



**Universität Hamburg**  
DER FORSCHUNG | DER LEHRE | DER BILDUNG

# Molekulare Analyse der CD83 Expression humaner Leukozyten

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

**Universität Hamburg**  
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
Fachbereich für Biologie

vorgelegt von

**Dorothea Pieper**  
aus Gräfelfing

Hamburg, April 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. T. DOBNER  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. J. HAUBER  
Tag der Disputation: 27. Januar 2012

Hamburg, den 10. Januar 2012

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Fromm', with a stylized flourish above the 'm'.

Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2007 bis November 2011 am Heinrich-Pette-Institut – Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in der Abteilung „Zellbiologie und Virologie“ angefertigt.

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Thomas Dobner
2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. Joachim Hauber

1. Disputationsgutachter: Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach
2. Disputationsgutachter: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

Datum der Disputation: 27.01.2012

Teile dieser Dissertation wurden bereits in folgenden *peer reviewed* Journalen veröffentlicht:

Chemnitz J, **Pieper D**, Grüttner C, Hauber J. 2009. *Phosphorylation of the HuR ligand APRIL by casein kinase 2 regulates CD83 expression*. European Journal of Immunology 39:267-279.

**Pieper D**, Schirmer S, Prechtel AT, Kehlenbach RH, Hauber J, Chemnitz J. 2011. *Functional Characterization of the HuR:CD83 mRNA Interaction*. PLoS One 6:e23290.

**Meiner Tante Cornelia**

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir diese Dissertation ermöglichen haben und ohne deren Mithilfe die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Joachim Hauber für sein Vertrauen und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung unter besten Arbeitsbedingungen durchführen zu dürfen. Vielen Dank für die vielen Chancen der Förderung und die tolle Unterstützung in jeglicher Hinsicht!

Ebenso möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Dobner bedanken, der sich freundlicher Weise als Erstgutachter dieser Arbeit aus dem Fachbereich Biologie zur Verfügung gestellt hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jan Chemnitz. Lieber Jan, auch wenn Du bei zu viel Dank und Lob gerne abwinkst: Herzlichen Dank! Ohne Deine Unterstützung, die vielen guten Ideen und Projekte, das immer offene Ohr und die exzellente Betreuung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Auch bei Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann vom ZMNH bedanke mich sehr für ihren Einsatz, ihre fachliche Unterstützung, die vielen guten Ratschläge und den langen Atem bei den zuweilen als schier ewig erscheinenden Mausearbeiten.

Genauso möchte ich mich den Tierpflegern des ZMNH, dem FACS-Team Arne Düsedau und Cordula Grüttner und vor allem bei den Tierpflegern des HPIs bedanken, im Besonderen bei Beate Miksche und Ulla Müller. Auch die vielen Mäuse, die ihre Beteiligung an dieser Arbeit mit dem Leben bezahlen mussten, seien an dieser Stelle erwähnt und bedacht.

Besonders danke ich der Abteilung 4 und der HIV-Gruppe des UKE für die wirklich schöne Zeit! Ich habe die interessanten Diskussionen, die ausgesprochene Hilfsbereitschaft und die so angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre immer sehr genossen. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Dirk und Marcel für die vielen geselligen (Mittags-)Runden und Helga für die guten Gespräche und ihren unermüdlichen Einsatz als gute Fee der Abteilung danken, aber nicht minder von Herzen allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für die letzten vier tollen Jahre, an die ich mich immer gerne erinnern werde! Vielen Dank! Dear former and current members of the department: Thank you so much for your great support and the familiar working atmosphere!

Zuletzt möchte ich meinen liebsten Freunden, meiner Familie und vor allem meinen Eltern und Philip für die immerwährende Unterstützung und das unendliche Grundvertrauen in mich von ganzem Herzen danken!

## Inhalt

Zusammenfassung .....	1
Summary.....	3
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Nukleozytoplasmatischer Transport .....	5
1.1.1 TAP-p15-abhängiger Transport von mRNA .....	7
1.1.2 CRM1-abhängiger Transport von mRNA .....	8
1.2 Dendritische Zellen .....	10
1.3 Glykoprotein CD83.....	12
1.4 CD83 mRNA-Transport.....	15
1.4.1 HuR.....	16
1.4.2 HuR-Ligand APRIL (ANP32B) .....	18
1.4.3 Proteinkinase CK2 .....	18
1.5 APRIL (ANP32B) und Mitglieder der ANP32-Familie .....	19
1.5.1 ANP32-Familie .....	20
1.5.2 APRIL (ANP32B).....	21
1.6 Gentechnik und Mäuse .....	22
1.6.1 Etablierung des gerichteten <i>gene targetings</i> in Mäusen .....	22
1.6.2 Rekombinasen Cre und Flp .....	25
1.6.3 Gewebsspezifische und induzierbare Kontrolle der Rekombinaseaktivität .....	26
1.6.4 „ <i>knockout-first</i> “ Modifikation .....	27
1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit .....	28
<b>2 Materialien .....</b>	<b>29</b>
2.1 Bakterienstämme .....	29
2.2 Eukaryotische Zelllinien .....	29
2.3 Primäre eukaryotische Zellen .....	30
2.4 Mausstämme .....	30
2.5 Medien.....	30
2.5.1 Medien für die Anzucht von Bakterien .....	30
2.5.2 Medien für Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	30
2.5.3 Einfriermedien .....	31
2.5.4 Medienzusätze .....	32
2.6 Oligonukleotide.....	32
2.6.1 PCR-Primer.....	32
2.6.2 Sonden und sonstige Oligonukleotide .....	34
2.6.3 siRNA für <i>knockdown</i> Experimente .....	34
2.6.4 Sonstige Nukleinsäuren .....	35
2.7 Radioaktivität.....	35

2.8	Expressionsplasmide.....	35
2.8.1	Parentale Expressionsplasmide.....	35
2.8.2	Zur Verfügung gestellte Expressionsplasmide.....	36
2.8.3	Neu generierte Expressionsplasmide .....	37
2.9	Enzyme .....	38
2.9.1	Restriktionsnukleasen/Puffer .....	38
2.9.2	Sonstige Enzyme .....	38
2.10	Zytokine.....	38
2.11	Antikörper.....	39
2.11.1	Allgemeine Antikörper .....	39
2.11.2	Primärantikörper für die Western Blot Analyse .....	39
2.11.3	Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse .....	39
2.11.4	Antikörper für die Immunfluoreszenz Analyse.....	40
2.11.5	Fluoreszenzmarkierte Antikörper zur FACS-Analyse.....	40
2.12	Reagenzsysteme .....	40
2.13	Chemikalien .....	41
2.14	Verbrauchsmaterialien .....	43
2.15	Lösungen und Puffer.....	44
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>47</b>
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	47
3.1.1	Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien zur Transformation.....	47
3.1.2	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> .....	47
3.1.3	Kultivierung von Bakterien zur Plasmidisolierung .....	48
3.1.4	DNA-Standardmethoden .....	48
3.1.5	Phenol-Chloroform Extraktion .....	49
3.1.6	<i>In vitro</i> Transkription zur Herstellung von radioaktiv markierter RNA .....	49
3.1.7	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien.....	50
3.1.8	Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen .....	50
3.1.9	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	51
3.1.10	Red®/ET® basierte Rekombination in <i>E.coli</i> .....	53
3.1.11	Koloniehybridisierung .....	56
3.2	Biochemische Methoden .....	58
3.2.1	Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine .....	58
3.2.2	Herstellung von Gesamtproteinextrakten .....	59
3.2.3	Deglykosylierung von Gesamtproteinextrakten.....	59
3.2.4	Immunpräzipitation von Flag-Fusionsproteinen aus Gesamtzelllysaten.....	59
3.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	60
3.2.6	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....	60
3.2.7	Western Blot (Immunoblot).....	61
3.2.8	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von Proteinen in Anwesenheit von Kinase-Inhibitoren... 61	
3.2.9	<i>In vivo</i> Phosphorylierung in Anwesenheit von CK2-Inhibitoren .....	62
3.2.10	Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen im <i>pulse chase</i> Experiment .....	62
3.2.11	RNA-Mobility Shift zur Bestimmung von RNA:Protein-Interaktion.....	63
3.3	Zellbiologische Arbeiten mit eukaryotischen Zellen .....	63
3.3.1	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	63

3.3.2	Kultivierung von Suspensionszellen .....	63
3.3.3	Kultivierung adhärenter Zelllinien.....	64
3.3.4	Isolierung und Kultivierung von PBMCs ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> ) .....	64
3.3.5	Anreicherung von Monozyten.....	64
3.3.6	Kultivierung von Dendritischen Zellen (DC) .....	65
3.3.7	Aktivierung von Jurkat T-Zellen.....	65
3.3.8	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen .....	65
3.3.9	Herstellung lentiviraler Partikel in 293T-Zellen .....	67
3.3.10	Transduktion adhärenter Zelllinien mit lentiviral verpackter shRNA.....	68
3.3.11	Zellfärbung für FACS Analyse .....	68
3.3.12	FACS-basierte Apoptose-Untersuchung.....	68
3.3.13	Heterokaryon Assay .....	68
3.3.14	Immunfluoreszenz-Markierung.....	69
3.4	Zellbiologische Arbeiten mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen).....	70
3.4.1	Murine embryonale Fibroblasten als <i>Feeder</i> -Zellen für die embryonale Stammzellkultur.....	70
3.4.2	Auftauen und Kultivierung von ES-Zellen .....	71
3.4.3	Elektroporation embryonaler Stammzellen.....	71
3.4.4	Selektion und Isolierung stabil transfizierter ES-Zellen.....	72
3.4.5	Einfrieren von ES-Zellen.....	72
3.4.6	Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten.....	72
3.4.7	Implantation der Blastozysten in pseudoträchtige Ammen zur Herstellung chimärer Mäuse .....	73
3.5	Zucht von Mäusen .....	73
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>74</b>
4.1	Teil I – Detaillierte Charakterisierung des Phosphoproteins APRIL und dessen Einfluss auf die Regulation der CD83 Expression <i>in vitro</i> .....	75
4.1.1	Die CK2 Untereinheit $\alpha'$ reguliert die CD83 Expression.....	77
4.1.2	Charakterisierung des Phosphoproteins APRIL .....	80
4.1.3	Einfluss von APRIL-spezifischer RNA-Interferenz (RNAi) auf die CD83 Expression....	93
4.2	Teil II – Generierung eines konditionellen APRIL <i>knockout</i> Maus Modells.....	99
4.2.1	Generierung des <i>targeting</i> Vektors (Rekombinations-Vektor).....	100
4.2.2	Gezielte Modifikation embryonaler Stammzellklone .....	106
4.2.3	Etablierung der APRIL <sup>Eucomm</sup> <i>knockout</i> Maus .....	110
4.2.4	Zucht der APRIL <sup>EUCOMM</sup> Nachkommen .....	116
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>134</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>136</b>
<b>8</b>	<b>Internetquellen .....</b>	<b>150</b>

## Zusammenfassung

Der Austausch von Molekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma ist ein lebenswichtiger Mechanismus eukaryotischer Zellen, der direkt die Regulation der Genexpression beeinflusst. Diese Regulation erfolgt dabei auf verschiedenen Ebenen, wie beispielsweise der Transkription, der Translation oder den posttranskriptionellen Prozessierungsmechanismen von mRNA. Der nukleozytoplasmatische Export von mRNAs wird hierbei der posttranskriptionellen Prozessierung von mRNA zugerechnet. Dabei galt lange Zeit das Dogma, dass zelluläre mRNAs über das Heterodimer TAP-p15 vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert werden. Inzwischen zeigte sich aber, dass bestimmte Gruppen induzierbarer zellulärer mRNAs unerwarteterweise über das Karyopherin CRM1 ins Zytoplasma translozieren. So wird beispielsweise der nukleozytoplasmatische Transport von Transkripten sogenannter *early response genes* CRM1-abhängig vermittelt. Doch auch mRNAs immunrelevanter Proteine wie das Transkript des Glykoproteins CD83 konnten unlängst als CRM1-abhängig identifiziert werden. Von CD83 wird vermutet, dass es bei der Aktivierung der zellulären T-Zellantwort eine wichtige Rolle spielt und unter anderem von reifen Dendritischen Zellen exprimiert wird. Weitere zelluläre Komponenten des CRM1-abhängigen CD83 mRNA-Transports wurden kürzlich identifiziert: Das RNA-Bindeprotein HuR, welches mit einem *cis*-aktiven *posttranscriptional regulatory element* (PRE) in der kodierenden Region CD83 mRNA interagiert, sowie das Phosphoprotein APRIL, welches als Adaptorprotein den HuR:CD83 mRNA Komplex mit dem CRM1-Rezeptor verknüpft.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte detaillierte Analyse dieser beiden Komponenten HuR und APRIL in der vorliegenden Arbeit lieferte neue Einblicke hinsichtlich ihrer Interaktion und Regulation im CRM1-abhängigen CD83 mRNA-Kernexport. So konnte bezüglich der Spezifität der Bindung von HuR an das *cis*-aktive PRE der CD83 mRNA gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine struktur- und nicht um eine sequenzspezifische Interaktion handelt. Des Weiteren machte die ausführliche Charakterisierung des Phosphoproteins APRIL deutlich, dass es sich bei diesem Protein um einen wichtigen Regulator der Genexpression von CD83 handelt. Neben der bereits bekannten Phosphatakzeptorstelle T244 von APRIL konnten mit S158 und S210 zwei weitere Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass nicht nur die Modifikation an T244, sondern auch an S210 für die nukleozytoplasmatische Translokation des Proteins eine wichtige Rolle spielt. Interessanterweise wird die posttranslationale Modifikation aller drei APRIL-Phosphatakzeptorstellen durch die Casein Kinase 2 (CK2) vermittelt, einer pleiotropen Kinase, die eine Vielzahl zellulärer Mechanismen reguliert. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, erfolgt die Regulation der CD83 Expression über die Untereinheit' der CK2. Des Weiteren konnte erstmalig eine direkte Korrelation zwischen der CD83 und APRIL Expression im komplexen

und lebensnahen Zellsystem primärer Dendritischer Zellen dargestellt werden. Zudem hat die erfolgreiche Konstruktion transgener Mäuse, die ein gefloxtes *APRIL*-Gen tragen, die Grundlage für zukünftige Studien im Tiermodell geschaffen. Diese transgene Mauslinie ermöglicht für weiterführende Arbeiten eine gewebsspezifische und/oder induzierbare Deletion von *APRIL*, so dass zukünftig weitere wichtige Erkenntnisse bezüglich der Funktion von *APRIL* für die Genexpression von *CD83*, aber auch für weitere *CRM1*-abhängige Transkripte im Gesamtorganismus erlangt werden können.

Die umfangreiche Analyse der zellulären Proteine HuR und *APRIL* im Rahmen dieser Arbeit hat neue Werkzeuge und Erklärungsansätze hinsichtlich des *CRM1*-abhängigen *CD83* mRNA-Exports geschaffen, so dass die *CRM1*-abhängige *CD83* mRNA-Exportmaschinerie als Modellmechanismus für den Transport zellulärer *CRM1*-abhängiger mRNAs betrachtet werden kann.

## Summary

The exchange of molecules between the nucleus and the cytoplasm is an essential mechanism in eukaryotic cells that affects the regulation of gene expression. This regulation occurs at various levels, such as transcription, translation or posttranscriptional processing of mRNA. Here, the nucleocytoplasmic export of mRNA is considered to be part of its posttranscriptional processing. The dogma that the vast majority of cellular mRNAs is exported from the nucleus to the cytoplasm by the heterodimer TAP- p15 has existed for a long time. However, in the last few years several subpopulations of cellular mRNAs have been identified that translocate from the nucleus to the cytoplasm in a CRM1-dependent manner. Until these findings, the karyopherin CRM1 was primarily known as an export receptor for proteins, ribosomal and small nuclear RNAs, and unspliced viral transcripts. Interestingly, CRM1-dependent mRNAs are generally transcribed from inducible genes, such as early response genes. Moreover, CRM1-dependent transcripts, such as the transcript encoding the glycoprotein CD83, were also detected in a subpopulation of immune relevant mRNAs in activated Jurkat T cells. CD83 is a surface molecule mainly expressed on fully matured dendritic cells and appears to play a role in T cell activation.

Recently, additional cellular components of the CRM1-dependent CD83 mRNA export machinery have been identified: the RNA-binding protein HuR, interacting with a *cis*-active posttranscriptional regulatory element (PRE) within the coding region of the CD83 mRNA, and the phosphoprotein APRIL, acting as an adaptor connecting the HuR:mRNA complex and CRM1. In the present thesis, novel insights into the function of HuR and APRIL during CRM1-dependent CD83 gene expression have been provided. Investigating the specificity between the RNA binding protein HuR and the *cis*-active PRE of the CD83 mRNA elucidated a structure-dependent, but not sequence-specific interaction within the HuR:CD83 mRNA complex. Furthermore, the functional characterization of the phosphoprotein APRIL revealed its functional importance for CD83 gene expression. Identification of two novel phosphate acceptor sites – S158 and S210 – demonstrated that not only the already known T244 phosphorylation site, but also S210 is relevant for nucleocytoplasmic shuttling of APRIL. Interestingly, all three phosphate acceptor sites are posttranslationally modified by the pleiotropic kinase CK2, which is known to regulate a multitude of cellular mechanisms. The present work furthermore demonstrated that the regulation of CD83 expression particularly depends on the  $\alpha'$  subunit of CK2. Moreover and for the first time, a direct correlation between CD83 and APRIL expression was demonstrated in primary dendritic cells. Finally, the successful construction of transgenic mice with targeted mutations of a floxed *APRIL*-gene established the basic technology for future studies. This transgenic strain facilitates inducible and/or tissue specific deletions of APRIL to

not only investigate its role in CD83 gene expression but also for further CRM1-dependent mRNAs in an animal mode.

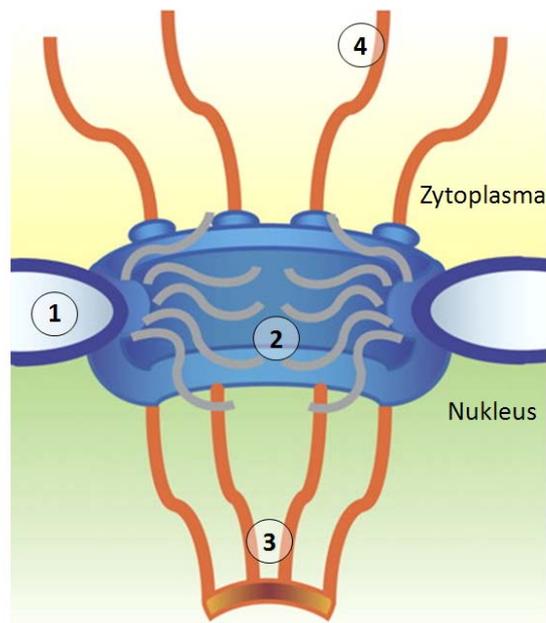
The detailed analysis of the cellular proteins HuR and APRIL in the regulation of the CRM1-dependent CD83 expression provides new insights into the nuclear export of CD83 mRNA. Furthermore, the results of this thesis suggest that CD83 mRNA export may serve as a model mechanism for the investigation of cellular CRM1-dependent mRNAs in general.

## 1 Einleitung

Eine fundamentale Eigenschaft eukaryotischer Zellen ist die nukleäre und zytoplasmatische Kompartimentierung der Genexpression. Der Großteil der genetischen Erbinformation liegt bei Eukaryoten im Zellkern vor, wo auch die Transkription erfolgt, während die Proteinbiosynthese im Zytoplasma stattfindet. Diese räumliche Trennung weist regulatorische Vorteile auf; gleichzeitig muss aber der Transport von Molekülen zwischen den einzelnen Kompartimenten gewährleistet sein. Kernständige Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Polymerasen, ribosomale Proteine oder Histone müssen nach ihrer Biosynthese in den Zellkern importiert werden, während für neu synthetisierte *transfer*- oder *messenger*-RNAs sowie assemblierte Ribosomen ein Export aus dem Kern ins Zytoplasma erforderlich ist.

### 1.1 Nukleozytoplasmatischer Transport

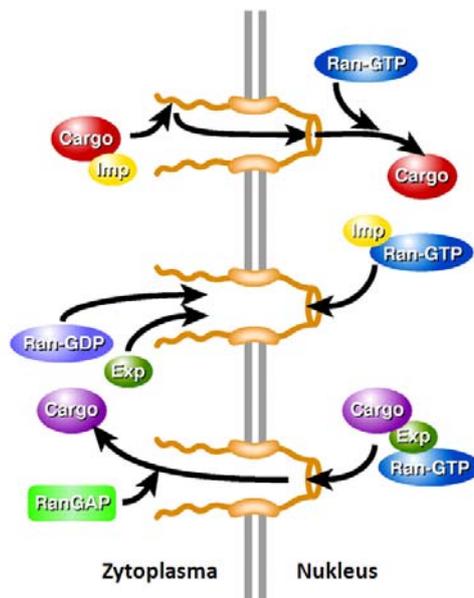
Der bidirektionale nukleozytoplasmatische Austausch von Molekülen findet über Kernporen statt. Dabei handelt es sich um große Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von 90-125 MDa, die sich vor allem aus Nukleoporinen (Nups) zusammensetzen (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes (verändert nach Terry and Wentz, 2007)**

Der Kernporenkomplex (*nuclear pore complex* bzw. NPC) ist in achtfach-Symmetrie rechtwinklig zur Kernmembran (1) angeordnet und kann in drei Bereiche unterteilt werden: die zentrale speichenförmige Kernstruktur (2,3) der nukleäre Korb (4) sowie die zytoplasmatischen Fibrillen (5) (siehe Übersichtsartikel: Suntharalingam and Wentz, 2003; Fahrenkrog and Aebi, 2003)

Kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 30-40 kDa und einem Durchmesser unter 9 nm können frei durch die Kernporen diffundieren. Bei größeren Molekülen erfolgt ein gerichteter Transport mittels löslicher Transport-Rezeptoren. Die meisten dieser Transport-Rezeptoren gehören der Familie der Karyopherine an und werden je nach Funktion auch als Importine, Exportine oder Transportine bezeichnet. Die Karyopherine interagieren während des nukleozytoplasmatischen Transportprozesses mit Phenylalanin- und Glycin-reichen Regionen der Nups (FG *repeats*) und binden zusätzlich die GTPase Ran, welche über einen Ran-Gradienten die Richtung des Transports kontrolliert (siehe Übersichtsartikel: Wentz, 2000). Die entsprechenden Kargos werden anhand spezifischer nukleärer Export- und Lokalisationssequenzen erkannt (*nuclear export signal* bzw. NES und *nuclear localization signal* bzw. NLS) und im trimeren Komplexen mit der GTPase Ran und dem jeweiligen Karyopherin transportiert (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Allgemeiner Mechanismus des Ran-abhängigen nukleozytoplasmatischen Transports (übernommen von Cullen, 2003b)**

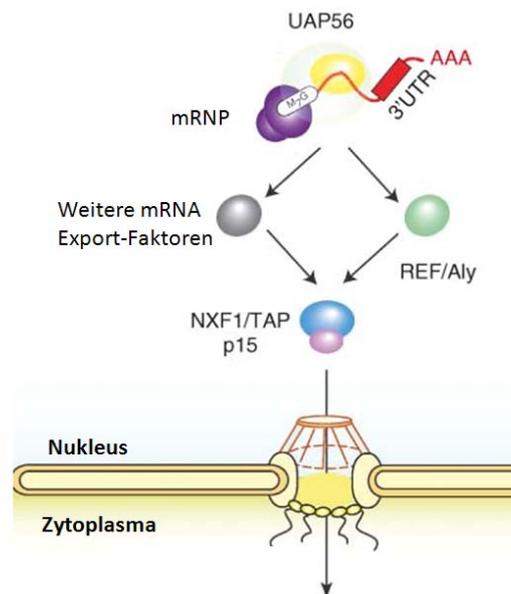
Vermittlung der Direktionalität des Transport mittels des Ran-Gradienten: im Zytoplasma liegt die GTPase Ran als RanGDP gebunden vor, während sie im Zellkern als RanGTP vorliegt. Im Zytoplasma vermittelt RanGAP die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP und somit den Zerfall des trimeren Export-Komplexes. Hingegen zerfällt im Kern durch die Interaktion von RanGTP mit Importin der Importin-Protein-Komplex und das zu importierende Protein wird frei. Das kernständige Protein RCC1 tauscht dabei RanGDP durch RanGTP aus.

Während es sich beim Kernimport-Signal NLS zumeist um ein- oder zweiteilige Sequenzen basischer Aminosäuren wie Lysin oder Arginin handelt, sind beim Export-Signal NES vor allem Leuzin-reiche Sequenzen vorhanden (siehe Übersichtsartikel: Görlich and Kutay, 1999; Fried and Kutay, 2003). Allerdings gibt es auch Transport-Rezeptoren, die nicht der Familie der Karyopherine angehören und Ran-unabhängig ihr Kargo transportieren, wie z.B. der mRNA-Transportfaktor TAP/NXF1 und sein Kofaktor p15/Nxt1 (siehe Übersichtsartikel: Reed and Hurt, 2002).

### 1.1.1 TAP-p15-abhängiger Transport von mRNA

Bevor neu transkribierte mRNA für die Translation ins Zytoplasma transportiert werden kann, muss sie sich einer Reihe von posttranskriptionellen Prozessierungsschritten wie dem 5'-capping, der Polyadenylierung und dem Prozess des Spleißens unterziehen. Der Export von mRNA gestaltet sich somit als besondere Herausforderung für die mRNA-Exportmaschinerie, da sie in der Lage sein muss, zwischen noch unreifer pre-mRNA und vollständig prozessierter mRNA zu unterscheiden.

Eine große Anzahl der zellulären, vollständig prozessierten mRNAs wird über den heterodimeren Komplex aus TAP/NFX1 und p15/Nxt1 aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert (TAP-p15) (siehe Übersichtsartikel: Reed and Hurt, 2002; Stutz and Izaurralde, 2003). TAP/NFX1 ist ein stark konserviertes Protein und gehört zur Familie der NFX-Proteine. Der TAP-p15-Rezeptor interagiert – wie auch die Karyopherine – mit den FG-repeats der Nukleoporine (Conti and Izaurralde, 2001), allerdings ist der Transportweg Ran-unabhängig (Clouse et al., 2001). Die Interaktion von TAP-p15 mit der als *messenger* Ribonukleoprotein (mRNP) Partikel verpackten mRNA wird zumeist von weiteren Bindungsfaktoren unterstützt und verstärkt, wie z.B. der RNA Helikase UAP56 oder dem mRNA-Exportfaktor REF/Aly (siehe Übersichtsartikel: Carmody and Wente, 2009). Letzterer ist allerdings nicht zwingend essentiell für den Transport (Gatfield and Izaurralde, 2002; Longman et al., 2003), so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine ganze Reihe weiterer Adaptoren mit redundanten Funktionen die Interaktion von TAP-p15 und den zellulären mRNPs vermitteln können (siehe Übersichtsartikel: Stutz and Izaurralde, 2003).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des TAP-p15 abhängigen mRNA-Transports (verändert nach Siddiqui and Borden, 2011)**

Die als mRNP verpackte mRNA wird über UAP56 und weitere Exportfaktoren wie Ref/Aly zum Heterodimer TAP-p15 rekrutiert und Ran-unabhängig über die FG-repeats der Nukleoporine ins Zytoplasma transportiert.

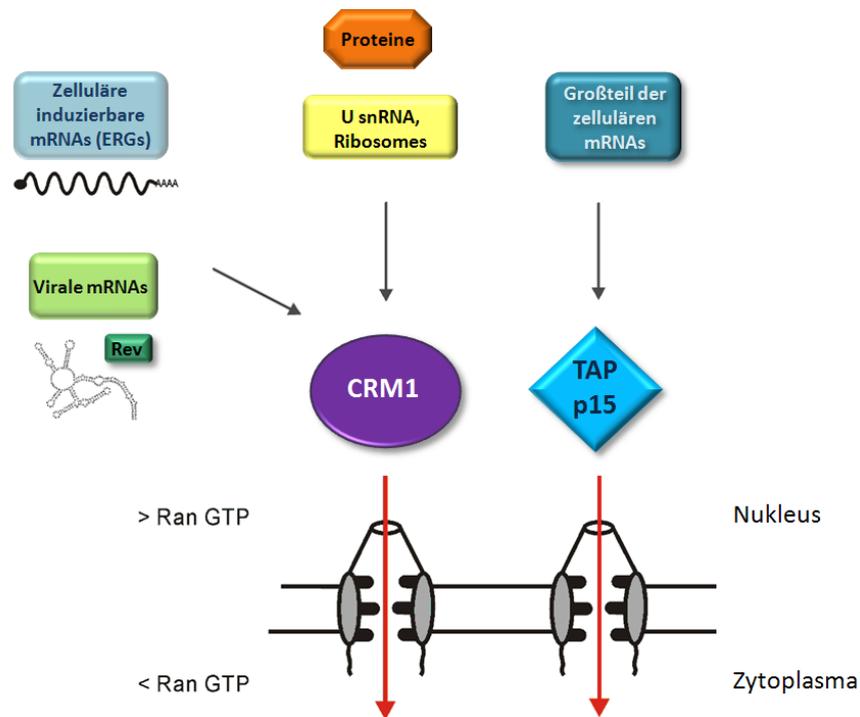
Neben der Fähigkeit, vollständig prozessierte mRNA von pre-mRNA zu unterscheiden, muss eine funktionelle mRNA-Exportmaschinerie zudem in der Lage sein, den Export der mRNAs der jeweiligen Situation der Zelle anzupassen und spezifisch zu regulieren, wie z.B. in Stresssituationen. So wird beispielsweise in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* unter Hitzeschock der Großteil der zellulären mRNAs aufgrund von Phosphorylierungen der mRNA-Exportfaktoren im Zellkern zurückgehalten. Das Transkript des Hitzeschockproteins Hsp wird hingegen in diesem Augenblick mittels Adaptoren, die normalerweise beim mRNA-Export keine Rolle spielen, über den TAP-p15 Transportweg ins Zytoplasma transportiert und kann somit unabhängig von den gängigen, aufgrund des Hitzeschocks aber phosphorylierten mRNA-Exportfaktoren reguliert werden (Carmody et al., 2010). Eine weitere Möglichkeit in der Feinregulation des mRNA-Exports ist die Variation hinsichtlich der Transportwege. Wie bereits beschrieben erfolgt der nukleozytoplasmatische Transport der meisten zellulären mRNAs TAP-p15-abhängig. Es zeigte sich aber in den letzten Jahren, dass eine Reihe von bestimmten zellulären mRNAs durch einen anderweitigen Kernexportrezeptor, dem CRM1 Protein, ins Zytoplasma transportiert werden kann.

### 1.1.2 CRM1-abhängiger Transport von mRNA

Das zur Familie der Karyopherine gehörende Exportin CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) bindet wie alle Karyopherine sein Kargo in Anwesenheit der GTPase Ran und ist vor allem als der Haupt-Exportrezeptor von Proteinen bekannt. Zudem fungiert es als Rezeptor für den Export von ribosomaler RNA und *small nuclear RNA* (snRNA). Aber auch ungespleißte retrovirale mRNAs des *human immunodeficiency virus type 1* (HIV-1) werden CRM1-abhängig aus dem Zellkern exportiert. Da CRM1 RNA nicht direkt binden kann, sind für den RNA-Export Proteine notwendig, die zwischen der RNA und CRM1 als Adaptoren fungieren. Leuzin-reiche Sequenzen der Adaptorproteine dienen als NES (*nuclear export signal*) und werden von CRM1 erkannt (Fornerod et al., 1997; Kobe and Kajava, 2001). So interagiert zum Beispiel das RNA-Bindeprotein Rev von HIV-1 über Leuzin-reiche Sequenzen mit CRM1 und vermittelt somit den Kernexport ungespleißter retroviraler mRNA (siehe Übersichtsartikel: Hutten and Kehlenbach, 2007).

Im Jahr 2000 konnten von Brennan und seinen Mitarbeitern Rev-ähnliche Leuzin-reiche Sequenzen in den beiden zellulären Proteinen pp32 (Anp32A) und APRIL (Anp32B) identifiziert werden, mittels welcher diese *shuttle* Proteine mit CRM1 interagieren. Diese Faktoren gehören zur Familie der Leuzin-reichen nukleären Phosphoproteine und werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit in einem eigenen Kapitel detailliert beschrieben (siehe 1.5). In der Studie von Brennan und Mitarbeitern wurde die erste zelluläre mRNA, die CRM1-abhängig aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird, identifiziert: das Transkript des Onkogens c-fos (Brennan et al., 2000). Es handelte sich dabei um ein sogenanntes *early response gene* (ERG). Die Transkripte der ERGs enthalten zumeist AU-

reiche Elemente (*Adenosine-Uridine-rich elements*, AREs), welche als Bindestelle für verschiedene Proteine dienen und eine posttranskriptionelle Regulation der Transkripte ermöglichen. Das RNA *shuttle* Protein HuR bindet diese AREs und stabilisiert auf diese Weise die kurzlebigen mRNAs. HuR ist ein evolutionär hochkonserviertes Protein, gehört zur Familie der Hu-Proteine und wird aufgrund seiner Bedeutung für diese Arbeit in einem späteren Kapitel genauer referiert (siehe 1.4). In der Studie von Brennan und Mitarbeitern scheint die Interaktion der HuR-Liganden pp32 und APRIL mit CRM1 tatsächlich den Export des HuR:*c-fos* mRNA Komplexes unter Verwendung des Kernexportrezeptors CRM1 zu ermöglichen. In den darauf folgenden Jahren konnte für eine Reihe weiterer Transkripte von *early response genes* ein CRM1-abhängiger Transportweg beschrieben werden, wie beispielsweise für die mRNAs von *COX-2*, *interferon- $\alpha$ 1*, *VEGF*, *iNOS* und *KOR* (Jang et al., 2003; Kimura et al., 2004; Cherradi et al., 2006; Jang et al., 2006; Tsai et al., 2010). Die Interaktion von HuR mit den AREs dieser mRNAs scheint dabei für den CRM1-abhängigen Transport aber nicht zwingend erforderlich zu sein (Kimura et al., 2004). Allen Transkripten gemeinsam ist aber die Tatsache, dass es sich um induzierbare mRNAs handelt, die unter besonderen Umständen wie bei Stresssituationen der Zelle transkribiert und folglich spezifisch reguliert werden müssen (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4: Überblick der nukleozytoplasmatischen Exportwege**

CRM1 vermittelt vor allem den nukleozytoplasmatischen Transport von Proteinen, snRNAs und Ribosomen sowie ungespleißter viraler mRNA. Während die Mehrzahl der zellulären mRNAs über den TAP-p15 Rezeptor ins Zytoplasma transportiert wird, scheint eine Reihe an induzierbaren mRNAs, hauptsächlich Transkripte von ERGs, CRM1-abhängig in ins Zytoplasma zu gelangen.

Konstitutiv transkribierte zelluläre mRNA, wie die Transkripte sogenannter *housekeeping* Gene, konnte bisher nicht dem CRM1 Transportweg zugeordnet werden (Herold et al., 2003). Unter diesem Aspekt analysierten Schütz und Mitarbeiter 2006 in einer systematischen Studie zur Detektion CRM1-abhängiger Transkripte nicht nur die mRNAs in HeLa- und CL-4-Zellen, sondern auch in aktivierten Jurkat T-Zellen (Schütz et al., 2006). Tatsächlich wurden ausschließlich in Letzteren Transkripte identifiziert, die CRM1-abhängig exprimiert werden. Zu diesen gehörte unter anderem auch das Transkript von *CD83*. Diese mRNA kodiert für das CD83-Glykoprotein, welches unter 1.3 detailliert beschrieben wird und sich vor allem auf reifen Dendritischen Zellen findet (Zhou et al., 1992).

### 1.2 Dendritische Zellen

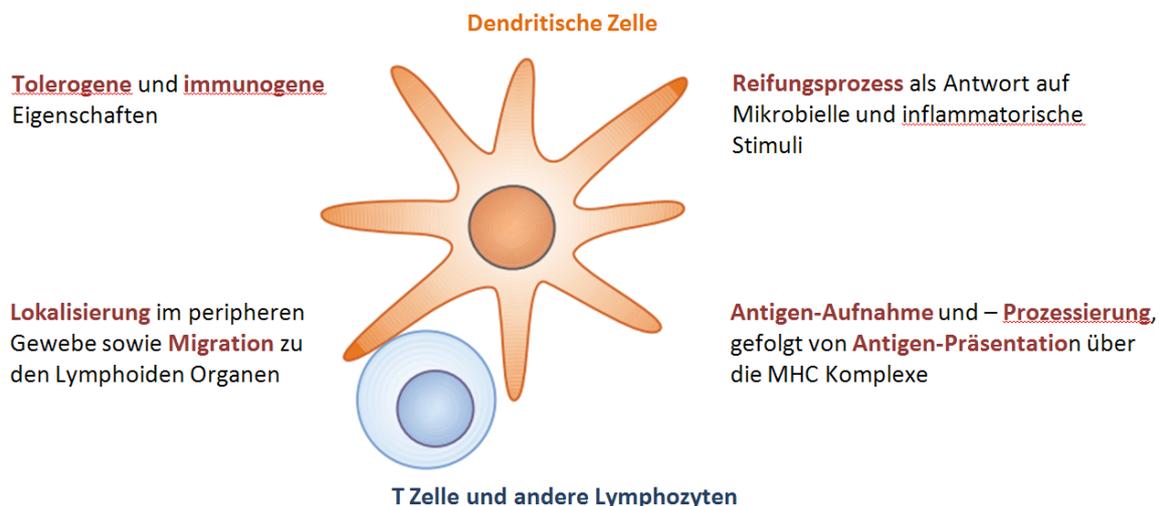
Die Interaktion von naiven Antigen-spezifischen T-Zellen mit professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (APC) ist ein wesentlicher Bestandteil der effizienten und abwehrenden zellulären Immunantwort. Dendritische Zellen (*dendritic cells* bzw. DC) sind aufgrund ihrer einzigartigen Eigenschaften wie ihren migratorischen Fähigkeiten, der Ausbildung Ko-stimulierender Oberflächenrezeptoren und der Befähigung, naive T-Lymphozyten zu aktivieren, die potentesten APCs des Immunsystems und werden gerne als Adjuvantien der Natur bezeichnet (lat. *adjuvans* – helfend, unterstützend) (Banchereau and Steinman, 1998; Banchereau et al., 2000). Sie spielen eine zentrale Rolle in zwei wichtigen und gleichzeitig gegensätzlichen Aufgabenbereichen des Immunsystems: Der Induzierung der zellulären Immunantwort („immunogene“ Eigenschaft) sowie der Vermittlung immunologischer Toleranz („tolerogene“ Eigenschaft).

Unreife DC (*immature* DC bzw. iDC) finden sich in peripheren Geweben, die ständig mit der Außenwelt und somit mit potentiellen Erregern in Berührung stehen wie beispielsweise der Haut, dem Respirations- und dem Gastrointestinaltrakt. Zudem sind iDC in den Interstitien aller Organe (mit Ausnahme des Gehirns) vorhanden. In ihrer Funktion als Wächter des Immunsystems suchen sie ihre Umgebung nach Fremdkörpern und Mikroorganismen ab. Über Phagozytose werden extrazellulären Bestandteile (Antigene) aufgenommen, prozessiert und anschließend als MHC I oder MHC II Peptidkomplex auf ihrer Oberfläche präsentiert – körpereigene und harmlose Antigene genauso wie pathogene.

Im *steady state*, unter Abwesenheit inflammatorischer Signale, vermittelt die Interaktion von unreifen DC mit T-Zellen die Apoptose von autoreaktiven T-Zellen, Anergie oder auch die Ausdifferenzierung regulatorischer T-Zellen ( $T_{regs}$ ) (Hawiger et al., 2001; Jonuleit et al., 2001). Dieser Prozess wird auch als periphere Toleranz bezeichnet (*peripheral tolerance*). Diese tolerogene Funktion der DC steht im direkten Zusammenhang zu den immunogenen Eigenschaften: über die iDC-

vermittelte Prozessierung und Präsentation körpereigener und/oder harmloser Antigene im *steady state* wird T-Zelltoleranz vermittelt und so die Gefahr von Autoimmunreaktionen oder die Ausbildung von Allergien reduziert (Steinman, 2007).

Für die immunogenen Eigenschaften der DC und somit die effiziente Stimulation naiver Helferzellen und zytotoxischer T-Zellen zur Aktivierung der zellulären Immunantwort ist der Reifungsprozess Dendritischer Zellen sowie die Ausbildung kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80 oder CD86 notwendig. Unreife DC erkennen über spezifische *pattern recognition receptors* PRR, zu denen die *toll like receptors* TLR gehören, pathogene Strukturen. Solch mikrobielle oder virale Stimulation bzw. von PRR ausgelöste inflammatorische Reize lösen den Reifungsprozess der DC aus. Dieser führt zu einer Veränderung der DC-Morphologie und zu einer Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle sowie der immunogenen, mit Antigen-beladenen MHC II Komplexe. Zudem migrieren die reifenden DC vom peripheren Gewebe zu den sekundären lymphoiden Organen. Dort interagieren sie mit naiven T-Zellen und sekretieren Chemokine und Zytokine, was zur Ausdifferenzierung der T-Helferzellen führt (siehe Übersichtsartikel: Banchereau et al., 2000). Auch das Glykoprotein CD83 wird im Zuge des Reifungsprozesses verstärkt auf Dendritischen Zellen exprimiert und wird häufig als Marker für reife, aktivierte DC verwendet. Die Bedeutung von CD83 in Hinblick auf den Reifungsprozess und die immunogenen Eigenschaften Dendritischer Zellen ist allerdings noch nicht hinreichend geklärt (siehe Übersichtsartikel: Prechtel and Steinkasserer, 2007; Prazma and Tedder, 2008).



**Abbildung 5: Funktionen Dendritischer Zellen im Überblick (verändert nach Steinman and Banchereau, 2007)**

Mit ihrer zentralen Funktion bei der Regulation der Immunantwort spielen DC auch unter medizinischen Aspekten in der Immuntherapie eine wichtige Rolle. So können z.B. die immunogenen Eigenschaften der DC in experimentellen Therapieansätzen genutzt werden, um DC-vermittelte

Immunantworten gegen Tumorantigene zu generieren (Nestle et al., 2001). Ein Ansatz ist dabei die *ex vivo* Generierung reifer DC, welche mit tumorspezifischen Antigenen beladen werden, um anschließend starke T-Zellantworten sowie die angeborene Anti-Tumor-Immunität natürlicher Killerzellen zu induzieren (Fernandez et al., 1999; Lucas et al., 2007). Dabei muss zum Einen gewährleistet sein, dass die *ex vivo* generierten DC zu den sekundären lymphoiden Organen migrieren und nicht an der Injektionsstelle verbleiben. Zum anderen muss sichergestellt werden, dass die *ex vivo* generierten DC vollauf leistungsfähig und immunogen sind, und möglichst keine tolerogenen Eigenschaften besitzen, um eine bestmögliche Aktivierung naiver T-Helfer und T-Killerzellen zu erreichen (siehe Übersichtsartikel: Palucka et al., 2011). Kritische Aspekte wie diese zeigen, dass noch vielfältige Aspekte der DC-Biologie hinsichtlich der immunogenen und tolerogenen Eigenschaften aufgeklärt werden müssen, bevor DC-vermittelte Immuntherapien auf breiter Basis in der Klinik einsetzbar sind.

Auch die tolerogenen Eigenschaften Dendritischer Zellen versucht man sich in der klinischen Immuntherapie zunutze zu machen. Diese werden unter anderem gezielt eingesetzt, um allergenspezifische regulatorische T-Zellen zu bilden, welche – zumindest im Mausmodell – anschließend in der Lage sind, Allergien zu behandeln (siehe Übersichtsartikel: Steinman and Banchereau, 2007). Auch für die Transplantationsmedizin stellen tolerogene DC eine attraktive Möglichkeit dar, eine durch alloreaktive T-Zellen vermittelte Transplantatabstoßung zu unterdrücken. Interessanterweise weist das Glykoprotein CD83, welches als membranständiges Rezeptorprotein von reifen, immunogenen DC exprimiert wird, in seiner löslichen Form immunsuppressorische Eigenschaften auf, welche zumindest im Tiermodell Transplantat-Toleranz vermitteln (Ge et al., 2010; Lan et al., 2010). Die unterschiedlichen Eigenschaften des Glykoproteins, die bisher identifizierten Funktionen von CD83 sowie die für mRNAs ungewöhnliche Route des CRM1-abhängigen Kernexports des CD83 Transkriptes sollen in den folgenden zwei Kapiteln genauer beleuchtet werden.

### **1.3 Glykoprotein CD83**

Das CD83 Molekül, welches zum ersten Mal 1992 von Zhou und Mitarbeitern als HB15 beschrieben wurde und seit 1994 als CD83 bezeichnet wird, ist ein Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 45 kDa und wird der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet (Zhou et al., 1992; Engel and Tedder, 1994; Zhou and Tedder, 1995). Das transmembrane Protein besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranalen und einer zytoplasmatischen Domäne. Es handelt sich um ein evolutionär konserviertes Molekül, dessen Homologe nicht nur bei Säugetieren, sondern auch bei Vögeln sowie Knochen- und Knorpelfischen identifiziert werden konnten (Ohta et al., 2004; Hansell et al., 2007; Donate et al., 2007). Vergleicht man die CD83-Homologe von Mensch und Maus, findet sich eine

Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von etwa 63 % (Kozlow et al., 1993; Twist et al., 1998). Humanes CD83 wird als membranständiges Oberflächenmolekül (mCD83) von Immunzellen exprimiert, liegt aber auch als lösliches CD83 (*soluble* sCD83) im Serum vor. Alternatives Spleißen oder auch Proteolyse könnten die Ursache für die zwei verschiedenen Formen von CD83 sein (Hock et al., 2001; Dudziak et al., 2005).

Die von aktivierten DC und B-Lymphozyten produzierte lösliche Form sCD83 wurde 2001 von Hock und Mitarbeitern beschrieben und kann in geringen Mengen in den Seren gesunder Spender nachgewiesen werden (Hock et al., 2001). Hingegen weisen Patienten, die an Chronischer Lymphatischer Leukämie (CLL), dem Mantelzell-Lymphom oder auch Rheumatischer Arthritis leiden, eine deutlich erhöhte Menge an löslichem CD83 im Blut auf (Hock et al., 2004; Hock et al., 2006). Interessanterweise scheint sCD83 immunsuppressive Eigenschaften zu besitzen. So führte die Behandlung von DC mit der rekombinant hergestellten extrazellulären Domäne von CD83 (hCD83ext) zu einer Inhibition der DC-vermittelten allogenen T-Zellproliferation in *mixed lymphocyte reactions* (MLR) und einer verminderten DC-Reifung (Lechmann et al., 2001). Die immunsuppressiven Eigenschaften von sCD83 wurden mittels eines löslichen CD83 Ig-Fusionsproteins in einer weiteren, unabhängigen Studie bestätigt (Scholler et al., 2002). Gleichzeitig konnten Scholler und Mitarbeiter im Tiermodell zeigen, dass lösliches CD83 zu einem gesteigertem Wachstum von immunogenen P815 Tumorzellen führt. Dies bestätigte die Hypothese, dass sCD83 die DC-abhängige T-Zellaktivierung supprimiert, was wiederum zu einer verminderten Population zytotoxischer T-Zellen und somit zu einer verminderten anti-Tumor Immunantwort führt. Zudem hat sCD83 in Mäusen eine abschwächende Wirkung auf die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), welche als Modell für das frühe entzündliche Stadium der humanen Multiplen Sklerose dient. Es konnte durch die Verabreichung von rekombinant gewonnenen sCD83 sogar eine Art Immunität gegen diese Krankheit erreicht werden (Zinser et al., 2004). Allerdings liegen auch Studienergebnisse vor, in welchen keine immunsuppressorische Eigenschaften von sCD83 beobachtet werden konnten (Pashine et al., 2008). Dennoch mehren sich bis heute die Hinweise darauf, dass lösliches CD83 einen supprimierenden Effekt auf die zelluläre Immunantwort ausübt. Die im vorherigen Kapitel bereits erwähnten Transplantations-Studien, in welchen sCD83 im Tiermodell Toleranz gegenüber allogenen Transplantaten vermittelt, sind die neuesten Hinweise darauf, dass lösliches CD83 tatsächlich die zelluläre Immunantwort supprimieren kann (Ge et al., 2010; Lan et al., 2010).

Die genaue Funktion von membranständigem CD83 konnte hingegen bis dato noch nicht eindeutig geklärt werden. Ebenso wurde ein möglicher Ligand noch nicht eindeutig identifiziert, auch wenn es verschiedene Hinweise für eine Bindung von CD83 an murine B2-Zellen, humane DC, Monozyten und auch CD8 T-Zellen gibt (Cramer et al., 2000; Lechmann et al., 2001; Scholler et al., 2001; Hirano et al.,

2006). Membranständiges CD83 wird hauptsächlich auf reifen immunkompetenten DC exprimiert, findet sich aber auch auf aktivierten B- und T-Lymphozyten sowie polymorphkernigen Neutrophilen (Zhou et al., 1992; Kozlow et al., 1993; Cramer et al., 2000; McKinsey et al., 2000). Schon früh wies eine gemeinsame Steigerung der Genexpression von CD83 und den kostimulatorischen DC-Molekülen CD80 und CD86 bei aktivierten DC auf eine Funktion von mCD83 bei der Aktivierung der Immunantwort hin (Zhou and Tedder, 1996). Im Jahre 2000 bestätigte sich diese Vermutung zunächst, als humane Dendritische Zellen untersucht wurden, deren CD83 Expression aufgrund von spezifischen Inhibitoren, welche den Kernexport der CD83 mRNA verhinderten, vermindert war. Die verringerte CD83 Expression hatte eine reduzierte Kapazität der DC zur T-Zellstimulation zur Folge (Kruse et al., 2000a), so dass sich die Hypothese, dass CD83 eine wichtige Funktion bei der T-Zellstimulation ausüben muss, weiter verfestigte (Lechmann et al., 2002a; Lechmann et al., 2002b). Hinweise für eine Bestätigung dieser Theorie wurden darin gefunden, dass bestimmte virale Infektionen zur Inhibition der CD83 Expression und zeitgleich zu einer Verminderung der T-Zell-stimulatorischen Kapazitäten der DC führen können (Kruse et al., 2000b; Senechal et al., 2004).

Bei den im Jahre 2002 von Fujimoto und Mitarbeitern generierten CD83 defizienten Mäusen konnten allerdings hinsichtlich der DC-vermittelten allogenen T-Zellproliferation überraschenderweise keine Unterschiede zu Wildtyp-Tieren festgestellt werden (Fujimoto et al., 2002). Hingegen wiesen die CD83<sup>-/-</sup> Mäuse als Phänotyp eine starke Reduktion peripherer naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf, was auf eine regulatorische Funktion von CD83 bei der CD4<sup>+</sup> T-Zellentwicklung im Thymus zumindest in Mäusen schließen ließ. Diese regulatorischen Eigenschaften von CD83 bei der Entwicklung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten in einem weiteren Mausmodell bestätigt werden (Garcia-Martinez et al., 2004). Weitere regulatorische Eigenschaften von CD83 auf murinen Immunzellen wurden in Hinblick auf murine B-Zellen beschrieben. So resultierte z.B. eine Überexpression von CD83 auf aktivierten B-Zellen in einer starken Reduktion der Sekretion antigenspezifischer Immunglobuline, während hingegen die IL-10 Sekretion diametral gesteigert wurde (Breloer et al., 2007). Somit scheint durch die Expression von CD83 auch die Entwicklung und Funktion von B-Zellen beeinflusst zu werden (Luthje et al., 2008).

Die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der Funktion von membranständigem CD83 blieben folglich kontrovers. Auf der einen Seite häuften sich die Ergebnisse, dass mCD83 auf reifen DC für ihre T-Zell-stimulatorischen Fähigkeiten eine wichtige Funktion hat: Verschiedene RNA-Interferenz Studien zeigten, dass die direkte Inhibition der CD83 Expression bei humanen DC zu einer Schwächung der DC-vermittelten T-Zellaktivierung führt (Prechtel et al., 2007; Aerts-Toegaert et al., 2007). Zudem konnte von Aerts-Toegaert und Mitarbeitern gezeigt werden, dass die Überexpression von CD83 in humanen DC zu einer gesteigerten CD8 T-Zellantwort führt. Andererseits wurde kürzlich

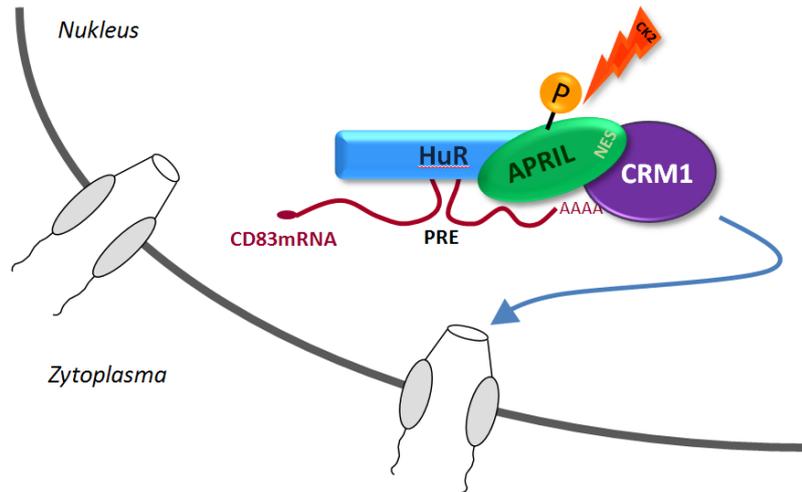
erneut publiziert, dass das CD83 Oberflächenmolekül keinen signifikanten Einfluss auf die stimulatorischen Fähigkeiten muriner DC besitzt (Kretschmer et al., 2008).

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse dieser kontroversen Studien dennoch darauf hin, dass humanes membranständiges CD83 für die Funktionalität von DC und deren immunogener Eigenschaften zur Aktivierung naiver T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Im murinen Organismus hingegen scheint mCD83 weniger bei der Stimulation von T-Zellen, als vielmehr bei der Entwicklung von B- und T-Lymphozyten eine wichtige regulatorische Funktion zu übernehmen. So scheint es sich bei CD83 um ein faszinierendes Oberflächenmolekül mit multiplen Eigenschaften zu handeln, welchem sowohl für die Entwicklung von Lymphozyten, als auch für die Aktivierung von T-Zellantworten eine regulatorische Funktion zugeschrieben werden kann. (siehe Übersichtsartikel: Prechtel and Steinkasserer, 2007; Breloer and Fleischer, 2008; Prazma and Tedder, 2008).

In Hinblick auf die unterschiedlichen Studienergebnisse hinsichtlich der Funktion von CD83 ist es deshalb auch von besonderem Interesse, die CD83 Expression auf molekularer Ebene zu analysieren. Das Augenmerk dieser Arbeit liegt auf dem für mRNAs ungewöhnlichen CRM1-abhängigen nukleozytoplasmatischen Transport des CD83 Transkriptes, dessen bisheriger Kenntnisstand im folgenden Kapitel detailliert beschrieben wird.

### **1.4 CD83 mRNA-Transport**

Wie bereits unter 1.1.2 erwähnt, gehört das Transkript von CD83 zu einer Reihe von mRNAs, die in aktivierten Jurkat T-Zellen über den für mRNAs ungewöhnlichen CRM1 Weg aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert werden (Schütz et al., 2006). Da das Karyopherin CRM1 nicht direkt, sondern nur über Adaptorproteine mit RNA interagieren kann, konnte davon ausgegangen werden, dass eine Reihe weiterer Komponenten am nukleozytoplasmatische Transport der CD83 mRNA mitwirken. Tatsächlich wurden in den letzten Jahren eine Reihe an Faktoren, die am Export der CD83 mRNA beteiligt sind, identifiziert (siehe Abbildung 6): So bildet das CD83 Transkript mit dem RNA-Bindeprotein HuR einen Ribonukleoprotein-Komplex (Prechtel et al., 2006). Die Interaktion dieses Komplexes mit dem Exportrezeptor CRM1 wird über den HuR-Liganden APRIL (ANP32B) vermittelt, welcher als Adaptorprotein fungiert (Fries et al., 2007). APRIL ist ein Phosphorprotein und muss für seine Eigenschaft als *shuttle* Protein von der Casein Kinase II (CK2) phosphoryliert werden (Chemnitz et al., 2009). Im folgenden Abschnitt werden diese Komponenten des CD83 mRNA-Exportkomplexes genauer beleuchtet.



**Abbildung 6: Schematischer Überblick des CD83 mRNA-Exportkomplexes**

HuR bindet über das posttranskriptionelle regulatorische Element (PRE) das CD83 Transkript. Der HuR:CD83 mRNA Komplex interagiert über den HuR-Liganden APRIL mit CRM1. APRIL wird von CK2 an T244 phosphoryliert und der Ribonukleoprotein-Komplex CRM1-abhängig in das Zytoplasma transportiert.

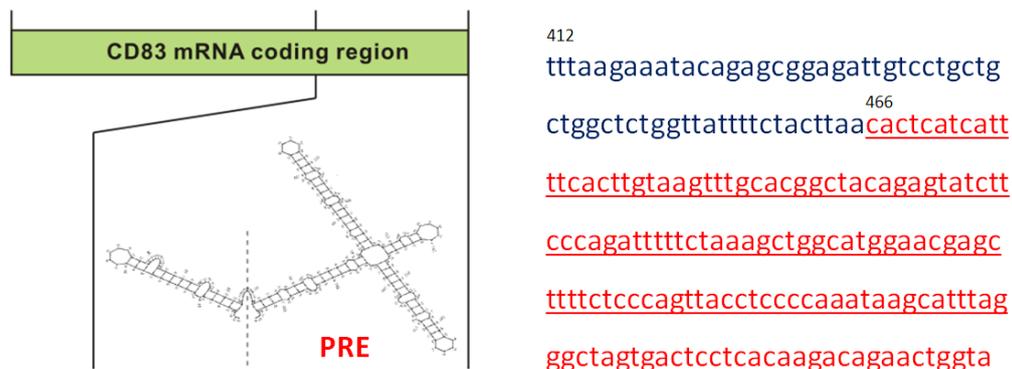
### 1.4.1 HuR

Die Interaktion der CD83 mRNA mit dem bereits unter 1.1.2 erwähnten RNA-Bindeprotein HuR wurde 2006 von Prectel und Mitarbeitern beschrieben. In einer detaillierten Analyse der CD83 mRNA konnte ein *cis*-aktives, posttranskriptionelles regulatorisches Element (*posttranscriptional regulatory element* bzw. PRE) in der kodierenden Region des Transkriptes identifiziert werden, welches spezifisch mit HuR interagiert. Das humane HuR Protein wird ubiquitär exprimiert und ist mit den ELAV Proteinen (*embryonic lethal abnormal vision*) von *Drosophila* verwandt (King et al., 1994; Ma et al., 1996). HuR beinhaltet drei konservierte RNA-Bindemotive RRM 1-3 (*RNA recognition motifs*), sowie eine nukleozytoplasmatische *shuttle* Domäne HNS, die die nukleozytoplasmatische Translokation des Proteins beeinflusst (*HuR nucleocytoplasmic shuttling domain* HNS) (siehe Übersichtsartikel: Brennan and Steitz, 2001). So wird der Kernimport von HuR über die Karyopherine Transportin-1 oder -2 reguliert (Rebane et al., 2004). Der Export wird hingegen von den bereits erwähnten HuR-Liganden pp32 (ANP32A) und APRIL (ANP32B) vermittelt, die über die HNS mit HuR interagieren (Brennan et al., 2000).

In seiner Eigenschaft als RNA-Bindeprotein ist HuR an einer Reihe posttranskriptioneller Prozesse beteiligt und beeinflusst die Stabilität, den Transport oder auch die Translation spezifischer mRNA Populationen (Keene, 1999; Brennan and Steitz, 2001). Vor allem die Stabilität der kurzlebigen mRNAs sogenannter *early response genes* (ERGs) wird durch die Bindung mit HuR beeinflusst. ERG-Transkripte kodieren für funktionell wichtige Proteine wie Proto-Onkogene, Transkriptionsfaktoren oder Zytokine und sind im Vergleich zu den konstitutiv exprimierten Transkripten der sogenannten *housekeeping genes* sehr instabil und kurzlebig. Die ERG mRNAs weisen zumeist im 3'UTR *cis*-aktive

Adenosin-Uracil reiche Sequenzen auf (AREs), welche die Deadenylierung wie auch den Abbau dieser mRNAs fördern (Shaw and Kamen, 1987; Chen and Shyu, 1995). Unterschiedliche Proteine interagieren mit den ARE-Sequenzen und beeinflussten somit die Stabilität dieser mRNAs. So wird beispielsweise durch die Interaktion der AREs mit hnRNP D (AUF1) der Abbau von ERG mRNAs gesteigert, während hingegen die Bindung der AREs mit HuR die Transkripte stabilisiert (DeMaria and Brewer, 1996; Fan and Steitz, 1998b; Raineri et al., 2004). Da die ARE-haltigen mRNAs häufig für Proteine kodieren, die bei der Karzinogenese eine Rolle spielen, wird teilweise auch HuR eine tumorogene Rolle zugeschrieben (Abdelmohsen and Gorospe, 2010).

Wie bereits erwähnt, werden einige der ERG mRNAs über die für mRNAs ungewöhnliche Route des CRM1 Wegs ins Zytoplasma transportiert. Das HuR Protein ist häufig, wenn auch nicht zwingend, an diesem CRM1-abhängigen Kernexport der induzierbaren mRNAs beteiligt, so auch beim nukleozytoplasmatischen Export der CD83 mRNA (Jang et al., 2003; Prechtel et al., 2006; Cherradi et al., 2006). Im Fall des CRM1-abhängigen Transports der CD83 mRNA variiert die Bindung von HuR an dieses Transkript vom gängigen Schema der HuR-Interaktion mit ERG mRNAs. So bindet HuR die CD83 mRNA nicht im Bereich des 3'UTRs, sondern interagiert über ein *cis*-aktives sogenanntes posttranskriptionelles regulatorisches Element (PRE) in der kodierenden Region der mRNA. Dieses bildet vermutlich ein strukturiertes RNA Element in Form einer dreigliedrigen Stamm-Schleifen-Struktur (*stem-loop* bzw. *SL*) aus (siehe Abbildung 7), über welches die Bindung zu HuR vermittelt wird (Prechtel et al., 2006).



**Abbildung 7: Posttranskriptionelles regulatorisches Element (PRE) der CD83 mRNA (verändert nach Prechtel et al., 2006)**

Die CD83 mRNA interagiert über ein *cis*-aktives Element in der kodierenden Region der CD83 mRNA mit HuR. Es handelt sich dabei um ein strukturiertes posttranskriptionelles regulatorisches Element (PRE), welches vermutlich als *stem-loop* 2 (SL2, in rot) drei *sub-loops* ausbildet.

Diese für HuR ungewöhnliche Art der mRNA Interaktion hat dabei interessanter Weise keinen Einfluss auf die Stabilität der mRNA, sondern vermittelt vielmehr der CRM1 spezifischen Transport: Eine Deletion des *cis*-aktiven Elements resultiert im CRM1-unabhängigen Export des CD83

Transkriptes (Prechtel et al., 2006; Pieper et al., 2011). Für den CRM1-abhängigen Export der CD83 mRNA muss HuR, wie bereits zuvor erwähnt, jedoch über einen NES-haltigen Liganden mit CRM1 interagieren.

#### **1.4.2 HuR-Ligand APRIL (ANP32B)**

Als Adaptorprotein für die Interaktion des HuR:CD83 mRNA Komplexes mit dem Exportrezeptor CRM1 konnte der HuR-Ligand APRIL (ANP32B), nicht aber das eng verwandte pp32 (ANP32A) identifiziert werden (Fries et al., 2007). Über seine Leuzin-reiche Domänen interagiert APRIL mit CRM1 und fungiert folglich als Adaptorprotein im CD83 mRNA-Exportkomplex. Das Phosphoprotein gehört zur Familie der stark konservierten ANP32-Proteine (*acidic nuclear phosphoproteins*) und wird im nächsten Kapitel zusammen mit weiteren Familienmitgliedern detailliert beschrieben. Für die *shuttle* Eigenschaften von APRIL ist eine Phosphorylierung an Position Threonin 244 (T244) notwendig. Die Proteinkinase Casein Kinase II (CK2) phosphoryliert APRIL an T244 und reguliert somit das *shuttling* von APRIL und infolgedessen auch indirekt die Expression von CD83 (Chemnitz et al., 2009).

#### **1.4.3 Proteinkinase CK2**

Die 1954 zum ersten Mal von Burnett und Kennedy beschriebene Proteinkinase Casein Kinase II (CK2) ist eine hoch konservierte ubiquitär exprimierte Serin/ Threonin Kinase, die bei der Regulation einer Vielzahl von unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Transformation, Differenzierung oder Apoptose, eine wichtige Rolle spielt. Es handelt sich um ein Holoenzym, welches aus insgesamt vier Untereinheiten besteht. Die Heterotetramere setzen sich dabei aus zwei vermutlich regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten von 28 kDa sowie den katalytischen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$  von 42 kDa bzw. 38kDa zusammen ( $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha'\beta_2$  oder auch  $\alpha'_2\beta_2$ ) (siehe Übersichtsartikel: Montenarh, 2010). Diese unterschiedlichen Kompositionen des Holoenzym sind vermutlich einer der Gründe für die mannigfaltigen Eigenschaften der Kinase; die Anzahl ihrer Substrate wird momentan mit über 300 beschrieben (siehe Übersichtsartikel: Meggio and Pinna, 2003). Die CK2 ist ein konstitutiv aktives Enzym, welches ubiquitär in der Zelle lokalisiert ist (siehe Übersichtsartikel: Faust and Montenarh, 2000; Filhol and Cochet, 2009). Hingegen sind die Substrate der CK2 auf verschiedene Zellkompartimente verteilt und befinden sich im Zellkern, dem Zytoplasma oder den Plasmamembranen. Als Antwort auf spezifische Signale und Stimuli wie z.B. Hitzeschock, UV Strahlung, Sauerstoffmangel oder auch virale Infektionen, kann sich die CK2 intrazellulär zwischen den Kompartimenten bewegen. Aufgrund dieses Kompartiment-spezifischen *targetings* der CK2 kann eine substratspezifische Phosphorylierung in den verschiedenen Bereichen der Zelle reguliert und gewährleistet werden (siehe Übersichtsartikel: Ahmad et al., 2005). Des Weiteren spielt vermutlich

auch die Translokation der einzelnen CK2-Untereinheiten zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten eine Rolle bei der Regulation der Substratspezifität (Gerber et al., 2000; Davis et al., 2002; Pluemsampant et al., 2008; Filhol and Cochet, 2009). In den vergangenen Jahren wurden eine Reihe an niedermolekularen Inhibitoren identifiziert und entwickelt, welche die Aktivität der Kinase spezifisch hemmen, so dass die CK2 als „*drugable*“ Proteinkinase bezeichnet werden kann (Sarno et al., 2002; Pagano et al., 2006).

In Hinblick auf den nukleozytoplasmatischen Transport der CD83 mRNA konnte die CK2 mittels des spezifischen CK2 Inhibitors TBB (4,5,6,7-tetrabromo-2-azabenzimidazole) sowie RNA-Interferenz Studien als APRIL-T244 modifizierende Kinase identifiziert werden (siehe 4.1.1) (Chemnitz et al., 2009). Mittels der CK2 Inhibition konnten Chemnitz und Mitarbeiter sowohl die nukleozytoplasmatische Translokation von APRIL (ANP32B), als auch die CD83 Expression hemmen und zudem zeigen, dass Letzteres seine Ursache in einem verminderten Kernexport der CD83 mRNA hat. So scheint die CK2 mit dem Phosphoprotein (ANP32B) ein weiteres Substrat zu besitzen und für die Regulation der CD83 Expression eine funktionell wichtige Rolle zu spielen.

### **1.5 APRIL (ANP32B) und Mitglieder der ANP32-Familie**

Die Familie der ANP32 Proteine, zu der auch das bereits erwähnte und als Adaptorprotein am CD83 mRNA Kernexport beteiligte Phosphoprotein APRIL (ANP32B) gehört, ist eine Familie von hoch konservierten, sauren nukleären Phosphoproteinen (*acidic nuclear phosphoproteins*). Die Mitglieder der ANP32-Familie werden als nukleozytoplasmatische *shuttle* Phosphoproteine beschrieben, die in einer Reihe verschiedener Signalwege sowie an wichtigen zellulären Prozessen wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung beteiligt sind (siehe Übersichtsartikel: Santa-Coloma, 2003; Matilla and Radrizzani, 2005). Sie zeichnen sich durch einen C-Terminus reich an sauren Aminosäuren aus und besitzen außerdem Leuzin-reiche Sequenzen (*leucine rich repeats* LRR) im N-Terminus, die als Erkennungsmotiv für eine Reihe an Protein:Protein-Interaktionen dienen. Diese beiden Regionen spielen für die intrazelluläre Verteilung der ANP32 Proteine eine wichtige Rolle: So findet sich im sauren C-Terminus ein klassisches NLS (*nuclear localisation signal*), welches von Importrezeptoren der Familie der Karyopherine erkannt wird (siehe 1.1). Die Leuzin-reichen Sequenzen im N-Terminus dienen hingegen als NES (*nuclear export signal*) und werden vom Exportin CRM1 erkannt, so dass die nukleozytoplasmatische Translokation der ANP32 Proteine über CRM1 vermittelt wird (Fornerod et al., 1997; Kobe and Kajava, 2001; Matilla and Radrizzani, 2005).

### 1.5.1 ANP32-Familie

Bisher konnten acht Mitglieder der ANP32-Familie identifiziert werden: ANP32A, B, C, D, E, F, G und H. Die meisten der Proteine haben neben der offiziellen ANP32A-H Nomenklatur mindestens eine weitere Bezeichnung (Trivialnamen), da die Namensgebung häufig im Kontext zur jeweiligen Identifizierung steht und die einzelnen Proteine oft mehrfach in verschiedenen Studien isoliert und identifiziert wurden (siehe Übersichtsartikel: Matilla and Radrizzani, 2005). Die Familienmitglieder ANP32F, G und H wurden bisher nur im Zusammenhang des Übersichtsartikels von 2005 über die ANP32-Familie von Matilla und Radrizzani beschrieben. Ihr Vorkommen sowie ihre Funktion wurden noch nicht weiter geklärt. Etwas ausführlicher ist das Familienmitglied ANP32E (CPD1) beschrieben. Es wurde 2001 aus dem Kleinhirn von Mäusen isoliert und scheint die PP2A (*protein phosphatase 2*) Aktivität während der Entstehung neuer Synapsen zu regulieren, so dass dem Protein eine Rolle bei der neuronalen Proliferation und Differenzierung zugeschrieben wurde (Radrizzani et al., 2001; Costanzo et al., 2006). Ebenso wurden onkogene Eigenschaften von ANP32E publiziert, es aber gleichzeitig konträr auch mit einem günstigen Verlauf des follikulären Lymphoms in Zusammenhang gebracht (Bjorck et al., 2005; Tsukamoto et al., 2008; Walker et al., 2010). Die genaue Funktion von ANP32E ist folglich noch nicht geklärt.

Die Familienmitglieder pp32r1 (ANP32C) und pp32r2 (ANP32D) wiesen bisher vor allem onkogene Eigenschaften auf und wurden beispielsweise in malignen Prostatakrebszellen oder Brustkrebszellen detektiert (Kadkol et al., 1998; Kadkol et al., 2001).

Das prominenteste und am besten charakterisierte Protein der ANP32-Familie ist pp32 (*phosphoprotein 32* kDa), welches auch als ANP32A oder LANP (*leucine rich acidic nuclear protein*) bezeichnet wird. Es wurde 1990 zusammen mit ANP32B, welches im nächsten Abschnitt beschrieben wird, aus einer murinen B-Lymphoblasten Zelllinie isoliert (Malek et al., 1990). Im Gegensatz zu seinen eng verwandten und onkogenen Familienmitgliedern pp32r1 (ANP32C) und pp32r2 (ANP32D) ist das Protein pp32 detailliert als Tumorsuppressor charakterisiert. So ist pp32 in der Lage, die durch Onkogene induzierte *in vitro* Transformation von Zellen oder auch *in vivo* Tumorgenese zu inhibieren (Chen et al., 1996; Bai et al., 2001). Die Gründe für die tumorsuppressorische Rolle von pp32 finden sich in verschiedenen Eigenschaften des Proteins: Zum einen wird pp32 die Fähigkeit zugeschrieben, die für Proliferation verantwortliche Proteinphosphatase PP2A hemmen zu können (Li et al., 1996). Zum anderen wurde pp32 als Bestandteil des INHAT Komplexes (*inhibitor of histone acetyltransferase*) identifiziert und ist somit in der Lage, über die Inhibition der Histon-Azetylierung die Genexpression zu regulieren (Seo et al., 2001). Zudem wurde publiziert, dass pp32 sowohl Caspase-unabhängige als auch Caspase-aktivierte Apoptose auszulösen vermag (Fan et al., 2003; Pan et al., 2009).

Wie bereits unter 1.1.2 und 1.4.1 beschrieben, ist pp32, wie auch sein Verwandter APRIL (ANP32B), ein HuR-Ligand und ist in dieser Funktion an der Stabilisierung von ARE-haltigen mRNAs und deren Kernexport beteiligt (Brennan et al., 2000; Gallouzi et al., 2001). Als HuR-Ligand im CRM1-abhängigen Export der CD83 mRNA spielt pp32 allerdings keine Rolle; hier wurde das Familienmitglied APRIL (ANP32B) als Adaptorprotein identifiziert (Fries et al., 2007).

### 1.5.2 APRIL (ANP32B)

Wie den meisten Proteinen der ANP32-Familie wurden auch dem Familienmitglied ANP32B im Laufe der Zeit eine Reihe unterschiedlicher Namen zugeordnet. Neben der inzwischen offiziellen Bezeichnung ANP32B wird es – wie schon mehrfach genannt – auch als APRIL (*acidic protein rich in leucins*) bezeichnet (Mencinger et al., 1998). Zudem finden sich in der Literatur die Bezeichnungen PHAPII (*putative human leukocyte antigen associated protein II*), SSP-29 (*silver stainable protein 29 kDa*) oder PAL31 (*proliferation associated leucine rich protein 31 kDa*) (Vaesen et al., 1994; Zhu et al., 1997; Mutai et al., 2000). Die Bezeichnungen SSP-29 und PHAPII sind allerdings inzwischen veraltet und das Synonym PAL31 wird vor allem bei Nagern wie *Rattus norvegicus* oder *Mus musculus* verwendet. Für den weiteren Verlauf dieser Arbeit und zur besseren Unterscheidung wird das Protein nur noch mit dem geläufigen Akronym APRIL<sup>1</sup> benannt.

Das Protein APRIL besteht aus 251 Aminosäuren (AS) mit einer Molekülmasse von 28.8 kDa und wurde wie schon erwähnt, zusammen mit pp32 aus einer murinen B-Lymphoblasten Zelllinie isoliert (Malek et al., 1990). Es existiert eine weitere, durch alternatives Spleißen entstandene Variante des Proteins, bestehend aus 195 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 22 kDa. Dieser Spleißvariante fehlt das NLS im C-Terminus, so dass es sich um ein *shuttle* inkompetentes, zytoplasmatisch-ständiges Protein handelt, dessen Funktion unbekannt ist (siehe Übersichtsartikel: Matilla and Radrizzani, 2005). Als allgemein anerkannte und gültige Form von APRIL in Publikationen und Datenbanken wurde die 251-AS-Variante festgelegt (Uniprot<sup>2</sup>).

Das Protein APRIL weist über 70 % Sequenzidentität und über 80 % Sequenzähnlichkeit zu pp32 auf, ist im Vergleich zu pp32 aber weniger deutlich charakterisiert. Dennoch wurden dem Protein seit seiner Entdeckung eine Reihe an Eigenschaften und Funktionen zugeschrieben, die sich teilweise – trotz der Homologie zu pp32 – stark von denen des engen Verwandten unterscheiden. So findet sich das Protein APRIL vor allem in stark proliferierenden Geweben wie der Milz oder dem Thymus (Mencinger et al., 1998; Reilly et al., 2011). Zudem scheint APRIL unter anderem an der Zellzyklusprogression beteiligt, sowie in die Entwicklung und Proliferation bestimmter neuronaler

---

<sup>1</sup> APRIL ist nicht identisch mit dem Protein der TNF Superfamilie „*a proliferation-inducing ligand*“, für das unglücklicherweise ebenfalls das Akronym „APRIL“ verwendet wird (Hahne et al., 1998).

<sup>2</sup> <http://www.uniprot.org/uniprot/Q92688>

Stammzellen involviert zu sein (Mutai et al., 2000; Sun et al., 2001). Im Vergleich zu seinen Familienmitgliedern pp32 und CPD1 fungiert es nicht als Inhibitor der pro-proliferativen Phosphatase PP2A, sondern weist vielmehr inhibitorische Eigenschaften gegenüber der Caspase-3 auf (Sun et al., 2006). Die direkte Inhibition der Caspase-3 konnte aber in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden; vielmehr wurde APRIL als Caspase-3 Substrat identifiziert (Shen et al., 2010). Die anti-apoptotischen Effekte von APRIL bestätigten sich jedoch auch in der Studie von Shen und Mitarbeitern. So führte die Depletion von APRIL zu einer Verstärkung der Caspase-3 Aktivität, was eine Steigerung im Absterben myeloider Leukämiezellen zur Folge hatte. Beim Familienmitglied APRIL scheint sich im Gegensatz zu pp32 demzufolge nicht um ein Tumorsuppressorprotein, sondern eher um ein Proliferation-induzierendes Protein zu handeln.

Gleichzeitig aber wird APRIL neben seinen proliferativen Eigenschaften auch eine regulatorische Funktion als Histon Chaperon zugeschrieben. Wie auch pp32 kann APRIL die Azetylierung von Histonen hemmen. Zudem scheint es Histone Promotor-spezifisch mit DNA zu komplexieren, was zu einer negativen Regulation bestimmter Gene wie beispielsweise dem Wachstumsfaktor PDGF-A (*platelet-derived growth factor*) führt (Munemasa et al., 2008). Dabei interagiert APRIL anscheinend mit den Histonen H3 und H4 über seine Leuzin-reichen Regionen im N-Terminus (Tochio et al., 2010).

Eine weitere Funktion wird diesem multifunktionellen Protein beim CRM1-abhängigen mRNA-Transport zugeschrieben. Wie bereits unter 1.1.2 erwähnt, konnten Brennan und Mitarbeiter sowohl pp32 als auch APRIL als HuR-Liganden identifizieren. Diese interagieren über ihr NES im N-Terminus mit dem CRM1 Rezeptor und spielen somit vermutlich eine Rolle beim CRM1-abhängigen Transport des *c-fos* Transkriptes (Brennan et al., 2000). Bei der Analyse des CD83 mRNA-Transports konnte gezeigt werden, dass APRIL, aber nicht pp32, als Adaptorprotein zwischen dem HuR:CD83 mRNA Komplex und CRM1 fungiert (Fries et al., 2007). Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von APRIL an Threonin 244 für die Fähigkeit der nukleozytoplasmatischen Translokation des Proteins notwendig ist.

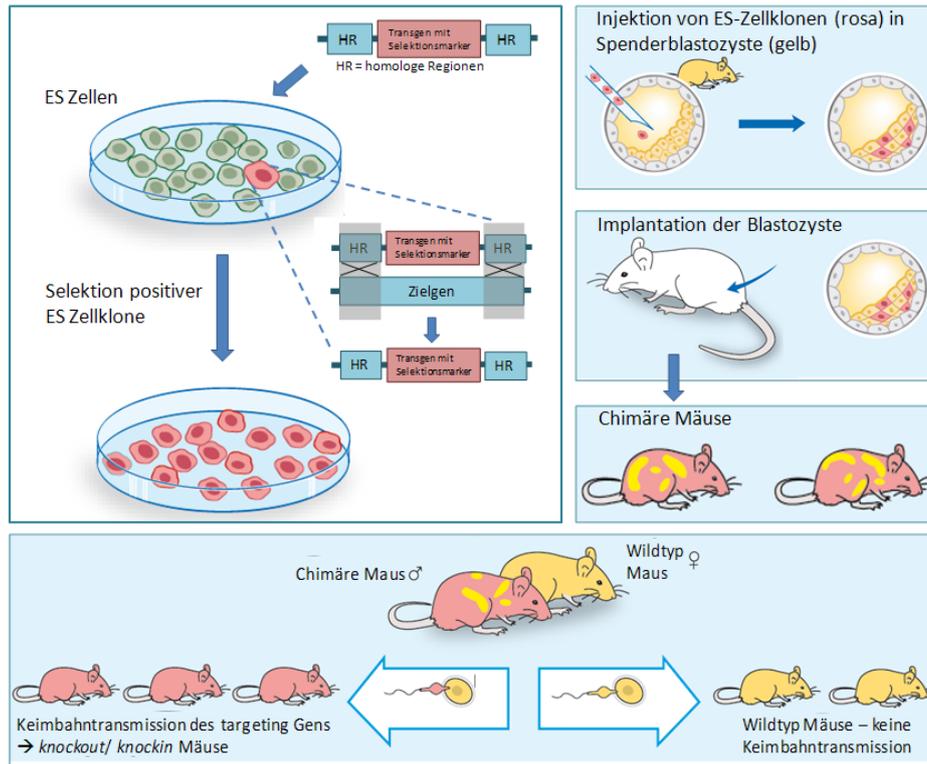
Abschließend soll erwähnt werden, dass in den letzten Jahren verschiedene *knockout* Mäuse der ANP32-Familie etabliert wurden. So liegt inzwischen jeweils ein konstitutives *knockout* Mausmodell von pp32 (Opal et al., 2004), CPD1 (Kular et al., 2010; Reilly et al., 2010) und auch APRIL vor (Reilly et al., 2011). Letzteres wurde kurz vor Beendigung dieser Arbeit publiziert.

## 1.6 Gentechnik und Mäuse

### 1.6.1 Etablierung des gerichteten *gene targetings* in Mäusen

Die Maus *Mus musculus* ist in der Entwicklungsbiologie schon lange das Modelltier für die Entwicklung höherer Vertebraten und heutzutage das Säugetier der Wahl für molekulargenetische

Studien. Die Verfahren der Gentechnologie erlauben inzwischen mittels *gene targetings* das gezielte Aus- oder auch Anschalten eines bestimmten Gens (*knockout* oder *knockin*). Dies macht eine Untersuchung des Zielgens *in vivo* im Organismus möglich. Während die erste transgene Maus bereits 1974 von Jaenisch und Mitarbeitern generiert wurde (Jaenisch and Mintz, 1974), wurde das gezielte *gene targeting* erst in den 80er Jahren etabliert, indem man sich das Prinzip der homologen Rekombination zunutze machte. Durch das „*crossing over*“ flankierender Homologiebereiche gelang es den Laboren von Mario R. Capecchi und Oliver Smithies, den gezielten und spezifischen Austausch eines endogenen Gens durch ein transgenes DNA-Fragment zu etablieren (Thomas and Capecchi, 1987; Doetschman et al., 1987). Parallel wurden von Sir Evans und Mitarbeitern die ersten pluripotente embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) isoliert (Evans and Kaufman, 1981). Diese beiden Techniken erlaubten 1989 die Etablierung der ersten *knockout* Mäuse (Koller and Smithies, 1989; Capecchi, 1989a; Capecchi, 1989b) und die beteiligten Wissenschaftler Capecchi, Evans und Smithies wurden dafür 2007 mit dem Nobelpreis für Medizin honoriert. Abbildung 8 fasst das Verfahren des *gene targetings* in der Maus zusammen.



**Abbildung 8: Gen targeting in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zur Etablierung von *knockout* oder *knockin* Mäusen (Verändert nach ©The Nobel Committee for Physiology or Medicine; Illustration: A.Röhl<sup>3</sup>)**

**A)** Über homologe Rekombination wird das Zielgen durch ein homologes, aber genetisch modifiziertes Transgen ausgetauscht. Das Transgen wurde aus einer murinen Gendatenbank isoliert und *in vitro* modifiziert (*knockout*: Gen wurde inaktiviert; *knockin*: zusätzliche genetische Information). Das Transgen enthält zudem ein Markergen, um homolog rekombinierte ES-Zellklone mittels Selektion anzureichern. Über Elektroporation wird das modifizierte Transgen in ES-Zellen eingebracht, mittels homologer Rekombination ins Genom integriert und anschließend werden die positiv homolog rekombinierten Zellklone über Selektion isoliert.

**B)** Die homolog rekombinierten ES-Zellklone werden in eine Spenderblastozyste injiziert, welche im Anschluss in den Uterus eines scheinsschwangeren Ammentiers implantiert wird. Die Blastozyste enthält dabei zwei verschiedene ES-Zelltypen: zum einen die ES-Zellen der Mauslinie der Spenderblastozyste (hier gelb), sowie die *in vitro* generierten ES-Zellklone mit dem modifizierten Transgen (hier rosa). Chimäre Nachkommen werden anhand der gefleckten Fellfarbe identifiziert

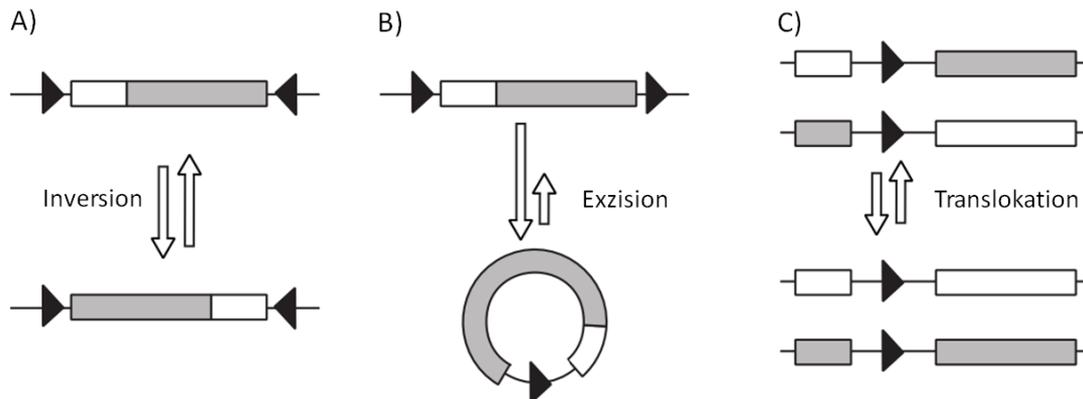
**C)** Findet eine Keimbahntransmission des modifizierten Transgens statt, können homozygote *knockout* oder *knockin* Mäuse gezüchtet werden.

Die konstitutive Ausschaltung eines Gens in *knockout* Mäusen hat allerdings den Nachteil, dass der vollständige *knockout* zu einem letalen Phänotyp führen kann, wenn das Zielgen ein entwicklungsbiologisch relevantes Genprodukt kodiert. Die Entwicklung konditioneller *knockout* Verfahren ermöglichte einen gewebsspezifischen und/oder zeitlich regulierbaren *knockout* von Genen, so dass letale Phänotypen vermieden werden können. Die konditionellen *knockout* Verfahren orientieren sich dabei am Cre/loxP Rekombinationssystem aus dem Bacteriophagen P1 unter Verwendung der spezifischen Rekombinase Cre (Austin et al., 1981), oder auch der aus der Hefe *Saccharomyces cerevisia* stammenden Rekombinase Flp (Broach et al., 1982).

<sup>3</sup> [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2007/med07eng.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/med07eng.pdf)

## 1.6.2 Rekombinasen Cre und Flp

Bei der aus dem Bacteriophagen P1 stammenden Rekombinase Cre handelt es sich um ein Enzym von 38 kDa, welches die Rekombination zwischen zwei spezifischen Erkennungssequenzen katalysiert (Sauer and Henderson, 1988). Bei Letzteren handelt es sich um sogenannte loxP-Sequenzen (*locus of crossing over of P1*) von je 34 bp. Je nach Orientierung der Sequenzen kommt es zu einer Inversion, Translokation oder Exzision der DNA (siehe Abbildung 9) (siehe Übersichtsartikel: Metzger and Feil, 1999).



**Abbildung 9: Sequenzspezifisches Cre/loxP Rekombinationssystem (verändert nach Metzger and Feil, 1999)**

**A)** Inversion: Befinden sich zwei loxP-Sequenzen (als Dreieck dargestellt) in gegensätzlicher Orientierung auf einem DNA-Strang, wird das dazwischenliegende DNA-Fragment intervertiert.

**B)** Exzision: Befinden sich zwei loxP-Sequenzen in gleicher Orientierung auf einem DNA-Strang, wird das dazwischenliegende DNA-Fragment herausgeschnitten, wobei eine loxP-Sequenz im Genom verbleibt

**C)** Integration/ Translokation: Befinden sich zwei loxP-Sequenzen auf zwei verschiedenen DNA-Strängen, kann eine Integration oder Translokation erfolgen.

Bei konditionellen *knockout* Mäusen wird der Exzision-Mechanismus der Cre Rekombinase genutzt. Dabei wird das zu inaktivierende Zielgen von zwei loxP-Sequenzen in gleicher Orientierung flankiert (bezeichnet als „gefloxtes“ Gen) und erst in Anwesenheit einer Cre Rekombinase aus dem Genom der Maus entfernt. Zur Etablierung einer konditionellen *knockout* Mauslinie werden Mäuse mit einem „gefloxten“ Zielgen mit einer Mauslinie verpaart, welche die Cre Rekombinase beinhaltet („Cre-Deleter“). In doppelt transgenen Tieren erfolgt eine Expression der Cre Rekombinase, welche eine Deletion des „gefloxten“ Zielgens zur Folge hat. Neben der Generierung von konditionellen *knockout* Mäusen kann das Enzym auch für Klonierungsarbeiten oder zum Austausch von Genen eingesetzt werden (Zhang et al., 1998; Buchholz and Bishop, 2001). Zudem dient die Cre Rekombinase als Vorlage, um über molekulare Evolution eine neue Generation von Rekombinasen zu entwickeln, die als molekulare Scheren oder auch „*tools of medical surgery*“ (Buchholz, 2008) in der Genterapie ihre Anwendung finden können (Buchholz and Stewart, 2001; Sarkar et al., 2007).

Der Rekombinationsmechanismus der Rekombinase Flp, einem Enzym von 43 kDa aus der Hefe *Saccharomyces cerevisia*, ähnelt dem der Cre Rekombinase. Flp erkennt sogenannte FRT-Sequenzen („*Flp recombination target*“) und rekombiniert die DNA – wie auch die Cre Rekombinase – je nach Orientierung der FRT-Sequenzen (siehe Übersichtsartikel: Bockamp et al., 2002). Allerdings liegt das Temperaturoptimum der Wildtyp-Flp Rekombinase bei 30°C, so dass ursprünglich die Cre Rekombinase bevorzugt eingesetzt wurde. Inzwischen wurden aber temperaturstabile Varianten der Flp entwickelt, die eine vergleichbare Aktivität zur Cre Rekombinase aufweisen (Rodriguez et al., 2000).

### 1.6.3 Gewebsspezifische und induzierbare Kontrolle der Rekombinaseaktivität

Wie bereits erwähnt, werden für die Etablierung von konditionellen *knockout* Mäusen sogenannte Cre- oder auch Flp-*Deleter* Mauslinien verwendet. Diese beinhalten die jeweilige Rekombinase unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors. Die Expression der Rekombinase in der *Deleter*-Mauslinie hängt folglich vom jeweiligen Promotor ab. Mittels gewebsspezifischer und/oder induzierbarer Promotoren können somit Zeit und Ort des *knockouts* bestimmt werden.

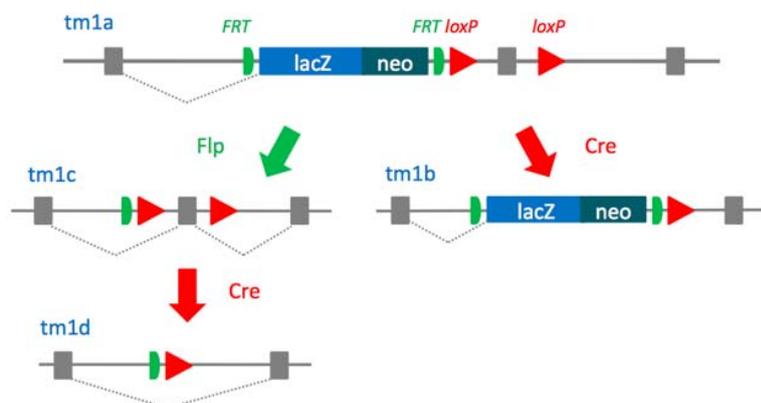
So wird beispielsweise in der sogenannten *vavCre* Mauslinie die Cre Rekombinase unter der Kontrolle von regulatorischen Sequenzen des murinen *vav* Gens exprimiert (Georgiades et al., 2002). Es handelt sich dabei um ein Proto-Onkogen mit Signalübertragungscharakter, dessen Transkripte fast ausschließlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden (Katzav et al., 1989; Ogilvy et al., 1998). So können mittels der *vavCre* Mauslinie konditionelle *knockout* Mäuse generiert werden, in denen die Cre Rekombinase ein „gefloxtes“ Zielgen gewebsspezifisch, d.h. ausschließlich im hämatopoetischen System deletiert.

Um eine zeitlich kontrollierbare Rekombination zu gewährleisten, wurden zudem *Deleter*-Mauslinien entwickelt, in welchen die Rekombinase unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors, wie den durch INF $\alpha$  und INF $\gamma$  aktivierbaren Mx1 Promotor, exprimiert wird (Kühn et al., 1995). Des Weiteren werden heutzutage Rekombinasen-Fusionsproteine wie Cre-ER<sup>T</sup> oder Cre-ER<sup>T2</sup> verwendet (*estrogen receptor tamoxifen-dependent* ER<sup>T</sup>). Diese beinhalten neben der Cre eine modifizierte Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors, welche vom endogenen Östrogen nicht erkannt wird, jedoch eine hohe Affinität gegenüber künstlichem Tamoxifen aufweist (Feil et al., 1996). Das Fusionsprotein interagiert über die modifizierte Ligandenbindungsdomäne mit dem Hitzeschockprotein Hsp90 und wird im Zytoplasma zurückgehalten, so dass keine Rekombination im Zellkern vermittelt werden kann. Durch die Applikation von Tamoxifen bindet die modifizierte Ligandenbindungsdomäne mit dem künstlichen Östrogenrezeptormodulator. Dies führt zu einer Dissoziation des Cre-Fusionsproteins von Hsp90, so dass die Rekombinase in den Zellkern gelangt,

„geflochte“ DNA Sequenzen rekombiniert und somit eine zeitliche Kontrolle der Rekombination sichergestellt wird.

### 1.6.4 „knockout-first“ Modifikation

Die 2004 von Testa und Mitarbeitern entwickelte „knockout-first“ Strategie kombiniert den konditionellen *knockout* nach dem Cre/loxP System mit einer Reporter-markierten Mutation, welche direkt ein Null-Allel erzeugt. Die gezielt inserierte, von FRT-Sequenzen flankierte Reporter-markierte Genkassette führt aufgrund einer Spleißakzeptor-Stelle und einer SV40-PolyA-Sequenz neben der Expression von  $\beta$ -Galaktosidase und einer Neomycin-Resistenz zu einem Abbruch der Transkription und somit zu einer Null-Mutation des modifizierten Allels (Null-Allel). Das Reporter-markierte „knockout-first“ Verfahren ist ein nützliches Instrument, um die Kausalität von *nonsense*-Mutationen (*non-sense mediated decay* bzw. NMD) und die daraus resultierenden Phänotypen zu untersuchen. Mittels der Fip-Rekombinase kann eine Reversion des Phänotyps vermittelt werden. Gleichzeitig kann über das Cre/loxP System der *knockout* erneut oder bei letalen Phänotypen gewebsspezifisch und/oder induzierbar etabliert werden (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des konditionellen „knockout first“ Allels (übernommen von [www.knockoutmouse.org](http://www.knockoutmouse.org)<sup>4</sup>)**

Das „knockout-first“ Allel (tm1a) mit einer Reporter-Selektionskassette (lacZ und NeoR) stört über eine integrierte Spleißakzeptor-Seite und eine PolyA-Sequenz die Genfunktion. Mittels der Fip-Rekombinase wird das „knockout-first“ Allel in ein konditionelles Allel verwandelt (tm1c) und die Genaktivität wieder hergestellt. Anschließend kann nach dem Cre/loxP System ein konditioneller *knockout* etabliert werden.

<sup>4</sup><http://www.knockoutmouse.org/about/targeting-strategies>

## 1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Hinsichtlich des nukleozytoplasmatischen Transports von mRNAs galt es lange Zeit als Dogma, dass das Heterodimer TAP-p15 als ausschließlicher Kernexportrezeptor für zelluläre mRNAs fungiert. Das Karyopherin CRM1 galt hingegen als Exportrezeptor für Proteine, ribosomale und *small nuclear* RNAs oder auch ungespleißte virale Transkripte. In den letzten Jahren konnten allerdings verschiedene zelluläre Transkripte identifiziert werden, deren nukleozytoplasmatische Translokation über den für zelluläre mRNAs höchst ungewöhnlichen Exportrezeptor CRM1 vermittelt wird. Auch das Transkript des Glykoproteins CD83, welches vermutlich als Oberflächenprotein reifer Dendritischen Zellen in die Aktivierung der zellulären T-Zellantwort involviert ist, wurde kürzlich als CRM1-abhängig beschrieben. Zudem konnten in weiteren Vorarbeiten zum CRM1-vermittelten CD83 mRNA Kernexport die zellulären Faktoren HuR und APRIL als wichtige Komponenten dieses spezifischen CRM1-abhängigen mRNA-Exportmechanismus identifiziert werden.

In dieser Arbeit sollen die Komponenten HuR und APRIL dieser für zelluläre mRNAs so ungewöhnlichen Exportmaschinerie hinsichtlich ihrer Interaktion und Regulation am Beispiel der CD83 Genexpression detailliert analysiert werden, um neue Erklärungsansätze bezüglich des CRM1-abhängigen CD83 mRNA-Exports zu liefern. Neben der funktionellen Analyse der Spezifität der HuR:CD83 mRNA Interaktion soll dabei vor allem das Adaptor- und Phosphoprotein APRIL im Detail charakterisiert werden. Um diese Charakterisierung so umfangreich wie möglich zu gestalten, soll APRIL zunächst biochemisch und *in vitro* analysiert werden. Anschließend soll das Protein in komplexen und lebensnahen Zellsystemen wie primären Dendritischen Zellen in Hinblick auf die Regulation der CD83 Expression untersucht werden. Mit der Konstruktion einer konditionellen APRIL *knockout* Mauslinie sollen letztlich die Voraussetzungen geschaffen werden, die Rolle von APRIL hinsichtlich der Regulation der CD83 Expression *in vivo* im Organismus zu erforschen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit, mittels einer detaillierten Analyse von HuR und APRIL das CD83 mRNA-Kernexport Modellsystem für den CRM1-abhängigen Transport zellulärer mRNAs zu vervollständigen. Die Konstruktion eines APRIL *knockout* Mausmodells soll zudem dazu beitragen, die Beteiligung von APRIL an der Regulation weiterer zellulärer CRM1-abhängiger mRNAs *in vivo* zu untersuchen und Funktion(en) von APRIL bezüglich der Regulation der Immunantwort im Gesamtorganismus zu analysieren.

## 2 Materialien

### 2.1 Bakterienstämme

Name	Genotyp	Herkunft
BL21 (DE3)	F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)	Stratagene (La Jolla, CA)
BL21 (DE3) pLys	F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cmr	Promega (Mannheim)
DH10B™	mcrA mcrBC mrr φ80lacZΔM15	Invitrogen (Karlsruhe)
Stbl3	F- mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(StrR)xyl-5 λ- leu mtl-1	Invitrogen (Karlsruhe)
XL10 Gold	Tetr, Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F', proAB, lacIqZΔM15, Tn10, (Tet'), Amy, Camr]a	Stratagene (La Jolla, CA)

### 2.2 Eukaryotische Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft
293T	Humane, embryonale Nierenzelllinie, exprimiert das große T-Antigen des SV40 Virus	ATCC Nr CRL-11268
Cos7	CV-1 Zelllinie aus immortalisierten Nierenzellen der grünen Meerkatze, exprimiert das große T-Antigen des SV40 Virus (CV1 Origin SV40)	ATTC Nr. CRL-1651
NIH 3T3	murine embryonale Fibroblastenzelllinie	ATCC Nr. CRL-1658
HeLa	Humane epitheliale Zelllinie, isoliert aus einem Zervix-Karzinom	ATCC Nr. CCL-2
Jurkat TAG	Humane T-Zelllinie, exprimiert das große T-Antigen des SV40 Virus; „Jurkat T-Zellen“	Dr. Ralph Kehlenbach, Universität Göttingen (Göttingen)
R1	Murine embryonale Stammzelllinie, 129X1x129S1	Dr. Andreas Nagy, Mount Sinai Hospital (Toronto, Kanada)
JM8.N4	Murine embryonale Stammzelllinie; C57Bl/6N	Wellcome Trust Sanger Institute WTSI (Cambridge, UK)

## 2.3 Primäre eukaryotische Zellen

Name	Beschreibung	Herkunft
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	Blutspendezentrale UKE, Hamburg
MEF	Murine embryonale Fibroblasten mit Neomycin-Resistenzgen, Tg(pPWL512hyg)1EMSxFVBneo	Versuchstierhaltung UKE (Hamburg)

## 2.4 Mausstämme

Name	Beschreibung	Herkunft
Balb/c	Blastozysten-Spendertiere für Injektion von ES-Zellen zur Etablierung einer Balb/c-chimären Maus	Versuchstierhaltung UKE (Hamburg)
C57Bl/6J (2010)	Inzuchttiere; Hintergrund Linie für KO-Mäuse; für Überprüfung der Keimbahnübertragung der chimären Böcke	HPI (Hamburg)

## 2.5 Medien

### 2.5.1 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.
Thym-Broth (kompetente Bakterien)	2 % Bacto-Trypton, 5 % Bacto-Hefeextrakt, 0,1 M NaCl, 0,01 M MgCl <sub>2</sub>

### 2.5.2 Medien für Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Name	Zusammensetzung
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium (Biochrom, Berlin); zur Kultivierung von 293T, HeLa, Cos7 und NIH 3T3-Zellen; Zugabe von 10 % FKS (Biochrom, Berlin), 3,75 mg/mL NaHCO <sub>3</sub> , 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, optional 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin.
DMEM-Mangelmedium	Dulbeccos Modified Eagle Medium (Sigma, München) ohne Methionin und Cystein; zur [ <sup>35</sup> S]-markierten <i>de novo</i> Synthese von Proteinen; Zugabe von 10 % dialysiertem FKS (PAN-Biotech), 1 mM L-Glutamin

	0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin
DMEM-Glutamax	Dulbeccos Modified Eagle Medium (Gibco BRL, Eggenstein); zur Kultivierung von MEF-Zellen; Zugabe von 9 % FKS (PAA), 0,1mM MEM= NEAE (non essential amino acids), 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin
ES-Medium	Dulbeccos Modified Eagle Medium (Gibco BRL, Eggenstein) mit 25mM HEPES; zur Kultivierung von murinen embryonalen Stammzellen Zugabe von 15 % FKS (PAA), 2 mM L-Glutamin, 0,1mM MEM, 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin, Nukleosidmix (Adenosin 1,3µg/ml; Guanosin 1,37µg/ml; Cytidin 1,18µg/ml; Uridin 1,18µg/ml; Thymidin 0,38µg/ml), 1 mM Natriumpyruvat, 100 µM 2-Mercaptoethanol, 1000 U/ml ESGRO-LIF; ggf. Selektionszusatz: 150-200 µg/ml G418
RPMI-Medium	RPMI-1640 Medium (Lonza, Verviers, Belgien); zur Kultivierung von Jurkat T-Zellen; Zugabe von 10 % FKS (PAN-Biotech), 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin
RPMI-Mangelmedium	RPMI-1640 Medium (Lonza, Verviers, Belgien); zur Aktivierung von Jurkat T-Zellen; Zugabe von 1 % FKS (PAN Biotech), 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin
RPMI-DC-Medium	RPMI-1640 Medium (Lonza, Verviers, Belgien); zur Kultivierung von monozytär generierten Dendritischen Zellen sowie PBMCs; Zugabe von 1-2 % hAB, 2 mM L-Glutamin, 0,05 mg/mL Penicillin/Streptomycin, teilweise 1mM HEPES
OptiMEM	OptiMEM (Gibco BRL, Eggenstein); serumreduziertes Medium zur Transfektion von Zellen

### 2.5.3 Einfriermedien

Name	Zusammensetzung
Einfriermedium	Einfriermedium zur Kryokonservierung eukaryotischer Zelllinien; FKS (PAN Biotech), 10 % DMSO (Sigma, München)
ES-Einfriermedium (1x)	Einfriermedium zur Kryokonservierung von murinen embryonalen Stammzellen und MEF-Zellen 50 % FKS (PAA), 40 % DMEM-ES Medium, 10 % DMSO (Sigma, München)
ES-Einfriermedium (2x)	Einfriermedium zur Kryokonservierung von murinen embryonalen Stammzellen; 1:2 mit Zellsuspension verdünnen 80 % FKS (PAA), 20 % DMSO (Sigma, München)

## 2.5.4 Medienzusätze

L-Glutamin	Biochrom (Berlin)
NaHCO <sub>3</sub> , 7,5 % Fertiglösung	Biochrom (Berlin)
Natriumpyruvat	Biochrom (Berlin)
HEPES	Biochrom (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (Berlin)
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom (Berlin), PAN Biotech (Aidenbach), PAA (Pasching)
Humanes AB Serum	PAN Biotech (Aidenbach)
MEM - nicht essentielle Aminosäuren	Gibco BRL (Eggenstein)
Nukleoside	Sigma (München)
2-Mercaptoethanol	Gibco BRL (Eggenstein)
Leukämie Inhibitions-Faktor LIF (ESGRO)	Millipore (Billerica, MA)
G418	Gibco BRL (Eggenstein)
DMSO	Sigma (München)
0,05 % Trypsin/ EDTA	Biochrom (Berlin)
0,25 % Trypsin/ EDTA für ES-Zellen	Gibco BRL (Eggenstein)

## 2.6 Oligonukleotide

Alle synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys (Steinheim) bezogen.

### 2.6.1 PCR-Primer

Name	Sequenz (5'-3' Richtung)	Funktion
<b>Primer für Homologiearme:</b>		
JC08#23-for	TTCTTGACTCTAAGGCCTGGTAATCTTGTGAGC ATACCATTGCATGTGTGTTAACAATTAACCCTCA CTAAAGGGCG	Einfügen von loxP-Stellen in <i>APRIL</i> -Gen über Homologiearme
JC08#24-rev	GGCGCTGGCTTTCACAGTAAGCTATTAGGTTTCC CAGCTGCAGGTAAGTCTAATACGACTCACTATAG GGCTC	
JC08#25-for	GGCTAAATGTAATTCTGCCTTGAGAGAGCAACTA AGTTTTGTGTAAGGAATAATACGACTCACTATAG GGCTC	Einfügen von Neomycin- Kassette mit FRT-Seiten in <i>APRIL</i> -Gen über Homologiearme
JC08#26-rev	CTGGTTTTGAGGTGGTGGGTGATCTCCCTGCTT ATAGGCATGTAATTAATTAACCCTCACTAAAG GGCG	

JC08#27-for	GTGTGTTAGAATGCTTGCTGCACAATCATGAGG GCCAGGGTTGGGATCCTGCTCTCCTGAGTAGGA CAAATC	Subklonierung des <i>APRIL</i> - Gens aus Bacmid über Homologie-Arme in Minimalvektor
JC08#28-rev	ACCAAGAGCAGAGAGGCACCCTAGTTCTCAGAG CATACGTGAACCTATCTGTCTGACTCACAGCTTGT CTGTAAGCGGATG	

**Primer für Sequenzierung und Genotypisierung:**

JC08#16-for JC08#17-rev	TCTGTCTTCTGGAAGAACAACACCTGATGT TTTGTATGTGTGCTATATATGTACACACC	Sequenzierprimer im <i>APRIL</i> -Gen; 1. loxP-Stelle
JC08#18-for JC08#19-rev	AACGGTGCTACCTGGATTACACTCACCT ACATGTCTTTACCATTTTACATTTTCAGGAC	Sequenzierprimer im <i>APRIL</i> -Gen; FRT-Stellen
JC08#21-rev JC08#22-for	AGGATCAGCTACCAATATAAAAAGCATGGT CATGCTCCCATGGACAGGAAATACTCTAGG	Sequenzierprimer im <i>APRIL</i> -Gen; Intron 1 und 8
DP_MV_ori_for DP_MV_Amp_rev	CTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATC CAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGG	Sequenzierprimer im Minimalvektor
JC08#20-for DP09#37-rev JC08#44-rev	TGCCTTACATGGCCGAAGTAAAGTGTTTCAT CACATGCAATGGTATGCTCACAAGATTACC CGCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGTTAAC	Überprüfung der Insertion des pMV- <i>APRIL</i> -KO Vektors in ES-Zellen
JC08#12-for DP-Kana-for DP10#12-for DP10#13-rev DP10#14-for DP10#27-for DP10#28-rev	CTAACCAGTAGGGAAGCCTAGAGTTTTGCC CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA GCATGCACATGGTGTGTACATATATAGCAC CACAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC CACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC GTCAGATCTCTGATTCTGCACAAGCACTCTACC CAGGGAGACAAGAAAATGATGAACTCTAAGCAC AGAAAGG	Genotypisierung von Schwanzbiopsien
DP10#29-for DP10#30-rev	GAAAGTATAGGAACTTCGTCGAGATAACTTCG GAACTGATGGCGAGCTCAGACCATAACTTCG	

**Primer für Mutations-PCR:**

DP10#63_for DP09#48_rev	GCAGAAGCTTGCGGCCGCCACAGCTCTG ATTTAAGGTACCTCATACCAGTTCTGTCTTGTGA GG	<i>outer</i> -Primerpaar, um über Mutations-PCR Punktmutationen in UREs im CD83-PRE einzubauen, mit HindIII und Asp718I Schnittstelle
DP10#66-for DP10#67-rev	CTTCCCAGACTTCTCAAAGCTGGCATG CATGCCAGCTTTTGGAGAAGTCTGGGAAG	<i>inner</i> -Primerpaar, um über Mutations-PCR Punkt- mutationen ins URE 1 im CD83-PRE einzubauen

DP10#68-for DP10#69-rev	CATGGAACGAGCATTCTACCAGTTACC GGTAACTGGTAGGAATGCTCGTTCCATG	<i>inner</i> -Primerpaar, um über Mutations-PCR Punktmutationen ins URE 2 im CD83-PRE einzubauen
DP10#70-for DP10#71-rev	CTCCCAGACTTCTCAAAGCTGGCATGGAACGA GCATTCTACCAGTTACCTCC GGAGGTAAGTGGTAGGAATGCTCGTTCCATGCC AGCTTTTGAGAAGTCTGGGAAG	<i>inner</i> -Primerpaar, um über Mutations-PCR Punktmutationen ins URE 1+2 im CD83-PRE einzubauen

**Klonierungs-Primer:**

DP11#19-for DP11#20-rev	GCAGAAGCTTATGTAACTCATCATTTTCACTT G GCAGGAATTCTCATACCAGTTCTGTCTTGAG	Klonierung des CD83-PRE mit URE-Punktmutanten in pcDNA3 über HindIII und EcoRI
----------------------------	--	--

**2.6.2 Sonden und sonstige Oligonukleotide**

Name	Sequenz (5'-3' Richtung)	Funktion
JC08#12	CTAACCAGTAGGGAAGCCTAGAGTTTTGCC	Sonde für Koloniehybridisierung

**2.6.3 siRNA für *knockdown* Experimente**

Name	RNA-Sequenz (5'-3' Richtung)	Herkunft
siLuci	CGUACGCGGAAUACUUCGA	pSUPERsiRNA Kasette im pGsi-Expressionsplasmid zur Expression von siRNA gegen Luciferase und APRIL
siAPRIL	GACGAGGACGATGAGGAT	
<i>stealth</i> siControl (=siLuciferase)	ACAUCACGUACGCGGAAUACUUCGA	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>stealth</i> siCK2 $\alpha$	GGAAAUCAAGAUGACUACCAGCUGG	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>stealth</i> siCK2 $\alpha'$	CCUGACAGACUUUGAUUCCGGUUU	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>stealth</i> siAPRIL	GAGGAAGACGAGGACGAUGAGGAUG	Invitrogen (Karlsruhe)

## 2.6.4 Sonstige Nukleinsäuren

### DNA-Längenstandard

1 kb-Ladder	New England Biolabs (Ipswich, MA)
100 bp-Ladder	New England Biolabs (Ipswich, MA)
dNTPs	Roche (Mannheim)

## 2.7 Radioaktivität

[alpha- <sup>32</sup> P] dATP	Hartmann Analytic (Braunschweig)
[alpha- <sup>32</sup> P] UTP	Hartmann Analytic (Braunschweig)
[gamma- <sup>32</sup> P] ATP	Hartmann Analytic (Braunschweig)
[ <sup>32</sup> P] <i>ortho</i> -Phosphat	Hartmann Analytic (Braunschweig)
Tran <sup>35</sup> S-Label [ <sup>35</sup> S]	MP Biomedicals (Santa Ana, CA)

## 2.8 Expressionsplasmide

### 2.8.1 Parentale Expressionsplasmide

Name	Beschreibung, kodiert für	Herkunft
pcDNA3.1	Parentaler eukaryotischer Expressionsvektor, der unter der Kontrolle des CMV-IE Promotors rekombinante Proteine in Säugerzellen exprimiert. Er enthält eine multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> MCS), die zudem von einem T7 und einem Sp6 RNA Promotor flankiert wird. Dies erlaubt die <i>in vitro</i> Transkription von RNA	Invitrogen (Karlsruhe)
pGex	Parentaler prokaryotischer Expressionsvektor; unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren tac-Promotor-/lac-Operator-Systems werden rekombinante Proteine als Fusionsproteine mit Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert.	Pharmacia (Freiburg)
pSUPER	<b>suppression of endogenous RNA</b> ; mit Polymerase III H1-RNA-Promotor, der die Expression von shRNA und siRNA ermöglicht	Dr. Thomas Hofmann DKFZ (Heidelberg)
pGsi	Lentiviraler Vektor mit GFP Expression	Dr. Carol Stocking, HPI (Hamburg)

## 2.8.2 Zur Verfügung gestellte Expressionsplasmide

Name	Beschreibung; kodiert für	Herkunft
pGex_HuR	Fusionsprotein GST-HuR	Dr. Alexander Prechtel, HPI (Hamburg)
pGex_APRIL-wt	Fusionsprotein GST-APRIL als Wildtyp	Dr. Ilona Hauber, HPI (Hamburg)
pcDNA3_APRIL-Flag-wt	Fusionsprotein APRIL –Flag als Wildtyp	Dr. Joachim Hauber, HPI (Hamburg)
pcDNA3_APRIL-Flag-S158A	Fusionsprotein APRIL –Flag als Punktmutante: Serin an Position 158 durch Alanin ausgetauscht	Dr. Jan Chemnitz, HPI (Hamburg)
pcDNA3_APRIL-Flag-S2108A	Fusionsprotein APRIL –Flag als Punktmutante: Serin an Position 210 durch Alanin ausgetauscht	Dr. Jan Chemnitz, HPI (Hamburg)
pcDNA3_APRIL-Flag-T244A	Fusionsprotein APRIL –Flag als Punktmutante: Threonin an Position 244 durch Alanin ausgetauscht	Dr. Barbara Fries, HPI (Hamburg)
pcDNA3_APRIL-Flag-S158-only	Fusionsprotein APRIL –Flag als Phosphorylierungsmutante: Threonin an Position 244 und Serin an Position 210 durch Alanin ausgetauscht; es kann nur Serin 158 phosphoryliert werden	Dr. Jan Chemnitz, HPI (Hamburg)
pcDNA3_APRIL-Flag-S210-only	Fusionsprotein APRIL –Flag als Phosphorylierungsmutante: Threonin an Position 244 und Serin an Position 158 durch Alanin ausgetauscht; es kann nur Serin 210 phosphoryliert werden	Dr. Jan Chemnitz, HPI (Hamburg)
pcDNA3_APRIL-Flag-T244-only	Fusionsprotein APRIL –Flag als Phosphorylierungsmutante: Serin an Position 158 und 210 durch Alanin ausgetauscht; es kann nur Threonin 244 phosphoryliert werden	Dr. Jan Chemnitz, HPI (Hamburg)
pcDNA3_APRIL-Flag-w/o-all-P	Fusionsprotein APRIL –Flag als Phosphorylierungs-defiziente Mutante: Threonin an Position 244 und Serin an Position 158 und 210 durch Alanin ausgetauscht; es kann nicht phosphoryliert werden	Dr. Jan Chemnitz, HPI (Hamburg)
pcDNA3_CD83-wt	Enthält die gesamte humane CD83-Sequenz, einschließlich 5' und 3'UTRs, mit ATG und Stop-Codon	Dr. Joachim Hauber, HPI (Hamburg)
pF25 Rev GFP	Rev-GFP Fusionsprotein;	Dr. Roland Stauber, Georg-Speyer-Haus (Frankfurt)
pGsiLuciferase	pSUPERsiRNA Kasette zur Expression von siRNA gegen Luciferase;	Dr. Nina Albrecht, HPI (Hamburg)
pGsiAPRIL	pSUPERsiRNA Kasette zur Expression von siRNA	Dr. Jan Chemnitz, HPI

RP23-117B19	gegen APRIL, Bacmid mit <i>APRIL</i> -Gen; murine DNA Sequenz von Chromosom 4 des Klons RP23-117B19; Chloramphenicol-Resistenz-Kassette	(Hamburg) BACPAC Resources, CHORI (Oakland, CA)
-------------	---	---

### 2.8.3 Neu generierte Expressionsplasmide

Name	Beschreibung; kodiert für	Klonierungsstrategie
pGex_APRIL-S158A	Fusionsprotein GST-APRIL als Punktmutante: Serin an Position 158 durch Alanin ausgetauscht	Amplifizierung der APRIL-Kassette mit DP10#01 und DP10#02; Klonierung EcoRI und XhoI
pGex_APRIL-S210A	Fusionsprotein GST-APRIL als Punktmutante: Serin an Position 210 durch Alanin ausgetauscht	Amplifizierung der APRIL-Kassette mit DP10#01 und DP10#02; Klonierung EcoRI und XhoI
pGex_APRIL-T244A	Fusionsprotein GST-APRIL als Punktmutante: Threonin an Position 244 durch Alanin ausgetauscht	Amplifizierung der APRIL-Kassette mit DP10#01 und DP10#02; Klonierung EcoRI und XhoI
pGex_APRIL-S158-only	Fusionsprotein GST-APRIL als Phosphorylierungsmutante: Threonin an Position 244 und Serin an Position 210 durch Alanin ausgetauscht; es kann nur Serin 158 phosphoryliert werden	Amplifizierung der APRIL-Kassette mit DP10#01 und DP10#02; Klonierung EcoRI und XhoI
pGex_APRIL-S210-only	Fusionsprotein GST-APRIL als Phosphorylierungsmutante: Threonin an Position 244 und Serin an Position 158 durch Alanin ausgetauscht; es kann nur Serin 210 phosphoryliert werden	Amplifizierung der APRIL-Kassette mit DP10#01 und DP10#02; Klonierung EcoRI und XhoI
pGex_APRIL-T244-only	Fusionsprotein GST-APRIL als Phosphorylierungsmutante: Serin an Position 158 und 210 durch Alanin ausgetauscht; es kann nur Threonin 244 phosphoryliert werden	Amplifizierung der APRIL-Kassette mit DP10#01 und DP10#02; Klonierung EcoRI und XhoI
pGex_APRIL-w/o-all-P	Fusionsprotein GST-APRIL als Phosphorylierungs-defiziente Mutante: Threonin an Position 244 und Serin an Position 158 und 210 durch Alanin ausgetauscht; es kann nicht phosphoryliert werden	Amplifizierung der APRIL-Kassette mit DP10#01 und DP10#02; Klonierung EcoRI und XhoI
pcDNA3_CD83-PRE	Enthält das PRE-Element von CD83	Amplifizierung der PRE-Sequenz mit DP11#19 und DP11#20; Klonierung HindIII und EcoRII
pcDNA3_CD83-PRE_ΔURE1	Enthält das PRE-Element von CD83, Punktmutation an URE 1	Amplifizierung der PRE-Sequenz mit DP11#19 und DP11#20; Klonierung HindIII und EcoRII
pcDNA3_CD83-	Enthält das PRE-Element von CD83,	Amplifizierung der PRE-Sequenz mit

PRE_ΔURE2	Punktmutation an URE 2	DP11#19 und DP11#20; Klonierung HindIII und EcoRII
pcDNA3_CD83- PRE_ΔURE1+2	Enthält das PRE-Element von CD83, Punktmutation an URE 1+2	Amplifizierung der PRE-Sequenz mit DP11#19 und DP11#20; Klonierung HindIII und EcoRII
pMV_APRIL-KO	<i>Targeting</i> Vektor zur Etablierung einer konditionellen APRIL <i>knockout</i> Maus: Minimalvektor-Konstrukt mit Ampicillin-Resistenzkassette; murines APRIL-Gen aus Bacmid RP-23 117B19; integrierte loxP-Stellen in Intron 2 und 5; von FRT-Seiten flankiertes Neomycin-Resistenzgen in Intron 5	Red <sup>®</sup> /ET <sup>®</sup> basierte homologe Rekombination

## 2.9 Enzyme

### 2.9.1 Restriktionsnukleasen/Puffer

Restriktionsnukleasen wurden von Roche (Mannheim), New England Biolabs (Ipswich, MA) und Fermentas Thermo Scientific (St. Leon-Rot) bezogen und in den vom Hersteller empfohlenen Puffersystemen verwendet.

### 2.9.2 Sonstige Enzyme

Alkalische Kalbsphosphatase	New England Biolabs (Ipswich, MA)
Phusion <sup>®</sup> High Fidelity Polymerase	Fermentas Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
Proteinase K	Sigma (München)
PNGase	New England Biolabs (Ipswich, MA)

## 2.10 Zytokine

Name	Stocklösung	Herkunft
humanes GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor)	40.000 U/ml	Strathmann (Hamburg)
humanes IL-4 (Interleukin-4)	50.000 U/ml	Peptotech (Hamburg)
humanes IL-1β (Interleukin-1β)	1μg/ml	Strathmann (Hamburg)
humanes TNFα (Tumor-Nekrosefaktor α)	2,5μg/ml	Strathmann (Hamburg)
humanes PGE2 (Prostaglandin 2)	1mg/ml	Sigma (München)

## 2.11 Antikörper

### 2.11.1 Allgemeine Antikörper

$\gamma$ -Globulin, human Sigma (München)

### 2.11.2 Primärantikörper für die Western Blot Analyse

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
anti- $\alpha$ -Tubulin	Maus	1:5.000	Sigma (München)
anti- $\alpha$ -Aktin	Maus	1:2.000	Sigma (München)
anti-CD83	Maus	1:1.000	Santa Cruz (Santa Cruz, CA)
anti-APRIL	Kaninchen	1:2.000	Jan Chemnitz, HPI (Hamburg)
anti-CK2 $\alpha$	Maus	1:1.000	Sigma (München)
anti-CK2 $\alpha'$	Kaninchen	1:2.000	Novus Biologicals (Littleton, CO)
anti-Flag	Maus	1:500	GenScript (Piscataway, NJ)
anti-GFP	Huhn	1:2.000	Novus Biologicals (Littleton, CO)
anti-GAPDH	Kaninchen	1:2.000	Sigma (München)

### 2.11.3 Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse

Antikörper	Spezies	Markierung	Herkunft
anti-Kaninchen	Ziege	Peroxidase	Dianova (Hamburg)
anti-Maus	Ziege	Peroxidase	Dianova (Hamburg)
anti-Maus IgG	Ziege	IRDye 700DX (rot)	Licor (Bad Homburg)
anti-Kaninchen IgG	Ziege	IRDye 700DX (rot)	Licor (Bad Homburg)
anti-Maus IgG	Ziege	IRDye 800CW (grün)	Licor (Bad Homburg)
anti-Kaninchen IgG	Ziege	IRDye 800CW (grün)	Licor (Bad Homburg)
anti-Huhn IgG	Esel	IRDye 700DX (rot)	Licor (Bad Homburg)

Für Western Blot Analysen wurden die Peroxidase-gekoppelten Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Die Fluorochrom gekoppelten Antikörper wurden in der Western Blot Analyse in einer Verdünnung von 1:10.000 verwendet.

### 2.11.4 Antikörper für die Immunfluoreszenz Analyse

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
Primärantikörper: anti-Flag	Maus	1:1.000	GenScript (Piscataway, NJ)
Sekundärantikörper: anti-Maus Cy3	Maus	1:200	Dianova (Hamburg)

### 2.11.5 Fluoreszenzmarkierte Antikörper zur FACS-Analyse

Antikörper	Markierung	Herkunft
anti-HLA-A,B,C	PE	BD Biosciences (San Jose, CA)
anti-HLA-DR	FITC	BD Biosciences (San Jose, CA)
anti-DC-Sign	FITC	BD Biosciences (San Jose, CA)
anti-CD14	PE	BD Biosciences (San Jose, CA)
anti-CD80	FITC	BD Biosciences (San Jose, CA)
anti-CD83	PE	BD Biosciences (San Jose, CA)
anti-CD83	APC	BD Biosciences (San Jose, CA)
anti-CD86	PE	BD Biosciences (San Jose, CA)

## 2.12 Reagenzsysteme

5 PRIME 2,5x PCR MasterMix	5 PRIME (Hamburg)
Dead Cell Apoptosis Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA Minipräparations-Kit	Qiagen (Hilden)
DNA Maxipräparations-Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA-Ligation-Kit	Roche (Mannheim)
Riboprobe® T7-Transcription System	(Promega, Mannheim)
DecaLabel™	Fermentas Thermo Scientific (St. Leon-Rot)
Terminal Transferase	Roche (Mannheim)

RosetteSep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail	Stemcell (Grenoble, Frankreich)
BAC Subcloning Kit	Gene Bridges (Heidelberg)
Quick and Easy Conditional Knockout Kit (loxP/ Cre)	Gene Bridges (Heidelberg)
Quick and Easy Conditional Knockout Kit (FRT/ Flpe)	Gene Bridges (Heidelberg)

### 2.13 Chemikalien

Acrylamid/Bis (29:1)	Biorad (München)
ANTI-FLAG® M2 Affinity Agarose Gel	Sigma (München)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (München)
Ampicillin	Roche (Mannheim)
Aprotinin	Biomol (Hamburg)
ATM-Kinase Inhibitor (2-Morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one)	Merck (Darmstadt)
Bradford Reagenz	BioRad (München)
Bromphenolblau	Sigma (München)
Chlorampenicol	Roche (Mannheim)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
cComplete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
Coomassie G250	Fluka (Neu-Ulm)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (München)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
DNA aus Lachssperma	Sigma (München)
Ethidiumbromid (EtBr)	Biomol (Hamburg)
Ficoll Type 400	Sigma (München)
Glutathionsepharose 4B	Amersham (Freiburg)

Glutathion	Sigma (München)
Hoechst 33258 Farbstoff	Sigma (München)
Ionomycin	Sigma (München)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Kälberserumalbumin (BSA)	Sigma (München)
Kanamycin	Roche (Mannheim)
Leupeptin	Biomol (Hamburg)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Luminol	Sigma (München)
Magermilchpulver	Saliter (Obergünzburg)
Mitomycin C	Sigma, München
Nonidet-P40 (Igepal)	Sigma (München)
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Biorad (München)
para-Cumarinsäure	Sigma (München)
Pefabloc® SC	Biomol (Hamburg)
PepstatinA	Biomol (Hamburg)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma (München)
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma (München)
Polybren	Sigma (München)
Polyethylene Glycol 1500	Roche (Mannheim)
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences (Eppelheim)
Polyvinylpyrrolidone	Sigma, München
Propidiumiodid	Sigma (München)
Proteinase K	Sigma (München)
Tetracyclin	Roche (Mannheim)
TBB (4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazole)	Merck (Darmstadt)
TBCA ((E)-3-(2,3,4,5-Tetrabromophenyl)acrylic acid)	Merck (Darmstadt)

Tween 20	Sigma (München)
Triton X 100	Roth (Karlsruhe)
Wortmannin	Merck (Darmstadt)

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.

### 2.14 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial und Plastikwaren stammten von den Herstellern Greiner (Frickenhäuser), Nunc (Langenselbold), Renner (Dannstadt) und Sarstedt (Nümbrecht).

Amersham Hybond™-N+ Nylonmembran	GE Health Care (München)
Dialysekammern	PIERCE, Perbio (St. Augustin)
Elektroporationsküvetten	Peqlab (Erlangen), Biorad (München)
Filterpapier	Schleicher&Schüll (Dassel)
Kodak®Biomax XAR Film	Sigma (München)
Nytran™ Nylonmembranen	GE Health Care (München)
ProbeQuant™ G50-Micro Columns	GE Health Care (München)
Protran® Nitrocellulosemembran	Schleicher&Schüll (Dassel)
Sterilfilter 0,45 µm / 0,22 µm	Costar (Cambridge, MA USA)
Whatman 3MM Papier	Whatman (Maidstone)

## 2.15 Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung
bakterieller Lysepuffer	3 mg/ml Lysozym in MTTBS-Puffer; ½ <i>cOmplete Protease Inhibitor Cocktail</i> Tablette (Roche, Mannheim)
Blocking-Reagenz für Hybridisierungspuffer	10 mg/ml Lachssperma DNA in H <sub>2</sub> O; 3 x in der Mikrowelle aufkochen; 5 – 15 min Sonographie
Coomassie-Färbelösung	0,5 % Coomassie Blau R250; 50 % Methanol; 10 % Essigsäure
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Denhardt's Puffer	2 % Ficoll Type 400; 2 % BSA, Fraction V; 2 % Polyvinylpyrrolidone
Depurinierungspuffer	0,25 M HCl
DNA Ladepuffer (10 x)	50 % Glycerin; 20 mM Tris-HCl pH 8.0; 20 mM EDTA; 0,01 % Bromphenolblau
Dialysepuffer	25 mM Tris-HCl, pH 7.5; 50 mM NaCl; 20 % Glycerin; 2 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol (immer frisch zugeben)
E1A Zelllysepuffer	50 mM HEPES-KOH pH 7.5; 150 mM NaCl; 0,1 % NP40; immer frisch Protease- und Phosphatase-Inhibitoren
ECL-Entwicklerlösung 1	100 mM 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	100 mM Tris-HCl, pH 8.5; 30 µl 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Elektroporationspuffer für ES-Zellen	20 mM HEPES; 137 mM NaCl; 5,0 mM KCl; 0,7 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 6,0 mM Dextrose; pH-Wert auf 7.05 mit 0,5 N NaOH einstellen, steril filtrieren!
Elutionspuffer	10 mM/ 20 mM Glutathion in E1A-Puffer
FACS-Puffer	2 % FKS; 1 mM EDTA in PBS
Gel-Entfärbepuffer	25 % Isopropanol; 10 % Essigsäure in H <sub>2</sub> O
Hybridisierungspuffer	5x SSC; 7 % SDS; 20 mM Na-Phosphatpuffer; 10 x Denhardt's Puffer; 200 µg/ml Blocking-Reagenz
Kinase-Puffer (5x)	100 mM HEPES/KOH pH 7.5; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM DTT; 0,5mg/ml BSA; 100µM ATP (wenn radioaktiv gelabelt wird: 50µM), Phosphatase-Inhibitoren (immer frisch dazu geben)
Lysepuffer für Schwanzbiopsien	100 mM Tris HCL pH 8.5; 5 mM EDTA; 0,2 % SDS; 200 mM NaCl; 100µg/ml Proteinase K (immer frisch dazu geben)
Lysepuffer für ES-Zellen	0,1 % SDS; 280 µg/ml Proteinase K (immer frisch dazu geben)

MTTBS-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA pH 8.0; 1 % TritonX 100
Mowiol	0,2 M Tris-HCl, pH 8.5; 12 % Mowiol 4-88; 30 % Glycerin
Na-Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7.0)	42,3 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O; 57,7ml 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O; auf 1 l H <sub>2</sub> O auffüllen
NETN-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8.0; 0,4 % NP40
Neutralisierungspuffer	1 M Tris, 3 M NaCl
PBS	120 mM NaCl; 17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 3 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7.2
PBS/EDTA	1mM EDTA in PBS
Phosphatase-Inhibitoren	25 mM NaF; 5 mM EGTA pH 8.0; 4 mM EDTA pH 8.0
Ponceau S	2 % Poceau S; 30 % Trichloressigsäure; 30 % Sulfosalicylsäure
Protease-Inhibitoren (Stammlösungen):	
- Aprotinin (1000 x)	5 mg/ml in 50 % Glycerin/PBS
- Leupeptin (1000 x)	5 mg/ml in 50 % Glycerin/PBS
- Pefabloc® SC (200 x)	25 mg/ml in 50 % Glycerin (Lagerung bis zu 2 Monaten bei -20°C)
- Pepstatin A (200 x)	1 mg/ml in Methanol
Protein-Probenpuffer (2x)	250 mM Tris-HCl pH 8.8; 10 % SDS; 36 % Glycerin; 600mM DTT; 0,01 % Bromphenolblau
Protein-Probenpuffer (6x)	250 mM Tris-HCl pH 8.8; 10 % SDS; 36 % Glycerin; 600mM DTT; 0,01 % Bromphenolblau
RIPA Zellysepuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 0,1 % SDS; 5 mM EDTA; 1 % NP40; 0,5 % Na-Deoxycholat
SDS Laufpuffer	250 mM Tris-HCl; 1,92 M Glycin; 0,1 % SDS
SDS Sammelgelpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6.8; 0,4 % SDS
SDS Trenngelpuffer	1,875 M Tris-HCl, pH 8.8; 0,4 % SDS
SSC (20x)	0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat; 3 M NaCl; mit HCl auf pH 7.4 einstellen
TAE (50x)	2,0 M Tris, 1 M Na-Acetat pH 7.4; 50 mM EDTA
Tbf I	30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl <sub>2</sub> ; 100 mM KCl; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15 % Glycerin

## Materialien

---

Tbf II	10 mM MOPS pH 7.0; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM KCl; 15 % Glyzerin
TBS (10x)	1,5 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 7.6
TBS-T (1x)	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7.6; 0,2 % Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris; 0,1 mM EDTA pH 8.0
Waschpuffer A	2 x SSC; 0,5 % SDS
Waschpuffer B	0,2 x SSC; 0,1 % SDS
Waschpuffer I	3 x SSC; 5 % SDS; 10 mM Na-Phosphatpuffer; 10 x Denhardt's Puffer;
Waschpuffer II	1 x SSC; 1 % SDS
Waschpuffer III	2 x SSC; 2 % SDS
Western Blot Puffer	250 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 20 % Methanol

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien zur Transformation

Für die Transformation von Plasmiden über Hitzeschock (3.1.2.1) wurden chemisch-kompetente *E.coli* Bakterien benötigt. Hierfür wurde eine Vorkultur von 10 ml Thym-Broth-Medium ohne Antibiotikum des entsprechenden *E.coli* Stamms von einer Stammplatte (10 mM MgSO<sub>4</sub>, ohne Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend mit Thym-Broth-Medium auf ein Volumen von 500 ml aufgefüllt und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 kultiviert. Im Anschluss wurden die Bakterien für 10 min bei 3.000 x g pelletiert, in 150 ml sterilem Tbf I Puffer aufgenommen, gründlich resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren der Bakterien wurden diese in 20 ml sterilem Tbf II Puffer resuspendiert, in Aliquots von je 200 µl aufgeteilt und zur Aufbewahrung bei – 80°C gelagert.

#### 3.1.2 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

##### 3.1.2.1 Hitzeschock-Transformation von Bakterien

Für die Hitzeschock-Transformation von DNA in Bakterien wurden 200 µl chemisch-kompetente *E.coli* Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0,5 – 1,0 µg Plasmid-DNA oder einem gesamten Ligationsansatz versehen und vorsichtig vermengt. Nach 30 min Inkubationszeit auf Eis wurde der Ansatz für 90 sec bei 42°C im Wasserbad erwärmt (Hitzeschock). Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für zwei min auf Eis abgekühlt, mit 0,5 ml (Ligationsansatz) oder 1 ml ( Plasmidtransformation) LB-Medium ohne Antibiotikum versehen und für mindestens 30 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl des Ansatzes auf Antibiotikum-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht für 16 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

##### 3.1.2.2 Elektroporation von Bakterien

Es wurde eine Vorkultur von 1 ml LB Medium mit elektrokompetente DH10B™ von Invitrogen (Karlsruhe) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,4 ml frisches LB-Medium mit 30 µl der Vorkultur inokuliert und für 2 – 3 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien zwei Mal mit 1 ml eiskaltem Wasser gewaschen, gründlich in 20-30 µl kaltem Wasser resuspendiert und 0,3 µg DNA hinzugegeben. Die Suspension wurde in vorgekühlte 2 mm Küvetten übertragen und die Zellen im Gene Pulser II von Biorad bei 2,5 kV, 200 Ohm und 25 µF elektroporiert. Nach der Elektroporation wurde 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika hinzugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des

Ansatzes auf Antibiotikum-haltigen Platten ausplattiert über Nacht für 16 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

### **3.1.3 Kultivierung von Bakterien zur Plasmidisolierung**

Um rekombinierte Plasmide für Mini- oder Maxi-Plasmidpräparationen zu vermehren, wurden *E.coli* Bakterien in Schüttelkulturen à 5 ml (Minipräparation) bzw. 250 ml (Maxipräparation) LB-Medium mit Antibiotikum für 16 h bei 37°C inkubiert. Um die mit Expressionsplasmiden transformierten Bakterien zu konservieren, wurden 700µl der Bakterienkultur mit 700 µl Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren.

### **3.1.4 DNA-Standardmethoden**

#### **3.1.4.1 DNA Auftrennung im Agarosegel**

Für die qualitative und quantitative Analyse von DNA wurde diese im Ethidiumbromid-haltigen 1 - 2 % Agarosegel bei 100 V in einer Gelelektrophoresekammer von Biorad (München) für 30 min aufgetrennt. Im Anschluss konnte die aufgetrennte DNA anhand des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromids im UV-Licht visualisiert werden. Zur Größenbestimmung der einzelnen DNA-Fragmente wurde ein DNA-Standard Marker von NEB (Ipswich, MA) verwendet.

#### **3.1.4.2 DNA Gelextraktion**

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden diese im 1 - 2 % Agarosegel aufgetrennt, mit einem Skalpell ausgeschnitten und im Anschluss mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* oder *QIAquick PCR Purification Kit* von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

#### **3.1.4.3 Restriktionsanalyse**

Für den Verdau von DNA wurden Restriktionsenzyme der Firma Roche (Mannheim), NEB (Ipswich, MA) und Fermentas Thermo Scientific (St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### **3.1.4.4 Dephosphorylierung von DNA**

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden für eine erfolgreiche Ligation erfolgte mit alkalischer Kalbsphosphatase von Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers.

#### **3.1.4.5 Ligation**

Die Ligation von DNA wurde mittels des Rapid-Ligation Kits von Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen DNA-Enden unter ATP-Verbrauch miteinander verknüpft.

#### **3.1.4.6 Fällung und Aufreinigung von DNA**

Nukleinsäuren wurden mit 50 % Isopropanol oder mit 10 % 5 M NaCl und 2,5 x Volumen 100 % Ethanol gefällt und im Anschluss mit 70 % Ethanol zur Entfernung von Salzen gewaschen. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in einem adäquaten Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **3.1.4.7 Konzentrationsmessungen von Nukleinsäuren**

Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen wurden am Beckman DU 640 Spektralphotometer von Beckman Coulter (Krefeld) durchgeführt. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entsprachen 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA.

#### **3.1.4.8 Sequenzierungen von Nukleinsäuren**

DNA-Sequenzierungen wurden von Sequence Laboratories (Seqlab, Göttingen) durchgeführt. Die nach Angaben des Sequenzierungs-Labors vorbereitete DNA wurde zusammen mit spezifischen Sequenzierungsprimern an Seqlab versendet.

#### **3.1.5 Phenol-Chloroform Extraktion**

Um Proteine (z.B. Restriktionsenzyme) aus wässrigen DNA- oder RNA-Lösungen zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Die aufzureinigenden Proben wurden im Verhältnis 1:2 mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermengt. Durch starkes Vortexen wurden die Proteine aus der Lösung extrahiert und diese über Zentrifugation (5 min bei 20.000 x g) eine wässrige und organische Phase getrennt. In der oberen, wässrigen Phase befanden sich nach der Phasentrennung die aufzureinigenden Nukleinsäuren, welche im Anschluss in 50 % Isopropanol gefällt, für mindestens 10-30 min bei RT inkubiert und anschließend bei 20.000 x g für 30 min pelletiert wurden. Danach wurden die Proben mit 80 % eiskaltem Ethanol gewaschen, das DNA- oder RNA-Pellet getrocknet und in gegebenenfalls RNase-freiem Wasser gelöst.

#### **3.1.6 *In vitro* Transkription zur Herstellung von radioaktiv markierter RNA**

Die Herstellung von synthetischer RNA wurde mit dem *Riboprobe T7-Transcription System* von Promega (Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die radioaktive Markierung der RNA erfolgte mit α[<sup>32</sup>P]-UTP von Hartmann(Braunschweig). Als Transkriptions-Matrize dienten zuvor linearisierte DNA-Fragmente aus Expressionsplasmiden. Für die Synthese von radioaktiv markierter RNA wurde folgender Ansatz verwendet:

1 µl	linearisierte DNA-Matrize (0,2 – 1µg)
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)

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl RNase freie DNase hinzugegeben und der Ansatz für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine zweifache Phenolisierung (siehe 3.1.5), wobei hier das Volumen des Ansatzes auf 200µl aufgefüllt wurde. Für die Fällung der RNA wurden 800 µl kaltes Ethanol (-20°C) zugeführt, der Ansatz für 30 min bei -80°C inkubiert und anschließend für weitere 30 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die gefällte RNA wurde im Anschluss mit 400 µl 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach Abnahme des Ethanols wurde die RNA luftgetrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen. Für die Denaturierung und anschließende Faltung der synthetischen RNA wurde diese im Wasserbad auf 80°C erwärmt und im warmen Wasserbad über Nacht auf RT abgekühlt. Die fertige RNA wurde in 10 µl Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

### 3.1.7 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Für die Genotypisierung von Mäusen wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien aufgereinigt. Hierfür wurden der Maus unter Betäubung 0,5 cm der Schwanzspitze mit einem Skalpell entnommen und die Wunde verödet. Die Schwanzspitze wurde in 500 µl Lysispuffer mit Proteinase K (100 µg/ml) bei 55°C über Nacht lysiert und die unverdauten Reste am Folgetag bei 20.000 x g abzentrifugiert. Die genomische DNA im Überstand wurde in 500 µl Isopropanol überführt und gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Im Anschluss wurde sie in 100 µl TE-Puffer gelöst und mittels PCR analysiert.

### 3.1.8 Isolierung genomischer DNA aus embryonalen Stammzellen

Für die Analyse embryonaler Stammzellklonen wurde die DNA direkt in 96-Well Kulturplatten präpariert. Nach der Elektroporation, Selektion und Passagierung der ES-Zellen (siehe 3.4.3 und 3.4.4) wurden jeweils zwei 96-Well Kulturplatten für die DNA-Analyse kultiviert, bei denen das ES-Medium nur alle zwei Tage gewechselt wurde. Nachdem die Zellen vollkommen dicht gewachsen waren, wurden das Medium auf Zellstoff abgekippt (kein Absaugen!) und die Platte mit je 200 µl PBS/Well gewaschen. Im Anschluss wurden je 100 µl Lysispuffer für ES-Zellen hinzugegeben und die

Platte über Nacht bei 55°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Es wurden pro Well 1/10 Volumen (10 µl) 8 M LiCl und 100 µl Isopropanol hinzugefügt und die Platte erneut über Nacht in der Feuchtekammer auf einem Schüttler inkubiert. Verlängerte Inkubationszeiten erhöhten hierbei die Ausbeute an gDNA. Anschließend wurden die Platten für 30 min bei 3.000 x g zentrifugiert und der Überstand auf Zellstoff abgekippt. Es folgte ein Waschschrift mit 70 % Ethanol, nach welchem erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen wurde. Die Platte wurde bei 55°C getrocknet, die DNA über Nacht in der Feuchtekammer bei 37°C in 100 µl TE-Puffer je Well gelöst und mittels PCR.

### 3.1.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mittels der Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden *in vitro* DNA Sequenzen amplifiziert. Die PCR setzte sich aus einem zyklischen Prozess von Denaturierung, Hybridisierung (Primer-*annealing*) und Elongation zusammen und wurde im Gene Amp® PCR System 9700 von Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Vor Zyklusbeginn wurde die *template*-DNA für 5 min bei 98°C denaturiert. Im Anschluss wurden 25 – 35 Zyklen der PCR durchgeführt. Jeder Zyklus begann mit einer Denaturierung von 30 sec, auf welche die Hybridisierung spezifischer Primer (Primer-*annealing*) folgte, so dass im Anschluss mit einer thermostabilen Polymerase die Elongation der Amplifikate erfolgen konnte. Die Hybridisierungstemperatur der Primer (*annealing*-Temperatur) ergab sich aus Länge und Nukleotid-Zusammensetzung der jeweiligen Primer und wurde mittels der Wallace-Regel  $T_m = 4x(G+C) + 2x(A+T)$  abgeschätzt. Die Elongationszeit wurde anhand der *template* Größe gewählt (30 sec für 1kb DNA). Ein klassisches PCR-Standardprogramm ist im Folgenden wiedergegeben:

Vorgang	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	98°C	Keine Wiederholung
Denaturierung	30 sec	98°C	
Primer- <i>annealing</i>	30 sec	56°C	30 Zyklen
Elongation	30 sec	72°C	
Finale Elongation	7 min	72°C	Keine Wiederholung

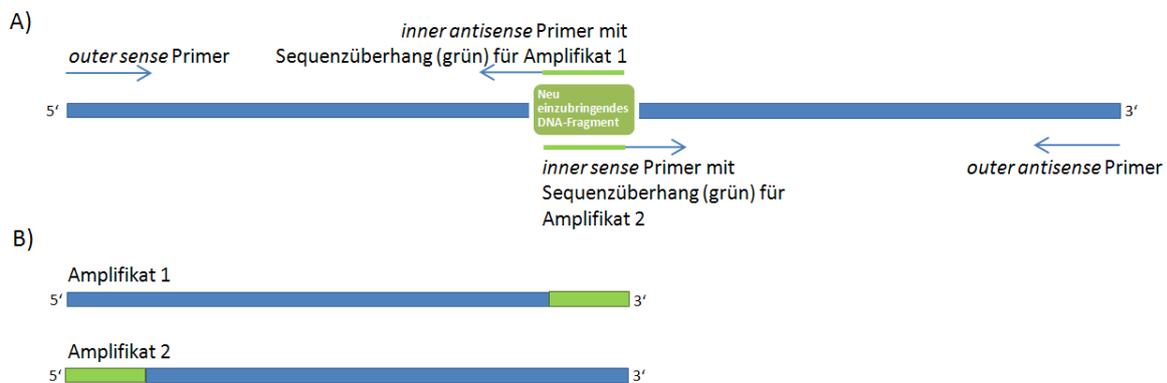
Für semi-quantitative PCR-Analysen wurde das 2,5-fach PCR-Mastermix von 5PRIME (Hamburg), welches eine *Taq* Polymerase beinhaltet, verwendet. Alle anderen PCRs wurden mit der Phusion® High Fidelity Polymerase von Fermentas Thermo Scientific (St. Leon-Rot) durchgeführt, die sich durch eine sehr hohe Prozessivität und eine sehr geringe Fehlerrate ( $4,4 \times 10^{-7}$ ) auszeichnete. Für PCRs mit genomischer DNA (gDNA) wurde grundsätzlich mit der Phusion® High Fidelity Polymerase gearbeitet. Außerdem wurde dem PCR-Ansatz teilweise 3 % DMSO hinzugefügt, um das Ausschmelzen der gDNA zu erleichtern. Zudem wurde bei der Amplifikation von gDNA zumeist das vom Hersteller für GC-reiche Sequenzen empfohlene GC-Puffersystem verwendet.

### 3.1.9.1 Klonierungs-PCR

Bei Konstrukten für Klonierungen wurden die *sense* und *antisense* Primer am 5' Ende mit der spezifischen Erkennungssequenz für das jeweilige Restriktionsenzym versehen, so dass die Schnittstellensequenz über die PCR-Amplifizierung an das DNA-Fragment angefügt wurde und die Amplifikate nach der Restriktionsanalyse direkt in einen Plasmidvektor ligiert werden konnten. Zudem wurde die Restriktions-Erkennungssequenz mit einem unspezifischen Überhang versehen (ATTAA oder GCAG), um die Anlagerung des Restriktionsenzym an seine spezifischen Schnittstelle zu ermöglichen.

### 3.1.9.2 Mutations-PCR

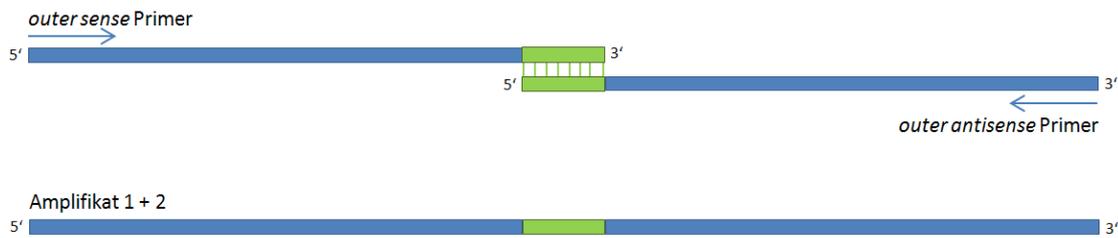
Über das Primerdesign konnten DNA-Sequenzen mutiert werden, in dem zum Beispiel kurze DNA-Fragmente wie neue Schnittstellen für Restriktionsenzyme in eine Zielsequenz eingebracht wurden. Dieses PCR-Verfahren gliederte sich in zwei Schritte. Zunächst wurden zwei DNA-Amplifikate hergestellt, bei welchen die einzufügende DNA-Sequenz mit spezifischen *inner*-Primern an das 3'-Ende des einen Amplifikats sowie an das 5' Ende des zweiten Amplifikats angelagert wurde (siehe Abbildung 11). Das einzufügende DNA-Fragment lag nun bei beiden DNA-Amplifikaten als Überhang vor.



**Abbildung 11: Schritt 1 der Mutations-PCR:**

Die einzufügende Sequenz wurde über spezifische *inner*-Primer (A) an Amplifikat 1 und 2 angehängt (B)

Im zweiten Schritt wurden die beiden zueinander komplementären DNA-Überhänge hybridisiert, so dass die nun miteinander verknüpften DNA-Amplifikate über *outer*-Primern in einer gemeinsamen PCR zu einem Gesamt-DNA-Fragment amplifiziert werden konnten (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Schritt 2 der Mutations-PCR:**

Hybridisierung der komplementären Überhänge (A) und Amplifizierung über *outer*-Primer von Amplifikat 1 + 2 (B)

### 3.1.10 Red<sup>®</sup>/ET<sup>®</sup> basierte Rekombination in *E.coli*

Die 1998 von Zhang und Mitarbeitern entwickelte Methode der lamda-vermittelten Red<sup>®</sup>/ET<sup>®</sup> basierten homologen Rekombination in *E.coli* (Zhang et al., 1998) ermöglicht das Einbringen von DNA-Sequenzen in ein Zielgen sowie Subklonierungsarbeiten ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen. Mittels dieser Technik wurde der *targeting* Vektor pMV-APRIL-KO für die Etablierung einer *knockout* Maus hergestellt.

#### 3.1.10.1 Subklonierung des *APRIL* Gens

Das murine *APRIL*-Gen wurde aus dem Bacmid RP23-117B19 in ein Minimalvektor-Plasmid subkloniert. Die Minimalvektor-Subklonierung erfolgte über homologe Rekombination mittels des *BAC Subcloning Kits* von Gene Bridges (Heidelberg). Das Kit beinhaltet ein Red/ET Expression Plasmid (pRedET) mit Tetracyclin-Resistenzgen sowie ein lineares DNA-Fragment, welches als PCR-*template* diente und mit seinem *ColE1 origin of replication* und einem Ampicillin-Resistenzgen das Grundgerüst des Minimalvektors darstellte.

Es wurde mit folgenden Antibiotika-Konzentrationen gearbeitet:

Antibiotikum	Konzentration
Chloramphenicol	15 µg/ml
Ampicillin	100 µg/ml
Tetracyclin (lichtempfindlich)	3 µg/ml

#### Schritt 1 – Anlagerung der Homologiearme

Mittels der Primer JC08#27 und JC08#28 wurden im PCR-Verfahren spezifische *APRIL*-Homologiearme an das Minimalvektor-DNA-*template* angehängt. Das PCR-Profil des Herstellers wurde hierfür leicht abgewandelt. Es wurde mit einer Primer-Konzentration von 10 pmol statt 25 pmol gearbeitet und eine PCR mit einem Präzyklus etabliert, deren Profil im Folgenden dargestellt ist:

Vorgang	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	98°C	
Initiales Primer- <i>annealing</i>	30 sec	50°C	Prä-Zyklus
Initiale Elongation	2 min	72°C	
Denaturierung	30 sec	98°C	
Primer- <i>annealing</i>	30 sec	60°C	30 Zyklen
Elongation	2 min	72°C	
Finale Elongation	7 min	72°C	Keine Wiederholung

Das Minimalvektor-Amplifikat mit den spezifischen *APRIL*-Homologiearmen wurde anschließend über ein 1 % Agarosegel aufgereinigt und in 30 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### Schritt 2 – Expression der Red/ET Rekombinasen

Über Elektroporation wurde das Bacmid (mit Chloramphenicol-Resistenzgen) in elektrokompente DH10B™ *E.coli* Bakterien transformiert (siehe 3.1.2.2). In einem zweiten Schritt folgte die Transformation des pRedET Expressionsplasmids (mit Tetracyclin-Resistenzgen). Die Zellen wurden im Anschluss für 70 min bei 30°C in LB-Medium ohne Antibiotikum im Schüttler inkubiert, anschließend pelletiert und auf Tetracyclin/Chloramphenicol-haltigen LB-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Inkubationstemperatur wurde auf 30°C gehalten, da das Temperatur-sensitive pRedET Expressionsplasmid bei höherer Temperatur nicht repliziert wurde. Am nächsten Tag wurden Klone gepickt und eine Tetracyclin/Chloramphenicol-haltige Übernacht-Kultur der Bakterien angesetzt. Von dieser wurden am nächsten Tag 30 µl in 1,4 ml frisches Tetracyclin/Chloramphenicol-haltiges LB-Medium überführt. Nach 2 h Inkubationszeit bei 30°C wurde die Expression der Red/ET-Rekombinasen mit 50 µl 10 % L-Arabinose induziert und die Temperatur auf 37°C erhöht. Das Temperatur-empfindliche pRedET Expressionsplasmid, welches im weiteren Verlauf nicht mehr benötigt wurde, wurde aufgrund der Temperaturerhöhung während der Proteinexpression nicht weiter repliziert und ging somit im weiteren Klonierungsverlauf verloren.

### Schritt 3 – Transformation des Minimalvektoramplifikats mit Homologiearmen

Nach 1 h Proteinexpression wurden 100 – 200 ng des Minimalvektor-Amplifikats mit spezifischen *APRIL*-Homologiearmen über Elektroporation in die Bacmid- und Red/ET-Rekombinationsprotein-haltigen *E.coli* transformiert. Nach 70 min Inkubationszeit bei 37°C in Antibiotika-freiem LB-Medium wurden die Zellen auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Erfolgte homologe Rekombination und somit die Subklonierung des Minimalvektors, konnten Ampicillin-resistente Klone auf den Ampicillin-haltigen LB-Platten wachsen und im Anschluss gepickt, die Plasmid-DNA präpariert und analysiert werden. Für die weiteren Klonierungsschritte wurde ein positiver Klon in elektrokompenten DH10B™ vervielfältigt

### 3.1.10.2 Insertion von linearen DNA-Fragmenten in *APRIL*-Gen

In den folgenden Klonierungsschritten wurden in das *APRIL*-Gen im Minimalvektor über homologe Rekombination loxP-Stellen sowie eine Kanamycin/Neomycin-Resistenz inseriert. Die Insertion der ersten loxP-Stelle erfolgte mit dem *Quick and Easy Conditional Knockout Kit (loxP/Cre)* von Gene Bridges (Heidelberg). Dieses enthielt zwei Expressionsplasmide mit Tetracyclin-Resistenz für Red/ET-Rekombinasen (pRedET) und die Cre-Rekombinase (706-Cre) sowie eine von loxP-Seiten flankierte („gefloخته“) Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette (loxP-PGK-gb2-neo-loxP). Die von FRT-Seiten flankierte Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette mit der zweiten loxP-Stelle wurde separat von Gene Bridges bezogen (loxP-FRT-PGK-gb2-neo-FRT).

Es wurde mit folgenden Antibiotika-Konzentrationen gearbeitet:

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Tetracyclin (lichtempfindlich)	3 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

#### Schritt 1 – Insertion der ersten loxP-Stelle

Nach Angaben des Herstellers wurden im PCR-Verfahren mittels der Primer JC08#23 und JC08#24 spezifische *APRIL*-Homologiearme an die „gefloخته“ Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette angelagert.

Vorgang	Dauer	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	30 sec	98°C	Keine Wiederholung
Denaturierung	10 sec	98°C	
Primer- <i>annealing</i>	30 sec	55°C	30 Zyklen
Elongation	2 min	72°C	
Finale Elongation	7 min	72°C	Keine Wiederholung

Die „gefloخته“ Antibiotika-Resistenzkassette mit den spezifischen *APRIL*-Homologiearmen wurde anschließend über ein 1 % Agarosegel aufgereinigt und in 30µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Das pRedET Expressionsplasmid wurde über Elektroporation in elektrokompetente DH10B™ *E.coli* Bakterien transformiert, welche bereits das Minimalvektorkonstrukt pMV-APRIL enthielten. Die Kultivierung erfolgte wie unter 3.1.10.1 – Schritt 1 beschrieben bei 30°C, als Selektionsantibiotika dienten Ampicillin und Tetracyclin. Nach der Induktion der Red/ET-Proteinexpression mittels L-Arabinose (siehe 3.1.10.1 – Schritt 2) wurde die „gefloخته“ Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette

über Elektroporation in die Bakterien transformiert und die Bakterien auf Kanamycin/Ampicillin-haltigen LB-Platten ausplattiert. Erfolgte homologe Rekombination und somit die Insertion der „geflochten“ Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette, wuchsen Kanamycin-resistente Klone auf den Antibiotika-haltigen LB-Platten. Diese Klone wurden vervielfältigt, die Plasmid-DNA präpariert und analysiert.

Für den nächsten Schritt wurde zunächst ein positiver Klon in Kanamycin/Ampicillin-haltigen LB-Medium vervielfältigt und das Cre-Rekombinase-Expressionsplasmid (706-Cre mit Tetracyclin-Resistenzgen) mittels Elektroporation transformiert. Die transformierten Bakterien wurden anschließend für 70 min bei 30°C in LB-Medium ohne Antibiotikum im Schüttler inkubiert, im Anschluss pelletiert und auf Tetracyclin/Kanamycin/Ampicillin-haltigen LB-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Inkubations-Temperatur wurde auf 30°C gehalten, da das Temperatur-sensitive 706-Cre Expressionsplasmid bei höherer Temperatur nicht repliziert wurde. Am nächsten Tag wurden Klone gepickt und in 1 ml Ampicillin-haltigen LB-Medium inkubiert. Nach 2 - 3 h wurde die Temperatur auf 37°C erhöht und somit die Expression der Cre-Rekombinase induziert. Das Temperatur-empfindliche Cre-Expressionsplasmid, welches im weiteren Verlauf nicht mehr benötigt wurde, wurde aufgrund der Temperaturerhöhung während der Proteinexpression nicht weiter repliziert und ging somit im weiteren Verlauf verloren. Die Rekombination der loxP-Stellen erfolgte in 60-80 % der „geflochten“ Kanamycin/Neomycin-Kassetten. Um nicht-rekombinierte Plasmide zu entfernen, erfolgte eine Re-Transformation in frische elektrokompente DH10B™ *E.coli*. Die Zellen wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausplattiert, über Nacht bei 37°C kultiviert und die Plasmid-DNA der gewachsenen Klone für die Analyse und Sequenzierung vervielfältigt und präpariert.

### **Schritt 2 – Insertion der zweiten loxP Stelle und der von FRT-Seiten flankierten Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette**

Die Insertion der zweiten loxP-Stelle zusammen mit der von FRT-Seiten flankierten Antibiotika-Resistenzkassette erfolgte identisch wie der unter 3.1.10.2 - Schritt 1 beschriebene Einbau der „geflochten“ Kanamycin/Neomycin-Resistenzkassette mit den Unterschieden, dass zur Anlagerung der spezifische *APRIL*-Homologiearme die Primer JC08#25 und JC08#26 verwendet wurden und kein Cre-Expressionsplasmid transformiert und exprimiert wurde.

#### **3.1.11 Koloniehybridisierung**

Zur Selektion positiver Subklone des *APRIL*-Gens im Minimalvektor-Kontext wurde eine Koloniehybridisierung durchgeführt. Mittels einer radioaktiv-markierten Sonde, welche spezifisch an

einen Bereich im *APRIL*-Gen hybridisiert, konnten positive Subklone, die das *APRIL*-Gen beinhalten, identifiziert und von unspezifischen Nebenprodukten unterschieden werden.

### **3.1.11.1 Filterabdruck der Kolonien**

Für den Plattenabdruck wurde eine mit Kugelschreiber beschriftete Nylon-Rundmembran von GE Health Care (München) vorsichtig in der Mitte der LB-Platte mit den zu analysierenden Kolonien abgelegt und langsam zu den Seiten abgesenkt, so dass sich die Membran am Agar festsaugte. Es wurde an drei asymmetrischen Punkten mit einer Kanüle und Tinte durch Membran und Agar gestochen, um die genaue Position der Membran auf der Platte zu dokumentieren. Anschließend wurde die Membran vorsichtig von der Platte entfernt und diese erneut bei 37°C inkubiert.

### **3.1.11.2 Denaturierung der Filtermembran**

Um die Kolonien auf der Membran zu denaturieren, wurde die Membran zunächst für 5 min auf Filter-Papier platziert, welches mit 0,5 M NaOH durchtränkt war. Es folgte ein weiterer Denaturierungs-Schritt für 5 min auf 0,1 M NaOH und 1,5 M NaCl getränktem Filter-Papier. Daran schlossen sich zwei fünf-minütige Neutralisierungsschritte in 0,5 M Tris-HCl (pH 7.5) und 1,5 M NaCl – Lösung an. Zwischen allen Einzelschritten wurde die Membran an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde die Membran in 2 x SSC mit 0,1 % SDS gelegt, die Kolonien mit KimWipe-Papier abgewischt, die Membran für 20 sec in 2 x SSC gewaschen und anschließend auf Filter-Papier getrocknet. Die Fixierung erfolgte im UV-Stratalinker®1800 von Stratagene (La Jolla, CA) dreifachen „Auto-Crosslink“. Die Membran wurde anschließend zwischen Filter-Papier bei RT bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

### **3.1.11.3 Sondenherstellung und Hybridisierung der Filtermembran**

Als spezifische Sonde diente das Oligonukleotid JC08#12, welches im *APRIL*-Gen kurz vor dem Exon 4 hybridisiert. Mittels der Terminalen Transferase von Roche (Mannheim) wurde die Sonde radioaktiv mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP nach Angaben des Herstellers markiert. Anschließend wurde die radioaktive Sonde aufgereinigt und nicht inkorporierte Nukleotide über *ProbeQuant™ G-50 Micro Columns* abgetrennt. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre gegeben und bei 65°C mit 10 - 20 ml Hybridisierungspuffer für mindestens 1 h im Hybridisierungsöfen prä-inkubiert. Anschließend wurde der Puffer verworfen, die Sonde mit frischem Hybridisierungspuffer zur Membran in die Hybridisierungs-Röhre gegeben und für mindestens 16 h bei 65°C im Hybridisierungsöfen inkubiert.

### **3.1.11.4 Detektion positiver Subklone**

Nach der Hybridisierung folgten drei Waschschriffe mit den Waschpuffern I, II und III. Zunächst wurde die Membran in der Hybridisierungsröhre bei RT mit Waschpuffer I gespült. Anschließend folgte je ein 30 min Waschschriff mit Puffer II und III bei 65°C im Hybridisierungsöfen. Die Membran wurde im Anschluss getrocknet, zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette überführt

und nach 1 – 3 Tagen entwickelt. Zeigte die Autoradiographie positive Klone an, konnten diese über die Tintenmarkierung von Membran und Agar-Platte zugeordnet, gepickt und analysiert werden.

## **3.2 Biochemische Methoden**

### **3.2.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine**

#### **3.2.1.1 Bakterielle Expression rekombinanter Proteine**

*E.coli* BL21 (DE3) Bakterien wurden mit einem pGex Expressionsplasmid, welches für das jeweilige aufzureinigende GST-Fusionsprotein kodierte, transformiert und als Übernachtskultur in 10 ml LB-Medium mit Antibiotikum bei 37°C im Schüttler kultiviert. Diese Vorkultur wurde anschließend mit Antibiotikum-haltigen LB-Medium auf ein Volumen von 600 ml aufgefüllt und bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG. Nach 3 – 4 h Proteinexpressionszeit bei 30°C wurden die Bakterien bei 3.000 x g für 10 min pelletiert, mit kaltem PBS gewaschen und entweder bei -80°C aufbewahrt oder direkt für die Aufreinigung der Proteine lysiert.

#### **3.2.1.2 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine über GST-Affinitätschromatographie**

Die Lyse der Bakterien erfolgte in 20 ml bakteriellem Lysispuffer (MTTBS-Puffer mit 3 mg/ml Lysozym und Proteaseinhibitoren) für 10 min auf Eis. Die aufgeschlossenen Bakterien wurden im Anschluss für 30 min bei 4°C und 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand mit 1 ml in NETN-Puffer äquilibrierter Glutathionsepharose vermengt. Die Suspension aus Sepharose und Überstand wurde für 30 min bei RT geschwenkt, so dass die GST-Fusionsproteine an die Glutathionsepharose binden konnten. Um ungebundene Proteine und unspezifische Bindungen zu entfernen, wurde die Glutathionsepharose im Anschluss drei Mal mit je 10 ml NETN-Puffer gewaschen, indem die Sepharose für 1 min bei 250 x g bei 4°C abzentrifugiert wurde.

Die Elution der gebundenen GST-Fusionsproteine erfolgte zunächst mit 500 µl Elutionspuffer (10 mM Glutathion in E1A-Puffer) und wurde dann drei Mal mit je 500 µl 20 mM Elutionspuffer wiederholt. Die Eluate wurden vereinigt und restliche Sepharose bei 250 x g für 1 min abzentrifugiert. Es erfolgte eine zweimalige Dialyse der Eluate bei 4°C für je 30 min im Dialysepuffer, bevor die gereinigten Proteine bei -80°C aufbewahrt wurden.

### **3.2.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten**

Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden adhärenente Zellen abtrypsiniert (siehe 3.3.3), die Zellen bei 20.000 x g für 1 min pelletiert, mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und erneut pelletiert (20.000 x g für 1 min). Suspensionszellen konnten direkt entnommen und mit kaltem PBS gewaschen werden. Je nach Pelletgröße wurden die gewaschenen Zellen in 30 – 300 µl E1A- oder RIPA-Lysepuffer aufgenommen, gründlich resuspendiert und für 20 min zur Zelllyse auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand bei 20.000 x g für 15 min abzentrifugiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration des Gesamtzelllysats erfolgte nach dem Biorad-Protein-Assay mit Bradford-Reagenz von Biorad (München). Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Lysate auf eine einheitliche Konzentration eingestellt, eine adäquate Menge an 6 x Proteinprobenpuffer hinzugegeben und das Gesamtzelllysate bei 95°C für 5 min aufgeköcht und somit denaturiert. Anschließend konnten die Proben zur Analyse der Proteinexpression über ein SDS-Gel aufgetrennt (siehe 3.2.5), oder bei -20°C aufbewahrt werden.

### **3.2.3 Deglykosylierung von Gesamtproteinextrakten**

Um die Darstellung von Glykoproteinen wie CD83 im Western Blot zu optimieren, wurden Gesamtzelllysate für die CD83-Analyse grundsätzlich deglykosyliert. Die Herstellung der Gesamtzelllysate erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. Allerdings wurde das Gesamtzelllysate nicht in 6 x Proteinprobenpuffer aufgenommen, sondern unter Zugabe von 10 x Denaturierungspuffer ohne Bromphenolblau für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurde in adäquater Menge 10 x NP40 hinzugegeben, um bei der Deglykosylierung störendes SDS zu entfernen. Im Anschluss wurden 0,5 µl PNGase in 10 x G7-Puffer zur Deglykosylierung hinzugegeben. Das PNGase-Enzym mit den jeweiligen Puffern wurde von NEB (Ipswich, MA) bezogen.

### **3.2.4 Immunpräzipitation von Flag-Fusionsproteinen aus Gesamtzelllysaten**

Für die Immunpräzipitation von Flag-Fusionsproteinen aus Gesamtzelllysaten wurden zunächst eukaryotische Zelllinien mit einem Expressionsplasmid für das jeweilige Flag-Fusionsprotein transfiziert (siehe 3.3.8). Anschließend wurden Gesamtzelllysate wie unter 3.2.2 beschrieben hergestellt. Die Immunpräzipitation der Flag-Fusionsproteine aus den Gesamtproteinextrakten erfolgte mittels des ANTI-FLAG® M2 Affinity Agarose Gels von Sigma (München), welches im Folgenden als „Flag-Säule“ bezeichnet wird. Nachdem die Flag-Säule mit 10-fachen Volumen an E1A-Puffer äquilibriert wurde, wurde 300 µl Gesamtzelllysate mit 10 % FKS mit 20 µl Flag-Säule vermengt und für 1 h bei 4°C geschwenkt, so dass die Flag-Fusionsproteine aus dem Gesamtproteinextrakt an

die mit Flag-Antikörpern versehene Flag-Säule binden konnten. Um ungebundene Proteine und unspezifische Bindungen zu entfernen, wurde die Flag-Säule im Anschluss drei Mal mit je 1 ml kaltem E1A-Puffer gewaschen, in dem die Agarose für 1 min bei 250 x g bei 4°C abzentrifugiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Flag-Säule vorsichtig trocken gesaugt, im Volumen der Säule (ca. 20 µl) mit 2 x Proteinprobenpuffer versehen und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die die Bindung der Flag-Antikörper zu den Flag-Fusionsproteinen wurde aufgeköcht und es erfolgte eine Denaturierung der Flag-Fusionsproteinen. Im Anschluss wurde die Flag-Säule durch starkes Zentrifugieren (1 min bei 20.000 x g) pelletiert und der Überstand mit den Flag-Fusionsproteinen bei -20°C aufbewahrt oder über SDS-PAGE aufgetrennt.

### 3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 20 mA pro Gel. Die Gele wurden in Mini-Protean Gelkammern von Biorad (München) mit Polyacrylamid-Konzentrationen im Trenngel von 8-15 % hergestellt. Der Polyacrylamid-Gehalt wurde je nach Proteingröße festgelegt, in den meisten Fällen wurden 10 % oder 12 % SDS-Gele verwendet. Im Folgenden ist die Zusammensetzung der SDS-Gele aufgelistet:

<b>Trenngel</b>	<b>8 %</b>	<b>10 %</b>	<b>12 %</b>	<b>15 %</b>
Polyacrylamid (30 %)	2,4 ml	3,0 ml	3,6 ml	4,5 ml
H <sub>2</sub> O	4,35 ml	3,75 ml	3,15 ml	2,25 ml
SDS Trenngelpuffer			2,25 ml	
APS (10 %)			60 µl	
TEMED			12 µl	
<b>Sammelgel</b>			<b>5 %</b>	
Polyacrylamid (30 %)			780 µl	
H <sub>2</sub> O			3,66 ml	
SDS Sammelgelpuffer			1,5 ml	
APS (10 %)			60 µl	
TEMED			12 µl	

### 3.2.6 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Färbung von SDS-Gelen erfolgte in Coomassie-Färbelösung für mindestens 30 min unter leichtem Schwenken. Anschließend wurden die gefärbten Gele mindestens zwei Mal mit Gelentfärbepuffer entfärbt und fixiert, auf Filterpapier übertragen und für 1 h bei 80°C unter Vakuum-Verschluss auf einem Geltrockentisch getrocknet.

### 3.2.7 Western Blot (Immunoblot)

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels der Western Blot Analyse. Im Nassblot-Verfahren wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine bei 80 V für 50 min auf eine Protran®Nitrocellulosemembran transferiert. Der Elektrotransfer der Proteine erfolgte auf Eis in einer Mini-ProteanII™ Nassblotapparatur von Biorad (München). Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S-Färbelösung angefärbt, um den Transfer zu bestätigen.

Für den immunologischen Nachweis der Proteine wurde die Membran zunächst für 30-60 min bei RT in 5 % Milchpulver/TBS-T inkubiert und geschwenkt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die Primärantikörper wurden in 5 % Milchpulver/TBS-T verdünnt und über Nacht mit der Membran bei 4°C geschwenkt. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Antikörpern wurde die Membran 4 x 15 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper, ebenfalls in 5 % Milchpulver/TBS-T, inkubiert und nach 1 h erneut 4 x 15 min gewaschen. Der Sekundärantikörper war entweder mit Meerrettich-Peroxidase oder IRDye Infrarot-Farbstoffen konjugiert.

Für die Peroxidase-Licht-Reaktion wurden die beiden ECL-Entwicklerlösungen im 1:2 Verhältnis vermischt und 1 min mit der Membran inkubiert. Die darauf auftretende Chemilumineszenz wurde anschließend auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht, welcher im Anschluss im Agfa Classic E.O.S. Entwickler entwickelt wurde.

Alternativ wurden die Fluoreszenz-Signale der mit IRDye gekoppelten Sekundärantikörper der Firma Licor (Bad Homburg) im Licor Odyssey Imaging System detektiert.

### 3.2.8 *In vitro* Phosphorylierung von Proteinen in Anwesenheit von Kinase-Inhibitoren

Für die *in vitro* Phosphorylierung rekombinanter Proteine wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 µg rekombinantes Protein mit 3 µCi  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (10 µCi/µl) und 4 µl 5 x Kinase-Puffer (mit Phosphataseinhibitoren) vermischt und für 5 min bei 37°C vorinkubiert. Wurden Kinase-Inhibitoren verwendet, wurden diese in jeweiliger Konzentration dem Präinkubationsansatz zugefügt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 µl Gesamtzelllysat von Jurkat T-Zellen gestartet und der Ansatz für weitere 20 min inkubiert. Durch die Zugabe von 20 µl 2 x Proteinprobenpuffer und ein Aufkochen des Ansatzes bei 95°C wurde die Phosphorylierung beendet. Die Reaktionsprodukte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Fixierung der Proteine und optischen Analyse der Banden erfolgte eine Coomassie-Färbung und Gelfixierung. Anschließend wurde das Gel getrocknet und die Phosphorylierung der rekombinanten Proteine im Autoradiogramm sowie auf einer *Phosphor Imaging Plate* (Fujifilm) detektiert und am Fujifilm BAS-2500 Scanner quantifiziert.

### 3.2.9 *In vivo* Phosphorylierung in Anwesenheit von CK2-Inhibitoren

Es wurden Jurkat T-Zellen mit Expressionsplasmiden für Flag-Fusionsproteine, deren Phosphorylierung untersucht werden sollte, in 6-Well Kulturplatten transfiziert (siehe 3.3.8.3). Jedes Konstrukt wurde im doppelten Ansatz transfiziert und die jeweiligen Zellen im Anschluss vereint. Am Folgetag wurden die Zellen in RPMI-Mangelmedium überführt. Nach weiteren 24 h wurde der Serumentzug beendet und den Zellen 10 % frisches FKS zugeführt. Nach 2 h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von CK2-Inhibitoren versetzt und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von 25 µCi [<sup>32</sup>P]-*ortho*-Phosphat mit PMA und Ionomycin (50 ng/ml bzw. 1 µM) aktiviert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 2 h wurden die Zellen geerntet, Gesamtzelllysate (siehe 3.2.2) im geringen Volumen von 15 µl hergestellt und auf 30 µl äquilibrierte Flag-Säule gegeben (siehe 3.2.4.). Das Säulengemisch wurde für 1 h bei 4°C im Drehrad geschwenkt, anschließend drei Mal gewaschen und vorsichtig trocken gesaugt. Die Flag-Fusionsproteine wurden wie unter 3.2.4. beschrieben mit 2 x Proteinprobenpuffer von der Flag-Säule gekocht und über SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Fixierung der Proteine und optischen Analyse der Banden erfolgte eine Coomassie-Färbung und Gelfixierung. Anschließend wurde das Gel getrocknet und die Phosphorylierung der Flag-Fusionsproteine im Autoradiogramm detektiert.

### 3.2.10 Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen im *pulse chase* Experiment

Es wurden Jurkat T-Zellen mit Expressionsplasmiden für Flag-Fusionsproteine, deren Halbwertszeit untersucht werden sollte, in 10 cm Platten transient transfiziert (siehe 3.3.8.3). Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, die Zellen 1 x mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend in DMEM-Mangelmedium ohne L-Methionin und L-Cystein aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Nach 1 h wurde radioaktiv markiertes L-Methionin und L-Cystein in Form von 20 µl TRAN<sup>35</sup>S-LABEL™ [<sup>35</sup>S] hinzugegeben und die Zellen für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen in 10 ml PBS gewaschen und in 10 ml frischem RPMI-Medium aufgenommen. Es wurde 1 ml Zellsuspension als Zeitpunkt t=0 entnommen, mit PBS gewaschen, pelletiert und bei -20°C aufbewahrt. Die weitere Probenentnahme von je 1 ml Zellsuspension erfolgte über einen definierten Zeitraum (z.B. 8 h, 16 h, 24 h, 38 h, 48 h). Es wurden Gesamtzelllysate (siehe 3.2.2) der Proben im Volumen von 200 µl hergestellt, mit 10 % FKS versehen und auf 20 µl äquilibrierte Flag-Säule gegeben (siehe 3.2.4.). Das Säulengemisch wurde für 1 h bei 4°C im Drehrad geschwenkt, anschließend drei Mal gewaschen und vorsichtig trocken gesaugt. Die Flag-Fusionsproteine wurden wie unter 3.2.4. beschrieben mit 2 x Proteinprobenpuffer von der Flag-Säule demobilisiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Fixierung der Proteine und optischen Analyse der Banden erfolgte eine Coomassie-Färbung und Gelfixierung. Anschließend wurde das Gel getrocknet

und die Halbwertszeit der Flag-Fusionsproteine im Autoradiogramm und auf einer *Phosphor Imaging Plate* (Fujifilm) detektiert und am Fujifilm BAS-2500 Scanner quantifiziert.

### **3.2.11 RNA-Mobility Shift zur Bestimmung von RNA:Protein-Interaktion**

Zur Untersuchung der Interaktionen einer spezifischen RNA mit einem bestimmten Protein wurden *RNA-Mobility-Shift*-Analysen durchgeführt. Das Protein wurde rekombinant in Bakterien exprimiert und über GST-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe 3.2.1.2). Die jeweilige RNA wurde wie unter 3.1.6 beschrieben mittels *in vitro* Transkription synthetisiert und mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P] UTP radioaktiv markiert. Es wurde zunächst der RNA-Ansatz von 1  $\mu$ l 10 x PBS, 1,5  $\mu$ l RNase-Inhibitor RNasin®, 6  $\mu$ l MS2-RNA zum Abfangen unspezifischer RNA:Protein-Interaktionen und 1,7  $\mu$ l 10mM DTT vermischt. Anschließend wurden 0,5  $\mu$ l der radioaktiv markierten synthetischen RNA hinzugefügt und der gesamte RNA-Ansatz mit dem Proteingemisch in unterschiedlichen Konzentrationen (0,4 – 1,0  $\mu$ g Protein in 8  $\mu$ l PBS) vermischt. Die Proben wurden für 30 min bei 4°C auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 2 – 3  $\mu$ l 50 % Glycerin beschwert und in einem 4 % nativen Polyacrylamidgel im TBE-Puffersystem aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V für 90 min. Das Gel wurde anschließend getrocknet und autoradiographisch analysiert.

## **3.3 Zellbiologische Arbeiten mit eukaryotischen Zellen**

### **3.3.1 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen**

Für die Kryokonservierung wurden Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in vorgekühltem Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend für 24 h bei -80°C in einer auf 4°C vorgekühlten Kryobox von Stratagene (La Jolla, CA) gelagert, die einen langsamen Einfriervorgang von 1°C/min ermöglichte. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gehalten.

Das Auftauen kryokonservierter eukaryotischer Zellen erfolgte schnell und bei 37°C im Wasserbad. Sie wurden möglichst direkt in frisches, vorgewärmtes Kulturmedium überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, um das DMSO-haltige Einfriermediums zu entfernen. Anschließend wurden sie in frischem Medium gründlich resuspendiert und kultiviert.

### **3.3.2 Kultivierung von Suspensionszellen**

Die Jurkat T-Zelllinie wurde in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in RPMI-Medium kultiviert. Die Kultur wurden alle 2 – 3 Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:6 verdünnt und weiterkultiviert.

### 3.3.3 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die adhärenenten Zelllinien 293T, Cos7, HeLa und NIH 3T3 wurden in Zellkulturflaschen in DMEM bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer humiden Atmosphäre (95 % relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Zellen wurden mit Erreichen der Konfluenz passagiert. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml 0,05 % Trypsin/EDTA vom Kulturflaschenboden abgelöst (3-5 min Inkubation bei 37°C im Brutschrank). Das Trypsin/EDTA wurde anschließend durch die Zugabe von Kulturmedium inaktiviert und die resuspendierten Zellen in einer Dichte von 10-20 % neu ausgesät.

### 3.3.4 Isolierung und Kultivierung von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*)

Für die Isolierung von PBMCs wurden *Buffy Coats* (50 - 60 ml Plasmafrees Blut) aus dem Blutspendezentrum des Universitätsklinikums Eppendorf (Hamburg) verwendet. Für die Zellisolierung wurde das Blut zunächst 1:2 mit PBS/EDTA verdünnt und über einem Ficoll-Gradienten aufgereinigt. Es wurden 10 ml Biocoll von Biochrom (Berlin) vorsichtig mit 25 ml des Blutgemisches überschichtet und 30 min bei 150 x g zentrifugiert. Wichtig war an dieser Stelle, die Bremswirkung der Zentrifuge zu inaktivieren. Die sich anschließend in der Interphase befindlichen PBMCs wurden in 50 ml kaltes PBS/EDTA überführt und für 5 min bei 300 x g pelletiert. Die Bremswirkung der Zentrifuge wurde wieder aktiviert. Der Waschschrift wurde zwei Mal wiederholt, die Zellen anschließend in DC-RPMI-Medium aufgenommen und kultiviert.

### 3.3.5 Anreicherung von Monozyten

Die Anreicherung von Monozyten erfolgte entweder direkt in IgG-beschichtete Kulturplatten oder über einen Zwischenschritt mit dem RosetteSep<sup>®</sup> Human Monocyte Enrichment Cocktail von Stemcell (Grenoble, Frankreich) verwendet. Über den Antikörper-Cocktail wurden nicht benötigte Zellen des Blutes vernetzt, so dass diese zusammen mit den Erythrozyten im Ficoll Gradienten pelletiert werden. Der Cocktail ist primär für eine Anreicherung von Monozyten aus Vollblut entwickelt worden, konnte aber nach Angaben des Herstellers ebenfalls in *Buffy Coats* angewendet werden. Es wurden 50 ml *Buffy Coat* mit 2 ml Antikörpercocktail und 1 mM EDTA vermengt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der in der Interphase befindlichen PBMCs, vornehmlich Monozyten, wie unter 3.3.4 beschrieben.

Die Reinheit der Zellen wurde im FACS mittels CD14-Antikörper-Färbung der Zellen überprüft und die Zellen in 10 ml DC-RPMI einer Dichte von 1 – 3 x 10<sup>7</sup>/ml auf IgG-beschichtete 10 cm Platten verteilt. Ohne den Zwischenschritt der Monozyten-Anreicherung mittels des RosetteSep<sup>®</sup> Human Monocyte Enrichment Cocktails wurden 7 – 10 x 10<sup>7</sup>/ml PBMCs in 10 ml DC-RPMI aufgenommen und auf IgG-beschichtete 10 cm Platten verteilt. Die Monozyten hafteten mit ihrem Fc-Rezeptor fest die IgG-beschichteten Plattenboden an, so dass durch gründliches Waschen mit warmen RPMI alle nicht-

adhärenten Zellen entfernt und die Monozyten-Population angereichert und kultiviert werden konnte.

### **3.3.6 Kultivierung von Dendritischen Zellen (DC)**

Monozyten wurden wie unter 3.3.4 und 3.3.5 aufgereinigt und angereichert und auf IgG-beschichteten Platten in RPMI-DC-Medium ausplattiert. Im Anschluss wurde dem Medium der zytokinhaltige Reifungscocktail I mit 800 U/ml humanen GM-CSF und 400 U/ml IL-4 zugeführt. Nach zwei tägiger Kultivierung wurde den Zellen zusätzlich 5 ml frisches RPMI-DC-Medium mit dem zytokinhaltigen Reifungscocktail II mit 400 U/ml humanen GM-CSF und 400 U/ml IL-4 zugeführt. Während der Differenzierung zu unreifen Dendritischen Zellen lösten sich die Zellen vom beschichteten Boden der 10 cm Platten und konnten an Tag 6 als Suspensionszellen aus dem Überstand geerntet werden. Die unreifen DC wurden auf unbeschichteten 10 cm Platten in 10 ml frischem RPMI-DC-Medium mit zytokinhaltigem Aktivierungscocktail (40 U/ml humanen GM-CSF, 400 U/ml IL-4, 1 µg/ml PEG2, 10 ng/ml TNFα und 1 ng/ml IL-1β) ausplattiert, so dass an Tag 7 und 8 reife Dendritische Zellen geerntet werden konnten.

### **3.3.7 Aktivierung von Jurkat T-Zellen**

Die Aktivierung von Jurkat T-Zellen erfolgte mit Ionomycin und Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Um die Aktivierung zu optimieren, wurde 24 h vor Aktivierung ein Serumentzug vorgenommen und die Zellen in 1 % FKS-haltigen RPMI-Mangelmedium kultiviert. 2 h vor der Aktivierung wurde der FKS-Gehalt im Medium wieder auf 10 % normalisiert und die Zellen anschließend mit Ionomycin (1µM) und PMA (50 ng/ml) aktiviert.

### **3.3.8 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen**

#### **3.3.8.1 Transfektion von 293T-Zellen mit PEI**

Die transiente Transfektion von 293T-Zellen erfolgte mit dem kationisches Polymer PEI (Polyethylenimin, 1 mg/ml), welches im Komplex mit DNA durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wird. 20 h vor Transfektion wurden  $3 \times 10^5$  293T-Zellen pro 6-Well Kulturplatte oder  $4 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Kulturplatte in Antibiotika-freiem DMEM ausgesät. Vor der Transfektion wurde das Medium der 10 cm Platten gegen 5 ml frisches Antibiotika-freies Medium gewechselt, in 6-Well Platten wurde das Medium beibehalten. Für die Transfektion wurden 0,5 – 2 µg DNA (6-Well Platten) oder 12 µg DNA (10 cm Platten) in 300 µl bzw. 1 ml OptiMEM aufgenommen und PEI in dreifacher eingesetzter DNA-Menge hinzugefügt. Der Ansatz wurde gründlich vermischt und nach 10 min Inkubationszeit bei RT vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach 5 - 7 h Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und die Zellen in Antibiotika-haltigen DMEM kultiviert und nach 24 – 48 h geerntet.

### **3.3.8.2 Transfektion von Cos7- und HeLa-Zellen mit TransIT**

Die Transfektion von Cos7- und HeLa-Zellen erfolgte mit TransIT® von Mirus Bio (Madison, WI) nach Angaben des Herstellers. Standardgemäß wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro 6-Well Kulturplatte 20 h vor Transfektion ausgesät, und 5 - 7 h nach Transfektion ein Mediumwechsel in Antibiotika-haltiges DMEM durchgeführt.

### **3.3.8.3 Transfektion von Jurkat T-Zellen mit Lipofectamine 2000**

Für die Lipofektion von Jurkat T-Zellen mit Lipofectamine™ 2000 von Invitrogen (Karlsruhe) wurden am Vorabend  $2 \times 10^6$  Jurkat T-Zellen pro 6-Well Kulturplatte oder  $2 \times 10^7$  Zellen pro 10 cm Kulturplatte in RPMI-Medium ausgesät. Vor der Transfektion wurde das Medium vorsichtig abgenommen und gegen 1,5 ml bzw. 6 ml OptiMEM ausgetauscht. Für den Transfektions-Ansatz der 6-Well Kulturplatte wurden zunächst 500 µl OptiMEM mit 20 µl Lipofectamine™ 2000 vermischt, für 5 Min bei RT inkubiert und anschließend gründlich mit 500 µl OptiMEM und 30 µg DNA vermischt. Für die Transfektion einer 10 cm Schale wurden zunächst 2,5 ml OptiMEM mit 100 µl Lipofectamine™ 2000 vermischt, für 5 Min bei RT inkubiert und anschließend gründlich mit 2,5 ml OptiMEM und 100 µg DNA vermischt. Der gesamte Transfektionsansatz wurde für mindestens 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach 7 h Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium gewechselt, die Zellen in Antibiotika-haltigem RPMI-Medium kultiviert und nach 24 – 48 h geerntet.

### **3.3.8.4 Transfektion von siRNA in Jurkat T-Zellen mit Lipofectamine 2000**

Die Transfektion von Jurkat T-Zellen mit *stealth* siRNA erfolgte in 6-Well Kulturplatten und wurde als dreifach-Ansatz an den Tagen 1, 3 und 5 durchgeführt. Es wurden am Vorabend  $2 \times 10^6$  Jurkat T-Zellen pro 6-Well Kulturplatte in RPMI-Medium ausgesät. Vor der Transfektion wurde das Medium vorsichtig abgenommen und gegen 1,5 ml OptiMEM ausgetauscht. Für den Transfektions-Ansatz wurden zunächst 500 µl OptiMEM mit 20 µl Lipofectamine™ 2000 vermischt, für 5 Min bei RT inkubiert und anschließend gründlich mit 500 µl OptiMEM und 50 µl (1nmol) *stealth* siRNA von Invitrogen (Karlsruhe) vermischt. Der gesamte Transfektionsansatz wurde für mindestens 20 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach 7 h Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium gewechselt, die Zellen in Antibiotika-haltigem RPMI-Medium kultiviert und die Transfektion nach 48 h wiederholt.

### **3.3.8.5 Transfektion von siRNA in Dendritische Zellen mit Lipofectamine 2000**

Die Transfektion von *stealth* siRNA in primären Leukozyten erfolgte in 10 cm Kulturplatten und wurde als dreifach-Ansatz an den Tagen 2, 4 und 6 durchgeführt. An Tag 1 wurden Monozyten wie unter 3.3.5 beschrieben aufgereinigt und auf IgG beschichteten Platten ausgesät und angereichert.

Vor der Transfektion wurde das Medium vorsichtig abgenommen und gegen 5 ml OptiMEM ausgetauscht. Für den Transfektions-Ansatz wurden zunächst 500  $\mu$ l OptiMEM mit 20  $\mu$ l Lipofectamine™ 2000 vermengt, für 5 Min bei RT inkubiert und anschließend gründlich mit 500  $\mu$ l OptiMEM und 50  $\mu$ l (1nmol) *stealth* siRNA von Invitrogen (Karlsruhe) vermischt. Der gesamte Transfektionsansatz wurde für mindestens 20 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach 7 h Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium gewechselt, die Zellen in Antibiotika-haltigem RPMI-DC-Medium mit Reifungscocktail I kultiviert und die Transfektion nach 48 h wiederholt. Die unter 3.3.6 beschriebenen Schritte zur Generierung Dendritischer Zellen wurden eingehalten. An Tag 4 wurde beim Medium-Wechsel der Reifungscocktail II, und an Tag 6 der Aktivierungscocktail hinzugegeben und die sich inzwischen in Suspension befindlichen unreifen Dendritischen Zellen auf neue, unbeschichtete 10 cm Platten überführt.

### **3.3.8.6 Transfektion von siRNA in unreife Dendritische Zellen mittels Elektroporation**

Die Transfektion unreifer Dendritischer Zellen mit *stealth* siRNA mittels Elektroporation erfolgte nach Anleitung von Prectel und Mitarbeitern (Prectel et al., 2007). Es wurde an Tag 4 der DC-Generierung elektroporiert. Monozyten wurden wie unter 3.3.5 beschrieben aufgereinigt, auf IgG beschichteten Platten ausgesät, angereichert und mit dem Reifungscocktail I versehen. An Tag 4 wurden die sich bereits in Suspension befindlichen Zellen von den 10 cm Platten abgespült, mit 10 ml RPMI gewaschen und in einer Dichte von  $4 \times 10^7$  Zellen/ml in OptiMEM aufgenommen. Das zytokinhaltige Medium wurde für den späteren Mediumwechsel aufbewahrt. In einer 4 mm Küvette von Peqlab (Erlangen) wurden 50  $\mu$ l OptiMEM mit 25 - 50  $\mu$ l (500 -1000 nM, ca. 8-16  $\mu$ g) *stealth* siRNA vermengt. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Zellsuspension ( $4 \times 10^6$  Zellen) in die Küvette überführt, gründlich resuspendiert und die Zellsuspension bei 300 Volt, 150  $\mu$ F und 100 Ohm im Gene Pulser II von Biorad (München) elektroporiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf neue, unbeschichtete 10 cm Kulturplatten im aufbewahrten Zytokin-haltigen Medium ausgesät und mit zusätzlichen 5 ml RPMI-DC-Medium und dem Reifungscocktail II versehen. An Tag 7 wurde der Aktivierungscocktail hinzugegeben und die Zellen an Tag 8 und 9 geerntet.

### **3.3.9 Herstellung lentiviraler Partikel in 293T-Zellen**

Für die Hemmung der Genexpression mittels shRNA wurden lentivirale pGsi-Vektoren verwendet, die neben GFP (*green fluorescent protein*) ebenfalls für eine pSUPERSiRNA Kasette kodierten. Diese ermöglichte über einen Polymerase III H1-RNA-Promotor die Expression von shRNA und siRNA. Für die Verpackung der lentiviralen Partikel wurden die lentivirale pGsi-Vektoren zusammen mit den Verpackungsplasmiden pDMLg/pRRE und pRSV-Rev, welche die die *gag-pol* Gene sowie Rev aus HIV-1 exprimierten (Dull et al., 1998), in 293T-Zellen kotransfiziert. Um die Transduktion nahezu aller Zelltypen zu ermöglichen, erfolgte eine Pseudotypisierung mittels des Hüllproteins des Vesikular

Stomatitis Virus VSV-G (Beyer et al., 2002); hierfür wurde das Plasmid pCMV-VSV-G verwendet und ebenfalls kotransfiziert. Für die Kotransfektion zur Virusproduktion wurden 293T-Zellen in 10 cm Schalen mit PEI wie unter 3.3.8.1 beschrieben transfiziert. Es wurden 6 µg lentivirales pGsi-Plasmid, 3 µg pDMLg/pRRE-Vektor, sowie jeweils 1,5 µg pRSV-Rev- und pCMV-VSV-G-Vektor eingesetzt. Der zellfreie Überstand wurde nach 3 Tagen geerntet, filtriert und bei -80°C aufbewahrt.

### **3.3.10 Transduktion adhärenter Zelllinien mit lentiviral verpackter shRNA**

Die Transduktion von 293T-, Cos7- und HeLa-Zellen mit den lentiviral verpackten pGsi-Vektoren erfolgte in 6-Well Kulturplatten. Den subkonfluenten Zellen wurden je Well 1 ml Virusüberstand zusammen mit 2 µl Polybren zugeführt und die 6-Well Platte für 90 min bei 500 x g spinokuliert. Danach wurde der Transduktions-Ansatz für weitere 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem DMEM kultiviert. Nach 24 h konnte die Transduktionseffizienz anhand der GFP Expression überprüft werden und die Zellen für weitere Arbeiten verwendet werden.

### **3.3.11 Zellfärbung für FACS Analyse**

Die Antikörper-Färbung von Zellen für die FACS-Analyse erfolgte mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern von BD Biosciences (Heidelberg). Es wurden  $0,5 - 1,0 \times 10^6$  Zellen für 3 min bei 300 x g pelletiert und in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert. Je 2 µl des jeweiligen Antikörpers wurden hinzugegeben, die Antikörper-Zellsuspension gut vermischt und für mindestens 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und in 400 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Auswertung erfolgte an einem FACS Canto Durchflusszytometer von BD Biosciences (Heidelberg)

### **3.3.12 FACS-basierte Apoptose-Untersuchung**

Für die FACS-basierte Apoptose-Untersuchung wurde das *Dead Cell Apoptosis* Kit von Invitrogen (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Annexin V diente hierbei als Indikator für apoptotische Zellen, während mittels Propidium Iodid (PI) tote Zellen angefärbt wurden. Die Auswertung erfolgte am FACS Canto Durchflusszytometer.

### **3.3.13 Heterokaryon Assay**

Mittels des Heterokaryon Assays konnte untersucht werden, ob sich Proteine zwischen Kern und Zytoplasma bewegen können. Der Assay beruht auf der Fusion von humanen und murinen Zellen. Die humanen Zellen exprimierten transient das zu untersuchende Protein. Bewegte sich ein Protein zwischen Zellkern und Zytoplasma, konnte es nach der Zellfusion im Synzytium sowohl im humanen als auch im murinen Zellkern nachgewiesen werden.

HeLa-Zellen wurden in 6-Well Kulturplatten mit je 0,5 µg verschiedener APRIL-Flag Konstrukte sowie mit 2,5 µg eines Rev-GFP Konstruktes als *shuttle*-Kontrolle kotransfiziert und für 24 h inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden nach 24 h mit Trypsin/EDTA abgelöst und gezählt. Es wurden jeweils  $3 \times 10^4$  HeLa-Zellen und  $4 \times 10^4$  NIH 3T3-Zellen auf Deckgläschen in einer 24-Well Kulturplatte ausgesät. Nach 24 h wurde die Translation der Proteine mit 100 ng/ml Cycloheximid gestoppt. Nach 3 h Inkubation in Cycloheximid wurden die Zellen mit PEG1500 von Roche (Mannheim) fusioniert. Die Deckgläschen wurden auf Parafilm für 2 min in einem Tropfen von 20 µl PEG1500 inkubiert und anschließend dreimal sehr vorsichtig mit 500 µl PBS/Well (warm) gewaschen. Das PBS wurde dabei langsam in die Wells der 24-Well Platte gegeben, damit die fusionierten Zellen nicht von den Deckgläschen gespült werden. Die fusionierten Zellen wurden anschließend für eine weitere Stunde in Cycloheximid-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 % PFA fixiert und für die Visualisierung der Protein-Lokalisation im Fluoreszenz-Mikroskop angefärbt (siehe 3.3.14), oder nach der Fixierung bei 4°C unter Lichtausschluss aufbewahrt.

### 3.3.14 Immunfluoreszenz-Markierung

Für die Visualisierung von APRIL-Flag Fusionsproteinen im Fluoreszenz-Mikroskop erfolgte eine Immunfluoreszenz-Markierung der Proteine. Auf Deckgläschen gewachsene, mit APRIL-Flag Konstrukten transient transfizierte Zellen in 24-Well Kulturplatten wurden mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl 3 % PFA/PBS für 20 min bei RT auf die Deckgläschen fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut 3 x mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl 100 mM Glycin/PBS für 10 min bei RT inkubiert, um die überschüssigen reaktiven Gruppen des PFAs zu blockieren. Es folgte erneut ein dreifacher Waschschrift mit PBS, an welchen sich die Permeabilisierung der Zellen anschloss. Hierfür wurden die Zellen in je 500 µl 0,1 % Triton X-100/PBS für exakt 5 min bei RT inkubiert. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen erneut 3 x mit PBS gewaschen und für die anschließende Antikörper-Färbung für 30 min in 500 µl 0,5 % BSA/PBS inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf Parafilm für 30 min in einem Tropfen von 50 µl anti-Flag Antikörper (1:1000 in 0,5 % BSA/PBS) inkubiert. Nach einem dreifachen Waschschrift in PBS folgte die Sekundär-Antikörperfärbung in 50 µl anti-Maus Cy3. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Zellkernfärbung in der 24-Well Platte mit 300 µl Hoechst 33258 (50 ng/ml) je Well für 10 min. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen, zwischen den einzelnen Waschschriften wurden die Zellen jeweils 10 – 15 min in PBS inkubiert. Vor der Einbettung der Deckgläschen in 20 µl Mowiol auf einem Objektträger wurden die Deckgläschen in sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Filterpapier trockengesaugt. Die Objektträger wurden bis zur Detektion der Flag-Fusionsproteine Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 2000/ Zeiss) bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

### **3.4 Zellbiologische Arbeiten mit embryonalen Stammzellen (ES-Zellen)**

Alle Arbeiten mit murinen embryonalen Stammzellen wurden in der Servicegruppe „Transgene Tiere“ des Zentrum für Molekulare Neurobiologie (ZMNH, Hamburg) entweder unter Anleitung oder von den Mitarbeitern (Dr. Irm Hermans-Borgmeyer, Sarah Homann) durchgeführt.

#### **3.4.1 Murine embryonale Fibroblasten als *Feeder*-Zellen für die embryonale Stammzellkultur**

ES-Zellen wurden auf einer Einzelzellschicht von *Feeder*-Zellen kultiviert, um die Pluripotenz der ES-Zellen zu erhalten. Hierbei handelte es sich um mitotisch inaktivierte murine embryonale Fibroblasten (MEF). Die MEF-Zellen enthielten ein Neomycin-Resistenzgen, um auch während der Antibiotika-Selektion embryonaler Stammzellen mit G418 (Geneticin) als *Feeder*-Zellen fungieren zu können.

##### **3.4.1.1 Kultivierung von MEF-Zellen**

Die Kultivierung der MEF-Zellen erfolgte in 15 cm Platten in 25 ml DMEM-Glutamax-Medium bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer humiden Atmosphäre (95 % relative Luftfeuchtigkeit). Die nach ca. drei Tagen konfluent gewachsenen Zellen wurden im Verhältnis 1:3 oder 1:4 passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit 25 ml PBS gewaschen, anschließend mit 3 ml 0,05 % Trypsin/EDTA vom Plattenboden gelöst (3 - 5 min Inkubationszeit bei 37°C), in 30 ml frischem Medium resuspendiert und auf drei oder vier neuen 15 cm Platten mit jeweils 20 ml Medium verteilt. Das Trypsin/EDTA wurde aufgrund des Überschusses an Kulturmedium inaktiviert. Nach weiteren drei Tagen wurden die Zellen entweder erneut passagiert, oder mit Mitomycin C (MMC) mitotisch inaktiviert und für die embryonale Stammzell-Kultivierung verwendet.

##### **3.4.1.2 Mitotische Inaktivierung von MEF-Zellen**

Damit die MEF-Zellen in ihrer Aufgabe als *Feeder*-Zellen nicht die embryonalen Stammzellen überwachsen und diese ihre pluripotenten Eigenschaften verlieren, wurden die MEF-Zellen mit Mitomycin C mitotisch inaktiviert. Mitomycin C blockiert den weiteren Zellzyklus, indem es den DNA-Doppelstrang quervernetzt.

Konfluent gewachsene MEF-Zellen in 15 cm Platten wurden für 2 - 3h bei 37°C in MMC-haltigen DMEM-Glutamax-Medium (10 µg MMC/ ml) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen zwei Mal mit 25 ml PBS gewaschen, trypsiniert und in einem 50 ml Falcon in 10 ml frischem Medium aufgenommen. Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, wurden die Zellen für 5 min bei 250 x g zentrifugiert, in frischem Medium in einer Dichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ ml aufgenommen und auf gelatinisierten Platten in einer Dichte von 5 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> als *Feeder*-Zellen für die embryonale

Stammzellkultur ausplattiert oder in ES-Einfriermedium (1x) für die spätere Verwendung eingefroren..

### **3.4.2 Auftauen und Kultivierung von ES-Zellen**

ES-Zellen wurden auf Einzelzellschichten von *Feeder*-Zellen in DMEM-ES-Medium bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> für JM8.N4, 7,5 % für R1 und einer humiden Atmosphäre (95 % relative Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Neben den üblichen Medien-Zusätzen wie L-Glutamin oder fetalem Kälberserum (FKS) wurde das ES-Medium zudem mit Leukämie-Inhibitions-Faktor (LIF) versetzt, der die Differenzierung der Zellen verhindert. Das Auftauen von kryokonservierten ES-Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen sofort in 5 ml ES-Medium aufgenommen, für 5 min bei 250 x g pelletiert, in frischem ES-Medium aufgenommen und auf gelatinierte *Feeder*-Zellplatten ausgesät. Das Medium wurde täglich gewechselt und die Zellen alle zwei Tage im 1:4 bis 1:6 Verhältnis passagiert. Die Zellen wurden hierfür mit PBS/EDTA gewaschen und mit 1/5 Volumen an 0,25 % Trypsin/EDTA trypsiniert (3 – 5 min Inkubationszeit bei 37°C). Anschließend wurden die Zellen durch gründliches Resuspendieren vereinzelt, in ein Falcon mit mindestens der doppelten Menge ES-Medium überführt und für 5 min bei 250 x g zentrifugiert. Danach wurden die ES-Zellen in frischem ES-Medium aufgenommen und im entsprechenden Verhältnis (1:4 bis 1:6) auf gelatinisierten *Feeder*-Zellplatten aufgeteilt.

### **3.4.3 Elektroporation embryonaler Stammzellen**

In der Vorbereitung für die Elektroporation von ES-Zellen wurden diese in einer 6 cm Kulturschale in einer Dichte von etwa  $2 \times 10^6$  Zellen auf einer Einzelzellschicht von *Feeder*-Zellen ausgesät. Nach zwei tägiger Kultivierung wurden die Zellen auf zwei 10 cm Kulturschale aufgeteilt. Für die Elektroporation wurden je Ansatz  $1 \times 10^7$  Zellen benötigt, was in etwa einer 10 cm Kulturschale entsprach.

Das Medium wurde 2 h vor dem Ablösen der Zellen für die Elektroporation gewechselt. Nach 2 h wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und in 7 ml ES-Medium überführt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1.000 zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 800µl Elektroporationspuffer aufgenommen, mit 30 µg zuvor vorbereiteter linearisierter DNA des Plasmids pMV-APRIL-KO gemischt und in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt. Es wurde im BioRad Elektroporator bei 250 V und 500µF elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min auf Eis gestellt, in ein Falcon mit 10 ml ES-Medium überführt und gleichmäßig auf 5 10 cm Kulturschale mit *Feeder*-Zellen verteilt.

#### **3.4.4 Selektion und Isolierung stabil transfizierter ES-Zellen**

Zur Identifizierung stabil transfizierter ES-Zellen wurde eine Selektion mit G418 (Geneticin) durchgeführt. Diese begann frühestens 24 h nach Elektroporation. Das modifizierte *APRIL*-Gen beinhaltete neben den loxP-Stellen zudem eine Neomycin-Resistenzkassette, so dass stabil transfizierte ES-Zellen im Selektionsmedium überleben konnten. Eine Woche lang wurde täglich das ES-Medium mit 150-250 µg/ml G418 als Selektionszusatz gewechselt. Nach einer Woche Kultivierung wurden die 10 cm Kulturschalen je zwei Mal mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend unter dem Stereomikroskop Kolonien von ES-Zellklonen gepickt. Es wurden nur scharf begrenzte, runde und nicht zu flache Kolonien mit glatter Oberfläche gewählt und mit einer 1-20 µl Pipette gepickt. Jede gepickte Kolonie wurde in ein Well einer 96-Well Kulturplatte mit rundem Boden überführt, in welches bereits 40 µl Trypsin/EDTA vorgelegt waren. Nachdem 2 Reihen der 96-Well Kulturplatte mit gepickten Kolonien bestückt waren, wurde diese für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurde eine weitere 96-Well Kulturplatten mit flachem Boden und einer Einzelzellschicht von *Feeder*-Zellen vorbereitet, in dem das MEF-Medium gegen 160 µl ES-Medium je Well ausgetauscht wurde, in welches die resuspendierten, gründlich vereinzelt ES-Zellen überführt werden konnten.

Insgesamt wurden 192 Kolonien gepickt und auf zwei 96-Well Kulturplatten überführt. Diese wurden in den darauf folgenden Tagen auf jeweils vier 96-Well Kulturplatten aufgeteilt. Jeweils zwei der Kulturplatten dienten der DNA-Analyse (siehe 3.1.8), die anderen beiden Platten wurden bei -80°C weggefroren

#### **3.4.5 Einfrieren von ES-Zellen**

Das Einfrieren der murinen ES-Zellen erfolgte in 96-Well Kulturplatten. 2 h vor dem Wegfrieren wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden mit 200 µl PBS/EDTA pro Well gewaschen und anschließend mit 40 µl 0,25 % Trypsin/EDTA trypsiniert (Inkubationszeit von 3-5 min bei 37°C), gut resuspendiert und das Trypsin mit 60 µl ES-Medium abgestoppt. Die weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. In jedem Well wurden je 100 µl 2 x ES-Einfriermedium unter gründlichem Mischen hinzugefügt. Anschließend wurde die 96-Well Kulturplatte mit Klebeband fest umwickelt und in einer Styroporbox bei -80°C zur Aufbewahrung weggefroren. Nach zwei Tagen konnte die 96-Well Kulturplatte aus der Styroporbox entnommen und im -80°C weiter Schrank gelagert werden.

#### **3.4.6 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten**

Für die Injektion embryonaler Stammzellklone in Blastozysten wurden Klone der JM8.N4 ES-Zelllinie verwendet, welche im Rahmen des EUCOMM Projekts etabliert und über das Helmholtz-Zentrum München vertrieben wurden. Es standen insgesamt vier ES-Zellklone zur Verfügung: HEPD0503\_1\_B01, HEPD0503\_1\_E01, HEPD0503\_1\_F01 und HEPD0503\_1\_H01.

Die Injektion der ES-Zellen in Blastozysten von Balb/c Spendertieren wurde von Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann der Servicegruppe „Transgene Tiere“ des Zentrum für Molekulare Neurobiologie (ZMNH, Hamburg) durchgeführt.

### **3.4.7 Implantation der Blastozysten in pseudoträchtige Ammen zur Herstellung chimärer Mäuse**

Die Implantation von Blastozysten in die Uteri pseudoträchtiger Ammentiere wurde von Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann der Servicegruppe „Transgene Tiere“ des Zentrum für Molekulare Neurobiologie (ZMNH, Hamburg) durchgeführt.

## **3.5 Zucht von Mäusen**

Die Verpaarung und Zucht der Mäuse wurde im Tierhaus des HPI (Hamburg) entweder unter Anleitung oder von den Tierpflegern des Tierstalls durchgeführt. Die Mäuse wurden bei 21°C Raumtemperatur und 50 % Luftfeuchtigkeit in Typ II Käfigen gehalten. Für die Zucht wurden Typ II *long* Käfige verwendet. Im Alter von 3 Wochen wurden die Tiere abgesetzt. Schwanzbiopsien wurden im Alter von 4-6 Wochen durchgeführt. Verpaarungen erfolgten ab einem Alter von 8 Wochen (Männchen) und 10 Wochen (Weibchen).

## 4 Ergebnisse

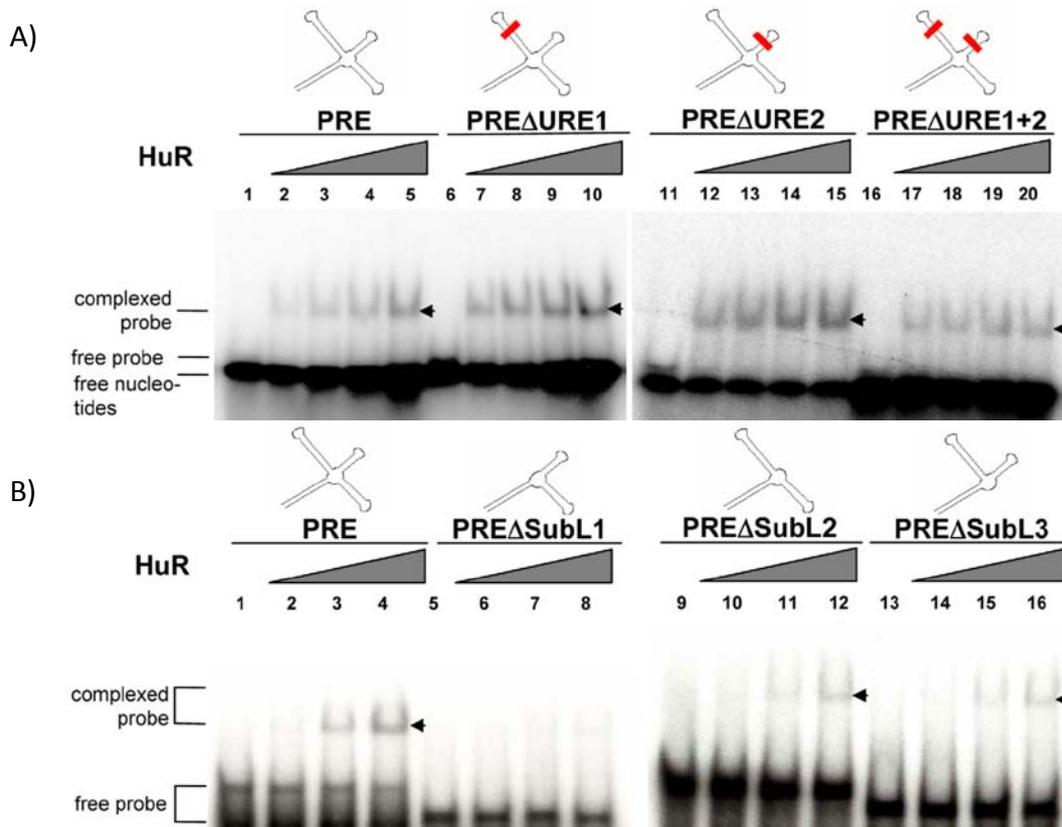
Im Fokus dieser Arbeit steht das Phosphoprotein APRIL, welches der Familie der stark konservierten Anp32-Proteine (*acidic nuclear phosphoproteins*) angehört und häufig auch als Anp32b, PAL31 oder PHAP1b bezeichnet wird. Die genauen Funktionen des Proteins sind bis heute noch nicht im Detail erforscht, obgleich APRIL – wie auch einigen seiner Familienmitglieder – die Beteiligung an der Regulation einer Reihe unterschiedlicher Prozesse zugeschrieben werden konnte, wie beispielsweise der Proliferation oder auch der Apoptose (Sun et al., 2001; Amasaki et al., 2003). Als Alleinstellungsmerkmal von APRIL wurde bisher dessen Beteiligung an der epigenetischen Genregulation als Histon-Chaperon oder auch die Rolle als Caspase-Substrat beschrieben (Munemasa et al., 2008; Tochio et al., 2010; Shen et al., 2010). Eine weitere spezifische Funktion von APRIL wurde im Zusammenhang des CRM1-abhängigen mRNA-Transports beschrieben (Fries et al., 2007; Bodem et al., 2011).

Im Lauf der letzten Jahre konnten eine ganze Reihe zellulärer mRNAs identifiziert werden, die nicht den als Haupt-Transportweg beschriebenen TAP/NXF1-Komplex für den nukleozytoplasmatischen Transport nutzen (Keene, 2003), sondern die CRM1-abhängig vom Zellkern in das Zytoplasma transportiert werden (Jang et al., 2003; Kimura et al., 2004; Tsai et al., 2010). Als CRM1-abhängige mRNAs konnte weiterhin eine Subpopulation spezifischer zellulärer mRNAs identifiziert werden, die unter anderem für wichtige Genprodukte der Immunantwort kodieren, so auch für das Transkript von CD83 (Schütz et al., 2006). CD83 ist ein Glykoprotein, welches unter anderem auf der Oberfläche reifer immunkompetenter Dendritischer Zellen (DC) exprimiert wird. Die genauen Funktionen von CD83 konnten bis heute noch nicht geklärt werden, doch die Ergebnisse zahlreicher Studien lassen darauf schließen, dass CD83 sowohl bei der Aktivierung der zellulären Immunantwort als auch bei der körpereigenen Immunsuppression zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen eine funktionelle Bedeutung hat (Lechmann et al., 2001; Scholler et al., 2002; Zinser et al., 2004; Matilla and Radrizzani, 2005). Die genauere Analyse des nukleozytoplasmatischen Transports der CD83 mRNA zeigte, dass das CD83 Transkript mit dem zellulären *shuttle*-Protein HuR interagiert (Prechtel et al., 2006). Hierbei erfolgt die direkte Bindung des *shuttle*-Proteins an ein *cis*-regulatorisches RNA-Element innerhalb des offenen Leserahmens der CD83 mRNA. HuR selbst besitzt kein nukleäres Exportsignal, das von CRM1 erkannt wird. Das Protein APRIL, das von Brennan und Mitarbeitern (Brennan et al., 2000) als HuR-Ligand identifiziert wurde, stellt daher die Verbindung zwischen dem HuR:CD83 mRNA Ribonukleoprotein-Komplex (Prechtel et al., 2006) her und fungiert somit im CRM1-abhängigen CD83 mRNA-Transport als wichtiges Adaptorprotein (Fries et al., 2007).

Um die Bedeutung von APRIL bei der Regulation der CD83 Expression weiter und detaillierter zu analysieren, wurde im ersten Teil dieser Arbeit zunächst das Phosphoprotein APRIL detailliert charakterisiert und anschließend die APRIL-abhängige Regulation der CD83 Expression in primären Dendritischen Zellen untersucht. Ein weiterer Teil dieser Arbeit widmete sich der Konstruktion einer konditionellen APRIL *knockout* Mauslinie, um die Beteiligung von APRIL im Hinblick auf den komplexen Vorgang der zellulären Immunantwort im Tiermodell zu untersuchen.

#### **4.1 Teil I – Detaillierte Charakterisierung des Phosphoproteins APRIL und dessen Einfluss auf die Regulation der CD83 Expression *in vitro***

Der nukleozytoplasmatische Transport der CD83 mRNA erfolgt unter Verwendung des Exportrezeptors CRM1 mit Beteiligung des *shuttle*-Protein HuR und unter Mithilfe des HuR-Liganden APRIL. Wie beschrieben, interagiert dabei die CD83 mRNA mit HuR über ein *cis*-aktives, posttranskriptionelles regulatorisches Element (*posttranscriptional regulatory element* bzw. PRE), welches im kodieren Bereich der CD83 mRNA als strukturiertes RNA Element identifiziert werden konnte (Prechtel et al., 2006). *In vitro* Bindungsstudien (*RNA-Mobility-Shift*) mit verschiedenen Mutanten synthetisch hergestellter CD83 mRNA PREs sowie rekombinanten GST-HuR Proteinen machten deutlich, dass es sich bei der Interaktion des CD83 mRNA PREs mit HuR um eine strukturabhängige und nicht sequenzspezifische Bindung handelt. Durch Deletionen einzelner Substrukturen im *stem-loop* des CD83 mRNA PRE wurde die Interaktion des PRE mit HuR vermindert oder gänzlich verhindert (siehe Abbildung 13B). Hingegen hatten Mutationen Uridin-reicher Elemente des PRE, welche wie AU-reiche Sequenzen als typische RNA-Bindestellen für HuR bezeichnet werden, keinerlei Einfluss auf die Interaktion (siehe Abbildung 13A). Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass das PRE in seiner Gesamtstruktur die Interaktion der CD83 mRNA mit HuR vermittelt (Pieper et al., 2011).



**Abbildung 13: Deletionen von Strukturen des *stem-loops* des PREs der CD83 mRNA beeinträchtigen die Interaktion mit HuR (veröffentlicht in Pieper et al., 2011)**

RNA-Mobility Shift von radioaktiv markierter CD83 PRE mRNA mit steigenden Konzentrationen von rekombinanten HuR-GST.

**A)** CD83 PRE-Mutanten\* Uridin-reicher Elementen (URE): PRE-wt – Reihe 1-5; : PRE- $\Delta$ URE1 – Reihe 6-10; : PRE-  $\Delta$ URE2 – Reihe 11-15; PRE-  $\Delta$ URE1+2 – Reihe 16-20; Negativ-Kontrolle GST-only: Reihen 1, 6, 11, 16 (2,2 $\mu$ M); steigende Konzentrationen von HuR-GST: 0,19  $\mu$ M; 0,38  $\mu$ M; 0,57  $\mu$ M; 0,95  $\mu$ M; Reihen 2–5, 7–10, 12–15, und 17–20);

**B)** CD83 PRE-*sub-loop*-Deletions-Mutanten: PRE-wt – Reihe 1-4; : PRE- $\Delta$ SubL1 – Reihe 5-8; : PRE- $\Delta$ SubL2 – Reihe 9-12; PRE-  $\Delta$ SubL3– Reihe 13-16; Negativ-Kontrolle GST-only: Reihen 1, 5, 9, 13 (2,2 $\mu$ M); steigende Konzentrationen von HuR-GST: 0,237  $\mu$ M; 0,475  $\mu$ M; 0,95  $\mu$ M; Reihen 2–4, 6–8, 10–12, und 14–16)

\*über Mutations-PCR etablierte Mutanten

HuR selbst bindet nicht an CRM1, die Interaktion wird von den HuR-Liganden pp32 und/oder APRIL, die beide der Familie der Phosphoproteine Anp32 angehören, vermittelt (Brennan et al., 2000). Diese interagieren über ihre Leuzin-reichen Domänen mit CRM1 und fungieren somit als Adaptorproteine zwischen HuR und CRM1. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass beim nukleozytoplasmatischen Transport des HuR:CD83 mRNA Ribonukleoprotein-Komplexes das Phosphoprotein APRIL, nicht aber pp32, als Adaptorprotein zwischen HuR und CRM1 fungiert (Fries et al., 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von APRIL an Position Threonin 244 (T244) für die *shuttle*-Fähigkeit des Proteins notwendig ist. Hierbei phosphoryliert die Proteinkinase CK2 APRIL an T244 und reguliert somit das *shuttling* von APRIL und infolgedessen auch die Expression von CD83 (Chemnitz et al., 2009).

#### 4.1.1 Die CK2 Untereinheit $\alpha'$ reguliert die CD83 Expression

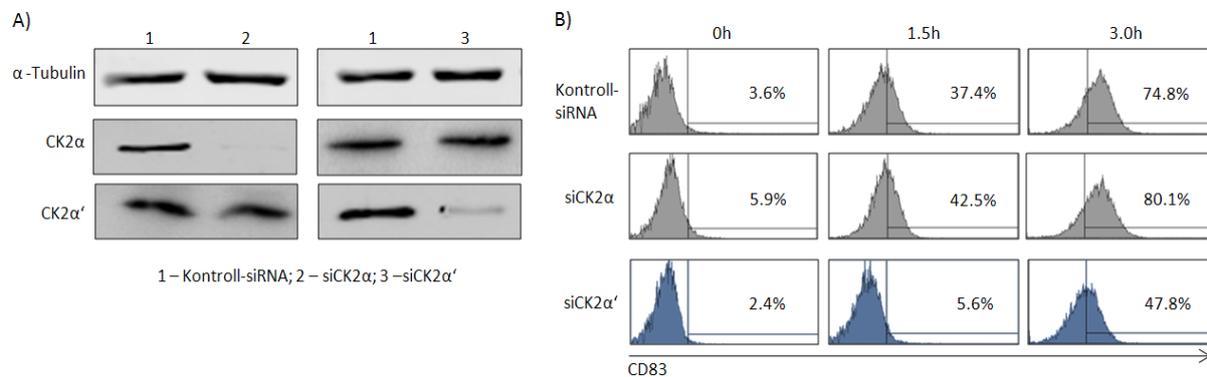
Die Proteinkinase CK2 ist ein Holoenzym, welches sich aus den katalytischen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$  sowie der regulatorischen Untereinheit  $\beta$  zusammensetzt (Cochet and Chambaz, 1983). In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits dargestellt, dass die Proteinkinase CK2 APRIL an Position T244 phosphoryliert und diese posttranskriptionelle Modifikation das *shuttle*-Verhalten des Proteins und somit die CD83 Expression reguliert (Chemnitz et al., 2009). Zudem konnten Chemnitz und Mitarbeiter in *in vitro* Studien zeigen, dass die CK2 Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$  Unterschiede in ihrer T244-spezifischen Kinase-Aktivität aufwiesen: CK2 $\alpha$  allein war nicht in der Lage, APRIL an T244 zu phosphorylieren, im Gegensatz zur CK2 Untereinheit  $\alpha'$ . Die Rolle der CK2 Untereinheit  $\alpha'$  in Hinblick auf die Regulation der CD83 Expression wurde im Folgenden in *in vivo* Untersuchungen mittels RNA-Interferenz (RNAi) weiter verifiziert.

##### 4.1.1.1 Silencing der CK2 Untereinheiten $\alpha$ und $\alpha'$ in Jurkat T-Zellen

Das Glykoprotein CD83 findet sich vor allem auf reifen Dendritischen Zellen, aber auch aktivierte B- und T-Zellen exprimieren das Oberflächenmolekül (Zhou et al., 1992; McKinsey et al., 2000; Wolenski et al., 2003), wie z.B. Jurkat T-Zellen. So exprimiert diese Zelllinie 2-3 h nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin endogenes CD83 auf der Oberfläche und stellt somit ein physiologisch relevantes Zellsystem dar, um die Regulation der CD83 Expression zu untersuchen. Im *knockdown* Experiment wurde in Jurkat T-Zellen der Einfluss der CK2 Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$  auf die Regulation der endogenen CD83 Expression analysiert.

Jurkat T-Zellen wurden mit spezifischer *stealth* siRNA transfiziert, die gegen die Untereinheiten  $\alpha$  bzw.  $\alpha'$  der Proteinkinase CK2 gerichtet war. Im Kontrollansatz wurde eine Kontroll-siRNA transfiziert. Der *knockdown* der Untereinheiten wurde im Immunoblot bestätigt (siehe Abbildung 14A) und anschließend wurde die CD83 Expression der Jurkat T-Zellen nach Aktivierung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Das *silencing* der CK2 $\alpha$  Untereinheit führte dabei zu keinem Unterschied in der Stärke der CD83 Expression im Vergleich zu den mit einer Kontroll-siRNA behandelten Jurkat T-Zellen (siehe Abbildung 14B). Die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen exprimierten nach 1,5 h 37,4 % CD83, die siCK2 $\alpha$  transfizierten Zellen vergleichbare 42,5 %. Auch 3 h nach Aktivierung wurden keine auffälligen Unterschiede in der CD83 Expression der siCK2 $\alpha$ -Zellen im Vergleich zu den Kontroll-siRNA-Zellen detektiert (74,8 % und 80,1 %). Im Gegensatz dazu konnte aufgrund der RNAi-vermittelten Reduktion der CK2 $\alpha'$  Untereinheit eine um fast die Hälfte verminderte CD83 Expression von nur noch 5,6 % (1,5 h nach Aktivierung) bzw. 47,8 % (3,0 h nach Aktivierung) beobachtet werden. Diese Ergebnisse in lebenden Zellen bestätigten sehr deutlich die früheren *in vitro* Beobachtungen der CK2 $\alpha'$ -abhängigen Phosphorylierung von APRIL an T244

(Chemnitz et al., 2009). Es kann deshalb gefolgert werden, dass die CK2 Untereinheit  $\alpha'$  auch *in vivo* durch Phosphorylierung des *shuttle*-Proteins APRIL an T244 die CD83 Expression reguliert.



**Abbildung 14: Knock down der CK2 Untereinheit  $\alpha'$ , aber nicht  $\alpha$ , vermindert die CD83 Expression aktivierter Jurkat T-Zellen:**

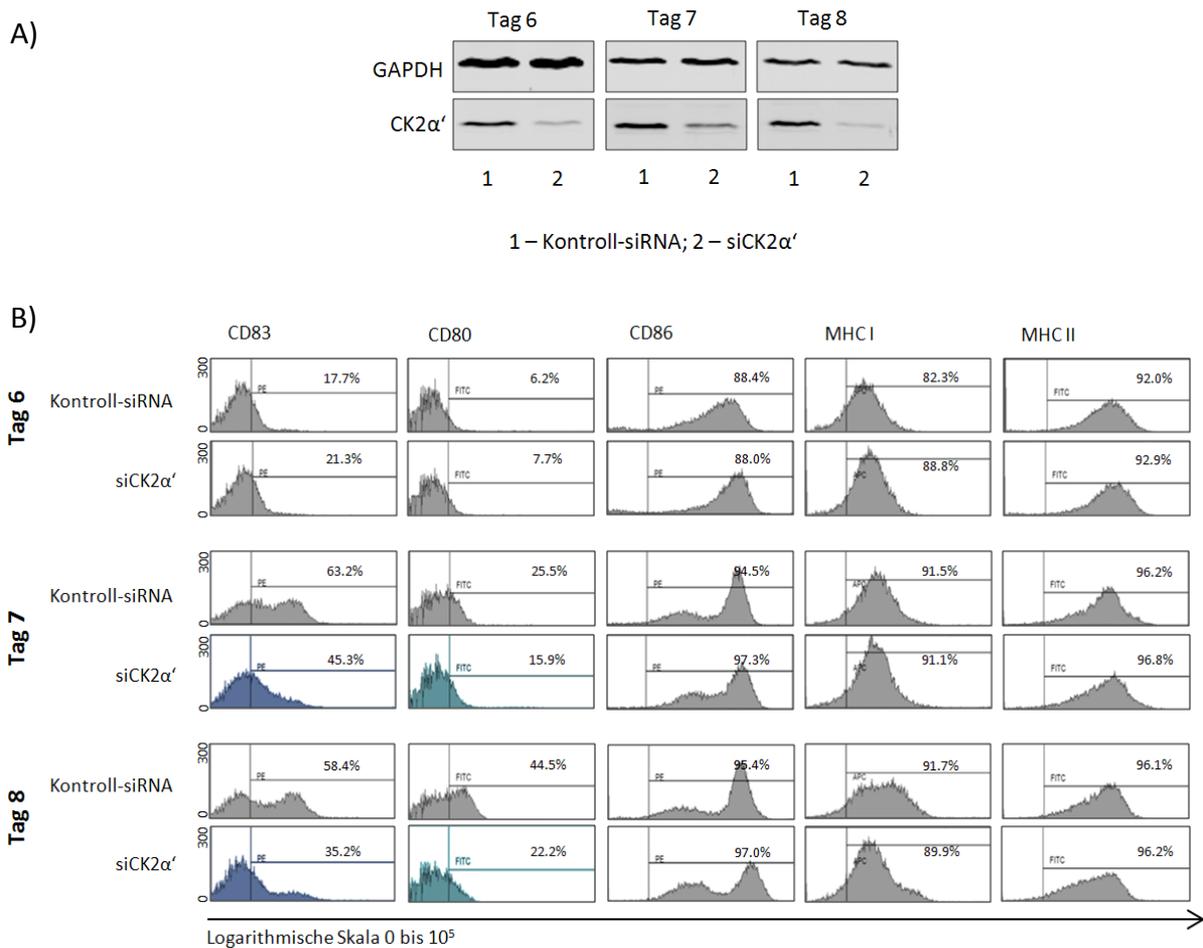
Jurkat T-Zellen wurden an Tag 1, 3 und 5 mit spezifischer *stealth* siRNA gegen CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  sowie einer Kontroll-siRNA transfiziert. Nach Serum-Entzug an Tag 6 wurden die Zellen an Tag 7 mit PMA und Ionomycin aktiviert. Es wurden 0 h, 1,5 h und 3 h nach Aktivierung jeweils Proben zur Protein- und FACS-Analyse entnommen.

**A)** Im Immunoblot wurde der *knock down* von CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  überprüft. Der Blot wurde mit spezifischen Antikörpern gegen CK2 $\alpha$  und CK2 $\alpha'$  sowie gegen  $\alpha$ -Tubulin als Ladekontrolle angefärbt. Mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper wurden die spezifischen Banden im Röntgenfilm via Chemilumineszenz detektiert.

**B)** FACS-Analyse der CD83 Expression: Die Zellen wurden mit anti-CD83-PE gefärbt und die CD83 Expression 0 h, 1,5 h und 3 h nach Aktivierung am FACS gemessen. Im Vergleich von siControl- und siCK2 $\alpha$ -Zellen ist die CD83 Expression der siCK2 $\alpha'$ -Zellen stark vermindert (in blau).

#### 4.1.1.2 Silencing der CK2 Untereinheit $\alpha'$ in primären aus Monozyten generierten Dendritischen Zellen

Nachdem im physiologisch relevanten Jurkat T-Zellsystem die CK2 $\alpha'$ -abhängige Regulation der CD83 Expression mittels RNAi verdeutlicht werden konnte, wurde anschließend das *silencing* der  $\alpha'$ -Untereinheit mit *stealth* siRNA in dem wesentlich komplexeren, aber lebensnaheren System der primären Dendritischen Zellen (DC) wiederholt. Reife DC exprimieren das Oberflächenprotein CD83 auf ihrer Oberfläche, welches für Aktivierung der zellulären Immunantwort erforderlich zu sein scheint. *Ex vivo* aus primären Monozyten generierte reife Dendritische Zellen exprimieren nach TNF $\alpha$ -abhängiger Aktivierung CD83 (Zhou and Tedder, 1996) und stellen das am weitesten entwickelte *in vitro* System zur Untersuchung der CK2 $\alpha'$ -abhängigen Regulation der CD83 Expression dar. Die Analyse dieser Experimente zeigte, dass das *silencing* der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit auch in primären DC – wie schon zuvor im Jurkat T-Zellsystem – zu einer verminderten Expression des CD83 Moleküls führte (siehe Abbildung 15B, in blau).



**Abbildung 15: Knock down der Untereinheit CK2α' verringert die CD83 Expression reifer DC:**

Aus CD14<sup>+</sup> Monozyten, isoliert aus humanem Blut, wurden mittels Zytokin-haltiger Reifungscocktails reife Dendritische Zellen generiert. An Tag 2, 4 und 6 des Reifungsprozesses wurden die Zellen jeweils mit spezifischer *stealth* siRNA gegen die CK2 Untereinheit α' sowie einer Kontroll-siRNA transfiziert und an Tag 6 mittels TNFα, PEG2 und IL-1β aktiviert. An den Tagen 6, 7 und 8 wurden sowohl Proben für die Analyse des *knock down* Effekts im Westernblot als auch Proben für die Untersuchung des DC-Reifungsprozesses im FACS entnommen.

**A)** Untersuchung der CK2α' Expression im Westernblot an Tag 6, 7 und 8: Die Immunoblots wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CK2α' sowie gegen GAPDH als Ladekontrolle angefärbt. Mittels IREdye markierten Sekundäntikörper wurden die spezifischen Banden im LI-COR Odyssey Imaging System über Fluoreszenz detektiert.

**B)** FACS-Analyse Dendritischer Zellen: Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten CD83-Antikörpern sowie Antikörpern gegen typische und spezifischen Oberflächenmarker reifer Dendritischer Zellen zur Kontrolle der Aktivierung gefärbt (CD80, CD86, MHC-I und MHC II). Die Abbildung zeigt die FACS-Daten von Tag 6 (vor Aktivierung) und den Tagen 7 und 8 (nach Aktivierung).

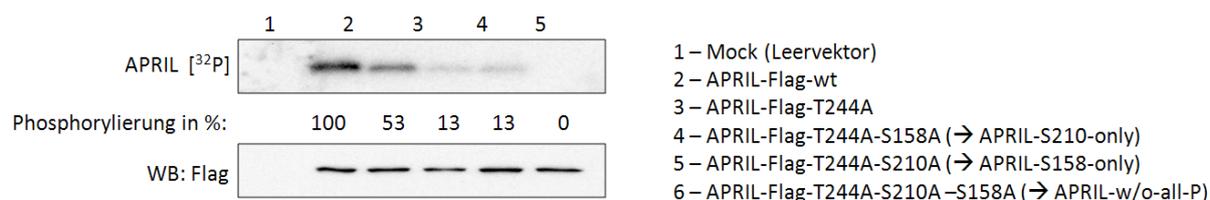
Die CK2-abhängige Regulation der CD83 Expression konnte somit auch hier bestätigt werden. Interessanterweise wurde zudem eine Reduktion der Oberflächenmoleküle CD80 und MHC I detektiert (siehe Abbildung 15B, in grün), was darauf schließen lässt, dass die CK2 -Untereinheit auch bei der Regulation dieser Oberflächenmoleküle eine Rolle spielen könnte.

#### **4.1.2 Charakterisierung des Phosphoproteins APRIL**

Die Identifizierung der CK2-abhängigen Modifikation von APRIL an T244 bestätigte frühere Beobachtungen, dass APRIL – wie die meisten Mitglieder der ANP32-Familie – durch Protein-Phosphorylierungen posttranslational modifiziert werden kann (Matilla and Radrizzani, 2005). Nachdem bereits ein durch CK2 regulierter Phosphatakzeptor in APRIL (T244) identifiziert worden war (Fries et al., 2007), sollten nun weitere potentielle Phosphorylierungsstellen in APRIL untersucht werden.

##### **4.1.2.1 Das Phosphoprotein APRIL wird an den Positionen S158, S210 und T244 phosphoryliert**

Zur Bestätigung weiterer Phosphorylierungsstellen wurden verschiedene Phosphorylierungs-Mutanten von APRIL hergestellt und in einer *de novo* Phosphorylierungs-Studie *in vivo* analysiert. Die Phosphorylierungs-defiziente Punktmutante APRIL-T244A wies in der [<sup>32</sup>P]-markierten *de novo* Phosphorylierung eine Rest-Phosphorylierungsaktivität von 53 % auf (siehe Abbildung 16, Reihe 3). Es konnte folglich davon ausgegangen werden, dass APRIL an noch mindestens einer weiteren Position phosphoryliert wird. Die *de novo* Phosphorylierungen der Punktmutanten APRIL-T244A-S210A und APRIL-T244A-S158A (im weiteren Verlauf als APRIL-S158-only bzw. APRIL-S210-only bezeichnet) zeigten, dass bei beiden Mutanten immer noch eine Phosphorylierungsaktivität von je 13 % detektiert werden konnte. Die Punktmutante APRIL-T244A-S210A-S158A (im weiteren Verlauf als APRIL-w/o-all-P bezeichnet) dagegen konnte in der *de novo* Phosphorylierungs-Studie nicht mehr phosphoryliert werden (siehe Abbildung 16, Reihe 6). Somit kann festgehalten werden, dass APRIL in menschlichen aktivierten lymphoiden Zellen neben T244 an noch zwei weiteren Positionen über Phosphorylierung modifiziert wird: S158 und S210. Weitere Phosphorylierungsstellen liegen in APRIL anscheinend nicht vor.



**Abbildung 16: De novo Phosphorylierungs-Studie des Phosphoproteins APRIL**

Jurkat T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für verschiedene APRIL-Flag Fusionsproteine transfiziert (Wildtyp und Phosphorylierungs-Mutanten). Die Zellen wurden mit PMA und Ionomycin aktiviert und mit [<sup>32</sup>P]ortho-Phosphat behandelt, um die *de novo* Phosphorylierung zu detektieren.

Die immunpräzipitierten APRIL-Flag Fusionsproteine wurden über ein SDS-Gel aufgetrennt und die Phosphorylierung im Autoradiogramm visualisiert (obere Reihe). Die Intensität der Phosphorylierung wurde über eine *Phosphor Imaging Plate* detektiert und am Fujifilm BAS-2500 Scanner quantifiziert. Die Phosphorylierung des Wildtyps diente dabei als positiv-Kontrolle und wurde als 100 % bezeichnet (Reihe 2). Die Punktmutante APRIL-T244A wurde noch zu 53 % phosphoryliert (Reihe 3), die Phosphorylierungs-Mutanten APRIL-T244A-S158A und APRIL-T244A-S158A wiesen jeweils noch eine Phosphorylierung von 13 % auf (Reihe 4 und 5). Bei der Phosphorylierungs-Mutanten APRIL-T244A-S210A-S158A konnte keine Phosphorylierung detektiert werden (Reihe 6).

Als Ladekontrolle wurden die immunpräzipitierten APRIL-Flag Fusionsproteine im Westernblot (WB) mittels eines spezifischen Flag-Antikörpers nachgewiesen (untere Reihe).

Nachdem die Phosphorylierungsstelle T244 bereits früher detailliert beschrieben wurde (Fries et al., 2007; Chemnitz et al., 2009), sollte nun das Phosphoprotein APRIL vor allem in Hinblick auf die Phosphorylierungsstellen S158 und S210 untersucht und charakterisiert werden. Zunächst galt es, die Proteinkinasen, welche APRIL an den Positionen S158 und S210 phosphorylieren, zu identifizieren. Anschließend wurde untersucht, ob die Phosphorylierungen von S158 und S210 wie auch T244 eine Rolle beim nukleozytoplasmatischen Transport des *shuttle*-Proteins APRIL spielen. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob sich die Phosphorylierungen an S158, S210 und T244 auf die Halbwertszeit und somit die Stabilität des Proteins auswirken.

Zur Charakterisierung des Phosphoproteins APRIL wurden unterschiedlichen Phosphorylierungs-Mutanten verwendet. Die verschiedenen Varianten der Mutationen sind im Folgenden beschrieben:

Name	Mutation	Verwendung
APRIL-wt	Wildtyp; Phosphorylierungs-kompetent an allen 3 Positionen	Positiv-Kontrolle in allen Experimenten
APRIL-w/o-all-P	Vollständige Phosphorylierungs-defiziente Mutante: alle drei Phosphorylierungspositionen sind mutiert (S158, S210 und T244 zu A158, A210 und A244); das Protein kann nicht mehr phosphoryliert werden	Negativ-Kontrolle in den Phosphorylierungs-Assays zur Identifizierung der S158 und S210 Kinase
APRIL-S158-only	Phosphorylierungs-defiziente Mutante; zwei der drei Phosphorylierungspositionen sind	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Phosphorylierungs-Assay zur

	mutiert (S210 und T244 zu A210 und A244); das Protein kann nur noch an Position S158 phosphoryliert werden	Identifizierung der S158 und S210 Kinase
APRIL-S210-only	Phosphorylierungs-defiziente Mutante; zwei der drei Phosphorylierungspositionen sind mutiert (S158 und T244 zu A158 und A244); das Protein kann nur noch an Position S210 phosphoryliert werden	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Phosphorylierungs-Assay zur Identifizierung der S158 und S210 Kinase
APRIL-T244-only	Phosphorylierungs-defiziente Mutante; zwei der drei Phosphorylierungspositionen sind mutiert (S158 und S210 zu A158 und A210); das Protein kann nur noch an Position T244 phosphoryliert werden	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Phosphorylierungs-Assay zur Identifizierung der S158 und S210 Kinase
APRIL-S158A	Phosphorylierungs-defiziente Punktmutante; S158 wurde zu A158 mutiert und ist somit Phosphorylierungs-inkompetent, S210 und T244 können normal phosphoryliert werden	Lokalisations- und <i>shuttle</i> -Analysen sowie zur Bestimmung der Halbwertszeit
APRIL-S210A	Phosphorylierungs-defiziente Punktmutante; S210 wurde zu A210 mutiert und ist somit Phosphorylierungs-inkompetent, S158 und T244 können normal phosphoryliert werden	Lokalisations- und <i>shuttle</i> -Analysen sowie zur Bestimmung der Halbwertszeit
APRIL-T244A	Phosphorylierungs-defiziente Punktmutante; T244 wurde zu A244 mutiert und ist somit Phosphorylierungs-inkompetent, S158 und S210 können normal phosphoryliert werden	Lokalisations- und <i>shuttle</i> -Analysen sowie zur Bestimmung der Halbwertszeit

#### 4.1.2.2 Die Proteinkinase CK2 phosphoryliert alle drei Phosphorylierungsstellen von APRIL

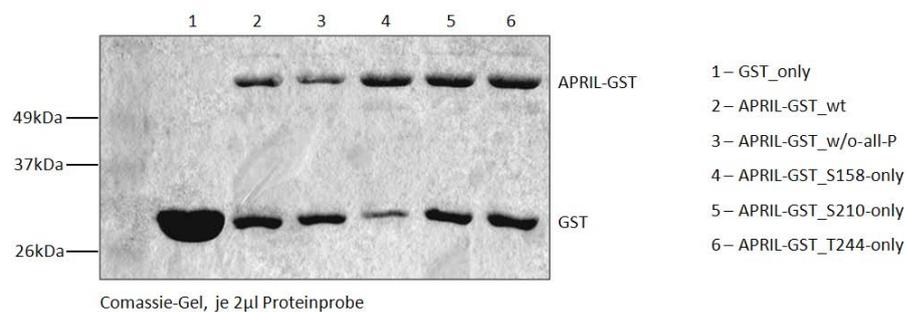
Für die *in silico* Vorhersage möglicher Kinase-Kandidaten der Phosphorylierungen von S158 und S210 wurde die Aminosäure-Sequenz von APRIL mittels der Software „Motif Scan“ (<http://scansite.mit.edu>) analysiert. Es wurde - wie auch schon für T244 - die Proteinkinase CK2 als wahrscheinlichste Kinase für die Phosphorylierungsstellen S158 und S210 vorgeschlagen, wobei für S210 zudem die Serin-Proteinkinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) als mögliche Kinase genannt wurde. Die ATM Kinase ist eine PI3-ähnliche Kinase und wird der Klasse IV der Familie der PI3 Kinasen zugeordnet. Diese Vorhersagen wurden im Folgenden mittels *in vitro* und *in vivo* Phosphorylierungs-Studien der rekombinanten APRIL-Mutanten APRIL-S158-only und APRIL-S210-only in Anwesenheit spezifischer CK2- und ATM Inhibitoren überprüft.

#### ***In vitro* Phosphorylierungs-Studien in Anwesenheit spezifischer Kinase-Inhibitoren**

Um zu untersuchen, welche der vorhergesagten Kinasen eine Phosphorylierung der Phosphatakzeptorstellen S158 und S210 in APRIL vollziehen können, wurden zunächst rekombinante GST-APRIL Fusionsproteine in Anwesenheit spezifischer Kinase-Inhibitoren durch die Kinasen in

zellulären Jurkat-Zellextrakten *in vitro* phosphoryliert. Zur Detektion der *in vitro* Phosphorylierung wurden die Proteine mit radioaktivem [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP phosphoryliert und somit markiert. Durch die Messung der Intensität dieser Markierung im Autoradiogramm war eine Quantifizierung der Hemmung der Phosphorylierung durch die Kinase-Inhibitoren möglich. Aufgrund der *in silico* Vorhersage wurden hochspezifische Inhibitoren der Proteinkinase CK2 und ATM eingesetzt.

Es wurden das APRIL-Wildtyp Protein, die vollständige Phosphorylierungs-defiziente Mutante APRIL-w/o-all-P sowie die APRIL-Mutanten APRIL-S158-only, APRIL-S210-only und APRIL-T244-only als rekombinante GST-Fusionsproteine (APRIL-GST) bakteriell exprimiert und gereinigt (siehe Abbildung 17). Die zuletzt genannten Phosphorylierungs-Mutanten können jeweils nur an einer der drei Positionen phosphoryliert werden, so dass der Effekt eines Kinase-Inhibitors direkt einer bestimmten Phosphorylierungsstelle zugeordnet werden kann. Die APRIL-T244-only Mutante, deren CK2-abhängige Phosphorylierung bereits früher dargestellt wurde (Chemnitz et al., 2009), sowie die vollständige Phosphorylierungs-defiziente APRIL-Mutante und der Wildtyp fungierten als entsprechende positiv- und negativ-Kontrollen.

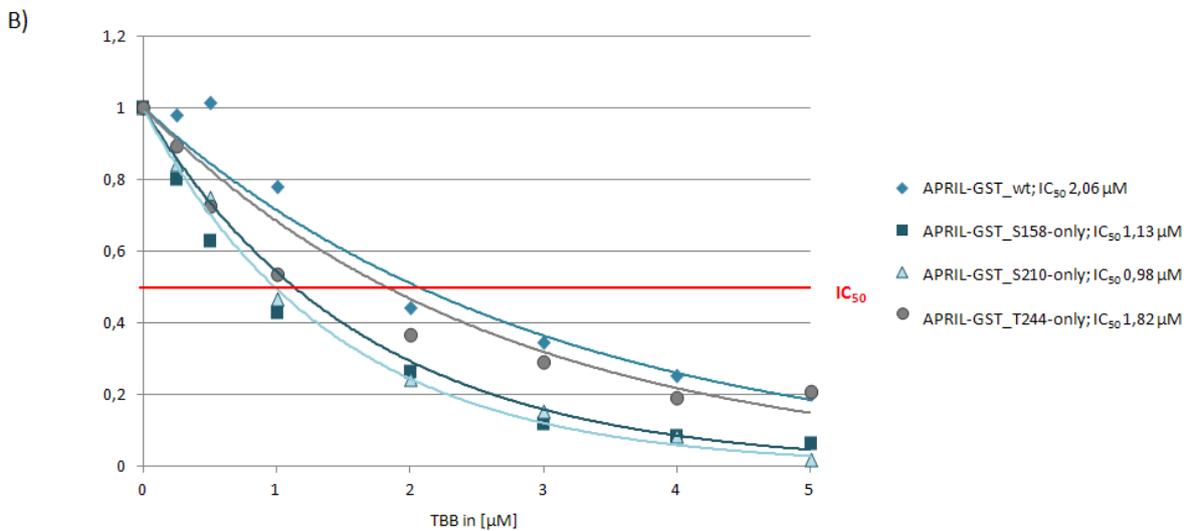
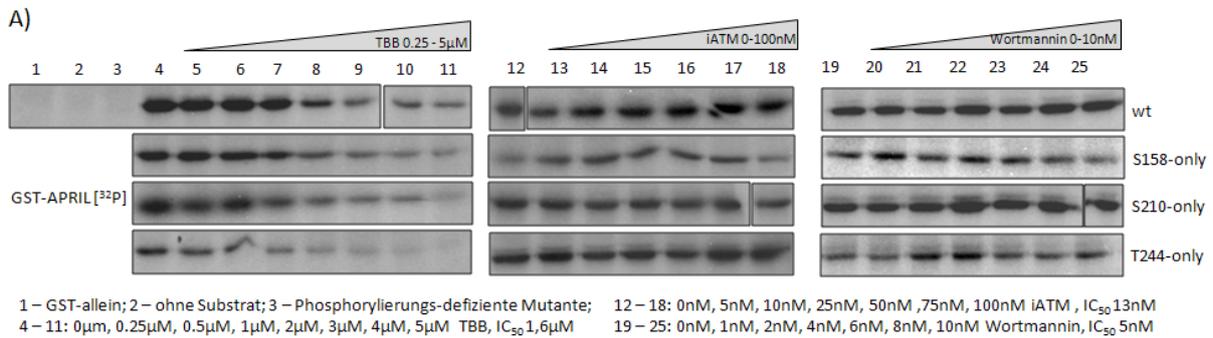


**Abbildung 17: Bakterielle Expression und Aufreinigung von rekombinanten GST-APRIL Fusionsproteinen:** GST-APRIL Fusionsproteine wurden in transformierten *E.coli* BL21 (DE3) exprimiert. Es wurde neben dem Wildtyp (APRIL-GST\_wt) und einer Phosphorylierungs-defizienten Mutante (APRIL-GST\_w/o-all-P) diverse APRIL-GST-Phosphorylierungs-Mutanten transformiert, die jeweils nur an einer der drei Phosphorylierungs-Stellen phosphoryliert werden konnten (APRIL-GST\_S158-only, APRIL-GST\_S210-only und APRIL-GST\_T244-only). Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über eine Gluthation-Sepharose-Matrix. Im Anschluss wurde die Reinheit der Proteine im Comassie-Gel überprüft.

**Endkonzentration:** APRIL-GST\_wt: 2,8  $\mu$ g/ $\mu$ l; APRIL-GST\_w/o-all-P: 1,7  $\mu$ g/ $\mu$ l; APRIL-GST\_S158-only: 2,6  $\mu$ g/ $\mu$ l; APRIL-GST\_S210-only: 2,5  $\mu$ g/ $\mu$ l; APRIL-GST\_T244-only: 3,2  $\mu$ g/ $\mu$ l;

Die spezifischen CK2-Inhibitoren TBB (*4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazole*) und TBCA (*((E)-3-(2,3,4,5-Tetrabromophenyl) acrylic acid*) (Sarno et al., 2001; Pagano et al., 2007) wurden in einer Konzentration von 0,25  $\mu$ M – 5  $\mu$ M eingesetzt. Der im weiteren Verlauf als „iATM“-bezeichnete ATM-Inhibitor *2-Morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one* wurde in einer Konzentration von 5 nM – 100 nM verwendet. Zudem wurde Wortmannin als Inhibitor aller Klassen der PI3-Kinasen in einer Konzentration von 1 nM – 10 nM eingesetzt. Die gewählten Konzentrationen der Inhibitoren

orientierten sich anhand der Angaben zur mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) des Herstellers (siehe Abbildung 18A).



**Abbildung 18: Die Phosphorylierungen von APRIL an den Positionen S158, S210 und T244 können alle mittels spezifischer Casein Kinase 2 (CK2)-Inhibitoren *in vitro* gehemmt werden**

**A)** *In vitro* Phosphorylierungs-Assay mit spezifischen Kinase-Inhibitoren: Die aufgereinigten rekombinanten APRIL-GST Fusionsproteine (APRIL-Wildtyp sowie Phosphorylierungs-Mutanten) wurden zusammen mit Zelllysat von Jurkat T-Zellen und spezifischen Kinase-Inhibitoren in steigender Konzentration bei 37°C für 30 Min inkubiert. Um die Phosphorylierung zu detektieren, wurde radioaktives [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP zum Ansatz hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben zur Inaktivierung bei 95°C aufgeköcht, über ein 12 % SDS-Gel aufgetrennt und die Intensität der Phosphorylierung autoradiographisch detektiert. Aus Platzgründen wurden die aufgereinigten Proteinlysate einer Inhibitor-Konzentrations-Reihe teilweise auf unterschiedlichen Gelen aufgetrennt, dies wurde in den Abbildungen als Bild-Unterbrechung gekennzeichnet.

Es wurden die CK2-spezifischen Inhibitoren TBB (Reihe 4 – 11: 0 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 3 µM, 4 µM, 5 µM) und TBCA (0-5 µM; Daten nicht gezeigt) verwendet, sowie der als iATM bezeichneter ATM-Kinase Inhibitor (Reihe 12 – 18: 0 nM, 5 nM, 10 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM) und der PI3-Inhibitor Wortmannin (Reihe 19 – 25: 0 nM, 1 nM, 2 nM, 4 nM, 6 nM, 8 nM, 10 nM). Die Ergebnisse des CK2-Inhibitors TBCA entsprachen der TBB-abhängigen CK2-Inhibition und wurden nicht gezeigt.

**B)** Quantifizierung der Phosphorylierung und Bestimmung der  $IC_{50}$  der einzelnen Phosphorylierungs-Inhibitionen: der Phosphorylierungs-Grad wurde über eine *Phosphor Imaging Plate* detektiert und am Fujifilm BAS-2500 Scanner quantifiziert. Die  $IC_{50}$  wurde anhand der exponentiellen Trendlinie bestimmt.

Die autoradiographische Auswertung des Experimentes zeigte, dass durch die Verwendung der CK2-spezifischen Kinase-Inhibitoren TBB und TBCA nicht nur die Phosphorylierung an Position T244,

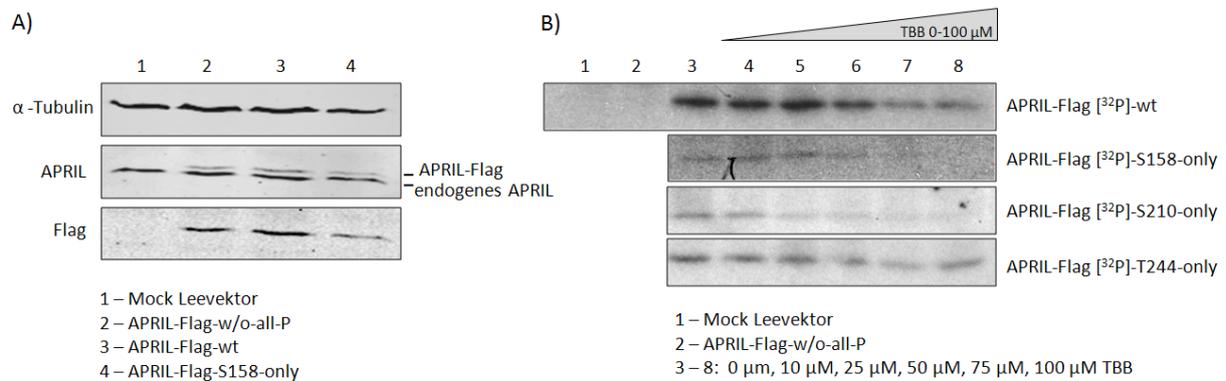
sondern ebenfalls an den Positionen S158 und S210 gehemmt werden kann, da in Anwesenheit der CK2-Inhibitoren die Phosphorylierung aller drei Phosphorylierungsstellen konzentrationsabhängig inhibiert wurde. Dagegen hatten die Kinase-Inhibitoren iATM und Wortmannin keinen hemmenden Effekt auf die Phosphorylierung (siehe Abbildung 18A).

Die Phosphorylierung der einzelnen Mutanten wurde über eine *Phosphor Imaging Plate* detektiert und am Fujifilm BAS-2500 Scanner quantifiziert. Der Phosphorylierungs-Grad der rekombinanten Proteine ohne Inhibitor (0  $\mu\text{M}$ ) wurde als 100 % definiert, die weitere konzentrationsabhängige Inhibition der Phosphorylierung im Verhältnis dazu berechnet und als exponentielle Trendlinie dargestellt (siehe Abbildung 18B). Der Assay wurde insgesamt drei Mal je Mutante durchgeführt, so dass anhand der Quantifizierung der Phosphorylierungs-Inhibition der Mittelwert der jeweiligen  $\text{IC}_{50}$  von TBB der unterschiedlichen APRIL-Mutanten bestimmt werden konnte. Der Wildtyp wies dabei eine  $\text{IC}_{50}$  von 2,06  $\mu\text{M}$ , APRIL-S158-only eine  $\text{IC}_{50}$  von 1,13  $\mu\text{M}$ , APRIL-S210-only 0,98  $\mu\text{M}$  und APRIL-T244-only eine  $\text{IC}_{50}$  von 1,82  $\mu\text{M}$  auf (siehe Abbildung 18B). Laut Herstellerangaben liegt die mittlere inhibitorische Konzentration von TBB *in vitro* bei 1,6  $\mu\text{M}$ . Die errechneten  $\text{IC}_{50}$  Werte lagen folglich im Bereich des erwarteten  $\text{IC}_{50}$  Wertes einer spezifischen CK2-Hemmung und die *in silico* Vorhersage einer CK2-abhängigen Phosphorylierung der Positionen S158 und S210 konnte demnach *in vitro* bestätigt werden.

### ***In vivo* Phosphorylierungs-Studie in Anwesenheit des spezifischen CK2-Inhibitors TBB**

Nachdem *in vitro* gezeigt werden konnte, dass die Proteinkinase CK2 nicht nur die Position T244, sondern auch die Positionen S158 und S210 von APRIL phosphoryliert, wurde im Folgenden eine *in vivo* Phosphorylierungs-Studie in Anwesenheit des spezifischen CK2-Inhibitors TBB durchgeführt, um die *in vitro* Daten zu verifizieren. Die bereits in den *in vitro* Phosphorylierungs-Studien verwendeten APRIL-Mutanten APRIL-S158-only, APRIL-S210-only und APRIL-T244-only wurden für den *in vivo* Assay als APRIL-Flag Fusionsproteine in transfizierten Jurkat T-Zellen transient exprimiert (siehe Abbildung 19A). Die Zellen wurden mit 10 – 100  $\mu\text{M}$  TBB behandelt und anschließend radioaktiv markiertes [ $^{32}\text{P}$ ]ortho-Phosphat zugeführt, um die Phosphorylierung visualisieren zu können. Die TBB-Konzentrationen wurde bereits in einer früheren Studie in Jurkat T-Zellen als nicht toxisch getestet (Chemnitz et al., 2009). Nach der Markierung wurde wie unter 6.1.2.1 beschrieben die *de novo* Phosphorylierung der APRIL-Varianten im Autoradiogramm quantifiziert. Somit konnte gezeigt werden, dass auch *in vivo* die Phosphorylierung aller drei Positionen durch den CK2-Inhibitors TBB konzentrationsabhängig und spezifisch inhibiert wurde (siehe Abbildung 19).

Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass auch in intakten humanen lymphoiden Zellen nicht nur die Aminosäureseitenketten T244, sondern ebenfalls S158 und S210 von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert werden.



**Abbildung 19: *In vivo* Inhibition der drei Phosphorylierungsstellen von APRIL mittels des spezifischer CK2-Inhibitors TBB**

*In vivo* Phosphorylierungs-Assay mit dem CK2-spezifischen Kinase-Inhibitor TBB: Jurkat T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für verschiedene APRIL-Flag Fusionsproteinen transfiziert (Wildtyp und Phosphorylierungs-Mutanten). Den Zellen wurde der spezifische CK2-Inhibitor TBB in steigender Konzentration zugeführt (0 – 100  $\mu$ M). Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Zellen mit [<sup>32</sup>P]*ortho*-Phosphat behandelt, um die Phosphorylierung zu markieren.

**A)** Immunoblot der Jurkat T-Zellysate: Im Westernblot wurde die Expression der APRIL-Flag-Konstrukte überprüft. Beispielhaft wurde hier die Proteinexpression der vollständigen Phosphorylierungs-defizienten Mutante APRIL-w/o-all-P (Reihe 2), des Wildtyps (Reihe 3) und der Phosphorylierungs-Mutante APRIL-S158-only (Reihe 4) dargestellt. Mittels spezifischer Antikörper gegen Flag und APRIL wurden das endogene APRIL und die APRIL-Flag Fusionsproteine detektiert. Als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin. Die Expression der Phosphorylierungs-Mutanten APRIL-Flag-210-only und APRIL-Flag-T244-only wurde ebenfalls im Westernblot überprüft (Daten nicht gezeigt).

**B)** Die immunpräzipitierten APRIL-Flag Fusionsproteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und die Intensität der Phosphorylierung sowie die TBB-abhängige Hemmung der Phosphorylierung im Autoradiogramm detektiert.

Reihe 1: Leervektor; Reihe 2: APRIL-w/o-all-P; Reihe 3–8: 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M TBB

#### 4.1.2.3 Einfluss der Phosphorylierungsstellen S158, S210 und T244 auf die Halbwertszeit von APRIL

Die Phosphorylierungs-abhängige Modifikation von Proteinen spielt nicht nur bei der Funktion und Aktivität von Proteinen, sondern oft auch in Hinblick auf deren Stabilität eine äußerst wichtige Rolle. So kann aufgrund von Phosphorylierung sowohl Proteolyse induziert werden (Hayden and Ghosh, 2008), als auch ein Protein vor Degradation geschützt werden. Auch die Proteinkinase CK2 reguliert durch Phosphorylierung die Stabilität von verschiedenen Proteinen und hat also einen Einfluss auf deren Halbwertszeit (Seldin et al., 2005; He et al., 2007).

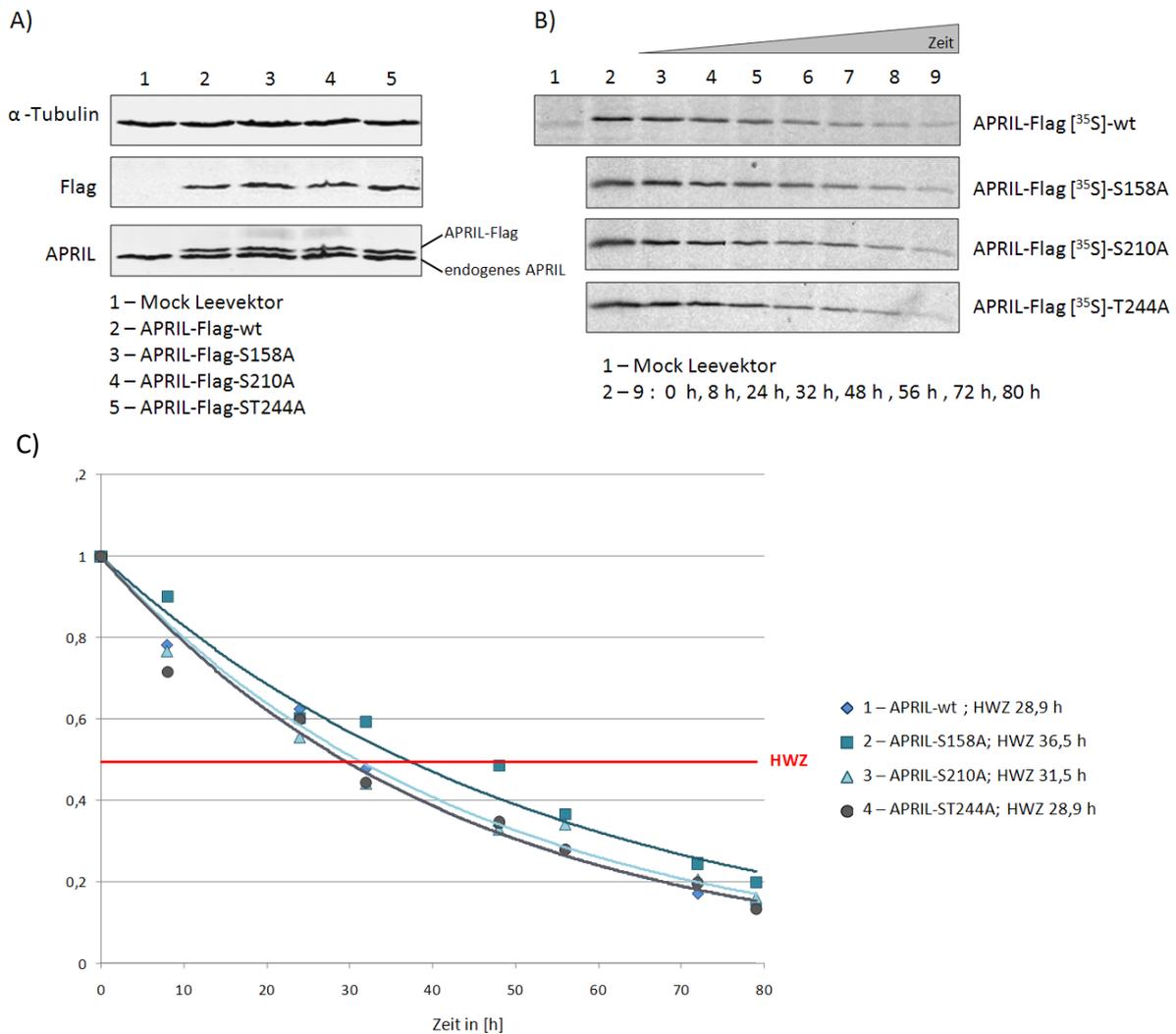
So wurde im Folgenden untersucht, ob die Phosphorylierungsstellen S158, S210 und T244 für die Stabilität des Phosphoproteins relevant sind und die jeweilige Phosphorylierung die APRIL-Halbwertszeit beeinflusst. Es wurden die Halbwertszeiten der Phosphorylierungs-defizienten

Punktmutanten APRIL-S158A, -S210A und -T244A in einer [<sup>35</sup>S]-markierten *de novo* Synthese ermittelt und die Stabilität der Mutanten mit der des Wildtyps verglichen.

Die verschiedenen Mutanten wurden als APRIL-Flag Fusionsproteine in Jurkat T-Zellen transient exprimiert und die Expression im Immunoblot überprüft (siehe Abbildung 20A). Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit [<sup>35</sup>S]-haltigen Aminosäuren markiert und ein *pulse chase* Experiment durchgeführt. Zum definierten Zeitpunkt t=0 (direkt nach der [<sup>35</sup>S]-Markierung) wurden die ersten Proteinproben entnommen und die Probenentnahme über einen Zeitraum von 80 h zu weiteren definierten Zeitpunkten wiederholt. Die APRIL-Flag Fusionsproteine wurden anschließend immunpräzipitiert und die während der Markierungszeit neu synthetisierten und somit [<sup>35</sup>S]-markierten Proteine wurden im Autoradiogramm visualisiert. Die Degradation der Flag-APRIL-Proteine im Zeitraum der untersuchten 80 h konnte somit anhand des abnehmenden [<sup>35</sup>S]-Signals im Autoradiogramm quantifiziert werden, wodurch die Berechnung der Proteinhalbwertszeit möglich wurde (siehe Abbildung 20B).

Die Quantifizierung der neu synthetisierten [<sup>35</sup>S]-markierten Proteine erfolgte durch Verwendung einer *Phosphor Imaging Plate* am Fujifilm BAS-2500 Scanner. Die Intensität der radioaktiv markierten Proteine zum Zeitpunkt t=0 wurde als 1 definiert und die weiteren Zeit-Werte der jeweiligen Mutanten im Verhältnis zum Zeitpunkt t=0 berechnet. Die Abnahme der detektierten Radioaktivität wurde als exponentielle Trendlinie dargestellt, mittels welcher die Halbwertszeit des Wildtyps sowie der Phosphorylierungs-defizienten Punktmutanten APRIL-S158A, -S210A und -T244A berechnet wurde.

In der Analyse der Halbwertszeiten konnten geringfügige Unterschiede zwischen der des Wildtyps und den der jeweiligen Mutanten festgestellt werden. Die APRIL-T244A-Mutante wies mit 28,9 h die gleiche Halbwertszeit wie der Wildtyp auf. Die Mutante S210A lag mit 30,5 h knapp darüber. Lediglich APRIL-S158A wies mit 36,5 h eine leicht erhöhte Stabilität im Vergleich zum Wildtyp-Protein auf.



**Abbildung 20:  $[^{35}\text{S}]$ -markierte *de novo* Synthese zur Bestimmung der Halbwertszeit (HWZ)**

Jurkat T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für verschiedene APRIL-Flag Fusionsproteine transfiziert (Wildtyp und Phosphorylierungs-defiziente Punktmutanten). Die Zellen wurden für 1 h in  $[^{35}\text{S}]$ -haltigen Medium inkubiert. Der anschließende Mediumwechsel beendete die  $[^{35}\text{S}]$ -markierte *de novo* Synthese der Proteine. Es wurden direkt Proben entnommen ( $t=0$ ) und die Probenentnahme über einen Zeitraum von 80 h wiederholt (*pulse chase*).

**A)** Im Immunoblot wurden Jurkat T-Zelllysate auf die Expression der APRIL-Flag Fusionsproteine überprüft. Die Proteine wurden mit spezifischen APRIL- und Flag-Antikörpern detektiert, als Ladekontrolle diente  $\alpha$ -Tubulin.

**B)** Die aus Jurkat T-Zelllysaten immunpräzipitierten APRIL-Flag Fusionproteine wurden über ein SDS Gel aufgetrennt und der Abbau der  $[^{35}\text{S}]$ -markierten Proteine im Zeitraum von 0 – 80 h im Autoradiogramm visualisiert (Reihe 2 – 8).

**C)** Die Radioaktivität der  $[^{35}\text{S}]$ -haltigen *de novo* Proteine wurden über eine *Phosphor Imaging Plate* detektiert und am Fujifilm BAS-2500 Scanner quantifiziert. Der Zeitpunkt  $t=0$  wurde als 1 festgelegt und die Abnahme der detektierten Radioaktivität im Verhältnis zum Zeitpunkt  $t=0$  ermittelt und als exponentielle Trendlinie dargestellt.

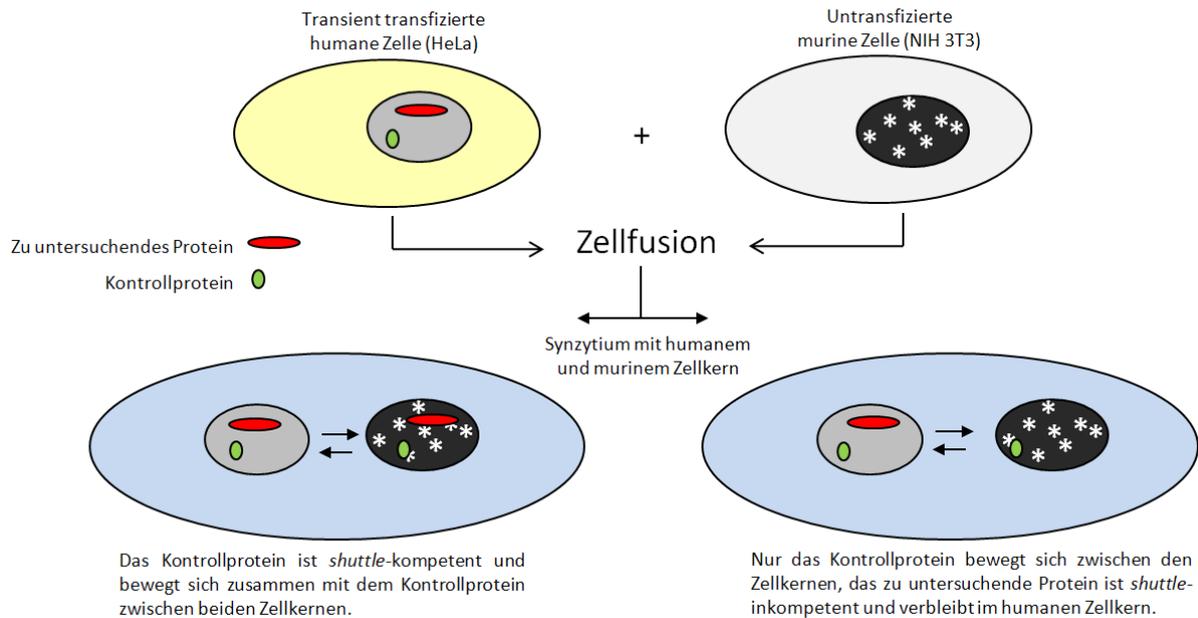
In früheren Untersuchungen konnte die CK2-vermittelte Phosphorylierung von T244 als relevant für das nukleozytoplasmatische *shuttling* von APRIL identifiziert werden (Fries et al., 2007; Chemnitz et al., 2009). Im Folgenden sollte nun auch der Einfluss der Phosphorylierungen S158 und S210 auf das *shuttle*-Verhalten von APRIL untersucht werden.

#### **4.1.2.4 Einfluss der Phosphorylierungsstellen S158, S210 und T244 auf das intrazelluläre Lokalisations- und *shuttle*-Verhalten von APRIL**

APRIL ist ein *shuttle*-Protein, das CRM1-abhängig aus dem Zellkern exportiert wird. In der Momentaufnahme der Zelle (*steady state*) liegt es akkumuliert im Zellkern vor, tatsächlich bewegt es sich aber ständig zwischen Zellkern und Zytoplasma (Brennan et al., 2000). Um nukleozytoplasmatische Bewegungen des Proteins zu analysieren, eignet sich die Heterokaryon Analyse.

##### **Prinzip des Heterokaryon Assays:**

Mittels der Heterokaryon Analyse kann das *shuttle*-Verhalten von Proteinen, welche im *steady state* im Zellkern lokalisieren, untersucht werden. Es werden humane Zellen (z.B. HeLa-Zellen) mit Expressionsplasmiden des zu untersuchenden Proteins sowie einem internen Kontrollprotein kotransfiziert. Anschließend werden die transient transfizierten humanen Zellen (Donor-Zellen) mit Zellen einer anderen Spezies (Rezeptorzellen, meistens murinen Ursprungs) zu Synzytien fusioniert. Die murine Zellkerne können dabei leicht von humanen Zellkernen unterschieden werden, da in der Kernfärbung mit Hoechst 33258 ihre Heterochromatinstrukturen als auffällige, fleckenartige „*speckle pattern*“ erscheinen (Moser et al., 1975). Um die Proteinbiosynthese in den fusionierten Zellen zu unterbinden, werden die Zellen während des gesamten Experimentes mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid behandelt. Im fusionierten Synzytium kann nun das Bewegungsverhalten des zu untersuchenden Proteins analysiert werden. Das interne Kontrollprotein, welches selbst zwischen den Kernen transportiert werden kann, dient dabei als Anhaltspunkt für eine erfolgreiche Zellfusion: Wird es in humanen (Donor) wie murinen (Rezeptor) Zellkernen nachgewiesen, handelt es sich um ein funktionstüchtiges Synzytium und das Bewegungsverhalten des zu untersuchenden Proteins kann ebenfalls analysiert und mit dem Kontrollprotein verglichen werden (siehe Abbildung 21).



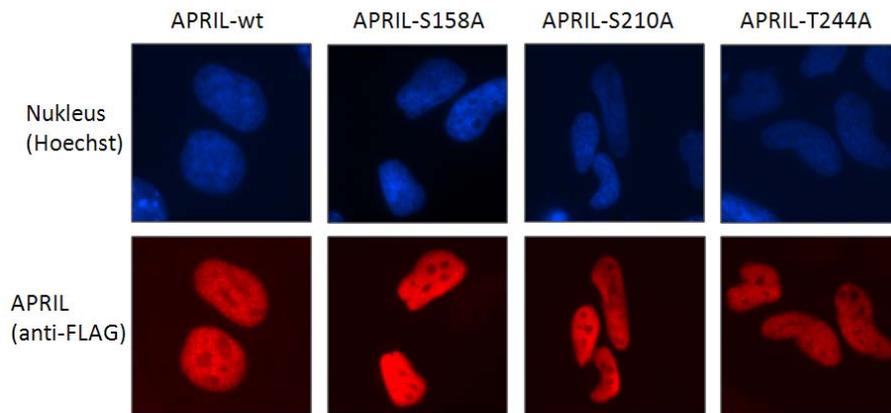
**Abbildung 21: Schematische Darstellung des Heterokaryon Assays:**

Mit einem Kontrollprotein (grün) und dem zu untersuchenden Protein (rot) kotransfizierte humane Zellen (gelb) werden mit untransfizierten murinen Zellen (grau) fusioniert. In den entstandenen Synzytien (blau) können die Zellkerne aufgrund der auffälligen Färbung der murinen Zellkerne („speckles“) unterschieden und das *shuttle*-Verhalten der Proteine zwischen humanen und murinen Zellkernen analysiert werden.

Mittels des Heterokaryon Assays sollte nun die Rolle der Phosphorylierungsstellen S158 und S210 beim *shuttling* von APRIL analysiert werden.

### Lokalisation Phosphorylierungs-defizienter Punktmutanten

Zuerst wurde untersucht, ob alle verwendeten APRIL-Varianten so wie der Wildtyp eine Lokalisation im Zellkern zeigen, da dies eine Grundvoraussetzung für die Durchführung der Heterokaryon Analysen ist. Die Punktmutanten APRIL-S158A, -S210A und -T244A sowie der Wildtyp wurden als Flag-Fusionsproteine transient in menschlichen Zellen exprimiert und ihre *steady state* Lokalisation wurde in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie verglichen. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen dem APRIL-Wildtyp und den Phosphorylierungs-defizienten Punktmutanten ausfindig gemacht werden: Die verschiedenen APRIL-Fusionsproteine (in rot) akkumulierten alle im Zellkern (in blau, siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22: Die Phosphorylierungsmutanten APRIL-S158A, -S210A und T244A akkumulieren wie auch der Wildtyp im Zellkern.**

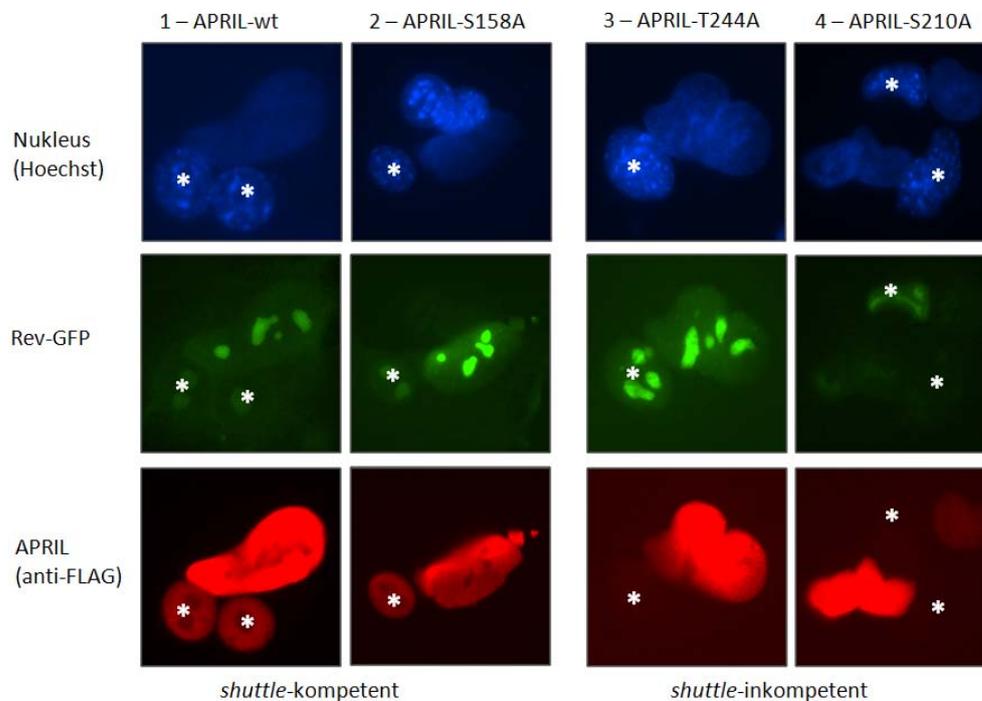
HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für verschiedene APRIL-Flag Fusionsproteine transfiziert und auf Objektträgern fixiert (APRIL-Wildtyp sowie die Phosphorylierungs-defizienten Punktmutanten S158A, S210A und T244A). Die APRIL-Flag Fusionsproteine wurden über einen spezifischen Flag-Antikörper sowie einen Cy3-markierten Sekundäntikörper detektiert (in rot). Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt (in blau). Die Aufnahmen erfolgten am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 2000/ Zeiss).

### **Shuttle-Verhalten Phosphorylierungs-defizienter Punktmutanten**

Nachdem bestätigt wurde, dass sich das Lokalisations-Verhalten der verschiedenen Phosphorylierungs-defizienten Punktmutanten nicht von dem des Wildtyps unterscheidet, wurden die Mutanten APRIL-S158A und APRIL-S210A für die Heterokaryon Analyse eingesetzt. Der *shuttle*-kompetente Wildtyp sowie die bereits als *shuttle*-inkompetent beschriebene Mutante APRIL-T244A (Fries et al., 2007) dienten als positive und negative Kontrolle. Als interne Kontrolle wurde das Fusionsprotein Rev-GFP verwendet, welches wie APRIL CRM1-abhängig aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert wird (Pollard and Malim, 1998). HeLa-Zellen wurden mit der jeweiligen Mutante sowie der internen Kontrolle kotransfiziert, mit murinen NIH 3T3-Zellen fusioniert und für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie präpariert. Für die Analyse des *shuttle*-Verhaltens wurden nur Synzytien untersucht, die sowohl das interne Kontrollprotein Rev-GFP, als auch eine APRIL-Mutante enthielten. Zudem musste gewährleistet sein, dass sich das Rev-GFP Fusionsprotein zwischen humanem und murinen Zellkern bewegt bzw. in beiden Zellkernen detektiert werden kann und es sich folglich um ein funktionstüchtiges Synzytium handelt.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Mikroskopie zeigte, dass sich der Wildtyp von APRIL wie erwartet als *shuttle*-Protein zwischen den Zellkernen bewegen kann; er wurde sowohl in humanen als auch murinen Zellkernen nachgewiesen (siehe Abbildung 23, Reihe 1). Ähnlich verhielt sich die Phosphorylierungs-defiziente Punktmutante APRIL-S158A: auch hier konnte in den meisten Fällen ein *shuttle*-Verhalten zwischen beiden Kernen beobachtet werden (siehe Abbildung 23, Reihe 2). Die phosphorylierungs-defiziente Punktmutante APRIL-S210A dagegen akkumulierte zumeist im

humanen Zellkern und wurde folglich als *shuttle*-inkompetent identifiziert (siehe Abbildung 23, Reihe 3). Die *shuttle*-inkompetente Kontrolle APRIL-T244A war ebenfalls zumeist nur im humanen Zellkern detektierbar, was die Ergebnisse der früheren Beobachtungen bestätigte (siehe Abbildung 23, Reihe 4).



**Abbildung 23: Die Phosphorylierung an Position S210, aber nicht S158 spielt eine Rolle für das *shuttle*-Verhalten von APRIL**

HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden der APRIL-Flag Fusionsproteine (Wildtyp – Reihe 1- und die phosphorylierungsdefizienten Punktmutanten S158A, S210A und T244A – Reihe 2-4) sowie der *shuttle*-Kontrolle Rev-GFP kontransfiziert, zusammen mit murinen NIH 3T3-Zellen auf Objektträgern fusioniert und fixiert. Die mit APRIL-Flag transfizierten Zellen wurden über einen spezifischen Flag-Antikörper und einen Cy3-markierten Sekundärantikörper detektiert (in rot), das Rev-GFP-Fusionsprotein konnte direkt über GFP (grün) nachgewiesen werden. Die Zellkerne wurden mit Hoechst-Farbstoff angefärbt (in blau), dabei sind die murinen Zellkerne sind aufgrund ihrer „speckles“ leicht zu identifizieren und mit einem Stern gekennzeichnet. Die Aufnahmen erfolgten am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 2000/ Zeiss).

Neben T244 scheint somit ebenfalls die Phosphorylierung an S210 eine funktionelle Rolle beim *shuttling* von APRIL zu spielen. Die CK2-abhängige Phosphorylierung von sowohl T244 als auch S210 beschränkte die Möglichkeit, zwischen dem Einfluss der beiden Phosphatakzeptorstellen zu differenzieren. Eine denkbare Beteiligung eines möglichen S210-abhängigen Exports des APRIL-CRM1-Komplexes und somit eine Rolle von S210 an der Regulation der CD83 Expression konnte folglich nicht weiter sondiert werden.

#### **4.1.3 Einfluss von APRIL-spezifischer RNA-Interferenz (RNAi) auf die CD83 Expression**

In einer früheren Arbeit wurde mittels RNA-Interferenz (RNAi) nachgewiesen, dass APRIL, aber nicht pp32, als HuR-Ligand an der Regulation der CD83 Expression beteiligt ist (Fries et al., 2007). Im folgenden Abschnitt sollte der Einfluss von APRIL auf die Regulation der CD83 Expression weiter verifiziert werden. Zunächst sollte die Effizienz des *knockdowns* optimiert werden, indem die siRNA-Expressionskassetten der pSUPER Vektoren über lentivirale pGsi-Vektoren stabil ins Wirtsgenom integriert wurden. Zudem sollte das Zellsystem mit 293T- und HeLa-Zellen auf humane Zelllinien erweitert und der Einfluss einer APRIL-Reduktion auf die CD83 Expression im autologen System primärer DC untersucht werden, da das Zusammenspiel von APRIL und CD83 bisher nur in Modellsystemen dargestellt wurde, die kein endogenes CD83 exprimieren.

##### **4.1.3.1 CD83 Expression in Abhängigkeit von APRIL im Modellsystem: *Silencing* von APRIL in Cos7-, 293T- und HeLa-Zellen**

Um die Effizienz des *silencings* von APRIL zu optimieren, wurden für die Expression der siRNA-Sequenzen lentivirale pGsi-Vektoren eingesetzt, welche die pSUPERSiRNA Kasette der parentalen pSUPER-Vektoren (Brummelkamp et al., 2002) enthalten und shRNA gegen APRIL bzw. gegen Luciferase als Kontroll-shRNA exprimieren. Zudem kodieren sie für das *green fluorescent protein* bzw. GFP. Es handelt sich um replikationsinkompetente, selbst-inaktivierende Lentiviren, die in der Lage sind, stabil ins Wirtsgenom zu integrieren und Promotoren-abhängig die eingebrachten Transgene zu exprimieren. Angesichts einer VSV-G vermittelten Pseudotypisierung der lentiviralen Partikel kann nahezu jeder Zelltyp mit diesen lentiviralen Vektoren transduziert werden (Beyer et al., 2002). Die Transduktionseffizienz kann über die GFP Expression der pGsi-Vektoren im Fluoreszenz-Mikroskop detektiert und gegebenenfalls GFP positive Zellen am FACS sortiert werden.

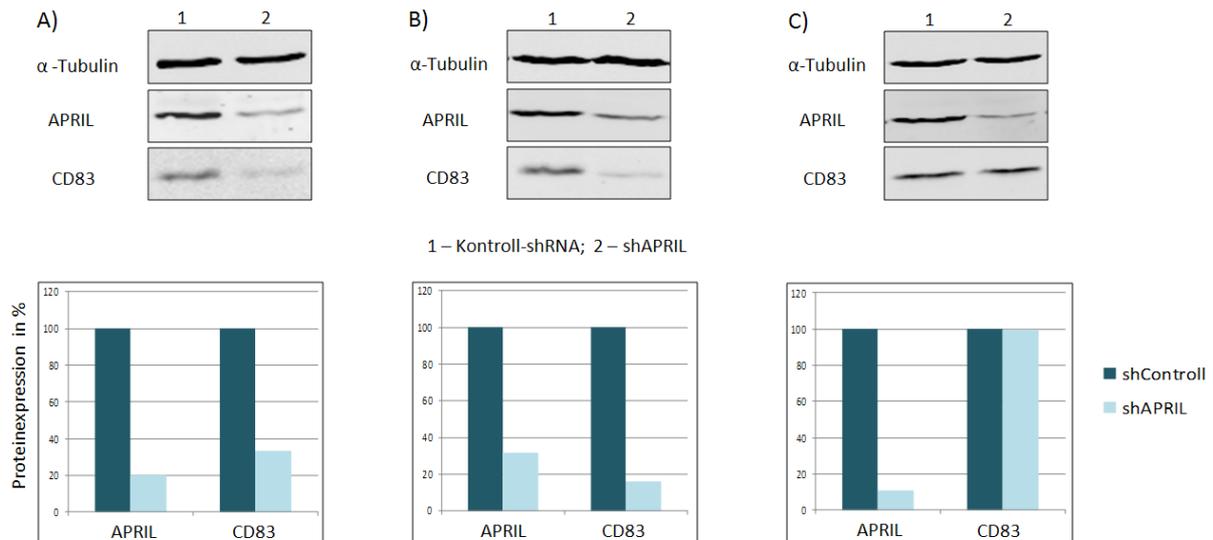
Neben der Effizienzoptimierung des *knockdown* Effektes wurde zudem das Modellsystem erweitert. So wurden neben Cos7-Zellen, die ihren Ursprung in immortalisierten Nierenzellen der grünen Meereskatze haben, auch 293T- und HeLa-Zellen, die ihren Ursprung in humanen embryonalen Nierenzellen (293T) bzw. Epithelzellen des Zervix-Karzinoms (HeLa) haben, mit den lentiviralen Vektoren transduziert.

Nachdem die lentiviralen Partikel wie unter 3.3.9 beschrieben hergestellt wurden, erfolgte die Transduktion der Cos7-, 293T- und HeLa-Zellen mit den lentiviralen Vektoren pGsiAPRIL und pGsiLuciferase nach Anleitung (siehe 3.3.10). Die Transduktionseffizienz, die nach 48 h anhand der GFP Expression im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht wurde, lag für alle drei Zelllinien bei nahezu 100 %, so dass eine FACS-Anreicherung nicht notwendig war (Daten nicht gezeigt). Da die Zellen kein endogenes CD83 exprimieren, wurden sie 48 h nach Transduktion mit dem pcDNA3\_CD83-wt Expressionsplasmid transient transfiziert und die CD83 Expression sowie die Reduktion der APRIL-

Expression der einzelnen, stabil transduzierten Zelllinien nach weiteren 24 h im Immunoblot überprüft und quantifiziert.

Um den *knockdown* von APRIL der einzelnen Zelllinien zu bestimmen, wurde die Menge der APRIL-Proteinexpression der pGsiAPRIL-transduzierten Zellen mit dem Expressionslevel der transduzierten Kontrollzellen (pGsiLuciferase) verglichen. Hierfür wurden die Werte der APRIL-Proteinexpression mit der Expression von  $\alpha$ -Tubulin normiert und die Expressionsmenge der Kontrollzellen als 100 % festgelegt. Die über pGsiAPRIL vermittelte Reduktion der APRIL-Expression in Cos7-Zellen lag somit bei etwa 80 %, in 293T- und HeLa-Zellen konnte ein *knockdown* Effekt von etwa 70 % (293T) bzw. 90 % (HeLa) detektiert werden (siehe Abbildung 24A-C).

Um den Effekt der APRIL-Reduktion auf die CD83 Expression der einzelnen Zelllinien zu quantifizieren, wurde das Level der CD83-Proteinexpression der pGsiAPRIL-transduzierten Zellen mit dem CD83 Level der transduzierten Kontrollzellen (pGsiLuciferase) verglichen und wie vorab beschrieben mit  $\alpha$ -Tubulin normiert. In Cos7-Zellen konnte somit eine Reduktion der CD83 Expression von etwa 70 % festgestellt werden. In APRIL-reduzierten 293T-Zellen lag die CD83 Reduktion sogar über 80 % (siehe Abbildung 24A und B). Interessanterweise unterschied sich die CD83 Expression der pGsiAPRIL-HeLa-Zellen dagegen nicht zur Expression der HeLa Kontrollzellen. In diesem Zelltyp konnte also keine APRIL-abhängige CD83 Expression beobachtet werden (siehe Abbildung 24C).



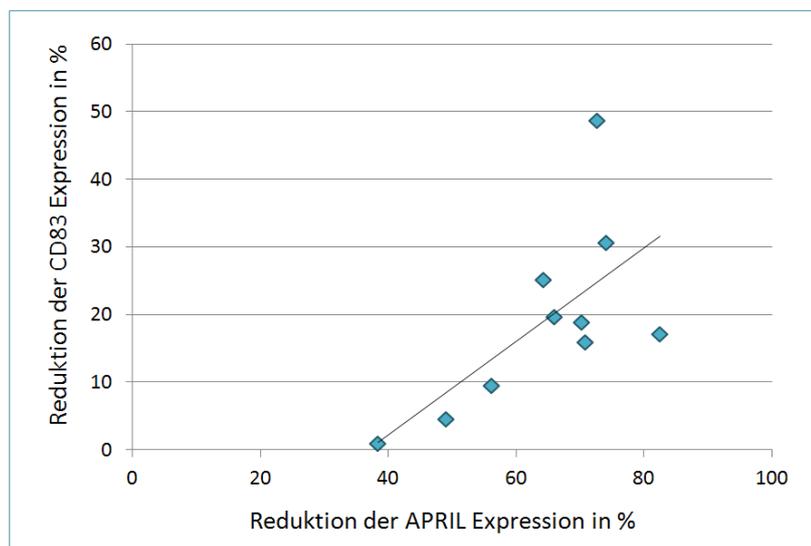
**Abbildung 24: Stabiles *silencing* von APRIL in Cos7- und 293T-Zellen, aber nicht in HeLa-Zellen, reduziert die CD83 Expression**

Cos7-, 293T- und HeLa-Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren mit spezifischer shRNA gegen APRIL sowie eine Kontroll-shRNA transduziert. Nach 48h Stunden wurden die Zellen mit einem CD83 Expressionsplasmid transfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen geerntet und die Expression von APRIL und CD83 der Cos7- (A), 293T- (B) und HeLa-Zelllysate (C) im Westernblot überprüft und quantifiziert. Der Immunoblot wurden mit spezifischen Antikörpern gegen APRIL und CD83 sowie gegen  $\alpha$ -Tubulin als Ladekontrolle angefärbt. Mittels IREDye markierten Sekundärantikörper wurden die spezifischen Banden im LI-COR Odyssey Imaging System via Fluoreszenz detektiert und quantifiziert. Die Proteinexpression von APRIL und CD83 wurde prozentual im Verhältnis zur Tubulinexpression dargestellt.

Mittels des lentiviral vermittelten *silencings* von APRIL wurde ein effizienter *knockdown* in allen drei Zelllinien erreicht, der sowohl in simianen Cos7-Zellen als auch in der humanen 293T-Zelllinie zu einer starken Reduktion der CD83 Expression führte. Frühere Ergebnisse von Fries und Mitarbeitern (Fries et al., 2007) hinsichtlich der APRIL-abhängigen CD83 Expression in Cos7-Zellen konnten somit optimiert und zudem in Zellen menschlichen Ursprungs bestätigt werden. Die offensichtlich Zelltyp-spezifischen Unterschiede der APRIL-abhängigen CD83 Expression zwischen 293T- und HeLa-Zellen offenbarten allerdings Einschränkungen des gewählten Modellsystems. Für eine weitere, realistische *in vivo* Untersuchung des Zusammenspiels von APRIL und CD83 sollte demzufolge ein System gewählt werden, welches endogenes CD83 vorweisen kann. So wurde im Folgenden die APRIL-abhängige Regulation der CD83 Expression in *ex vivo* generierten primären Dendritischen Zellen (DC) untersucht, welche – wie schon unter 4.1.1.2 beschrieben – als autologes System am besten die natürlichen Prozesse widerspiegeln und zur Untersuchung der Regulation der CD83 Expression *ex vivo* genutzt werden können.

#### 4.1.3.2 APRIL-abhängige Regulation der CD83 Expression im autologen System: *Silencing* von APRIL in primären aus Monozyten generierten Dendritischen Zellen

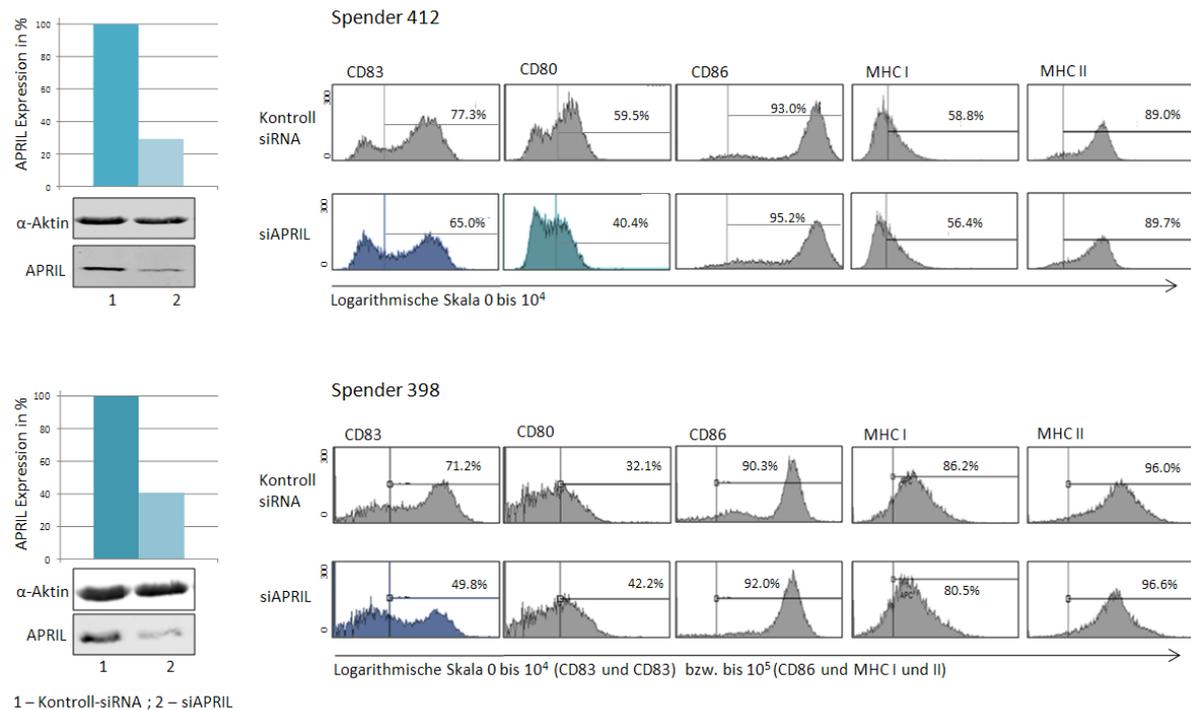
Es zeigte sich, dass die lentiviralen pGsi-Vektoren sich nicht für einen effizienten *knockdown* von APRIL in primären aus Monozyten generierten Dendritischen Zellen eignen, da die Zellen in diesem Kontext nicht transduziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Für ein erfolgreiches *silencing* von APRIL in primären DC wurde folglich wie auch schon beim *knockdown* der CK2 $\alpha'$ -Untereinheit doppelsträngige *stealth* siRNA der Firma Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt, wobei die *targeting* Sequenz gegen APRIL bzw. zur Kontrolle gegen Luciferase der pSUPERSiRNA Kasette beibehalten wurde. Die primären Monozyten, aus denen die DC generiert wurden, wurden wie unter 3.3.5 beschrieben aus Spenderblut isoliert. Der APRIL *knockdown* sowie die anschließende Analyse der CD83 Expression wurde in DC von insgesamt 10 verschiedenen Spendern durchgeführt. Der Reifungsprozess der Dendritischen Zellen wurde neben der CD83 Expression anhand der Oberflächenrezeptoren CD80, CD86, MHC I und MHC II überprüft. Zudem wurde vor der Aktivierung der Zellen ein *Dead Cell Apoptosis Assay* (Invitrogen) durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Transfektion der siRNA keine toxischen Nebeneffekte bewirkt (Daten nicht gezeigt). Die Analyse aller Spender verdeutlichte, dass die Reduktion der APRIL Expression mit einer Reduktion der CD83 Expression korrelierte (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25: Die Reduktion der APRIL Expression korreliert in allen 10 Spendern der primären aus Monozyten generierten DC mit der Reduktion der CD83 Expression**

Die Darstellung der prozentuale Reduktion der CD83 Expression in Abhängigkeit zur prozentualen Reduktion der APRIL Expression zeigt eine Korrelation zwischen den beiden Ereignissen.

In Abbildung 26 sind stellvertretend für alle Spender die Ergebnisse des *knockdowns* im Western Blot sowie die Expression der Oberflächenmoleküle im FACS-Assay der Spender 398 und 412 dargestellt.



**Abbildung 26: Silencing von APRIL in primären aus Monozyten generierten DC verringert die CD83 Expression**

Aus CD14+ Monozyten, isoliert aus humanem Blut, wurden mittels Zytokin-haltiger Reifungscocktails reife Dendritische Zellen generiert. An Tag 2 (Spender 412) sowie auch 4 und 6 (Spender 398) des Reifungsprozesses wurden die Zellen jeweils mit spezifischer *stealth* siRNA gegen APRIL sowie einer Kontroll-siRNA transfiziert und an Tag 6 mittels TNF $\alpha$ , PEG2 und IL-1 $\beta$  aktiviert.

**Links:** Untersuchung der APRIL Expression im Western Blot an Tag 8 von Spender 412 und 398: Die Immunoblots wurden mit spezifischen Antikörpern gegen APRIL sowie gegen Aktin als Ladekontrolle angefärbt. Mittels IREDye markierten Sekundärantikörper wurden die spezifischen Banden im LI-COR Odyssey Imaging System über Fluoreszenz detektiert und quantifiziert. Die Proteinexpression von APRIL wurde prozentual im Verhältnis zur Aktinexpression dargestellt.

**Rechts:** FACS-Analyse der Dendritischen Zellen an Tag 8 von Spender 412 und 398: Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten CD83-Antikörpern sowie Antikörpern gegen typische und spezifischen Oberflächenmarker reifer Dendritischer Zellen zur Kontrolle der Aktivierung gefärbt (CD80, CD86, MHC-I und MHC II). Die siAPRIL-abhängige Reduktion der CD83 Expression ist in blau, die von CD80 in grün dargestellt.

Das *silencing* von APRIL führte bei Spender 412 zu einer relativen Reduktion der CD83 Expression um 16 % (von 77,3 % auf 65,0 % positive Zellen, blau gefärbt) und bei Spender 398 zu einer relativen Reduktion um 30 % (von 71,2 % auf 49,8 % positive Zellen, blau gefärbt). Hierbei muss beachtet werden, dass diese Zahlen lediglich die strikte Einteilung nach CD83-positiv und CD83-negativ widerspiegeln. Nicht beachtet wird in dieser Auswertung, dass in den APRIL *knockdown* Ansätzen die absolute CD83 Expressionsstärke in den verbleibenden CD83-positiven Zellen gegenüber der Kontrolle deutlich reduziert ist. Dies ist besonders hervorzuheben, da es sich um eine logarithmische Skala handelt. Mit den vorhandenen apparativen Möglichkeiten war die weitere quantitative Analyse des Rückgangs der CD83 Expression in APRIL-reduzierten DC jedoch nicht weiter sinnvoll möglich. Es kann aber festgehalten werden, dass in primären DC eine deutliche Korrelation von APRIL- und CD83

Expression besteht (siehe Abbildung 25). Die Expression der Oberflächenrezeptoren CD86, MHC I und II und somit der Reifungsprozess war nicht vom *silencing* des APRIL-Proteins betroffen. Hingegen wiesen die CD80 Oberflächenmoleküle bei verschiedenen Spendern, wie z.B. auch Spender 412, eine deutlich verminderte Expression in Anwesenheit der siAPRIL-RNA auf (grün markiert). Es kann folglich die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass APRIL eventuell auch für die Regulation der CD80 Expression eine Rolle spielt.

## 4.2 Teil II – Generierung eines konditionellen APRIL *knockout* Maus Modells

Das Phosphoprotein APRIL gehört, wie bereits unter 4.1.2 beschrieben, zur Familie der ANP32-Proteine, deren Mitglieder in der Literatur regelmäßig als Regulatoren wichtiger zellulärer Prozesse bekannt sind (Matilla and Radrizzani, 2005). Die genaue Funktion von APRIL im Organismus wurde jedoch noch nicht im Detail geklärt. Die bisherigen eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass APRIL eine wichtige Rolle bei der Regulation der CD83 Expression ausübt (Fries et al., 2007).

Die Regulation von CD83 beim Reifungsprozess Dendritischer Zellen (DC) und somit der Aktivierung der zellulären Immunantwort ist ein äußerst komplex regulierter Vorgang (Lechmann et al., 2002a; Wolenski et al., 2003; Prectel and Steinkasserer, 2007). Im ersten Teil dieser Arbeit konnte über RNAi vermitteltes *silencing* von APRIL in *ex vivo* generierten primären DC eine Reduktion der CD83 Oberflächen-Expression beobachtet werden (siehe 4.1.3.2). Allerdings konnte mittels RNAi keine 100 %ige Hemmung der APRIL-Expression erreicht werden, eine Restaktivität des Proteins von etwa 20-30 % war generell noch zu beobachten. Die Rolle von APRIL im Zusammenhang der CD83 Expression kann folglich in seiner Gesamtheit nur in einem Tiermodell untersucht werden. Für die weitere Erforschung der Funktion von APRIL im Zusammenhang mit der CD83 Expression, aber auch in Hinblick auf die Funktion von APRIL für weitere zelluläre Prozessen im Organismus, eignet sich ein *knockout* Mausmodell. So war das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit die Konstruktion einer APRIL *knockout* Mauslinie, um diesen Fragestellungen nachgehen zu können.

Es wurde ein System gewählt, in welchem nicht nur ein konstitutiver, sondern gleichzeitig auch ein konditioneller *knockout* von APRIL generiert werden kann. Der konditionelle *knockout* in Mäusen ermöglicht im Gegensatz zum konstitutiven *knockout* die gewebsspezifische und/oder auch induzierbare und somit zeitlich definierte Deletion eines Zielgens. Mittels des Cre/loxP Systems kann die Expression von APRIL beispielsweise im hämatopoetischen System unterbunden werden, während alle weiteren Gewebsarten nicht vom *knockout* betroffen sind und das Protein weiterhin in Wildtyp-Form exprimieren. So kann spezifisch geklärt werden, welche Aufgabe und welchen Einfluss APRIL bei der Aktivierung der zellulären Immunantwort *in vivo* spielt, während gleichzeitig die Gefahr möglicher letaler Effekte durch den konditionellen, gewebsspezifischen *knockout* minimiert wird. Die Wahl des konditionellen *knockout* Systems bestätigte sich während der Etablierungs-Arbeiten, als von Reilly und seinen Mitarbeitern eine konstitutive APRIL *knockout* Mauslinie vorgestellt wurde, bei welcher die vollständige Eliminierung von APRIL in den meisten Fällen zu perinataler Letalität führte (Reilly et al., 2011).

Die Generierung der konditionellen APRIL *knockout* Mauslinie teilte sich in vier Teilbereiche auf:

(I) Voraussetzung für die Etablierung einer konditionellen *knockout* Mauslinie war die Herstellung eines Rekombinations-Vektors (*targeting* Vektor). Dieser beinhaltet einen Teil des *APRIL*-Gens, welches zum einen von loxP-Rekombinationsstellen zur Entfernung der *APRIL* Sequenzen flankiert ist („gefloxtes“ *APRIL*-Gen). Zum anderen enthält dieser Vektor eine von FRT-Seiten flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette, die für die Selektion der transgenen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) benötigt wird. Das modifizierte Gen wird im weiteren Verlauf als *APRIL*<sup>flox</sup> bezeichnet.

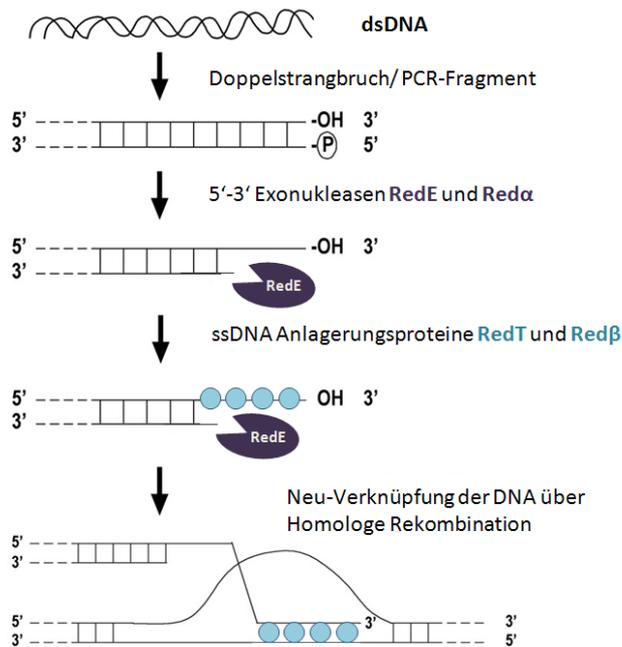
(II) Anschließend wurde der Rekombinations-Vektor mit dem „gefloxten“ *APRIL*-Gen *APRIL*<sup>flox</sup> in eine murine ES-Zelllinie eingebracht und transgene, mit dem „gefloxten“ Rekombinations-Vektor homolog rekombinierte und gezielt modifizierte ES-Zellklone identifiziert (Genotyp *APRIL*<sup>flox/wt</sup>). Diese Klone wurden anschließend in Blastozysten injiziert, aus denen chimäre Mäuse generiert wurden.

(III) Es folgte der Nachweis der Keimbahnübertragung der F1-Nachkommen der chimären Mäusen mittels Genotypisierung und die Zucht einer für das „gefloxte“ *APRIL*-Gen homozygoten *APRIL*<sup>flox</sup> Inzuchtmauslinie.

(IV) Im vierten Teilbereich der Etablierung der konditionellen *APRIL knockout* Mauslinie wäre durch die Verpaarung der homozygoten „gefloxten“ *APRIL*<sup>flox</sup> Mauslinie mit transgenen Cre-Mäusen, welche die Cre-Rekombinase mittels spezifischer Promotoren gewebspezifisch exprimieren, die konditionelle *APRIL knockout* Mauslinie etabliert worden. Aus Zeitgründen konnte der letzte Teilbereich der Etablierung einer konditionellen *APRIL knockout* Mauslinie jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

#### **4.2.1 Generierung des *targeting* Vektors (Rekombinations-Vektor)**

Für die Herstellung des *targeting* Vektors, welcher ein „gefloxtes“ *APRIL*-Gen sowie eine von FRT-Seiten flankierte Antibiotika-Resistenzkassette enthält, wurde die 1998 von Zhang und Mitarbeitern entwickelte Methode der lamda-vermittelten Red<sup>®</sup>/ET<sup>®</sup> basierten homologen Rekombination in *E.coli* verwendet (Zhang et al., 1998). Die aus Phagen stammenden Proteinpaare RecE/RecT (Rac-Phage) und Red $\alpha$ /Red $\beta$  ( $\lambda$ -Phage) katalysierten dabei den Vorgang der homologen Rekombination, wobei RecE oder Red $\alpha$  als 5'-3' Exonukleasen und RecT oder Red $\beta$  als Anlagerungsproteine einzelsträngiger DNA fungieren (siehe Abbildung 27).



**Abbildung 27: Schematische Darstellung des Prinzips der Red<sup>®</sup>/ET<sup>®</sup> basierten homologen Rekombination**

(verändert nach dem Handbuch zur Red<sup>®</sup>/ET<sup>®</sup> basierten homologen Rekombination von Gene Bridges, Heidelberg)

Die 5'-3' Exonukleasen RedE oder Red $\alpha$  degradieren im Reparaturprozess nach einem DNA-Doppelstrangbruch überhängende 5'-Enden und produzieren 3'-Einzelstränge. An diese lagern sich die Einzelstrang-DNA (ssDNA) Anlagerungsproteine RedT oder Red $\beta$  an, was die Verknüpfung homologer Regionen ermöglicht.

Ebenso werden überhängende Enden wie Homologiearme von PCR-Fragmenten von RedE oder Red $\alpha$  prozessiert und von RedT oder Red $\beta$  gebunden, was die zielgerichtete, Red/ET vermittelte homologe Rekombination ermöglicht.

Die Generierung des Rekombinations-Vektors erfolgte in zwei Schritten: zunächst wurde ein spezifischer Abschnitt des *APRIL*-Gen aus dem Bacmid RP23-117B19 in ein Minimalvektor-Plasmid pMV subkloniert. Anschließend wurde das *APRIL*-Gen im Plasmid pMV-APRIL zum Rekombinations-Vektor pMV-APRIL-KO modifiziert, indem spezifische loxP-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase ins *APRIL*-Gen integriert und zudem eine von FRT-Seiten flankierte Neomycin-Resistenzkassette für die Selektion der transgenen ES-Zellen inseriert wurde.

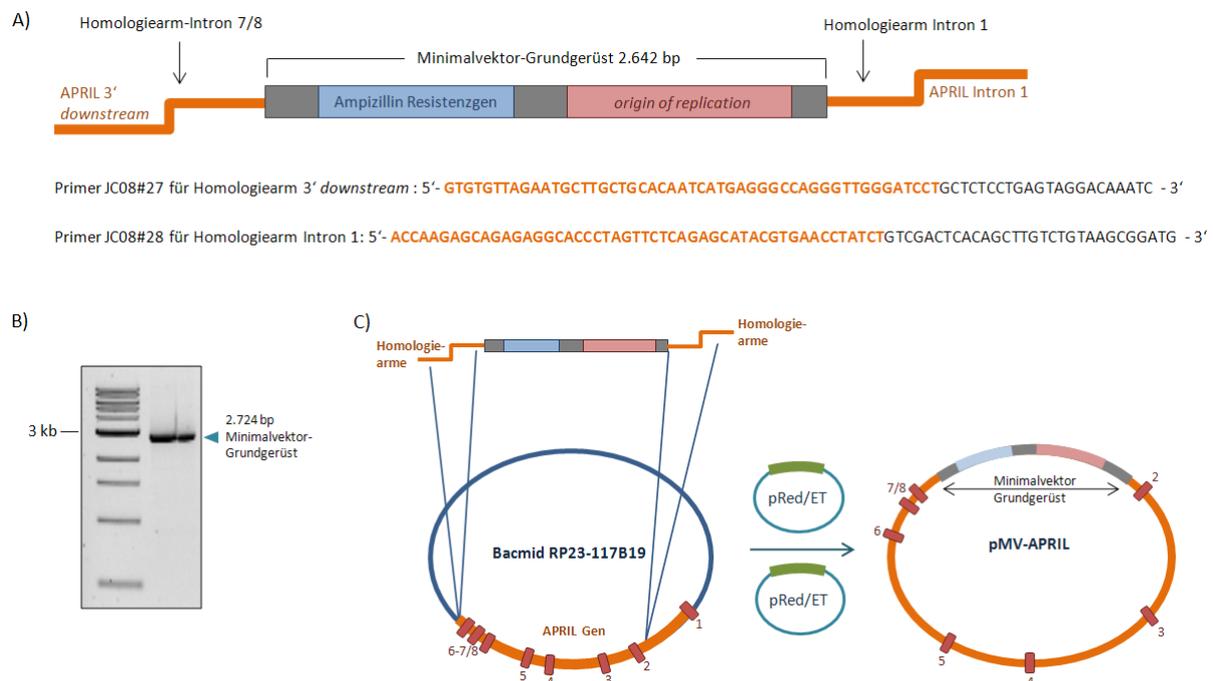
Vor allem die Länge des homologen Bereichs (Homologiearme) im *targeting* Vektor spielt für die Spezifität und somit für die Rekombinationsfrequenz des Vektors ins murine Genom der ES-Zellen eine wichtige Rolle (Thomas et al., 1992). Der Bereich der Homologiearme im Rekombinations-Vektor und somit der Abschnitt des *APRIL*-Gens, der in den Minimalvektor-Kontext subkloniert werden sollte, wurde freundlicherweise von Dr. Sibylle Blumenthal von Gene Bridges (Heidelberg) festgelegt. Auch die Integrationsbereiche der loxP-Rekombinationssequenzen, sowie der von FRT-Seiten flankierten Neomycin-Resistenzkassette, wurden anhand ihrer Vorschläge bestimmt. Aufgrund der Red<sup>®</sup>/ET<sup>®</sup>-Methodik konnte ohne Restriktionsenzyme gearbeitet werden, so dass bei der Wahl der Integrationsstellen keine Einschränkungen wegen spezifischer Restriktionsschnittstellen vorlagen.

Nach den Vorschlägen von Dr. Sibylle Blumenthal wurde für die Subklonierung des *APRIL*-Gens der Abschnitt ab Intron 1 (295 bp vor Exon 2) bis zum Ende des Gens (3' *downstream* Bereich) gewählt. Die Homologiearme, über die der Rekombinations-Vektor ins murine Genom integriert wird, wiesen dabei jeweils eine Länge von etwa 3 kb auf, da die loxP-Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase in Intron 2 und 5 des *APRIL*-Gens integriert wurden. Die von FRT-Seiten flankierte Neomycin-Resistenzkassette wurde ebenfalls in das Intron 5 inseriert. Im späteren *knockout*

Mausmodell würde die Cre-vermittelte Rekombination der loxP-Rekombinationsstellen in Intron 2 und 5 zu einer Deletion der Exons 3, 4 und 5 führen. Diese Deletion resultierte im Fehlen der Aminosäuren 69-228 und somit der Abwesenheit funktioneller Domänen wie dem *nuclear export signals* NES, den *leucine rich repeats* LRR 3 und 4 sowie Teilen der *highly acidic* Domäne, was die Expression eines nicht-funktionellen APRIL Proteins zur Folge hätte.

#### 4.2.1.1 Subklonierung des APRIL-Gens

Die Subklonierung des APRIL-Gens aus dem Bacmid RP23-117B19 erfolgte über spezifische APRIL-Homologiearme, welche über PCR als Primer JC08#27 und JC08##28 an das Grundgerüst des Minimalvektors, ein 2.642 bp großes DNA-Fragment mit einem ColE1 *origin of replication* sowie einem Ampicillin-Resistenzgen, angelagert wurden (siehe Abbildung 28A). Anschließend wurde das nun 2.742 bp große PCR-Amplifikat im 1 % Agarosegel überprüft (siehe Abbildung 28B) und in Bacmid-haltige *E.coli* Bakterien transformiert. Über homologe Rekombination fand der Austausch der homologen DNA-Sequenzen statt und das APRIL-Gen wurde aus dem Bacmid in den Vektor überführt. Katalysiert wurde der Vorgang von den Proteinpaaren RecE/RecT und Red $\alpha$ /Red $\beta$ , die vom Expressionsplasmid pRedET exprimiert wurden. Abbildung 28C zeigt das Vorgehen schematisch.



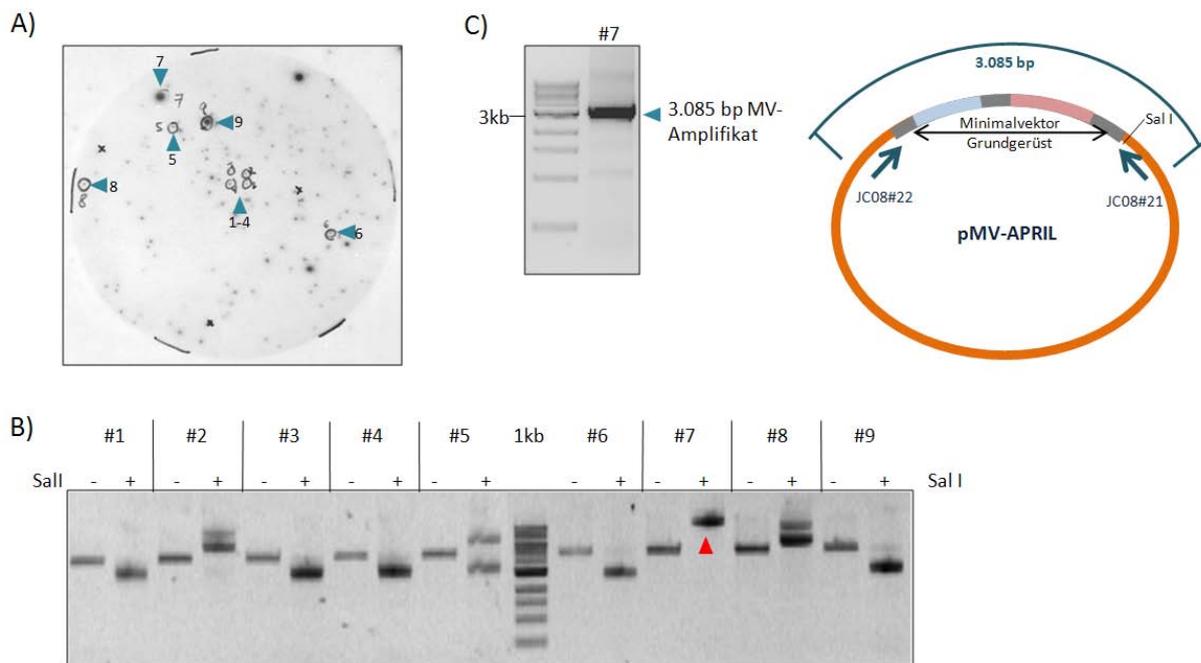
**Abbildung 28: Schematische Darstellung der Subklonierung des APRIL-Gens:**

**A)** Anlagerung der für Intron 1 und 3' downstream homologen APRIL-Arme (orange) mittels PCR an das Minimalvektor-Grundgerüst. Die Primersequenz ist in 5' – 3' Richtung angegeben und die homologe APRIL-Sequenz farblich gekennzeichnet (orange).

**B)** Überprüfung des 2.742 bp großen Minimalvektor PCR-Produkts nach Anlagerung der APRIL-Homologiearme im 1 % Agarosegel.

**C)** Subklonierung des APRIL-Gens, von Red/ET-Proteinpaaren katalysiert: die Homologiearme lagern sich an die homologen Zielsequenzen im APRIL-Gen an und das APRIL-Gen wird aus dem Bacmid herausgezogen.

Trotz der für *APRIL*-spezifischen Homologiearme wurden bei der Red<sup>®</sup>/ET<sup>®</sup> basierten Subklonierung des *APRIL*-Gens viele unspezifische Nebenprodukte in das Minimalvektor-System eingeführt, was die Identifizierung eines positiven *APRIL*-Subklons mittels Restriktionsanalyse und anschließender Sequenzierung erschwerte. Um die Auswahl möglicher positiver Subklone zunächst einzuschränken, wurde von einem Plattenabdruck aller Klone eine Filterkolonie-Hybridisierung durchgeführt. Mittels der radioaktiv-markierten Sonde JC08#12, die im Intron 3 des *APRIL*-Gens hybridisiert, wurden im Autoradiogramm nur *APRIL*-haltige Subklone kenntlich gemacht (siehe Abbildung 29A). Eine Auswahl dieser Subklone (1-9) wurde anschließend mittels Restriktionsanalyse, PCR und Sequenzierung auf das Vorhandensein des subklonierten *APRIL*-Abschnitts untersucht.



**Abbildung 29: Identifizierung des *APRIL*-Subklons pMV-*APRIL* #7**

**A)** Filterkolonie-Hybridisierung: Von der Sonde JC08#12 detektierte Klone im Autoradiogramm des Plattenabdrucks

**B)** Kontroll-Restriktionsanalyse der Klone 1-9 mit Sal I: Die erwartete pMV-*APRIL* Größe von 17.968 bp konnte in etwa einzig bei Klon #7 (siehe roter Pfeil) nachgewiesen werden, alle anderen Klone wiesen trotz Filterkolonie-Hybridisierung unspezifische Nebenprodukte auf. Als Marker wurde der 1 kb DNA-Ladder von NEB verwendet.

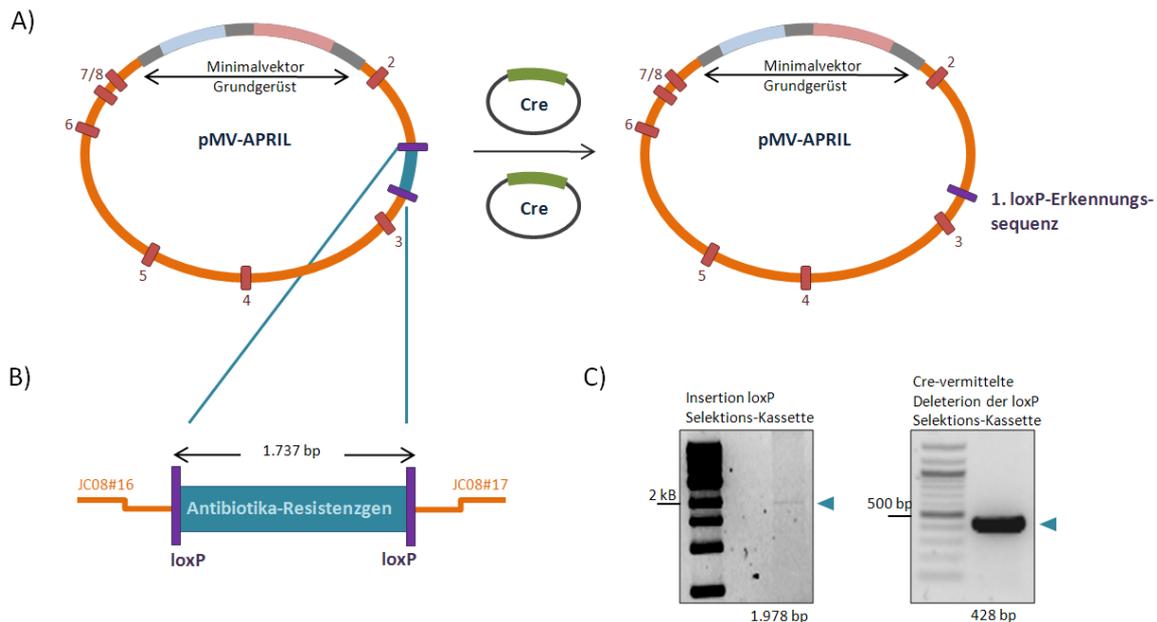
**C)** PCR-Produkt des Minimalvektor-Grundgerüstes (3.085 bp) im 1 % Agarosegel, amplifiziert mit spezifischen *APRIL*-Primern JC08#21 und JC08#22. Als Marker wurde der 1kb DNA-Ladder von NEB verwendet.

Die Restriktionsanalyse mit dem Restriktionsenzym Sal I, welches im Grundgerüst des Minimalvektors schneidet, diente der Größenbestimmung der Klone 1-9. Die exakte Vektorgröße konnte mittels der Restriktionsanalyse nicht ermittelt werden, dennoch wies Klon #7 als einziger Klon annähernd die Größe des Minimalvektorgroße von 17.968 bp auf (siehe Abbildung 29B) und wurde in weiteren Untersuchungen genauer analysiert. Eine Kontroll-PCR mit den spezifischen *APRIL*-Primern JC08#21 und JC08#22, die im Intron 1 und 3' *downstream* Bereich des Gens hybridisieren und somit das

Minimalvektor-Grundgerüst in einer Größe von 3.085 bp aus dem *APRIL*-Gen amplifizierten, bekräftigten das Ergebnis für Klon #7 aus der Restriktionsanalyse (siehe Abbildung 29C). Die darauf folgende Sequenzierung des Vektors von Klon #7 bestätigte die Subklonierung des *APRIL*-Abschnitts von Intron 1 bis zum Ende des Gens in ein Minimalvektor-Plasmid, so dass das pMV-*APRIL* Konstrukt von Klon #7 in den folgenden Schritten für die weitere Modifizierung des *APRIL*-Gens zur Herstellung des *APRIL targeting* Vektors pMV-*APRIL*-KO verwendet wurde.

### 4.2.1.2 Modifizierung des *APRIL*-Gens

Die Integration der ersten loxP Erkennungsstelle in Intron 2, 568 bp vor Exon 3, erfolgte über den Einbau einer „geflochten“ Antibiotika-Resistenzkassette von 1.737 bp Größe. Diese wurde unter Verwendung der Cre-Rekombinase anschließend wieder entfernt, so dass aufgrund des loxP-spezifischen Rekombinationsmechanismus eine loxP-Rekombinationssequenz im Intron 2 zurückblieb (siehe Abbildung 31A). Die Insertion dieser „geflochten“ Antibiotika-Resistenzkassette erfolgte wie auch schon bei der Subklonierung des *APRIL*-Gen Abschnitts durch homologe Rekombination über spezifische *APRIL*-Gen-Homologiearme. Diese wurden durch PCR (JC08#16 und JC08#17) an das kommerziell erhältliche *template* der „geflochten“ Resistenz-Kassette angefügt (siehe Abbildung 31B). Die Insertion sowie die darauf folgende Cre-vermittelte Deletion der „geflochten“ Resistenz-Kassette wurde durch Restriktionsanalyse (Daten nicht gezeigt) und mittels PCR (JC08#16 und JC08#17) überprüft (siehe Abbildung 31B). Nach erfolgreicher Integration der Kassette konnte im 1 % Agarosegel ein Amplifikat von 1.978 bp detektiert werden, das nach der Deletion der „geflochten“ Antibiotika-Resistenzkassette nur noch eine Größe von 428 bp aufwies (siehe Abbildung 31C). Die anschließende DNA-Sequenzierung bestätigte, 568 bp von Exon 3 entfernt, die erfolgreiche Insertion der 1. loxP-Rekombinationssequenz in Intron 2.



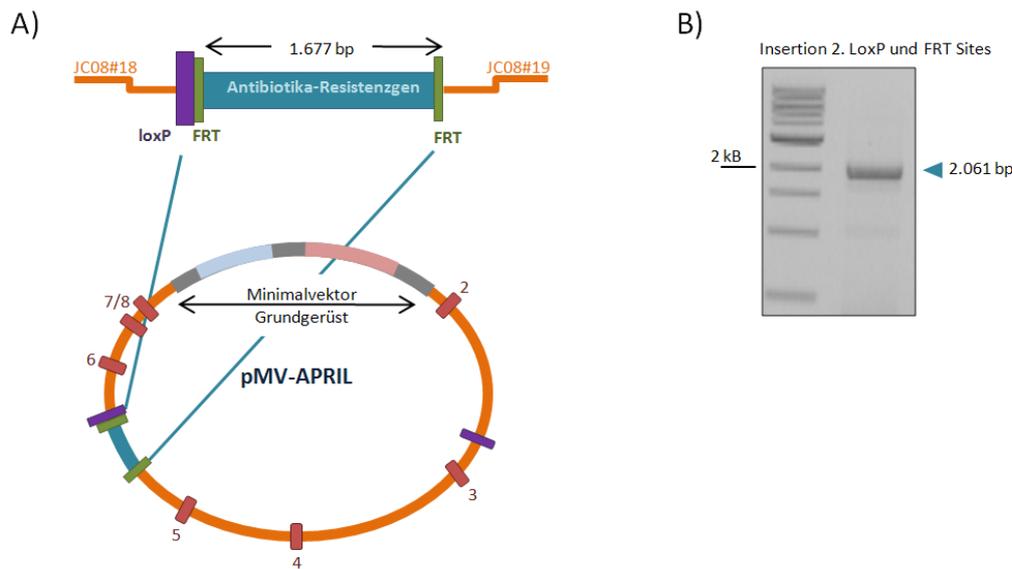
**Abbildung 30: Teil 1 der Modifikation des APRIL-Subklons pMV-APRIL zum targeting-Vektor pMV-APRIL-KO**

**A)** Schematische Darstellung der Insertion loxP-Rekombinationssequenz: eine „geflochte“ Antibiotika-Resistenzkassette wurde über Homologiearme in Intron 2 von pMV-APRIL integriert. Über den Cre-Rekombinationsmechanismus wurde die Resistenzkassette deletiert, es verbleibt eine loxP-Sequenz im Intron 2, welche als 1. loxP-Erkennungssequenz bezeichnet wird.

**B)** Anlagerung der Homologiearme an die „geflochte“ Antibiotika-Resistenzkassette über die Primer JC08#16 und JC08#17.

**C)** PCR-Kontrollen der Insertion (1.978 bp) und anschließenden Deletion (428 bp) der „geflochten“ Antibiotika-Resistenzkassette Insertion der 2. loxP-Rekombinationssequenz mit den Homologiearm-Primern JC08#16 und JC08#17; DNA Ladder 1 kb (links) und 100 bp (rechts) von NEB.

Die zweite loxP-Erkennungssequenz wurde in Kombination mit einem von FRT-Seiten flankierten Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen von 1.677 bp Länge über die von den Primern JC08#18 und JC08#19 angelagerten Homologiearme ins Intron 5 entsprechend integriert (siehe Abbildung 31C). Der Einbau wurde durch Restriktionsanalyse (Daten nicht gezeigt) sowie einer Kontroll-PCR mit den für die Homologiearme verwendeten Primern (JC08#18 und JC08#19) überprüft (Abbildung 31D).



**Abbildung 31: Teil 2 der Modifikation des APRIL-Subklons pMV-APRIL zum *targeting*-Vektor pMV-APRIL-KO**

**A)** Schematische Darstellung der Insertion der von FRT-Sequenzen flankierten Antibiotika-Resistenzkassette (Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen) via Homologiearme (über die Primer JC08#18 und JC08#19)

**B)** PCR-Kontrolle der Insertion zweiten loxP-Erkennungssequenz in Kombination mit einem von FRT-Seiten flankierten Kanamycin/Neomycin-Resistenzgen mit den Homologiearm-Primern JC08#18 und JC08#19 (2.061 bp), DNA Ladder 1 kb von NEB.

Es folgte eine finale Sequenzierung des Rekombinations-Vektors pMV-APRIL-KO, in welcher alle Exon-Bereiche sowie hinzugefügten Modifikationen überprüft und bestätigt wurden. Das fertige Konstrukt wurde anschließend mit Sal I für den Einbau ins murine Genome linearisiert und aufgereinigt.

#### 4.2.2 Gezielte Modifikation embryonaler Stammzellklone

Wie bereits unter 3.4 beschrieben fanden alle Arbeiten mit murinen embryonalen Stammzellen am Zentrum für Molekulare Neurobiologie (ZMNH, Hamburg) in der Arbeitsgruppe für transgene Tiere unter Anleitung von Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer und ihren Mitarbeitern statt. Die Einbringung des *targeting* Konstrukts in murine ES-Zellen mittels Elektroporation sowie die darauf folgende Kultivierung und Selektion der Zellen wurde gemeinsam unter der Anleitung von Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer durchgeführt. Die Injektion von ES-Zellklonen in Spender-Blastozysten sowie die Implantation der Blastozysten in die Uteri scheinchwangerer Ammentiere wurden freundlicherweise von Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer und ihren Mitarbeitern durchgeführt.

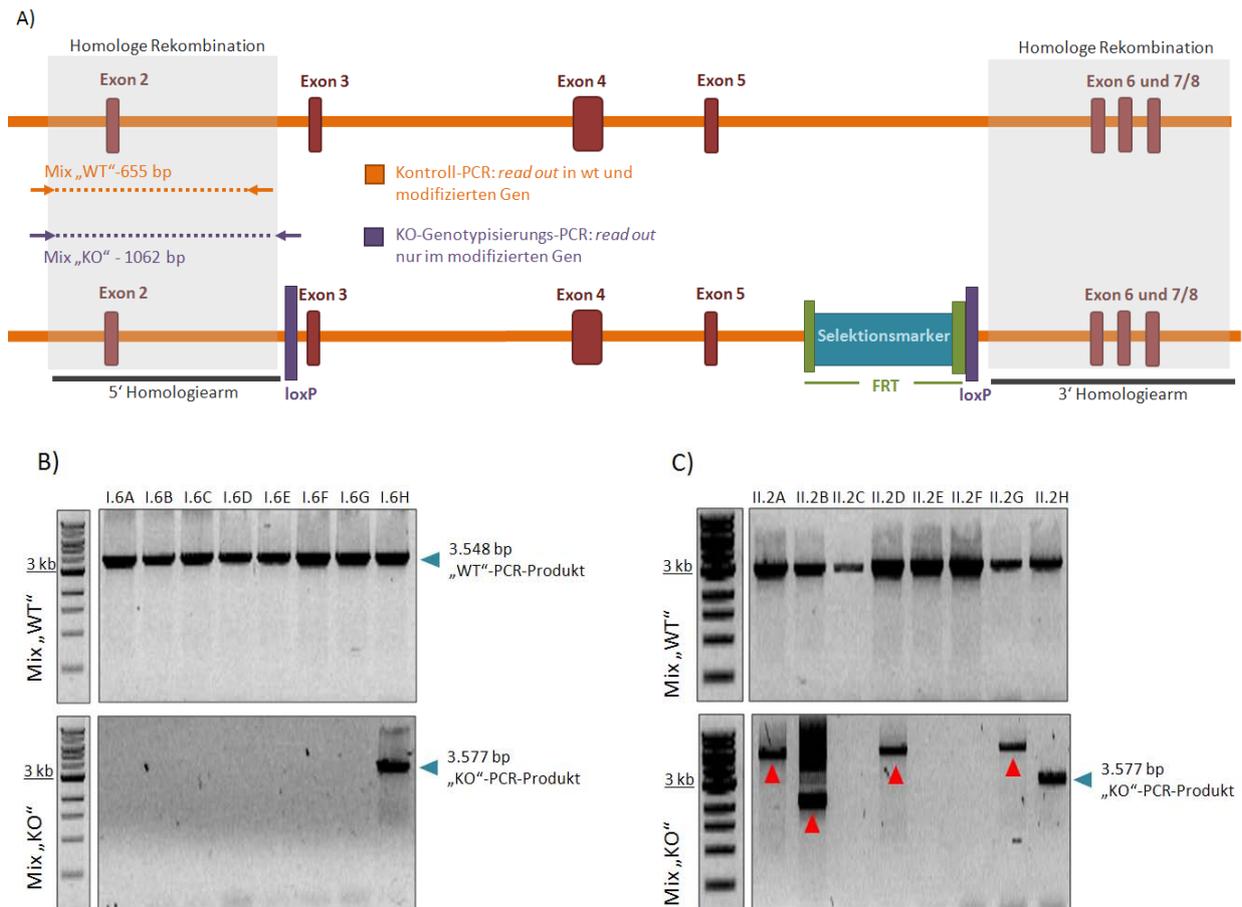
##### 4.2.2.1 Rekombination des *targeting* Vektors in R1 ES-Zellen

Für die Generierung transgener *APRIL*<sup>flox</sup> ES-Zellklone wurden R1 ES-Zellen (Nagy et al., 1993) vom 129-Mausstamm mit männlichem Genotyp verwendet. Der linearisierte *targeting* Vektor pMV-APRIL-KO wurde in die ES-Zellen elektroporiert und stabil transfizierte ES-Zellen über die sich im Rekombinations-Vektor befindliche Neomycin-Resistenzkassette mittels G418- (Geneticin) haltigen Medium selektiert. Da es sich beim Prinzip der homologen Rekombination um ein sehr seltenes

Ereignis handelt und trotz homologer Sequenzen in den meisten Fällen eine nicht-zielgerichtete Integration des *targeting* Konstrukts ins murine Genom stattfindet, folgte auf die G418-Selektion eine Genotypisierung zur Identifizierung homolog rekombinierter *APRIL*<sup>flox/wt</sup> ES-Zellklone. Die insgesamt 192 selektierten ES-Zellklone wurden in zwei 96-Well Kulturplatten amplifiziert und genomische DNA (gDNA) für die Genotypisierung präpariert. Anschließend wurde die gDNA jedes einzelnen Klons im PCR-Screening überprüft.

### **Genotypisierung der rekombinierten ES-Zellen im PCR Screening**

Im PCR-Screening wurden alle durch die Antibiotika-Selektion erhaltenen ES-Zellklone auf homologe Rekombination des *targeting* Vektors ins murine Genom überprüft. Für das PCR-Screening wurden zwei Oligopaare eingesetzt, die sich im *reverse*-Primer unterschieden: das aus den Primern JC08#20 und JC08#37 bestehende Primermix „WT“ als PCR-Kontrolle und das aus den Primern JC08#20 DP09#44 bestehende Primermix „KO“, welches für die homologe Rekombination des pMV-APRIL-KO Vektors spezifisch war. Der Primer JC08#20 hybridisierte in Intron 1 des *APRIL*-Gens in einem Bereich kurz vor den Homologiearmen, welcher demzufolge von der homologen Rekombination nicht betroffen ist. Der Primer JC08#44 lagerte spezifisch innerhalb der 1. loxP-Erkennungssequenz und somit nur im modifizierten Transgen *APRIL*<sup>flox</sup> an. Bei erfolgreicher homologer Rekombination wurde mittels des Primermixes „KO“ ein PCR-Fragment von 3.577 bp amplifiziert (siehe Abbildung 32), nicht-homolog rekombinierte DNA wurde nicht amplifiziert. Um abzusichern, dass ein negatives Ergebnis der „KO“-PCR tatsächlich auf eine nicht-homologe Rekombination schließen ließ und nicht auf mangelnde Funktionalität der PCR zurückzuführen war, wurde zudem Primermix „WT“ als PCR-Kontrolle unter identischen PCR-Bedingungen wie Primermix „KO“ eingesetzt. Der *reverse* Kontroll-Primer JC08#37 hybridisierte dabei im Intron 2 kurz vor der 1. loxP-Erkennungssequenz. Es handelte sich dabei um einen Bereich, der sowohl im homolog rekombinierten Transgen *APRIL*<sup>flox</sup>, als auch der unveränderte *APRIL* Wildtyp-DNA vorhanden ist. Es wurde ein DNA Fragment von 3.548 bp amplifiziert und somit die Funktionalität der PCR überprüft (siehe Abbildung 32A).



**Abbildung 32: Genotypisierung der selektierten ES-Zellklone im PCR-Screening**

**A)** Schematische Darstellung des PCR-Screenings: Mix „WT“ kontrollierte das Screening und amplifizierte sowohl bei homologer Rekombination als auch bei nicht-homologer Rekombination ein PCR-Produkt von 3.548 bp. Mix „KO“ amplifizierte nur bei Homologer Rekombination ein Produkt von 3.577 bp

**B)** PCR-Screening am Beispiel von Klon I.6A – I.6H: oben: Mix „WT“; unten: Mix „KO“; Klon I.6H mit positive homolog rekombiniertem Transgen von 3.577 bp (siehe blauer Pfeil)

**C)** PCR-Screening von Mischkulturen am Beispiel von Klon II.2A – II.2H oben: Mix „WT“; unten: Mix „KO“; Klon xxx mit rekombinierten Transgen, aber falsche PCR-Fragmentgröße von ca. 2.000 bzw. 8.000 bp (siehe rote Pfeile); Klon II.2H mit positive homolog rekombiniertem Transgen von 3.577 bp (siehe blauer Pfeil)

DNA-Marker: 1 kb DNA-Ladder von NEB

Von den 192 in der PCR genotypisierten ES-Zellklonen konnten insgesamt zwei Klone (I.6H und II.2H) als positiv für das homolog rekombinierte Transgen *APRIL<sup>flox</sup>* identifiziert werden (siehe Abbildung 32B und C, blaue Pfeile). In weiteren 20 Klonen konnte mittels PCR das Transgen zwar nachgewiesen werden, allerdings entsprachen die PCR-Produkte nicht der erwarteten Fragmentgröße von 3.577 bp. (siehe Abbildung 32C, rote Pfeile). Die 192 Klone lagen für die Genotypisierung als Duplikate vor, so dass ein zweites PCR-Screening zur Bekräftigung der positiven Ergebnisse von Klon I.6H und II.2H durchgeführt wurde. In diesem wurde die homologe Rekombination des Transgens *APRIL<sup>flox</sup>* für Klon I.6H bestätigt, in Klon II.2H konnte die Modifikation nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.2.2 Systemwechsel – aus braun wird schwarz

Nach der gängigen und etablierten Methode zur Herstellung von *knockout* Mäusen werden aus gezielt modifizierten ES-Zellen des 129 Mausstamms (z.B. R1-Zellen) transgene chimäre Mäuse generiert, die dann in den robusteren C57Bl/6 Stamm zurückgekreuzt werden müssen. Die Wahl der ES-Zellen des 129 Stamms und das aufwendige Zurückkreuzen in den Hintergrund des C57Bl/6 Mausstamms hat zwei Gründe: Zum Einen weisen die meisten C57Bl/6 ES-Zellen im Vergleich zu 129 ES-Zellen nur geringe Keimbahntransmissions-Raten auf und sind weniger robust in der Zellkultur (Hansen et al., 2008). Zum Anderen handelt es sich aber beim C57Bl/6 Stamm um den am besten charakterisierten Inzuchtstamm, der zudem als Referenzstamm zur Sequenzierung des murinen Genoms diente (Waterston et al., 2002). Mäuse des 129 Stamms dagegen pflanzen sich im Vergleich zum C57Bl/6 Stamm schlechter fort und zeigen zudem oft anatomische und immunologische Anormalitäten (Wahlsten et al., 1992; McVicar et al., 2002), oder auch auffällige Verhaltensweise (Crawley et al., 1997). Für die Generierung von transgenen Chimären aus gezielt modifizierten ES-Zellen eignen sich folglich am besten 129 ES-Zellen. Die Rückkreuzung in den genetischen C57Bl/6 Hintergrund erleichtert anschließend die Analyse des Phänotyps.

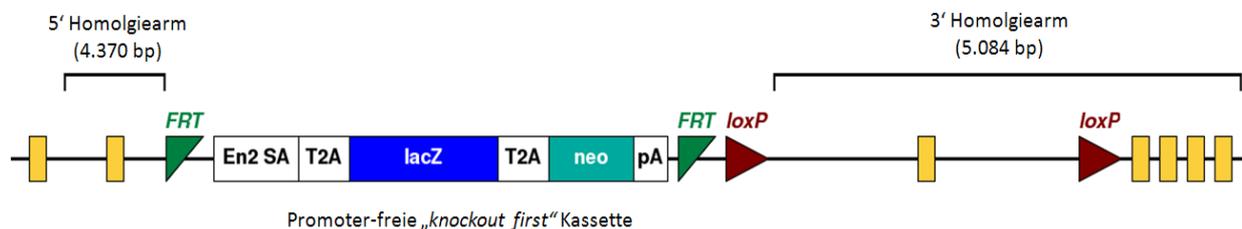
Auch in dieser Dissertation wurden die bisherigen Arbeiten zur Etablierung der konditionellen APRIL *knockout* Mauslinie nach der herkömmlichen Methode in R1 ES-Zellen durchgeführt, die ihren Ursprung im 129-Mausstamm haben. Nachteilig an der herkömmlichen Methode ist allerdings, dass es sich beim Rückkreuzen in den genetischen C57Bl/6 Hintergrund um ein extrem zeitaufwendiges Unterfangen handelt. Mindestens 6-7 Generationen müssen zurückgekreuzt werden, bevor man nicht mehr von einem gemischten, sondern einem „kongenen“ (*congenic*) Hintergrund spricht. Auch die Analyse des Phänotyps im gemischten Hintergrund stellt nur eine suboptimale Alternative dar.

Zum Zeitpunkt der Identifikation eines homolog rekombinanten R1-Zellklons (siehe 4.2.2.1) wurden im Rahmen des EUCOMM-Konsortiums (Auwerx et al., 2004) embryonale Stammzellklone erhältlich, die bereits ein modifiziertes APRIL Allel ( $Anp32^{btm1a(EUCOMM)HmgU}$ ) zur Etablierung einer konditionellen APRIL *knockout* Maus beinhalteten und zudem als C57Bl/6 ES-Zellen eine hohe Keimbahntransmissionsrate aufwiesen (EUCOMM Projekt 32882). Diese ES-Zellklone mit männlichem Genotyp entstammten der Zelllinie JM8.N4, die ihren Ursprung in einem JM8 ES-Zellklon aus C57Bl/6N Mäusen hat und trotz des genetischen C57Bl/6 Hintergrunds eine hohe Keimbahntransmissions-Rate aufweist (Pettitt et al., 2009). Da sich die Generierung des pMV-APRIL-KO *targeting* Vektors sowie die Detektion und Identifizierung eines homolog rekombinierten R1 ES-Klons bereits als sehr zeitaufwendig gestaltet hatte, wurden für die sich anschließende Blastozysteninjektion zur Generierung der chimären Mäuse trotz der erfolgreichen ES-Zellmodifikation im R1-Kontext die JM8.N4 ES-Zellklone des C57Bl/6 Mausstamms des EUCOMM-

Konsortiums verwendet, um zeitaufwendiges Rückkreuzen zu vermeiden. Die modifizierten R1 ES-Klone wurden als Rückfalloption zurückgestellt und die weitere Etablierung der konditionellen APRIL *knockout* Mauslinie erfolgte somit direkt im genetischen C57Bl/6 Hintergrund.

#### 4.2.3 Etablierung der APRIL<sup>Eucomm</sup> *knockout* Maus

Beim Allel *Anp32b*<sup>tm1a(EUCOMM)Hmgu</sup> der JM8.N4 ES-Zellklone, welches im weiteren Verlauf nur noch als APRIL<sup>Eucomm</sup> bezeichnet wird, handelte es sich um eine Modifikation des APRIL-Gens nach der Reporter-markierten konditionellen „*knockout-first*“ Strategie, die unter 1.6.4 erläutert wurde (Testa et al., 2004). Eine von FRT-Seiten flankierten Promotor-freien Reporter-Selektionskassette (*lacZ* und *neoR*) mit einer Spleißakzeptorseite aus dem murinen *En2*-Gen sowie einer SV40-PolyA-Sequenz vermittelt zunächst ein Null-Allel von APRIL und somit die „*knockout-first*“ Strategie. Über die Flp-Rekombinase kann diese Genkassette deletiert werden, beispielsweise bei einem letalen Phänotyp. Der konditionelle *knockout* wird über die Cre-vermittelte Deletion des als kritisch bezeichneten und somit „geflochten“ Exons 4 etabliert. Diese Deletion führt zu einer Verschiebung des gesamten Leserahmens und somit zum Abbruch der Transkription des APRIL-Gens. Die verkürzte APRIL mRNA wird anschließend als *nonsense*-Mutation erkannt und degradiert (NMD *non-sense mediated decay*). Der Aufbau des modifizierten APRIL<sup>EUCOMM</sup>-Gens ist in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33: Darstellung des modifizierten APRIL<sup>EUCOMM</sup>-Gens (*Anp32b*<sup>tm1a(EUCOMM)Hmgu</sup>), übernommen und verändert aus dem Projekt 32882 des EUCOMM Konsortiums<sup>5</sup>**

*Anp32b*<sup>tm1a(EUCOMM)Hmgu</sup>: von FRT-Seiten (grün) flankierte Promotor-freie „*knockout-first*“ Kassetten sowie von loxP Erkennungssequenzen (rot) flankiertes Exon 4 (gelb); **En2 SA** – *splicing acceptor site* aus Intron 2 des murinen *En2* Gens; **LacZ** – β-Galaktosidase-Reporter (blau); **NeoR** – Neomycin-Resistenz (türkis); **T2A** – Peptidsequenz zur multiplen Genexpression;

##### 4.2.3.1 Genotypisierung der transgenen APRIL<sup>Eucomm</sup> JM8.4N ES-Zellklone

Die transgenen JM8.N4 ES-Zellklone des EUCOMM-Konsortiums zur Etablierung einer konditionellen APRIL *knockout* Maus werden über das Helmholtz-Zentrum München mittels PCR genotypisiert und kommerziell vertrieben. Insgesamt standen vier ES-Zellklone zur Verfügung: HEPD0503\_1\_B01, HEPD0503\_1\_E01, HEPD0503\_1\_F01 und HEPD0503\_1\_H01, die im Folgenden als B01, E01, F01 und

<sup>5</sup>[http://www.knockoutmouse.org/targ\\_rep/alleles/6655/allele-image](http://www.knockoutmouse.org/targ_rep/alleles/6655/allele-image)

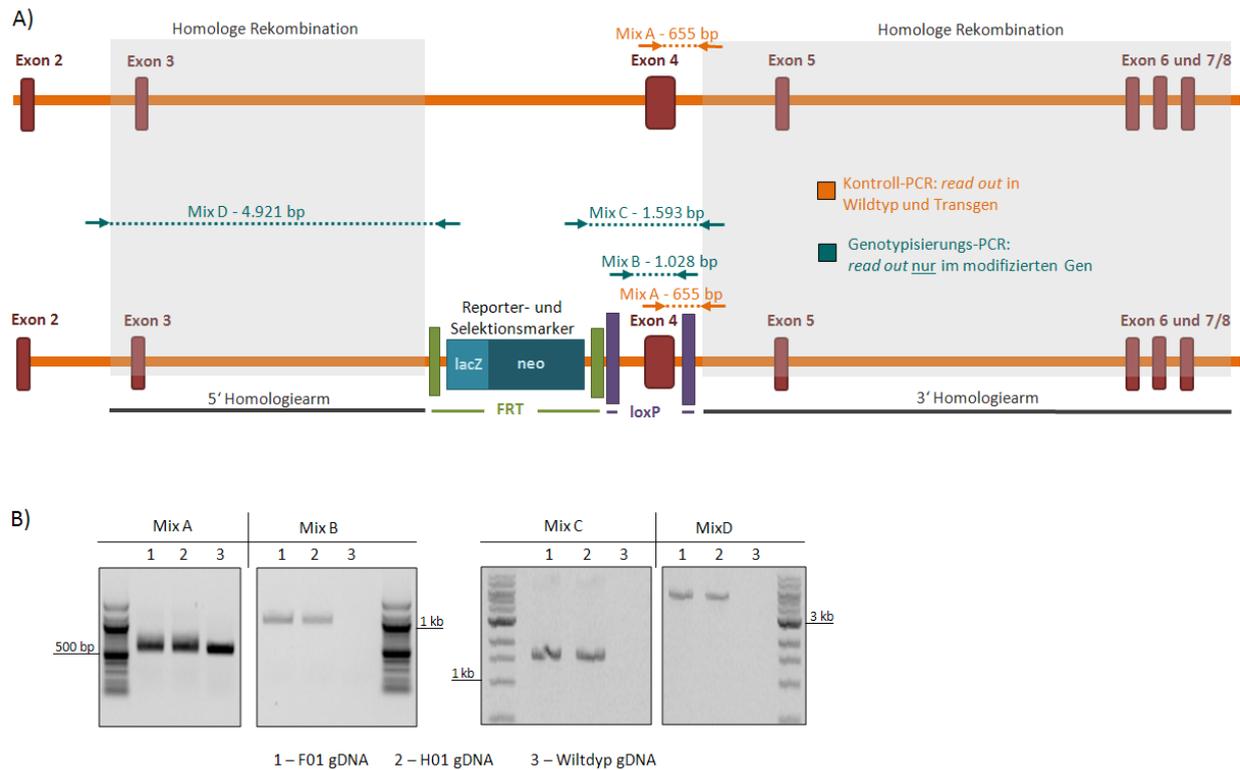
H01 bezeichnet werden. Um die Modifikation des *APRIL*<sup>EU<sub>COMM</sub></sup>-Gens der transgenen ES-Zellklone erneut zu verifizieren, wurde die Genotypisierung der ES-Zellen mittels PCR wiederholt.

Wie auch schon bei der PCR-abhängigen Genotypisierung der R1-ES-Zellklone (siehe 4.2.2.1) wurden zum einen ein Primerpaar verwendet, welches sowohl im Wildtyp als auch im modifizierten Transgen hybridisiert und die Funktionalität der PCR überprüft (Primerpaar A). Zum andern wurden spezifische Primerpaare eingesetzt, die das Transgen selbst sowie dessen gezielte Insertion ins Genom kontrollieren. Primerpaar B bindet spezifisch die loxP-Sequenzen und amplifiziert das „gefloxte“ Exon 4. Der *forward*-Primer von Paar C (DP Kana-for) hybridisiert spezifisch in der Reportermarkierten Selektionskassette des *APRIL*<sup>EU<sub>COMM</sub></sup>-Gens. Primerpaar D kontrolliert die gezielte Insertion (*gene targeting*) der Modifikation. Eine Auflistung der verwendeten Primerpaare und die erwarteten Fragmentgrößen sind in Tabelle 1 abgebildet.

**Tabelle 1 Genotypisierung-Primer**

Primerpaar	Primer	Funktion	PCR-Fragment
A	JC08#12 DP10#28	Kontroll-PCR	655 bp
B	DP10#29 DP10#30	Kontrolliert loxP-Stellen	1.028 bp
C	DP Kana-for DP10#28	Kontrolliert Selektionskassette	1.593bp
D	DP10#12 DP10#13	Kontrolliert <i>gene targeting</i>	4.921bp

Das modifizierte Allel *APRIL*<sup>EU<sub>COMM</sub></sup> konnte mittels der vier verschiedenen Genotypisierungs-PCRs in allen vier Klonen nachgewiesen und kontrolliert werden. Die Daten des Helmholtz-Zentrums wurden somit bestätigt. Eine schematische Darstellung sowie die Ergebnisse der Genotypisierungs-PCR sind in Abbildung 34 dargestellt.



**Abbildung 34: PCR-Genotypisierung der *APRIL*<sup>EUCOMM</sup> ES-Zellklone**

**A)** Schematische Darstellung der Amplifikate des für die Genotypisierung verwendeten Primerpaars A (bindet Wildtyp-Kontrolle und modifiziertes *APRIL*<sup>EUCOMM</sup>-Gen; orange), sowie B, C und D (binden nur modifiziertes *APRIL*<sup>EUCOMM</sup>-Gen; türkis)

**B)** PCR-Produkte der ES-Zellklon Genotypisierungs-PCR, beispielhaft dargestellt anhand der Amplifizierung der gDNA der ES-Zellklone F01 (1), H01 (2) sowie Wildtyp gDNA (3): Die Kontroll-PCR mit Primerpaar A weist bei 1, 2 und 3 eine Bande von 655 bp auf; die Genotypisierungs-Primer B, C und D amplifizieren nur bei den modifizierten *APRIL*<sup>EUCOMM</sup> ES-Zellklonen F01 und H01 und nicht beim Wildtyp DNA-Fragmente von 1.028 bp (B), 1.593 bp (C) und 4.921 bp (D).

#### 4.2.3.2 Generierung chimärer Mäuse und Keimbahntransmission

Zur Generierung der *APRIL* *knockout* Mauslinie wurden die *APRIL*<sup>EUCOMM</sup> JM8.4N ES-Zellklone des C57Bl/6 Mausstamms (schwarz) in Spender-Blastozysten von Mäusen des Balb/c Stamms (weiß) injiziert und die Blastozysten anschließend in die Uteri pseudoträchtiger Ammentiere implantiert. Die Mikroinjektion der ES-Zellen in Balb/c Spender-Blastozysten sowie die Implantation der Blastozysten in die Uteri pseudoträchtiger Ammentiere wurden von Frau Dr. Irm Hermanns-Borgmeyer durchgeführt. Chimäre Nachkommen wurden anhand der schwarz-weiß-agouti gefleckten Fellfarbe identifiziert. Weiße Haarfollikel stammten dabei von den ES-Zellen der Balb/c Spenderblastozyste, während hingegen die schwarzen Haarfollikel von den schwarzen transgenen ES-Zellklonen der JM8.4N ES-Zellen abstammen. Die agouti-farbenen (bräunlichen) Ränder der schwarzen Fellflecken beruhen auf der von zwei Genen abhängigen Fellfarben-Entstehung (*color*-Gen Tyr und *agouti*-Gen A), die im Folgenden kurz erläutert wird.

Das *color*-Gen *Tyr* kodiert für eine Tyrosinase, welche für die Melanin-Synthese verantwortlich ist und von den meisten Mausstämmen, so auch C57Bl/6, als funktionelles *color*-Gen vorliegt ( $Tyr^+/Tyr^+$ ). Weiße Balb/c Mäusen exprimieren aufgrund einer Genmutation ( $Tyr^c/Tyr^c$ ), eine nicht-funktionelle Tyrosinase, die für den Albinismus der Tiere verantwortlich ist. Des Weiteren spielt das *agouti*-Gen bei der Fellfarben-Entstehung eine wichtige Rolle. Es kodiert für das Agouti-Signalpeptid ASIP (*agouti signaling peptid*), welches in Melanozyten für die Synthese der gelblich-bräunlichen Melanin-Variante Phäomelanin und somit für die bräunliche agouti-Fellfärbung verantwortlich ist (Lu et al., 1994). C57Bl/6 Mäuse exprimieren aufgrund einer Promotormutation im *agouti*-Gen kein ASIP (Bultman et al., 1994), so dass kein Phäomelanin synthetisiert wird und dunkles Eumelanin für die schwarze *non-agouti* Fellfarbe verantwortlich ist. C57Bl/6 Mäuse werden als homozygot rezessiv hinsichtlich des *agouti*-Gens bezeichnet (*a/a*). In weißen Albino Balb/c Mäuse wird das *agouti*-Gen dominant exprimiert (*A/A*), allerdings wird aufgrund des mutierten *color*-Gens  $Tyr^c$  kein Melanin synthetisiert, so dass keine Phäomelanin-abhängige agouti-Fellfärbung erfolgen kann.

Bei den chimären Mäusen wurden im Grenzbereich der schwarzen und weißen Fellfärbungen aufgrund des von den weißen Haarfollikeln synthetisierten und sekretierten Agouti-Signalpeptids ASIP das Eumelanin der schwarzen Haarfollikel zu bräunlichem Phäomelanin synthetisiert, was zu agouti-farbenen Rändern der schwarzen Fellflecken führt (siehe Abbildung 35).

### **Chimäre Nachkommen**

Aus den vier erhaltenen APRIL<sup>EUCOMM</sup> JM8.4N ES-Zellklonen B01, E01, F01 und H01 wurden mittels Blastozysteninjektion und -implantation insgesamt 9 chimäre männliche Mäuse (Böcke) generiert. Aus den ES-Zellen von Klon B01 wurde ein chimärer Bock hergestellt (B01\_ch-011), aus den ES-Zellklonen F01 und H01 konnten 5 (F01\_ch-012 bis F01\_ch-016) bzw. 3 (H01\_ch-052, -053 und -054) chimäre Männchen etabliert werden. Die E01 ES-Zellen eigneten sich nicht zur Etablierung chimärer Nachkommen (siehe Tabelle 2 und Abbildung 35).



**Abbildung 35: Chimäre Nachkommen**

Schwarz-weiß-agouti gefleckte chimäre Böcke F01\_ch-014, F01\_ch-015 und F01\_ch-016 im Alter von 3 Wochen

**Tabelle 2 Chimäre Nachkommen der ES-Zellklone B01, F01, E01 und H01 die Keimbahntransmission**

JM8.N4 ES-Zellklon	Chimäre Nachkommen		Fertilität
B01	1	B01_ch-011	fertil
E01	n.d.	n.d.	n.d.*
F01	5	F01_ch-012, -014, -013, -015 und 016	2 fertil, 3 steril
H01	3	H01_ch-052, -053 und 054	alle fertil

\*n.d. *not detected* – kein Nachwuchs

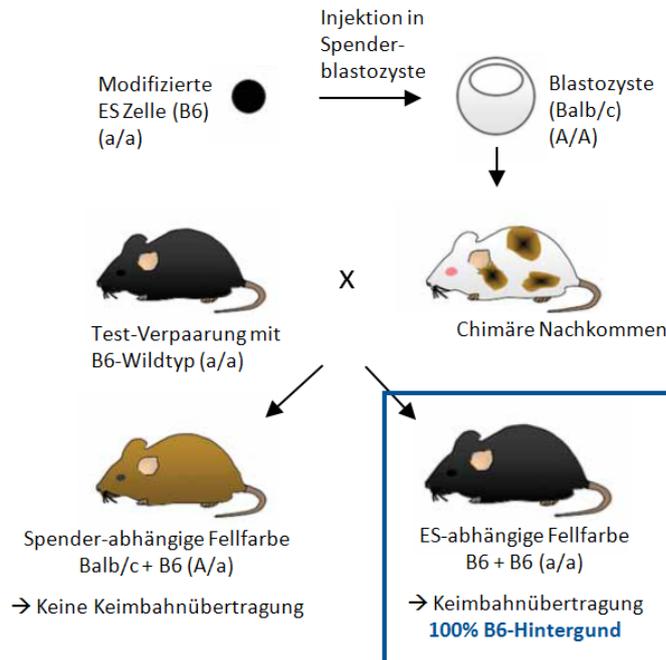
Die chimären Nachkommen F01\_ch-13, F01\_ch-15, und F01\_ch-16 erwiesen sich in der Zucht mit Weibchen des Inzuchtmausstamms C57Bl/6J (2010) als steril. Die Autopsie der Tiere offenbarte bei Chimäre F01\_ch-016 einen verkümmerten rechten Hoden sowie ein Geschwulst am linken Hoden. Die Böcke F01\_ch-13 und F01\_ch-15 wiesen keine anatomischen Anomalitäten auf, befanden sich mit 37,9 g und 46,4 g Körpergewicht aber an der Grenze zum adipösen Bereich (Normalgewicht 25-35 g; persönliche Kommunikation Ulla Müller), was auch eine Ursache für Unfruchtbarkeit sein kann.

Die Chimären B01\_ch-11, F01\_ch-12, F01\_ch-14, H01\_ch-052, -053 und -054 waren hingegen alle fertil und wurden mit Weibchen des Inzuchtstamms C57Bl/6J (2010) verpaart, um die Keimbahntransmission der transgenen modifizierten APRIL<sup>EUCOMM</sup> JM8.N4 ES-Zellen zu überprüfen.

### Keimbahntransmission der chimären Nachkommen

Bei der Verpaarung mit Wildtypweibchen des Inzuchtstamms C57Bl/6J (2010) sollte überprüft werden, ob die modifizierten embryonalen Stammzellen in die Keimbahn der chimären Tiere gelangt sind und die Modifikation des *APRIL*-Gens von den Chimären vererbt werden kann. Hierbei spielte erneut die Fellfarbe eine wichtige Rolle: Das *agouti*-Gen *A*, welches für das Agouti-Signalpeptid ASIP kodiert, liegt wie bereits erläutert in Balb/c Mäusen homozygot dominant (*A/A*), und in C57Bl/6 Mäusen homozygot rezessiv (*a/a*) vor. Bei der Verpaarung mit Wildtypweibchen des Inzuchtstamms C57Bl/6J (2010) vererben die Weibchen ein rezessives *agouti*-Allel (*a*). Chimäre Böcke, welche die modifizierten JM8.N4 ES-Zellen des C57Bl/6 Stamms in ihrer Keimbahn trugen, vererbten folglich ebenfalls ein rezessives *agouti*-Allel (*a*). Die entsprechenden Nachkommen (F1-Generation) sind folglich homozygot rezessiv für das *agouti*-Gen (*a/a*) und haben somit ein schwarzes Fell. Befanden sich in der Keimbahn der chimären Böcke hingegen keine modifizierten C57Bl/6 ES-Zellen, sondern nur die Balb/c ES-Zellen der Spenderblastozyste, wurde ein dominantes *agouti*-Allel (*A*) vererbt.

Diese F1-Generation ist dann heterozygot dominant/rezessiv für das *agouti*-Gen (A/a) und hat somit agouti-farbenes bräunliches Fell (siehe Abbildung 36).



**Abbildung 36: Überblick Schema der Keimbahntransmission: von der ES-Zelle bis zur Keimbahnübertragung (verändert nach Pettitt et al., 2009)**

Die modifizierten transgenen ES Zellklone aus schwarzen C57Bl/6 Mäusen (B6) wurden in eine Spenderblastozyste von weißen Balb/c Mäusen injiziert. Die Blastozyste wurde in scheinchwangere Ammentiere implantiert und chimäre Nachkommen wurden geboren. Um die Keimbahntransmission der Chimären zu untersuchen, wurden diese mit schwarzen B6 Wildtyp-Mäusen verpaart. Wies der Nachwuchs ein agouti-farbenes Fell auf, lag keine Keimbahntransmission vor, da das dominante agouti-Allel von den Balb/c ES-Zellen der Spenderblastozyste stammte. Wies der Nachwuchs eine schwarze Fellfarbe auf, wurden die schwarzen ES-Zellen des C57Bl/6 Stamms (B6) mit dem modifizierten *APRIL<sup>EUCOMM</sup>*-Gen weitervererbt.

Die fertilen Böcke B01\_ch-11, F01\_ch-12, F01\_ch-14, H01\_ch-052, -053 und -054 wurden jeweils mit mindestens sechs verschiedenen Weibchen verpaart. Dabei waren die Nachkommen der Chimären B01\_ch-11, F01\_ch-12, F01\_ch-14, H01\_ch-053 und -054 immer agouti-farben, so dass keine Keimbahnübertragung vorlag. Einzig die Verpaarungen mit Bock H01\_ch-052 führten zu einer schwarzen F1-Generation, so dass von einer Keimbahntransmission ausgegangen werden konnte (siehe Tabelle 3 und Abbildung 37). Die weitere Zucht wurde nur noch mit dem chimären Bock H01\_ch-052 durchgeführt.

**Tabelle 3 Chimäre Nachkommen der ES-Zellklone B01, F01, E01 und H01 die Keimbahntransmission**

Chimäre Nachkommen	Fertilität	Keimbahntransmission
B01_ch-011	fertil	negativ
F01_ch-012	fertil	negativ
F01_ch-013	steril	negativ
F01_ch-014	fertil	n.d.
F01_ch-015	steril	n.d.
F01_ch-016	steril	n.d.
H01_ch-052	fertil	negativ
H01_ch-053	fertil	negativ
<b>H01_ch-054</b>	<b>fertil</b>	<b>positiv</b>



**Abbildung 37: Ausgewachsener, fertiler chimärer Bock H01\_ch-054, positiv für Keimbahntransmission**

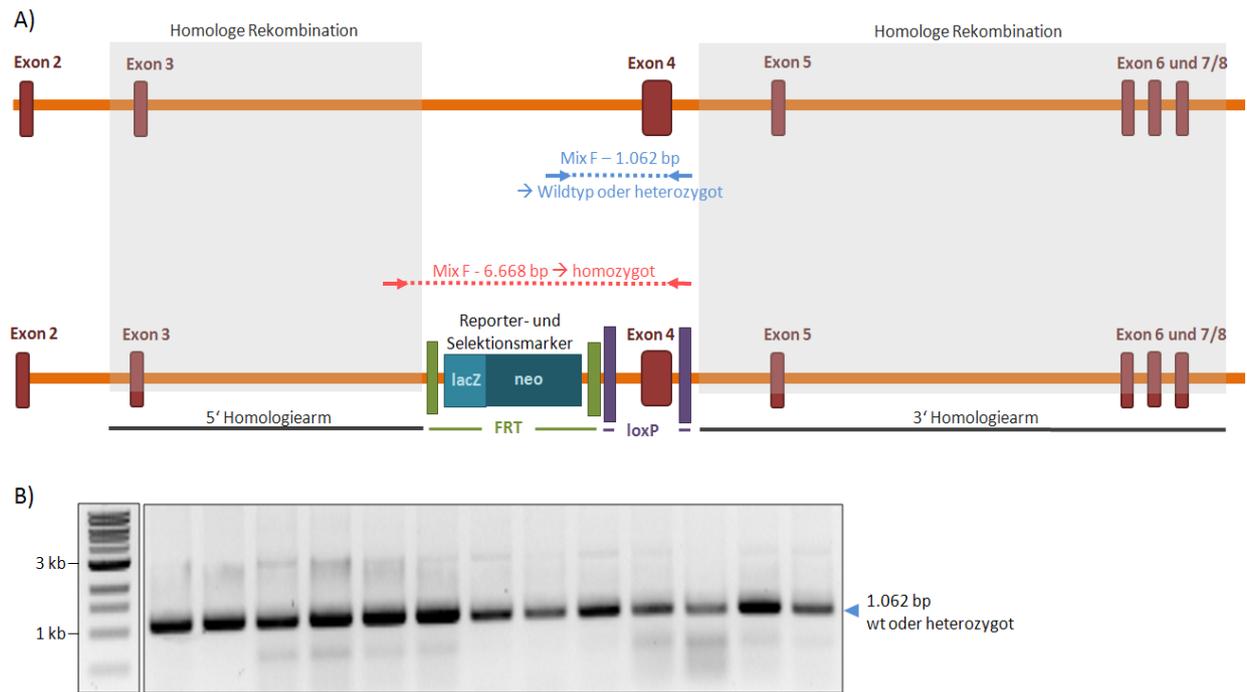
## 4.2.4 Zucht der $APRIL^{EUCOMM}$ Nachkommen

### 4.2.4.1 Genotypisierung der F1-Generation

Modifikationen in ES-Zellen sind grundsätzlich heterozygot. Auch die transgenen  $APRIL^{EUCOMM}$  JM8.N4 ES-Zellen lagen heterozygot für die  $APRIL$ -Modifikation vor ( $APRIL^{EUCOMM/wt}$ ). Die schwarze F1-Nachkommen des Keimbahn-transmissiven chimären H01\_ch-052 Männchens und sechs verschiedenen Wildtypweibchen des Inzuchtstamms C57Bl/6J (2010) mussten folglich mittels PCR genotypisiert werden, um die tatsächlichen Träger des  $APRIL^{EUCOMM}$ -Allels zu identifizieren. Hierfür wurden dem F1-Nachwuchs Schwanzbiopsien entnommen, die genomische DNA aufbereitet und mittels der bereits unter 4.2.3.1 etablierten Genotypisierungs-PCR analysiert. Nach Mendel wurde dabei ein Verhältnis der heterozygoten Mäusen mit dem modifizierten Allel ( $APRIL^{EUCOMM/wt}$ ) zu Wildtypmäusen ( $APRIL^{wt/wt}$ ) von 1:2 (50 %) erwartet. Insgesamt wurden 63 Nachkommen der F1-Generation aus neun Würfen genotypisiert. Das modifizierte  $APRIL^{EUCOMM}$ -Allel wurde dabei bei 23 der F1-Nachkommen detektiert (11 Weibchen, 12 Männchen), so dass im Ganzen 36,5 % des gesamten F1-Nachwuchses das modifizierte Transgen trugen. Dies entsprach einem Verhältnis von 1:2 und somit in etwa den Mendelschen Erwartungen.

### 4.2.4.2 Etablierung der homozygoten F2-Generation

Die heterozygoten Träger des  $APRIL^{EUCOMM}$ -Allels der F1-Generation wurden anschließend miteinander verpaart, um in der F2-Generation homozygote Träger des  $APRIL^{EUCOMM}$ -Allels zu erhalten. Die homozygoten  $APRIL^{EUCOMM}$  F2-Nachkommen würden aufgrund der „*knockout-first*“ Strategie bereits Null-Allele des  $APRIL$ -Gens und somit einen *knockout* aufweisen. Für die Detektion homozygoter F2-Nachkommen wurde zum einen erneut die etablierte Genotypisierungs-PCR verwendet, um das  $APRIL^{EUCOMM}$ -Allel nachzuweisen (siehe Tabelle 1, Primerpaare A, B, C und D). Anschließend wurde eine weitere Kontroll-PCR durchgeführt, mittels welcher heterozygote von homozygoten Nachkommen unterschieden werden können, und die PCR-Produkte zudem sequenziert. Es wurde das Primerpaar F verwendet (DP11#27 und DP11#28)t, welches im nicht-modifizierten Bereich des  $APRIL$ -Gens hybridisiert und im Wildtyp ein PCR-Produkt von 1.062 bp amplifiziert. Beim modifizierten  $APRIL^{EUCOMM}$ -Allel weist das Amplifikat aufgrund der inserierten Reporter-Kassette eine Größe von 6.668 bp auf. Bei heterozygoten Nachkommen wird aufgrund des kinetischen Vorteils des kleineren Fragments in der PCR das Wildtyp  $APRIL$ -Allel amplifiziert. Einzig bei homozygoten Nachkommen, welche nur das modifizierte  $APRIL^{EUCOMM}$ -Allel aufweisen, wird ein Fragment von 6.668 bp amplifiziert (siehe Abbildung 38).



**Abbildung 38: Genotypisierung der F2-Nachkommen**

**A)** Schematische Darstellung der PCR zur Detektion von homozygoten und heterozygoten Nachkommen: Das Primerpaar F der PCR binden im nicht-modifizierten Bereich des APRIL-Gens. Das Wildtyp *APRIL<sup>wt</sup>*-Allel wird in einer Größe von 1.062 amplifiziert (in blau). Das Amplifikat des modifizierten *APRIL<sup>EUCOMM</sup>*-Allels weist aufgrund des inserierten Reporter-Marker-Gens eine Größe von 6.668 bp auf. Bei heterozygoten Nachkommen liegen beide Allele vor, allerdings wird aufgrund des kinetischen Vorteils das kleineren Fragments des Wildtyp-Alles bevorzugt amplifiziert (in blau). Einzig bei homozygoten Nachkommen, bei denen beide Allele die *APRIL<sup>EUCOMM</sup>* Modifikation tragen, wird das große DNA-Fragment von 6.668 bp (in rosa).

**B)** PCR-Produkte der F2-Genotypisierungs-PCR: Beispielhaft dargestellt anhand der Amplifizierung der gDNA von F2-Nachkommen #99-111.

Die Ergebnisse der Genotypisierungs-PCR sowie auch die Sequenzierungen der PCR-Produkte (Daten nicht gezeigt) wiesen darauf hin, dass in der F2-Generation keine homozygoten Nachkommen erzeugt wurden, sondern nur heterozygote und Wildtyp Tiere. Gleichzeitig wurde von Reilly et al. publiziert, dass sich die vollständige Inhibition der APRIL-Expression durch einen homozygoten *knockout* letal auf die perinatale Entwicklung von Mäusen auswirkt (Reilly et al., 2011). Es konnte folglich davon ausgegangen werden, dass aufgrund der „*knockout-first*“ Strategie, welche ein Null-Allel zur Folge hat, keine lebensfähigen homozygoten Nachkommen erzeugt wurden. Demzufolge sollen die heterozygoten F1-Nachkommen (*APRIL<sup>EUCOMM/wt</sup>*) zuerst mit transgenen Flp-Mäusen (Flp-*Deleter*) verpaart werden, um die von FRT-Stellen flankierte „*knockout-first*“ Genkassette durch Anwesenheit einer Flp-Rekombinase zu deletieren. Aus zeitlichen Gründen konnte dieser Schritt sowie die sich daran anschließende Verpaarung mit einer *Cre-Deleter* Mauslinie zur finalen Etablierung einer konditionellen APRIL *knockout* Mauslinie im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden.

## 5 Diskussion

Die Regulation der Genexpression ist für die Zelle ein essentieller da lebenswichtiger Mechanismus. Die Genexpression wird auf den Ebenen der Transkription, der posttranskriptionellen mRNA Prozessierungsmechanismen, der Translation sowie durch posttranslationale Modifikationen der daran beteiligten Faktoren reguliert. In den letzten Jahren sind vor allem posttranskriptionelle Prozesse wie das Spleißen, die Stabilisierung/Destabilisierung und auch die Lokalisation von Transkripten in den Fokus der wissenschaftlichen Untersuchungen gerückt. So konnte beispielsweise auf der Ebene des nukleozytoplasmatischen mRNA-Transports gezeigt werden, dass beim Kernexport von mRNAs verschiedene Wege genutzt werden können und die Wahl des jeweiligen Transportwegs mit der funktionellen Bedeutung der jeweiligen mRNAs zusammenzuhängen scheint. Zwar gilt nach wie vor das Heterodimer TAP-p15 als Haupt-Exportfaktor von zellulären Transkripten. Doch für eine Reihe an induzierbaren mRNAs konnte ein CRM1-abhängiger nukleozytoplasmatischer Transportweg beschrieben werden, obgleich lange das Dogma galt, dass das Karyopherin CRM1 keine zellulären mRNAs aus dem Zellkern exportiert. Eine Gruppe dieser CRM1-abhängigen mRNAs kodieren sogenannte *early response genes* (ERGs), wie z.B. *c-fos*, *COX-2*, *VEGF* oder auch *interferon- $\alpha$ 1* (Brennan et al., 2000; Jang et al., 2003; Cherradi et al., 2006; Jang et al., 2006). Bei Letzterer handelt es sich gleichzeitig auch um ein Transkript der Gruppe von natürlichen intronfreien Genen. Zudem konnten aus aktivierten Jurkat T-Zellen Transkripte isoliert werden, die CRM1-abhängig aus dem Zellkern transportiert werden, wie die mRNA des Glykoproteins CD83 (Schütz et al., 2006). Die CD83 mRNA wird jedoch nicht den ERG mRNAs zugeordnet. Gleichwohl handelt es sich um eine induzierbare mRNA, deren Proteinprodukt CD83 vermutlich eine wichtige Funktion bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort einnimmt (Lechmann et al., 2002b; Reinwald et al., 2008).

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen zu posttranskriptionellen Prozessierungsmechanismen hat sich in den letzten Jahren das Modell des RNA-Operons oder auch RNA-Regulons in Anlehnung an das DNA-Operon von Prokaryoten entwickelt. Das DNA-Operon der Bakterien koordiniert als Funktionseinheit gewissermaßen Gene, die für funktionell ähnliche Proteine kodieren. Die räumliche Nähe der Gene im DNA-Operon hat eine gemeinsame Genexpression der funktionell ähnlichen Proteine zur Folge (siehe Übersichtsartikel: Müller-Hill, 2004). Entsprechend wird inzwischen bei Eukaryoten eine Art posttranskriptionelles RNA-Operon vermutet. Das Modell des RNA-Operons schlägt vor, dass mRNAs, deren Transkription beispielsweise in Folge einer Immun- oder Stressantwort induziert wird, von spezifischen RNA-Bindeproteinen während der posttranskriptionellen Prozessierung im RNA-Operon gemeinsam reguliert werden. Die funktionell verwandten Transkripte weisen dabei ähnliche Erkennungsmerkmale auf (z.B. spezifische *cis*-aktive

Sequenzen im 3'UTR) und können somit von einem RNA-Bindeproteinen gemeinsam koordiniert werden (siehe Übersichtsartikel: Keene, 2007). Als Beispiel sei das RNA-Bindeprotein HuR genannt, welches die Stabilisierung von ERG mRNAs koordinieren kann und bereits als Komponente des RNA-Operons betrachtet wird. In Hinblick auf die funktionellen Gruppen des CRM1-abhängigen mRNA-Transports – induzierbare mRNAs im allgemeinen; ERG mRNAs, Transkripte von natürlich intronfreien Genen oder immunspezifische mRNAs im speziellen – könnte angenommen werden, dass die CRM1-abhängige mRNA-Exportmaschinerie möglicherweise auch als Teil des RNA-Operons zu betrachten ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden die am CRM1-abhängigen Exportmechanismus der CD83 mRNA beteiligten Proteine HuR und APRIL detailliert untersucht und analysiert, so dass der Exportmechanismus des CD83 Transkriptes als Modellsystem für weitere CRM1-abhängige mRNAs betrachtet werden kann. Als allgemeingültig erscheint die Tatsache, dass mRNAs als Ribonukleoprotein-Komplexe verpackt ins Zytoplasma transportiert werden (siehe Übersichtsartikel: Cullen, 2003b). Dabei können die RNA-Bindeproteine unter anderem als Adaptorproteine zwischen den mRNAs und den Exportrezeptoren dienen, deren Interaktion unterstützen oder weitere Faktoren in den Ribonukleoprotein-Komplex rekrutieren. So ist beispielsweise an der Interaktion der meisten mRNAs mit dem Haupt-Exportrezeptor TAP-p15 das Protein REF/Aly beteiligt, da das Heterodimer TAP-p15 selbst nur eine schwache RNA-Bindeaffinität aufweist (siehe Übersichtsartikel: Moore and Rosbash, 2001). Indessen besitzt das Karyopherin CRM1 überhaupt keine RNA-bindenden Eigenschaften, so dass Adaptorproteine für den CRM1-abhängigen mRNA-Transport zwingend erforderlich sind.

Das im Jahr 2000 als erstes zelluläres CRM1-abhängiges identifizierte Transkript des Onkogens c-fos weist als typische ERG mRNA in seinem 3'UTR ein *cis*-aktives Element in Form einer AU-reichen Sequenz auf (**AU-rich elements** bzw. ARE). An dieses Sequenzelement bindet unter anderem das Protein HuR, was zu einer signifikanten Stabilisierung der ansonsten sehr labilen ERG mRNAs führt (Fan and Steitz, 1998b). Auch weitere, als CRM1-abhängig identifizierte ERG mRNAs, wie die COX-2 oder auch VEGF mRNA, besitzen zur Interaktion mit HuR typische ARE-Sequenzen (Jang et al., 2003; Cherradi et al., 2006). Interessanterweise zeichnete sich nach Hemmung von CRM1 mittels des hochspezifischen CRM1-Inhibitors Leptomycin B (LMB) bei den genannten Studien eine Akkumulation der jeweiligen mRNA und HuR im Zellkern ab. Dies ließ darauf schließen, dass spezifische ERG mRNAs in Interaktion mit HuR CRM1-abhängig transportiert werden. Auch bei der CD83 mRNA, welche in aktivierten Jurkat T-Zellen als CRM1-abhängig identifiziert wurde (Schütz et al., 2006), konnte eine Interaktion mit dem Protein HuR beobachtet werden. Allerdings wurde CD83 bisher nicht als *early response gene* beschrieben und die entsprechende mRNA weist auch keine *cis*-aktiven AU-reichen

Elemente auf. Dennoch handelt es sich auch bei der CD83 mRNA – ähnlich wie den anderen bis dato als CRM1-abhängig beschriebenen Transkripten – um eine induzierbare mRNA, die mit HuR interagiert.

Mittels Studien der nukleozytoplasmatischen Transportmechanismen von Viren konnten in den letzten Jahren viele grundlegende Erkenntnisse über die zwischen den Kompartimenten existierenden zellulären Transportsysteme gewonnen werden. Vor allem virale *cis*-aktive RNA-Strukturelemente spielten bei der Analyse des Kernexports von entsprechenden mRNAs eine wichtige Rolle, wie beispielsweise das RRE (*rev response element*) von HIV-1 oder das CTE (*constitutive transport element*) des MPMV („*Mason Pfizer monkey virus*“). So wurde der zelluläre Exportrezeptor CRM1 aufgrund der Interaktion mit dem viralen Protein Rev, welches das RRE der viralen ungespleißten mRNA bindet und als essentielles Adaptorprotein den Kernexport vermittelt, als Exportfaktor identifiziert. Und auch das Heterodimer TAP-p15 konnte aufgrund der direkten Interaktion mit dem CTE des MPMV als Bestandteil der zellulären mRNA-Exportmaschinerie identifiziert werden (siehe Übersichtsartikel: Cullen, 2003a).

In Anbetracht dieser Ergebnisse der virologischen Grundlagenforschung könnten sich in ähnlicher Weise auch hinsichtlich der für den CRM1-abhängigen Kernexport zellulärer mRNAs benötigten Adaptorproteine weitere Kenntnisse ableiten lassen. So ging man lange davon aus, dass die Interaktion strukturierter viraler RNA-Elemente mit *viralen* RNA-Bindeproteinen zu CRM1-abhängigem mRNA-Export führt (siehe HIV-1), während hingegen die Interaktion der viralen RNA-Strukturelemente mit *zellulären* RNA-Bindeproteinen einen TAP-p15-abhängigen mRNA-Export zur Folge hat (siehe MPMV) (Popa et al., 2002). Tatsächlich zeigte sich aber inzwischen, dass auch die direkte Interaktion der viralen Transkripte mit zellulären Komponenten zu einem CRM1-abhängigen Transport der viralen mRNA führen kann, wie es offensichtlich beim Kernexport der mRNA des Foamy Virus der Fall ist (Bodem et al., 2011). Interessanterweise handelt es sich bei diesen, am CRM1-abhängigen Export beteiligten zellulären Komponenten um die bereits erwähnten und aus der Analyse des CD83 mRNA-Exports bereits bekannten Proteine HuR und APRIL, sowie das weitere ANP32-Familienmitglied und ebenfalls als HuR-Ligand bekannte pp32 (Bodem et al., 2011). Eine detaillierte Analyse dieser Komponenten am Beispiel eines zellulären Transportmechanismus wie der des CD83 mRNA-Exports könnte nun weiteren Aufschluss über die Rolle und Funktion von Adaptorproteinen beim CRM1-abhängigen Export zellulärer mRNAs geben.

### **Interaktion der CD83 mRNA mit HuR**

Wie bereits erwähnt interagiert HuR mit einigen der CRM1-abhängigen mRNAs wie beispielsweise mit der *c-fos*, *VEGF* oder auch der CD83 mRNA. Die Analyse der HuR:CD83 mRNA Interaktion zeigte, dass diese Bindung interessanterweise nicht wie bei den ERG mRNAs über ARE-Sequenzen im 3'UTR

der mRNA erfolgt, sondern unüblicher Weise über ein *cis*-aktives Element im kodierenden Bereich des Transkriptes vermittelt wird (Prechtel et al., 2006). Ebenso wenig stabilisiert die Bindung von HuR die CD83 mRNA, wie es bei ERG mRNAs der Fall ist. Vielmehr vermittelt die Interaktion von HuR mit der CD83 mRNA den Transport des CD83 Transkriptes, was unter anderem mittels HuR-spezifischen RNA-Interferenz Studien beobachtet werden konnte. Das strukturierte RNA-Element des kodierenden Bereichs der CD83 mRNA, welches die HuR-Bindung vermittelt, bildet dabei eine theoretische *stem-loop*-artige Struktur aus und wurde als *posttranscriptional regulatory element* PRE bezeichnet (Prechtel et al., 2006).

Interaktionsstudien mit verschiedenen Mutanten des CD83 PREs zeigen nun, dass die Bindung von HuR an das PRE der CD83 mRNA stark von dessen Struktur abhängt. Zwar liegen im PRE potentielle HuR Erkennungs- und Bindungssequenzen vor (UUUUCU; *Uridine-rich element* bzw. URE, beschrieben in Kim et al., 2011). Allerdings hat HuR im Gegensatz zu den ARE-Sequenzen der 3'UTRs von ERG mRNAs keine Affinität zu diesen URE-Sequenzen im CD83 PRE. Die Interaktion erfolgt vielmehr über die Substrukturen des PRE-*stem-loops*, wobei vor allem die Struktur des *sub-loops* 1 (SubL 1) essentiell für die Interaktion mit HuR erscheint (Pieper et al., 2011). Eine struktur- und nicht zwingend sequenzspezifische Interaktion von Nucleinsäuren mit Bindeproteinen ist ein Mechanismus, der vor allem von DNA:Protein-Interaktionen bekannt ist. So unterscheiden DNA-Bindeproteine zwischen einzel- und doppelsträngigen DNA-Molekülen und können beispielsweise als Nucleasen spezifische *loops* oder verzweigte DNA-Strukturen erkennen und prozessieren (Nishino et al., 2006). Doch gerade in Hinblick auf das immer größer werdende Interesse hinsichtlich der multiplen Funktionen von RNA finden sich auch zunehmend Studien über RNA-Bindeproteine, die nicht nur Sequenz-, sondern auch Strukturspezifität aufweisen (Shi et al., 1997; Stefl et al., 2006).

Interessanterweise zeigte sich bei Analysen der CD83 mRNA Mutanten zudem, dass PRE-defiziente Mutanten nicht mehr CRM1-abhängig, sondern vermutlich über das Heterodimer TAP-p15 ins Zytoplasma transportiert werden. Demzufolge könnte das *cis*-aktive PRE der CD83 mRNA möglicherweise als Erkennungsmerkmal und bestimmendes Element für den CRM1-abhängigen Kernexport betrachtet werden (Pieper et al., 2011).

Bezeichnenderweise zeigte sich bei Untersuchungen der CRM1-abhängigen *interferon- $\alpha$ 1* mRNA, dass auch hier ein *cis*-aktives Element in der kodierenden Region eine wichtige Funktion für den nukleozytoplasmatischen Transport einnimmt (Kimura et al., 2004). Hingegen spielen die ARE-Sequenzen und in diesem Falle auch das Protein HuR keine Rolle für den CRM1-abhängigen Transport (Kimura et al., 2004). Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der *interferon- $\alpha$ 1* mRNA um das Transkript eines intronfreien Gens. Die mRNA weist in ihrer kodierenden Region besagtes strukturiertes *cis*-aktives Element auf (*conserved secondary structure* bzw. CSS), dessen *stem-loop*-

artiger Aufbau für den Export der mRNA erforderlich ist (Kimura et al., 2010). Es stellte sich die Frage, wie natürlich intronfreie mRNAs als Ribonukleoprotein-Komplexe ins Zytoplasma transportiert werden können, da normalerweise bereits beim Spleißvorgang mRNA-Exportfaktoren wie UAP56 oder Ref/Aly rekrutiert werden und dieser Vorgang bei natürlich intronfreien mRNAs ausbleibt (siehe Übersichtsartikel: Reed and Hurt, 2002). Es zeigte sich, dass einige dieser mRNAs die fehlenden Introns über die Interaktion von *cis*-aktiven Elementen mit RNA-Bindeproteinen kompensierten und somit entweder über den allgemein bekannten TAP-p15 Transportmechanismus, oder aber über eine individuelle Exportmaschinerie ins Zytoplasma gelangen können, wie beispielsweise das Transkript des murinen Histons H2a (Huang and Carmichael, 1997). Auch der Kernexport von intronfreien mRNAs des Hepatitis B Virus oder dem intronfreien Transkript der Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus wird über *cis*-aktive Elemente der mRNA vermittelt (Huang and Yen, 1995; Otero and Hope, 1998). Als weitere Beispiele für die funktionelle Bedeutung viraler strukturierter RNA-Elemente können das bereits erwähnte RRE von HIV oder auch das CTE des MPMV genannt werden, welche jeweils eine essentielle Rolle beim nukleozytoplasmatischen mRNA-Transport dieser Viren ausüben (Rosen et al., 1988; Bray et al., 1994). In Hinblick auf die Bedeutung der strukturierten *cis*-aktiven Elemente viraler mRNAs beim Kernexport kann als logische und sinnvolle Folgerung die Vermutung nahegelegt werden, dass auch bei *zellulären* Transkripten *cis*-aktive strukturierte Sequenz-Elemente der mRNA am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligt sind, wie die Beispiele des PREs der CD83 mRNA oder auch des CSS der *interferon- $\alpha$ 1* mRNA zeigen.

Unter diesem Aspekt kann nun spekuliert werden, ob sich in den mRNAs der CRM1-abhängigen ERGs wie *c-fos*, *COX-2* und *VEGF* ebenfalls *cis*-aktive Strukturelemente in den kodierenden Region finden lassen, die das jeweilige Transkript dem CRM1-abhängigen Transport zuführen. Auch kann erörtert werden, inwiefern strukturierte RNA-Elemente bei der Koordination im RNA-Operon eine Rolle spielen. Zudem stellt sich die Frage, ob ein solches RNA-Strukturelement ebenfalls mit HuR interagieren würde, wie im Fall der CD83 mRNA, oder ob weitere oder andere RNA-Bindeproteine rekrutiert werden müssen, wie es vermutlich für den Export der *interferon- $\alpha$ 1* mRNA zutrifft.

Die Untersuchungen von Prechtel und Mitarbeitern und Pieper und Kollegen machten deutlich, dass das PRE der CD83 mRNA und die Interaktion des PREs der CD83 mRNA an HuR den CRM1-abhängigen Transport vermittelt (Prechtel et al., 2006; Pieper et al., 2011). Zwar werden HuR neben seiner Eigenschaft als RNA-Bindeprotein ebenfalls nukleozytoplasmatische *shuttle* Eigenschaften zugeschrieben, allerdings weist es keine typischen Leuzin-reichen NES-Sequenzen (*nuclear export signal*) auf, die für eine Interaktion mit dem Exportrezeptor CRM1 erforderlich sind. Eine direkte Interaktion von HuR mit CRM1 ist demzufolge nicht gegeben, was in den Untersuchungen von Brennan und Mitarbeitern bestätigt werden konnte (Brennan et al., 2000). Folglich wurde schon früh

deutlich, dass für den CRM1-vermittelten Export der HuR:mRNA Ribonukleoprotein-Komplexe ein oder mehrere Adaptorproteine benötigt werden, welche eine Verbindung des HuR:mRNA Komplexes mit dem Exportrezeptor CRM1 sicher stellen.

### **Adaptorprotein APRIL**

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass CRM1 sein Kargo über dessen Leuzin-reiche Sequenzen, die als *nuclear export signal* (NES) fungieren, bindet und diese spezielle Interaktion erstmals zwischen dem viralen Protein Rev und CRM1 beschrieben wurde (Fischer et al., 1995; Bogerd et al., 1998). Wie erwähnt weist HuR keine dieser typischen, Rev-ähnlichen Leuzin-reichen Sequenzen auf und interagiert deshalb nicht direkt mit CRM1. Stattdessen konnte bei HuR in der sogenannten *hinge* Region zwischen dem zweiten und dritten RRM (*RNA recognition motif*) des Proteins eine *shuttling* Domäne identifiziert werden (Fan and Steitz, 1998a). Diese scheint essentiell für die nukleozytoplasmatische Translokation des Proteins zu sein, weist sowohl Import- als auch Export-Aktivität auf und wird als HNS (*HuR nucleocytoplasmic shuttling sequence*) bezeichnet. Interessanterweise interagiert HuR vermutlich über diese *hinge* Region mit den HuR-Liganden pp32 und APRIL, wobei die HNS Region maskiert wird (Brennan et al., 2000). Die beiden HuR-Liganden wiederum besitzen typische, Rev-ähnliche Leuzin-reiche NES-Sequenzen, werden folglich CRM1-abhängig transportiert und könnten demzufolge als Adaptorproteine zwischen HuR und CRM1 beim CD83 mRNA-Export fungieren. Bei den Untersuchungen des Kernexports der *c-fos* mRNA von Brennan und Mitarbeitern (Brennan et al., 2000) konnten beide Proteine mit dem CRM1-vermittelten Kernexport in Zusammenhang gebracht werden. Auch konnte beim Hormon-induzierten CRM1-abhängigen Export der *VEGF* mRNA der HuR-Ligand pp32 im Exportkomplex identifiziert werden (Cherradi et al., 2006). Inwiefern das Adaptorprotein APRIL eine Rolle beim *VEGF* mRNA-Export spielt, konnte in der beschriebenen Studie nicht weiter festgestellt werden, da es in den untersuchten bovinen adrenokortikalen Zellen nicht detektiert werden konnte (Cherradi et al., 2006).

Beim CRM1-abhängigen Transportmechanismus der CD83 mRNA wurde hingegen eindeutig APRIL, aber nicht pp32, als Adaptorprotein identifiziert, welches die Verbindung des HuR:CD83 mRNA Komplexes mit CRM1 vermittelt (Fries et al., 2007). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine Phosphatakzeptorstelle von APRIL an Aminosäure Threonin 244 (T244) identifiziert werden. Interessanterweise zeigte die Studie von Fries und Mitarbeitern zudem, dass die Phosphorylierung von APRIL an Position T244 für eine erfolgreiche Translokation des Proteins aus dem Zellkern ins Zytoplasma unbedingt erforderlich ist und demzufolge für die *shuttle* Eigenschaften des Proteins anscheinend eine wichtige Rolle spielt.

RNA-Interferenz (RNAi) Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sowie frühere, im selben Labor durchgeführte *in vitro* Studien zeigten auf, dass die Kinase CK2 (Casein

Kinase 2) für die Phosphorylierung von APRIL an T244 verantwortlich ist und die CD83 Expression von aktivierten Jurkat T-Zellen wie auch primären Dendritischen Zellen (DC) über CK2 reguliert wird (Chemnitz et al., 2009). Die CK2 ist ein multifunktionelles pleiotropes Enzym, das multiple zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose, oder auch die inflammatorische Immunantwort reguliert (siehe Übersichtsartikel: Singh and Ramji, 2008). Interessanterweise zeigte das *silencing* der beiden katalytischen CK2 Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$ , dass vornehmlich Letztere die CD83 Expression beeinflusst, während hingegen die Reduktion der CK2 $\alpha$  Untereinheit keinen Effekt auf die CD83 Expression hatte. Diese Unterschiede in der Funktion zwischen den katalytischen CK2 Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$  hinsichtlich der CD83 Expression wurden ebenfalls bereits in früheren *in vitro* Studien beobachtet und mittels der *in vivo* RNAi Studien dieser Arbeit bestätigt (Chemnitz et al., 2009). Die funktionellen Unterschiede der katalytischen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\alpha'$  in der vorliegenden Dissertation könnten auf das intrazelluläre Transportverhalten der CK2 (und ihrer Untereinheiten) zurückgeführt werden. So wurde in Stresssituationen wie beispielsweise Hitzeschock oder UV-Licht vorzugsweise eine Translokation der Untereinheit  $\alpha'$  vom Zytoplasma in den Zellkern beobachtet. Als Immunreaktion auf einen extrazellulären Reiz kann die CD83 Expression, die bei Jurkat T-Zellen durch die Kombination des bakteriellen Ionophors Ionomycin mit dem Phorbol Ester PMA und bei Dendritischen Zellen durch inflammatorische Reize und mikrobielle Stimuli induziert wird, ebenfalls als Zellstress betrachtet werden. Die Aktivierung der Immunzellen durch die externen Stimuli könnte für die CK2 Untereinheit  $\alpha'$  das Signal sein, in den Nukleus zu translozieren. Diese Translokation der CK2 $\alpha'$  Untereinheit resultiert vermutlich wiederum in der Phosphorylierung des sich primär im Kern befindlichen Proteins APRIL an Position T244.

Wie bereits erwähnt ist die posttranslationale Modifikation von APRIL an T244 für die *shuttle* Eigenschaften des Proteins notwendig (Fries et al., 2007.), so dass die Phosphorylierung von APRIL mittels der CK2 für eine erfolgreiche Translokation des HuR:CD83 mRNA Komplexes via CRM1 erforderlich zu sein scheint. Inwiefern die Phosphorylierung an T244 dabei eine Rolle für die Interaktion von APRIL mit CRM1 spielt, konnte zu diesem Zeitpunkt nicht festgestellt werden. Bindungsstudien mit spezifischen Phosphorylierungsdefizienten Mutanten könnten diese Fragestellung beantworten. Tatsächlich scheint eine Phosphorylierung für die Bindung von Proteinen an den Exportrezeptor CRM1 zuweilen durchaus erforderlich zu sein, wie Export- und Bindungsstudien mit Phosphorylierungsdefizienten Mutanten von den zellulären Proteinen p27 oder auch PPAR $\gamma$  aufzeigten (Ishida et al., 2002; von Knethen et al., 2010). Interessanterweise erfolgt bei PPAR $\gamma$ , welches als Hormonrezeptor die proinflammatorische Genexpression beeinflusst, die posttranslationale Modifikation ebenfalls mittels der CK2 (von Knethen et al., 2010).

Da APRIL als Phosphoprotein beschrieben wurde (Matilla and Radrizzani, 2005), konnte davon ausgegangen werden, dass T244 nicht die einzige Aminosäure des Proteins ist, welche über Phosphorylierung posttranslational modifiziert wird. Tatsächlich konnten im Rahmen dieser Arbeit mit Serin 158 (S158) und Serin 210 (S210) noch zwei weitere Aminosäuren in APRIL identifiziert werden, die phosphoryliert werden können. Interessanterweise wurde zugleich deutlich, dass die weiteren Phosphorylierungsstellen S158 und S210 ebenfalls – wie auch die bereits beschriebene Position T244 – von der Kinase CK2 phosphoryliert werden. Demzufolge wird das Protein APRIL an seinen drei Phosphorylierungsstellen, den Aminosäuren S158, S210 und T244, mittels der CK2 posttranslational modifiziert.

Weitere Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten außerdem, dass S210, aber nicht S158, ebenfalls für eine nukleozytoplasmatische Translokation von APRIL erforderlich ist. Allerdings konnte aufgrund der spatio-temporalen Phosphorylierung von T244 und S210 durch die gleiche Kinase der Einfluss beider Phosphorylierungsstellen von APRIL hinsichtlich der Regulation der CD83 Expression im Rahmen dieser Arbeit nicht unabhängig und getrennt voneinander analysiert werden. Auch können aufgrund der dualen APRIL-Phosphorylierung durch die CK2 die Ergebnisse der früheren Studien, in denen die CK2-vermittelte Phosphorylierung von APRIL an T244 mit der Regulation der CD83 Expression korreliert werden konnte (Chemnitz et al.; 2009), nicht mehr ohne weitere Analysen ausschließlich der Phosphorylierung an T244 zugeschrieben werden. APRIL-RNAi Studien in Anwesenheit von Phosphorylierungsdefizienten APRIL-Mutanten, die unempfindlich gegenüber dem RNAi-vermittelten *silencings* wären, könnten aber weiteren Aufschluss über die spezifische(n) Funktion(en) der posttranslationalen Modifizierung von T244 und S210 während der CD83 Expression geben.

Allerdings lassen sich möglicherweise durch Vergleiche von konservierten, aber dennoch leicht unterschiedlichen APRIL Proteinen verschiedener Spezies Rückschlüsse hinsichtlich der Wichtigkeit der einzelnen Phosphorylierungsstellen von APRIL für den CRM1-abhängigen CD83 mRNA-Exportkomplex ziehen. So zeigte eine Studie zur Untersuchung des RNA-Kernexportes im Modellsystem des Krallenfroschs *Xenopus laevis*, dass die CD83 mRNA auch in Oozyten des Krallenfroschs CRM1-abhängig transportiert wird (Dissertation Stefanie Glaser, 2008). Die Analyse der am Export beteiligten Proteine machte zudem deutlich, dass zwischen humanen APRIL und *Xenopus* APRIL (XAPRIL) eine Sequenzidentität von etwa 80 % und eine Sequenzähnlichkeit von etwa circa 89 % besteht (Dissertation Stefanie Glaser, 2008; Bestätigung durch Uniprot 2011<sup>6</sup>). Interessanterweise zeigt der Abgleich der drei Phosphorylierungsstellen des humanen APRILs S158, S210 und T244 mit der Äquivalente XAPRIL von *Xenopus laevis*, dass einzig die Position T244

---

<sup>6</sup> APRIL: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q92688>; XAPRIL: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6GNU4>

konserviert in beiden Spezies vorliegt. Da der humane CD83 mRNA Ribonukleoprotein-Komplex im Modellsystem des Krallenfroschs erfolgreich CRM1-abhängig transportiert wird, könnte gefolgert werden, dass als posttranslationale Modifizierungsstelle von APRIL zwar T244, aber nicht S210, für den nukleozytoplasmatischen Export der CD83 mRNA erforderlich ist. Ein weiteres Indiz für die besondere Bedeutung von T244 im Phosphoprotein APRIL für den differentiell regulierten Export der CD83 mRNA könnte die Tatsache sein, dass das eng verwandte und ebenfalls als HuR-Ligand bekannte ANP32-Familienmitglied pp32 keine T244 Phosphorylierungsstelle aufweist, obgleich es ansonsten etwa 81,5 % Sequenzähnlichkeit mit APRIL besitzt (Uniprot<sup>7</sup>). So könnte gefolgert werden, dass bei der posttranslationalen Modifikation der drei Phosphorylierungsstellen von APRIL durch die CK2 im Besonderen die Phosphorylierung von T244 für den CRM1-abhängigen Export der CD83 mRNA erforderlich ist.

### **APRIL in verschiedenen Zellsystemen**

Die Ergebnisse der APRIL-RNAi Studien dieser Arbeit, die in verschiedenen Zellsystemen – etablierten Zelllinien sowie primären Zellen von Spendern – durchgeführt wurden, machen deutlich, welche große Rolle die Wahl eines adäquaten Zellsystems für die Beantwortung einer biologischen Fragestellung spielt. So zeigten die RNAi Untersuchungen klare Unterschiede bezüglich der Relevanz von APRIL für die CD83 Expression in verschiedenen Zelllinien. Während 293T-Zellen ebenso wie Cos7-Zellen eine APRIL-abhängige CD83 Expression zeigten, schien hingegen in HeLa-Zellen das Protein APRIL keinen Einfluss auf die Expression von CD83 zu haben. Dies ist ein wenig unerwartet, da eine frühere Studie, in der APRIL als CRM1-abhängiger HuR-Ligand identifiziert wurde, ebenfalls in HeLa-Zellen durchgeführt wurde (Brennan et al., 2000). Dennoch muss man aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit davon ausgehen, dass sich im Zusammenhang mit dem CD83 mRNA-Exportmechanismus die HeLa-Zelllinie von den 293T und Cos7-Zelllinien deutlich unterscheidet. Ein interessanter Aspekt könnte hierbei der Status der genomischen Integrität der HeLa-Zellen sein. Während es sich bei 293T und Cos7-Zellen lediglich um immortalisierte Nierenzellen handelt, haben HeLa-Zellen ihren Ursprung in einem extrem aggressiven Zervix-Karzinom mit entsprechenden massiven genetischen Veränderungen (siehe Übersichtsartikel: Masters, 2002).

Interessanterweise konnten bereits bei verschiedenen Tumorzellen Unterschiede in Hinblick auf den CRM1-abhängigen Export von ARE-haltigen mRNAs beobachtet werden. So zeigte sich, dass in Zelllinien, die durch das adenovirale Onkogen E4orf6 zu Tumorzellen transformierten, ARE-haltige mRNAs zusammen mit HuR und dem APRIL-Verwandten pp32 *nicht* mehr CRM1-abhängig ins Zytoplasma transportiert werden. Vielmehr wurde mittels des adenoviralen Proteins ein anderer, CRM1-unabhängiger Exportweg genutzt (Higashino et al., 2005). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch

---

<sup>7</sup> pp32: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q08AJ6>; APRIL: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q92688>

in Tumorzellen, die nicht aufgrund einer Virusinfektion transformiert wurden, beobachtet werden. So wurde 2009 von Hasegawa und Mitarbeitern veröffentlicht, dass in oralen Tumorzellen ARE-haltige mRNAs in Interaktion mit HuR im Gegensatz zu gesunden oralen Zellen nicht CRM1-abhängig ins Zytoplasma gelangen (Hasegawa et al., 2009). Ein weiteres Indiz für eine Dysfunktion von HeLa-Zellen hinsichtlich des CRM1-abhängigen mRNA-Exports lieferte die systematische Studie von Schütz und Mitarbeitern, in welcher das CD83 Transkript in aktivierten Jurkat T-Zellen als CRM1-abhängig identifiziert wurde, doch in HeLa-Zellen keine CRM1-abhängigen mRNAs detektiert werden konnten (Schütz et al., 2006). Zwar wird wie erwähnt die ARE-haltige *c-fos* mRNAs in den unkontrolliert wachsenden HeLa-Zellen CRM1-abhängig in Zusammenhang mit HuR und den HuR-Liganden APRIL, bzw. dessen Verwandter pp32 transportiert (Brennan et al., 2000). Dennoch legen die weiteren genannten Studien zusammengefasst die Vermutung nahe, dass in verschiedenen Tumorzellen durchaus eine Dysfunktion in der Regulation des CRM1-abhängigen mRNA-Transports vorliegen kann. Ein Zusammenhang zwischen einer Dysregulation von mRNA-Exportfaktoren, TAP-p15 wie auch CRM1, und der Tumorgenese wurde bereits in verschiedenen Studien postuliert (siehe Übersichtsartikel: Siddiqui and Borden, 2011). Interessanterweise wurde gerade beim Zervix-Karzinom eine Überexpression von CRM1 beschrieben (van der Watt et al., 2009). So wird an dieser Stelle spekuliert, dass aufgrund einer Dysfunktion der kanzerösen HeLa-Zellen der CRM1-abhängige Transport bestimmter mRNAs, in Fall dieser Arbeit der der CD83 mRNA, tatsächlich dysreguliert ist.

Grundsätzlich machten die RNA-Interferenz Studien von APRIL im Zusammenhang mit der CD83 Expression in den drei verschiedenen Zelllinien deutlich, wie sehr sich die Wahl des jeweiligen Zellsystems auf die Untersuchungsergebnisse auswirken kann. Generell bergen Zelllinien – ob gezielt immortalisiert oder aus bereits entarteten Tumorzellen gezüchtet – das Problem, dass ob des unkontrollierten Wachstums der Zellen definitiv Dysfunktionen in zellulären Mechanismen vorliegen, welche wiederum die Forschungsergebnisse beeinflussen könnten.

Umso wichtiger ist die in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass in primären Dendritischen Zellen die Reduktion der APRIL-Expression direkt mit einer Hemmung der CD83 Expression korreliert. Mit den aus primären Monozyten generierten DC wurde ein autologes Zellsystem gewählt, das näher an den humanen Organismus angelehnt ist und die zu untersuchenden Faktoren APRIL und CD83 endogen exprimiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben folglich eine stärkere Aussagekraft als die APRIL-RNAi Studien in Zelllinien. Gleichzeitig muss, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, bei Analysen von primären Zellen die Abhängigkeit der Ergebnisse von der Konstitution der Spenderzellen beachtet und demzufolge eine möglichst große Anzahl von Proben untersucht werden. Mit mehr als 15 verschiedenen Spendern, von denen insgesamt 10 ausgewertet werden konnten, war die Validität der Ergebnisse in dieser Arbeit gegeben. Auch wenn durch das *silencing* von APRIL in

DC keine vollständige Inhibition der CD83 Expression erreicht werden konnte, zeigt die Korrelation zwischen APRIL und CD83, die bei allen Spendern gegeben war, die Relevanz von APRIL für die Genexpression von CD83. Im Zusammenhang mit dem Wissen, dass CD83 in primären DC CRM1-abhängig reguliert wird (Chemnitz et al., 2010) und den Befunden der APRIL- und CK2-regulierten CD83 Expression primärer DC, kann davon ausgegangen werden, dass das beschriebene Modell der CD83 mRNA-Exportmaschinerie mit dem phosphorylierten Adaptorprotein APRIL (Fries et al., 2007; Chemnitz et al., 2009) auch auf primäre Dendritische Zellen übertragbar ist.

In Hinblick auf die erwähnte Problematik bei Arbeiten in Zelllinien kann an dieser Stelle zudem spekuliert werden, inwiefern das eng mit APRIL verwandte und ebenfalls als HuR-Ligand bekannte Protein pp32 nicht doch eine Rolle beim Exportmechanismus der CD83 mRNA spielt. Zwar konnten Fries und Mitarbeiter in ihren Studien von 2007 deutlich zeigen, dass pp32 in Zelllinien keinen Einfluss auf den Export der CD83 mRNA hat (Fries et al., 2007). In Hinblick auf die Ergebnisse der APRIL-RNAi Studien in primären DC spräche die nur partielle Reduktion der CD83 Expression für ein redundantes Verhalten eines nahen APRIL-Verwandten wie beispielsweise pp32. Gegen pp32 gerichtete RNAi Studien sowie ein gleichzeitiges *silencing* der beiden HuR-Liganden APRIL und pp32 könnten diese Frage beantworten.

Interessanterweise scheint bei einigen Spendern der primären DC das Protein APRIL nicht nur einen Einfluss auf die Regulation der CD83 Expression, sondern auch auf die des Korezeptors CD80 zu haben. Ähnliche Ergebnisse wurden in dieser Arbeit ebenfalls beim *silencing* der CK2 $\alpha'$  Untereinheit beobachtet. Auch hier wurde in Anwesenheit der siRNA gegen CK2 $\alpha'$  nicht nur die Expression von CD83, sondern auch die des Korezeptors CD80 verringert. Auch Studien mit dem CRM1 spezifischen Inhibitor LMB wiesen bei primären DC nicht nur die erwartete Reduktion der CD83 Expression, sondern ebenfalls eine verminderte CD80 Expression auf (Chemnitz et al., 2010). Als mögliche Erklärung dieser Beobachtung sollen an dieser Stelle zwei Möglichkeiten genauer erörtert werden: zum einen könnte die Inhibition der CD83 Expression per se im jeweiligen Experiment eine verminderte CD80 Expression zur Folge haben. So wurde bereits publiziert, dass die transmembranale Domäne von CD83 die Degradation von MHC II und des Korezeptors CD86 inhibiert und somit deren Expression fördert (Tze et al., 2011). Ein ähnlicher Mechanismus könnte möglicherweise auch bei der Expression CD80 zum Tragen kommen, indem die CD80 Expression in Abhängigkeit zur CD83 Expression steht. Allerdings konnte bei einer direkten, durch RNAi vermittelten Reduktion der CD83 Expression in primären DC keine verminderte Expression des CD80 Korezeptors beobachtet werden (Prechtel et al., 2007), was eine Abhängigkeit des CD80 Korezeptors von der CD83 Expression als unwahrscheinlich erscheinen lässt. So wird an dieser Stelle eher vermutet, dass das Transkript von CD80 wie auch die CD83 mRNA mit Beteiligung von APRIL als

Adaptorprotein CRM1-abhängig transportiert werden könnte und das Phosphoprotein APRIL und somit auch die Expression des Korezeptors CD80 durch die CK2 $\alpha'$  Untereinheit reguliert wird. Gleichwohl muss an dieser Stelle betont werden, dass ebenso eine Vielzahl an weiteren Faktoren (z.B. Transkriptionsfaktoren, Spleißfaktoren etc.), die wiederum für die CD80 Expression notwendig sein könnten, APRIL/CRM1/CK2-abhängig reguliert werden könnten und folglich die CD80 Expression in den genannten Untersuchungen über mögliche dritte oder weitere Faktoren beeinflusst wurde. Demzufolge kann dieser Aspekt ohne weitere spezifische und detaillierte Untersuchungen nicht weiter diskutiert werden.

Grundsätzlich besteht bei Untersuchungen von Zellen des Immunsystems das Problem, dass zumeist eine Population von Immunzellen im Einzelnen betrachtet wird, die Aktivierung der zellulären Immunantwort aber auf dem Zusammenspiel und den verschiedensten Wechselwirkungen unterschiedlichster Zellpopulationen beruht. Um in diesem Zusammenhang Fragestellungen zu beantworten empfiehlt es sich, die zu untersuchenden Komponenten im gesamten Organismus zu betrachten. So wurde im Rahmen dieser Arbeit für die weitere Erforschung der Rolle von APRIL im Zusammenhang mit der CD83 Expression, aber auch in Hinblick auf die Funktion von APRIL für weitere zelluläre Prozessen, wie beispielsweise die CD80 Expression oder die Translokation weiterer CRM1-abhängiger mRNAs, mit der Konstruktion eines *knockout* Mausmodells begonnen.

### **APRIL *knockout* Maus**

Wie zuvor erwähnt birgt die Analyse biologischer Mechanismen in Zelllinien oftmals die Problematik, dass aufgrund möglicher Dysfunktionen der Zelllinien die tatsächliche Funktion eines Gens bzw. dessen Proteinprodukts oder aber der Ablauf eines Mechanismus im Organismus nicht immer folgerichtig erkannt werden kann. Mit der Etablierung des gezielten *gene targetings* und der standardisierten Generierung von *knockout* und *knockin* Mäusen wurden in den letzten Jahren Möglichkeiten geschaffen, Funktionen von Genen und deren Proteinprodukte direkt *in vivo* im Gesamtorganismus zu betrachten. Allerdings stellt sich bei Arbeiten im Tiermodell neben dem Aspekt der ethischen Vertretbarkeit grundsätzlich die Frage, inwiefern die Ergebnisse von Spezies zu Spezies übertragbar sind. Dennoch etablierte sich in den vergangenen Jahren vor allem die Verwendung von *knockout* Mäusen in den verschiedensten Forschungsbereichen immer mehr zum Standard bei der funktionellen Analyse von Genprodukten.

Auch im Bereich der ANP32-Familie, zu der APRIL zählt, existieren inzwischen für einige der Familienmitglieder *knockout* Mausmodelle. Bereits 2004 wurde von Opal und Mitarbeitern ein konstitutives LANP (ANP32A, pp32) Mausmodell generiert (Opal et al., 2004). Interessanterweise wiesen die pp32-defizienten Mäuse keinen Phänotyp auf, obgleich das Protein pp32 bisher ausführlich als Tumorsuppressor und Inhibitor der pro-proliferativen Phosphatase PP2A

charakterisiert und dem Protein in Nagern eine Rolle bei der Morphogenese des Zerebellums zugeschrieben wurde (Matsuoka et al., 1994; Li et al., 1996). Ähnlich verhielt es sich mit den CPD1- (ANP32E-) defizienten Mäusen, die 2010 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurden (Kular et al., 2010; Reilly et al., 2010). Auch hier konnte keine der beiden Arbeitsgruppen einen offensichtlichen Phänotyp beschreiben. In Anbetracht der Tatsache, dass die Familienmitglieder der ANP32-Proteine stark konserviert und eng verwandt sind, wurde eine gewisse Redundanz zwischen den einzelnen Familienmitgliedern angenommen. Man vermutete, dass die Deletion eines Proteins der ANP32-Familie durch andere, eng verwandte Familienmitglieder kompensiert werden könnte. Doch zumindest die in diesem Zusammenhang generierten doppelt-defizienten pp32- und CPD1-defizienten *knockout* Tiere wiesen ebenfalls keinen prägnanten Phänotyp auf (Kular et al., 2010; Reilly et al., 2010). Interessanterweise wurde aber in den CPD1- (ANP32E-) defizienten Mäusen durchaus eine deutliche Erhöhung der mRNA der Familienmitglieder pp32 und vor allem APRIL detektiert, was sich allerdings auf Proteinebene nicht bemerkbar machte (Reilly et al., 2010). Dennoch rückte das Familienmitglied APRIL und folglich auch die die Etablierung einer APRIL-defizienten Maus mehr in den Fokus der Wissenschaft.

So war in Hinblick auf die Konstruktion der APRIL *knockout* Maus in dieser Arbeit nicht nur der zeitlich begrenzte Rahmen der Dissertation, sondern vor allem die beiden genannten Veröffentlichungen über CPD1- (ANP32E-) defiziente Mäuse, der Anlass für einen Systemwechsel in der Methodik der *knockout* Maus Generierung. Die erwähnten Publikationen von 2010 machten deutlich, dass die Arbeiten dieser Dissertation zur Konstruktion einer APRIL-defizienten *knockout* Maus zeitnah auf konkurrierende *knockout* Maus Modelle stoßen könnten. Durch die Verwendung von kommerziellen embryonaler Stammzellen (ES-Zellen), die im Rahmen des EUCOMM-Konsortiums (Auwerx et al., 2004) erwerblich waren, konnten in der vorliegenden Arbeit aufwendige Rückkreuzungsarbeiten vermieden werden, was den Wechsel der ES-Zelllinie und den kommerziellen Erwerb der ES-Zellen rechtfertigte und im Wettlauf der Etablierung einer APRIL *knockout* Maus Zeit einsparte. Dennoch waren Reilly und Mitarbeiter die ersten, die in 2011 die Generierung einer konstitutiven APRIL *knockout* Mauslinie publizieren konnten (Reilly et al., 2011).

Erstaunlicherweise wiesen die APRIL-defizienten Mäuse im Vergleich zu den bisherigen *knockout* Mäusen der ANP32-Familienmitglieder einen prägnanten, perinatal *letal*en Phänotyp auf. Im gemischten 129ola:C57Bl/6 Hintergrund wurden zwar noch einige wenige lebende APRIL-defiziente Nachkommen identifiziert, allerdings waren diese Tiere durch starke Beeinträchtigungen in ihrer Vitalität charakterisiert. Zudem muss darauf hingewiesen werden, dass Untersuchungsergebnisse von Mäusen im gemischten Hintergrund allenfalls als suboptimale Alternative gewertet werden kann. Umso aussagekräftiger sind die Untersuchungsergebnisse von Reilly und Mitarbeitern im

reinen C57Bl/6 Hintergrund: Hier konnten lediglich bei einem statt nach der Mendelschen Verteilung erwarteten 39 Nachkommen ein homozygoter APRIL<sup>-/-</sup> Genotyp detektiert werden (Reilly et al., 2011).

Fast identische Beobachtungen wurden bei den APRIL *knockout* Maus Etablierungsarbeiten in der vorliegenden Arbeit gemacht: Mittels der „*knockout-first*“ Strategie im reinen C57Bl/6 Hintergrund, die zunächst ebenfalls zu einem Null-Allel und somit konstitutiven *knockout* führt, konnten keine homozygoten Nachkommen detektiert werden. Diese übereinstimmenden Ergebnisse mit Reilly und Mitarbeitern belegen eine essentielle Rolle von APRIL bei der Entwicklung von C57Bl/6 Mäusen. Die Untersuchungen von Reilly und Mitarbeitern legten nahe, dass die perinatale Letalität der APRIL-defizienten Mäuse ihre Ursache erst nach Entwicklungstag 17 und demzufolge erst kurz vor Geburt hat. Ein spezifischer Grund für die perinatale Letalität konnte allerdings bisher nicht ausgemacht werden. Interessanterweise konnten Reilly et al. keine Unterschiede hinsichtlich der Regulation der Caspaseaktivität oder auch der Proliferation in APRIL-defizienten Zellen feststellen, obgleich APRIL in früheren Studien mit beiden Prozessen in Verbindung gebracht wurde (Sun et al., 2001; Jiang et al., 2003; Shen et al., 2010).

Allerdings könnte in diesem Zusammenhang in Hinblick auf die Funktion von APRIL als phosphoryliertes Adaptorprotein und HuR-Ligand beim CRM1-abhängigen Export der induzierbaren CD83 mRNA spekuliert werden, ob das Fehlen von APRIL eine Dysregulation im CRM1-abhängigen mRNA-Transport zur Folge hat. Diese Dysregulation könnte wiederum den Export einer ganzen Reihe von induzierbaren und möglicherweise essentiellen CRM1-abhängigen mRNA beeinflussen und womöglich in einer Reduktion von beispielsweise immunrelevanten Proteinen wie CD83 resultieren. In diesem Zusammenhang spricht im Übrigen gerade die Tatsache, dass eine Hemmung von CD83 allein in Mäusen keine letalen Folgen hat (Fujimoto et al., 2002) dafür, dass APRIL nicht nur für die Regulation der Genexpression von CD83, sondern ebenfalls für die von weiteren Proteinen notwendig sein könnte. Der von Fries und Mitarbeitern in 2007 beobachtete und in dieser Arbeit weiter bestätigte Befund, dass APRIL die CRM1-abhängige Expression von CD83 reguliert, stützt die These, dass dieses Protein auch beim Export weiterer CRM1-regulierter mRNAs eine wichtige Funktion übernehmen könnte. Gleichwohl soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass APRIL die Genexpression nicht nur auf Ebene des mRNA-Transports, sondern auch auf Ebene der Transkription regulieren könnte, da dem Protein Eigenschaften als Histon-Chaperon zugeschrieben wurden (Munemasa et al., 2008). Ein vergleichendes *screening* der mRNAs von Wildtyp- und APRIL-defizienten Mäusen, die diesem Labor in naher Zukunft freundlicherweise von Reilly und Mitarbeitern zur Verfügung gestellt werden, könnte Auskunft über die Rolle von APRIL bei der Regulation der Genexpression – sowohl als Adaptorprotein und HuR-Ligand beim CRM1-abhängigen

mRNA-Export als auch als Histon-Chaperon bei der Transkription – geben. Des Weiteren könnte mit gezielt gewebsspezifischen und/oder induzierbaren APRIL-defizienten Mäusen, die aus den in dieser Arbeit konstruierten transgenen APRIL<sup>EUCOMM</sup> Tieren generiert werden können, die perinatale Letalität möglicherweise umgangen und folglich weitere Kenntnis über die Funktion des Proteins APRIL gewonnen werden.

Ob und inwiefern nun das ebenfalls als HuR-Ligand bekannte Protein und nahe Familienmitglied pp32 in die mögliche Regulation CRM1-abhängiger mRNAs involviert ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht bestimmt werden. Allerdings soll an dieser Stelle die interessante Beobachtung von Reilly und Mitarbeitern erwähnt werden, dass in APRIL-defizienten Mäusen im gemischten Hintergrund eine ergänzende Reduktion von pp32 die perinatale Letalität der Tiere weiter vorantrieb (Reilly et al., 2011). Die Verminderung des Familienmitglieds CPD1 (ANP32E) in defizienten APRIL-Mäusen hatte hingegen keinen weiteren Einfluss auf das Überleben der Tiere. So scheint zwischen einigen ANP32-Familienmitgliedern tatsächlich ein gewisses redundantes Verhalten vorhanden zu sein, allerdings in unterschiedlicher Gewichtung. Demzufolge wurde eine gewisse Form der Hierarchie in der ANP32-Familie postuliert, in welcher APRIL die bedeutendste Rolle übernimmt (Reilly et al., 2011). Im Zusammenhang mit der genannten Vermutung, dass APRIL als HuR-Ligand und Adaptorprotein eine wichtige Funktion im CRM1-abhängigen mRNA-Export übernimmt und folglich bei der Regulation der Genexpression bestimmter Proteine eine wichtige Rolle spielt, stützt diese hierarchische Positionierung von APRIL diese Spekulation. Zwar wurde bei einigen CRM1-abhängigen mRNAs das Protein pp32, und nicht APRIL, als HuR-Ligand identifiziert (Cherradi et al., 2006). Doch wurde in diesen Untersuchungen die Beteiligung des Proteins APRIL nicht ausgeschlossen; das Protein konnte vielmehr in den verwendeten Zellen (bovine adrenokortikale BAC-Zellen) nicht detektiert werden (Cherradi et al., 2006). So könnte in Hinblick auf die hierarchische Positionierung von APRIL spekuliert werden, dass aufgrund der natürlichen Abwesenheit von APRIL in BAC-Zellen in den Studien von Cherradi und Mitarbeitern das Protein pp32 die Funktion von APRIL übernommen hat. Hingegen konnte in unabhängigen Studien in 2007 eine notwendige Beteiligung von pp32 am CRM1-abhängigen Transport der CD83 mRNA eindeutig ausgeschlossen werden (Fries et al., 2007). Hier war das hierarchisch höher positionierte APRIL vorhanden und konnte als HuR-Ligand fungieren.

So wird an dieser Stelle spekuliert, dass die Beteiligung von APRIL als hierarchisch wichtigstes ANP32-Familienmitglied als HuR-Ligand am CRM1-abhängigen mRNA-Exportweg erforderlich ist. Gleichzeitig wird aber eine Beteiligung von pp32 nicht ausgeschlossen. Letztere ist lediglich nicht zwingend notwendig, kann aber womöglich durch redundantes Verhalten ein Fehlen des nahen Verwandten APRIL bis zu einem gewissen Grad ausgleichen. Die Etablierung eines konditionellen Mausmodells, in

welchem sowohl APRIL als auch pp32 induzierbar inaktivierbar (d.h. deletierbar) wären, könnte weiteren Aufschluss über das Zusammenspiel der beiden ANP32-Familienmitglieder geben.

Betrachtet man nun den CD83 mRNA-Transportmechanismus vor dem Hintergrund der Erkenntnisse dieser Arbeit sowie den neuesten Studien zur ANP32-Familie als einen Modellmechanismus für den CRM1-abhängigen Export zellulärer mRNAs, so kann durchaus vermutet werden, dass sowohl HuR als auch APRIL als wichtige Regulatoren für eine ganze Reihe weiterer, CRM1-abhängiger zellulärer mRNAs eine Rolle spielen könnten. Inwiefern dabei ein redundantes Verhalten des ANP32-Familienmitglieds pp32 involviert ist, müssen weitere zukünftige Studien zeigen.

Schließlich könnten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hinweisen, dass vor allem HuR, aber auch APRIL in seiner Funktion als HuR-Ligand und Adaptorprotein, im Modell der RNA-Operons im Zusammenhang mit dem CRM1-abhängigen Exportmechanismus gemeinsam für die Koordination funktionell ähnlicher Transkripte verantwortlich sind. Unter diesem Aspekt könnte die Regulation des CRM1-abhängigen mRNA-Exportmechanismus als Teil des RNA-Operons betrachtet werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APRIL	<i>acidic protein rich in leucines</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>AU-rich elements</i>
AU	<i>Adenosine-Uridine</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
<i>c-fos</i>	<i>cellular oncogene fos</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
Da	Dalton
DC	<i>dendritic cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELAV	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>
ERG	<i>early response gene</i>
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ1
hnRNP	heterogenous nuclear Ribonucleoprotein
hsp	Hitzeschockprotein
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-4	Interleukin 4
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
K	Kilo
kV	Kilovolt
l	Liter
LB	Luria Bertani
LMB	Leptomycin B
loxP	<i>locus of crossing over of P1</i>
M	Molar
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
NaAc	Natriumacetat
NES	<i>nuclear export signal</i> , nukleäres Exportsignal
n.d.	<i>not detected</i>
$\mu$ g	Mikrogramm
NIH	<i>National Institutes of Health</i>

μl	Mikroliter
NLS	<i>nuclear localisation signal</i> , nukleäres Lokalisationssignal
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
NPC	<i>nuclear pore complex</i> , Kernporenkomplex
NXF1	<i>nuclear export factor1</i>
nt	Nukleotid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PG2	Prostaglandin 2
PI	Propidiumiodid
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
pp32	Phosphoprotein 32
PRE	<i>posttranscriptional regulatory element</i>
pSUPER	<i>suppression of endogenous RNA</i>
Rev	<i>regulator of viral gene expression</i>
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodiumdodecylsulfate</i> )
sec	Sekunde
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylsorbitan Monolaurat
TNFα	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
URE	<i>Uridine-rich elements</i>
WT	Wildtyp

Aminosäuren wurden nach dem 1-Buchstaben-Code abgekürzt.

## 7 Literatur

- Abdelmohsen K, Gorospe M.** 2010. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1:214-229.
- Aerts-Toegaert C, Heirman C, Tuyaeerts S, Corthals J, Aerts JL, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K.** 2007. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 37:686-695.
- Ahmad KA, Wang GX, Slaton J, Unger G, Ahmed K.** 2005. Targeting CK2 for cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* 16:1037-1043.
- Amasaki H, Ogawa M, Nagasao J, Mutoh KI, Ichihara N, Asari M, Shiota K.** 2003. Distributional changes of BrdU, PCNA, E2F1 and PAL31 molecules in developing murine palatal rugae. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 185:517-523.
- Austin S, Ziese M, Sternberg N.** 1981. A Novel Role for Site-Specific Recombination in Maintenance of Bacterial Replicons. *Cell* 25:729-736.
- Auwerx J, Avner P, Baldock R, Ballabio A, Balling R, Barbacid M, Berns A, Bradley A, Brown S, Carmeliet P, Chambon P, Cox R, Davidson D, Davies K, Duboule D, Forejt J, Granucci F, Hastie N, de Angelis MH, Jackson I, Kioussis D, Kollias G, Lathrop M, Lendahl U, Malumbres M, von Melchner H, Muller W, Partanen J, Ricciardi-Castagnoli P, Rigby P, Rosen B, Rosenthal N, Skarnes B, Stewart AF, Thornton J, Tocchini-Valentini G, Wagner E, Wahli W, Wurst W.** 2004. The European dimension for the mouse genome mutagenesis program. *Nature Genetics* 36:925-927.
- Bai J, Brody JR, Kadkol SS, Pasternack GR.** 2001. Tumor suppression and potentiation by manipulation of pp32 expression. *Oncogene* 20:2153-2160.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YT, Pulendran B, Palucka K.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 18:767-+.
- Banchereau J, Steinman RM.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von Laer D.** 2002. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: Generation, concentration, and broad host range. *Journal of Virology* 76:1488-1495.
- Bjorck E, Ek S, Landgren O, Jerkeman M, Ehinger M, Bjorkholm M, Borrebaeck CA, Porwit-MacDonald A, Nordenskjold M.** 2005. High expression of cyclin B1 predicts a favorable outcome in patients with follicular lymphoma. *Blood* 105:2908-2915.
- Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, Oesch F, Zabel B.** 2002. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics* 11:115-132.
- Bodem J, Schied T, Gabriel R, Rammling M, Rethwilm A.** 2011. Foamy Virus Nuclear RNA Export Is Distinct from That of Other Retroviruses. *Journal of Virology* 85:2333-2341.
- Bogerd HP, Echarri A, Ross TM, Cullen BR.** 1998. Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J Virol* 72:8627-8635.

- Bray M, Prasad S, Dubay JW, Hunter E, Jeang KT, Rekosh D, Hammarskjold ML.** 1994. A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1256-1260.
- Breloer M, Fleischer B.** 2008. CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends in Immunology* 29:186-194.
- Breloer M, Kretschmer B, Luthje K, Ehrlich S, Ritter U, Bickert T, Steeg C, Fillatreau S, Hoehlig K, Lampropoulou V, Fleischer B.** 2007. CD83 is a regulator of murine B cell function in vivo. *European Journal of Immunology* 37:634-648.
- Brennan CM, Gallouzi IE, Steitz JA.** 2000. Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *Journal of Cell Biology* 151:1-13.
- Brennan CM, Steitz JA.** 2001. HuR and mRNA stability. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:266-277.
- Broach JR, Guarascio VR, Jayaram M.** 1982. Recombination within the yeast plasmid 2mu circle is site-specific. *Cell* 29:227-234.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R.** 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.
- Buchholz F.** 2008. Molecular evolution of the tre recombinase. *Journal of visualized experiments*.
- Buchholz F, Bishop M.** 2001. LoxP-directed cloning: use of Cre recombinase as a universal restriction enzyme. *Biotechniques* 31:906-8, 910, 912, 914, 916, 918.
- Buchholz F, Stewart AF.** 2001. Alteration of Cre recombinase site specificity by substrate-linked protein evolution. *Nat Biotechnol* 19:1047-1052.
- Bultman SJ, Klebig ML, Michaud EJ, Sweet HO, Davisson MT, Woychik RP.** 1994. Molecular Analysis of Reverse Mutations from Nonagouti (A) to Black-And-Tan (A(T)) and White-Bellied Agouti (A(W)) Reveals Alternative Forms of Agouti Transcripts. *Genes & Development* 8:481-490.
- Capecchi MR.** 1989a. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292.
- Capecchi MR.** 1989b. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5:70-76.
- Carmody SR, Tran EJ, Apponi LH, Corbett AH, Wentz SR.** 2010. The Mitogen-Activated Protein Kinase Slt2 Regulates Nuclear Retention of Non-Heat Shock mRNAs during Heat Shock-Induced Stress. *Molecular and Cellular Biology* 30:5168-5179.
- Carmody SR, Wentz SR.** 2009. mRNA nuclear export at a glance. *Journal of Cell Science* 122:1933-1937.
- Chemnitz J, Pieper D, Gruttner C, Hauber J.** 2009. Phosphorylation of the HuR ligand APRIL by casein kinase 2 regulates CD83 expression. *European Journal of Immunology* 39:267-279.
- Chemnitz J, Turza N, Hauber I, Steinkasserer A, Hauber J.** 2010. The karyopherin CRM1 is required for dendritic cell maturation. *Immunobiology* 215:370-379.

- Chen CYA, Shyu AB.** 1995. Au-Rich Elements - Characterization and Importance in Messenger-Rna Degradation. *Trends in Biochemical Sciences* 20:465-470.
- Chen TH, Brody JR, Romantsev FE, Yu JG, Kayler AE, Voneiff E, Kuhajda FP, Pasternack GR.** 1996. Structure of pp32, an acidic nuclear protein which inhibits oncogene-induced formation of transformed foci. *Mol Biol Cell* 7:2045-2056.
- Cherradi N, Lejczak C, Desroches-Castan A, Feige JJ.** 2006. Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin. *Molecular Endocrinology* 20:916-930.
- Clouse KN, Luo MJ, Zhou ZL, Reed R.** 2001. A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA. *Nature Cell Biology* 3:97-99.
- Cochet C, Chambaz EM.** 1983. Oligomeric Structure and Catalytic Activity of G-Type Casein Kinase - Isolation of the 2 Subunits and Renaturation Experiments. *Journal of Biological Chemistry* 258:1403-1406.
- Costanzo RV, Vila-Ortiz GJ, Perandones C, Carminatti H, Matilla A, Radrizzani M.** 2006. Anp32e/Cpd1 regulates protein phosphatase 2A activity at synapses during synaptogenesis. *Eur J Neurosci* 23:309-324.
- Cramer SO, Trumpfheller C, Mehlhoop U, More S, Fleischer B, von Bonin A.** 2000. Activation-induced expression of murine CD83 on T cells and identification of a specific CD83 ligand on murine B cells. *International Immunology* 12:1347-1351.
- Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, Hitzemann RJ, Maxson SC, Miner LL, Silva AJ, Wehner JM, WynshawBoris A, Paylor R.** 1997. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology* 132:107-124.
- Cullen BR.** 2003a. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends in Biochemical Sciences* 28:419-424.
- Cullen BR.** 2003b. Nuclear RNA export. *Journal of Cell Science* 116:587-597.
- Davis AT, Wang HM, Zhang P, Ahmed K.** 2002. Heat shock mediated modulation of protein kinase CK2 in the nuclear matrix. *Journal of Cellular Biochemistry* 85:583-591.
- DeMaria CT, Brewer G.** 1996. AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J Biol Chem* 271:12179-12184.
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O.** 1987. Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576-578.
- Donate C, Roher N, Balasch JC, Ribas L, Goetz FW, Planas JV, Tort L, MacKenzie S.** 2007. CD83 expression in sea bream macrophages is a marker for the LPS-induced inflammatory response. *Fish & Shellfish Immunology* 23:877-885.
- Dudziak D, Nimmerjahn F, Bornkamm GW, Laux G.** 2005. Alternative splicing generates putative soluble CD83 proteins that inhibit T cell proliferation. *Journal of Immunology* 174:6672-6676.

- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L.** 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology* 72:8463-8471.
- Engel P, Tedder TF.** 1994. New Cd from the B-Cell Section of the 5Th-International-Workshop-On-Human-Leukocyte-Differentiation-Antigens. *Leukemia & Lymphoma* 13:61-64.
- Evans MJ, Kaufman MH.** 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Fahrenkrog B, Aebi U.** 2003. The nuclear pore complex: Nucleocytoplasmic transport and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:757-766.
- Fan XC, Steitz JA.** 1998a. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15293-15298.
- Fan XC, Steitz JA.** 1998b. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J* 17:3448-3460.
- Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J.** 2003. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112:659-672.
- Faust M, Montenarh M.** 2000. Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res* 301:329-340.
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P.** 1996. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10887-10890.
- Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E, Zitvogel L.** 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: Cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature Medicine* 5:405-411.
- Filhol O, Cochet C.** 2009. Cellular functions of Protein kinase CK2: a dynamic affair. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66:1830-1839.
- Fischer U, Huber J, Boelens WC, Mattaj IW, Luhrmann R.** 1995. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82:475-483.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW.** 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90:1051-1060.
- Fried H, Kutay U.** 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60:1659-1688.
- Fries B, Heukeshoven J, Hauber I, Gruttner C, Stocking C, Kehlenbach RH, Hall J, Chemnitz J.** 2007. Analysis of nucleocytoplasmic trafficking of the HuR ligand APRIL and its influence on CD83 expression. *Journal of Biological Chemistry* 282:4504-4515.
- Fries B.** 2006. Einfluss des HuR-Liganden APRIL auf die CD83 Expression. Dissertation
- Fujimoto Y, Tu LL, Miller AS, Bock C, Fujimoto M, Doyle C, Steeber DA, Tedder TF.** 2002. CD83 expression influences CD4(+) T cell development in the thymus. *Cell* 108:755-767.

**Gallouzi IE, Brennan CM, Steitz JA.** 2001. Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock (Retracted Article. See vol 9, pg 1410, 2003). *Rna-A Publication of the Rna Society* 7:1348-1361.

**Garcia-Martinez LF, Appleby MW, Staehling-Hampton K, Andrews DM, Chen YC, McEuen M, Tang P, Rhinehart RL, Proll S, Paeper B, Brunkow ME, Granda AG, Howard ED, Walker DE, Charmley P, Jonas M, Shaw S, Latham JA, Ramsdell F.** 2004. A novel mutation in CD83 results in the development of a unique population of CD4(+) T cells. *Journal of Immunology* 173:2995-3001.

**Gatfield D, Izaurralde E.** 2002. REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export. *Journal of Cell Biology* 159:579-588.

**Ge W, Arp J, Lian DM, Liu WH, Baroja ML, Jiang JF, Ramcharran S, Eldeen FZ, Zinser E, Steinkasserer A, Chou P, Brand S, Nicolette C, Garcia B, Wang H.** 2010. Immunosuppression Involving Soluble CD83 Induces Tolerogenic Dendritic Cells That Prevent Cardiac Allograft Rejection. *Transplantation* 90:1145-1156.

**Georgiades P, Ogilvy S, Duval H, Licence DR, Charnock-Jones DS, Smith SK, Print CG.** 2002. VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages. *Genesis* 34:251-256.

**Gerber DA, Souquere-Besse S, Puvion F, Dubois MF, Bensaude O, Cochet C.** 2000. Heat-induced relocalization of protein kinase CK2 - Implication of CK2 in the context of cellular stress. *Journal of Biological Chemistry* 275:23919-23926.

**Glaser S.** 2008. Untersuchung des RNA-Kernexportes im Modellsystem *Xenopus laevis*. Dissertation

**Görlich D, Kutay U.** 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15:607-660.

**Hahne M, Kataoka T, Schroter M, Hofmann K, Irmeler M, Bodmer JL, Schneider P, Bornand T, Holler N, French LE, Sordat B, Rimoldi D, Tschopp J.** 1998. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med* 188:1185-1190.

**Hansell C, Zhu XW, Brooks H, Sheppard M, Withanage S, Maskell D, Mcconnell I.** 2007. Unique features and distribution of the chicken CD83(+) cell. *Journal of Immunology* 179:5117-5125.

**Hansen GM, Markesich DC, Burnett MB, Zhu QH, Dionne KM, Richter LJ, Finnell RH, Sands AT, Zambrowicz BP, Abuin A.** 2008. Large-scale gene trapping in C57BL/6N mouse embryonic stem cells. *Genome Research* 18:1670-1679.

**Hasegawa H, Kakuguchi W, Kuroshima T, Kitamura T, Tanaka S, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F.** 2009. HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells in a different manner from that of normal cells. *British Journal of Cancer* 100:1943-1948.

**Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC.** 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 194:769-779.

**Hayden MS, Ghosh S.** 2008. Shared principles in NF-kappa B signaling. *Cell* 132:344-362.

**He HB, Tan MJ, Pamarthy D, Wang GX, Ahmed K, Sun Y.** 2007. CK2 phosphorylation of SAG at Thr10 regulates SAG stability, but not its E3 ligase activity. *Molecular and Cellular Biochemistry* 295:179-188.

- Herold A, Teixeira L, Izaurralde E.** 2003. Genome-wide analysis of nuclear mRNA export pathways in *Drosophila*. *Embo Journal* 22:2472-2483.
- Higashino F, Aoyagi M, Takahashi A, Ishino M, Taoka M, Isobe T, Kobayashi M, Totsuka Y, Kohgo T, Shindoh M.** 2005. Adenovirus E4orf6 targets pp32/LANP to control the fate of ARE-containing mRNAs by perturbing the CRM1-dependent mechanism. *Journal of Cell Biology* 170:15-20.
- Hirano N, Butler MO, Xia Z, Ansen S, Bergwelt-Baildon MS, Neuberg D, Freeman GJ, Nadler LM.** 2006. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8(+) T cells and preferential enrichment for antigen specificity. *Blood* 107:1528-1536.
- Hock BD, Haring LF, Steinkasserer A, Taylor KG, Patton WN, McKenzie JL.** 2004. The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. *Leukemia Research* 28:237-241.
- Hock BD, Kato M, McKenzie JL, Hart DN.** 2001. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol* 13:959-967.
- Hock BD, O'Donnell JL, Taylor K, Steinkasserer A, McKenzie JL, Rothwell AG, Summers KL.** 2006. Levels of the soluble forms of CD80, CD86, and CD83 are elevated in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Tissue Antigens* 67:57-60.
- Huang Y, Carmichael GG.** 1997. The mouse histone H2a gene contains a small element that facilitates cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts and of unspliced HIV-1-related mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10104-10109.
- Huang ZM, Yen TS.** 1995. Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol Cell Biol* 15:3864-3869.
- Hutten S, Kehlenbach RH.** 2007. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in Cell Biology* 17:193-201.
- Ishida N, Hara T, Kamura T, Yoshida M, Nakayama K, Nakayama KI.** 2002. Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem* 277:14355-14358.
- Jaenisch R, Mintz B.** 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:1250-1254.
- Jang BC, Munoz-Najar U, Paik JH, Claffey K, Yoshida M, Hla T.** 2003. Leptomycin B, an inhibitor of the nuclear export receptor CRM1, inhibits COX-2 expression. *Journal of Biological Chemistry* 278:2773-2776.
- Jang BC, Sung SH, Park JG, Park JW, Suh MH, Cho IH, Yoshida M, Yoo SK, Suh SI.** 2006. Leptomycin B, a metabolite of *Streptomyces*, inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in BV2 microglial cells. *International Journal of Oncology* 29:1509-1515.
- Jiang X, Kim HE, Shu H, Zhao Y, Zhang H, Kofron J, Donnelly J, Burns D, Ng SC, Rosenberg S, Wang X.** 2003. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin- $\alpha$  in a death regulatory pathway. *Science* 299:223-226.
- Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH.** 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *Journal of Experimental Medicine* 193:1285-1294.

- Kadkol SS, Brody JR, Epstein JI, Kuhajda FP, Pasternack GR.** 1998. Novel nuclear phosphoprotein pp32 is highly expressed in intermediate- and high-grade prostate cancer. *Prostate* 34:231-237.
- Kadkol SS, El Naga GA, Brody JR, Bai J, Gusev Y, Dooley WC, Pasternack GR.** 2001. Expression of pp32 gene family members in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 68:65-73.
- Katzav S, Martin-Zanca D, Barbacid M.** 1989. vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J* 8:2283-2290.
- Keene JD.** 1999. Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5-7.
- Keene JD.** 2003. Organizing mRNA export. *Nature Genetics* 33:111-112.
- Keene JD.** 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8:533-543.
- Kim HS, Wilce MCJ, Yoga YMK, Pardini NR, Gunzburg MJ, Cowieson NP, Wilson GM, Williams BRG, Gorospe M, Wilce JA.** 2011. Different modes of interaction by TIAR and HuR with target RNA and DNA. *Nucleic Acids Research* 39:1117-1130.
- Kimura T, Hashimoto I, Nagase T, Fujisawa JI.** 2004. CRM1-dependent, but not ARE-mediated, nuclear export of IFN-alpha 1 mRNA. *Journal of Cell Science* 117:2259-2270.
- Kimura T, Hashimoto I, Nishizawa M, Ito S, Yamada H.** 2010. Novel cis-active structures in the coding region mediate CRM1-dependent nuclear export of IFN-alpha 1 mRNA. *Medical Molecular Morphology* 43:145-157.
- King PH, Levine TD, Freneau RT, Jr., Keene JD.** 1994. Mammalian homologs of Drosophila ELAV localized to a neuronal subset can bind in vitro to the 3' UTR of mRNA encoding the Id transcriptional repressor. *J Neurosci* 14:1943-1952.
- Kobe B, Kajava AV.** 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11:725-732.
- Koller BH, Smithies O.** 1989. Inactivating the beta 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8932-8935.
- Kozlow EJ, Wilson GL, Fox CH, Kehrl JH.** 1993. Subtractive cDNA cloning of a novel member of the Ig gene superfamily expressed at high levels in activated B lymphocytes. *Blood* 81:454-461.
- Kretschmer B, Luthje K, Ehrlich S, Osterloh A, Piedavent M, Fleischer B, Breloer M.** 2008. CD83 on murine APC does not function as a costimulatory receptor for T cells. *Immunology Letters* 120:87-95.
- Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, Bevec D, Kuhnt C, Steinkasserer A, Schuler G, Hauber J.** 2000a. Inhibition of CD83 cell surface expression during dendritic cell maturation by interference with nuclear export of CD83 mRNA. *Journal of Experimental Medicine* 191:1581-1589.
- Kruse M, Rosorius O, Kratzer F, Stelz G, Kuhnt C, Schuler G, Hauber J, Steinkasserer A.** 2000b. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *Journal of Virology* 74:7127-7136.
- Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K.** 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269:1427-1429.

- Kular RK, Gogliotti RG, Opal P.** 2010. Cpd-1 null mice display a subtle neurological phenotype. *PLoS One* 5.
- Lan Z, Lian D, Liu W, Arp J, Charlton B, Ge W, Brand S, Healey D, DeBenedette M, Nicolette C, Garcia B, Wang H.** 2010. Prevention of chronic renal allograft rejection by soluble CD83. *Transplantation* 90:1278-1285.
- Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A.** 2002a. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends in Immunology* 23:273-275.
- Lechmann M, Krooshoop DJEB, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A.** 2001. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 194:1813-1821.
- Lechmann M, Zinser E, Golka A, Steinkasserer A.** 2002b. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 129:113-118.
- Li M, Makkinje A, Damuni Z.** 1996. Molecular identification of I1PP2A, a novel potent heat-stable inhibitor protein of protein phosphatase 2A. *Biochemistry* 35:6998-7002.
- Longman D, Johnstone IL, Caceres JF.** 2003. The Ref/Aly proteins are dispensable for mRNA export and development in *Caenorhabditis elegans*. *Rna-A Publication of the Rna Society* 9:881-891.
- Lu DS, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen WB, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD.** 1994. Agouti Protein Is An Antagonist of the Melanocyte-Stimulating-Hormone Receptor. *Nature* 371:799-802.
- Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A.** 2007. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26:503-517.
- Luthje K, Kretschmer B, Fleischer B, Breloer M.** 2008. CD83 regulates splenic B cell maturation and peripheral B cell homeostasis. *International Immunology* 20:949-960.
- Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H.** 1996. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem* 271:8144-8151.
- Malek SN, Katumuluwa AI, Pasternack GR.** 1990. Identification and preliminary characterization of two related proliferation-associated nuclear phosphoproteins. *J Biol Chem* 265:13400-13409.
- Masters JR.** 2002. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2:315-319.
- Matilla A, Radrizzani M.** 2005. The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats. *Cerebellum* 4:7-18.
- Matsuoka K, Taoka M, Satozawa N, Nakayama H, Ichimura T, Takahashi N, Yamakuni T, Song SY, Isoe T.** 1994. A nuclear factor containing the leucine-rich repeats expressed in murine cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9670-9674.
- McKinsey TA, Chu ZL, Tedder TF, Ballard DW.** 2000. Transcription factor NF-kappa B regulates inducible CD83 gene expression in activated T lymphocytes. *Molecular Immunology* 37:783-788.
- McVicar DW, Winkler-Pickett R, Taylor LS, Makrigiannis A, Bennett M, Anderson SK, Ortaldo JR.** 2002. Aberrant DAP12 signaling in the 129 strain of mice: Implications for the analysis of gene-targeted mice. *Journal of Immunology* 169:1721-1728.

- Meggio F, Pinna LA.** 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* 17:349-368.
- Mencinger M, Panagopoulos I, Contreras JA, Mitelman F, Aman P.** 1998. Expression analysis and chromosomal mapping of a novel human gene, APRIL, encoding an acidic protein rich in leucines. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1395:176-180.
- Metzger D, Feil R.** 1999. Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* 10:470-476.
- Montenarh M.** 2010. Cellular regulators of protein kinase CK2. *Cell Tissue Res* 342:139-146.
- Moore MJ, Rosbash M.** 2001. Cell biology. TAPping into mRNA export. *Science* 294:1841-1842.
- Moser FG, Dorman BP, Ruddle FH.** 1975. Mouse-Human Heterokaryon Analysis with A 33258 Hoechst-Giemsa Technique. *Journal of Cell Biology* 66:676-680.
- Munemasa Y, Suzuki T, Aizawa K, Miyamoto S, Imai Y, Matsumura T, Horikoshi M, Nagai R.** 2008. Promoter region-specific histone incorporation by the novel histone chaperone ANP32B and DNA-binding factor KLF5. *Molecular and Cellular Biology* 28:1171-1181.
- Müller-Hill B.** 2004. Bacterial Transcription Regulation. eLS
- Mutai H, Toyoshima Y, Sun WY, Hattori N, Tanaka S, Shiota K.** 2000. PAL31, a novel nuclear protein, expressed in the developing brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274:427-433.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramownewerly W, Roder JC.** 1993. Derivation of Completely Cell Culture-Derived Mice from Early-Passage Embryonic Stem-Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:8424-8428.
- Nestle FO, Banchereau J, Hart D.** 2001. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* 7:761-765.
- Nishino T, Ishino Y, Morikawa K.** 2006. Structure-specific DNA nucleases: structural basis for 3D-scissors. *Current Opinion in Structural Biology* 16:60-67.
- Ogilvy S, Elefanty AG, Visvader J, Bath ML, Harris AW, Adams JM.** 1998. Transcriptional regulation of vav, a gene expressed throughout the hematopoietic compartment. *Blood* 91:419-430.
- Ohta Y, Landis E, Boulay T, Phillips RB, Collet B, Secombes CJ, Flajnik MF, Hansen JD.** 2004. Homologs of CD83 from elasmobranch and teleost fish. *Journal of Immunology* 173:4553-4560.
- Opal P, Garcia JJ, McCall AE, Xu B, Weeber EJ, Sweatt JD, Orr HT, Zoghbi HY.** 2004. Generation and characterization of LANP/pp32 null mice. *Mol Cell Biol* 24:3140-3149.
- Otero GC, Hope TJ.** 1998. Splicing-independent expression of the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase gene is mediated by three cis-acting RNA subelements. *J Virol* 72:9889-9896.
- Pagano MA, Cesaro L, Meggio F, Pinna LA.** 2006. Protein kinase CK2: a newcomer in the 'druggable kinome'. *Biochem Soc Trans* 34:1303-1306.

- Pagano MA, Poletto G, Di Maira G, Cozza G, Ruzzene M, Sarno S, Bain J, Elliott M, Moro S, Zagotto G, Meggio F, Pinna LA.** 2007. Tetrabromocinnamic acid (TBCA) and related compounds represent a new class of specific protein kinase CK2 inhibitors. *Chembiochem* 8:129-139.
- Palucka K, Ueno H, Fay J, Banchereau J.** 2011. Dendritic cells and immunity against cancer. *Journal of Internal Medicine* 269:64-73.
- Pan W, da Graca LS, Shao Y, Yin Q, Wu H, Jiang X.** 2009. PHAPI/pp32 suppresses tumorigenesis by stimulating apoptosis. *J Biol Chem* 284:6946-6954.
- Pashine A, Gopfert U, Chen J, Hoffmann E, Dietrich PS, Peng SL.** 2008. Failed efficacy of soluble human CD83-Ig in allogeneic mixed lymphocyte reactions and experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for a lack of therapeutic potential. *Immunol Lett* 115:9-15.
- Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, Moran JL, Prosser HM, Beier DR, Lloyd KC, Bradley A, Skarnes WC.** 2009. Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nature Methods* 6:493-U34.
- Pieper D, Schirmer S, Prechtel AT, Kehlenbach RH, Hauber J, Chemnitz J.** 2011. Functional Characterization of the HuR:CD83 mRNA Interaction. *Plos One* 6.
- Pluemsampant S, Safronova OS, Nakahama K, Morita I.** 2008. Protein kinase CK2 is a key activator of histone deacetylase in hypoxia-associated tumors. *International Journal of Cancer* 122:333-341.
- Pollard VW, Malim MH.** 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annual Review of Microbiology* 52:491-532.
- Popa I, Harris ME, Donello JE, Hope TJ.** 2002. CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element. *Mol Cell Biol* 22:2057-2067.
- Prazma CM, Tedder TF.** 2008. Dendritic cell CD83: A therapeutic target or innocent bystander? *Immunology Letters* 115:1-8.
- Prechtel AT, Chemnitz J, Schirmer S, Ehlers C, Langbein-Detsch I, Stulke J, Dabauvalle MC, Kehlenbach RH, Hauber J.** 2006. Expression of CD83 is regulated by HuR via a novel cis-active coding region RNA element. *Journal of Biological Chemistry* 281:10912-10925.
- Prechtel AT, Steinkasserer A.** 2007. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Archives of Dermatological Research* 299:59-69.
- Prechtel AT, Turza NM, Theodoridis AA, Steinkasserer A.** 2007. CD83 knockdown in monocyte-derived dendritic cells by small interfering RNA leads to a diminished T cell stimulation. *Journal of Immunology* 178:5454-5464.
- Radrizzani M, Vila-Ortiz G, Cafferata EG, Di Tella MC, Gonzalez-Guerrico A, Perandones C, Pivetta OH, Carminatti H, Idoyaga V, V, Santa-Coloma TA.** 2001. Differential expression of CPD1 during postnatal development in the mouse cerebellum. *Brain Res* 907:162-174.
- Raineri I, Wegmueller D, Gross B, Certa U, Moroni C.** 2004. Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res* 32:1279-1288.
- Rebane A, Aab A, Steitz JA.** 2004. Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *RNA* 10:590-599.

- Reed R, Hurt E.** 2002. A conserved snRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* 108:523-531.
- Reilly PT, Afzal S, Gorrini C, Lui K, Bukhman YV, Wakeham A, Haight J, Ling TW, Cheung CC, Elia AJ, Turner PV, Mak TW.** 2011. Acidic nuclear phosphoprotein 32kDa (ANP32)B-deficient mouse reveals a hierarchy of ANP32 importance in mammalian development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:10243-10248.
- Reilly PT, Afzal S, Wakeham A, Haight J, You-Ten A, Zaugg K, Dembowy J, Young A, Mak TW.** 2010. Generation and characterization of the Anp32e-deficient mouse. *PLoS One* 5:e13597.
- Reinwald S, Wiethe C, Westendorf AM, Breloer M, Probst-Kepper M, Fleischer B, Steinkasserer A, Buer J, Hansen W.** 2008. CD83 expression in CD4(+) T cells modulates inflammation and autoimmunity. *Journal of Immunology* 180:5890-5897.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM.** 2000. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25:139-140.
- Rosen CA, Terwilliger E, Dayton A, Sodroski JG, Haseltine WA.** 1988. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2071-2075.
- Santa-Coloma TA.** 2003. Anp32e (Cpd1) and related protein phosphatase 2 inhibitors. *Cerebellum* 2:310-320.
- Sarkar I, Hauber I, Hauber J, Buchholz F.** 2007. HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science* 316:1912-1915.
- Sarno S, Moro S, Meggio F, Zagotto G, Dal Ben D, Ghisellini P, Battistutta R, Zanotti G, Pinna LA.** 2002. Toward the rational design of protein kinase casein kinase-2 inhibitors. *Pharmacol Ther* 93:159-168.
- Sarno S, Reddy H, Meggio F, Ruzzene M, Davies SP, Donella-Deana A, Shugar D, Pinna LA.** 2001. Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2'). *FEBS Lett* 496:44-48.
- Sauer B, Henderson N.** 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5166-5170.
- Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA.** 2002. Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity. *Journal of Immunology* 168:2599-2602.
- Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Hellstrom KE, Hellstrom I, Ledbetter JA.** 2001. CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8(+) T cells. *Journal of Immunology* 166:3865-3872.
- Schütz S, Chemnitz J, Spillner C, Frohme M, Hauber J, Kehlenbach RH.** 2006. Stimulated expression of mRNAs in activated T cells depends on a functional CRM1 nuclear export pathway. *Journal of Molecular Biology* 358:997-1009.
- Seldin DC, Landesman-Bollag E, Farago M, Currier N, Lou D, Dominguez I.** 2005. CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 274:63-67.

- Senechal B, Boruchov AM, Reagan JL, Hart DN, Young JW.** 2004. Infection of mature monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus inhibits stimulation of T-cell proliferation via the release of soluble CD83. *Blood* 103:4207-4215.
- Seo SB, McNamara P, Heo S, Turner A, Lane WS, Chakravarti D.** 2001. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. *Cell* 104:119-130.
- Shaw G, Kamen R.** 1987. A Conserved AU Sequence from the 3' Untranslated Region of Gm-Csf Messenger-Rna Mediates Selective Messenger-Rna Degradation. *Journal of Cellular Biochemistry* 132.
- Shen SM, Yu Y, Wu YL, Cheng JK, Wang LS, Chen GQ.** 2010. Downregulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells. *Carcinogenesis* 31:419-426.
- Shi H, Hoffman BE, Lis JT.** 1997. A specific RNA hairpin loop structure binds the RNA recognition motifs of the Drosophila SR protein B52. *Molecular and Cellular Biology* 17:2649-2657.
- Siddiqui N, Borden KL.** 2011. mRNA export and cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA*.
- Singh NN, Ramji DP.** 2008. Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response? *J Mol Med (Berl)* 86:887-897.
- Stefl R, Xu M, Skrisovska L, Emeson RB, Allain FHT.** 2006. Structure and specific RNA binding of ADAR2 double-stranded RNA binding motifs. *Structure* 14:345-355.
- Steinman RM.** 2007. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. *European Journal of Immunology* 37:S53-S60.
- Steinman RM, Banchereau J.** 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449:419-426.
- Stutz F, Izaurralde E.** 2003. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends in Cell Biology* 13:319-327.
- Sun W, Kimura H, Hattori N, Tanaka S, Matsuyama S, Shiota K.** 2006. Proliferation related acidic leucine-rich protein PAL31 functions as a caspase-3 inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 342:817-823.
- Sun WY, Hattori N, Mutai H, Toyoshima Y, Kimura H, Tanaka S, Shiota K.** 2001. PAL31, a nuclear protein required for progression to the S phase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280:1048-1054.
- Suntharalingam M, Wente SR.** 2003. Peering through the pore: Nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Developmental Cell* 4:775-789.
- Terry LJ, Wente SR.** 2007. Nuclear mRNA export requires specific FG nucleoporins for translocation through the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 178:1121-1132.
- Testa G, Schaft J, van der Hoeven F, Glaser S, Anastassiadis K, Zhang YM, Hermann T, Stremmel W, Stewart AF.** 2004. A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout-first alleles. *Genesis* 38:151-158.
- Thomas KR, Capecchi MR.** 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.

- Thomas KR, Deng CX, Capecchi MR.** 1992. High-Fidelity Gene Targeting in Embryonic Stem-Cells by Using Sequence Replacement Vectors. *Molecular and Cellular Biology* 12:2919-2923.
- Tochio N, Umehara T, Munemasa Y, Suzuki T, Sato S, Tsuda K, Koshiha S, Kigawa T, Nagai R, Yokoyama S.** 2010. Solution Structure of Histone Chaperone ANP32B: Interaction with Core Histones H3-H4 through Its Acidic Concave Domain. *Journal of Molecular Biology* 401:97-114.
- Tsai NP, Lin YL, Tsui YC, Wei LN.** 2010. Dual action of epidermal growth factor: extracellular signal-stimulated nuclear-cytoplasmic export and coordinated translation of selected messenger RNA. *Journal of Cell Biology* 188:325-333.
- Tsukamoto Y, Uchida T, Karnan S, Noguchi T, Nguyen LT, Tanigawa M, Takeuchi I, Matsuura K, Hijiya N, Nakada C, Kishida T, Kawahara K, Ito H, Murakami K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M.** 2008. Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. *J Pathol* 216:471-482.
- Twist CJ, Beier DR, Disteché CM, Edelhoff S, Tedder TF.** 1998. The mouse Cd83 gene: structure, domain organization, and chromosome localization. *Immunogenetics* 48:383-393.
- Tze LE, Horikawa K, Domaschenz H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, Way DA, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Goodnow CC.** 2011. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med* 208:149-165.
- Vaesen M, Barnikol-Watanabe S, Gotz H, Awni LA, Cole T, Zimmermann B, Kratzin HD, Hilschmann N.** 1994. Purification and characterization of two putative HLA class II associated proteins: PHAPI and PHAPII. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375:113-126.
- van der Watt PJ, Maske CP, Hendricks DT, Parker MI, Denny L, Govender D, Birrer MJ, Leaner VD.** 2009. The Karyopherin proteins, Crm1 and Karyopherin beta1, are overexpressed in cervical cancer and are critical for cancer cell survival and proliferation. *Int J Cancer* 124:1829-1840.
- von Knethen A, Tzieply N, Jennewein C, Brune B.** 2010. Casein-kinase-II-dependent phosphorylation of PPAR gamma provokes CRM1-mediated shuttling of PPAR gamma from the nucleus to the cytosol. *Journal of Cell Science* 123:192-201.
- Wahlsten D, Ozaki HS, Livy D.** 1992. Deficient Corpus-Callosum in Hybrids Between Ddn and 3 Other Abnormal-Mouse Strains. *Neuroscience Letters* 136:99-101.
- Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, Johnson DC, Gonzalez D, Dagrada GP, Protheroe RK, Konn ZJ, Stockley DM, Gregory WM, Davies FE, Ross FM, Morgan GJ.** 2010. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 116:e56-e65.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyas E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigo R, Guyer M,**

Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, Mclay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Larty EO, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Raymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Strange-Thomann NS, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Vidal AU, Vinson JP, von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562.

**Wente SR.** 2000. Gatekeepers of the nucleus. *Science* 288:1374-1377.

**Wolenski M, Cramer SO, Ehrlich S, Steeg C, Fleischer B, von Bonin A.** 2003. Enhanced activation of CD83-positive T cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 58:306-311.

**Zhang YM, Buchholz F, Muyrers JPP, Stewart AF.** 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature Genetics* 20:123-128.

**Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF.** 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. *Journal of Immunology* 149:735-742.

**Zhou LJ, Tedder TF.** 1995. Human Blood Dendritic Cells Selectively Express Cd83, A Member of the Immunoglobulin Superfamily. *Journal of Immunology* 154:3821-3835.

**Zhou LJ, Tedder TF.** 1996. CD14(+) blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83(+) dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2588-2592.

**Zhu L, Perlaky L, Henning D, Valdez BC.** 1997. Cloning and characterization of a new silver-stainable protein SSP29, a member of the LRR family. *Biochem Mol Biol Int* 42:927-935.

**Zinser E, Lechmann M, Golka A, Lutz MB, Steinkasserer A.** 2004. Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble CD83. *Journal of Experimental Medicine* 200:345-351.

## 8 Internetquellen

### Datenquellen

Uniprot, humanes APRIL (ANP32B); 29.09.2011

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q92688>

Uniprot, humanes pp32 (ANP32A); 15.10.2011

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q08AJ6>

Uniprot, *Xenopus laevis* XAPRIL (anp32b); 29.09.2011

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6GNU4>

### Bildquellen

Etablierung einer *knockout* Maus; 29.09.2011

[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2007/med07eng.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/med07eng.pdf)

„*knockout-first*“ Verfahren; 05.10.2011

<http://www.knockoutmouse.org/about/targeting-strategies>

Darstellung des modifizierten APRIL-Gens (Anp32b<sup>tm1a(EUCOMM)Hmgu</sup>), Projekt 32882 des EUCOMM

Konsortiums; 04.10.2011

[http://www.knockoutmouse.org/targ\\_rep/alleles/6655/allele-image](http://www.knockoutmouse.org/targ_rep/alleles/6655/allele-image)