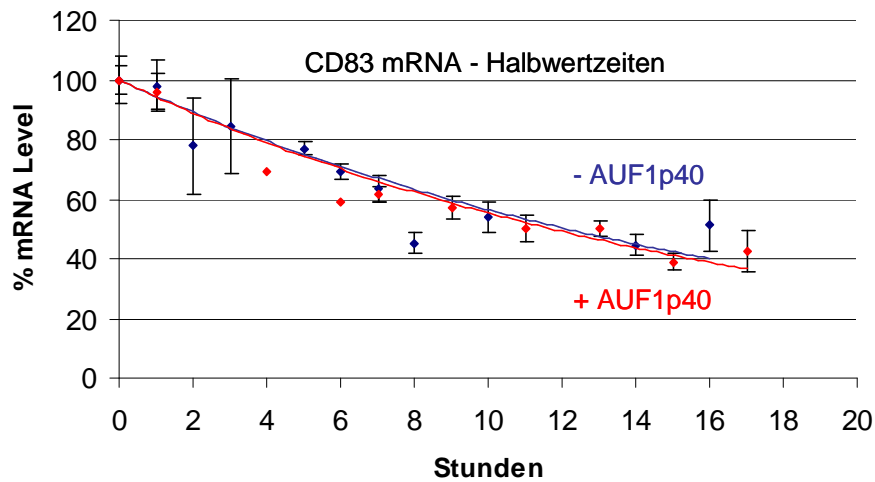
Auch auf die intrazelluläre Verteilung von CD83 mRNA scheint AUF1 keinen Einfluss zu haben. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verstärkte Proteinexpression vermutlich weder auf die Transkriptionsrate noch auf einen gesteigerten mRNA Export aus dem Zellkern zurückzuführen ist.

#### 6.2.5 Einfluss von AUF1 auf die Stabilität der CD83 mRNA

Obwohl bereits gezeigt wurde, dass die Gesamtmenge an CD83 mRNA nicht durch AUF1 beeinflusst zu sein scheint, wurde zur weiteren Absicherung dieses Ergebnisses untersucht, ob AUF1 einen Effekt auf die Stabilität der CD83 mRNA hat. Die Stabilität von mRNAs kann durch die Analyse des mRNA-Abbaus bestimmt werden. Dies erfolgte mit Hilfe eines *Transcriptional Pulse* Experimentes, in welchem die Transkription der CD83 mRNA unter die Kontrolle eines Tetracyclin-regulierten Promotors gestellt wird. Auf diese Weise wird der Einsatz allgemeiner Transkriptioninhibitoren mit potentiell toxischen Nebenwirkungen (z. B. Actinomycin D) vermieden.

Im Fall des hier benutzten *Tet off*-Systems bewirkte die Tetracyclin Zugabe eine Inhibition der CD83 Transkription (Loflin et al., 1999, Xu et al., 1998) (siehe auch 5.4.5.).  $2 \times 10^6$  HeLa *Tet off* Zellen wurden mit  $1,5 \mu\text{g}$  pUHC-CD83-Plasmid transient transfiziert. Es enthält die vollständige cDNA von CD83 unter der Kontrolle eines *Tet off*-Promotors. Die Transkription der CD83 cDNA kann also nur stattfinden, wenn kein Tetracyclin oder Doxycyclin anwesend ist. Es wurden zwei Ansätze transfiziert, wobei ein Ansatz zusätzlich mit  $4,5 \mu\text{g}$  eines Expressionsplasmids für AUF1p40 kotransfiziert wurde. Zum Ausgleich der DNA Mengen wurde der zweite Ansatz mit dem entsprechenden Menge an parentalem Vektor kotransfiziert. Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie unter 4.4.5 beschrieben. Später wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels der *Realtime* PCR analysiert.

Die mathematische und graphische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Excel Programms (Microsoft). Der relative CD83 mRNA Gehalt zum Zeitpunkt  $t=0$  wurde auf 100% festgesetzt und der Gehalt der weiteren Zeitwerte ins Verhältnis zu diesem Wert dargestellt. Die Stabilität der mRNA wurde mit Hilfe der Halbwertszeit angegeben. Dieser Wert beschreibt den Zeitpunkt, an dem ausgehend von der Ausgangsmenge der RNA (100%) noch 50% dieser Menge vorhanden sind.



**Abb. 23 Überexpression von AUF1p40 hat keinen Einfluss auf die Stabilität der CD83 mRNA.**

Zur Bestimmung der Stabilität der CD83 mRNA wurde ein *Transcriptional Pulse* Experiment mit Hilfe des Tetracyclin-regulierten *Tet off*-Promotorsystems durchgeführt. Dazu wurden HeLa *Tet off* Zellen mit dem entsprechenden Tet-abhängigen CD83 Konstrukt und einem Expressionsvektor für AUF1p40 (+ AUF1p40), bzw. einem Kontrollplasmid (-AUF1p40) transfiziert.

48h Stunden später wurde die Transkription durch Zugabe von Doxycyclin gestoppt. Ab diesem Zeitpunkt wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden Proben genommen, die RNA isoliert und für die *real time* PCR präpariert.

Die Halbwertszeit der CD83 mRNA liegt bei ca. 12 Stunden. Dieser Wert entsprach ungefähr dem Wert, der bereits in früheren Studien bestimmt wurde (Prechtel et al., 2006). In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass sich dieser Wert nicht durch AUF1 Überexpression beeinflussen lässt. AUF1 scheint also keinen Einfluss auf die Stabilität der CD83 mRNA auszuüben.

### **6.3 Einfluss von AUF1-spezifischer RNA Interferenz (RNAi) auf die CD83 Expression**

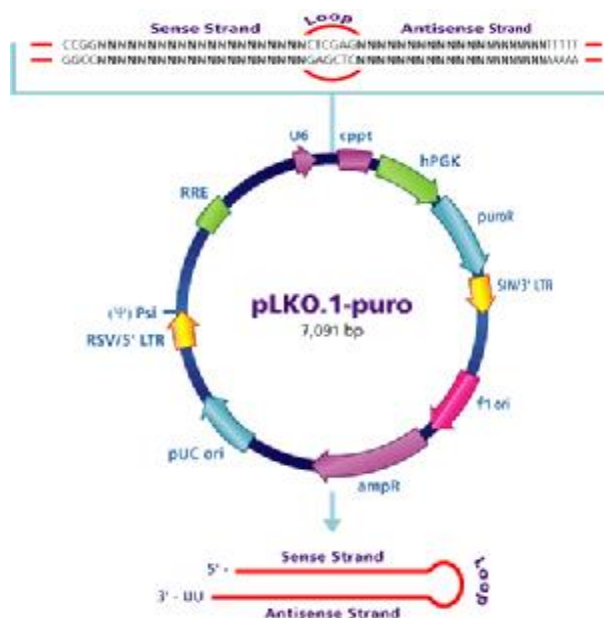
Bisher wurde in dieser Arbeit der Effekt von AUF1 auf die CD83 Expression nur durch Überexpression von AUF1 untersucht. Da AUF1 aber auch endogen in den COS7 Zellen vorhanden ist, konnte noch nicht geklärt werden, ob AUF1 essentiell für den beobachteten CD83-Effekt ist.

Um einen Eindruck zu erhalten, ob die Reduzierung von endogenem AUF1 mit einer Reduzierung der CD83 Expression einhergeht, wurde das Prinzip der *RNA Interferenz* (RNAi) angewendet. Hierbei werden *small interfering RNAs* (siRNAs) eingesetzt. Diese 21-28 Nukleotide langen RNAs verhindern die Expression spezifischer Proteine, indem sie den Abbau der entsprechenden endogenen RNA-Transkripte vermitteln.

#### *6.3.1 Herstellung stabiler Zelllinien mit Hilfe rekombinanter Lentivirus-Vektoren*

Um eine möglichst hohe Effizienz der siRNAs gegen AUF1-spezifische mRNA zu erreichen, sollten die siRNAs mit Hilfe lentiviraler Vektoren zellulär exprimiert werden. Bei diesen Konstrukten handelt es sich um replikationsinkompetente und selbst-inaktivierende Lentiviren. Ein Vorteil dieser Vektoren ist, dass sie stabil ins Wirtszellgenom integrieren und Promotoren-abhängig die eingebrachten Transgene (z.B. siRNA) exprimieren. Ein weiterer Vorteil dieser Vektoren ist ihre hohe Transduktionseffizienz. Nach geeigneter Pseudotypisierung kann nahezu jeder Zelltyp mit hoher Rate infiziert werden.

Für die Konstruktion der lentiviralen Partikel wurden fünf Vektoren pLKO.1-puro von der Firma Sigma (St. Louis, USA) bezogen. Diese enthielten bereits fünf unterschiedliche siRNA-Sequenzen, die spezifisch gegen unterschiedliche Bereiche in der Sequenz von AUF1 gerichtet waren. Der schematische Aufbau dieses Vektors ist in Abbildung 24 dargestellt.



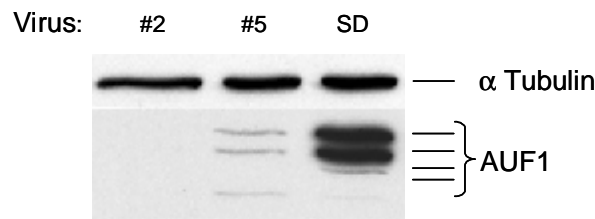
**Abb. 24 Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors pLKO.1-puro (nach Sigma, Saint Louis, USA).**

Über die beiden flankierenden LTRs wird die dazwischenliegende Sequenz ins Wirtszellgenom integriert. Die siRNAs werden durch einen U6-Promotor exprimiert. Der Vektor besitzt eine Puromycin-Resistenz (puroR). Cppt: Central polypurine tract; hPGK: Human phosphoglycerate kinase eukaryotic promotor; 3'SIN/LTR: 3'self inactivating long terminal repeat; f1 ori: f1 origin of replication; 5'LTR: 5'long terminal repeat; Psi: RNA packaging signal; RRE: Rev Response Element.

Zur Austestung der Vektoren auf ihre Fähigkeit, die AUF1 Expression zu reduzieren, wurden aus allen fünf Vektoren mit unterschiedlichen siRNA Sequenzen gegen AUF1 und zusätzlich aus einem Vektor, der unspezifische siRNA exprimiert, pseudotypisierte lentivirale Partikel konstruiert. Mit diesen rekombinanten Viren wurden COS7 Zellen infiziert.

Die Verpackung der Vektoren und die Infektion von Zelllinien wurde bereits im Methodenteil (4.4.1 und 4.4.4) detailliert beschrieben. Die Zellen, die die Sequenz der siRNA stabil in ihr Genom integriert hatten, besaßen auch ein Puromycin-Resistenzgen, welches vom unabhängigen Promotor hPGK exprimiert wurde (siehe Abbildung 24). Dadurch war es möglich, die stabilen Zellen zu selektionieren, indem sie in Kulturmedium gehalten wurden, dem 2 µg/ml Puromycin zugesetzt war. Sechs Tage nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und für die Westernblot Analyse aufgearbeitet.

Zwei der fünf unterschiedlichen siAUF1-Viren waren in der Lage, die AUF1 Expression deutlich zu reduzieren. Die Abbildung 25 zeigt diese Reduktion durch die viralen Vektoren #2 und #5.



**Abb. 25 Inhibition der AUF1 Expression durch RNAi.**

COS7 Zellen wurden mit unterschiedlichen rekombinanten Lentiviren, welche AUF1-spezifische siRNA-Kassetten enthielten (#2 und #5) und einem Virus, das unspezifische siRNA (*scramble duplex*, SD) exprimiert, infiziert. Nach 6 Tagen wurden die Zellysate im Westernblot mit einem spezifischen anti-AUF1 Antikörper, der in der Lage ist, alle vier Isoformen zu erkennen, analysiert. Zur Ladekontrolle wurde  $\alpha$  Tubulin nachgewiesen.

Für weitere Experimente wurde der lentivirale Vektor #2 ausgewählt, da er am effizientesten die AUF1 Expression hemmte.

### 6.3.2 Auswirkung einer reduzierten AUF1 Expression auf die CD83 Expression

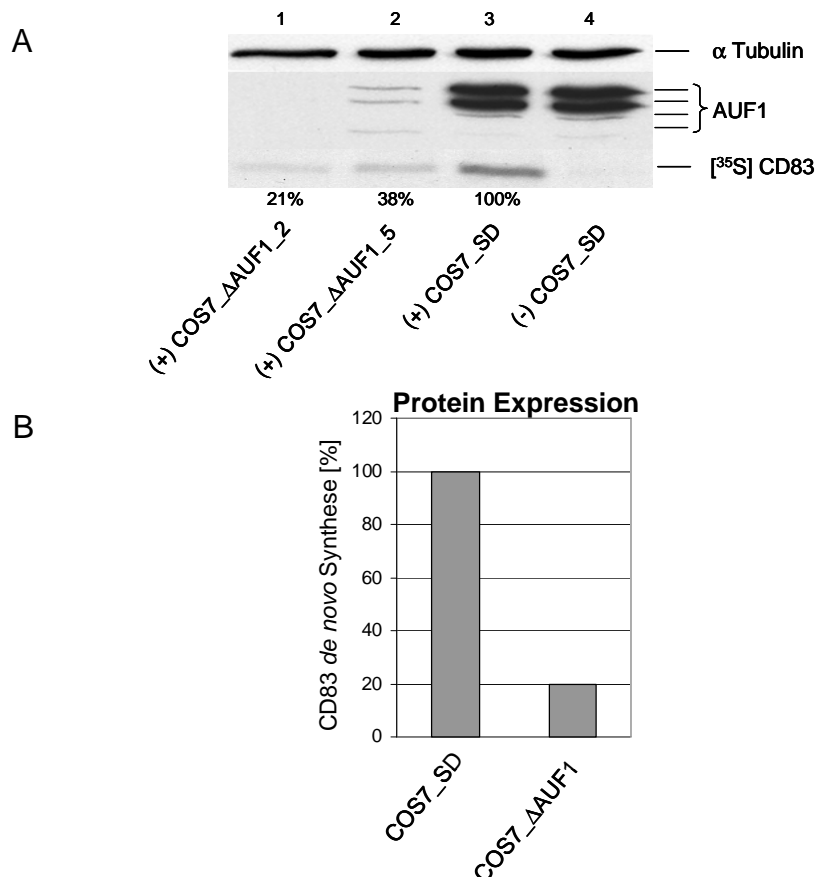
Zur Überprüfung, ob die Reduktion der AUF1 Expression einen Einfluss auf die CD83 Expression hat, wurde die *de novo* Synthese von CD83 untersucht. Hierfür wurden stabile COS7 Zelllinien verwendet, die wie unter 5.3.1 beschrieben, hergestellt wurden. Sie werden im Folgenden mit COS7\_SD (Zelllinie, die konstitutiv eine unspezifische (*scramble duplex*) siRNA exprimiert) und COS7\_ΔAUF1 (Zelllinie, die konstitutiv eine spezifisch gegen AUF1 gerichtete siRNA exprimiert) bezeichnet. Diese Zelllinien wurden mit 4  $\mu$ g/ml des Expressionsvektors transient transfiziert, der die gesamte CD83-Sequenz einschließlich 5' und 3'UTR besitzt (pcDNA3-CD83-wt). Als Kontrolle wurde ein Ansatz von COS7\_SD Zellen mit einem parentalen Vektor transfiziert, der keine CD83-Expressionskassette trug.

Am nächsten Tag wurden die gesamtzellulären Proteine durch Zugabe von [<sup>35</sup>S]-markiertem Methionin und Cystein radioaktiv markiert. Nach 30 Minuten wurde das radioaktive Medium abgenommen, die Zellen geerntet und lysiert. Durch CD83-spezifische Immunpräzipitation wurde CD83 isoliert, durch SDS-Gelelektrophorese

aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung mit Hilfe von Phosphoimaging.

Die Ergebnisse in Abbildung 26 zeigen, dass die Reduzierung von AUF1 einen deutlichen Einfluss auf die CD83 Expression ausübte. Es konnte eine bis zu fünffache Reduktion der CD83 Expression beobachtet werden. Diese Reduktion scheint sich linear mit der Stärke der AUF1-Reduktion zu verhalten (vergleiche Spur 1, 2 und 3 in Abbildung 26A).

Durch die Verwendung von zwei völlig verschiedenen siRNAs, die gegen verschiedene Sequenzen in der AUF1 mRNA gerichtet sind, konnte ausgeschlossen werden, dass die Reduktion der CD83 Expression durch sogenannte „*off target*“-Effekte zustande kommt. Beide siRNAs waren in der Lage, die AUF1 Expression zu reduzieren und dadurch eine Reduktion der CD83 Expression herbeizuführen. Die Abnahme der CD83 Expression korrelierte darüberhinaus mit der unterschiedlich starken Reduktion der AUF1 Expression durch die beiden siRNAs (siehe Abbildung 26A), was ebenfalls gegen einen solchen unerwünschten Nebeneffekt spricht.



**Abb. 26 Einfluss von AUF1-spezifischer siRNA auf die CD83 Expression.**

(A) Die stabilen COS7 Zelllinien COS7\_SD und COS7\_ΔAUF1 wurden mit einem Konstrukt, welches die gesamte CD83 Sequenz enthält, einschließlich 5' und 3'UTR, transfiziert. 24h nach der Transfektion erfolgte für 30 min eine radioaktive Markierung der Proteine mit [<sup>35</sup>S]. CD83 wurde unter Verwendung eines anti-CD83-Antikörpers immunpräzipitiert. Die Proben wurden elektrophoretisch getrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Banden erfolgte mit Hilfe von Phosphoimaging. (B) Graphische Auswertung der Reduzierung der CD83 Expression.

### 6.3.3 Auswirkung einer reduzierten AUF1 Expression auf die intrazelluläre Verteilung der CD83 mRNA

Unter 5.2.4. wurde bereits gezeigt, dass eine Überexpression von AUF1 weder einen Einfluss auf die Gesamtmenge an CD83 mRNA, noch auf deren intrazelluläre Verteilung ausübt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die subzelluläre Verteilung der CD83 mRNA durch die Reduktion von AUF1 beeinflusst wird.

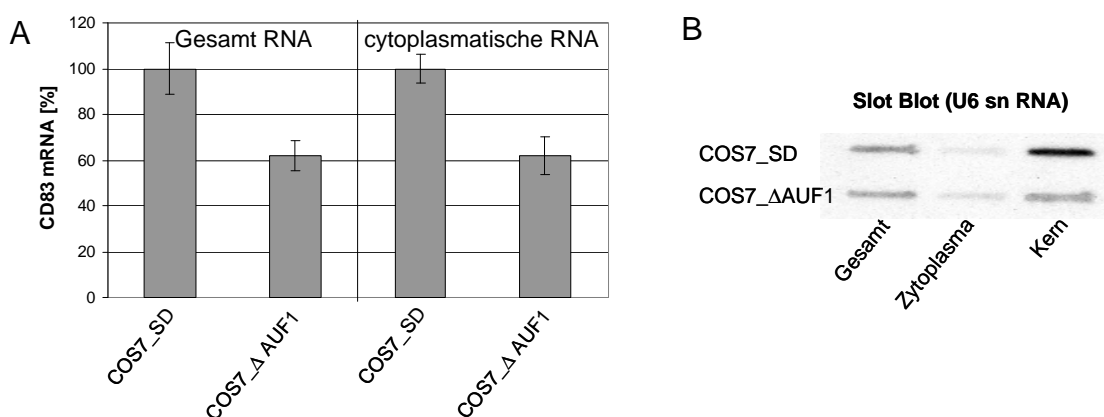
Dafür wurden jeweils  $2 \times 10^6$  COS7\_SD und COS7\_ΔAUF1 Zellen mit 4 μg/ml des CD83-Expressionsvektors transient transfiziert. Am nächsten Tag wurde ein Teil der



Zellen fraktioniert und der zytoplasmatische Teil zur RNA-Isolierung in TRIzol<sup>®</sup> aufgenommen. Aus dem Rest der Zellen sollte die Gesamt-RNA isoliert werden. Diese Zellen wurden direkt in TRIzol<sup>®</sup> aufgenommen. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der *Realtime* PCR analysiert.

Die CD83 mRNA-Mengen in den COS7\_SD Zellen wurden auf 100% festgesetzt und die Mengen an CD83 mRNA aus den COS7\_ΔAUF1 Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. In der Gesamt-RNA und im zytoplasmatischen Anteil der AUF1-defizienten COS7 Zellen war etwa 40% weniger CD83 mRNA vorhanden als in den Vergleichszellen (Abbildung 27A). Diese Abnahme erklärt allerdings nicht die um 80% niedrigere Expression von CD83 (Abbildung 26).

Zur Überprüfung der Zellfraktionierung wurde ein Teil der fraktionierten Proben mit Hilfe einer Slot-Blot Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurde U6 snRNA detektiert, indem die Membran mit einer U6-spezifischen DNA-Sonde inkubiert wurde (Abbildung 27B). U6 snRNA (*small nuclear RNA*) ist Bestandteil der Spliceosomen im Zellkern und ist nur dort vorhanden. Daher wird sie in vielfältigen Studien zum Nachweis einer erfolgreichen Fraktionierung verwendet.



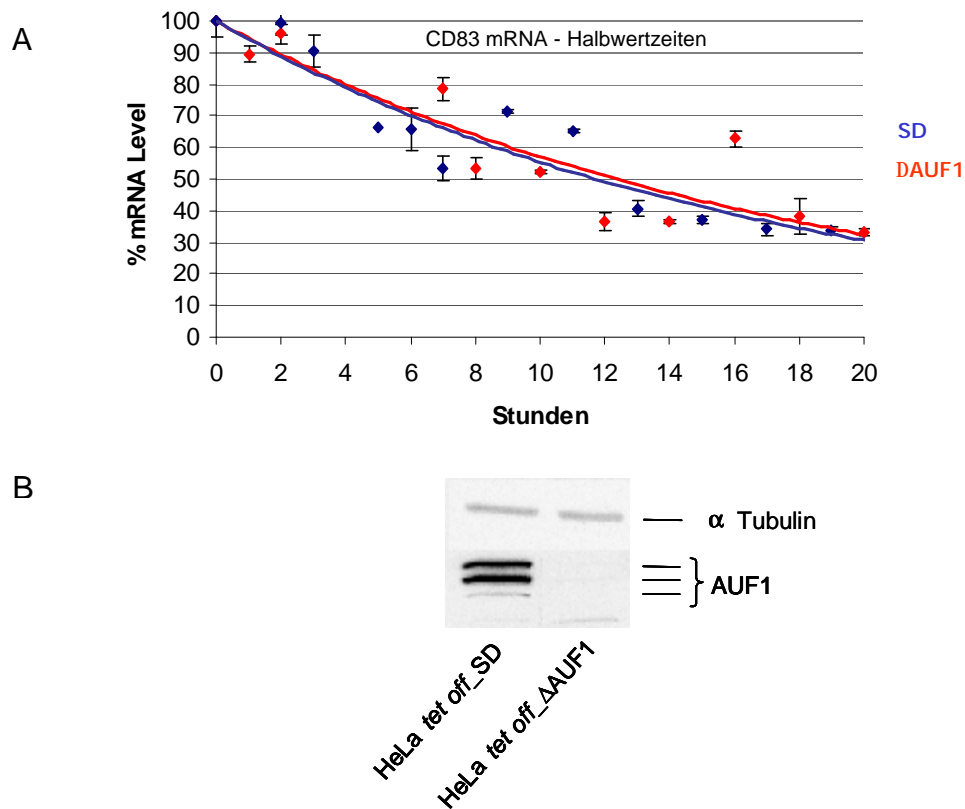
**Abb. 27 Einfluss der AUF1 Reduktion auf die CD83 mRNA-Mengen und ihre intrazelluläre Verteilung.**

COS7\_SD und COS7\_ΔAUF1 Zellen wurden mit dem CD83-Expressionsvektor transfiziert. 24h später wurde ein Teil der Zellen in Kern- und zytoplasmatische Bestandteile aufgeteilt. Es wurde die Gesamt- und zytoplasmatische RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der *real time* PCR quantifiziert. (A) Graphische Auswertung der RNA Mengen. (B) Slot-Blot zur Überprüfung der Zellfraktionierung mit Hilfe einer U6-spezifischen Sonde.

#### 6.3.4 *Auswirkung einer Reduktion der AUF1 Expression auf die Stabilität der CD83 mRNA*

In Kapitel 5.2.5 wurde bereits gezeigt, dass eine Überexpression von AUF1 keinen Einfluss auf die Stabilität der CD83 mRNA hat. In diesem Zusammenhang sollte nun auch die Reduktion der AUF1 Expression untersucht werden.

Der Versuch wurde wie unter 5.2.5 beschrieben wiederholt, diesmal wurden allerdings stabile HeLa *Tet off\_SD* und HeLa *Tet off\_ΔAUF1* Zelllinien verwendet, die ebenfalls durch Infektion mit rekombinanten Lentiviren hergestellt wurden (siehe 6.3.1). Diese Zellen wurden mittels PEI-Transfektion mit jeweils 7 µg pUHC-CD83 Vektor transfiziert. Am folgenden Tag wurde das *Transcriptional Pulse* Experiment initiiert. Es wurden über 24 Stunden Proben genommen, aus denen die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben wurde und dann mit Hilfe der *real time* PCR quantitativ ausgewertet wurde.



**Abb. 28 Einfluss der AUF1 Reduktion auf die Stabilität von CD83 mRNA.**

(A) Zur Bestimmung der Stabilität der CD83 mRNA wurde ein *Transcriptional Pulse* Experiment mit Hilfe des Tetracyclin-regulierten *Tet off*-Promotorsystems durchgeführt. Dazu wurden HeLa *Tet off\_SD* und HeLa *Tet off\_ΔAUF1* Zellen mit dem entsprechenden Tet-abhängigen CD83 Konstrukt transfiziert.

48h Stunden später wurde die Transkription durch Zugabe von Doxycyclin gestoppt. Ab diesem Zeitpunkt wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden Proben genommen, die RNA isoliert und für die *real time* PCR präpariert. (B) Westernblot zur Überprüfung der Reduktion an AUF1 Protein.

Die Reduktion scheint genau wie die Überexpression von AUF1 keinen Einfluss auf die Stabilität von CD83 mRNA auszuüben. Auch hier zeigte sich wie in Kapitel 5.2.5 eine Halbwertszeit von ca. 12 Stunden, die unabhängig von der AUF1 Menge ist (Abbildung 28A).

## **6.4 Untersuchungen in autologen Zellsystemen**

In dieser Arbeit wurde bisher das Zusammenspiel von AUF1 und CD83 in Modellsystemen untersucht, die kein endogenes CD83 exprimieren. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich der bisher beobachtete Effekt auch in autologen Zellsystemen widerspiegelt, welche endogenes CD83 und AUF1 exprimieren.

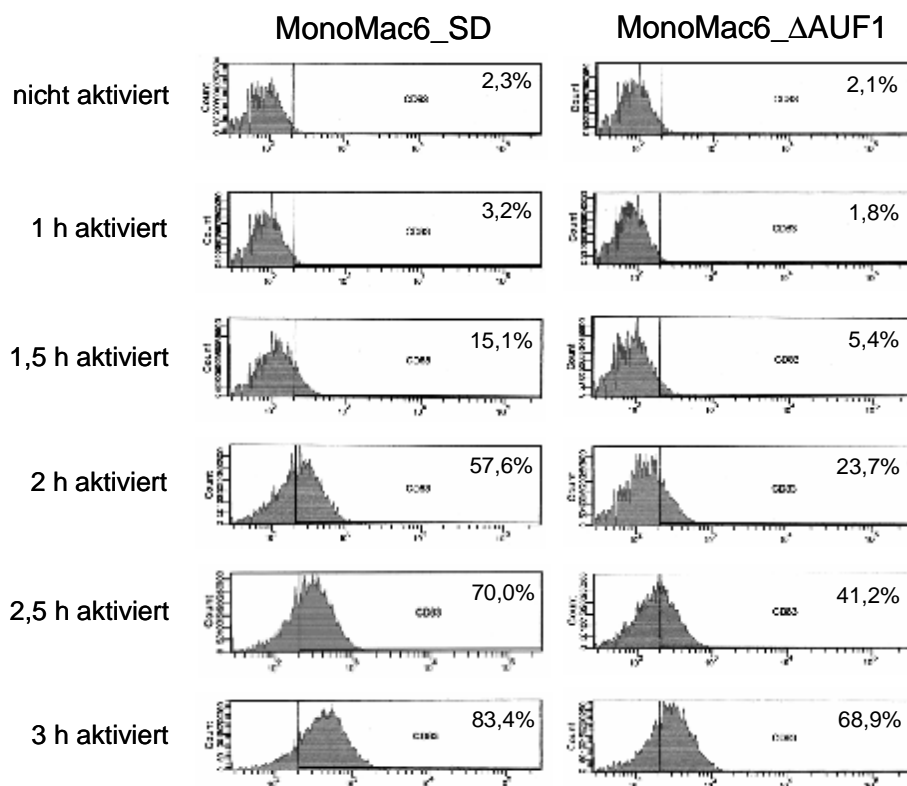
### *6.4.1 CD83 Expression während der Aktivierung von MonoMac6 Zellen*

Bei MonoMac6 Zellen handelt es sich um eine monozytäre Zelllinie, die nach Aktivierung durch PMA (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) und LPS (Lipopolysaccharid) (siehe 5.4.6) messbare Mengen an CD83 exprimiert (Ziegler-Heitbrock et al., 1988).

Mit Hilfe der *RNA Interference* sollte wieder die Expression von AUF1 reduziert werden. Dazu wurden durch Infektion mit rekombinanten Lentiviren die AUF1-reduzierte Zelllinie MonoMac6\_ΔAUF1 und MonoMac6\_SD als Vergleichszelllinie generiert (siehe 5.4.4).

Zur Untersuchung der CD83 Proteinmengen in Abhängigkeit von AUF1 wurden beide Zelllinien aktiviert. Während der Aktivierung wurden über 3 Stunden hinweg Proben genommen. Eine weitere Probe wurde bereits vor dem Start der Aktivierung genommen. Diese Proben wurden für die FACS-Analyse (*Fluorescence activated cell sorting*) vorbereitet, indem sie mit einem fluoreszenzmarkierten CD83-spezifischen Antikörper inkubiert und anschließend fixiert wurden (siehe 5.4.8).

Mit Hilfe der FACS-Analyse wurden die CD83-positiven Zellen in der Gesamtmenge der Zellen bestimmt. In der Auswertung ist sowohl die Menge an positiven Zellen, als auch die Stärke ihrer Fluoreszenz, was der Menge an CD83 auf der Oberfläche einer einzelnen Zelle entspricht, dargestellt. Abbildung 29 zeigt die Zusammenstellung der FACS-Auswertungen der einzelnen Zeitwerte während der Aktivierung von MonoMac6\_SD und MonoMac6\_ΔAUF1 Zellen.



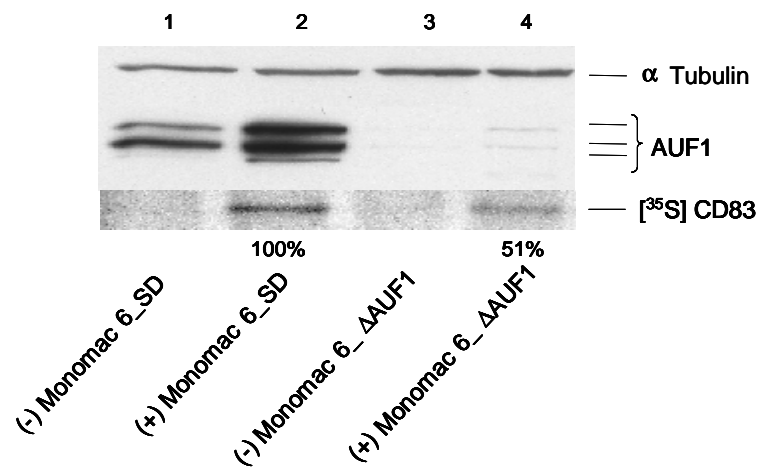
**Abb. 29 FACS Analyse zur Untersuchung der CD83 Oberflächenexpression in Abhängigkeit von AUF1 in MonoMac6 Zellen.**

MonoMac6\_SD und MonoMac6\_ΔAUF1 Zellen wurden mit Hilfe von PMA und LPS aktiviert. Vor und während der Aktivierung wurden Proben genommen. Die Zellen wurden mit einem fluoreszenzmarkierten, CD83-spezifischen Antikörper gekoppelt und im FACS analysiert. Die Verschiebung der Zellpopulation nach rechts zeigt eine verstärkte CD83 Expression an. Der prozentuale Anteil an CD83 positiven Zellen ist jeweils angegeben.

Durch Vergleich der Aktivierungsverläufe der beiden Zelllinien ist eine Verzögerung der CD83 Expression bei den MonoMac6\_ΔAUF1 Zellen zu erkennen. Dieses Phänomen ist nach 1,5 bis 2 Stunden am Stärksten ausgeprägt. In diesem Zeitraum wird in der Vergleichszelllinie MonoMac6\_SD nahezu die dreifache Menge an CD83 auf der Oberfläche der Zellen exprimiert. Später, 3 Stunden nach dem Start der Aktivierung, gleichen sich die Expressionshöhen wieder mehr an, die AUF1-defiziente Zelllinie exprimiert aber weiterhin weniger CD83.

Zusätzlich wurde dieses Ergebnis überprüft, indem MonoMac6\_ΔAUF1 und MonoMac6\_SD Zellen wieder, wie oben beschrieben, aktiviert wurden, diesmal aber

im Zeitraum von 1,5 bis 2,5 Stunden nach dem Beginn der Aktivierung durch Zugabe von 400  $\mu\text{Ci}$  [ $^{35}\text{S}$ ]-markiertem Methionin und Cystein radioaktiv markiert wurden. Dann wurden die Zellen geerntet und lysiert. Durch CD83-spezifische Immunpräzipitation wurde CD83 isoliert, durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung mit Hilfe von Phosphoimaging.



**Abb. 30** [ $^{35}\text{S}$ ]-Markierung zur Untersuchung der CD83 Expression in Abhängigkeit von AUF1 in MonoMac6 Zellen.

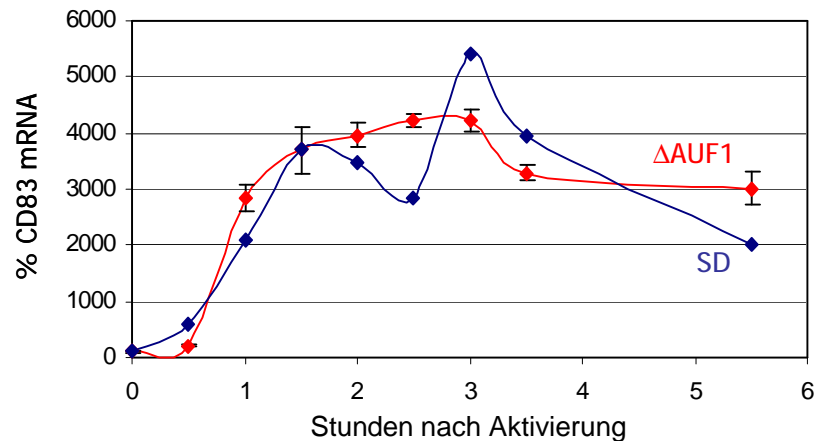
MonoMac6\_SD und MonoMac6\_ΔAUF1 Zellen wurden mit Hilfe von PMA und LPS aktiviert. Die Zellen wurden 1,5 Stunden nach Start der Aktivierung für eine Stunde durch Zugabe von [ $^{35}\text{S}$ ]-markiertem Methionin und Cystein radioaktiv markiert. Als Kontrolle wurde gleichzeitig eine Markierung nicht aktivierter Zellen durchgeführt. PMA/LPS-Aktivierung (+), ohne Aktivierung (-).

Auch in diesem Experiment ist durch die Reduktion von AUF1 eine deutliche Abnahme der neu synthetisierten CD83 Menge zu erkennen. Die quantitative Auswertung ergab eine Verringerung der CD83 Expression um ca. 50% (vergl. Spur 2 und 4 in Abbildung 30).

#### 6.4.2 CD83 mRNA Level während der Aktivierung von MonoMac6 Zellen

Die Überprüfung, ob auch im autologen System die CD83 mRNA Mengen durch die Reduzierung von AUF1 unangetastet blieben, wurde eine *real time* PCR Analyse durchgeführt. MonoMac6\_SD und MonoMac6\_ΔAUF1 Zellen wurden mit PMA und LPS aktiviert. Während der Aktivierung wurden Proben genommen, die in TRIzol<sup>®</sup>

aufgenommen wurden. Daraus wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit der *real time* PCR quantitativ analysiert. Die CD83 mRNA-Mengen im Verlauf der Aktivierung der MonoMac6 Zellen sind in Abbildung 31 graphisch dargestellt. Obwohl leichte Schwankungen in den mRNA-Mengen zu verzeichnen sind, sind über den gesamten zeitlichen Verlauf keine signifikanten Unterschiede feststellbar, die den Effekt erklären (vgl. Abbildung 30).



**Abb. 31 Analyse der CD83 mRNA-Mengen während der Aktivierung von MonoMac6\_SD und MonoMac6\_ΔAUF1 Zellen.**

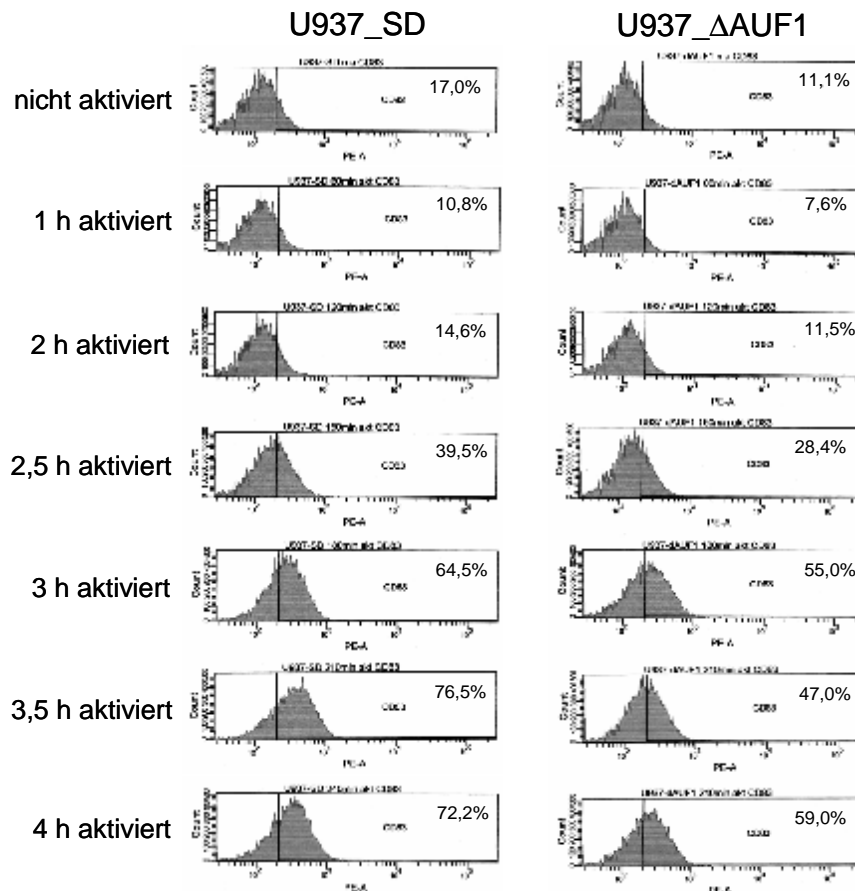
MonoMac6\_SD und MonoMac6\_ΔAUF1 Zellen wurden mit Hilfe von PMA und LPS aktiviert. Während der Aktivierung wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen, aus denen die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der *real time* PCR analysiert wurde.

#### 6.4.3 CD83 Expression während der Aktivierung von U937 Zellen und Jurkat Zellen

Die Untersuchung der Oberflächenexpression von CD83 während der Aktivierung (siehe 6.4.1) wurde zusätzlich auch noch in weiteren Zelllinien untersucht.

Bei U937 Zellen handelt es sich ebenfalls, wie bei MonoMac6, um eine monozytäre Zelllinie. Sie ist ebenfalls in der Lage durch Aktivierung CD83 zu exprimieren.

Es wurden wieder stabile Zellen hergestellt, indem mit den bereits beschriebenen Lentiviren infiziert wurde. Die Oberflächenexpression von CD83 in U937\_SD und U937\_ΔAUF1 während der Aktivierung ist mittels FACS-Analyse bestimmt worden und in Abbildung 32 dargestellt.



**Abb. 32 FACS Analyse zur Untersuchung der CD83 Oberflächenexpression in Abhängigkeit von AUF1 in U937 Zellen.**

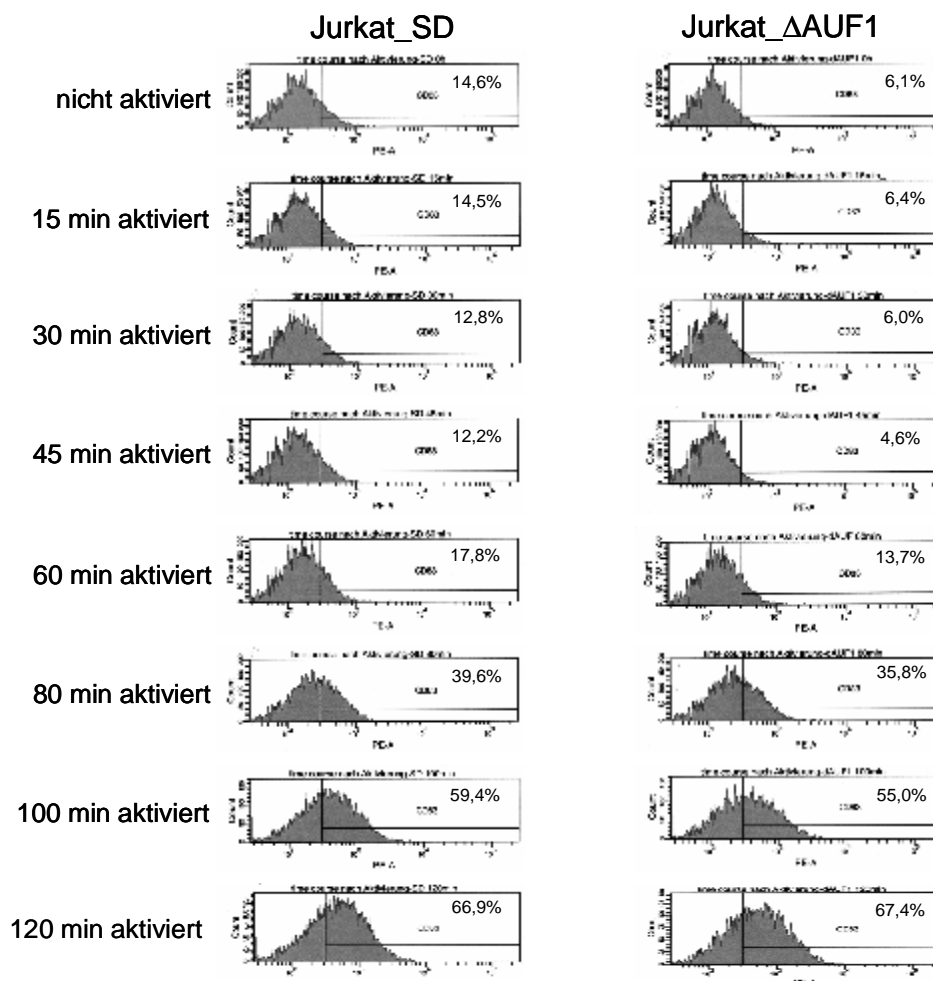
U937\_SD und U937\_ΔAUF1 Zellen wurden mit Hilfe von PMA und LPS aktiviert. Vor und während der Aktivierung wurden Proben genommen. Die Zellen wurden mit einem fluoreszenzmarkierten, CD83-spezifischen Antikörper gekoppelt und im FACS analysiert. Die Verschiebung der Zellpopulation nach rechts zeigt eine verstärkte CD83 Expression an. Der prozentuale Anteil an CD83 positiven Zellen ist jeweils angegeben.

Die U937 Zellen zeigen im Prinzip das gleiche Ergebnis wie die MonoMac6 Zellen, nur dass in diesem Fall die verzögerte CD83 Expression in den U937\_ΔAUF1 weniger stark ausgeprägt ist (vergl. Abbildung 29 und 32). Im Durchschnitt ist auf der Oberfläche der Vergleichszelllinie U937\_SD 1,5-fach mehr CD83 vorhanden als bei der AUF1-reduzierten Zelllinie.

Als weitere Zelllinie wurden Jurkat Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine humane T-Lymphozytenzelllinie. Auch bei diesen Zellen kommt es durch Aktivierung zu einer Expression von CD83 auf der Oberfläche (Wolenski et al., 2003). Jurkat Zellen wurden mit Hilfe von PMA und Ionomycin aktiviert. Die während der



Aktivierung genommenen Proben wurden für die FACS-Analyse vorbereitet und gemessen. In diesem Fall wurden in kürzeren Zeitabständen Proben genommen, da sich in Jurkat Zellen die Oberflächenexpression von CD83 durch die Aktivierung in einem kürzeren Zeitraum vollzieht.



**Abb. 33 FACS Analyse zur Untersuchung der CD83 Oberflächenexpression in Abhängigkeit von AUF1 in Jurkat Zellen.**

Jurkat\_SD und Jurkat\_ΔAUF1 Zellen wurden mit Hilfe von PMA und Ionomycin aktiviert. Vor und während der Aktivierung wurden Proben genommen. Die Zellen wurden mit einem fluoreszenzmarkierten, CD83-spezifischen Antikörper gekoppelt und im FACS analysiert. Die Verschiebung der Zellpopulation nach rechts zeigt eine verstärkte CD83 Expression an. Der prozentuale Anteil an CD83 positiven Zellen ist jeweils angegeben.

Auch bei den Jurkat Zellen ist die verzögerte Expression von CD83 zu beobachten, wenn AUF1 in den Zellen reduziert ist (siehe Abbildung 33). Nach 45 min ist der größte Unterschied zu erkennen, wenn die Jurkat\_SD Zellen 2,6 x mehr CD83 auf

ihrer Oberfläche exprimiert haben als die Jurkat\_ΔAUF1 Zellen. Nach 120 min gleichen sich die exprimierten Mengen an CD83 auf der Oberfläche wieder an, sodass die AUF1-reduzierte Zelllinie wieder vergleichbare Mengen wie Jurkat\_SD exprimiert.

#### 6.4.4 CD83 Expression in dendritischen Zellen

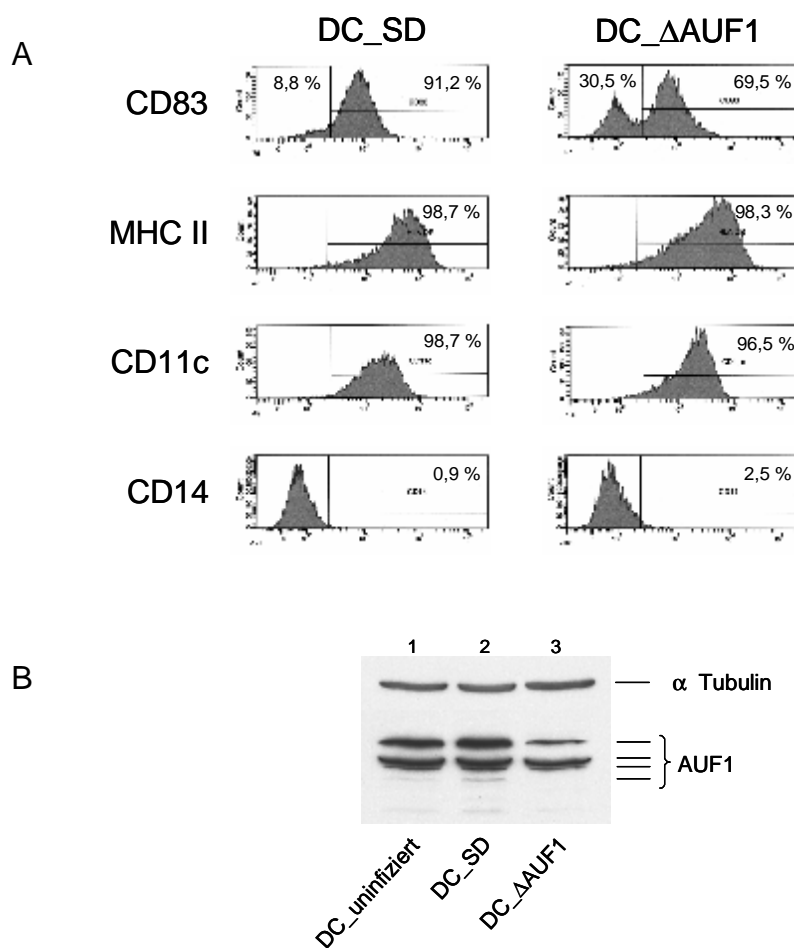
Das adäquateste autologe System zur Untersuchung der bisher gewonnenen Erkenntnisse über die Regulation der CD83 Expression durch AUF1 sind dendritische Zellen. CD83 ist ein wichtiger Oberflächenmarker dieser am Wirksamsten antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems. Ferner existieren eindeutige unabhängige Hinweise, dass reife DC zur effizienten T-Zell Aktivierung das CD83 Oberflächenmolekül benötigen. (Banchereau and Steinman, R. M., 1998, Banchereau et al., 2000, Kruse et al., 2000a, Lechmann et al., 2001).

Um den Einfluss von AUF1 auf Dendritische Zellen untersuchen zu können, wurden CD14 monozytäre Vorläuferzellen aus menschlichem Blut isoliert und mit rekombinanten Lentiviren infiziert, um eine Reduktion der AUF1 Expression zu erreichen. Gleichzeitig wurde ein Aliquot dieser Zellen mit dem Kontrollvirus (SD) infiziert. Anschließend wurden die infizierten Monozyten über einen Zeitraum von 6 Tagen mit unterschiedlichen Cytokin-Cocktails inkubiert, um die Reifung zu dendritischen Zellen zu erreichen (siehe 5.4.7). Die reifen dendritischen Zellen wurden mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt (siehe 5.4.8) und mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht.

Neben CD83 wurden noch andere Oberflächenmarker untersucht. Bei CD14 handelt es sich um ein Oberflächenprotein der Monozyten. Reife DC exprimieren dieses Protein nicht mehr auf ihrer Oberfläche (Cao et al., 2005). CD11c und MHC II sind, neben CD83, Oberflächenmarker reifer dendritischer Zellen (Lechmann et al., 2001, Lechmann et al., 2002b).

Anhand der FACS Analyse ist zu erkennen, dass es sich bei den vorliegenden Zellen tatsächlich um reife dendritische Zellen handelt, da nahezu die gesamte Zellpopulation (> 90%) sowohl CD83 als auch CD11c und MHC II auf ihrer Oberfläche trägt. Vergleicht man jedoch die Anzahl CD83-positiver Zellen der AUF1-

defizienten DC mit denen der Kontroll-DC, so ist ein deutlicher Rückgang zu verzeichnen. Während die mit dem SD-Virus behandelten Zellen zu über 90% CD83-positiv sind, besitzen nur noch knapp 70% der AUF1-reduzierten Zellen diesen Oberflächenmarker (siehe Abbildung 34A). Da sich die Zellpopulationen der anderen Oberflächenmarker durch die Reduktion der AUF1 Expression nicht ändert, scheint dieser Effekt spezifisch für CD83 zu sein. Wenn man berücksichtigt, dass es sich nur um eine moderate Inhibition der AUF1 Expression handelt, erscheint dieses Ergebnis noch effizienter (siehe Abbildung 34B). Eine stärkere Reduktion an AUF1 Protein konnte nicht erreicht werden, da sich diese primären Zellen nur schwer mit Lentiviren infizieren ließen. Das Ergebnis dieses recht aufwändigen Experiments war reproduzierbar, wie weitere entsprechende Experimente zeigten (nicht gezeigt).



**Abb. 34 Einfluss der AUF1 Reduktion in Dendritischen Zellen auf die Expression von CD83.**

Monozyten wurden aus humanem Blut isoliert und mit Lentiviren zur Reduktion der AUF1 Expression (DC\_ΔAUF1), bzw. zur Generierung von Kontroll-DC (DC\_SD) infiziert. Anschließend wurden diese infizierten Monozyten über einen Zeitraum von 6 Tagen mit unterschiedlichen Cytokin-Cocktails inkubiert, um eine Reifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu erreichen. Die DC wurden geerntet, mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt und in der FACS untersucht. **(A)** FACS Analyse der unterschiedlichen Oberflächenmarker der dendritischen Zellen. Die Anzahl positiver Zellen der angegebenen Oberflächenmarker ist prozentual aufgeführt. **(B)** Westernblotanalyse zur Untersuchung der Reduktion der AUF1 Expression an Tag 6 nach der Infektion.

## 7 Diskussion

Bei der zellulären Genexpression handelt es sich um einen kontinuierlichen und zusammenhängenden Prozess, der mit der Transkription der Gene beginnt und über die Prozessierung der nativen Transkripte zum Transport der reifen mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma führt. Dort kommt es zur Translation und schließlich zum Abbau der mRNAs. Bei diesem Vorgang spielen eine Vielzahl von Regulationsmechanismen eine wichtige Rolle. Um eine exakte und effiziente Genexpression zu garantieren, ist die Zelle in der Lage, auf praktisch jeder Ebene regulatorisch einzugreifen. Die Regulationsmöglichkeiten beinhalten zum Einen den Einfluss auf die Effektivität der Transkription, wobei auch epigenetische Mechanismen eine Rolle spielen können. So kann beispielsweise die Transkription eines Gens durch Transkriptionsfaktoren, DNA-Methylierung und Histonmodifikationen beeinflusst werden. Aber auch die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression und letztendlich die Steuerung auf der Ebene der Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Genexpression.

Während die Möglichkeiten der Genregulation auf der Ebene der Transkription und Translation sehr gut untersucht und verstanden sind, gelingt es bisher nur teilweise, die sehr komplexen Mechanismen im Bereich des mRNA Stoffwechsels zu entschlüsseln und aufzuklären. Daher ist die Untersuchung dieser Regulationsmechanismen in den letzten Jahren zunehmend in den Forschungsmittelpunkt gerückt. Es wird immer deutlicher, dass es sich bei der Regulation auf der Ebene der mRNAs um einen wichtigen Mechanismus handelt, der es der Zelle erlaubt, sehr schnell auf Umweltreize oder andere externe Signale zu reagieren (Guhaniyogi and Brewer, G., 2001, Parker and Song, H., 2004, Wilusz and Wilusz, J., 2004). Hierbei wird das Schicksal der Transkripte durch die dynamische Rekrutierung unterschiedlicher RNA-bindender Proteine an die jeweilige mRNA bestimmt. Diese Proteine regulieren unter anderem das Spleissen, den Kernexport, die mRNA-Stabilität und die Translation (Dreyfuss et al., 2002, Hieronymus and Silver, P. A., 2004, Maniatis and Reed, R., 2002). In den meisten Fällen binden sie bereits im Zellkern an ihre Ziel-mRNA und werden mit dieser aus dem Zellkern transportiert (Cullen, 2003b, Hieronymus and Silver, P. A., 2004, Keene, 2007, Kuersten and Goodwin, E. B., 2005, Moore, 2005).

Im Allgemeinen werden die meisten zellulären mRNAs durch den TAP/NXF1-Exportweg vom Zellkern in das Zytoplasma der Zelle transportiert (Moore, 2005). Eine kürzlich durchgeführte Studie ergab jedoch, dass eine kleine Gruppe von mRNAs existiert, die mit Hilfe des Exportfaktors CRM1 durch die Kernporen transportiert wird (Schutz et al., 2006). Der CRM1-Kernexportweg wird normalerweise von U snRNAs, ribosomalen RNAs und diversen Proteinen genutzt (Fried and Kutay, U., 2003) und war bisher nicht als zellulärer Exportweg für mRNAs beschrieben worden. Zusätzlich vermittelt CRM1 aber auch den Export von unvollständig gespleisster retroviraler mRNA, wie beispielsweise die Transkripte von HIV-1, die für die viralen Strukturproteine und Enzyme Gag, Pol und Env kodieren (Cullen, 2003a).

Interessanterweise handelt es sich bei den mRNAs, die über diesen aussergewöhnlichen Weg in das Zytoplasma transportiert werden, in den meisten Fällen um Transkripte, die die sogenannten *Early Response Genes* (ERG), wie beispielsweise Zytokine, kodieren (Wilusz et al., 2001). Außerdem ist es wichtig zu erwähnen, dass in ungestressten menschlichen HeLa Zellen kein CRM1-abhängiger Export von mRNAs aus dem Zellkern nachgewiesen werden konnte (Schutz et al., 2006). Darum kann man davon ausgehen, dass nur induzierbare mRNAs über diesen besonderen Weg transportiert werden.

Neben verschiedenen mRNAs, die für verschiedene Zytokine kodieren, wurde auch die mRNA von CD83 als ein Transkript identifiziert, das über den besonderen CRM1-Weg exportiert wird (Schutz et al., 2006). Das Glykoprotein CD83 wird auf der Oberfläche von reifen dendritischen Zellen exprimiert und wird in der effizienten DC-vermittelten Aktivierung von T-Zellen benötigt (Fujimoto and Tedder, T. F., 2006). Demzufolge spielt es eine wichtige funktionelle Rolle in der DC-vermittelten Immunantwort (Lechmann et al., 2001, Scholler et al., 2002). Wie bei den ERG mRNAs handelt es sich bei der CD83 mRNA daher um ein wichtiges Transkript, das während einer Immunantwort sehr effizient prozessiert werden muss.

Im Gegensatz zu den ERG mRNAs enthält die CD83 mRNA keine ARE Sequenz in ihren untranslatierten Bereichen. AREs (*AU-rich elements*) sind bekannte *cis*-aktive Instabilitätselemente, die häufig im 3'UTR von ERG mRNAs vorkommen. Sie dienen der schnellen und effektiven Regulation der Genexpression, indem sie als Bindestellen für RNA-bindende, regulatorische Proteine fungieren (Bakheet et al.,

2001, Bakheet et al., 2003, Barreau et al., 2005, Chen and Shyu, A. B., 1995, Lechmann et al., 2001). Stattdessen wurde kürzlich ein neues Sequenzelement innerhalb der kodierenden Region der CD83 mRNA entdeckt, welches als *Posttranscriptional Regulatory Element* (PRE) bezeichnet wurde (Prechtel et al., 2006). Diese Sequenz bildet ein strukturiertes RNA-Element, an das spezifisch HuR bindet.

Bisher ist HuR hauptsächlich als nukleozytoplasmatisches *Shuttle*-Protein beschrieben worden, welches in der Lage ist, ERG mRNAs zu stabilisieren, indem es direkt an deren ARE-Sequenzen bindet. Im Zusammenhang mit der CD83 mRNA hat HuR dagegen keinen Einfluss auf die mRNA Stabilität, sondern unterstützt die nukleozytoplasmatische Translokation des Transkripts unter Benutzung des CRM1-Transportweges (Prechtel et al., 2006).

Man kann vermuten, dass der Kernexport von Transkripten funktionell bedeutsamer Proteine über diesen Exportweg in Hinblick auf eine effiziente Proteinsynthese signifikante Vorteile bringt. Entkoppelt von einem Großteil der zellulären Mechanismen, könnte dieser spezifische Weg effizienter funktionieren und bessere bzw. kinetisch vorteilhaftere Regulationsmöglichkeiten bieten.

Ein weiteres ARE-bindendes Protein ist AUF1 (Brewer, 1991, Wilson and Brewer, G., 1999). Bei den ERG mRNAs führt AUF1 im Gegensatz zu HuR in den meisten Fällen zu einer Destabilisierung der entsprechenden ARE-enthaltenden mRNAs und wird deswegen oft als Gegenspieler von HuR bezeichnet. Da bereits bekannt ist, dass HuR und AUF1 nahezu dieselbe Gewebeverteilung besitzen, beide Proteine im Fließgleichgewicht (*steady-state*) hauptsächlich im Zellkern lokalisiert sind und beide die Expression vieler wichtiger Ziel-mRNAs beeinflussen, wurde schon früh vermutet, dass zwischen diesen beiden Proteinen funktionelle Zusammenhänge bestehen (Bhattacharya et al., 1999, Chen et al., 2002). Aus diesen Gründen sollte in dieser Arbeit ein potentieller Einfluss von AUF1 auf die posttranskriptionelle Regulation der CD83 Expression untersucht werden.

Mit Hilfe von umfangreichen Bindungsstudien wurde zuerst untersucht, ob AUF1, genau wie HuR, in der Lage ist, mit CD83 mRNA zu interagieren. Dabei ergaben *RNA-Mobility-Shift*-Experimente, dass alle vier AUF1-Isoformen in der Lage sind,

spezifisch an das PRE-Element von CD83 mRNA zu binden. Die in diesem Fall am stärksten bindenden Isoformen p37 und p40 zeigten dabei Andeutungen von doppelten Signalen, was ein Hinweis auf eine Multimerisierung der Proteine sein könnte (Abbildung 10; Spur 3, 4, 7, 8). Interessanterweise gibt es bereits Untersuchungen, die unterstreichen, dass eine Multimerisierung von AUF1-Isoformen die Bindungseigenschaften an ARE-Sequenzen positiv unterstützt (Wilson and Brewer, G., 1999). Demnach besteht die Möglichkeit, dass ein multimerer Komplex aus unterschiedlichen AUF1-Isoformen an die CD83 mRNA bindet. Weitere Untersuchungen sollten in der Zukunft diesen Aspekt näher betrachten.

Dass AUF1 auch an andere Sequenzen außer AREs binden kann, konnte bereits in anderen Fällen gezeigt werden. So konnte ein Sequenzelement beschrieben werden, welches sich in der kodierenden Region der *c-fos* mRNA befindet. Das entsprechende RNA-Element wird als *major protein-coding-region determinant* (mCRD) bezeichnet (Veyrone et al., 1995). Diese *cis*-aktive Sequenz ist in der Lage, mit verschiedenen Proteinen, unter anderem mit AUF1 und PolyA-bindenden Proteinen (PABP), zu interagieren (Grosset et al., 2000). Die Überexpression der im mCRD-Protein-Komplex vorhandenen Proteine führte zu einer Stabilisierung der mCRD-enthaltenden mRNAs, wobei die Funktion des mCRDs abhängig vom Abstand zum PolyA-Ende der *c-fos* mRNA war. Es wird vermutet, dass eine Komplexierung PolyA-bindender Proteine und mCRD-bindender Proteine zu einer Zirkularisierung der *c-fos* mRNA führt, wodurch der Abbau der mRNA verhindert wird. Darüberhinaus ist AUF1 in der Lage an polyA-Sequenzen zu binden und anscheinend mit PABP um die Bindung an polyA zu konkurrieren (Sagliocco et al., 2006). Vermutlich kommen auf diese Weise die destabilisierenden Eigenschaften von AUF1 im Zusammenhang mit ARE-enthaltenden mRNAs zustande. Schließlich konnte eine Interaktion von AUF1 mit AT-reichen Regionen von doppelsträngigen DNA-Sequenzen im Gen des Neurotransmitters Enkephalin nachgewiesen werden, wodurch die Interaktion zwischen dieser AT-reichen Region und der TATA-Region unterstützt wird (Dobi et al., 2006). AUF1 wird deshalb eine Rolle in der Kontrolle der Genexpression von Enkephalin zugeschrieben, indem es regulierend auf die Transkription des Gens einwirkt.



In dem Versuch, den Bindungsbereich des CD83 PRE-Elements weiter einzuschränken, zeigte sich, dass für die Bindung an AUF1 die gesamte PRE-Struktur essentiell ist. Die Deletion jedes einzelnen „Subloops“ der Struktur führte zum Verlust der Bindung (Abbildung 14). Dieses Ergebnis unterscheidet sich von denen, die im Zusammenhang mit HuR erzielt wurden. Die Bindung von HuR an die PRE RNA-Struktur kommt auch dann noch zustande, wenn zwei der drei „Subloops“ („Subloop 2 + 3“) deletiert wurden. Nur der „Subloop 1“ scheint für die Bindung von HuR essentiell zu sein (Chemnitz et al., Manuskript in Vorbereitung). Das deutet darauf hin, dass HuR und AUF1 zwar an dieselbe RNA-Struktur binden, dies allerdings in unterschiedlicher Art und Weise geschieht. Es scheint, dass dieser Unterschied darin besteht, dass die Bindung von HuR an die CD83 mRNA sequenzspezifisch ist, während für die Bindung von AUF1 die korrekte Faltung des gesamten PRE-Strukturelements gegeben sein muss.

Ähnliche Untersuchungen gab es in Hinblick auf die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von HuR und AUF1 an ARE-Sequenzmotive (Blaxall et al., 2002). Auch hier deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die Faktoren, die die Bindungseigenschaften von AUF1 an AU-reiche Sequenzen bestimmen, komplexer sind verglichen mit der Bindung von HuR. Mit Hilfe von *Mobility-Shift*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine hochaffine Interaktion zwischen AUF1 und verschiedenen ARE-Bindungsmotiven nur dann zustande kam, wenn sich diese Bindungssequenzen in einem größeren, bisher nicht definierbaren RNA-Kontext befanden. HuR hingegen war in der Lage, stabile Bindungen mit minimalen ARE-Bindungsmotiven einzugehen. Diese Interaktionen konnten auch im Gesamtkontext der mRNA nicht weiter verstärkt werden. Vermutlich benötigt AUF1 auch hierfür eine effiziente Bindung nicht nur die entsprechende primäre Sequenz der mRNA, sondern flankierende Bereiche und / oder Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen.

Diese Vermutungen konnten durch neuere Studien bestätigt werden, die ein Strukturelement innerhalb der ARE-Sequenz der TNF $\alpha$  mRNA beschrieben haben (Fialcowitz et al., 2005). In diesem Fall führte eine Stabilisierung dieses Strukturelements dazu, dass die Bindung von AUF1 an TNF $\alpha$  ARE mRNA unterbunden wurde. Die Interaktion von HuR war unbeeinflusst davon, ob das Strukturelement stabilisiert war oder nicht. Diese Ergebnisse ließen ebenfalls vermuten, dass die Bindungsaktivität von AUF1 davon abhängig ist, ob die ARE-Sequenzen die Fähigkeit besitzen, Sekundärstrukturen auszubilden. Auch die

Beobachtung, dass AUF1 relativ lange (mehr als 20 Nukleotide) AU-reiche Sequenzen für eine hochaffine Bindung benötigt, unterstreicht die Theorie, dass AUF1 im Gegensatz zu HuR strukturspezifisch an seine Ziel-mRNA bindet (DeMaria and Brewer, G., 1996).

Im Zusammenhang mit ARE-Elementen ist bereits bekannt, dass HuR mit AUF1 um die Bindung derselben Ziel-mRNA kompetitieren kann (Cok et al., 2004). Nähere Untersuchungen hierzu wurden von Lal und Mitarbeitern durchgeführt (Lal et al., 2004), die mit ihren Bindungsstudien von HuR und AUF1 an p21 und cyclin D1 mRNA zeigen konnten, dass beide Proteine gleichzeitig und kompetitiv an ihre spezifische mRNA binden können. Welcher Fall eintritt, scheint dabei abhängig von unterschiedlichen zellulären Faktoren bestimmt zu werden (Hieronymus and Silver, P. A., 2004, Keene, 2007). Dies kann zum einen die Sequenz der Ziel-RNA sein, aber auch die Mengenverteilung der unterschiedlichen RNA-bindenden Proteine, die Stresssituation der Zelle und der subzelluläre Ort des Ribonukleoproteinkomplexes. Wahrscheinlich binden im Zellkern HuR und AUF1 neben weiteren anderen RNA-bindenden Proteinen gleichzeitig an die mRNA, während im Zytoplasma nur eines der beiden Proteine an der mRNA verbleibt. Um welches es sich dabei handelt, hängt vermutlich mit der physiologischen Situation der Zelle zusammen und damit, was mit der frisch aus dem Zellkern exportierten mRNA geschehen soll (Lal et al., 2004). Bisher wurde noch nicht untersucht, ob HuR und AUF1 in der Lage sind, gleichzeitig an die CD83 mRNA binden können oder ob die Bindung eher auf einer kompetitiven Natur beruht. Bindungsstudien in diese Richtung könnten weitere Einblicke in die posttranskriptionelle Regulation der CD83 mRNA erbringen.

Die Interaktion von AUF1 mit der CD83 mRNA führte zu einer verstärkten Expression von CD83, was sowohl durch Reporteranalysen, als auch mit Hilfe von Westernblots bewiesen werden konnte (Abbildungen 16, 18, 20). Diese Ergebnisse waren überraschend, da bisher eine Überexpression von AUF1 in den meisten Fällen zu einer Reduktion der Expression des jeweiligen Interaktionspartners führte (He and Schneider, R., 2006, Loflin et al., 1999, Sarkar et al., 2003b). Die Gründe für diese gesteigerte Expression von CD83 können zum Einen auf der Ebene der mRNA beruhen. Hier kommt eine gesteigerte Transkription, ein effizienterer nukleärer

Export oder auch eine Stabilisierung der mRNA in Frage. Eine weitere Möglichkeit besteht in der positiven Beeinflussung der Translation durch AUF1.

In der vorliegenden Arbeit konnte ausgeschlossen werden, dass AUF1 einen Einfluss auf den Gesamtumsatz („*turnover*“) der CD83 mRNA hat. Verschiedene Experimente zeigten, dass weder die Gesamtmengen an mRNA, noch der Transport der mRNA aus den Zellkern in das Zytoplasma, noch die Stabilität der mRNA durch AUF1 beeinflusst waren (Abbildungen 21, 22, 23, 27, 28, 31). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die gesteigerte CD83-Expression durch einen translatorischen Einfluss von AUF1 zustande kommt.

Tatsächlich existieren Studien, die AUF1 eine Funktion in der Translation bestimmter mRNAs zuordnen. AUF1 wurde beispielsweise in dem translatorisch aktiven Fraktionen einer Polysomengradientenanalyse im Komplex mit der Laktatdehydrogenase M (LDH) und dem Hitzeschockprotein hsp-70 gefunden (Pioli et al., 2002). Dabei war die polysomale Lokalisation abhängig von der Interaktion von LDH mit einer aktiv translatierten mRNA. Weiterhin wurde die direkte Assoziation von AUF1 mit LDH nachgewiesen (Pioli et al., 2002). Zusätzlich gibt es weitere Untersuchungen, die AUF1 im Komplex mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G und dem PolyA-bindenden Protein PABP und den Hitzeschockproteinen hsp-70 und hsc-70 nachgewiesen haben (Laroia et al., 1999, Liao et al., 2007, Lu et al., 2006a). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Initiation der Translation und unterstützen die Zirkularisierung der mRNA, die für die Translation essentiell ist (Mangus et al., 2003). Außerdem wurde vor kurzem beschrieben, dass AUF1 und TIAR, ein weiteres RNA-bindendes Protein, welches regulierend auf die Translation von ARE-enthaltenden mRNAs einwirkt (Kedersha et al., 1999), die Translation der *c-myc* mRNA beeinflussen, indem sie kompetitiv an die ARE-Sequenz dieser mRNA binden (Liao et al., 2007). Der Einfluss von AUF1 kann dabei direkter oder indirekter Natur sein. Ein direkter Einfluss könnte darin bestehen, dass AUF1 zur Rekrutierung von weiteren, für die Translation essentiellen Faktoren, führt. Das könnten die Proteine eIF4G, PABP, hsp-70 und hsc-70 sein. Somit würde AUF1 die Zirkularisierung der *c-myc* mRNA unterstützen und zur Initiation der Translation einen entscheidenden Beitrag leisten. Eine andere Möglichkeit wäre ein indirekter Effekt von AUF1. Hierbei könnte AUF1 dazu dienen, die Bindung des

Translationssuppressors TIAR an die mRNA zu unterdrücken und infolge dessen die Translation initiieren (Liao et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit lieferten Untersuchungen der *de novo* Synthese von CD83 Protein einen ersten Hinweis für einen positiven Einfluss von AUF1 auf die Translation von CD83 mRNA. Eine Überexpression von AUF1 führte somit zu einer durchschnittlich doppelt so starken Neu-Synthese von CD83 bei unveränderter Menge von zytoplasmatischer CD83 mRNA (Abbildung 19).

Eine weitere Bestätigung, dass AUF1 die Translation von CD83 mRNA unterstützt, würden Polysomenbindungsexperimente liefern. Diese Experimente könnten Aufschluss darüber liefern, ob sich das Polysomenbeladungsprofil der CD83 mRNA in An- und Abwesenheit von AUF1 ändert.

Um die Bedeutung von AUF1 im Hinblick auf die CD83 Expression noch weitgehender untersuchen zu können, wurde überprüft, ob der Einfluss von AUF1 auch in autologen Systemen, in denen CD83 und AUF1 endogen exprimiert werden, eine Rolle spielt. Hierzu wurden verschiedene Zelllinien, wie Monomac6 und U937 als monozytäre Zelllinien und Jurkat als humane T-Lymphozytenzelllinie verwendet, die während ihrer Aktivierung geringe Mengen von CD83 exprimieren. Dies ermöglichte eine Echtzeitanalyse des Verlaufs der CD83 Expression. FACS-Analysen und [<sup>35</sup>S]-Markierungen ergaben, dass eine durch RNAi herbeigeführte Reduktion von AUF1 in den Zellen zu einer deutlich verzögerten CD83 Expression auf der Oberfläche während der Aktivierung der Zellen führte (Abbildungen 29, 30, 32, 33). Dabei ergaben Untersuchungen der CD83 mRNA Mengen, dass diese nicht auffällig beeinflusst waren (Abbildung 31).

Die Beobachtung, dass die Reduktion von AUF1 zu einer stark verzögerten Expression von CD83 in aktivierbaren Zellsystemen führte, unterschied sich von Ergebnissen, die im Zusammenhang mit dem Export der CD83 mRNA erhalten wurden. Dabei zeigte sich, dass eine Inhibition des CRM1-Exportweges in aktivierbaren Zellsystemen zu einer Unterbrechung der CD83 Expression führte. Dabei war es nicht von Bedeutung, an welchen Stellen in den Exportmechanismus eingegriffen wurde. Die direkte Inhibition des Exportfaktors CRM1 durch den spezifischen CRM1-Inhibitor Leptomycin B (LMB) (Kudo et al., 1999) führte genauso

zum Verlust der CD83 Expression, wie die Reduktion des Adapterproteins HuR (Prechtel et al., 2006, Schutz et al., 2006). Auch wenn die Expression des Phosphoproteins APRIL gehemmt wurde, eines weiteren kürzlich entdeckten Faktors des CD83 mRNA-Exportkomplexes, konnte die CD83 mRNA nicht mehr transportiert werden und die Expression war somit unterbrochen (Fries et al., 2007). Der gleiche Effekt konnte beobachtet werden, wenn eine phosphorylierungsdefiziente Mutante von APRIL eingesetzt wurde, wodurch gezeigt wurde, dass bei der Expression von CD83 weitere Regulationsmechanismen auf der Ebene der posttranskriptionellen Regulation existieren (Chemnitz et al. Manuskript in Vorbereitung).

Die lediglich verzögerte CD83 Expression durch die Reduktion der AUF1 Mengen in der Zelle könnte damit erklärt werden, dass die Zelle in der Lage ist, den durch fehlendes AUF1 unterbrochenen Mechanismus zu umgehen, indem sie alternative Wege beschreitet, um dieses funktionell wichtige Protein exprimieren zu können. Es könnte aber auch sein, dass AUF1 als zellulärer Effektor wirkt, der für die Translation nicht stringent benötigt wird, diese aber stark beschleunigt. Es ist auch nicht auszuschließen, dass parallele Stoffwechselwege in der Zelle existieren, die eine effiziente Translation wichtiger Transkripte sicherstellen, so dass der Ausfall eines Weges nicht zu einem totalen Verlust des benötigten Proteins führt. So wäre es denkbar, dass sich die Regulation der Expression aktuell benötigter Proteine in bestimmten Stresssituationen der Zelle so ändert, dass eine effiziente Expression dieser Proteine ermöglicht, bzw. sichergestellt wird.

Ein weiterer wichtiger Hinweis für die Bedeutung von AUF1 für die CD83 Expression lieferte das Experiment mit primären humanen dendritischen Zellen. Hierbei handelt es sich um ein adäquates autologes System, da CD83 als wichtiger Oberflächenmarker in diesen Immunzellen zur effizienten Aktivierung von T-Zellen benötigt wird (Kruse et al., 2000a, Lechmann et al., 2002a, Scholler et al., 2002, Zinser et al., 2004b). Es konnte beobachtet werden, dass im Fall einer reduzierten AUF1 Expression die Menge von CD83 negativen dendritischen Zellen um das Dreifache höher lag als in den Vergleichszellen (Abbildung 34). Wenn man dabei die nur mäßige Inhibition der AUF1 Expression berücksichtigt, erscheint dieses Ergebnis noch effizienter und weist auf die wichtige Rolle von AUF1 in diesen immunologisch wichtigen Zellen hin.

Aus den zuvor diskutierten Ergebnissen und veröffentlichten Befunden lässt sich folgendes vorläufiges Modell entwerfen: AUF1 bindet neben HuR bereits im Zellkern an das PRE der CD83 mRNA. Dies könnte nach den gleichen Mechanismen ablaufen, wie sie in den bereits erwähnten Untersuchungen von Lal und Mitarbeitern im Zusammenhang mit ARE-enthaltenden Sequenzen postuliert wurden (Lal et al., 2004). Das würde bedeuten, dass erst nach dem Transport der CD83 mRNA ins Zytoplasma möglicherweise eines der beiden Proteine von der mRNA dissoziiert. Es kann auch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass AUF1 erst im Zytoplasma an die RNA bindet, indem es dort mit HuR um die Bindung kompetitiert. Allerdings spricht der Befund, dass es sich bei AUF1 wie bei HuR um ein Shuttle-Protein handelt (Sarkar et al., 2003a), eher für einen gemeinsamen Transport beider Proteine auf der mRNA aus dem Zellkern.

Nach dem erfolgten Transport der CD83 mRNA ins Zytoplasma, der durch HuR unterstützt wird (Prechtel et al., 2006), kann nun AUF1 seine Aufgabe in der Steigerung der Translationseffizienz ausführen. Der Einfluss von AUF1 kann dabei, wie bereits in der zuvor erwähnten Studie beschrieben (Liao et al., 2007), direkt oder indirekt sein. Bei einem direkten Einfluss könnte AUF1 die Zirkularisierung der CD83 mRNA unterstützen, indem es weitere für diesen Schritt notwendige Proteine an diese spezifische mRNA rekrutiert. Das könnten zum Beispiel die schon mehrfach erwähnten Proteine eIF4G, PABP, hsp-70 und hsc-70 sein, für die eine Interaktion mit AUF1 nachgewiesen wurde (Laroia et al., 1999, Liao et al., 2007, Lu et al., 2006a, Mangus et al., 2003). Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass AUF1 indirekt an der Beschleunigung der Translation beteiligt ist. Hierbei könnte AUF1 wie im Fall der *c-myc* mRNA (Liao et al., 2007) als Kompetitor fungieren, um die Bindung von weiteren RNA-bindenden Proteinen wie TIAR oder TIA-1, die als Translationssuppressoren fungieren (Kedersha et al., 1999), an die CD83 mRNA zu unterbinden und so die Translation zu unterstützen.

Da es sich bei AUF1 um ein Phosphoprotein handelt (Wilson et al., 2003b, Wilson et al., 2003a), besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass die Translation der CD83 mRNA durch den Phosphorylierungszustand von AUF1 reguliert wird. Die Proteinphosphorylierung spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen zellulären Prozessen, wie beispielsweise vielen verschiedenen Signalübertragungswegen (z. B.

zelluläre Proliferation) (Fan and Zhang, X. G., 2005). So spielt der p38 MAP-Kinaseweg (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) eine bedeutende Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation von Zytokinen. Die Aktivierung dieser Signaltransduktionskaskade führt zur Stabilisierung bestimmter Zytokin mRNAs (Frevel et al., 2003, Kishore et al., 2001). Dabei wurde gefunden, dass die p38 Kinase sowohl die Stabilität als auch die Translation inflammatorischer mRNAs regulieren kann, wobei diese Regulation anscheinend auf der Phosphorylierung von ARE-bindenden Proteinen beruht (Dean et al., 2004). Auch für AUF1 gibt es Untersuchungen, die einen Einfluss der AUF1-Phosphorylierung auf die Stabilisierung von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  mRNAs zeigten (Wilson et al., 2003b, Wilson et al., 2003a). Weiterhin konnte bereits eine Beteiligung dieser posttranskriptionellen Modifikation bei der Regulation der Expression von CD83 gezeigt werden: Die Phosphorylierung des Adapterproteins APRIL ist entscheidend für den Transport der CD83 mRNA aus dem Zytoplasma (Chemnitz et al., Manuskript in Vorbereitung). Diese vorangegangenen Untersuchungen machen eine Beteiligung der Phosphorylierung von AUF1 für die Regulation der Translation von CD83 mRNA wahrscheinlich.

Insgesamt konnte diese Dissertation durch die Identifizierung eines neuen funktionellen Interaktionspartners der CD83 mRNA einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Mechanismen zur posttranskriptionellen Regulation der CD83 Expression liefern. Es konnte bestätigt werden, dass das PRE Element der CD83 mRNA kein typisches Instabilitätselement darstellt und dass die Funktionen der RNA bindenden Proteine weit über die bereits bekannten Funktionen, wie sie beispielsweise für ARE-enhaltene RNAs beschrieben sind, hinausgehen.

Diese Dissertation liefert neue Erkenntnisse über die posttranskriptionelle Genregulation von CD83 und zeigt, dass es sich hierbei um einen wichtigen Bestandteil der Expression dieses Proteins handelt. Es wurde die Grundlage für weitere Untersuchungen geschaffen, um diesen Regulationsmechanismus noch besser verstehen zu können. Somit könnte in Zukunft AUF1 eine neue Zielstruktur zur Modulation der CD83 Expression in dendritischen Zellen darstellen, wodurch sich eine weitere Möglichkeit zur Modulation der DC-vermittelten Immunantwort (z. B. Immuntherapie bei Tumorerkrankungen oder bei Autoimmunkrankheiten) ergeben würde.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Ak	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APRIL	<i>acidic protein rich in leucines</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>AU-rich elements</i>
AU	Adenosin/Uridin
AUF1	ARE/poly(U)-binding/degradation factor 1
BSA	Bovines Serum Albumin
Bp	Basenpaar
CD	<i>cluster of differentiation</i>
<i>c-fos</i>	<i>cellular oncogene fos</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemilumineszenz</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELAV	<i><u>e</u>mbryonic <u>l</u>ethal <u>a</u>bnormal <u>v</u>ision</i>
ERG	<i>early response gene</i>
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
β-Gal	β-Galaktosidase
GST	Glutathion S-Transferase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ1
hnRNP	heterogenous nuclear Ribonucleoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography



---

hsp	Hitzeschockprotein
HTLV-I	Humanes T-Zell Leukämie Virus Typ I
HuR	Hu-Protein
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LMB	Leptomycin B
M	Molar
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
miRNA	<i>micro RNA</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaAc	Natriumacetat
NES	<i>nuclear export signal</i> , Nukleäres Exportsignal
NXF1	<i>nuclear export factor1</i>
ng	Nanogramm
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , Nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
NMD	nonsense mediated decay
NPC	<i>nuclear pore complex</i> , Kernporenkanal
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
pp32	Phosphoprotein 32
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEI	Polyethylenimin
PGS	Protein-G-Sepharose
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen- konzentration

---

PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PRE	<i>Posttranscriptional Regulatory Element</i>
pSUPER	<i>suppression of endogenous RNA</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rev	<i>regulator of viral gene expression</i>
RISC	RNA-induzierter <i>Silencing</i> Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
RRM	RNA recognition motif
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sek	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
Std	Stunde
SV40	<i>simian virus 40</i>
TAP	<i>Tip-associated protein</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIA-1	T cell intracellular antigen-1
TIAR	TIA related protein
TNF $\alpha$	Tumornecrosisfaktor $\alpha$
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

## 9 Literaturverzeichnis

- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S., and Jacobson, A.** (2004); A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay; *Nature*; 432(7013); 112-118
- Anderson, P. and Kedersha, N.** (2002); Stressful initiations; *J.Cell Sci.*; 115(Pt 16); 3227-3234
- Bagasra, O. and Prilliman, K. R.** (2004); RNA interference: the molecular immune system; *J.Mol.Histol.*; 35(6); 545-553
- Bakheet, T., Frevel, M., Williams, B. R., Greer, W., and Khabar, K. S.** (2001); ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins; *Nucleic Acids Res.*; 29(1); 246-254
- Bakheet, T., Williams, B. R., and Khabar, K. S.** (2003); ARED 2.0: an update of AU-rich element mRNA database; *Nucleic Acids Res.*; 31(1); 421-423
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K.** (2000); Immunobiology of dendritic cells; *Annu.Rev.Immunol.*; 18767-811
- Banchereau, J., Schuler-Thurner, B., Palucka, A. K., and Schuler, G.** (2001); Dendritic cells as vectors for therapy; *Cell*; 106(3); 271-274
- Banchereau, J. and Steinman, R. M.** (1998); Dendritic cells and the control of immunity; *Nature*; 392(6673); 245-252
- Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H. B.** (2005); AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?; *Nucleic Acids Res.*; 33(22); 7138-7150
- Beck, A. R., Medley, Q. G., O'Brien, S., Anderson, P., and Streuli, M.** (1996); Structure, tissue distribution and genomic organization of the murine RRM-type RNA binding proteins TIA-1 and TIAR; *Nucleic Acids Res.*; 24(19); 3829-3835
- Bell, D., Young, J. W., and Banchereau, J.** (1999); Dendritic cells; *Adv.Immunol.*; 72255-324
- Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R. M., and Bhardwaj, N.** (1996); Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood; *J.Immunol.Methods*; 196(2); 121-135
- Bhattacharya, S., Giordano, T., Brewer, G., and Malter, J. S.** (1999); Identification of AUF-1 ligands reveals vast diversity of early response gene mRNAs; *Nucleic Acids Res.*; 27(6); 1464-1472
- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., and Filipowicz, W.** (2006); Relief of microRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress; *Cell*; 125(6); 1111-1124

- Blaxall, B. C., Pende, A., Wu, S. C., and Port, J. D.** (2002); Correlation between intrinsic mRNA stability and the affinity of AUF1 (hnRNP D) and HuR for A+U-rich mRNAs; *Mol.Cell Biochem.*; 232(1-2); 1-11
- Bradford, M. M.** (1976); A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal.Biochem.*; 72248-254
- Brennan, C. M. and Steitz, J. A.** (2001); HuR and mRNA stability; *Cell Mol.Life Sci.*; 58(2); 266-277
- Brewer, G.** (1991); An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro; *Mol.Cell Biol.*; 11(5); 2460-2466
- Buzby, J. S., Brewer, G., and Nugent, D. J.** (1999); Developmental regulation of RNA transcript destabilization by A + U-rich elements is AUF1-dependent; *J.Biol.Chem.*; 274(48); 33973-33978
- Cao, W., Lee, S. H., and Lu, J.** (2005); CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells; *Biochem.J.*; 385(Pt 1); 85-93
- Carballo, E., Lai, W. S., and Blackshear, P. J.** (1998); Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin; *Science*; 281(5379); 1001-1005
- Chen, C. Y. and Shyu, A. B.** (1995); AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation; *Trends Biochem.Sci.*; 20(11); 465-470
- Chen, C. Y., Xu, N., Zhu, W., and Shyu, A. B.** (2004); Functional dissection of hnRNP D suggests that nuclear import is required before hnRNP D can modulate mRNA turnover in the cytoplasm; *RNA.*; 10(4); 669-680
- Chen, C. Y., Xu, N., and Shyu, A. B.** (2002); Highly Selective Actions of HuR in Antagonizing AU-Rich Element-Mediated mRNA Destabilization; *Mol.Cell.Biol.*; 22(20); 7268-7278
- Cok, S. J., Acton, S. J., Sexton, A. E., and Morrison, A. R.** (2004); Identification of RNA-binding proteins in RAW 264.7 cells that recognize a lipopolysaccharide-responsive element in the 3-untranslated region of the murine cyclooxygenase-2 mRNA; *J.Biol.Chem.*; 279(9); 8196-8205
- Cougot, N., Babajko, S., and Seraphin, B.** (2004); Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells; *J.Cell Biol.*; 165(1); 31-40
- Cullen, B. R.** (1986); Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism; *Cell*; 46(7); 973-982
- Cullen, B. R.** (2000); Nuclear RNA export pathways; *Mol.Cell Biol.*; 20(12); 4181-4187
- Cullen, B. R.** (2006); Viruses and microRNAs; *Nat.Genet.*; 38 Suppl 1S25-S30

- Cullen, B. R.** (2003a); Nuclear mRNA export: insights from virology; *Trends Biochem.Sci.*; 28(8); 419-424
- Cullen, B. R.** (2003b); Nuclear RNA export; *J.Cell Sci.*; 116(Pt 4); 587-597
- David, P. S., Tanveer, R., and Port, J. D.** (2007); FRET-detectable interactions between the ARE binding proteins, HuR and p37AUF1; *RNA.*; 13(9); 1453-1468
- Davis, M. M.** (2004); The evolutionary and structural 'logic' of antigen receptor diversity; *Semin.Immunol.*; 16(4); 239-243
- Dean, J. L., Sully, G., Clark, A. R., and Saklatvala, J.** (2004); The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation; *Cell Signal.*; 16(10); 1113-1121
- Dean, J. L., Wait, R., Mahtani, K. R., Sully, G., Clark, A. R., and Saklatvala, J.** (2001); The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR; *Mol.Cell Biol.*; 21(3); 721-730
- DeMaria, C. T. and Brewer, G.** (1996); AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation; *J.Biol.Chem.*; 271(21); 12179-12184
- Dember, L. M., Kim, N. D., Liu, K. Q., and Anderson, P.** (1996); Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities; *J.Biol.Chem.*; 271(5); 2783-2788
- Dixon, D. A., Tolley, N. D., King, P. H., Nabors, L. B., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., and Prescott, S. M.** (2001); Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells; *J.Clin.Invest*; 108(11); 1657-1665
- Dobi, A., Szemes, M., Lee, C., Palkovits, M., Lim, F., Gyorgy, A., Mahan, M. A., and Agoston, D. V.** (2006); AUF1 is expressed in the developing brain, binds to AT-rich double-stranded DNA, and regulates enkephalin gene expression; *J.Biol.Chem.*; 281(39); 28889-28900
- Dreyfuss, G., Hentze, M., and Lamond, A. I.** (1996); From transcript to protein; *Cell*; 85(7); 963-972
- Dreyfuss, G., Kim, V. N., and Kataoka, N.** (2002); Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry; *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*; 3(3); 195-205
- Dustin, M. L. and Chan, A. C.** (2000); Signaling takes shape in the immune system; *Cell*; 103(2); 283-294
- Fan, S. C. and Zhang, X. G.** (2005); Characterizing the microenvironment surrounding phosphorylated protein sites; *Genomics Proteomics.Bioinformatics.*; 3(4); 213-217
- Fan, X. C. and Steitz, J. A.** (1998); Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs; *EMBO J.*; 17(12); 3448-3460

- Fialcowitz, E. J., Brewer, B. Y., Keenan, B. P., and Wilson, G. M.** (2005); A hairpin-like structure within an AU-rich mRNA-destabilizing element regulates trans-factor binding selectivity and mRNA decay kinetics; *J.Biol.Chem.*;
- Flores-Romo, L.** (2001); In vivo maturation and migration of dendritic cells; *Immunology*; 102(3); 255-262
- Frevel, M. A., Bakheet, T., Silva, A. M., Hissong, J. G., Khabar, K. S., and Williams, B. R.** (2003); p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts; *Mol.Cell Biol.*; 23(2); 425-436
- Fried, H. and Kutay, U.** (2003); Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory; *Cell Mol.Life Sci.*; 60(8); 1659-1688
- Fries, B., Heukeshoven, J., Hauber, I., Gruttner, C., Stocking, C., Kehlenbach, R. H., Hauber, J., and Chemnitz, J.** (2007); Analysis of nucleocytoplasmic trafficking of the HuR ligand APRIL and its influence on CD83 expression; *J.Biol.Chem.*; 282(7); 4504-4515
- Fujimoto, Y. and Tedder, T. F.** (2006); CD83: a regulatory molecule of the immune system with great potential for therapeutic application; *J.Med.Dent.Sci.*; 53(2); 85-91
- Gallouzi, I. E. and Steitz, J. A.** (2001); Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides; *Science*; 294(5548); 1895-1901
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M., and Anderson, P.** (2004); Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1; *Mol.Biol.Cell*; 15(12); 5383-5398
- Gossen, M. and Bujard, H.** (1992); Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 89(12); 5547-5551
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H.** (1995); Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells; *Science*; 268(5218); 1766-1769
- Grosset, C., Boniface, R., Duchez, P., Solanilla, A., Cosson, B., and Ripoche, J.** (2004); In vivo studies of translational repression mediated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich element; *J.Biol.Chem.*; 279(14); 13354-13362
- Grosset, C., Chen, C. Y., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H., and Shyu, A. B.** (2000); A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex; *Cell*; 103(1); 29-40
- Guhaniyogi, J. and Brewer, G.** (2001); Regulation of mRNA stability in mammalian cells; *Gene*; 265(1-2); 11-23
- Gunn, M. D.** (2003); Chemokine mediated control of dendritic cell migration and function; *Semin.Immunol.*; 15(5); 271-276

- Hakata, Y., Yamada, M., Mabuchi, N., and Shida, H.** (2002); The carboxy-terminal region of the human immunodeficiency virus type 1 protein Rev has multiple roles in mediating CRM1-related Rev functions; *J. Virol.*; 76(16); 8079-8089
- Hannon, G. J.** (2002); RNA interference; *Nature*; 418(6894); 244-251
- He, C. and Schneider, R.** (2006); 14-3-3sigma is a p37 AUF1-binding protein that facilitates AUF1 transport and AU-rich mRNA decay; *EMBO J.*; 25(16); 3823-3831
- Hieronymus, H. and Silver, P. A.** (2004); A systems view of mRNP biology; *Genes Dev.*; 18(23); 2845-2860
- Hock, B. D., Kato, M., McKenzie, J. L., and Hart, D. N.** (2001); A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera; *Int. Immunol.*; 13(7); 959-967
- Hollams, E. M., Giles, K. M., Thomson, A. M., and Leedman, P. J.** (2002); mRNA stability and the control of gene expression: implications for human disease; *Neurochem. Res.*; 27(10); 957-980
- Hutvagner, G.** (2005); Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation; *FEBS Lett.*; 579(26); 5850-5857
- Jacob, C. O., Lee, S. K., and Strassmann, G.** (1996); Mutational analysis of TNF-alpha gene reveals a regulatory role for the 3'-untranslated region in the genetic predisposition to lupus-like autoimmune disease; *J. Immunol.*; 156(8); 3043-3050
- Jansen, R. P.** (2001); mRNA localization: message on the move; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 2(4); 247-256
- JENSEN, F. C., GIRARDI, A. J., GILDEN, R. V., and KOPROWSKI, H.** (1964); INFECTION OF HUMAN AND SIMIAN TISSUE CULTURES WITH ROUS SARCOMA VIRUS; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 5253-59
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E., and Anderson, P.** (2005); Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling; *J. Cell Biol.*; 169(6); 871-884
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P.** (1999); RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules; *J. Cell Biol.*; 147(7); 1431-1442
- Keene, J. D.** (2007); RNA regulons: coordination of post-transcriptional events; *Nat. Rev. Genet.*; 8(7); 533-543
- Keene, J. D.** (2003); Organizing mRNA export; *Nat. Genet.*; 33(2); 111-112
- Kiledjian, M., DeMaria, C. T., Brewer, G., and Novick, K.** (1997); Identification of AUF1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the alpha-globin mRNA stability complex; *Mol. Cell Biol.*; 17(8); 4870-4876

- Kishore, R., McMullen, M. R., and Nagy, L. E.** (2001); Stabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA by chronic ethanol: role of A + U-rich elements and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway; *J.Biol.Chem.*; 276(45); 41930-41937
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., and Kollias, G.** (1999); Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies; *Immunity.*; 10(3); 387-398
- Kozlow, E. J., Wilson, G. L., Fox, C. H., and Kehrl, J. H.** (1993); Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes; *Blood*; 81(2); 454-461
- Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Bevec, D., Kuhnt, C., Steinkasserer, A., Schuler, G., and Hauber, J.** (2000a); Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA; *J.Exp.Med.*; 191(9); 1581-1590
- Kruse, M., Rosorius, O., Kratzer, F., Stelz, G., Kuhnt, C., Schuler, G., Hauber, J., and Steinkasserer, A.** (2000b); Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity; *J.Virol.*; 74(15); 7127-7136
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S.** (1999); Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 96(16); 9112-9117
- Kuersten, S. and Goodwin, E. B.** (2005); Linking nuclear mRNP assembly and cytoplasmic destiny; *Biol.Cell*; 97(6); 469-478
- Lai, W. S. and Blackshear, P. J.** (2001); Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly(A) tail; *J.Biol.Chem.*; 276(25); 23144-23154
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J. L., and Gorospe, M.** (2004); Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs; *EMBO J.*; 23(15); 3092-3102
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R. J.** (1999); Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway; *Science*; 284(5413); 499-502
- Laroia, G. and Schneider, R. J.** (2002); Alternate exon insertion controls selective ubiquitination and degradation of different AUF1 protein isoforms; *Nucleic Acids Res.*; 30(14); 3052-3058
- Lebwohl, D. E., Muise-Helmericks, R., Sepp-Lorenzino, L., Serve, S., Timaul, M., Bol, R., Borgen, P., and Rosen, N.** (1994); A truncated cyclin D1 gene encodes a stable mRNA in a human breast cancer cell line; *Oncogene*; 9(7); 1925-1929
- Lechmann, M., Berchtold, S., Hauber, J., and Steinkasserer, A.** (2002a); CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation; *Trends Immunol.*; 23(6); 273-275



- Lechmann, M., Krooshoop, D. J., Dudziak, D., Kremmer, E., Kuhnt, C., Figdor, C. G., Schuler, G., and Steinkasserer, A.** (2001); The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells; *J.Exp.Med.*; 194(12); 1813-1821
- Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A., and Steinkasserer, A.** (2002b); Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells; *Int.Arch.Allergy Immunol.*; 129(2); 113-118
- Liao, B., Hu, Y., and Brewer, G.** (2007); Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation; *Nat.Struct.Mol.Biol.*; 14(6); 511-518
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G. J.** (2004); Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi; *Science*; 305(5689); 1437-1441
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., and Parker, R.** (2005); MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies; *Nat.Cell Biol.*; 7(7); 719-723
- Loflin, P., Chen, C. Y., and Shyu, A. B.** (1999); Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element; *Genes Dev.*; 13(14); 1884-1897
- Lu, J. Y., Bergman, N., Sadri, N., and Schneider, R. J.** (2006a); Assembly of AUF1 with eIF4G-poly(A) binding protein complex suggests a translation function in AU-rich mRNA decay; *RNA.*; 12(5); 883-893
- Lu, J. Y., Sadri, N., and Schneider, R. J.** (2006b); Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs; *Genes Dev.*; 20(22); 3174-3184
- Lu, J. Y. and Schneider, R. J.** (2004); Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay; *J.Biol.Chem.*; 279(13); 12974-12979
- Lutz, M. B., Schnare, M., Menges, M., Rossner, S., Rollinghoff, M., Schuler, G., and Gessner, A.** (2002); Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF; *J.Immunol.*; 169(7); 3574-3580
- Mangus, D. A., Evans, M. C., and Jacobson, A.** (2003); Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression; *Genome Biol.*; 4(7); 223-
- Maniatis, T. and Reed, R.** (2002); An extensive network of coupling among gene expression machines; *Nature*; 416(6880); 499-506
- Maquat, L. E.** (2002); Nonsense-mediated mRNA decay; *Curr.Biol.*; 12(6); R196-R197
- Maquat, L. E.** (2004); Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics; *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*; 5(2); 89-99

- Mazan-Mamczarz, K. and Gartenhaus, R. B.** (2007); Post-transcriptional control of the MCT-1-associated protein DENR/DRP by RNA-binding protein AUF1; *Cancer Genomics Proteomics.*; 4(3); 233-239
- McCutchan, J. H. and Pagano, J. S.** (1968); Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran; *J.Natl.Cancer Inst.*; 41(2); 351-357
- Meister, G. and Tuschl, T.** (2004); Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA; *Nature*; 431(7006); 343-349
- Mellman, I. and Steinman, R. M.** (2001); Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines; *Cell*; 106(3); 255-258
- Mitchell, P. and Tollervey, D.** (2001); mRNA turnover; *Curr.Opin.Cell Biol.*; 13(3); 320-325
- Moore, M. J.** (2005); From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs; *Science*; 309(5740); 1514-1518
- Naim, H. Y. and Roth, M. G.** (1994); SV40 virus expression vectors; *Methods Cell Biol.*; 43 Pt A113-136
- Parker, R. and Song, H.** (2004); The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover; *Nat.Struct.Mol.Biol.*; 11(2); 121-127
- Pemberton, L. F. and Paschal, B. M.** (2005); Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export; *Traffic*; 6(3); 187-198
- Peng, S. S., Chen, C. Y., and Shyu, A. B.** (1996); Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements; *Mol.Cell Biol.*; 16(4); 1490-1499
- Pillai, R. S.** (2005); MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?; *RNA*; 11(12); 1753-1761
- Pillai, R. S., Artus, C. G., and Filipowicz, W.** (2004); Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis; *RNA*; 10(10); 1518-1525
- Pioli, P. A., Hamilton, B. J., Connolly, J. E., Brewer, G., and Rigby, W. F.** (2002); Lactate dehydrogenase is an AU-rich element-binding protein that directly interacts with AUF1; *J.Biol.Chem.*; 277(38); 35738-35745
- Prechtel, A. T., Chemnitz, J., Schirmer, S., Ehlers, C., Langbein-Detsch, I., Stulke, J., Dabauvalle, M. C., Kehlenbach, R. H., and Hauber, J.** (2006); Expression of CD83 is regulated by HuR via a novel cis-active coding region RNA element; *J.Biol.Chem.*; 281(16); 10912-10925
- Raineri, I., Wegmueller, D., Gross, B., Certa, U., and Moroni, C.** (2004); Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference; *Nucleic Acids Res.*; 32(4); 1279-1288

- Sagliocco, F., Laloo, B., Cosson, B., Laborde, L., Castroviejo, M., Rosenbaum, J., Ripoche, J., and Grosset, C.** (2006); The ARE-associated factor AUF1 binds poly(A) in vitro in competition with PABP; *Biochem.J.*; 400(2); 337-347
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.** (1977); DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 74(12); 5463-5467
- Sarkar, B., Lu, J. Y., and Schneider, R. J.** (2003a); Nuclear import and export functions in the different isoforms of the AUF1/heterogeneous nuclear ribonucleoprotein protein family; *J.Biol.Chem.*; 278(23); 20700-20707
- Sarkar, B., Xi, Q., He, C., and Schneider, R. J.** (2003b); Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform; *Mol.Cell Biol.*; 23(18); 6685-6693
- Scholler, N., Hayden-Ledbetter, M., Dahlin, A., Hellstrom, I., Hellstrom, K. E., and Ledbetter, J. A.** (2002); Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity; *J.Immunol.*; 168(6); 2599-2602
- Schutz, S., Chemnitz, J., Spillner, C., Frohme, M., Hauber, J., and Kehlenbach, R. H.** (2006); Stimulated expression of mRNAs in activated T cells depends on a functional CRM1 nuclear export pathway; *J.Mol.Biol.*; 358(4); 997-1009
- Sen, G. L. and Blau, H. M.** (2005); Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies; *Nat.Cell Biol.*; 7(6); 633-636
- Sheth, U. and Parker, R.** (2003); Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies; *Science*; 300(5620); 805-808
- Sontheimer, E. J. and Carthew, R. W.** (2005); Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs; *Cell*; 122(1); 9-12
- Storz, G., Altuvia, S., and Wassarman, K. M.** (2005); An abundance of RNA regulators; *Annu.Rev.Biochem.*; 74; 199-217
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., Brengues, M., and Parker, R.** (2005); Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs; *RNA*; 11(4); 371-382
- Veyrune, J. L., Carillo, S., Vie, A., and Blanchard, J. M.** (1995); c-fos mRNA instability determinants present within both the coding and the 3' non coding region link the degradation of this mRNA to its translation; *Oncogene*; 11(10); 2127-2134
- Wagner, B. J., DeMaria, C. T., Sun, Y., Wilson, G. M., and Brewer, G.** (1998); Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms; *Genomics*; 48(2); 195-202
- Wan, H. and Dupasquier, M.** (2005); Dendritic cells in vivo and in vitro; *Cell Mol.Immunol.*; 2(1); 28-35
- Wilkinson, M. F. and Shyu, A. B.** (2002); RNA surveillance by nuclear scanning?; *Nat.Cell Biol.*; 4(6); E144-E147

- Wilson, G. M. and Brewer, G.** (1999); The search for trans-acting factors controlling messenger RNA decay; *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*; 62257-291
- Wilson, G. M., Lu, J., Sutphen, K., Suarez, Y., Sinha, S., Brewer, B., Villanueva-Feliciano, E. C., Ysla, R. M., Charles, S., and Brewer, G.** (2003a); Phosphorylation of p40AUF1 regulates binding to A + U-rich mRNA-destabilizing elements and protein-induced changes in ribonucleoprotein structure; *J.Biol.Chem.*; 278(35); 33039-33048
- Wilson, G. M., Lu, J., Sutphen, K., Sun, Y., Huynh, Y., and Brewer, G.** (2003b); Regulation of A + U-rich element-directed mRNA turnover involving reversible phosphorylation of AUF1; *J.Biol.Chem.*; 278(35); 33029-33038
- Wilson, G. M., Sun, Y., Lu, H., and Brewer, G.** (1999); Assembly of AUF1 oligomers on U-rich RNA targets by sequential dimer association; *J.Biol.Chem.*; 274(47); 33374-33381
- Wilusz, C. J. and Wilusz, J.** (2004); Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus; *Trends Genet.*; 20(10); 491-497
- Wilusz, C. J., Wormington, M., and Peltz, S. W.** (2001); The cap-to-tail guide to mRNA turnover; *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*; 2(4); 237-246
- Wolenski, M., Cramer, S. O., Ehrlich, S., Steeg, C., Fleischer, B., and von, B. A.** (2003); Enhanced activation of CD83-positive T cells; *Scand.J.Immunol.*; 58(3); 306-311
- Xu, N., Chen, C. Y., and Shyu, A. B.** (2001); Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover; *Mol.Cell Biol.*; 21(20); 6960-6971
- Xu, N., Loflin, P., Chen, C. Y., and Shyu, A. B.** (1998); A broader role for AU-rich element-mediated mRNA turnover revealed by a new transcriptional pulse strategy; *Nucleic Acids Res.*; 26(2); 558-565
- Zamore, P. D. and Haley, B.** (2005); Ribo-gnome: the big world of small RNAs; *Science*; 309(5740); 1519-1524
- Zhang, W., Wagner, B. J., Ehrenman, K., Schaefer, A. W., DeMaria, C. T., Crater, D., DeHaven, K., Long, L., and Brewer, G.** (1993); Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1; *Mol.Cell Biol.*; 13(12); 7652-7665
- Zhou, L. J., Schwarting, R., Smith, H. M., and Tedder, T. F.** (1992); A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily; *J.Immunol.*; 149(2); 735-742
- Zhou, L. J. and Tedder, T. F.** (1995); Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily; *J.Immunol.*; 154(8); 3821-3835

**Zhou, L. J. and Tedder, T. F.** (1996); CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*; 93(6); 2588-2592

**Ziegler-Heitbrock, H. W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., and Riethmuller, G.** (1988); Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes; *Int.J.Cancer*; 41(3); 456-461

**Zinser, E., Lechmann, M., Golka, A., Lutz, M. B., and Steinkasserer, A.** (2004a); Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble CD83; *J.Exp.Med.*; 200(3); 345-351

**Zinser, E., Turza, N., and Steinkasserer, A.** (2004b); CNI-1493 mediated suppression of dendritic cell activation in vitro and in vivo; *Immunobiology*; 209(1-2); 89-97

Substanz	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
Acrylamid	T	45-46-20/2125-36/38-43-48/23/24/25-62	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Dithiothreitol	Xn	22	36-38
Eisessig	C	10-35	(1/2-)23-26-45
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-68	26-28-36/37-45
Formamid	T	61	53-45
Formaldehyd	T	23/24/25-34-40-43	(1/2-)26-36/37/39-45-51
Isopropanol	F, Xi	11-36-67	(2-)7-16-24/25-26
Luminol	Xn	22-36/37/38	26-37/39
Methanol	T, F	11-23/24/25-39/23/24/25	(1/2-)7-16-36/37-45
SDS	F, Xn	11-21/22-36/37/38	26-36/37
Tetramethyldiamin	C, F	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Phenol	T, C	23/24/25-34-48/20/21/22-68	(1/2-)24/25-26-28-36/37/39-45

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe.  
Weiterhin versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig durchgeführt  
und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Christina Ehlers

Hamburg, den 23. Januar 2008