

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Pharmakologie
Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie
Direktor: Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter

**Untersuchungen zur Regulation des mRNA-Bindeproteins
human antigen R (HuR) in humanen Kolonkarzinomzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Irina Melnikov

aus Frunse

Frankfurt am Main, 2018

Dekan:	Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. Wolfgang Eberhardt
Korreferent:	Prof. Dr. Michael Rieger
1. Prüfer:	Prof. Dr. Andreas von Knethen
2. Prüfer:	Prof. Dr. Reinier Abraham Boon
Tag der mündlichen Prüfung:	09.04.2019

Gewidmet meinem Ehemann

*Anfangs wollt' ich fast verzagen
und ich dacht' ich trüg' es nie
und ich hab' es doch getragen
aber fragt mich nur nicht, wie...
Heine*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	11
1.1 Allgemeine Aspekte der Kolonkarzinogenese.....	11
1.1.1 Epidemiologie.....	11
1.1.2 Ätiologie, Pathogenese und Histologie von Darmkrebs.....	12
1.1.3 Risikofaktoren für Darmkrebs.....	14
1.2 Rolle der Cyclooxygenase-2 bei der Kolonkarzinogenese	16
1.2.1 Rolle von COX-2 bei der chronischen Entzündung	16
1.2.2 Möglicher therapeutischer Nutzen von COX-2 Inhibitoren bei der Kolonkarzinogenese.....	17
1.2.3 Störungen in der transkriptionellen, epigenetischen und posttranskriptionellen Regulation der COX-2 und deren Bedeutung für die Kolonkarzinogenese	19
1.2.4 Posttranskriptionelle Regulation von COX-2 durch die mRNA-Bindeproteine TTP1 und HuR.....	22
1.3 HuR als ubiquitärer Faktor der posttranskriptionellen Genregulation.....	23
1.3.1 HuR: ein zentraler Regulator der RNA Reifung.....	23
1.3.2 Bedeutung von HuR bei der Tumorigenese	24
1.3.3 Tumorrelevante Zielgene.....	25
1.3.4 Regulationsebenen von HuR.....	28
1.3.4.1 Regulation der subzellulären HuR-Lokalisation.....	28
1.3.4.2 Regulation der HuR-RNA Bindung.....	29
1.3.4.3 Hemmung der HuR Expression durch miRNAs.....	30
1.3.4.4 Regulation von verschiedenen HuR Funktionen durch posttranslationale Modifikation.....	31
1.3.4.4a Methylierung.....	32
1.3.4.4b Phosphorylierung.....	32
1.4 PKC: eine multifunktionelle Familie von Serin-/Threoninkinasen.....	33
1.4.1 PKC-Isoformen: Ca ²⁺ - abhängige/unabhängige DAG-Aktivierung.....	34
1.4.2 Mechanismen der Aktivierung und Inaktivierung von Proteinkinase C.....	35
1.4.2.1 Reifung: Transphosphorylierung und Autophosphorylierung.....	35
1.4.2.2 Aktivierung.....	36
1.4.2.3 Inaktivierung: Proteolyse und Abbau.....	36
1.4.3 Aktivierungsmechanismen von PKC δ	37
1.4.4 Bedeutung von PKCs bei der Karzinogenese	39
1.5 Fragestellung der Arbeit.....	40
2.1 Material.....	41
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien:	41
2.1.2 Inhibitoren für die Zellkultur.....	42
2.1.3 Antikörper.....	43

2.1.4 Zelllinien.....	43
2.1.5 Enzyme für die Molekularbiologie:.....	44
2.1.6 Primer für PCR	44
2.1.7 Kits.....	44
2.1.8 Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	44
2.1.9 Puffer und Lösungen.....	45
2.1.10 Geräte.....	48
2.2 Methoden:.....	49
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	49
2.2.1.1 Kultivierung von DLD-1/SW-620-Zellen.....	49
2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer.....	49
2.2.1.3 Passagieren der Zellen.....	50
2.2.1.4 Stimulation von humanen Kolonkarzinomzellen DLD-1 und SW-620.....	50
2.2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	50
2.2.2.1 Transfektion mit siRNA.....	50
2.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen.....	51
2.2.2.3 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	52
2.2.2.4 Agarose- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	52
2.2.2.5 Reverse-Transkriptase (RT)-Reaktion	52
2.2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	53
2.2.3 Biochemische Arbeitsmethoden.....	55
2.2.3.1 Gewinnung von Proteinlysaten (Totalprotein).....	55
2.2.3.2 Präparation von zytoplasmatischen und nukleären Proteine.....	55
2.2.3.3 Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe der BCA-Methode.....	56
2.2.3.4 Western Blot.....	56
2.2.3.5 Immunfluoreszenz.....	58
2.2.3.6 PKC-Aktivitätsassay.....	59
2.2.3.7 Zytokin-Antikörper-Array.....	59
2.2.3.8 RNA-Protein-Koimmunopräzipitation („Pulldown“.....)	61
2.2.4 Statistik	63
3. Ergebnisse.....	64
3.1 Bestimmung des konstitutiven HuR-Gehalts in verschiedenen Zellkompartimenten in den Kolonkarzinom-Zelllinien DLD-1 und SW-620.....	64
3.2 Untersuchungen zur Bedeutung von Proteinkinasen auf den konstitutiven zytosolischen HuR-Gehalt von Kolonkarzinomzellen.....	65
3.2.1 Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf den zytosolischen HuR-Gehalt von DLD-1 und SW-620 Zellen.....	65
3.2.2. Einfluss von PKC-Inhibitoren auf den zytosolischen HuR-Gehalt von	67
DLD-1 Zellen.....	67
3.2.3 Die zeitabhängige Wirkung von Rottlerin und Gö6976 auf die zytosolische HuR-Proteinspiegel in DLD-1-Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten.....	69
3.2.4 Einfluss von Rottlerin auf das HuR-Shuttling in beiden Zelllinien.....	70

3.3 Untersuchung zur möglichen Kolo­kalisierung von HuR und PKC δ mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie.....	71
3.4 Untersuchung zum PKC-Aktivitätsstatus in DLD-1 Zellen.....	73
3.4.1 PKC-Aktivitätsassay.....	73
3.4.2 Die Stimulation mit TPA führt zu einer moderaten Steigerung des zytosolischen HuR Gehalts in DLD-1 Zellen.....	75
3.4.3 TPA-induzierte Translokation zur Plasmamembran.....	76
3.5 Einfluss der PKC-Hemmung auf die Expression bekannter HuR-Zielgene.....	77
3.5.1 Auswirkungen von Rottlerin auf bestimmte HuR-Zielgene.....	78
3.5.2 Rottlerin hemmt die Bindung von HuR an AU-reiche mRNAs.....	79
3.6 Identifizierung weiterer PKC-regulierter HuR-Zielgene mit Hilfe eines Zytokin-Antikörper-Arrays.....	80
3.6.1 Transiente Depletion von PKC δ mit Hilfe von siRNA-vermittelten Genattenuation	80
3.6.2 Effekt der biologischen Depletion von PKC δ durch siRNA auf die Expression von verschiedenen Zytokinen.....	81
3.6.3 Auswirkungen einer pharmakologischen Inhibition der PKC δ mit Rottlerin....	83
4 Diskussion.....	85
5. Zusammenfassung.....	95
6 Summary.....	97
7 Literaturverzeichnis.....	99

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activated protein-1
APC-Gen	Adenomatous-polyposis-coli gene
APS	Ammonium persulfate
Asp	Aspartic acid
AREs	AU-rich elements
ATP	Adenosine triphosphate
BCA	Bicinchoninic acid
Bcl-2	B-cell lymphoma protein-2
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CARM1	Coactivator associated arginine methyltransferase-1
Cdk1	Cyclin-dependent kinase-1
cDNA	complementary DNA
CEA	Carcinoembryonic antigen
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
ChK2	Checkpoint kinase-2
cIAP2	Cellular inhibitor of apoptosis protein-2
COX	Cyclooxygenase
CpG-Inseln	Cytosin-guanin rich islands
CREs	cAMP-response-elements
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRM1	Chromosomal maintenance protein-1
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosine triphosphate
dCTP	Desoxycytidine triphosphate
DEAE	Diethylaminoethanol
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid

dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
DSS	Disuccinimidyl suberate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylene-diamine-tetra-acetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylene glycol-bis-N,N,N',N'-tetraacetic acid
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor-4E
ELAV	Embryonic lethal abnormal vision
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLIP	FLICE-like inhibitory protein
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GFR	Growth factor receptor
GC-content	Guanin-cytosin content
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC-1	Histone deacetylase-1
HEPES	4-(2-hydroxy)-1-piperazine ethane sulfonic acid
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor-1 α
HNS	HuR nuclear localization signal
HuR	Human antigen R
IGF-IR	Insulin-like growth factor-1 receptor
IL-17	Interleukin-17
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IP3	Inositol trisphosphate
ISG15	Interferon-stimulated gene-15
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KRK	Kolorektales Karzinom
LPS	Lipopolysaccharide

MAP Kinase	Mitogen-activated protein kinase
Mdm2	Murine double minute oncogene-2
miR	microRNA
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9
mRNA	messenger RNA
MSI-L	Microsatellite instability-Low
MSI-H	Microsatellite instability-High
MTA1	Metastasis-associated protein-1
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NF-κB	Nuclear factor κB
NSAIDs	Non steroidal anti-inflammatory drugs
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PAR-CLIP	Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PG	Prostaglandin
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethane sulfonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidene fluoride
RBP	RNA-binding protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RRM	RNA recognition motif
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
Ser	Serin

SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SIRT1	Sirtuin-1 protein
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
TBE	Tris base/boric acid/EDTA buffer
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF- β	Transforming growth factor beta
Thr	Threonin
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TS	Tumorsuppressor
TTP	Tristetraprolin
UICC	Union for International Cancer Control
uPA	urokinase-type plasminogen activator
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslated region
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	The World Health Organization
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Aspekte der Kolonkarzinogenese

1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist eine häufige und tödliche Erkrankung. Die Inzidenz und Mortalität variieren in verschiedenen Ländern sehr stark. Weltweit gilt das kolorektale Karzinom als dritthäufigste Krebsdiagnose bei Männern und zweithäufigste Krebsdiagnose bei Frauen. Im Jahr 2012 wurden weltweit 1,4 Millionen Neuerkrankungen und 694.000 Todesfälle registriert [Torre et al., 2015]. Alleine in Deutschland verstarben 2012 ungefähr 26.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom. Jede achte Krebserkrankung in Deutschland betrifft den Dickdarm. Fast zwei Drittel der Erkrankungen treten im Dickdarm auf, etwa 30 % betreffen den kürzeren Enddarm, die übrigen verteilen sich auf den Übergang zwischen Dick- und Enddarm (Rektosigmoid) bzw. den Analkanal [www.krebsdaten.de]. Im Laufe seines Lebens entwickelt in Deutschland jeder 14. Mann bzw. jede 18. Frau das kolorektale Karzinom. Dabei erkranken die Männer etwa doppelt so häufig an einem KRK als Frauen [Nguyen et al., 2009]. Männer entwickeln auch früher fortgeschrittene Adenome als Frauen [Kolligs et al., 2011]. Die Inzidenz variiert weltweit zwischen 44.8 pro 100.000 Einwohner in Australien und 4.5 in Westafrika [globocan database]. Diese geografischen Unterschiede sind vor allem durch die verschiedenen Ernährungsgewohnheiten und Umwelteinflüsse zu erklären. Des Weiteren spielt die genetische Anfälligkeit eine wichtige Rolle. Aktuell ist ein Rückgang der Inzidenz und Mortalität des KRK in den USA zu verzeichnen, was mit einem besseren Screening und der Reduktion der Risikofaktoren zusammenhängt [Zauber et al., 2015]. Über die letzten 15 Jahre ist die KRK Inzidenz jährlich um 3-4 Prozent rückläufig. Hingegen bleiben die Inzidenzraten in einigen westlichen Ländern stabil oder steigen sogar in einigen Ländern wie z.B. Spanien, Ostasien und Osteuropa [Center et al., 2009]. Hinsichtlich des mittleren Erkrankungsalters treten in einigen Entwicklungsländern wie Indien die kolorektalen Karzinome bei jüngeren Menschen (<50 J.) auffallend häufiger auf als bei älteren (>50 J.) [Gupta et al., 2010]. Tendenziell steigt die Inzidenz von KRK bei Menschen unter 50 Jahren, sinkt aber ab dem Alter von 50 Jahren, wie verschiedene

westliche Krebsregister belegen [Siegel et al., 2017]. Auffällig ist der Anstieg von rechtsseitigen oder proximalen Karzinomen. Der Rückgang der Inzidenz von distalen Kolon- und Rektumkarzinomen kann u.a. auf verbesserte Prävention und Therapieoptionen der KRK sowie auf ein verbessertes Krebscreening zurückgeführt werden [Schub et al., 1986]. Anhand der aktuellen Literatur sind über 86 Prozent der KRK, welche bei unter 50-jährigen diagnostiziert werden, bereits bei Diagnosestellung symptomatisch und befinden sich in einem fortgeschrittenen Stadium, was mit einer generell schlechteren Prognose einhergeht [Dozois et al., 2008].

1.1.2 Ätiologie, Pathogenese und Histologie von Darmkrebs

Die Vorstufe des kolorektalen Karzinoms ist ein adenomatöser Polyp der Dickdarmschleimhaut. Ein Darmpolyp im weitesten Sinne ist eine geschwulstartige Masse, die in das Darmlumen hineinragt. Derzeit wird vermutet, dass alle Polypen als kleine, breitbasige Läsionen ohne definierbaren Stiel beginnen und erst später durch einseitige Zugkräfte an der Tumormasse zum gestielten Polypen auswachsen.

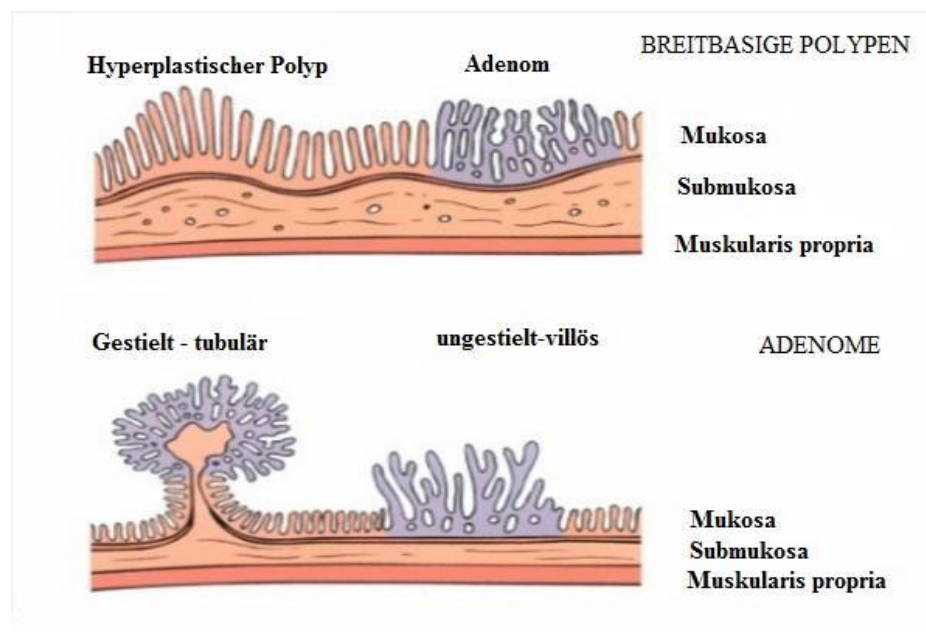


Abbildung 1: Formen der sessilen Polypen.

Es werden zwei Formen der sessilen Polypen unterschieden - hyperplastische Polypen und Adenome. Bei den Adenomen werden wiederum gestielte und ungestielt-villöse Adenome unterschieden. Modifiziert nach [Liu et al., 2009]

Hyperplastische Polypen entstehen als Folge einer defekten Schleimhautreifung oder sind Folge einer chronischen Entzündung. Diese Polypen sind nicht neoplastisch und

haben selbst kein malignes Potential. Dagegen entstehen adenomatöse Polypen oder Adenome durch Proliferation und Dysplasie des Darmepithels. Sie sind echte neoplastische Läsionen und somit die eigentlichen Vorläufer von Karzinomen. Es wird vermutet, dass sich Adenome aus den Kolonmukosa- bzw. adulten Stammzellen innerhalb der Kolonkrypte entwickeln. Im Vergleich zu normalen Mukosazellen wachsen Adenome häufig in das Darmlumen hinein (tubuläres oder villöses Adenom), während flache Adenome seltener auftreten. Es wird geschätzt, dass ein Adenom mit einem Durchmesser von ≥ 1 cm innerhalb von 10 Jahren mit einer Wahrscheinlichkeit von 15% zu einem Karzinom entartet. Der Aufbau unterschiedlicher Polypenformen ist in der Abb. 1 zu sehen. Das Modell der Adenom-Karzinom-Sequenz ist von Fearon und Vogelstein 1990 etabliert worden und ist in Abb. 2 dargestellt. Hierbei wird die Kolonkarzinogenese als ein mehrstufiger Prozess aus mehreren Etappen zusammengefasst, wobei zwischen jeder Etappe spezifische genetische Veränderungen letztendlich zur Hyperproliferation der initiierten Epithelzelle führen und damit aus einem normalen Darmepithel über die Vorstufe eines Adenoms das invasive Kolonkarzinom entsteht. Phasenabhängig sind bei diesem Prozess Mutationen in verschiedenen Genen wie z.B. k-ras, p53 und Adenomatöse Polyposis Coli Gen (APC-Gen) entscheidend beteiligt [Fearon et al., 1990]. Diese Mutationen können sowohl eine Deletion von ganzen Genabschnitten (z.B. Deletion des Gens für APC) als auch Punktmutationen (k-ras Mutation) beinhalten.

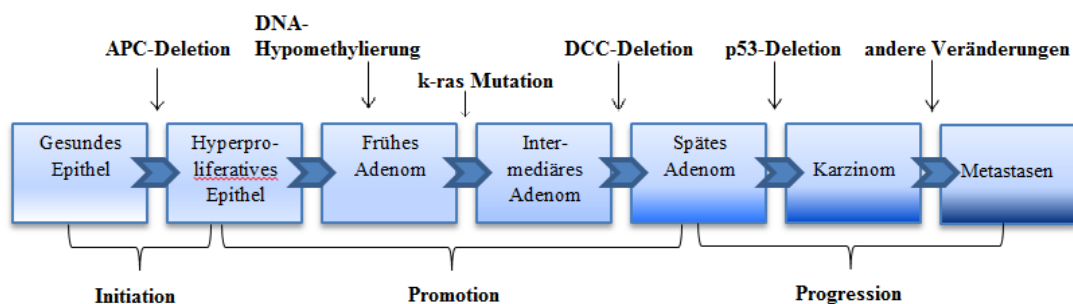


Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz, modifiziert nach [Fearon & Vogelstein, 1990]. Während der Initiationsphase der Kolonkarzinogenese wird die DNA durch karzinogene Noxen geschädigt. Die fehlenden zelleigenen Reparaturmechanismen führen irreversibel zu einer Mutation. Die Epithelzelle entzieht sich der Zellzykluskontrolle, hyperproliert und wird zunächst zum benignen Adenom (Promotion). Die Progressionsphase führt letztendlich zu einer zunehmenden Entdifferenzierung der Zelle und zum Karzinom. Durch zunehmende Autonomie entwickelt sich ein invasiver Tumor mit der Fähigkeit zur Metastasierung.

Bei der Entstehung des Kolonkarzinoms spielen neben genetischen Veränderungen auch epigenetische Ereignisse eine entscheidende Rolle. So kann ein veränderter Methylierungsmuster bestimmter DNA Abschnitte zum Verlust der Genfunktion führen [Shen et al., 2002]. Histologisch gesehen handelt es sich bei der überwiegenden Mehrheit der diagnostizierten bösartigen Tumoren des Dick- und Mastdarms um Adenokarzinome (90%). Die restlichen 10% betreffen neuroendokrine Neoplasien, Hamartome, mesenchymale Tumoren, Lymphome. Die Adenokarzinome selbst werden abhängig von der Fünfjahresüberlebensrate in 2 Kategorien, den High Risk Subtyp und den Low Risk Subtyp unterteilt. Diagnostisch wird der High Risk Subtyp durch eine niedriggradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-L) sowie eine initiale *k-ras* Mutation charakterisiert. Zudem ist dieser Subtyp häufiger auf das distale Kolorektumsegment beschränkt. Der Low Risk Subtyp zeigt indessen eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H), eine initiale Mutation des Protoonkogens BRAF und ist überwiegend im proximalen Kolon lokalisiert. Histologisch werden neben dem serratierten Adenokarzinom noch andere histopathologische Karzinomtypen wie z.B. Siegelringzellkarzinome oder medulläres Karzinom unterschieden. Während das Siegelringzellkarzinom einen aggressiven Subtyp darstellt, weist das medulläre Karzinom des Dickdarmes eine relativ günstige Prognose auf [Knox et al., 2015]. Trotz der Lymphknotenmetastasierung ist das Vorkommen hämatogener Fernmetastasen beim medullären Karzinom extrem selten, weshalb die medullären Karzinome eine sehr gute Prognose haben, was nach kurativer Resektion im UICC-Stadium I und II ein rezidivfreies Überleben in 100% der Fälle ermöglicht [Lanza et al., 1999].

Im Jahr 2000 definierte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) vier histologische Differenzierungsgrade - gut differenzierte (G1) bis undifferenzierte (G4) Tumore. Dabei sind Tumore mit einem niedrigen Differenzierungsgrad (G4) mit einer schlechteren Prognose assoziiert als diejenige mit einem höheren (G1).

1.1.3 Risikofaktoren für Darmkrebs

Das Darmkrebsrisiko wird durch eine Reihe von Faktoren erhöht. Das individuelle KRK Risiko besteht zu 30-50 % aus beeinflussbaren Lebensstilfaktoren wie Ernährung, Rauchen und körperlicher Aktivität. Mit am stärksten wirkt sich der Tabakkonsum aus [www.krebsdaten.de]. Daneben gilt Übergewicht als ein weiterer großer Risikofaktor

für das KRK [Lauby-Secretan et al., 2016]. Wie eine systematische Übersichtsarbeit und Metaanalyse von 13 randomisierten klinischen Studien aus den USA zeigt, ist eine Gewichtszunahme zwischen dem frühen Erwachsenenalter und dem mittleren Lebensalter mit einem mäßigen, aber dennoch signifikanten Risiko für KRK verbunden (Hazard Ratio (HR) 1.23, 95% KI 1.14-1.34) [Karahalios et al., 2015]. Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist Bewegungsmangel. Zahlreiche Beobachtungsstudien deuten darauf hin, dass eine regelmäßige körperliche Aktivität vor Darmkrebs schützt [Wolin et al., 2009]. Eine Metaanalyse über 21 Beobachtungsstudien hat gezeigt, dass das Risiko für KRK bei den körperlich aktivsten Individuen verglichen mit den körperlich inaktivsten um signifikante 27 Prozent geringer ist (Relatives Risiko (RR) 0.73, 95% KI 0.66-0.81) [Boyle et al., 2012]. Während eine ballaststoffreiche Ernährung vor Darmkrebs schützt [Bingham et al., 2003], kann ein langfristiger Konsum von viel rotem Fleisch bzw. Wurstwaren das Auftreten eines Kolonkarzinoms stark begünstigen [Chao et al., 2005]. Das Kochen bei hoher Temperatur (z.B. Grillen, Braten in einer Pfanne) erhöht dieses Risiko zusätzlich – was durch die erhöhte Bildung polyaromatischer Kohlenwasserstoffe und anderer Karzinogene, die aus Proteinen beim Verkohlungsprozess generiert werden, erklärt werden kann. Die nicht beeinflussbaren Risikofaktoren für ein KRK sind Alter, familiäre Belastung und männliches Geschlecht. Dabei entfallen 20-25% auf die familiäre Belastung, d.h. das Risiko ist bei Personen mit leiblichen Verwandten mit KRK oder kolorektalem Adenom in der Anamnese erhöht. Wie stark es erhöht ist, hängt vom Verwandtschaftsgrad (früherer Beginn der Vorsorgekoloskopie bei Verwandten ersten Grades mit KRK), dem Erkrankungsalter und der Anzahl betroffener Verwandten ab [Butterworth et al., 2006]. Das Risiko ist in Familien mit hereditärem Darmkrebs besonders hoch - statistisch gesehen sind es etwa 5% der Fälle. Die häufigsten hereditären Formen sind Familiäre Adenomatöse Polyposis coli (FAP) und HNPCC, auch "Lynch Syndrom" genannt, beides autosomal-dominant vererbte Erkrankungen [Yurgelun et al., 2017]. Die FAP und ihre Varianten - Gardner Syndrom, Turcot Syndrom und attenuierte familiäre adenomatöse Polyposis (AFAP, mildere Form), machen weniger als 1 Prozent aller KRK aus. FAP wird durch Keimbahnmutationen im *adenomatous polyposis coli* (APC)- Gen verursacht, das sich auf Chromosom 5 befindet. Funktionell spielt das von APC codierte Genprodukt eine wichtige Rolle in der WNT Signalkaskade, welche wiederum für die Differenzierung

der intestinalen Darmkrypten von großer Bedeutung ist. So führt der Verlust der APC-vermittelten Funktionen zu einer Akkumulation des für die WNT Signalkaskade wichtigen β -Catenins, das u.a. als Transkriptionsfaktor die Expression einer Reihe wichtiger Proliferationsgene (Cyclin D, c-myc) induzieren kann (sogenanntes *kanonisches Wnt-Signaling*). Außerdem kann APC über Mikrotubuli-Stabilisierung eine Reihe zellulärer Aktivitäten entscheidend beeinflussen [Kwong et al., 2009]. Das Lynch Syndrom oder HNPCC (hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom) macht hingegen ca. 3% aller KRK aus. Die Familien mit „Lynch Syndrom“ weisen einen Defekt in einem der DNA-Mismatch-Reparaturgene auf, am häufigsten hMLH1, hMSH2, hMSH6 oder hPMS2. Es handelt sich um eine Keimbahnmutation in einem Allel des MMR-Gens, wobei das zweite Allel durch somatische Mutation, Verlust der Heterozygotie oder epigenetisches Silencing durch Hypermethylierung des Promotors inaktiviert wird.

1.2 Rolle der Cyclooxygenase-2 bei der Kolonkarzinogenese

1.2.1 Rolle von COX-2 bei der chronischen Entzündung

Neben den oben beschriebenen Genmutationen spielt die pathologisch veränderte Expression von tumorrelevanten Proteinen eine kausale Rolle bei der Entstehung des Kolonkarzinoms. Hierzu zählen u.a. die induzierbare Cyclooxygenase (COX-2) und das ubiquitäre RNA-Bindeprotein (RBP) *human Antigen R* (HuR). Die Schlüsselrolle beider Genprodukte bei der Kolonkarzinogenese ist durch zahlreiche Studien der letzten Dekade ausdrücklich belegt worden. Cyclooxygenasen, COX-1 und COX-2, sind wichtige regulatorische Enzyme, die die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) katalysieren, den Schlüsselschritt in der Biosynthese von Prostanoiden. Das PGH₂ wird anschließend in eine Vielzahl von Eicosanoiden umgewandelt, einschließlich PGE₂, PGD₂, PGF₂ α , PGI₂ und Thromboxan A₂ [als Übersichtsartikel siehe DuBois et al., 1998] welche wiederum zahlreiche physiologische Schlüsselfunktionen wie z.B. Regulation des Gefäßtonus (PGE₂, PGF₂ α), Thrombozytenaggregation (Thromboxan), Schmerz und Entzündung (PGE₂) sowie z.B. Uteruskontraktion (PGF₂ α) ausüben. Außerdem sind Prostaglandine bei verschiedenen Reproduktionsprozessen wie z.B. Blastozystenimplantation beteiligt. Während COX-1

in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert wird, ist die COX-2 in den meisten Geweben nicht nachweisbar, sondern bedarf einer transkriptionellen Induktion durch externe Stimuli wie z.B. bakterielle Endotoxine (z.B. Lipopolysaccharide, LPS), Zytokine, Tumorpromotoren und Mitogene [Mitchell et al., 1999]. Die übermäßige COX-2-Expression hat signifikante gewebespezifische Konsequenzen und ist mit entzündlichen Erkrankungen oder in manchen Fällen sogar mit der Entstehung von Krebs assoziiert [Williams et al., 1999; Sinicrope et al., 2004]. Diese Tatsache macht COX-2 zu einer wichtigen Zielscheibe für die pharmakologischen Interventionen, was sich besonders deutlich an der erfolgreichen Etablierung des COX-Hemmstoffes Acetylsalicylsäure (Aspirin) zeigt, welches seit über einem Jahrhundert zur Behandlung von Schmerzen und Fieber angewendet wird. Erhöhte Prostaglandinspiegel können sowohl bei Patienten mit akuter als auch chronischer Darmentzündung nachgewiesen werden [Wang et al., 2005]. Ein chronischer Entzündungsprozess wirkt ähnlich wie ein klassischer Tumorpromotor unabhängig von der jeweiligen Gewebeart. In der Tat haben Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Kolorektalkarzinomen [Itzkowitz et al., 2004]. Ein kausaler Zusammenhang der COX-2 in der epithelialen Tumorgenese konnte anhand von verschiedenen genetisch manipulierten Tiermodellen sowohl im Kolon als auch in einigen anderen epithelialen Tumoren wie z.B. Brustkrebs [Ristimäki et al., 2002; Half et al., 2002], Pankreas [Molina et al., 1999; Tucker et al., 1999], Ösophagus [Lord et al., 1999; Shamma et al., 2000], Magen [van Rees, 2002; Yamagata et al., 2002] und Lunge [Wolff et al., 1998] belegt werden. Diese Studien haben gezeigt, dass die COX-2 neben Entzündungsprozessen u.a. an der Regulation von Proliferation, Apoptose, Angiogenese und Zellinvasion beteiligt ist und somit die Tumorgenese multifunktionell fördern kann [als Übersichtsartikel siehe Smith et al., 2000; Sinicrope et al., 2004].

1.2.2 Möglicher therapeutischer Nutzen von COX-2 Inhibitoren bei der Kolonkarzinogenese

In 80-90% der kolorektalen Adenokarzinome wird eine starke Expression von COX-2 beschrieben [Yazawa et al., 2005]. Die Abb. 3 zeigt Unterschiede in der COX-2-Expression im normalen Epithel, Adenom und Adenokarzinom mit Hilfe der

Immunhistochemie. Wie bereits zuvor erwähnt, bewirkt eine erhöhte COX-2-Aktivität eine vermehrte Synthese von Prostaglandin E₂, das u.a. Steigerung der Proliferation sowie durch Stimulation der Angiogenese und Migration und gleichzeitige Hemmung von Apoptose von Epithelzellen das Fortschreiten der Kolonkarzinogenese fördert [Oshima et al., 1996; Moreira and Castells, 2011]. Vor diesem Hintergrund könnten spezifische COX-2-Inhibitoren nicht nur zur Behandlung von chronischen Entzündungen sondern auch zur Therapie kolorektaler Karzinome Einsatz finden. In älteren Studien mit nichtselektiven COX-Inhibitoren konnte eine signifikante Abnahme der Mortalität und -Inzidenz des KKR [Baron et al., 2000; Thun et al., 1991] sowie eine Verkleinerung der Polypen bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis [Giardiello et al., 1993] nachgewiesen werden. Die durch COX-1 Hemmung hervorgerufenen gastrointestinalen Nebenwirkungen wie gastrale Ulzerationen und Blutungen sowie eine gesteigerte Thrombozytenaggregation sind jedoch als sehr nachteilig zu bewerten und können mittlerweile durch den Einsatz von COX-2 selektiven Inhibitoren ersetzt werden. So zeigt sich der Einsatz des spezifischen COX-2-Inhibitors Celecoxib in ersten tierexperimentellen Studien im Vergleich zu konventionellen NSAIDs als deutlich potentere Strategie zur Vermeidung der Kolonkarzinogenese [Kawamori et al., 1998]. Da COX-2 nachweislich auch bei anderen Tumorarten wie z.B. Magen- und Brustkrebs eine kausale Rolle spielt, könnte der Einsatz von spezifischen COX-2-Hemmern auch bei diesen Krebsarten von therapeutischem Nutzen sein [Parrett et al., 1997; Ristimäki et al., 1997]. Unter der Berücksichtigung, dass der COX-2 auch viele physiologisch wichtige Funktionen zugeschrieben werden (z.B. Aufrechterhaltung der GFR, Follikelreifung, epitheliale Wundheilungsprozesse) wird allerdings von einem rein prophylaktischen Einsatz der COX-2 Inhibitoren abgeraten [Mizuno et al., 1997; Schmassmann et al., 1998].

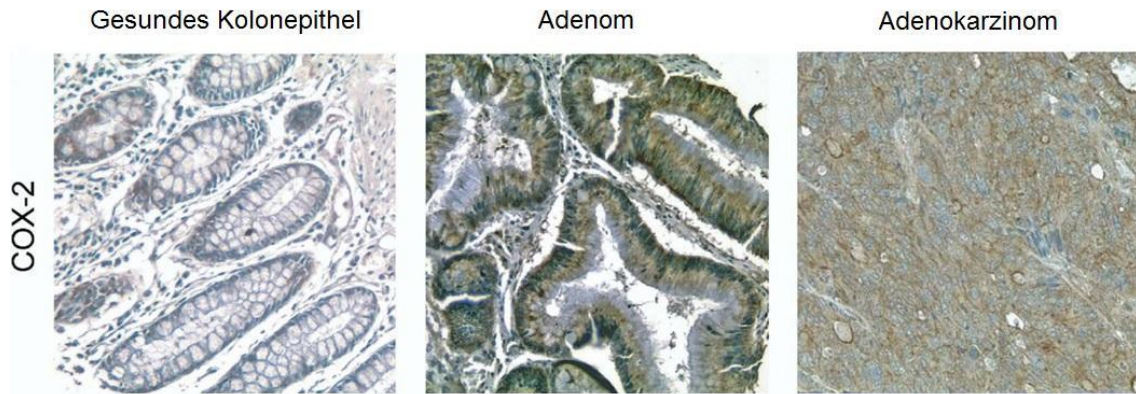


Abb. 3: Immunhistochemischer Nachweis der COX-2-Expression im Kolongewebe. Repräsentative serielle Schnitte aus Gewebeproben des normalen Kolonepithels (links), des tubulären Adenoms (Mitte) und des Adenokarzinoms (Stadium T3; rechts) wurden auf COX-2-Expression untersucht. Im normalen Epithel ist die COX-2-Expression negativ, im Adenom und Adenokarzinom jedoch deutlich erhöht. Originalvergrößerung, 200 ×. Modifiziert nach Young et al., 2009

1.2.3 Störungen in der transkriptionellen, epigenetischen und posttranskriptionellen Regulation der COX-2 und deren Bedeutung für die Kolonkarzinogenese

Die Expression von COX-2 wird neben der transkriptionellen auch auf der posttranskriptionellen Ebene reguliert. Beide Regulationsmechanismen beinhalten eine Reihe von verschiedenen übergeordneten Signaltransduktionswegen. In humanen Kolonkarzinomzellen scheint die Transkriptionsregulation die entscheidende Rolle bei der Kontrolle der COX-2-Expression zu spielen [Shao et al., 2000]. Die Transkription der COX-2 erfolgt relativ schnell und meistens nur transient und wird, wie bereits zuvor beschrieben, durch ein breites Spektrum von extrazellulären Stimuli, einschließlich Pathogene, Zytokine, Stickoxid, Bestrahlung, Wachstumsfaktoren und verschiedenen extrazellulären Liganden induziert [zur Übersicht siehe Harper et al., 2008]. Der humane COX-2 Promotor enthält Bindungsstellen für zahlreiche regulatorische Transkriptionsfaktoren, darunter jeweils 2 Bindestellen für *nuclear factor κB* (NF-κB) und das *activated protein 1* (AP-1), sowie *cAMP-Response-Elements* (CREs) [Appleby et al., 1994]. Für die transkriptionelle Induktion von COX-2 durch inflammatorische Zytokine ist insbesondere die Stimulation der *mitogen activated Proteinkinase* (MAP Kinase) p38 und nachfolgende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB von

kausaler Bedeutung [Duque et al., 2006; Guan et al., 1998]. Die Bedeutung NF- κ B-induzierter Transkription für die COX-2 Induktion ist darüber hinaus auch durch die therapeutisch etablierte Wirksamkeit der Glukokortikoide bei der antirheumatisch wirksamen COX-2-Hemmung belegt [Joshi et Dhaneshwar, 2014]. Neben der p38 MAPK spielt auch die Aktivierung der Proteinkinase C für die Induktion der COX-2-Transkription z.B. durch Dihydroxy-Gallensäuren eine wichtige Rolle [Zhang et al., 1998]. Weitere COX-2 Induktoren erfordern die Aktivierung anderer Kinaseketten wie z.B. die Ras/Rac1/MEKK1/Jun-N-terminale Kinase oder der Ras/Raf-1/ERK-Signaltransduktionsweg [Xie et al., 1996]. Die transkriptionelle Regulierung von COX-2 kann zusätzlich durch epigenetische Veränderungen insbesondere durch Chromatin-Remodeling beeinflusst werden, welche z.B. durch Änderungen des Azetylierungsstatus von Histonen und Nicht-Histonen hervorgerufen werden. Zum Beispiel wurde festgestellt, dass die Hochregulation des Transkription-Koaktivators p300 sowie einer *Histon Acetyl Transferase* (HAT) eine zentrale Rolle bei der transkriptionellen Aktivierung von COX-2 durch Acetylierung einzelner NF- κ B-Komponenten spielen kann [Deng et al., 2003]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass pharmakologische Hemmstoffe der *Histon-Deacetylase* (HDAC) wie z.B. Vorinostat oder Entinostat die c-Jun-vermittelte Induktion der COX-2-Expression in Krebszelllinien unterdrücken [Yamaguchi et al., 2005]. Des Weiteren enthält der COX-2-Promotor zahlreiche Cytosin-Guanin-reiche (CpG)- Inseln, welche durch einen erhöhten Methylierungsgrad (sogenannte *Hypermethylierung*) zur Hemmung der Transkription der entsprechenden Gens führen [Song et al., 2001]. Somit kann die Expression von COX-2 sowohl durch Histonmodifizierungen als auch durch Veränderung des Methylierungsstatus kontrolliert werden. Erkenntnisse über eine posttranskriptionelle Regulation von COX-2 beziehen sich hauptsächlich auf die über eine 3'-untranslatierte Region (UTR) vermittelte Veränderung der mRNA-Stabilität [als Review siehe z.B. Eberhardt et al., 2007]. Der gerichtete Abbau von mRNA ist für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase von zentraler Bedeutung und ist gleichzeitig durch viele Erkrankungen belegt, deren Ätiologie in enger Korrelation mit einer erhöhten Stabilisierung bestimmter mRNAs korreliert. So spielt die erhöhte mRNA-Stabilität der induzierbaren Cyclooxygenase (COX-2) beispielsweise neben chronisch entzündlichen Darmerkrankungen auch eine kausale Rolle bei der Kolonkarzinogenese [Dixon et al.,

2001; Denkert et al., 2006]. Die Stabilität der COX-2 mRNA wie die vieler anderer entzündungs- und tumorrelevanter Faktoren wie z.B. VEGF, GM-CSF, TGF- β , Cyclin A, B1 und D, c-fos, c-myc, p53, bcl-2, induzierbare NO Synthase, TNF α , Interleukin-6 und -8, Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9), Urokinase Plasminogenaktivator (uPA), sowie Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI)-1 und -2 wird über Adenylat/Uridylat (AU) und U-reichen Elemente (AREs) innerhalb der 3'-UTR der mRNAs vermittelt [zur Übersicht siehe Lopez de Silanes et al., 2005; Eberhardt et al., 2007]. Die 3'-UTR von COX-2 enthält zahlreiche Kopien von AREs, welche als klassische *cis*-regulatorische Elemente die Halbwertszeit der COX-2-mRNA maßgeblich regulieren, da sie den ARE-abhängigen exosomalen Abbau von mRNA vermitteln. Interessanterweise können diese Sequenzen neben der mRNA-Stabilität auch die Translationseffizienz des betreffenden Gens beeinflussen, was letztendlich auch von der aktuellen Besetzung der jeweiligen AREs mit spezifischen RNA-Bindeproteinen einschließlich der Translationsfaktoren abhängt. Dixon et al. berichteten darüber, dass die Translation der COX-2 mRNA in Abhängigkeit von konservierten AREs innerhalb der 3' UTR gehemmt wird. Weiterhin können externe Signale sowohl die Transkription von COX-2 als auch deren mRNA-Stabilität beeinflussen. Beispiel hierfür sind mitogene Inhibitoren wie Taxane, welche die COX-2-Transkription über eine PKC-p38-MAPK-vermittelte Signalkaskade modulieren und gleichzeitig die Stabilität von COX-2 mRNA durch Bindung des RBP HuR erhöhen [Subbaramaiah et al., 2003]. Als weitere prominente Induktoren der COX-2 mRNA-Stabilität sind Zytokine wie Interleukin-1 α und β sowie TNF α [Ristimaki et al., 1994], das onkogene *Ras protein* [Sheng et al., 2000] zu erwähnen, wobei ihre Wirkung auf die COX-2 Expression hauptsächlich über AREs vermittelt wird. Des Weiteren wird die COX-2 Expression unter gewissen Bedingungen maßgeblich durch die Geschwindigkeit der Neusynthese bzw. durch den proteasomalen von Ubiquitin abhängigen Abbau reguliert. Der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg ist der Hauptmechanismus, der für den Umsatz von vielen kurzlebigen Proteinen in eukaryotischen Zellen verantwortlich ist [als Review siehe Haas et al., 1997]. So wird z.B. der Umsatz von zellulären Regulationsproteinen, einschließlich vieler Zellzyklusproteine, Transkriptionsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren durch Ubiquitin-Proteasom-vermittelten Abbau engmaschig kontrolliert [Rolfe et al., 1997].

1.2.4. Posttranskriptionelle Regulation von COX-2 durch die mRNA-Bindeproteine TTP1 und HuR

Wie bereits erwähnt, wird die Expression der humanen COX-2 in vielen Zellen maßgeblich durch posttranskriptionelle Mechanismen, insbesondere durch Veränderung der mRNA-Stabilität kontrolliert [Dixon, 2000]. Die erhöhte Expression von COX-2 wird mit der erhöhten Bindung von RBPs an die bereits erwähnten AREs in 3'UTR des COX-Gens in eine enge funktionelle Korrelation gebracht [Lasa et al., 2000]. Diese AREs entfalten ihre regulatorische Funktion durch Anlagerung von z.T. miteinander konkurrierenden RBPs. Prominente Beispiele hierfür sind die RBPs HuR und Tristetraprolin (TTP), welche die Stabilität von COX-2 mRNA auf entgegengesetzte Weise kontrollieren. HuR ist ein ubiquitär exprimiertes Mitglied der ELAV-Genfamilie von RBPs, mit einer ausschließlich mRNA-stabilisierender Wirkung. In zahlreichen Tumoren korrelieren die erhöhten COX-2 Spiegel mit einer erhöhten HuR Expression [Nabors et al., 2001; Dixon et al., 2001; Shi et al., 2003]. Im Gegensatz zu den Wirkungen von HuR ist TTP als Mitglied einer kleinen Familie von Tandem-Cys-3-His-Zinkfingerproteinen ein RBP, dessen Bindung an ARE-haltige mRNAs deren schnellen exosomalen Abbau bewirkt [Lai et al., 2000; Hau et al., 2007]. Im Unterschied zu HuR gilt die Reduktion der TTP Expression als wichtige Ursache für die Überexpression von bestimmten tumorassoziierten Genen wie z.B. COX-2. Die tumorassoziierte Reduktion von TTP ist deshalb von herausragender Bedeutung, weil sie in vielen Fällen mit einer erhöhtem HuR Expression assoziiert ist und damit zur erhöhten posttranskriptionellen Expression von COX-2 maßgeblich beiträgt. Daher ist es naheliegend, dass sowohl der Verlust an TTP-Funktion als auch die Zunahme von HuR für die tumorassoziierte Dysregulation der COX-2 verantwortlich ist. Aus diesem Grund werden niedrige TTP-Spiegeln neben erhöhten COX-2 und HuR-Spiegeln als potentielle negative prognostische Faktoren beim Kolonkarzinom diskutiert [Young et al., 2009].

1.3 HuR als ubiquitärer Faktor der posttranskriptionellen Genregulation

1.3.1 HuR: ein zentraler Regulator der RNA Reifung

Das humane RBP HuR (synonym auch: HuA) wird in nahezu allen Zellen des Organismus konstitutiv exprimiert und ist im gesamten Tierreich hoch konserviert (Yao et al., 1993). HuR wurde zunächst in der Taufliege *Drosophila melanogaster* als Mitglied der *embryonal lethal abnormal vision* (ELAV)-Familie identifiziert, die bei der embryonalen Entwicklung sowie bei der Differenzierung des Nervensystems eine zentrale Rolle spielt [King et al., 1994; Ma et al., 1996; Myer et al., 1997]. Während die übrigen Mitglieder dieser Genfamilie (HuB, HuC und HuD) ausschließlich in neuronalen Zellen zu finden sind und mit neuronaler Entwicklung, neuronaler Plastizität und Gedächtnis in Verbindung gebracht werden [Hinman et al., 2008; Pascale et al., 2008], zeigt HuR eine ubiquitäre Expression [Robinow et al., 1998]. Kloniert wurde HuR, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa, 1996 [Ma et al., 1996] und wenig später konnte das für HuR kodierende Gen auf Chromosom 19p13.2 lokalisiert werden [Ma et al., 1997]. Seit seiner Entdeckung vor mehr als 20 Jahren sind Dutzende von tatsächlichen und potentiellen Zielgenen des HuRs identifiziert worden, wobei viele dieser Genprodukte nachweislich mit bestimmten Erkrankungen in kausale Verbindung gebracht werden konnten [als Review siehe: Srikantan und Gorospe, 2012], was im Folgenden noch detaillierter beschrieben wird (siehe Abschnitt 1.3.3). Neben den ursprünglich dem HuR zugeschriebenen Funktionen beim mRNA-Splicing und bei der Stabilisierung von mRNA sind mittlerweile andere von HuR kontrollierten mRNA Reifungsprozesse beschrieben worden. Hierzu gehört u.a. der intrazelluläre Transport, die Editierung, die Lagerung in bestimmten Kompartimenten sowie die Translation von mRNAs [Orphanides et al., 2002; Mitchell et al., 2000]. Sämtliche Hu Proteine haben eine charakteristische Struktur, die aus drei hoch konservierten RNA Bindedomänen („RNA recognition motifs, RRMs“) sowie einer Verbindungsdomäne („Hinge“ Domäne) zwischen RRM2 und RRM3 besteht. Die spezifische Bindung von HuR an *cis*-regulatorische Elemente, die sich im Übrigen meistens innerhalb der 3'-UTR und seltener in der 5'-UTR der mRNA befinden, ist eine wichtige Voraussetzung für die HuR-vermittelte Regulation der mRNA-Stabilität und -translation [Valencia-Sanchez et

al., 2006]. Über eine spezifische Bindung an (AREs) der mRNA kann HuR neben der Stabilisierung auch die Translation einiger mRNAs steigern [Kim und Gorospe, 2008; Mazan-Mamczarz et al., 2008]. Interessanterweise kann HuR die Translation nicht nur fördern, sondern in einigen Fällen auch hemmen [Abdelmohsen et al., 2008]. Prominente Beispiele für mRNAs, deren Translation in negativer Weise von HuR beeinflusst wird, sind das den Zellzyklus regulierende Protein p27 [Kullmann et al., 2002] und der Rezeptor für den Insulin Wachstumsfaktor (IGF-IR) [Meng et al., 2005]. Im Einklang mit seiner vorwiegend nuklearen Präsenz und seiner ursprünglich identifizierten Funktion, kann HuR an viele unreifen Prä-mRNAs binden und somit deren Spleißen beeinflussen, wie neuere Hochdurchsatz-Studien mittels PAR-CLIP (photoaktivierbare Ribonukleosid-verstärkte Vernetzung und Immunpräzipitation) gezeigt haben [Mukherjee et al., 2011].

1.3.2 Bedeutung von HuR bei der Tumorigenese

Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Expression von HuR neben anderen RBPs bei der chronischen Entzündung [als Review s. Khabar et al., 2010] sowie bei verschiedenen Krebserkrankungen wie z.B. Brust-, Lungen-, Eierstock- und Darmkrebs gestört [Dalmau et al., 1992]. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei häufigen Krebsarten, insbesondere bei Darmkrebs, die ungünstige Überlebensprognose der Tumorpatienten mit einem erhöhten zytosolischen HuR Gehalt korreliert [Mazan-Mamczarz et al., 2008]. Der erhöhte zytosolische HuR Gehalt korreliert wiederum häufig mit einer erhöhten mRNA-Stabilität bei der Kolonkarzinogenese [Yao et al., 1993]. Dementsprechend konnten erhöhte zytosolische HuR-Spiegel in verschiedenen Tumoren wie z.B. Hirn-, Brust-, Ovarial-, Pankreas-, Prostata-, Larynx-, Lungen- und Kolontumoren nachgewiesen werden [Nabors et al., 2001; Denkert et al., 2004; Heinonen et al., 2005; Erkinheimo TL et al., 2003; Costantino et al., 2009; Niesporek et al., 2008; Cho et al., 2007; Wang et al., 2009; Dixon et al., 2001; Denkert et al., 2006; Lim SJ et al., 2009]. Dementsprechend deuten klinische Daten darauf hin, dass eine Überexpression von HuR signifikant mit einer schlechten Prognose der Krebspatienten korreliert, was erklärt, weshalb HuR in der Fachliteratur als möglicher negativer Prognosefaktor diskutiert wird [Young et al., 2009]. Entgegen diesen Befunden scheint HuR bei Brustkrebs auch eine protektive Rolle zu spielen [Gubin et al., 2010]. So wird

die Herunterregulation von HuR in humanen Brustkrebszellen als ein bislang unbekannter Mechanismus für eine Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Doxorubicin postuliert [Lattore et al., 2012].

1.3.3 Tumorrelevante Zielgene

Die zentrale Rolle von HuR bei Entzündung und Krebs kann anhand der Vielzahl der von HuR regulierten Zielgenen und deren Schlüsselrolle bei wichtigen Zellfunktionen erklärt werden. Neben der o.g. beschriebenen COX-2 befinden sich unter den von HuR kontrollierten Genprodukten Proteine, die nicht nur für die Entzündung, sondern beispielsweise auch für die Regulation der Zellproliferation, Angiogenese, Zellmigration, Apoptose/Anti-Apoptose sowie Differenzierung und intrazelluläre Signalübertragung von zentraler Bedeutung sind (s. Tabelle 1).

Beispiele für HuR- Zielgene	Literaturangabe
Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren	
COX-2	<i>Dixon 2003; Erkinheimo et al., 2003</i>
TNF-alpha	<i>Dean et al., 2001;</i>
EGF	<i>Sheflin et al., 2004</i>
VEGF	<i>Levy et al., 1998; Kurosu et al., 2011</i>
GM-CSF	<i>Wang et al., 2000</i>
IL-17	<i>Chen J et al., 2013</i>
TGF-β	<i>Nabors et al., 2001</i>
IGF-IR	<i>Meng et al., 2005</i>
HIF-1α	<i>Sheflin et al., 2004</i>
Zellzyklusregulatoren, Tumorsuppressorgene, Protoonkogene	
Cyclin A2 und B1	<i>Wang et al., 2000</i>
Cyclin D1	<i>Lal et al., 2004</i>
c-myc	<i>Kim et al., 2009; Lafon et al., 1998</i>
p21	<i>Lafarga V et al., 2009; Wang et al., 2000</i>
c-fos	<i>Kakuguchi et al., 2010</i>
Extrazelluläre Matrixproteine und Zellmigrationsfaktoren	
MMP-9	<i>Akool et al., 2003; Huwiler et al., 2003</i>
uPA, uPAR	<i>Tran et al., 2003</i>
Snail	<i>Dong R et al., 2007</i>
Apoptose-/Anti-Apoptoseregulatoren	
p53	<i>Mazan-Mamczarz et al., 2003</i>
Bcl-2	<i>Abdelmohsen et al., 2007; Ishimaru et al., 2009</i>
SIRT1	<i>Abdelmohsen et al., 2007</i>
Mdm2	<i>Ghosh et al., 2009</i>
p27	<i>Kullmann et al., 2002</i>

Prothymosin- α	<i>Lal et al., 2005</i>
Caspase-2	<i>Winkler et al., 2014</i>
XIAP	<i>Zhang et al., 2009</i>
Survivin	<i>Donahue et al., 2011</i>
Andere Zielgene	
Casein	<i>Nagaoka et al., 2006</i>
β -Catenin	<i>Lopez de Silanes et al., 2003</i>
Initiationsfaktor eIF4E	<i>Topisirovic et al., 2009</i>
Cytochrom c	<i>Kawai, et al., 2006</i>
Myogenin und MyoD	<i>Figuroa et al., 2003</i>

Tabelle 1: Prominente Zielgene von HuR.

Nahezu sämtliche der in Tabelle 1 aufgeführten Transkripte besitzen ein oder mehrere AREs. In den meisten Fällen führt die Überexpression der zumeist kurzlebigen mRNAs zu einer pathophysiologischen Verlängerung der vom jeweiligen Gen kontrollierten Zellantwort wie z.B. Entzündung, Proliferation, Angiogenese, und ist somit direkt an das Einsetzen und die Dauer des Krankheitsprozesses gekoppelt. Beispielsweise kann die Expression des epidermalen Wachstumsfaktors und des Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktors (GM-CSF) über die mRNA-Stabilisierung durch HuR hochreguliert werden, was eine Stimulation der von externen Wachstumssignalen unabhängigen Zellproliferation unterstützt [Sheflin et al., 2004; Esnault et al., 2003]. Zusätzlich können mithilfe von HuR wachstumshemmende Signale und replikative Alterungssignale umgangen werden, indem die Expression von proliferativen und protoonkogenen Faktoren wie z.B. Myc, Fos, Cyclin A2, Cyclin B1 und Cyclin D1 über mRNA-Stabilisierung gesteigert wird [Lal et al., 2004; Wang et al., 2000 und 2001].

Über die posttranskriptionelle Regulation von zentralen Matrix-abbauenden Proteasen wie Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9), Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und Metastase-assoziiertes Protein-1 (MTA1) kann HuR sowohl die Invasion als auch Metastasierung von Tumorzellen fördern [Tran et al., 2003; López de Silanes et al., 2004]. Eine erniedrigte Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli kann in vielen Tumorzellen auf gesteigerte HuR-Spiegel zurückgeführt werden. HuR vermittelt seine antiapoptotischen Funktionen entweder über Stabilisierung und/oder durch Translationssteigerung von wichtigen antiapoptotischen Effektorproteinen wie z.B. Bcl-2, Prothymosin α (ProT α), XIAP, Survivin oder SIRT1, welches letzteres die Aktivität

des Tumorsuppressors p53 hemmt [Abdelmohsen et al., 2007; Lal et al., 2005; Zhang et al., 2009; Donahue et al., 2011]. Umgekehrt kann HuR auch die Translation von proapoptotischen Faktoren wie z.B. p27 und Caspase-2 hemmen [Kullmann et al., 2002; Winkler et al., 2014]. Übereinstimmend hierzu zeigen Studien mit induzierbaren HuR knock-out Mäusen eine erhöhte Apoptoserate insbesondere in den Epithelzellen [Ghosh et al., 2009]. Durch Stabilisierung von HIF-1 α und VEGF mRNAs fördert HuR zusätzlich Angiogeneseprozesse und trägt damit zur Sicherstellung des Sauerstoff- und Nährstoffbedarfs des Tumors entscheidend bei [Sheflin et al., 2004; Levy et al., 1998; Vogelstein et al., 2004]. Schließlich können sich Tumorzellen dank einer HuR-induzierten Expression von immunsuppressiven Zytokinen wie TGF- β und der T-Zell-Inhibitor Galectin einem Angriff des Immunsystems entziehen [Hemminki et al., 1998, Nabors et al., 2001] (s. Abbildung 4).

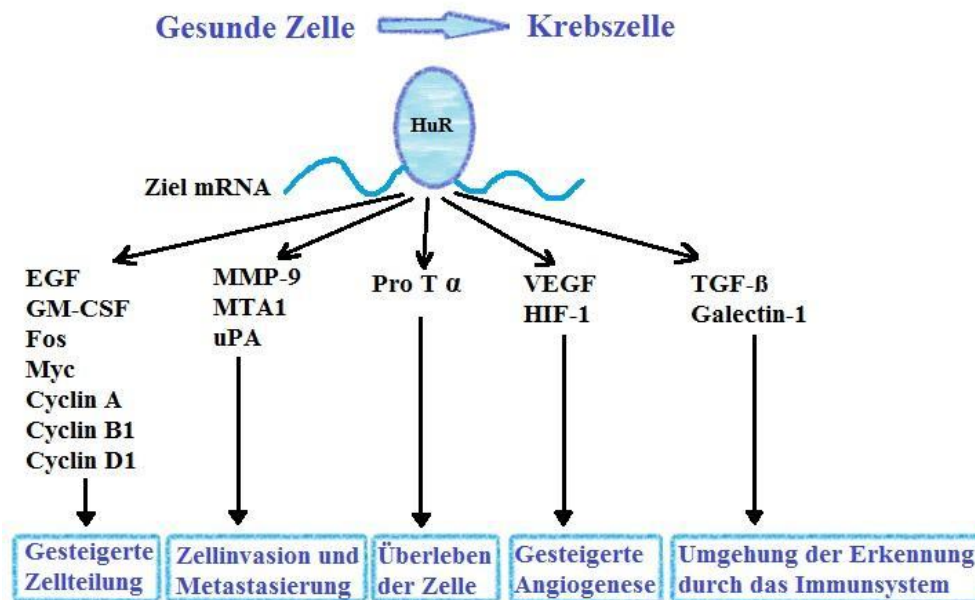


Abbildung 4. Schematische Darstellung verschiedener Untergruppen von Transkripten (schwarz), die als „Zielgene des HuRs“ identifiziert wurden.

Eine erhöhte Expression dieser Zielgene beeinflusst den entsprechenden dargestellten Phänotyp von Krebszellen (modifiziert nach López de Silanes et al., 2005).

Wie bereits oben erwähnt, korrelieren erhöhte zytoplasmatische HuR-Spiegel häufig mit einem tumorigenen Phänotyp (geringes Überleben bei Patienten, Tumorgöße, höheres Invasionspotential). Dies wird u.a. auch damit erklärt, dass viele der oben beschriebenen Zellantworten durch eine HuR vermittelte mRNA-Stabilisierung und/oder

Translationsveränderung nahezu ausschließlich im Zytoplasma kontrolliert werden [Denkert et al., 2006; Atasoy et al., 1998; Wang et al., 1998; Kullmann et al., 2002; Figueroa et al., 2003].

1.3.4 Regulationsebenen von HuR

Untersuchungen der beiden letzten Dekaden haben deutlich gemacht, dass die subzelluläre Lokalisation von HuR einen wesentlichen Aspekt seiner Regulation darstellt [Keene et al., 1999; Abdelmohsen et al., 2007; Doller et al., 2008]. Des Weiteren wird die posttranskriptionelle Genregulation durch HuR maßgeblich durch Veränderung der RNA-Bindeaffinität an Ziel-mRNAs beeinflusst. Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass die verminderte, miR-vermittelte Repression der HuR Expression bei einigen Tumoren eine kausale Rolle spielen kann.

1.3.4.1 Regulation der subzellulären HuR-Lokalisation

Während in den meisten unstimulierten Zellen HuR überwiegend (> 90%) im Kern lokalisiert ist, kann sein Export ins Zytoplasma durch verschiedene Stimuli drastisch gesteigert werden [Brennan et al., 2001]. Wie viele andere RBPs wird auch HuR zwischen Kern und Zytoplasma transportiert (HuR-Shuttling), was für seine mRNA-modulierende Funktionen im Zytoplasma von zentraler Bedeutung ist. So wird die pathologische Stabilitätssteigerung vieler ARE-haltigen mRNAs u.a. auf ein verstärktes HuR-Shuttling zurückgeführt [als Review siehe: Doller et al., 2008; Eberhardt et al., 2012]. Interessanterweise ist ein fehlerhaft reguliertes HuR-Shuttling hauptsächlich für pathologisch erhöhte zytosolische HuR-Spiegel verantwortlich, während genomische oder epigenetische Mechanismen eine eher untergeordnete Rolle spielen. Strukturell wird der bidirektionale Transport von HuR durch die Kernmembran durch eine spezifische, sogenannte „HuR-nukleozytoplasmatische Shuttling-Domäne“ (HNS) vermittelt, welche zwischen der zweiten und der dritten RNA-Bindedomäne (*RNA recognition motifs* RRM2 und RRM3) lokalisiert ist. Weiterhin wird das nukleozytoplasmatische HuR-Shuttling über eine direkte Interaktion des HuRs mit verschiedenen Kerntransportproteinen wie Transportin-2, Importin-1 α oder

chromosome maintenance-1 (CRM1) ermöglicht [Gallouzi et al., 2001; Fan et al., 1998]. Der intrazelluläre HuR-Transport kann außerdem durch Stimulus-induzierte Interaktion mit dem Zytoskelett vermittelt werden. Darüber hinaus zeigen neuere Arbeiten, dass sowohl HuR [Cheng et al., 2013; Doller et al., 2013] als auch das neuronale HuD [Fujiwara et al., 2011] ihre gebundenen Cargo-mRNAs sowohl über Aktin/Myosin als auch Mikrotubuli-/Dynein zu spezifischen Zellkompartimenten wie Polysomen oder Stress bodies transportieren können [für Review siehe Eberhardt et al., 2016]. Dies deutet auf eine direkte Kommunikation zwischen dem Zytoskelett und den nukleären Exportproteinen hin, die möglicherweise über HuR vermittelt wird. Die Fähigkeit von HuR zum „Shuttling“ hat zu der Annahme geführt, dass HuR die mRNA bereits im Zellkern bindet und sie damit dauerhaft vor der zellulären RNA-Abbaumaschinerie schützt. Der nukleozytoplasmatische Transport von HuR wird außerdem maßgeblich durch posttranslationale Modifikationen des HuR-Proteins, insbesondere durch Kinase-vermittelte Phosphorylierung beeinflusst (s. Abschnitt 1.3.4.4) [als Review siehe Doller et al., 2008; Eberhardt et al., 2012].

1.3.4.2 Regulation der HuR-RNA Bindung

Als ein trans-wirkender Faktor kann das HuR-Protein die AREs in der untranslatierten Region der mRNA oder des Poly(A)-Schwanzes durch drei klassische RNA-Erkennungsmotive als solche identifizieren und nachfolgend binden [Srikantan and Gorospe, 2012]. HuR besitzt, wie auch die anderen Mitglieder der Hu Genfamilie, drei RNA-Bindungsdomänen (RRM). Die beiden ersten, N-terminalen Domänen RRM1 und RRM2, welche zugleich die am meisten konservierten Domänen der Hu Proteine sind, werden hauptsächlich für die Bindung an ARE-haltige RNAs benötigt. Die weniger konservierte C-terminale Domäne RRM3 scheint hingegen weniger für die RNA-Bindung, sondern vielmehr für die Assoziation des HuRs mit anderen Proteinen notwendig zu sein [Hinman et al., 2008]. Dennoch konnte auch dieser RRM3 Bindungsdomäne eine wichtige Funktion bei der RNA-Bindung zugeschrieben werden. Beispiele hierfür sind die poly(A)-RNA Bindung des HuRs sowie die von unserer Arbeitsgruppe beschriebene Rolle der RRM3 bei der PKC δ -vermittelten RNA-Bindungsaffinität an verschiedene ARE-reiche mRNAs [Doller et al., 2010]. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass eine

Deletion von RRM3 zum vollständigen Verlust der stabilisierenden Wirkung auf ARE haltige mRNAs führt [Fan and Steitz, 1998; Doller et al., 2008 und 2010]. Obwohl zahlreiche Studien eine hohe Affinität von HuR an ARE-reiche mRNAs beschreiben konnten, ist es sehr unwahrscheinlich, dass HuR seine putativen Ziel mRNAs ständig mit der gleichen Affinität bindet. In Übereinstimmung mit der zuvor beschriebenen Rolle der posttranslationalen Modifikation auf die intrazelluläre HuR-Verteilung können einige der bislang identifizierten HuR Modifizierungen auch dessen mRNA Bindung maßgeblich beeinflussen und werden in Abschnitt 1.3.3.4 detaillierter beschreiben.

1.3.4.3 Hemmung der HuR Expression durch miRNAs

Als ein weiterer wichtiger Kontrollmechanismus der posttranskriptionellen HuR-Regulation ist die microRNA (miR)-vermittelte Suppression des HuR Gehaltes zu nennen. miRs sind kurze meist 22 Nukleotide lange, nichtkodierende RNAs, die sich direkt an hochkonservierte und miR-spezifische Abschnitte, sogenannte „*seed sequences*“ der mRNA binden [Bartel, 2004] und dadurch entweder die Halbwertszeit und/oder die Translation der jeweiligen Zeile mRNA stark beeinflussen können [Bartel 2009; Fabian et al., 2010, Holams et al., 2002]. Häufig sind miR-spezifische Seed-Sequenzen innerhalb der 3'UTR der mRNA zu finden. MicroRNAs werden aus langen *primären miRNA* Transkripten (primiRNAs) synthetisiert, welche mithilfe von insbesondere Exportin 5 in das Zytoplasma exportiert werden. Dort werden primiRNAs durch Ribonuklease *Dicer* zu sogenannten „Vorläufer-Transkripten“ (pre-miRNAs) gespalten und zur 22-nt-Duplex-RNA prozessiert. Reife miRNAs bilden dann einen sog. *Ribonukleoprotein-Silencing-Complex* (RISC), der dann zur jeweiligen spezifischen mRNA rekrutiert wird [Winter et al., 2009]. Dabei können miRs sowohl die Stabilität als auch die Translation von mRNAs hemmen [Valencia-Sanchez et al., 2006]. Durch ihren meist negativen Einfluss auf das zelluläre Genexpressionsmuster spielen miRs eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase. Dementsprechend können zahlreiche pathologische Prozesse wie Entzündung, Fibrose oder Tumorigenese mit einer reduzierten Expression von bestimmten miRs in einen kausalen Zusammenhang gebracht werden [Ambros et al., 2004; Kloosterman et al., 2006; Baltimore, 2008; Stefani et al., 2008]. So konnten eine Reihe von miRNAs

identifiziert werden, die zumeist als Tumorsuppressoren (TS-miRNAs) in wenigen Fällen aber auch als Tumorpromotoren (OncomiRs) wirken können [Croce et al., 2009]. OncomiRs fördern die Oncogenese durch Hemmung von klassischen Tumorsuppressorgenen wie z.B. p53, p21 oder das proapoptotische Protein Bax. Dementsprechend scheint die Hemmung von miRs wesentlich zum tumorigenen Phänotyp beizutragen, wobei die zugrundeliegenden Ursachen der dysregulierten miR Expression bis dato nicht vollständig bekannt sind. Für HuR konnten bislang verschiedene inhibitorische miRs, darunter miR-519 [Abdelmohsen et al., 2008], miR-125a [Guo et al., 2009], miR-9 [Leucci et al., 2012], miR-16 [Xu et al., 2010] und miR-133 [Eberhardt, unveröffentlichte Ergebnisse] identifiziert werden. So kann miR-519 über eine Hemmung der Proteinsynthese von HuR das Tumorwachstum in Maus Xenograft Modellen hemmen [Abdelmohsen et al., 2010; Marasa et al., 2010]. Interessanterweise zeigen einige der oben erwähnten miRs ihre negative Wirkung über Bindung an die kodierende Region der HuR-mRNA. Entsprechend zeigen diese HuR-kontrollierenden miRs bei verschiedenen Krebsarten eine im Vergleich zu gesunden Proben eine verminderte Expression. Aus diesem Grund wird die Ergänzung eines pathologischen miR-Defizits als eine attraktive adjuvante Therapiemöglichkeit zur Behandlung einiger Tumore wie Mamma-, Prostata-, Leber-, Magen- und Darmkarzinome diskutiert mit dem Vorteil, dass sie im Gegensatz zum genetischen HuR-Knockout nicht auf einen totalen Verlust der HuR Expression abzielt. Neben der miR-vermittelten Expressionshemmung, kann der zelluläre Gehalt an HuR Protein durch Ubiquitinierung und nachfolgenden proteasomalen Abbau z.B. als Reaktion auf Hitzestress kontrolliert werden [Abdelmohsen et al., 2009]. Als ein weiterer Regulationsmechanismus der HuR Proteinexpression ist die Caspase-abhängige Spaltung von HuR zu nennen, die insbesondere für die Myogenese eine wichtige Rolle spielt [Mazroui et al., 2008].

1.3.4.4 Regulation von verschiedenen HuR Funktionen durch posttranslationale Modifikation

Wie bereits in Abschnitt 1.3.4.2 erwähnt, werden wichtige HuR Funktionen u.a. durch verschiedene posttranslationale Modifizierungen kontrolliert. Die posttranslationale Modifikation beinhaltet diverse chemische Modifikationen von Proteinen nach der

Translation, welche wesentlich zur Spezifizierung eines Proteins nach dessen Biosynthese beiträgt. Posttranslationale Modifikationen beinhalten die chemische Anlagerung verschiedener funktioneller Reste wie z.B. Acetyl-, Methyl- oder Phosphatreste an das Zielprotein. Weitere Modifikationen umfassen eine kovalente Anknüpfung eines Peptides oder gar eines Proteins wie z.B. das Interferon-stimulierte Gen 15 (ISG15) [Malakhova et al., 2003], das Ubiquitin oder das Ubiquitin-verwandte Modifikationsprotein SUMO [Wilson et al., 2001]. Interessanterweise sind für HuR die meisten der oben genannten posttranslationalen Modifikationen in der Fachliteratur beschrieben worden. Neben der Regulation eines Ubiquitin-abhängigen Abbaus von HuR nach Hitzeschock, scheint die Kinase-abhängige Phosphorylierung von HuR durch verschiedene Kinasen eine zentrale Rolle für die Kontrolle des HuRs zu spielen.

1.3.4.4a Methylierung

Die erste HuR Modifikation, die in der Literatur beschrieben wurde ist eine durch Lipopolysaccharide induzierte Arginin-Methylierung an Asp-271 durch die Coaktivator-assoziierte Arginin-Methyltransferase 1 (CARM1) [Li et al., 2002]. Da sich diese Aminosäure innerhalb der HNS-Domäne befindet, kann vermutet werden, dass die Methylierung neben der beschriebenen Stabilisierung der TNF α mRNA auch das nukleozytoplasmatische HuR-Shuttling beeinflusst. Generell scheinen posttranslationale Modifikationen des HuRs an spezifischen Aminosäuren innerhalb oder in der Nähe der HNS Region zur Änderung seiner subzellulären Lokalisation entscheidend beizutragen [Doller et al., 2008; Eberhardt et al., 2012]. Im Vergleich zur Methylierung scheint allerdings die über Kinase-abhängige HuR- Phosphorylierung eine etwas vielseitigere Rolle zu spielen.

1.3.4.4b Phosphorylierung

Eine direkte Phosphorylierung der HuR Proteins konnte bislang für wenige Proteinkinasen belegt werden. Zu diesen gehören Cyclin-abhängige Kinase 1 (Cdk1) [Kim et al., 2008], Checkpoint Kinase-2 (ChK-2) [Abdelmohsen et al., 2007], mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 [Lafarga et al., 2009] sowie Protein Kinase C

(PKC) α [Doller et al., 2007), PKC β [Amadio et al., 2010] und PKC δ [Doller et al., 2008]. Die genannten Kinasen können hierdurch entweder den Transport oder die RNA-Bindung des HuRs oder beide Funktionen gleichermaßen beeinflussen [Doller et al., 2010]. So verhindert eine Phosphorylierung an den HuR-Resten Ser-88, Ser-100 und Thr-118 (alle innerhalb von RRM1 und RRM2 lokalisiert) durch Chk2 dessen Bindung an verschiedene Ziel-mRNAs [Masuda et al., 2011; Abdelmohsen et al., 2007]. Die Bindungsaktivität von HuR wird indessen durch PKC-abhängige Phosphorylierung verstärkt. Als Beispiele können Phosphorylierungen an Ser-158 durch PKC α als Antwort auf eine ATP-Behandlung bzw. an Ser-318 durch PKC δ nach Stimulation mit Angiotensin II genannt werden [Doller et al., 2007, 2008 und 2010]. In der humanen Osteosarkom- (U2OS) sowie Kolonkarzinomzelllinie (RKO), konnte nach der Gamma-Bestrahlung eine verstärkte HuR Bindung an p21-mRNA gezeigt werden, welche mit einer p38 vermittelten Phosphorylierung von HuR an Thr-118 einhergeht [Lafarga et al., 2009]. Proteinkinase C-vermittelte Phosphorylierungen an Serin/Threonin-Resten mittels Punktmutagenese sind als wichtige posttranslationale Modifizierungen des HuRs beschrieben worden. Die Familie der Serin/Threonin-Proteinkinasen der PKC-Familie besteht aus 10 verschiedenen Isoformen [Nishizuka 1995], die im nachfolgenden Abschnitt detailliert beschrieben werden, da sie im Fokus dieser Arbeit standen.

1.4 PKC: eine multifunktionelle Familie von Serin-/Threoninkinasen

Die Mitglieder der PKC-Familie sind an Signaltransduktionen bei zahlreichen zellulären Prozessen wie z.B. Mitogenese, Zellmetabolismus, Differenzierung, Zellmotilität, Tumorpromotion und Apoptose beteiligt [Blobe et al., 1994; Liu et al., 1998; Deszo et al., 2001; Griner und Kazanietz, 2007]. PKC wurde in den 70-er Jahren zunächst als intrazellulärer Rezeptor für die Phorbolster-Tumor-Promotoren beschrieben [Kikkawa et al., 1983; Leach et al., 1983]. Die PKC-Familie umfasst 10 Mitglieder der strukturell verwandten Serin-/Threonin Kinasen mit diversen biologischen Funktionen. Diese Isoformen sind Produkte von 9 Genen, die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Dysregulationen von einzelnen PKCs werden mittlerweile mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen wie z.B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Stoffwechselstörungen und besonders auch Tumor-erkrankungen in einen kausalen

Zusammenhang gebracht. Trotz der Erkenntnis, dass insbesondere die Expression verschiedener PKC Isoenzyme in den genannten Pathologien verändert scheint, ist der konkrete Zusammenhang zwischen dieser Fehlregulation und dem Entstehungsmechanismus der entsprechenden Erkrankung nach wie vor nur unzureichend bekannt. Der Fokus der pharmazeutischen und Grundlagenforschung mit Hinblick auf PKC richtet sich nach wie vor auf deren Rolle bei der Tumorgenese und -progression.

1.4.1 PKC-Isoformen: Ca²⁺-abhängige/unabhängige DAG-Aktivierung

Bei der Signaltransduktion vieler hydrophiler Pharmaka führt die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Plasmamembran über eine Aktivierung von G-Proteinen zur Synthese von bestimmten sekundären Botenstoffen (*second messengers*). Zu den prominentesten gehören cAMP, cGMP, Diacylglycerol (DAG), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Calcium. Diese aktivieren ihrerseits nachgeschaltete Proteinkinasen, welche ihre Substrate an spezifischen Tyrosin-, Serin- oder Threoninresten phosphorylieren. Die PKC-Isoenzyme werden abhängig von ihren homologen Sequenzen und ihrem Aktivierungsmodus in drei Hauptgruppen eingeteilt: die konventionellen oder klassischen PKCs (cPKCs), darunter PKC α , PKC β I, PKC β II und PKC γ ; die neuen PKCs (nPKCs), darunter PKC δ , PKC ϵ , PKC η und PKC θ sowie die atypischen PKCs (aPKCs), von denen bislang die PKC ζ und ι (λ) identifiziert werden konnten [Ohno et Nishizuka, 2002; Steinberg, 2008]. Während PKC α , δ und ϵ im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiert sind, werden die anderen PKC Isoenzyme weitgehend zelltypspezifisch exprimiert. Weitere Unterschiede zwischen den einzelnen PKC Subtypen zeigen sich im Hinblick auf deren Aktivierungsmechanismus. Während die klassischen und neuen PKCs für ihre Aktivierung den Lipidmediator Diacylglycerol (DAG) benötigen, spielt das DAG für die Aktivierung der atypischen PKCs keine nennenswerte Rolle. Phorbolster können die Wirkung von DAG imitieren, indem sie an die C1-Domänen innerhalb der regulatorischen Region der PKCs binden. Da nur die klassischen PKCs eine C2-Domäne besitzen, ist ihre enzymatische Aktivierung strikt Calcium-abhängig. Dementsprechend können die neuen PKCs,

welche keine klassische C2 Domäne besitzen, kein Calcium binden. Atypische PKCs sind ebenfalls unempfindlich gegenüber Calcium und werden stattdessen vielmehr durch Protein-Protein-Wechselwirkungen und anschließende Phosphorylierung aktiviert (Abb. 4) [zur Übersicht s. Review: Griner und Kazanietz, 2007].

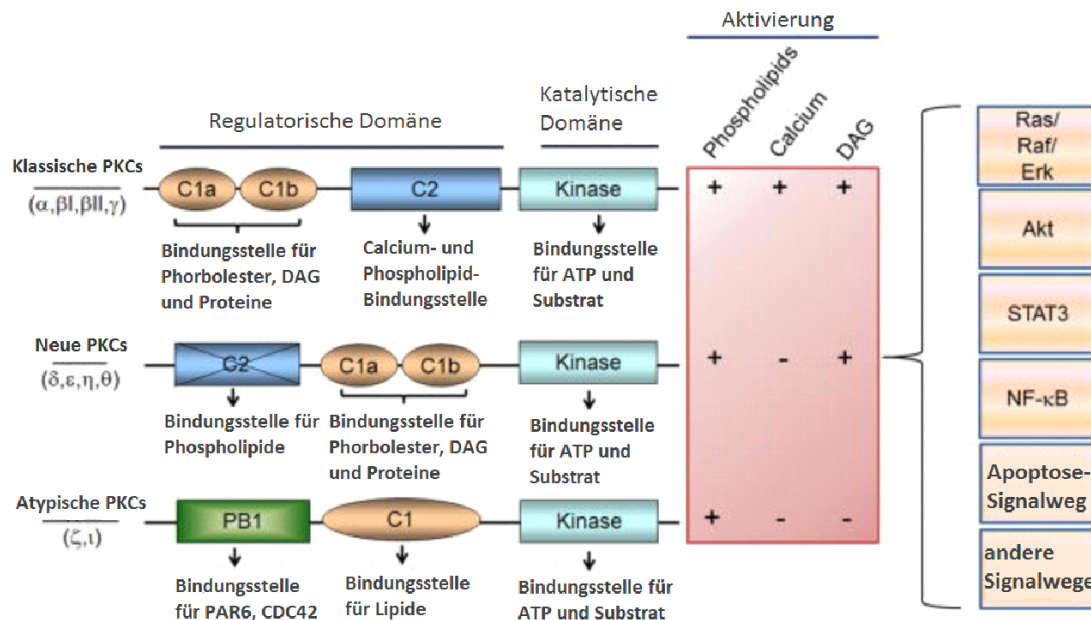


Abb. 4. Struktur von PKC-Isoenzymen.

PKCs sind Multidomänenproteine, die durch Lipide und Protein-Protein-Wechselwirkungen gesteuert werden. Diacylglycerin (DAG), das bei der Aktivierung von Rezeptoren gebildet wird, aktiviert klassische und neue PKCs und imitiert somit die Wirkung von Phorbolestern. Atypische PKCs reagieren nicht auf DAG oder Phorbolester. PKCs aktivieren eine Reihe von Signaltransduktionswegen, die die Tumorigenese und Metastasierung steuern [modifiziert nach Garg et al., 2014].

1.4.2 Mechanismen der Aktivierung und Inaktivierung von Proteinkinase C

1.4.2.1 Reifung: Transphosphorylierung und Autophosphorylierung

Es ist bekannt, dass alle Proteinkinase C (PKC) Isoenzyme einen Reifungsprozess durchlaufen, bevor sie aktiviert werden können [Newton, 2003; Parekh et al., 2000]. Die PKC-Reifung beinhaltet eine Reihe von Phosphorylierungsschritten, der erste davon tritt an der Aktivierungsschleifenstelle (*activation-loop site*) auf und wird durch Phosphoinositide-abhängige Kinase 1 (PDK1) vermittelt. Nach der PDK1-Phosphorylierung, werden die sog. *turn* und *hydrophobic* Motive der C-terminalen Domäne freigelegt, was über die Autophosphorylierung zur Stabilisierung des Enzyms

führt. Die nun reife PKC ist jetzt für die Aktivierung durch Diacylglycerol (DAG) und Calcium vorbereitet und wird ins Zytoplasma freigesetzt, wo sie durch intramolekulare Wechselwirkungen zwischen der N-terminalen Pseudosubstratregion und der Kinasedomäne in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Ein Teil der PKC-Isoenzyme kann mithilfe Protein-Protein-Wechselwirkungen an spezifische intrazelluläre Stellen translozieren.

1.4.2.2 Aktivierung

Bei der Stimulation von Rezeptoren, welche die Konzentration vom intrazellulären Calcium und DAG erhöhen, binden die klassischen PKCs durch Interaktion von Calcium mit der C2-Domäne an die Plasmamembran. Gleichzeitig vermittelt die DAG-Bindung an die C1-Domäne eine hochaffine Wechselwirkung zwischen PKC und der Membran, die zu einer massiven Konformationsänderung führt, welche die Pseudosubstratdomäne von der Substratbindungsstelle freisetzt und somit eine Substratbindung, Phosphorylierung und die Aktivierung von nachgeschalteten Signaltransduktionseffektoren erlaubt [Colon-Gonzalez et al., 2006]. Die neuen PKCs translozieren langsamer als klassische PKCs an die Membran, weil sie vorher nicht durch Calcium aktiviert werden, was jedoch durch eine erhöhte Affinität zum DAG kompensiert wird [Giorgione et al., 2006]. C1-Domänen können die PKC-Translokation zu verschiedenen intrazellulären Kompartimenten wie dem Golgi-Apparat verstärken. Das konstitutiv in den inneren Membranen gebildete DAG, kann eine Schlüsselrolle bei der PKC-Bindung an die Organellen spielen. Durch diese unterschiedliche Umverteilung der PKC Isoenzyme wird auch deren unterschiedliche Substratselektivität und Funktion erklärt [Gallegos et al., 2006; Schultz et al., 2004].

1.4.2.3 Inaktivierung: Proteolyse und Abbau

Die kurze Halbwertszeit von DAG ist vermutlich die Ursache für die Deaktivierung von aktiven PKCs. Die dauerhafte Aktivierung von PKC durch Phorbolester führt jedoch durch einen immer noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus zu ihrer Herunterregulierung. Während PKC α dephosphoryliert und durch einen Caveolae-abhängigen Mechanismus in ein endosomales Kompartiment internalisiert wird

[Prevostel et al., 2000], muss PKC δ vor dem Abbau phosphoryliert werden [Srivastava et al., 2002]. Zusätzlich wurden auch Ubiquitin-Proteasom-abhängige Abbauewege für einzelne PKC-Isoenzyme beschrieben [Lee et al., 1996; Leontieva et al., 2004; Lu et al., 1998].

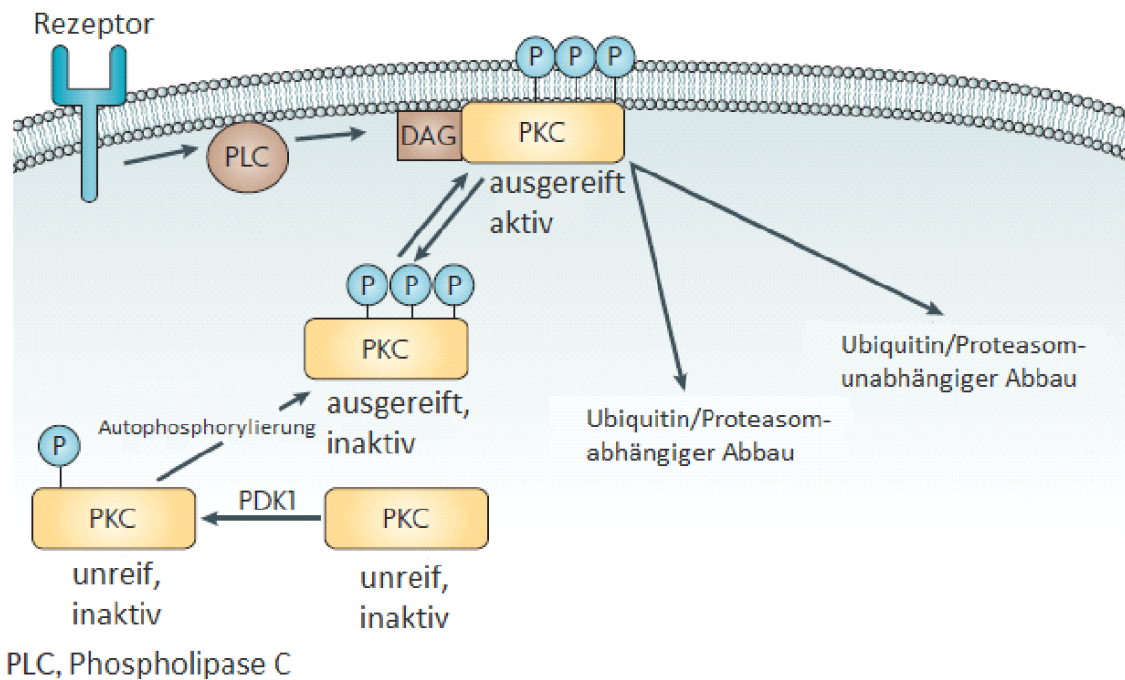


Abb. 5. Mechanismen der Aktivierung und Inaktivierung von Proteinkinase C, modifiziert nach [Griner & Kazanietz, 2007].

1.4.3 Aktivierungsmechanismen von PKC δ

Die Bindung von PKC an die Membran ist eine Voraussetzung für die Aktivierung von DAG-/Phorbol ester-abhängigen PKCs [Griner&Kazanietz, 2007]. Bis auf einige Ausnahmen wie Aktivierung durch proteolytische Spaltung [DeVries et al., 2002] werden die *c*PKCs und *n*PKCs als Reaktion auf bestimmte Stimuli wie z.B. nach Aktivierung eines Wachstumsfaktor-Rezeptors (GFR) in der Regel zur Plasmamembran rekrutiert. Der biochemische Nachweis einer induzierten Verlagerung dieser PKCs vom Zytoplasma zur Plasmamembran wird technisch auch als Hinweis für eine PKC Aktivierung herangezogen. Daneben kann aber unter bestimmten Bedingungen eine Translokation von *c*PKCs und *n*PKCs zu intrazellulären Kompartimenten wie etwa Mitochondrien, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum oder zur Kernmembran

beobachtet werden. Außerdem konnten bestimmte PKCs dauerhaft auch an den internen Membranen nachgewiesen werden [Wang et al., 2010; Jaken et al., 2000; Wang et al., 2011; Dai et al., 2011]. Da sich diese Arbeit ausschließlich mit der funktionellen Rolle der PKC δ bei der HuR-Aktivierung befasst, soll im Folgenden diese Isoform näher beschrieben werden. Die Aktivität von PKC δ kann neben Diacylglycerol und Phorbol ester, zusätzlich durch Kinase-abhängige Phosphorylierung moduliert werden. Während die Phosphorylierung der meisten PKCs an konservierten Serin-/Threonin-Resten erfolgt, wird die PKC δ insbesondere auch an Tyrosin-Resten modifiziert, so z.B. nach Einwirkung DNA-schädigender Substanzen, oxidativem Stress und anderen Noxen [Steinberg, 2008; Yoshida, 2007; Brodie et al., 1998]. Als verantwortliche Tyrosinkinase sind hierbei z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder Tyrosinkinase der Src-Familie (Src, Fyn, Lyn oder c-Abl) zu nennen [Yoshida, 2007; Okhrimenko et al., 2005; Lu et al., 2007; Lomonaco et al., 2008; Zrachia et al., 2002]. Abhängig vom Stimulus können unterschiedliche Tyrosinreste der PKC δ phosphoryliert werden und zu einer Aktivierung oder Hemmung des Enzyms führen. Dadurch kann u.a. die Lokalisation, die Spaltung durch Caspase-3 und somit letztlich auch ihre apoptotische Wirkung maßgeblich beeinflusst werden. So kann die duale Rolle der PKC δ sowohl als positiver als auch negativer Wachstumsregulator wahrscheinlich durch einen unterschiedlichen Tyrosin-Phosphorylierungsstatus der PKC δ erklärt werden [Steinberg, 2004]. Ein weiterer wichtiger Aktivierungsmechanismus der PKC's ist die Caspase-3-abhängige proteolytische Spaltung der PKC δ im Zellkern, welcher v.a. bei der Apoptose eine wichtige Rolle zukommt [Emoto et al., 1995]. Die Caspase-abhängige Spaltung von PKC δ an der Hinge Region führt zur Bildung eines ~ 40 kDa großen C-terminalen und konstitutiv aktiven Fragmentes. Hierbei spielt es keine Rolle, ob Caspase-3 durch den Rezeptor-vermittelten (extrinsischen) oder den mitochondrialen (intrinsischen) Weg aktiviert wird [Griner & Kazanietz, 2007; Basu, 2003]. Darüber hinaus können einige Noxen eine Translokation der PKC δ aus dem Zellkern zu den Mitochondrien bewirken, was zur Cytochrom C- Freisetzung und nachfolgend zur Aktivierung der Caspase-3 führt und als ein wichtiger Mechanismus der intrinsischen Apoptose gilt [Li et al., 1997; Majumder et al., 2000; Denning et al., 2002].

1.4.4 Bedeutung von PKCs bei der Karzinogenese

Die kausale Rolle einzelner PKC Isoenzyme bei der Tumorgenese wird in der Fachliteratur als sehr heterogen diskutiert und ist noch nicht vollständig aufgeklärt [als Übersichtsartikel s. Griner&Kazanietz, 2007; Garg et al., 2014; Isakov, 2018]. Obwohl zahlreiche *in vitro* Versuche nahelegen, dass eine Aktivierung der meisten PKCs zur Tumorentstehung maßgeblich beitragen kann, lassen die pathologisch veränderten Expressionsspiegel einzelner PKC Enzyme in verschiedenen humanen Tumoren keine eindeutige Rückschlüsse auf ihr malignes Potenzial zu. Ursprünglich gemachte Rückschlüsse auf eine generelle tumorigene Funktion der PKC beziehen sich v.a. auf frühe Untersuchungsergebnisse an murinen Hautkrebsmodellen, die mehrheitlich auf der Tumorpromotion nach einer topischen Applikation von Phorbolestern beruhen [La Porta et al., 1998]. Erst später konnten die funktionellen Zusammenhänge zwischen einzelnen PKCs und verschiedenen Oncogenen wie z.B. c-fos oder c-myc näher identifiziert werden [Zhang et al., 2014; Luna-Ulloa et al., 2011]. Darüber hinaus können PKCs das Überleben von Zellen über mehrere bekannte „pro survival“ Signalkaskaden unter der Beteiligung von NF- κ B-, Akt- (PKB-), und/oder von MAP Kinasen fördern [Storz et al., 2004; Tanaka et al., 2003]. Bemerkenswerterweise konnten im Gegensatz zur oben beschriebenen Rolle der PKC δ bei der Aktivierung der intrinsischen Apoptose bei vielen Tumoren wie z.B. Brust-, Lungen-, Pankreas- und Lebertumoren auch antiapoptotische Eigenschaften der PKC δ nachgewiesen werden [als Review s. Basu et al., 2010]. So kann die PKC δ vermittelte Steigerung der Zellproliferation, des verankerungsunabhängigen Zellwachstums („anchorage-independent growth“) und die Apoptoseresistenz von Brustkrebszellen v.a. durch Steigerung der Cyclin D1 Expression erklärt werden [Grossoni et al., 2007]. In Kolonkarzinomzellen kann die PKC δ sowohl durch Induktion des zytoplasmatischen Apoptose-Inhibitor Proteins-2 (cIAP2) und des FLICE-like Inhibitory Proteins (FLIP) als auch durch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Apoptose hemmen [Wang et al., 2003; Wang et al., 2006]. Während die meisten PKC Enzyme in vielen humanen Tumoren herunterreguliert sind, gibt es andernfalls auch Krebsarten wie z.B. Pankreas, Haut und Kolon, bei denen eine gesteigerte Expression von PKC δ nachgewiesen werden konnte [Pongracz et al., 1995; Mauro et al., 2010].

1.5 Fragestellung der Arbeit

Wie in der Einleitung beschrieben, vermuten wir dass die Phosphorylierung von HuR durch PKC δ primär für die erhöhte HuR Aktivität und damit verbunden für die verstärkte posttranskriptionelle Expression vieler verschiedener onkogener Faktoren in Kolonkarzinomzellen verantwortlich ist. Eigene Studien der Arbeitsgruppe mit verschiedenen PKC-inhibitorischen Strategien in humanen Mesangiumzellen haben gezeigt, dass der Angiotensin II-induzierte zytoplasmatische HuR Gehalt in diesen Zellen nach der spezifischen Hemmung der PKC δ signifikant herabgesetzt wird. Da bislang in der Literatur wenig Hinweise über molekulare Mechanismen des erhöhten HuR-Shuttlings in Krebszellen, insbesondere über die pathophysiologische Bedeutung einer über PKC abhängigen HuR-Regulation gibt, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob PKC auch bei der Stimulus-unabhängigen HuR-Aktivierung und der damit verbundenen HuR-abhängigen posttranskriptionellen Regulation von tumorrelevanten Genen in humanen Kolonkarzinomen eine kausale Rolle spielt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien:

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Eurogentec, Köln
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Roche, Mannheim
Bradford-Reagenz	Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid(DMSO)	Applichem, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt
D-MEM mit Zusätzen :	Gibco Life Technol., Karlsruhe
4,5 g/L Glukose	
GlutaMAX I - Pyruvat	
Disuccinimidyl suberate (DSS)	Thermo Fisher scientific, Schwerte
Elutionspuffer (RNA-Protein-Ko-IP)	Thermo scientific, Schwerte
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum	Gibco Life Technol., Karlsruhe
Fluoromount-G (Fluoreszenz-Eindeckmedium)	Southern Biotech (Alabama)
Glycerol	Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	Calbiochem, Schwalbach
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Ladepuffer DNA/RNA (6x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Leupeptin	Serva, Heidelberg
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Molekulargewichtsstandard (DNA)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Molekulargewichtsstandard (Protein)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumazid 0,1% Lösung	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt

Natriumfluorid (NaF)	Fluka, Seelze
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco Life Technol., Karlsruhe
NP-40 (IGEPAL CA-630)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Desoxy Nukleotid Triphosphat (dNTP)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin	Gibco Life Technol., Karlsruhe
Pepstatin A	Roche, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Mannheim
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco Life Technol., Karlsruhe
2-Propanol	Fluka, Seelze
Protein G Sepharose TM 4 Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
Random-Hexamer-Primer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Rinder-Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tween 0,1%	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
TPA, Phorbol ester, Endkonzentration 100nM	Calbiochem, Schwalbach
Transfektionsreagenz HiPerFect	Qiagen, Hilden
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma Aldrich, Taufkirchen
TRIzol-Reagenz	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Gibco Life Technol., Karlsruhe
Tween 20	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Zellkultur-Einsätze	Nunc, Wiesbaden

2.1.2 Inhibitoren für die Zellkultur

Substanz	Inhibitor von:	Konz. in der Stammlösung	Konz. im Inkubationsmedium
Rottlerin	PKC δ/ϵ (neuen, Ca ²⁺ -unabhängigen PKCs)	10 mM	10 μ M
CGP41251	PKC (Breitspektrum-Inhibitor)	10 mM	100 nM
Gö6976	PKC α/β_1 (klassischen, Ca ²⁺ -abhängigen PKCs)	100 mM	20 nM
Staurosporin	PKC (Breitspektrum-Inhibitor)	10 mM	100 nM
SB203580	p38 – MAP – Kinase	10 mM	10 μ M

PD98059	p42/p44 MAP- Kinase	10 mM	30µM
SP600125	N-Terminale Jun-Kinase	10 mM	10µM
Raf-1-Inhibitor	Raf-1 Kinase	10 mM	100nM

Tab. 2: Inhibitoren für die Zellkultur (Hersteller: Calbiochem, Schwalbach)

2.1.3 Antikörper

Anti-HuR, sc-5261	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-PKCδ, sc-937	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-PKCα (C20), sc-208	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-β-Aktin (A5441), A-2228	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Anti-Histon-Deacetylase-1 (HDAC-1), sc-6298	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Alexa Fluor 488 Ziege anti-Maus IgG	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Ziege anti-Kaninchen IgG HRP, sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ziege anti-Maus IgG HRP, sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Goat-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.1.4 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei Kolonkarzinom-Zelllinien untersucht: DLD-1 und SW-620. Diese waren käuflich bei Deutscher Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig erworben.

Zelllinie	DLD-1	SW-620
Invasivität	Tumorstadium C* (Dukes)	Tumorstadium C* (Dukes)
Art des Tumors	Kolorektales Adenokarzinom	Kolorektales Adenokarzinom
Organismus und Organ	Mensch; Dickdarm	Mensch; Dickdarm
Zellprodukte	Karziñoembryonales Antigen (CEA); Keratin; Kolon-Antigen 3	Karziñoembryonales Antigen (CEA), TNF alpha, Keratin, Matrilysin
Morphologie	Epithelial	Epithelial
Wachstums-eigenschaften	Adhärent	Adhärent

* Dukes –Stadium C entspricht einer Lymphknotenmetastasierung (ATCC-LGC,

Globales Bio-Ressourcen-Zentrum)

2.1.5 Enzyme für die Molekularbiologie:

Reverse Transkriptase Superscript II [200 U/μl]	Gibco Life Technol., Karlsruhe
BioTherm-DNA-Polymerase [5U/μl]	Genecraft, Lüdinghausen

2.1.6 Primer für PCR

iNOS:	Forward 5'-TGCAGACACGTGCGTACTCC-3'
	Reverse 5'-GGTAGCCAGCATAGCGGATG-3'
GAPDH:	Forward 5'- CACCATCTTCCAGGAGCGAG-3'
	Reverse 5'-GCAGGAGGCATTGCTGAT-3'
Cyclin A:	Forward 5'-ATTAGTTTACCTGGACCCAG-3'
	Reverse 5'-CACAAACTCTGCTACTTCTG-3'
COX II:	Forward 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'
	Reverse 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'

2.1.7 Kits

BCA-Kit für Proteinbestimmung	Pierce (Rockford, MD, USA)
ECL- Reagenz	Amersham Pharmacia, Freiburg
ECL- Reagenz «Advanced»	Amersham Pharmacia, Freiburg
PKC-Aktivitäts-Assay	Promega, Mannheim
Cytokine-Antibody-Array	Ray Biotech, Inc., Heidelberg

2.1.8 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Polyvinylidifluorid (PVDF)-Membran	Millipore, Eschborn
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Whatman Papier (3MM)	Merck, Darmstadt
Zellkulturflaschen/-schalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-Well-Platten, 12-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.9 Puffer und Lösungen

PBS/EDTA

1 mM EDTA in 1x PBS, pH 8,0

TBS-Tween (TBS-T)

0,05% Tween-20

TBE (10x)

0,89 M Tris

0,89 M Borsäure

20 mM EDTA (pH 8,2)

Towbin Puffer (zum Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran)

25 mM Tris

192 mM Glycin pH 8,3

20% Methanol/Isopropanol

Auf 1l Aqua dest. auffüllen, keine pH- Einstellung erforderlich.

Proteinextraktion

Homogenisierungspuffer für die Extraktion von zellulärem Gesamtprotein

20 mM Tris/HCl pH 8,0

137 mM NaCl

10% Glycerol (v/v)

1%(v/v) Triton X-100

5 mM EDTA pH 8,0

1 µg/ml Leupeptin*

1 mM PMSF*

*unmittelbar vor der Anwendung zugeben

Puffer A (zytosolische Proteinextrakte, hypotonischer Puffer)

Für 100ml:

10 mM HEPES pH 7,9 bei 4°C

10 mM KCl

0,1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

0.5 mM PMSF*

0,5 mM DTT*

50 mg/ml Leupeptin*

*unmittelbar vor der Anwendung zugeben

Puffer C für nukleäre Proteinextrakte

20 mM HEPES (pH 7,3)

25% Glycerol

0,4 M NaCl

1mM EDTA

1mM EGTA

0.5mM PMSF*

0,1 mM DTT*

50 mg/ml Leupeptin*

*unmittelbar vor der Anwendung zugeben

Puffer A (nach Schreiber)

10 mM HEPES pH 7,9 bei 4°C

1,5 mM MgCl₂

10 mM KCl

0,5 mM DTT*

0,5 mM PMSF*

*unmittelbar vor der Anwendung zugeben

Puffer C (nach Schreiber)

20 mM HEPES

25% Glycerol

1,2 M KCl

1,5 mM MgCl₂

0,2 mM EDTA

0,5 mM DTT*

0,5 mM PMSF*

*unmittelbar vor der Anwendung zugeben

Gelpuffer für Western Blot

Sammelgelpuffer (Upper-Tris)	Trenngelpuffer (Lower-Tris)
0,5 M Tris/Cl pH=6,8	1,5 M Tris/Cl pH=8,8

Binding/Wash (B/W)-Puffer für die RNA-Protein-Immunpräzipitation

0,14 M NaCl

0,008 M Na₃PO₄

0,002 M K₂HPO₄

0,01 M KCl

Puffer am Ende auf pH 7,4 einstellen

Elektrodenpuffer (10x PAGE, Laufpuffer für die Gelkammer)

25 mM Tris

192 mM Glycin

1% SDS

Der pH muss Werte zwischen 8,3 und 8,8 aufweisen, eine genaue pH-Einstellung ist nicht erforderlich.

Laemli-Puffer (4x)

40% Glycerin

10% SDS

125 mM Tris Cl pH 6,8

50 mM DTT

0,01% Bromphenolblau

Wachstumsmedium 1 (Zelllinie DLD-1)

D-MEM (Wachstumsmedium) 500 ml

+ 50 ml Fötale Kälberserum

5 ml Penicillin-Streptomycin 10.000U/ml

Wachstumsmedium 2 (Zelllinie SW-620)

D-MEM (Wachstumsmedium) 500 ml

+ 50 ml Fötale Kälberserum

+ 5 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml

DMEM (Hungermedium) (500 ml)

+ 1 ml BSA/PBS (1%)

+ 5 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml

2.1.10 Geräte

Begasungsbrutschrank (BBD 6220)	Heraeus, Hanau
ChemiDoc Imager	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Gene Amp PCR System Thermal Cycler (9700)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Herasafe Sterilbank	Heraeus, Hanau
Hyperprocessor (Filmentwickler)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Immunfluoreszenzmikroskop BZ-7000 (mit Objektiv Apo 20x /0,75 NA)	Biozero, Keyence, Neu-Isenburg (Zeiss, Göttingen)
Kühlzentrifuge Fresco	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Neustadt
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Orbitalschüttler	Eppendorf, Hamburg
Power supply	Bio-Rad, München
Semidry-Blot-Apparatur	Bio-Rad, München
Tischschüttler	Heidolph, Duomax 1030
Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
VersaDoc Imager	Bio-Rad, München

2.2 Methoden:

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von DLD-1/SW-620-Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen fanden in einer Reinraumbank statt. Die humanen Kolonkarzinom Zelllinien DLD-1 und SW-620 wurden in Zellkulturflaschen (175 cm²) ausgesät und im Begasungsschrank bei 37°C und 5% CO₂ mit dem jeweiligen Wachstumsmedium kultiviert.

Alle Kulturmedien wurden vor dem Kontakt mit Zellen auf 37°C erwärmt. Bei Subkonfluenz dieses Monolayers (Zelldichte ca. 90%) wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgten die Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung und die Inkubation der Zellen für fünf Minuten bei 37°C im Begasungsschrank, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturflasche ablösten. Die abgelösten Zellen wurden zunächst in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert, bei 800 Upm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10ml Medium aufgenommen (= Zellsuspension).

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer

Nach Befüllen der Neubauer-Zählkammer mit der Zellsuspension wurden unter dem Lichtmikroskop drei von vier Quadranten ausgezählt.

Berechnung zur Einstellung der Zellzahl:

Die Gesamtzahl der Zellen der 3 Quadranten (L) wird durch 3 geteilt, um den Mittelwert (M) zu ermitteln.

$M \times \text{Zählkammerfaktor (hier: } 10^5) = \text{Zellzahl/ml}$

Aus der bestimmten Zellzahl konnte anschließend die Zellsuspensionsmenge und die Menge des Mediums berechnet werden.

2.2.1.3 Passagieren der Zellen

Zum Passagieren wurden die Zellen, sobald sie konfluent waren, zunächst mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und dann mit 1 ml 0,5%-iger Trypsin-Lösung versetzt, sodass sie sich nach 2-10 Minuten vom Boden der Zellkulturflasche ablösten. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden Zellen dann in frischem Medium resuspendiert, und zentrifugiert 5 min bei 800 Upm. Ein Aliquot davon wurde zur Weiterführung der Stammkultur wieder in eine Kulturflasche ausgesät. Die restlichen Zellen wurden je nach Bedarf für Versuche in Zellkulturschalen ausgesät, eingefroren oder verworfen. Abschließend erfolgte die erneute Inkubation der Zellen bis zur Ausbildung eines subtotalen Monolayers wie oben beschrieben.

2.2.1.4 Stimulation von humanen Kolonkarzinomzellen DLD-1 und SW-620

Für die Experimente wurden 2×10^6 Zellen pro 10 cm^2 Schale ausgesät. Nach spätestens 24h wurde das Wachstumsmedium durch FCS-freies Hungermedium ersetzt. Nach weiteren 16h in Hungermedium wurden die Zellen für die angegebenen Zeitpunkte mit entsprechenden Substanzen behandelt. Dazu wurden die einzelnen Inhibitoren/TPA direkt in das die Zellen bedeckende Medium gegeben.

2.2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.2.1 Transfektion mit siRNA

siRNAs (small interfering RNAs) sind kurze doppelsträngige RNA-Moleküle, die in der Zelle sequenzspezifisch zur Degradation der entsprechenden mRNA führen. Bei der Transfektion wird eine siRNA mit Hilfe einer Transfektionsreagenz in die Zellen eingeschleust. Transiente Transfektionen wurden in 6 cm^2 -Schalen durchgeführt; pro Schale wurden dazu $1,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und mit 4 ml FCS-haltigem Medium bedeckt. Zum Ansetzen des Transfektionsgemisches wurden zunächst 10 nmol von der jeweiligen siRNA mit 15 μl HiPerFect-Transfektionsreagenz in 100 μl serumfreiem Medium verdünnt. Anschließend wurde das Gemisch für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Komplexe aus siRNA und Transfektionsreagenz ausbilden konnten. Unmittelbar danach wurde den Zellen

tropfenweise das Transfektionsgemisch zugefügt. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel auf Hungermedium. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen mit Rottlerin stimuliert. Der Erfolg der Reduktion der Genexpression und der Effekt auf die Zielgen-Expression wurden mit RT-PCR- überprüft.

PKC δ siRNA	5'- CCAGAGACUACAGCAACU-3' (Eurogentec)
Human HuR siRNA	sc-35619, Santa Cruz (Heidelberg)
Kontroll siRNA	D-001206-13-20, Dharmacon (Lafayette, USA)

Tabelle 3: Verwendete siRNA

2.2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Um bei Arbeiten mit RNA einer Kontamination mit RNAsen vorzubeugen, wurden immer Handschuhe getragen und alle benötigten Puffer und Lösungen mit DEPC-H₂O angesetzt. Zum Aufreinigen von RNA aus humanen Kolonkarzinomzellen wurden diese mit PBS gewaschen, mit 1 ml Trizol Reagenz /10 cm Schale lysiert, gründlich mit einem Zellschaber abgekratzt, mit 1 ml Pipettenspitze aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert. Unter dem Abzug wurden 0,2 ml Chloroform zugegeben, 10 sek. stark geschüttelt, 5 min. bei RT inkubiert und mit 14000 Upm bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Die obere, wässrige (farblose) Phase wurde von der unteren organischen Phase und der proteinhaltigen Interphase abgetrennt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde dann durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol, vorsichtigem Schwenken der Probe und Lagerung bei -20°C über Nacht präzipitiert. Alternativ wurden die entstandenen RNA-haltigen Lösungen bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert und auf Eis aufgetaut. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 14000 Upm wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das entstandene RNA-Präzipitat mit 500 μ l eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, für 10 min bei 4°C mit 14000 Upm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die RNA wurde für 10min bei 37°C getrocknet, bis das weiße Präzipitat farblos geworden ist. Je nach Präzipitatsgröße wurden 15-25 μ l DEPC-H₂O hinzu pipettiert und zum Lösen für 10 min bei 60°C inkubiert und zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten oder bei -80°C eingefroren. Die Qualität der isolierten

RNA wurde durch die gelelektrophoretische Auftrennung von 1 µg isolierter RNA auf einem Agarosegel (1%) bestimmt.

2.2.2.3 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Eine Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektrometrisch durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm unter der Annahme, dass eine Extinktion von 1,0 etwa einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Die Proben sollten dabei so verdünnt werden, dass die gemessenen RNA-Konzentrationen nicht höher als 1000 ng/µl liegen.

2.2.2.4 Agarose- Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion mit erwarteten Fragmentlängen größer als 100 bp wurden analytische Agarosegele verwendet. Dazu wurde die Agarose in 1%-iger Konzentration eingesetzt, als Laufpuffer diente 1x TBE. Zur Elektrophorese wurden die Proben mit 1x Puffer Loading Dye versetzt, aufgetragen und mit einer Spannung von 90 V für 20 min laufen lassen. Zur Detektion der DNA nach einer RT-PCR wurde dem Gel der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid (2,8 µl/40 ml Agarosegel) zugesetzt. Auf diese Weise konnten die einzelnen Fragmente durch Fluoreszenz mit einem Geldokumentationsgerät BioRad fotografiert werden.

2.2.2.5 Reverse-Transkriptase (RT)-Reaktion

Da die zelluläre mRNA als Ausgangsmaterial für die PCR dient, wurde sie vor der eigentlichen PCR mit Hilfe des Enzyms SuperScript II Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, wobei die einzelsträngige RNA als Matrize verwendet wurde. Hierbei wurden gen-unspezifischen Random Hexamer Primer verwendet. Um die Degradation von RNA zu vermeiden, war ein sehr sauberes, RNase-freies Arbeiten erforderlich (Verwendung von nukleasefreiem Wasser, + 0.1% DEPC). Die Gesamt-RNA wurde in autoklavierte Eppendorf-Gefäße gegeben, durch eine 10 minütige Inkubation bei 70°C denaturiert, danach sofort für 2 min auf Eis gestellt und 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert.

Protokoll der Reverse-Transkriptionsreaktion für einen Ansatz:

500 ng RNA (4 µl)

Nukleasefreies Wasser (DEPC-H₂O) 6 µl

Random-Hexamer-Primer 2 µl

10 min 70°C, dann sofort auf Eis

Dem Ansatz (12 µl) wurde dann jeweils eine RT-Mastermix (s. Tab. 4) zugegeben (Gesamtvolumen des Ansatzes: 22 µl).

RT-Vormischung	Ausgangskonzentration	Vol. für 1 Ansatz
First Strain Puffer	5 X	5 µl
dNTP Mix [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]	je 10 mM	1 µl
DTT	0,1 M	1 µl
Superscript-Polymerase (II RNase H-RT)	200 U/µl	1,0 µl
RNase inhibitor	20 U/µl	1 µl
Volumen Mastermix		9 µl
RNA-Primer-Ansatz dazugeben		12 µl

Tabelle 4: Mastermix für die RT-Reaktion

Raumtemperatur für 10 Minuten und

42°C für 50 Minuten (Reverse Transkription)

95°C für 5 Minuten (Inaktivierung des Enzyms)

4° C für 3 Minuten (mindestens)

Nach der Reaktion wurden jeweils 79 µl DEPC-H₂O in den Ansatz pipettiert und die gewonnene cDNA bis zur Verwendung in einer PCR, falls nötig, bei -20°C gelagert. Für einen PCR Ansatz wurden 10 µl (= 5 ng/µl) dieser verdünnten cDNA eingesetzt.

2.2.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Selektiv bestimmte Abschnitte der cDNA können mit dem von [Mullis et al., 1990] entwickelten Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) exponentiell amplifiziert werden. Dabei flankieren zwei Oligonukleotidprimer das zu amplifizierende DNA-Segment und binden nach einer Hitzedenaturierung an den komplementären Strängen. Die Verwendung der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, die während der Denaturierungsphase nicht zerstört wird, ermöglicht eine automatisierte Abfolge der Temperaturschritte.

Zu 10 µl (50 ng) cDNA wurde eine PCR-Reaktionsmischung (15 µl) pipettiert (vgl. Tab. 5).

PCR-Reaktionsmischung	Ausgangskonzentration	Volumen für 1x Ansatz
Reaktionspuffer Biotherm	10 x	2,5 µl
dNTP Mix [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]	je 10 mM	1,0 µl
Vorwärts-Primer (F)	10 µM	1,0 µl
Rückwärts-Primer (R)	10 µM	1,0 µl
DEPC-H ₂ O		9 µl
Biotherm DNA-Polymerase*	5 U/µl	0,5 µl
Gesamtvolumen für PCR-Mischung		15 µl
*kurz vor Schluss zugegeben		

Tabelle 5: PCR-Reaktionsmischung

Der Prototyp des Ablaufes der PCR-Reaktion war dabei wie folgt:

0. 95°C/5 min Denaturierung
1. 95°C/30 sek. (Hitze-Denaturierung der doppelsträngigen cDNA)
2. 50-55°C/1 min (Primer-Anlagerung; T°C abhängig vom GC-Gehalt der Primer)
3. 72°C/2 min (Elongation)
4. 95°C/30 sek. (Denaturierung)
5. zurück zu Schritt 2 und Wiederholung des Ablaufes für 30-31 Zyklen
6. Schritt: 10 min bei 72°C (Endelongation noch unvollständiger PCR-Produkte)
7. 4°C/∞ (Abschluss der Reaktion durch Abkühlen)

Den Zyklen wurde eine 5 minütige Denaturierungsphase bei 95°C vorangestellt, um sicherzustellen, dass die gesamte eingesetzte DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Am Ende der PCR wurde eine 10 minütige Extensionsphase bei 72°C angehängt, damit alle PCR Produkte vervollständigt werden konnten. Die Amplifikation von Zielsequenzen aus der entstandenen cDNA über PCR erfolgte in einem "GeneAmp PCR System Thermal Cycler (9700)" der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt). Anlagerungstemperatur und Zyklenzahl variierten dabei mit den eingesetzten Primer Paaren (vgl. Tab.6).

Primer	Endkonzentration	Anlagerungstemperatur	Zyklenzahl
COX-2	10 µM	55°C	30
Cyclin A	10 µM	50°C	31
GAPDH	10 µM	55°C	30
iNOS	10 µM	55°C	30

Tabelle 6: PCR-Bedingungen

10 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl Gelladepuffer versetzt, auf ein 1% Agarosegel (s. Kap. 2.2.2.4) aufgetragen und die Elektrophorese 30-40 min bei 90 V durchgeführt. Das Gel wurde anschließend mit dem Geldokumentationsgerät BioRad fotografiert und auf einem Datenträger abgespeichert.

2.2.3 Biochemische Arbeitsmethoden

2.2.3.1 Gewinnung von Proteinlysaten (Totalprotein)

Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1ml PBS/EDTA pro Zellkulturschale versetzt und die Schalen für 5 Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen wurden sorgfältig mit einem Zellschaber von der Schale entfernt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde dann 5 min bei 4°C mit 700 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen; das restliche PBS wurde vorsichtig abpipettiert. Je nach Pelletgröße wurden 100 µl Totalprotein-Puffer, der kurz zuvor mit Proteaseinhibitoren versetzt wurde, dazugegeben und das Pellet resuspendiert. Die Zellen wurden durch Sonifizieren im Ultraschallbad für 3 min bei 100% Ultraschall Leistungsstärke aufgeschlossen. Die Proben wurden für 10 min bei 4°C mit 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Präparation von zytoplasmatischen und nukleären Proteine

Die Kolonkarzinomzellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen, in PBS/EDTA von den Zellkulturschalen abgeschabt, 1 min bei 5000 Upm und 4°C zentrifugiert, dann in 100 µl Puffer A pro 10cm²-Zellkulturschale aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 6 µl 10% Nonident-P40 und die Proben wurden intensiv geschüttelt. Nach der Zentrifugation (10 min; 13000 Upm; 4°C) wurde der Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthielt, in neue Gefäße überführt und bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde in 70 µl Puffer C aufgenommen und in einem Kühlraum (4°C) für 30 min auf einem Orbitalschüttler sehr stark geschüttelt. Dann wurde wiederum abzentrifugiert (20 min; 13000 Upm; 4°C) und der Überstand, der die Kernproteine enthielt, bis zur Weiterverarbeitung in einem neuen Gefäß bei -80°C gelagert.

2.2.3.3 Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe der BCA-Methode

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Analyse. Die Absorption der Proben, jeweils Duplikate, wurde an einem Elisa-Lesegerät bei einer Wellenlänge 560 nm gemessen. Zur Messung wurde folgende Verdünnungsreihe erstellt

Name des Eppendorf- Gefäßes	A	B	C	D	E	F
Destilliertes und autoklaviertes Wasser (μl)	900	800	400	400	400	400
BSA-Puffer (A) bzw. jeweils verdünnte Lösung aus dem vorherigen Eppendorf- Gefäß (μl)	100	200	400	400	400	400
BSA-Endkonzentration nach Verdünnung ($\mu\text{g/ml}$)	200	40	20	10	5	2,5

Die Proteinproben wurden ebenfalls vorverdünnt (1:150). Anschließend wurden jeweils 150 μl von den Protein-/ BSA-Proben mit jeweils 150 μl BCA- Reagenz in eine 96-Well-Platte pipettiert und die optische Dichte gemessen. Anhand der Eichkurve mit Rinderserumalbumin (BSA) war die Errechnung der Proteinmenge in der Testlösung möglich.

2.2.3.4 Western Blot

Die Western Blot Analyse dient zum Nachweis bestimmter Proteine aus einem Proteingemisch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern [Burnette, 1981]. Dazu wurde das Gesamt-, zytosolische oder nukleäre Protein mittels Gelelektrophorese aufgetrennt [Laemmli, 1970] und in einem vertikal zur Oberfläche angelegten elektrischen Feld aus dem Gel auf eine PVDF-Membran-Membran transferiert. Nach dem Transfer wird das Protein mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (Primärantikörpern) detektiert. Entstandene Antigen-Antikörper-Komplexe werden dann mittels eines Enzymgekoppelten Sekundärantikörpers, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, sichtbar gemacht. Durch die gekoppelten Enzyme können vorher nicht detektierbare Substrate in eine nachweisbare Form umgewandelt werden. Für die Western Blot Analyse wurden zunächst die Elektrophoresegele (SDS-Page) hergestellt:

Für 4 Gele	Trenngel		Sammelgel
	15%	10%	
Puffer	5 ml	5 ml	2,5 ml
Polyacrylamid 30% Bisacrylamid 0,8%	10 ml	6,7 ml	1,3 ml
ddH ₂ O	4,6 ml	8 ml	6 ml
20% SDS	100 µl	100 µl	25 µl
10% APS	200 µl	200 µl	60 µl
TEMED	10 µl	10 µl	20 µl

Es wurden 25- 50 µg Protein von jeder Probe auf das Gel aufgetragen. Zuvor wurden die Proben mit jeweils 6 µl 4 x Lämmli-puffer gemischt und für 5min bei 95°C denaturiert. Nach Aufbau der Elektrophoresekammer konnten die Proben mit Hilfe einer Hamilton-Spritze aufgetragen werden. In jedem Gel lief ein Massenmarker (Page Ruler) als Größenstandard mit. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer (1 x PAGE) befüllt und die Proteine bei 25 mA ca. 90 min aufgetrennt. Die SDS-Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese zunächst 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert, bevor die Proteine mit Hilfe eines Semidry-Blot-Systems auf eine PVDF-Membran übertragen wurden. Dazu wurden auf die Anodenplatte vier angefeuchtete Whatman 3 MM Papiere aufeinander geschichtet, gefolgt von der in Transferpuffer äquilibrierten Membran. Darauf folgte das Polyacrylamidgel, auf das wiederum vier Whatman 3 MM Papiere geschichtet wurden. Der Transfer erfolgte für 70 Minuten bei 70 mA/Gel. Danach wurde die PVDF-Membran zum Überprüfen der Transfereffizienz in Ponceau S-Lösung angefärbt und anschließend durch Spülen mit Wasser wieder entfärbt. Die Membran wurde dann für eine Stunde mit 5% Magermilchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen und später die Antikörperbindung nur an spezifische Bindungsstellen zu ermöglichen. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils zehn Minuten mit TBST gewaschen, bevor der verdünnte erste Antikörper hinzugegeben wurde. Der Blot wurde mit dem Primärantikörper (i.d.R. in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST) über Nacht bei 4°C geschüttelt. Daraufhin wurde erneut mit Waschpuffer gewaschen, bevor die Inkubation

mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (i.d.R. in einer Verdünnung von 1:10000 in TBST) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte. Nach erneutem Waschen mit TBST wurde der Blot schließlich mit Hilfe des ECL-Systems detektiert. Die dabei entstandene Chemilumineszenz konnte auf einen Röntgenfilm übertragen werden. Für den Nachweis der geladenen Proteinmenge wurden die Membranen mit anti- β -Actin oder anti-GAPDH Antikörper überprobt. Für eine neue Antikörperdetektion mussten erst die an der Membran gebundenen Antikörper entfernt werden. Hierzu wurden die Membranen einem in 0,2 M NaOH für 10 min inkubiert und anschließend dreimal mit TBST für je 10 min gewaschen. Nach einer Blockierung war dann eine erneute Antikörperdetektion möglich.

2.2.3.5 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden DLD-1 Zellen mit einer ungefähren Dichte von 10^5 Zellen/Well in 12-Well-Platten auf Deckgläsern Durchmesser 18mm ausgelegt und 24h in serumfreiem Medium inkubiert. Nach 16-stündiger Stimulation mit den entsprechenden Substanzen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in der unmittelbar davor durch Erhitzen hergestellten, 4% Paraformaldehyd/PBS-Lösung 10-15 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Deckgläschen nochmals zweimal mit PBS gewaschen und 15 min in 5% Ziegen Serum/PBS mit dem Zusatz von 0.1% TX100 geblockt. Daraufhin wurde der Primärantikörper (HuR 1:500 bzw PKC 1:200) in 5% Ziegen Serum/PBS zugegeben (pro Deckgläschen - 120 μ l Antikörperlösung) und 45-60 min bei RT inkubiert. Die Deckgläschen wurden 3-5min mit PBS gewaschen, woraufhin die Deckgläschen mit dem Sekundärantikörper (1:250) (120 μ l/ Deckgläschen) in Ziegen Serum/PBS 30 min unter Lichtentzug inkubiert wurden. Für die Farbe „rot“ wurde der Sekundärantikörper „Texas Red“ (anti-Maus-Rhodamin) (Anregung bei max. 586 nm, Emission bei max. 605 nm), für die Farbe „grün“ Fluorescein (anti-Ziege-FITC) (Anregung bei max. 490 nm, Emission bei max. 525 nm) verwendet. Nach dem dreifachen Waschen der Deckgläschen mit einer PBS-Lösung wurden sie auf die Objektträger mit jeweils einem Tropfen „Fluoromount-G“ (gebrauchsfertig von Southern Biotech) eingedeckt. Die gefärbten Zellpräparate wurden mit Hilfe eines inversen Immunfluoreszenz-Mikroskops von BZ-7000 (Biozero)

betrachtet, mit der „BZ-H1TL-Software“ von Biozero bei 20 x facher Vergrößerung aufgenommen und als tif-Dateien gespeichert.

2.2.3.6 PKC-Aktivitätsassay

Der PKC-Assay (SignATECT®) wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Um die Spezifität vom Assay zu erhöhen, verwendet das System das biotinylierte Peptid Neurogranin, ein für die PKC-Aktivität spezifisches Substrat. Für die PKC-Reaktion wurden unverdünnte Proteinlysate verwendet. Es wurden jeweils 10µl der Proben auf die Membran aufgetragen.

2.2.3.7 Zytokin-Antikörper-Array

Material

Kit der Firma RayBiotech Inc., Heidelberg, Tischschüttler, Plastikfolie, Röntgenfilme (Kodak, Stuttgart), ChemiDoc Imager (Bio-Rad, München) (s. auch Teil 2, Material).

Beschreibung der Methode

Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Vermittlung von angeborener Immunität, Apoptose, Angiogenese, Zellwachstum und -differenzierung. Bei dem kommerziell erhältlichen humanen Zytokin-Antikörper-Array (Ray Bio®) sind auf einer Membran verschiedene Antikörper immobilisiert. Die gebundenen Zytokine werden mit biotinylierten Antikörpern verknüpft und mit Streptavidin konjugiert (Abb.7). Der Zytokinnachweis im Kulturüberstand der DLD-1 Zellen erfolgt nach dem Prinzip des „Sandwich“-ELISAs. Diese Arrays haben den Vorteil, dass mehrere humane Zytokine (hier: 23) gleichzeitig detektiert werden können und eine hohe Sensitivität bis in den pg/ml Bereich bei gleichzeitiger breiter Detektionsweite bis 100000 pg/ml erreicht wird.

Vorbereitung der Proben

Zur Anfertigung des Arrays wurden zunächst DLD-1 Zellen mit einer PKCδ-siRNA (Eurogentec) sowie einer Kontroll-siRNA transient transfiziert. Bei der Herstellung von Zelllysaten wurden von jeder 6 cm²-Schale 2 ml Überstand für die Experimente

aufgehoben und in 2 ml-Eppendorfgefäßen bei -20°C eingefroren. Es wurden jeweils drei Überstände einer Kondition vereinigt.

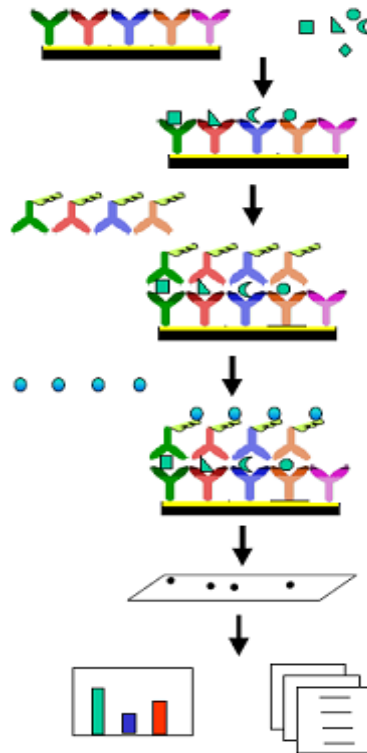


Abbildung 7: Schema des humanen Zytokin-Antikörper-Arrays (nach RayBiotech).

Antigene im Zellkulturüberstand binden an immobilisierte Antikörper auf der Membran; die gebundenen Antigene werden mit biotinylierten Antikörpern verknüpft und mit HRP-markiertem Streptavidin konjugiert

Durchführung

Blockieren und Inkubation

Der Array wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt: Die benötigten Membranen wurden eingangs mit der Antikörper-beschichteten Seite nach oben in einen verschließbaren 8-geteilten Plastikbehälter gelegt und 30 Minuten mit jeweils 2 ml des 1 x Blockierungspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blockieren von freien Proteinbindungsstellen inkubierte man die Membran mit 1 ml unverdünnter Antigen-Lösung (Zellkulturüberstand) über 1 Stunde. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten auf einem Schüttler unter ständigem Schwenken und Vermeidung von Schaumbildung. Daraufhin wurde die Membran erst dreimal mit 1 x Waschpuffer I (2

ml), dann zweimal mit 1 x Waschpuffer II (2 ml) für je 5 min bei RT gewaschen. Auf die Membran wurde nun je 1 ml des mit 100 µl 1xBlockierungspuffer verdünnten Biotin-konjugierten Antikörpers gegeben. Nach 2 Stunden Inkubation wurde erneut mit Waschlösung I und II gewaschen und 2 ml der HRP-konjugierten Streptavidin-Lösung (1998 µl 1 x Blockierungspuffer mit 2 µl Streptavidin) auf die Membranen pipettiert. Nach 2 weiteren Stunden und einem Waschschrift wurde der restliche Waschpuffer von den Membranen abgossen, indem man die Membranen kurz mit einer Pinzette an den Rändern vertikal gehalten hat.

Detektion

Die Detektionsreaktion wurde innerhalb von 40 Minuten ausgeführt. Hierzu wurden die Membranen vorsichtig auf Plastikfolie gelegt und 2 Minuten mit den Nachweisreagenzien (1:1 gemischte (je 250 µL) Detektionspuffer C und D) inkubiert. Die Detektionspuffer wurden restlos abgossen, die Membran auf einer neuen, trockenen Plastikfolie mit einer weiteren durchsichtigen Folie bedeckt (wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen entstehen) und mit der Proteinseite nach oben mit einem Kodak-Film in einer Filmkassette platziert. Nach einer Expositionszeit von 0,5 bis 20 min (je nach Signalintensität) wurde der Film in der Dunkelkammer mit einer Entwicklermaschine der Firma Amersham Pharmacia, Freiburg entwickelt.

2.2.3.8 RNA-Protein-Koimmunopräzipitation („Pull-down“)

Die Koimmunopräzipitation von HuR/mRNA-Komplexen wurde nach einem Protokoll von Chataway et. al. durchgeführt. Dabei wurde die Crosslinker-IP-Methode verwendet, bei der das IgG durch eine Vernetzungssubstanz Disuccinimidyl suberate (DSS) an die Sepharose irreversibel gekoppelt und somit nicht mit eluiert wird. Das ergibt in einer Western Blot Analyse keine störenden IgG-Banden.

Bindung des Antikörpers an die Sepharose

Protein G-Sepharose wurde mit Binding/Wash (B/W)-Puffer äquilibriert. Zu der Sepharose wurde der HuR-Antikörper (50µg/ml) bzw. das Maus-IgG (50µg/ml) in B/W Puffer hinzugegeben und das Gemisch 15 min bei 4°C auf dem Drehschüttelinkubator

inkubiert, bevor die Proben weiter mit B/W Puffer gewaschen und abzentrifugiert wurden. Antikörper-gebundene Sepharose wurde dann mit 400 µl B/W Puffer versetzt.

Irreversible Kopplung des Antikörpers an die Sepharose mittels DSS (Crosslinking)

Für die Vernetzung wurden 2 mg DSS in 80µl DMSO gelöst, zu je 400 µl Antikörper-gebundener Sepharose 25µl DSS-Lösung hinzugegeben und bei 4°C für 30-60 min auf dem Drehschüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurde je 500µl Elutionspuffer zugegeben, die Probe 10-mal invertiert, 1 min lang zentrifugiert und der Waschschrift mit Elutionspuffer viermal wiederholt. Danach wurde die Sepharose mit einer Hamilton Pipette getrocknet und erneut mit je 500µl B/W Puffer gewaschen.

Beladen mit Protein/RNA-Komplexen

Um die HuR/mRNA-Komplexe an die Protein G-Sepharose zu binden, wurde für einen RNA/IP Ansatz 50µl Sepharose mit 200-300µg Proteinlysate versetzt, mit B/W Puffer auf 500µl aufgefüllt und bei 4°C über Nacht auf einem Drehschüttelinkubator inkubiert. Die Beads wurden mit weiteren 500µl B/W Puffer versetzt, durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 U/min sedimentiert und dann so oft mit Waschpuffer gewaschen, bis im Überstand kein Protein mehr mit Bradford-Reagenz nachgewiesen wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose mit einer Hamilton Pipette gründlich getrocknet. Sollte die Sepharose wieder benutzt werden, so wurde sie mit 3 Mal mit 100µl Elutionspuffer versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 min Zentrifugation wurde der Überstand mit Hamilton Pipette abgenommen und die Eluate vereinigt.

Isolation der gebundenen RNA

Die Isolation der RNA aus den HuR/mRNA-Komplexen erfolgte durch direkte Zugabe von 1ml TRIzol-Reagenz auf die Sepharose-Beads und Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur. Nachfolgend erfolgte die Präparation der RNA: zu den Proben wurde 0.2ml Chloroform/ml TRIzol gegeben, gut durchmischt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bei 14000 U/min und 4°C für 15 min zentrifugiert und der obere, nicht organische Teil in neue Eppendorfgefäße überführt. Nach einer Zugabe von jeweils

0.5ml Isopropanol wurden die Proben gut gemischt und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, zentrifugiert und für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Pellets wurden mit 1ml 70% Ethanol gewaschen, für 10 min luftgetrocknet, und in 10µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die RNA wurde mittels RT-PCR analysiert, dabei die gesamte Menge in die RT-Reaktion eingesetzt.

Regenerierung und Aufbewahrung

Die Sepharose wurde 10 Mal mit B/W Puffer gewaschen und anschließend in B/W Puffer mit 0,1% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

2.2.4 Statistik

Sämtliche graphisch dargestellten Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte \pm S.D. Die Ermittlung und Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von Excel. Die Erhebung statistischer Daten wurde unter Anweisung des Student-t-Tests durchgeführt, wobei p-Werte von <0.01 (##) oder <0.005 (###) als signifikant gekennzeichnet sind. Die n-Zahl gibt die Anzahl der unabhängigen Versuche wider.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung des konstitutiven HuR-Gehalts in verschiedenen Zellkompartimenten in den Kolonkarzinom-Zelllinien DLD-1 und SW-620

Da aus mehreren Arbeiten in der Literatur bekannt war, dass wie in vielen anderen Tumorzellen auch in Kolonkarzinomzellen eine erhöhte Expression [Dixon et al., 2001] bzw. ein erhöhter zytosolischer Gehalt des mRNA-stabilisierenden Proteins HuR [Lopez de Silanes et al., 2003] funktionell an der Tumorgenese beteiligt ist, wurde zunächst der zytosolische HuR Gehalt in den humanen Kolonkarzinom-Zelllinien DLD-1 und

SW-620 mittels Zellfraktionierung bestimmt. Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass im Gegensatz zu Tumorzellen, in den meisten nicht transformierten Zelltypen zytosolisches HuR unter unstimulierten Bedingungen über die Western Blot Analyse nur schwer nachzuweisen ist. Als Grund hierfür gilt, dass HuR nahezu ausschließlich ($\geq 95\%$) im Kern lokalisiert ist und seine Umverteilung vom Kern in das Zytoplasma (sogenanntes HuR-Shuttling) nur durch bestimmte Stimuli induziert wird [Fan und Steitz, 1998].

Die Bestimmung von zytosolischem und nukleärem HuR Gehalt erfolgte mit Hilfe eines monoklonalen HuR-spezifischen Antikörpers. Western Blot Analysen zeigen, dass in beiden Kolonkarzinom-Zelllinien DLD-1 und SW-620, zytosolisches HuR bereits unter unstimulierten Bedingungen detektiert werden kann, wobei es in den entsprechenden Kernfraktionen eine deutlich höhere Expressionsrate aufweist (Abb. 8). Ein erhöhter konstitutiver Gehalt an zytosolischem HuR unter unstimulierten Bedingungen gilt als Charakteristikum vieler Krebszellen [Denkert et al., 2006]. Der relativ starke Nachweis von β -Aktin in den Kernfraktionen weist auf eine gewisse Verunreinigung der Kernextrakte mit zytosolischem Protein hin. Nachfolgende Analysen der Kernextrakte mit einem Anti-HDAC Antikörper konnten indessen die Reinheit der zytosolischen Extrakte bestätigen [Doller et al., 2011]. Nachweis von nukleärem β -Aktin ist indessen von verschiedenen Arbeitsgruppen dokumentiert.

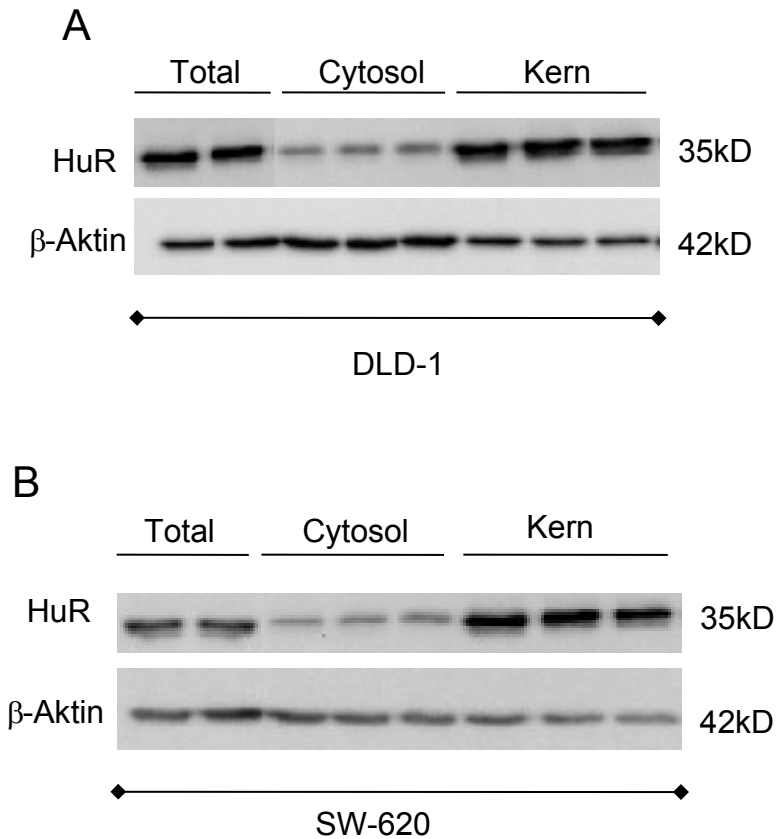


Abb. 8: Konstitutive HuR-Spiegel in unbehandelten Kolonkarzinom Zelllinien DLD-1 (A) und SW-620 (B).

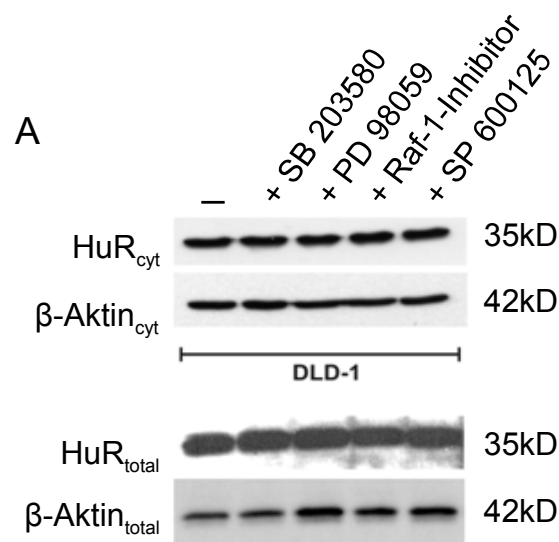
Die unstimulierten DLD-1 Zellen wurden in FKS-haltigem Vollmedium kultiviert und für die Zellfraktionierung, wie im Methodenteil beschrieben, in Gesamtprotein (als Duplet), zytosolische sowie nukleäre Lysate (jeweils als Triplet), homogenisiert. Die Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mit Hilfe eines monoklonalen HuR-spezifischen Antikörpers inkubiert. Für die Analysen wurden jeweils 50µg Protein eingesetzt.

3.2 Untersuchungen zur Bedeutung von Proteinkinasen auf den konstitutiven zytosolischen HuR-Gehalt von Kolonkarzinomzellen

3.2.1 Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf den zytosolischen HuR-Gehalt von DLD-1 und SW-620 Zellen

Aus der Literatur war bekannt, dass das Stimulus-induzierte HuR-Shuttling über verschiedene Signalkaskaden vermittelt wird. Hingegen ist noch unbekannt, über welche Signalkaskaden das konstitutive HuR-Shuttling in Krebszellen vermittelt wird.

Aus diesem Grund wurde im nächsten Versuch die mögliche Beteiligung der zentralen Signalkaskaden MAPK und PKC mit Hilfe der folgenden pharmakologischen Inhibitoren untersucht: SB203580 [10 μ M], ein Inhibitor der p38-MAPK; PD98059 [30 μ M], ein Inhibitor der p42/p44 MAPK; SP600125 [10 μ M], ein Inhibitor der N-Terminalen Jun-Kinase sowie einem Inhibitor der Raf-1 Kinase (100 nM), einer MAPK übergeordneten Proteinkinase. Serumdepletierte Kolonkarzinomzellen wurden für weitere 16 Stunden mit einem der oben genannten Inhibitoren stimuliert, bevor die Zellen für die biochemische Fraktionierung lysiert wurden. Die Western Blot Analyse zeigt, dass keiner der untersuchten Inhibitoren eine Veränderung des zytosolischen HuR Gehalts hervorrufen konnte (Abb. 9) - ein Phänomen, das gleichermaßen in beiden Zelllinien beobachtet wurde. Ebenso wurde auch der Gesamtgehalt von HuR durch keine der untersuchten Inhibitoren beeinflusst (Abb. 9).



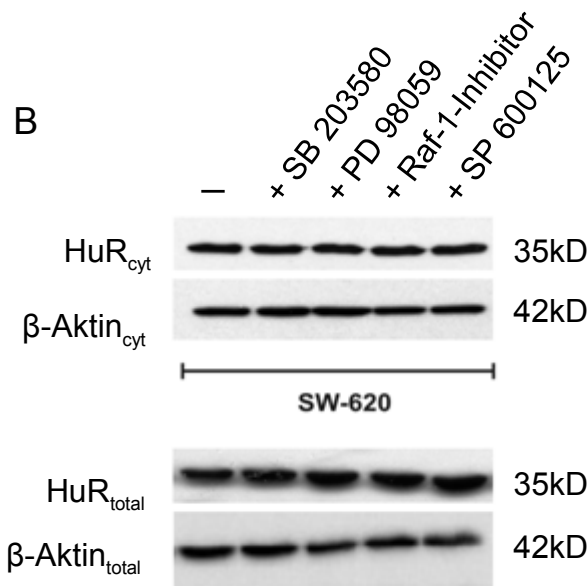


Abb. 9: Verschiedene MAPK-Inhibitoren haben weder Einfluss auf den zytosolischen HuR Gehalt (obere Reihe) noch auf den HuR Gesamtgehalt (untere Reihe) in DLD-1 (A) und SW-620 (B) Zellen.

Konfluente Tumorzellen wurden für 16 Stunden serumfrei kultiviert und anschließend für 16 Stunden mit einem der angegebenen Inhibitoren stimuliert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot mit einem HuR-spezifischen Antikörper inkubiert. Für die Analysen wurden jeweils 50 μ g Protein eingesetzt. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

3.2.2. Einfluss von PKC-Inhibitoren auf den zytosolischen HuR-Gehalt von DLD-1 Zellen

In einer nächsten Versuchsreihe wurde die mögliche Beteiligung von PKC-Signalkaskaden mit Hilfe der folgenden pharmakologischen Inhibitoren untersucht. Staurosporin (100 nM), ein Breitspektrum PKC-Inhibitor; Gö6976 (20 nM), ein Inhibitor mit einer hohen Prävalenz gegenüber den klassischen, Ca^{2+} -abhängigen PKCs (PKC α , PKC β); Rottlerin (10 μ M), ein Inhibitor mit einer hohen Prävalenz gegenüber den neuen, Ca^{2+} -unabhängigen PKCs (insbesondere PKC δ und PKC ϵ) sowie CGP41251 (100 nM), ebenfalls ein Breitspektrum PKC-Inhibitor. Serumdepletierte DLD-1 Kolonkarzinomzellen wurden wiederum für weitere 16 Stunden mit einem der oben beschriebenen PKC-Inhibitor inkubiert und anschließend der biochemischen Fraktionierung unterzogen. Die Western Blot Analyse der so gewonnenen

Zellfraktionen zeigt, dass in DLD-1 Zellen Rottlerin einen stark hemmenden Einfluss auf den zytosolischen HuR Gehalt der Zellen hat, während der Gesamtgehalt von HuR unverändert bleibt (Abb. 10). Ein schwach hemmender Einfluss zeigt sich auch nach einer Behandlung mit Gö6976, während die übrigen PKC Inhibitoren die zytosolische HuR-Expression von DLD-1 Zellen nicht beeinflussen konnten (Abb. 10). Interessanterweise zeigt sich, dass der nukleäre Gehalt von PKC δ durch Gö6976 geringfügig reduziert wird, was möglicherweise eine Erklärung für die hemmende Wirkung von Gö6976 auf den konstitutiven zytosolischen HuR-Gehalt von DLD-1 Zellen liefert, obwohl der Gesamtgehalt von HuR durch diesen Hemmstoff nicht vermindert wurde (Abb. 10). Die Tatsache, dass Rottlerin keinen Einfluss auf die nukleären PKC δ -Spiegel zeigt, lässt vermuten, dass eine Hemmung der PKC δ -Aktivität nicht notwendigerweise zur Hemmung der PKC δ -Translokation in den Zellkern führt.

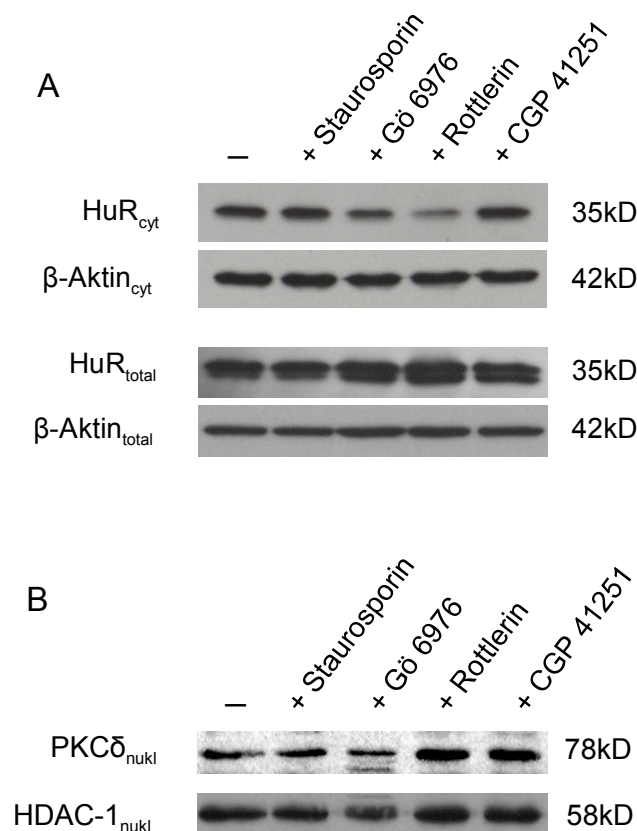


Abb. 10: Einfluss verschiedener PKC-Inhibitoren auf den HuR Gehalt im Zytosol und auf den Gesamtgehalt (A) sowie auf den PKC δ -Gehalt im Zellkern (B).

Die Kolonkarzinomzellen DLD-1 wurden für 16 Stunden serumfrei kultiviert und für weitere 16 Stunden mit einem der oben gezeigten PKC-Inhibitor stimuliert. Zytosolische, nukleäre sowie Gesamtzellextrakte wurden wie im Methodenteil beschrieben (s. Kapitel 2.2.3.2) isoliert und mit Hilfe der Western Blot Analyse mit einem HuR-spezifischen Antikörper detektiert. Als interne Ladungskontrolle wurde der β -Aktin-Gehalt bestimmt. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

3.2.3 Die zeitabhängige Wirkung von Rottlerin und Gö6976 auf die zytosolische HuR-Proteinspiegel in DLD-1-Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten

Um den Zeitpunkt einer maximalen Hemmung der PKC-Inhibitoren Rottlerin und Gö6976 auf das konstitutive HuR-Shuttling zu untersuchen, wurden zusätzlich Zeitkinetik-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden die ausgehungerten DLD-1 Zellen nach 2, 4, 8 und 16 Stunden für die Zellfraktionierung homogenisiert. Während eine maximale inhibitorische Wirkung des Rottlerins nach 16 Stunden erreicht wird, zeigt dagegen ein Inhibitor der klassischen PKCs Gö6976, (PKC α -/ β - Inhibitor) zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine eindeutige Hemmung (Abb. 11).

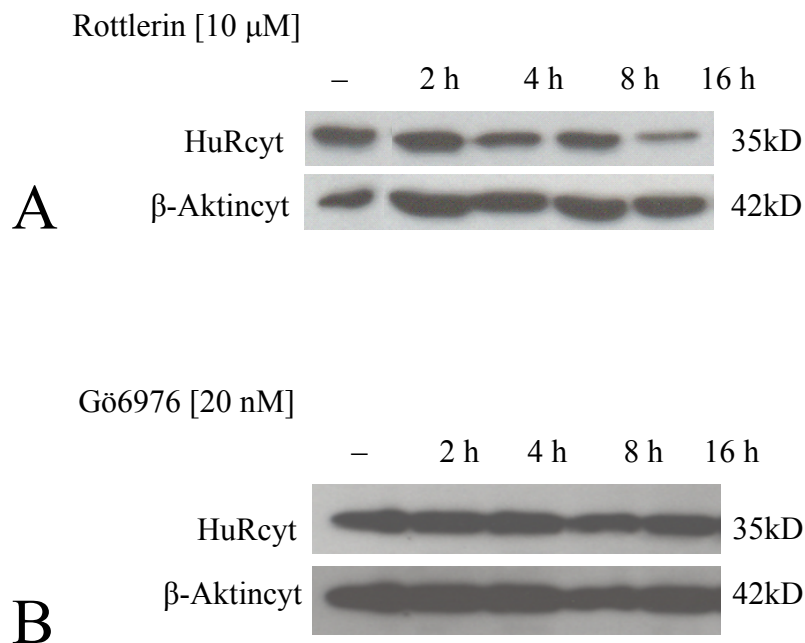


Abb. 11: Die maximale Reduktion der zytosolischen HuR-Spiegel ist nach 16 Stunden Rottlerin Behandlung erreicht (A).

Im Gegenteil, zeigt der PKC α - und β - Inhibitor Gö6976 (B) zu keinem der verwendeten Zeitpunkte einen sichtbaren Einfluss auf den zytosolischen HuR Gehalt. DLD-1 Zellen wurden nach 16-stündiger serumfreier Inkubation mit dem jeweiligen Inhibitor für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Zytosolische Proteinextrakte wurden, wie in dem Methodenteil

beschrieben, aufgearbeitet und mit Hilfe der Western Blot Analyse mit einem HuR-spezifischen Antikörper analysiert. Als Ladungskontrolle galt der jeweilige β -Aktin-Gehalt. Die gezeigten Western Blots zeigen das repräsentative Ergebnis zweier unabhängig durchgeführter Experimente mit ähnlichen Resultaten.

3.2.4 Einfluss von Rottlerin auf das HuR-Shuttling in beiden Zelllinien

Zur Verifizierung des modulierenden Einflusses von Rottlerin auf den konstitutiven zytosolischen HuR-Gehalt in Kolonkarzinomzellen wurde im Anschluss die Wirkung von Rottlerin und Gö6976 auch in SW-620 Zellen untersucht. Wie Abb. 12 deutlich zeigt, wird der zytosolische HuR-Spiegel in beiden Tumorzelllinien signifikant gehemmt ($p \leq 0.01$, $n=3$ bzw. $p \leq 0.005$, $n=3$), während Gö6976 in beiden Zelltypen keine statistisch relevante Wirkung auf den zytosolischen HuR-Gehalt zeigt.

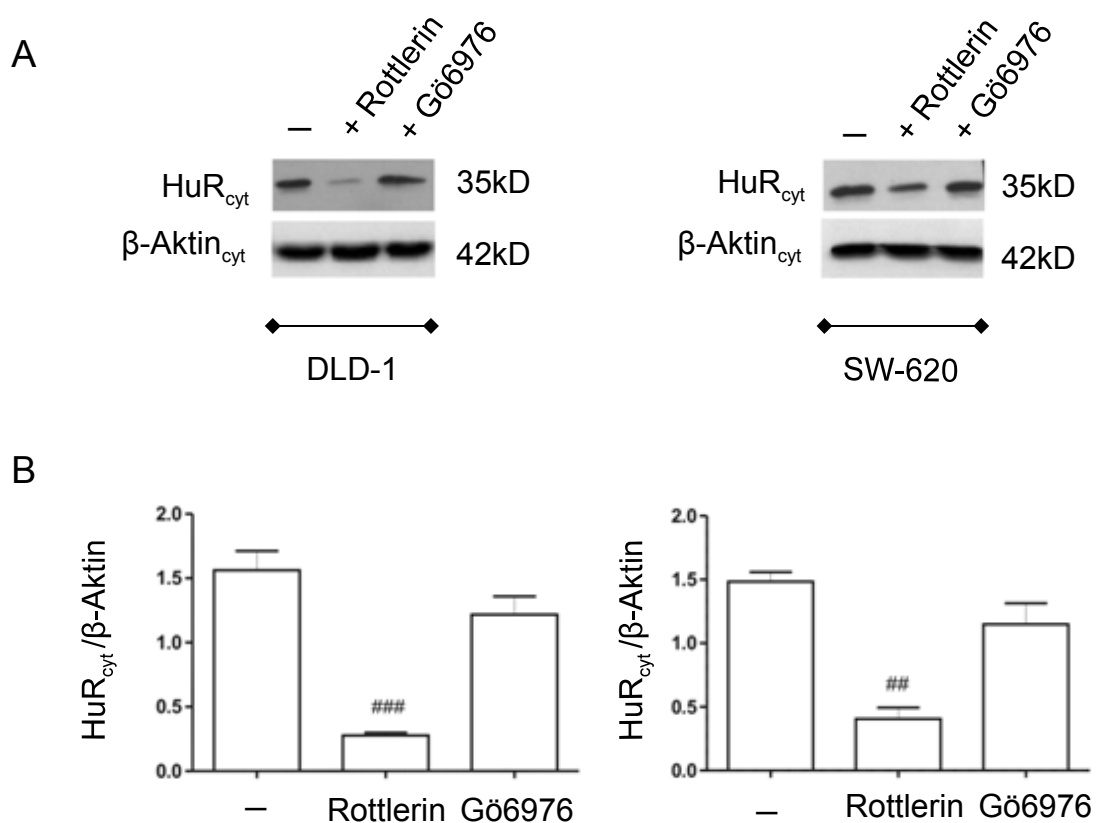


Abb. 12: Der modulierende Einfluss von Rottlerin und Gö6976 auf das HuR-Shuttling in den DLD-1 und SW-620 Zellen.

Rottlerin reduziert den zytosolischen HuR Gehalt signifikant. DLD-1 und SW-620 Zellen wurden für 16 Stunden mit Rottlerin / Gö6976 stimuliert. Zytosolische Proteine der Zellen wurden aufgearbeitet und für die Western Blot Analysen jeweils 50µg Protein eingesetzt. Zum Abgleich wurde der β -Aktin-Gehalt im Zytosol verwendet. Die Abbildung B zeigt den zytosolischen HuR-Gehalt bezogen auf den β -Aktin-Gehalt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert plus STD (n=3) dargestellt. $p \leq 0.005$ (###) und $p \leq 0.01$ (##) wurden als statistisch signifikant bezogen auf die Kontrolle angesehen. Der hier gezeigte Western Blot stellt drei unabhängige Experimente mit den gleichen Ergebnissen dar.

3.3 Untersuchung zur möglichen Kollokalisierung von HuR und PKC δ mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie

Wie anhand von Western Blot Analyse gezeigt werden konnte, wird der erhöhte zytosolische HuR-Gehalt in den untersuchten Kolonkarzinomzellen DLD-1 und SW-620 durch Rottlerin herabgesetzt. Das Ziel der nachfolgend durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Analyse war, vergleichbare Veränderungen der subzellulären HuR-Lokalisation zusätzlich auf mikroskopischer Ebene nachzuweisen. Idealerweise sollte zusätzlich eine Stimulus-abhängige Veränderung der Interaktion von PKC δ und HuR nachgewiesen werden. Die klassische Art der PKC-Aktivierung zeichnet sich in den meisten Säugetierzellen durch eine sogenannte Desensibilisierung aus, d.h. bei einer Langzeitstimulation des Enzyms kann dieses nach wenigen Stunden der Hemmung nicht mehr aktiviert werden. Diese Desensibilisierung führt dann auch zu einer Abnahme der zellulären PKC-Aktivität. Aus diesen Erkenntnissen wurde postuliert, dass der in DLD-1 Zellen nachgewiesene, erhöhte zytosolische HuR Gehalt möglicherweise auf eine konstitutive Aktivierung der PKC δ zurückgeführt werden kann. Abb. 13 zeigt eine Texas Red-markierte (rot) HuR- und FITC-markierte (grün) PKC δ -Färbung in DLD-1 Zellen nach Behandlung mit Rottlerin im Vergleich zu unstimulierten Zellen.

HuR-Färbung (obere Reihe): Unter Kontrollbedingungen ist eine starke Färbung von HuR im Zellkern zu beobachten. Gleichzeitig zeigt sich eine deutliche, wenn auch geringere HuR-Färbung im Zytoplasma. Im Einklang mit Ergebnissen aus Western Blot Analyse (Abb. 9) führt die Behandlung von Zellen mit Rottlerin zu einer deutlichen

Hemmung der zytosolischen HuR Lokalisierung (s. HuR-Kanal in Abb. 13). Der zytosolische Anteil von HuR ist allerdings nicht so deutlich wie in den entsprechenden biochemischen Analysen. Dies ist auch eine Erklärung für die nur sehr schwach erkennbare Minderung des zytosolischen HuR-Gehalts nach Zugabe von Rottlerin.

PKC δ -Färbung: (mittlere Reihe): In unbehandelten DLD-1 Zellen ist die PKC δ insgesamt relativ homogen auf die gesamte Zelle verteilt, wobei bei einzelnen Zellen (s. Pfeil) eine moderate Konzentration der PKC δ auf Kernbereiche deutlich wird. Die Immunfärbung der PKC δ (grün) erscheint zudem im Vergleich zu HuR-Färbung als stärker inhomogen. Interessanterweise bewirkte die Behandlung der Zellen mit Rottlerin eine deutliche Intensitätsverstärkung der PKC δ -Färbung, gleichzeitig zeigt die PKC δ nach der Rottlerin-Zugabe eine deutlich gleichmäßigere Verteilung als in unbehandelten DLD-1 Zellen. Hierbei ist zu erwähnen, dass die oben beschriebene Konzentration der PKC δ auf die perinukleären Bereiche verschwunden ist. Dieser Befund steht mit den oben dargestellten Ergebnissen der biochemischen Analyse im Einklang (Abb. 10).

Doppelfärbung (untere Reihe): Da bei der Überlappung der beiden Fluoreszenzfärbungen unter keinen Bedingungen eine deutliche Gelbfärbung erkennbar ist, können keine sicheren Aussagen über eine mögliche Kolokalisation von PKC δ und HuR gemacht werden. Eine solche Gelbfärbung wäre ein eindeutiges Indiz für eine Kolokalisation beider Proteine.

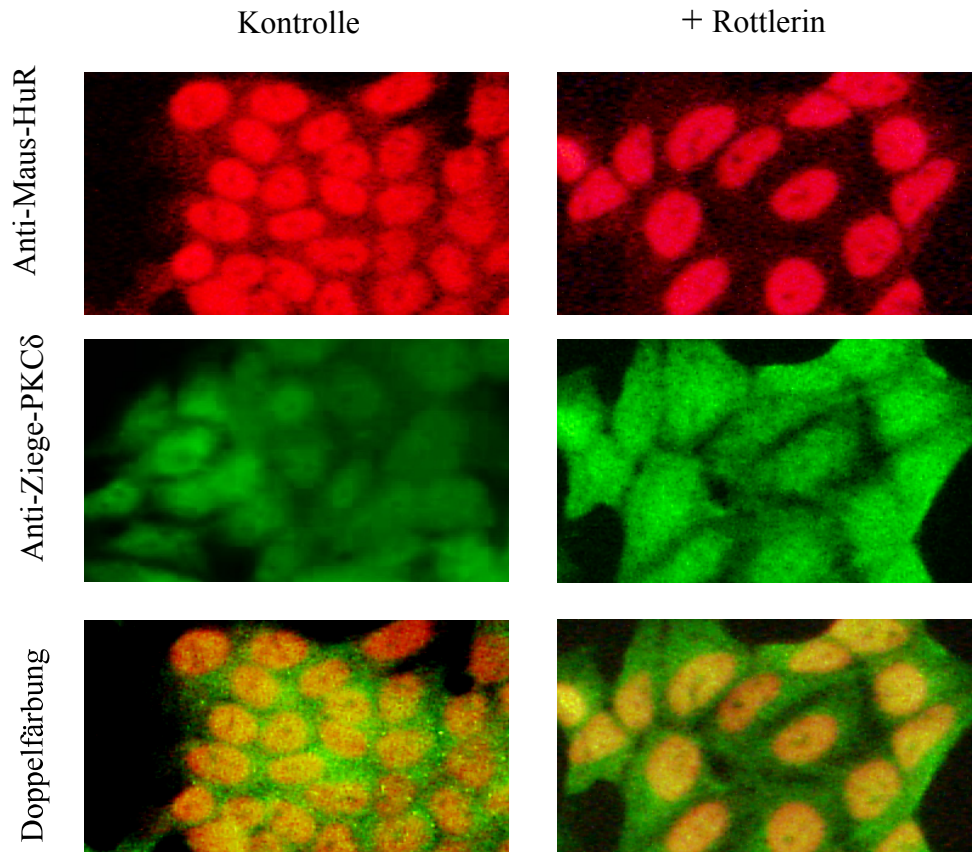


Abb. 13: Lokalisierung von HuR und PKC δ nach Inkubation der DLD-1-Zellen mit Rottlerin.

Die Reduktion des zytosolischen HuR-Gehalts durch Rottlerin nach der fluoreszenzmarkierten Färbung von DLD1-Zellen. DLD-1-Zellen wurden für 16h mit Rottlerin [5 μ M] stimuliert. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden die Zellen jeweils mit anti-HuR-Antikörper „Texas Red“ (anti-Maus-Rhodamin) oder anti-PKC δ -Antikörper „Fluorescein“ (anti-Ziege-FITC) inkubiert und mit einem konfokalen Mikroskop mittels Software-Programm „LSM Browser“ aufgenommen.

3.4 Untersuchung zum PKC-Aktivitätsstatus in DLD-1 Zellen

Es stellte sich weiterhin die Frage, ob die DLD-1 Zellen, wie im Falle einer konstitutiven Aktivierung zu erwarten, unempfindlich gegenüber einer zusätzlichen Aktivierung durch klassische PKC-Aktivatoren wie dem Phorbolster TPA, sind.

3.4.1 PKC-Aktivitätsassay

Zunächst wurde mit Hilfe eines PKC-Aktivitätstests die PKC-Gesamtaktivität in DLD-1

Zellen bestimmt. Dabei sollte außerdem überprüft werden, ob Rottlerin auch tatsächlich die Gesamtaktivität von PKC hemmen kann. Der käuflich erworbene PKC-Aktivitäts-Assay zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für PKC-Isoenzyme aus, bei dem das biotinylierte Peptid Neurogranin als Substrat verwendet wird. Das Prinzip des Assays beruht auf einer Übertragung von ^{32}P -markierten Phosphatresten auf Protein- und Peptidsubstrate. Die phosphorylierten Substrate werden auf einem Phosphozellulose-Filter durch schwache elektrostatische Kräfte immobilisiert. Wie eine repräsentative Messung in Abb. 14 zeigt, kann in DLD-1 Kolonkarzinomzellen eine konstitutive PKC-Aktivität nachgewiesen werden. Diese wird sowohl durch Koinkubation der Zellen mit dem PKC δ -selektiven Inhibitor Rottlerin [10 μM] als auch durch Zugabe des Breitband-PKC-Inhibitors Staurosporin [100nM] drastisch herabgesetzt. Umgekehrt führt die Stimulation von DLD-1 Zellen mit TPA zu einer deutlichen Steigerung der PKC-Gesamtaktivität (Abb. 14).

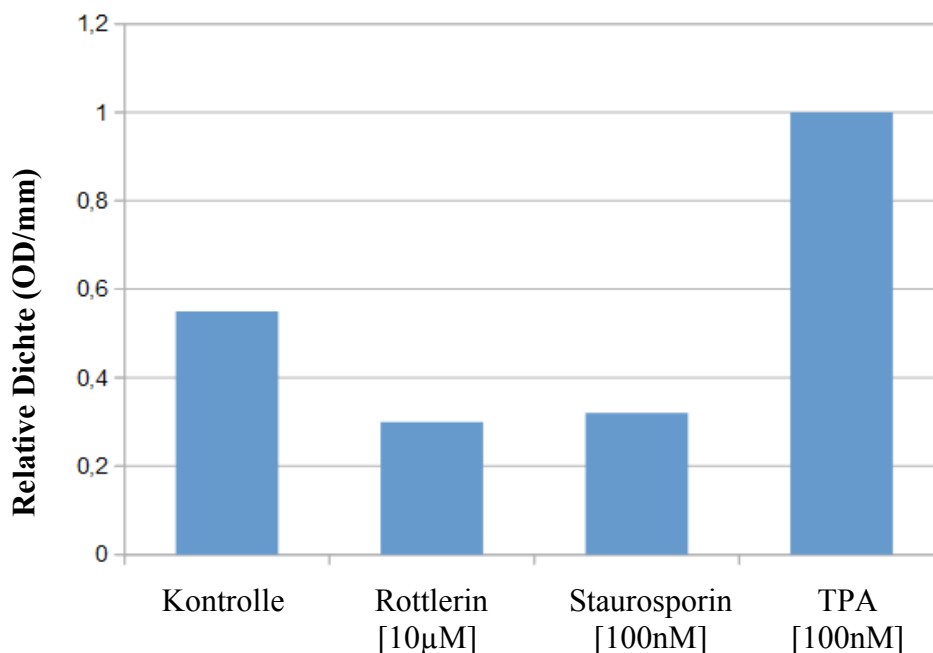


Abb. 14: Modulation der PKC-Gesamtaktivität in DLD-1 Zellen mit Hilfe des SignaTEST PKC-Assay-Systems „Promega“.

Die PKC-Gesamtaktivität in DLD-1 Zellen wird nach Rottlerin- und Staurosporin-Behandlung deutlich reduziert. DLD1-Zellen wurden entweder für 16 Stunden mit dem jeweiligen PKC-Inhibitor behandelt [10 μM Rottlerin bzw. 100 nM Staurosporin] oder, alternativ für 15 Minuten mit TPA[100 nM] stimuliert. Der Assay wurde durchgeführt wie im Methodenteil beschrieben. Die aufgearbeiteten Proben wurden unverdünnt eingesetzt. Die densitometrisch ausgewerteten Daten zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Aktivitätsbestimmungen.

3.4.2 Die Stimulation mit TPA führt zu einer moderaten Steigerung des zytosolischen HuR Gehalts in DLD-1 Zellen

Eine Aktivierung von Proteinkinase C wird anhand einer sehr raschen, innerhalb weniger Minuten eintretenden, Translokation vom Zytoplasma an die Zellmembran erkennbar [Cross et al., 2000]. Dieser Prozess der Aktivierung dauert in der Regel von wenigen Minuten bis maximal 1 Stunde. Dabei führt der kurzfristige Effekt (Minuten bis zur 1 Stunde) zu einer PKC-Aktivierung. Im Gegensatz hierzu führt in den meisten Zellen eine längere Stimulation mit Phorbolestern zur Hemmung der PKC-Translokation im Sinne einer kompensatorischen Desensibilisierung. Im Anschluss sollte untersucht werden, ob eine Stimulation von DLD-1 Zellen mit Phorbolester zur Abnahme oder zusätzlichen Erhöhung des zytosolischen HuR Gehaltes führen. Wie die Western Blot Analyse zeigt, wird der Gehalt von zytosolischem HuR nach 1 Stunde Stimulation mit TPA [100 nM] nicht verändert. Eine längere Stimulation der Zellen mit TPA für 4 Stunden zeigte hingegen einen moderaten Anstieg von zytosolischem HuR (Abb. 15). Daraus kann gefolgert werden, dass PKC-abhängige HuR-Shuttling nicht ausschließlich über den klassischen Diacylglycerol-abhängigen Aktivierungsweg vermittelt wird, da in diesem Falle keine weitere Steigerung der zytosolischen HuR Gehalts bei der Langzeitstimulation mit TPA zu erwarten gewesen wäre. Die Frage einer möglichen intrazellulären Lokalisationsveränderung nach TPA Stimulation sollte im Folgenden mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie beantwortet werden.

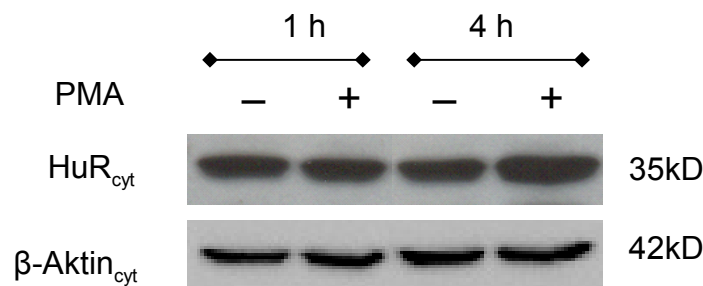


Abb. 15: Effekte von PMA auf den zytosolischen HuR-Gehalt.

DLD-1-Zellen zeigen den höchsten zytosolischen HuR-Gehalt nach 4 Stunden TPA-Stimulation. Nach 16h serumfreier Inkubation wurden die Zellen für 1 und 4 Stunden mit TPA [100nM] stimuliert. Für eine Western Blot Analyse wurden die zytosolischen Proteinextrakte gewonnen, von jeder Probe 50µg Protein eingesetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines HuR-spezifischen Antikörpers wurden die Proteine detektiert. Die Größe der Bande wurde mit einem Molekulargewichtsmarker bestimmt.

3.4.3 TPA-induzierte Translokation zur Plasmamembran

Eine Aktivierung von PKC δ durch TPA wurde zusätzlich mit Hilfe von Immunzytochemie untersucht. Abb. 16 zeigt eine charakteristische Immunfluoreszenzfärbung von HuR und PKC δ in unbehandelten Kontrollzellen sowie in TPA behandelten DLD-1 Zellen. Wie bereits in Abb. 13 dargestellt, wird unter unstimulierten Kontrollbedingungen eine inhomogene PKC δ -Lokalisierung erkennbar, wobei die Intensität der PKC δ -Färbung im Nukleus stärker ist als im umgebenden Zytosol (Abb. 16, PKC δ -Kanal). Die HuR-Färbung zeigt eine nahezu ausschließlich nukleäre Lokalisation des HuRs und eine nur geringe HuR-Intensität im Zytoplasma (Abb. 16, HuR-Kanal). Analog zur biochemischen Analyse, führt eine Stimulation mit TPA [100nM] zu einer deutlichen PKC δ -Färbung an der Plasmamembran (Abb. 16). Diese ist besonders deutlich in der Doppelfärbung (orange) erkennbar (Abb. 16, Doppelfärbung-Kanal). Zusammenfassend zeigt sich, dass trotz einer offensichtlichen basalen PKC δ -Aktivität in DLD-1 Zellen, deren Stimulierbarkeit durch Phorbolster erhalten ist. Hieraus kann vermutet werden, dass die basale PKC δ -Aktivität in DLD-1 Zellen nicht über eine konstitutive Aktivierung des klassischen über Diacylglycerol vermittelten PKC-Signalwegs erklärt werden kann.

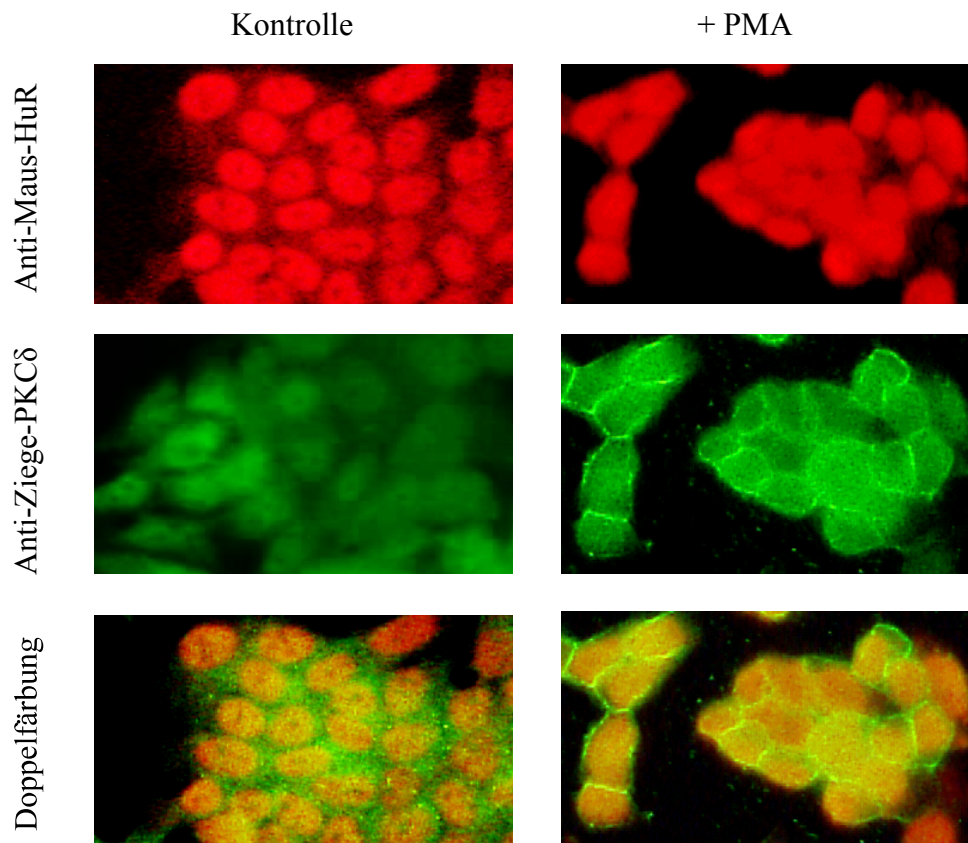


Abb. 16: Lokalisation von HuR und PKC δ nach Stimulation der DLD-1-Zellen mit TPA.

Detektion einer veränderten PKC δ -Lokalisation nach TPA-Stimulation mittels Immunfluoreszenzfärbung von DLD1-Zellen. DLD-1-Zellen wurden für 15 Minuten mit TPA[100 nM] stimuliert. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden die Zellen jeweils mit einem anti-HuR „Texas Red“-gekoppelten Antikörper (anti-Maus-Rhodamin) oder anti-PKC δ „Fluorescein“-gekoppelten Antikörper (anti-Ziege-FITC) inkubiert und mit einem konfokalen Mikroskop mittels Software-Programm „LSM Browser“ aufgenommen.

3.5 Einfluss der PKC-Hemmung auf die Expression bekannter HuR-Zielgene

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Überexpression von HuR unter anderem zu einer erhöhten Expression von COX-2 sowie anderen Zielgenen mit AU-reichen Elementen in deren 3'-UTR führt [Dixon et al., 2001]. Die Kolonkarzinogenese ist eines der am besten dokumentierten Beispiele für die funktionelle Bedeutung von HuR bei der Tumorentstehung. So ist in mehreren Arbeiten beschrieben worden, dass die durch HuR regulierte Zielgen-mRNA-Expression entscheidend zum Krebswachstum beiträgt und dabei mit einer geringeren Überlebenschance der betroffenen Patienten korreliert [Lopez de Silanes et al., 2003].

3.5.1 Auswirkungen von Rottlerin auf bestimmte HuR-Zielgene

In der nachfolgenden Versuchsreihe sollte überprüft werden, ob eine PKC δ -abhängige HuR-Aktivierung bei der posttranskriptionellen Genregulation bekannter HuR-Zielgene beteiligt ist. Als prominente und gut charakterisierte Zielgene des HuRs wurde die induzierbare NO-Synthase (iNOS), induzierbare COX-2 sowie Cyclin A gewählt. Zunächst wurde eine PKC δ -abhängige Expression der oben aufgeführten Gene mit Hilfe pharmakologischer PKC-Inhibitoren getestet. Hierzu wurden serumdepletierte DLD-1 Zellen für 16 Stunden mit Rottlerin [10 μ M] stimuliert, bevor sie für die Gesamt-RNA-Isolation homogenisiert wurden. Die angereicherte Gesamt-RNA wurde anschließend mit Hilfe einer reversen Transkription in cDNA überführt und das Produkt mittels PCR amplifiziert (s. Kapitel 2.2.2.6 in Material und Methoden). Für die PCR-Reaktion wurden spezifische Primerpaare für humane iNOS-, COX-2- sowie Cyclin A eingesetzt. Wie die Abb. 17 zeigt, vermindert Rottlerin die Expression der drei Zielgene deutlich, während mRNA-Spiegel für das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durch die Rottlerin-Gabe unverändert bleiben.

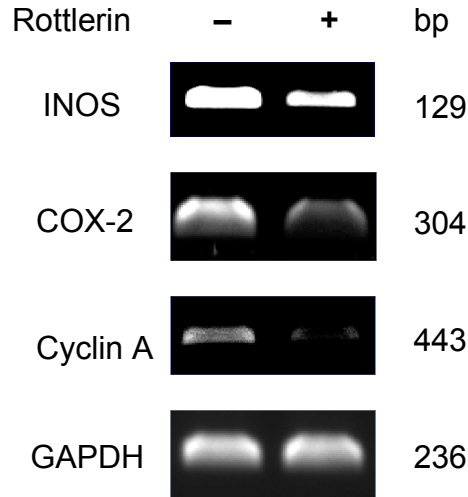


Abb. 17: Auswirkungen von Rottlerin auf verschiedene Zielgene des HuRs.

Konfluente DLD-1 Zellen wurden für die Dauer von 16h mit Rottlerin [10 μ M] stimuliert. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde eine semiquantitative PCR mit spezifischen Primern für iNOS, COX-2 und Cyclin A mit 30 Zyklen durchgeführt. Zum Abgleich wurden GAPDH-mRNA-Spiegel verwendet. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen. Die Größe der jeweiligen PCR-Produkte ist durch Angabe der Basenpaare (bp) gekennzeichnet.

3.5.2 Rottlerin hemmt die Bindung von HuR an AU-reiche mRNAs

Um eine direkte Beziehung zwischen der oben gezeigten Expressionshemmung durch Rottlerin und der im Kapitel 3.2 dargestellten Hemmung der HuR-Translokation nachzuweisen, wurden HuR-Pulldown-RT-PCR Analysen durchgeführt. Hierbei werden durch eine Immunpräzipitation (IP) von HuR, HuR-gebundene mRNA präzipitiert, so dass HuR-assoziierte mRNAs nach einer RNA-Isolation und nach reverser Transkription durch PCR detektiert werden konnten. Da HuR seine Ziel-mRNAs sowohl im Kern als auch im Zytoplasma binden kann, wurden aus DLD-Zellen neben Kernextrakten auch zytosolische Zelllysate hergestellt. Die RT-PCR Analyse nach IP des HuRs zeigt, dass DLD-1 Zellen bereits unter unstimulierten Bedingungen eine hohe Affinität zu beiden untersuchten mRNAs (COX-2, Cyclin A) aufweisen (Abb. 18). Wie aus den vorigen Ergebnissen vermutet werden kann, ist die HuR-Bindung an COX-2 und Cyclin A mRNAs nach gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit Rottlerin nahezu vollständig aufgehoben (Abb. 18). Die Ergebnisse der Pulldown-RT-PCR Analyse beruhen nicht auf Unterschieden im Gesamt-RNA-Gehalt der für die jeweiligen IP Reaktionen eingesetzten Zellhomogenate, wie anhand der Gleichmäßigkeit der „Input“ Kontrolle mit GAPDH erkennbar ist (Abb. 18). Wie eine parallel durchgeführte Western Blot Analyse der für die Pulldown-Analyse verwendeten Zellfraktionen mit einem HuR-Antikörper zeigt, führte die Inkubation der Zellen mit Rottlerin [10 μ M] in diesem Versuch zu einer deutlichen Reduktion der zytosolischen HuR-Spiegel, während der Gehalt der Gesamt-HuR-Spiegel wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, nur unwesentlich durch die Rottlerin-Behandlung reduziert wird (Abb. 19).

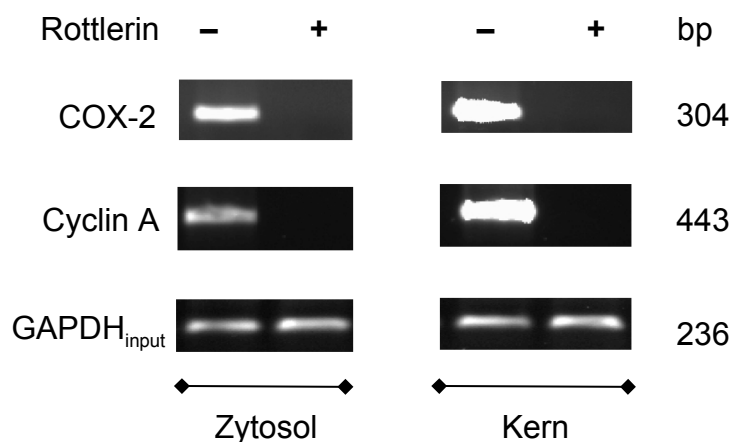


Abb. 18: Rottlerin hemmt die zytosolische (Zytosol) und nukleäre (Kern) HuR Bindung an COX-2 und Cyclin A mRNA in DLD-1 Zellen.

Konfluente DLD-1 Zellen wurden für 16h mit Rottlerin [10 M] stimuliert und für die nachfolgende RNA-Pulldown Analyse präpariert. Hierzu wurden 0.5 mg nukleäre oder zytosolische Extrakten mit einem monoklonalen HuR-Antikörper präzipitiert. Die HuR-gebundene mRNA wurde im Anschluss mit Hilfe der RT-PCR mit 30 Zyklen amplifiziert. Für die Normalisierung der eingesetzten mRNA Mengen wurden parallel zu COX-2- und Cyclin-mRNAs auch die mRNA Spiegel von GAPDH bestimmt („GAPDH input“). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von 2 unabhängigen Versuchen. Die Größe der PCR Produkte ist durch Angabe der Basenpaare (bp) gekennzeichnet.

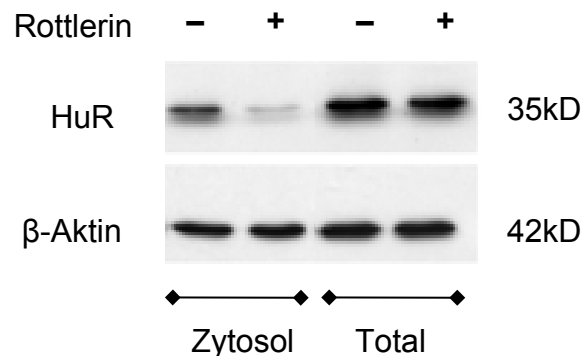


Abb. 19: Die Hemmung der HuR-Bindung an mRNA durch Rottlerin (Abb. 18) geht mit einer Reduktion des zytosolischen HuR-Gehalts einher.

Ein Teil der in Abb. 18 beschriebenen DLD-1-Zellen wurden parallel für die Isolation von Proteinextrakten für die Western Blot Analyse verwendet. Hierzu wurden jeweils 50 μ g eines zytosolischen Proteinextraktes (Zytosol) oder Gesamthomogenats (Total) eingesetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe eines HuR-spezifischen Antikörpers wurden die HuR-Spiegel in den jeweiligen Fraktionen detektiert. Die Größe der Bande wurde mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers bestimmt. Der gezeigte Western Blot zeigt ein repräsentatives Ergebnis zweier unabhängiger Versuche.

3.6 Identifizierung weiterer PKC-regulierter HuR-Zielgene mit Hilfe eines Zytokin-Antikörper-Arrays

3.6.1 Transiente Depletion von PKC δ mit Hilfe von siRNA-vermittelten Genattenuation

Weitere Aufgabe dieser Arbeit war, mit Hilfe von small interfering (si)RNA-Attenuation neben der pharmakologischen Inhibition auch eine biologische PKC δ -Depletion in DLD-1 Zellen zu erzielen und dessen Auswirkungen auf das Expressionsmuster von bislang unbekanntem putativen Zielgenen des HuRs zu untersuchen. Der Einsatz von siRNAs ist nach wie vor eine etablierte Methode zur Ermittlung der Wirkung eines spezifischen Genproduktes in der biomedizinischen

Grundlagenforschung. Neben einer Transfektion von PKC δ -spezifischer siRNA (10 nM) wurden die Zellen als Kontrolle auch mit einer PKC α -spezifischen siRNA transfiziert. 24h nach Transfektion der siRNA wurde ein Teil der Transfektanten zusätzlich mit dem PKC-Inhibitor Rottlerin [10 μ M] behandelt (+Rottlerin) (Abb. 20). Für die Überprüfung der PKC δ -Depletion durch siRNA wurden die PKC δ -Spiegel in Gesamthomogenaten mit Hilfe eines PKC δ -spezifischen Antikörpers bestimmt. Der erfolgreiche „Knockdown“ der PKC δ zeigt sich anhand des vollständigen Verlustes der PKC δ -spezifischen Bande im Western Blot (Abb. 20). Im Unterschied hierzu führt die Transfektion einer PKC α -spezifischen siRNA sogar zu einer geringfügigen Steigerung der PKC δ -Spiegel, die unerwarteter Weise nach Stimulation der Zellen mit Rottlerin partiell gehemmt wird (Abb. 20). Wie die Ladekontrolle mit einem β -Aktin-spezifischen Antikörper zeigt, können Unterschiede in der PKC δ -Expression nicht auf Ladungsunterschiede zurückgeführt werden (Abb. 20).

3.6.2 Effekt der biologischen Depletion von PKC δ durch siRNA auf die Expression von verschiedenen Zytokinen

Um zu ermitteln, ob die in Abb. 20 gezeigte Hemmung der PKC δ auch Einfluss auf die Expression von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, darunter einige bekannte HuR-Zielgene, hat, verwendeten wir in einem nächsten Versuchsansatz einen Zytokin-Antikörper-Array der Firma *Ray Biotech*. Zytokine und Wachstumsfaktoren gehören zu den wichtigen Zielgenen von HuR. Ihrer Expressionssteigerung kann eine maßgebliche Rolle bei der Pathogenese von Darmkrebs zugeschrieben werden [Balding et al., 2004; Slattery et al., 2007]. Der hier verwendete Zytokin Array beinhaltete humane Zytokine und Wachstumsfaktoren, die in Tabelle 8 zusammengefasst sind.

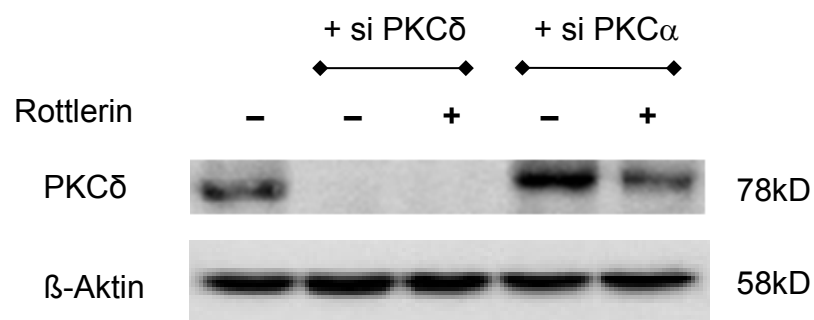


Abb. 20: Die Transfektion mit PKC δ -siRNA führt zu einer vollständigen Depletion der

PKC δ .

Western Blot zur Darstellung des PKC δ und - α -Depletionen in DLD-1 Zellen 20 h nach der Transfektion von siRNAs. Für eine Western Blot Analyse wurden die Gesamtproteinextrakte gewonnen und von jeder Probe 50 μ g Protein eingesetzt und im Anschluss daran elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von PKC δ erfolgte mit Hilfe eines PKC δ -spezifischen Antikörpers. Die Größe der Bande wurde mit einem Molekulargewichtsmarker bestimmt. Jede der gezeigten siRNAs wurde in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt.

POS	POS	NEG	NEG	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α
POS	POS	NEG	NEG	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α
IL-1 α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
IL-1 α	IL-2	IL-3	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10
IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTE S
IL-13	IL-15	IFN- γ	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MIG	RANTE S
TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	Blank	Blank	Blank	Blank	POS
TGF- β 1	TNF- α	TNF- β	Blank	Blank	Blank	Blank	POS

Tab. 8: Positionen der Zytokine auf der Membran.

Die Tabelle zeigt die jeweiligen, auf den Membranflächen verankerten Primär-Antikörper, die dem „RayBio[®] Human Cytokine-Antibody-Array 1 Map“ entnommen sind. POS: Positivkontrolle, NEG: Negativkontrolle.

Für den Versuch wurden DLD-1 Zellen wie in Abschnitt 3.6.1. beschrieben mit einer von der Firma Eurogentec erworbenen PKC δ -siRNA transient transfiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Kontroll-siRNA verwendet.

48 Stunden nach der Transfektion wurde für die Analyse des Zytokin-Protein-Arrays jeweils 2 ml Zellkulturüberstand gesammelt, aus mehreren Experimenten vereinigt und direkt für die Zytokin-Antikörper-Array Analyse eingesetzt. Hierzu wurde der gesamte Überstand mit Hilfe eines vom Hersteller mitgelieferten Gitter Trogs auf die mit verschiedenen Antikörpern beschichtete PVDF-Membran aufgetragen.

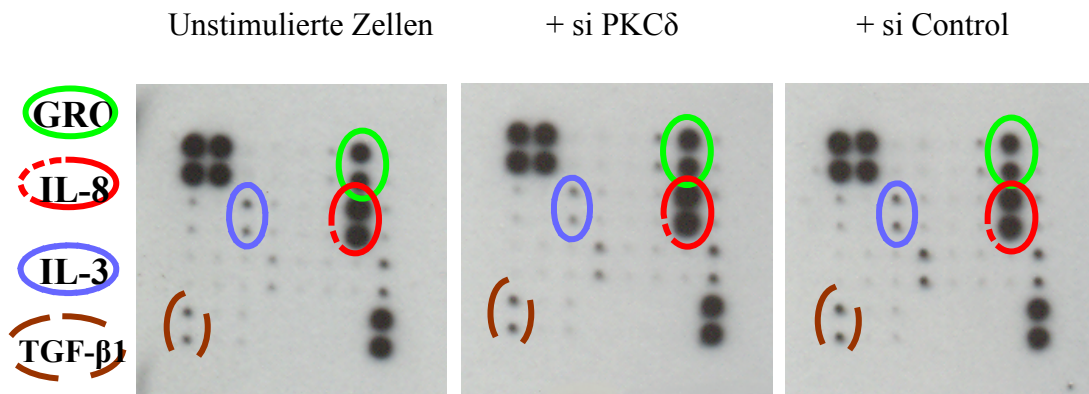


Abb. 21: PKC δ -siRNA vermindert die Expression von IL-3.

DLD-1 Zellen wurden für 20 h mit Hilfe der HiPerFect-Transfektionsreagenz transfiziert. PKC δ -siRNA und Kontroll-siRNA wurden jeweils in einer Konzentration von 10 nM eingesetzt. Für den Antikörper-Array wurde 20 h nach der Transfektion jeweils 1ml des Zellkulturüberstands aus drei vereinigten Versuchen verwendet. Dabei entsprechen die eingekreisten Immunospots den Primärantikörpern, die auf den entsprechenden Membranpositionen immobilisiert waren.

Ein repräsentatives Ergebnis eines solchen Versuchs ist in Abb. 22 gezeigt. GRO und IL-8 zeigen hohe extrazelluläre Basalspiegel in DLD-1 Zellen. Interessanterweise zeigt unter den in der Fachliteratur beschriebenen HuR-regulierten Zielgenen IL-3 (blaue Umrandung), IL-8 (rote Umrandung), GRO (grüne Umrandung) und TGF- β_1 (braune Umrandung) lediglich die Expression des IL-3 eine geringe Abnahme nach der PKC δ -siRNA Transfektion (+PKC δ -siRNA), während die Transfektion der Zellen mit einer Kontroll-siRNA keinen Einfluss auf die basale IL-3-Expression zeigte (Abb. 22).

3.6.3 Auswirkungen einer pharmakologischen Inhibition der PKC δ mit Rottlerin

Ergänzend zur biologischen PKC δ -Depletion sollte die Wirkung des PKC δ -Inhibitors Rottlerin auf die extrazellulären Expressionsspiegel der in 3.6.2. untersuchten Zytokine mit Hilfe des oben beschriebenen Zytokin-Arrays überprüft werden. Wie in Abb. 22 zu sehen, zeigen GRO und IL-8 in diesem Experiment eine bereits hohe konstitutive Expression in DLD-1 Zellen. Nach 16-stündiger Rottlerin-Behandlung zeigt sich ein unterschiedliches Expressionsmuster der einzelnen Zytokine. Besonders auffällig ist die Verminderung der GRO-Expressionsspiegel (grüne Umrandung), wohingegen die Expression von IL-3 (blaue Umrandung) und TGF- β_1 (braune Umrandung) nach einer Rottlerin-Behandlung eher verstärkt wird. Die Expression von IL-8 (rote Umrandung)

hingegen zeigt sich unverändert.

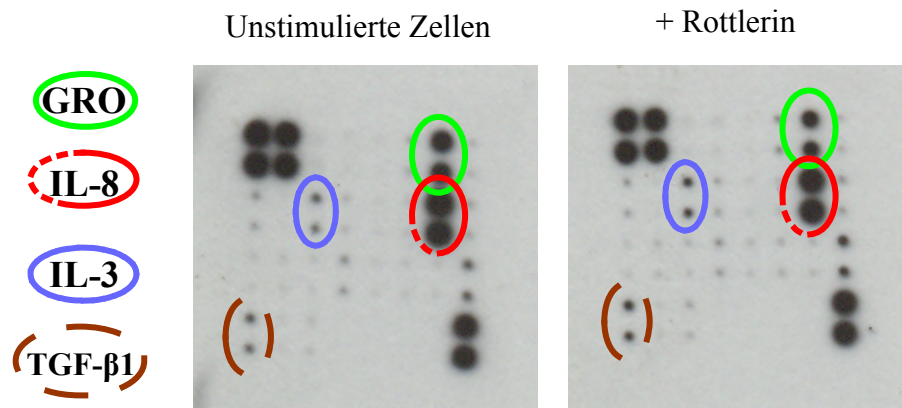


Abb. 22: Einfluss von Rotlerin auf die Expression verschiedener Zytokine.

DLD-1 Zellen wurden für 16 h mit Rotlerin [10 µM] stimuliert. Für den Antikörper-Array wurden Zellkulturüberstände aus drei vereinigten Versuchen eingesetzt. Es wurde jeweils 1 ml des Zellkulturüberstandes verwendet. Dabei entsprechen die eingekreisten Immunospots die Primärantikörper, die auf den entsprechenden Membranpositionen immobilisiert waren.

4 Diskussion

Die pathophysiologische Bedeutung der posttranskriptionellen Genregulation ist in den letzten Jahren durch zahlreiche Untersuchungen belegt worden. Neben Dysregulationen von miR-vermittelten Veränderungen des Transkriptoms, ist die fehlerhafte Kontrolle von RBPs mit Wirkung auf die mRNA-Stabilität und/oder Translation für die Entwicklung einer Reihe von einigen prominenten Krankheitsprozessen wie chronische Entzündungen, Fibrosierungen und Krebs von zentraler Bedeutung. Hierbei können beide Kontrollmechanismen gleichermaßen durch das ubiquitär exprimierte RBP HuR, welches im Fokus der vorliegenden Arbeit war, entscheidend mitbeeinflusst werden. Bemerkenswerterweise kann HuR die miR-vermittelte Expressionshemmung sowohl positiv (etwa durch Erleichterung der miR Rekrutierung an die betreffende mRNA) als auch negativ (durch kompetitive Hemmung der miR Bindung) beeinflussen [Guo et al., 2009, Leucci et al., 2012].

Die vorliegende Dissertation hat sich schwerpunktmäßig mit der Charakterisierung der intrazellulären Verteilung von HuR in humanen Kolonkarzinomzellen unter der besonderen Berücksichtigung von PKC δ -abhängigen Signalwegen beschäftigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die zum damaligen Zeitpunkt vorhandenen Erkenntnisse über eine deutliche zytoplasmatische Lokalisation von HuR in Tumorzellen [Denkert et al., 2006; Winzer et al., 2004; Wang et al., 2009] am Beispiel der beiden Kolonkarzinom- Zelllinien DLD-1 und SW620 unter der Verwendung von sowohl mikroskopischen als auch biochemischen Methoden bestätigen (Abb. 8). Tierversuche an Mäusen haben gezeigt, dass der zytosolische HuR-Gehalt eng mit einem Malignitätsgrad der Kolonkarzinomzellen korreliert [Lopez de Silanes et al., 2003]. Eine subkutane Injektion von HuR-überexprimierten RKO-Zellen in Mäusen führt beispielsweise zur Entstehung größerer Tumore als in der Kontrollgruppe, was die Autoren zum Schluss kommen lässt, dass die von HuR regulierte Zielgen-mRNA Expression maßgeblich zum Tumorwachstum beiträgt. Eine positive Korrelation zwischen erhöhtem zytosolischem HuR-Gehalt und Malignitätsgrad konnte mittlerweile auch anhand von Biopsiematerial aus verschiedenen Tumoren bestätigt werden [Erkinheimo et al., 2003; Heinonen et al., 2005; Denkert et al., 2006]. Im deutlichen Unterschied zu vielen Tumorzellen, weist das ubiquitär exprimierte HuR in gesunden Zellen normalerweise eine nahezu ausschließlich nukleäre Lokalisation auf [Fan und

Steitz, 1998]. Lediglich nach Exposition der Zellen mit bestimmten Noxen wie z.B. LPS, ionisierende oder Röntgen-Strahlung, inflammatorische Zytokine oder Peptide wie z.B. Angiotensin-2 kann ein transienter Anstieg von zytoplasmatischem HuR beobachtet werden [Li et al., 2002; Lafarga et al., 2009; Doller et al., 2008]. Im direkten Vergleich der beiden Zellfraktionen (Kern und Zytosol) durch Western Blot Analyse zeigt sich jedoch, dass der überwiegende Teil des zellulären HuRs im Zellkern vorhanden ist (Abb. 8). Dies deutete darauf hin, dass nur ein geringer Teil des HuR in Kolonkarzinomzellen basal aktiv ist.

Funktionell muss die physiologische und Stimulus-abhängige HuR Translokation von der pathophysiologischen und konstitutiven HuR Translokation differenziert werden. Da HuR vor allem als mRNA-stabilisierendes RBP bekannt ist, kann eine erhöhte Stabilisierung bestimmter, meist kurzlebiger mRNAs, welche häufig mit einem erhöhten zytosolischen Gehalt von HuR korreliert in einen kausalen Zusammenhang gebracht werden. Dabei bindet HuR nach derzeitigem Kenntnisstand seine Ziel mRNA bereits im Zellkern und transportiert diese nach Passage der Kernporen ins Zytoplasma. Hierbei sind in einigen Fällen Interaktionen sowohl mit bestimmten Proteinen des Kernporen-Komplexes als auch mit bestimmten Zytoskelett Elementen von Bedeutung [Rebane et al., 2004; Eberhardt et al., 2016], wodurch HuR an der Stabilisierung verschiedener Wachstums-, Angiogenese- und entzündungsregulierender Faktoren beteiligt ist. So spielt beispielsweise die erhöhte mRNA-Stabilität der induzierbaren Cyclooxygenase (COX-2) neben chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen auch eine kausale Rolle bei der Kolonkarzinogenese [Dixon et al., 2001, Denkert et al., 2006]. Mittels verschiedener pharmakologischer Hemmstoffe wurde zunächst versucht, die Beteiligung der beim Transport von HuR kritischen Kinasewege zu identifizieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre HuR-Lokalisation durch den pharmakologischen PKC δ -Inhibitor Rottlerin in den Kolonkarzinom Zelllinien DLD-1 und SW-620 deutlich verändert wird während Inhibitoren von verschiedenen MAPK-Kinasen (SB203580, SP600125, PD98059, Raf-1-Inhibitor usw.) keinen Einfluss auf die zytosolischen HuR-Spiegel in den untersuchten Krebszellen zeigen (Abb. 9). In einer weiteren Reihe von Experimenten konnte gezeigt werden, dass der basale zytosolische HuR-Gehalt in verschiedenen Kolonkarzinomzellen in Gegenwart von Rottlerin stark reduziert ist während Gö6976, ein pharmakologischer Inhibitor der

Calcium-abhängigen PKCs (PKC α und PKC β) keinen Einfluss auf die basalen zytoplasmatischen HuR Spiegel zeigte (Abb. 11). Zeitkinetik-Experimente haben darüber hinaus belegt, dass die maximale Hemmung durch Rottlerin erst nach einer Inhibitionszeit von 16 Stunden erreicht wurde. Obwohl die Selektivität von Rottlerin als PKC-spezifischer Inhibitor in der Fachliteratur mittlerweile stark angezweifelt wird [Soltoff, 2007], konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass Rottlerin in gleicher Potenz wie der Breitband-PKC Inhibitor Staurosporin die PKC Aktivität in DLD-1 Zellen hemmt, während die Behandlung der Zellen mit dem Phorbolester PMA zu einer deutlichen Steigerung der PKC-Aktivität führt (Abb. 14). Dies belegt, dass Rottlerin die PKC δ Aktivität in DLD-1 Zellen hemmt, obgleich eine Hemmung anderer Proteinkinasen nicht ausgeschlossen werden kann. Versuchsansätze zur genetischen Depletion der PKC δ mittels spezifischer siRNA Transfektion waren leider nicht genügend aussagekräftig, da vermutlich durch die Transfektionsprozedur die HuR Translokation durch stressabhängige Mechanismen aktiviert werden.

Trotz der in der Fachliteratur angezweifelten Selektivität des Rottlerins gegenüber PKC δ findet diese Substanz in vielen Untersuchungen nach wie vor als pharmakologischer Inhibitor der PKC δ Verwendung. Dies mag daran liegen, dass bislang keine selektivere Substanz für PKC δ zur Verfügung steht. Wie aus frühen Arbeiten von Gschwendt *et al.* anhand von zellfreien Kinaseassays ermittelt wurde, besitzt Rottlerin eine deutlich höhere inhibitorische Wirkung gegenüber PKC δ (IC₅₀ zwischen 3-6 μ M) gegenüber PKC α , β und γ (IC₅₀ von 30-42 μ M) als auch gegenüber PKC ϵ , η und ζ (IC₅₀ von 80-100 μ M). Mechanistisch wird die inhibitorische Wirkung von Rottlerin hauptsächlich einem kompetitiven Antagonismus mit ATP zugeschrieben [Gschwendt et al., 1994]. Die hier in Zellkultur verwendete Dosis von 10 μ M entspricht durchaus einer niedrigen bis mittleren Dosierung, da durch die notwendige Zellpenetration generell höhere Konzentrationen erforderlich sind. Wie bereits erwähnt, haben neuere Arbeiten indessen die Selektivität von Rottlerin gegenüber PKC δ stark angezweifelt. So hemmt Rottlerin neben PKC δ auch andere Kinasen wie z.B. die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) als auch einige Proteine ohne Enzymfunktion wie z.B. Ca²⁺- sensitive K Kanäle [als Review s. Soltoff SP, 2007]. Die Hemmung der PKC δ durch Rottlerin ist vielmehr sekundär auf eine Entkopplung von

Mitochondrien und der nachfolgenden Reduktion der zellulären ATP Spiegel zurückzuführen und weniger auf eine direkte Competition am Enzym selbst. So können auch andere klassische mitochondriale Entkoppler über Senkung der intrazellulären ATP Spiegel die PKC δ Aktivierung durch Hemmung deren Tyrosinphosphorylierung herbeirufen. Erwähnt sollte auch werden, dass Rottlerin zur erhöhten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt. Ein Anstieg von ROS kann zahlreiche Zellfunktionen beeinträchtigen und somit möglicherweise eine Hemmung von PKC vermittelten Prozessen vortäuschen [Byun et al., 2014]. Trotz diesen kritischen Erkenntnissen aus der Fachliteratur, untermauern die folgenden Befunde eine gewisse Spezifität von Rottlerin für PKC δ in DLD-1 Zellen. Zum einen kann Rottlerin die basale zytosolische HuR Verteilung im Zytosol dosisabhängig herabsetzen, während Gö6976, ein Hemmstoff der klassischen PKCs sowie diverse Inhibitoren der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (SB203580, PD98059, SP600125, Raf-1-Inhibitor) keine hemmende Wirkung auf die intrazelluläre HuR Verteilung von DLD-1 Zellen zeigten (s. Abb. 9). Zudem konnte mithilfe eines enzymatischen PKC Aktivitätstests gezeigt werden, dass Rottlerin ähnlich wie Staurosporin die Aktivität von PKC δ in DLD-1 Zellen deutlich hemmt. Im Gegensatz hierzu führte eine Stimulation der Zellen mit TPA zu einer deutlichen Steigerung der Aktivierung (Abb. 14) was die Funktionalität des Essays belegt. In einem weiteren Schritt konnte mit Hilfe von siRNA-Attenuation eine biologische PKC δ -Depletion in DLD-1 Zellen erzielt werden und deren Auswirkungen auf das Expressionsmuster einiger putativer Zielgene des HuRs eruiert werden. In der medizinischen Grundlagenforschung wurde und wird noch immer siRNA standardmäßig eingesetzt, um die Wirkung des kurzzeitigen Ausfalls eines spezifischen Genproduktes zu ermitteln. Mithilfe von Western Blot Analyse konnte bei diesen Versuchen gezeigt werden, dass die Transfektion von DLD-1 Zellen mit PKC δ -siRNA zu einer vollständigen Depletion der PKC δ führt (Abb. 20). Bei der Pathogenese des Kolonkarzinoms wird einer erhöhten Expression einiger wichtiger Zytokine und Wachstumsfaktoren eine kausale Rolle zugeschrieben [Balding et al., 2004; Slattery et al., 2007]. Die Entzündungsvorgänge im Darm werden durch Produktion von löslichen Faktoren u.a. von Zytokinen, Chemokinen und anderen Mediatoren durch Tumorzellen selbst sowie durch Zellen des unmittelbaren Tumorstromas wie z.B. Makrophagen und Mastzellen aufrechterhalten [als Übersicht s. Klampfer L, 2011]. Eine maßgebliche

Rolle dieser tumor-assoziierten Immunzellen und ihrer löslichen Faktoren bei der Initiierung und Progression von Darmkrebs ist durch experimentelle Befunde belegt, die u.a. zeigen konnten, dass eine Depletion von Mastzellen oder Makrophagen zu einer Remission von genetisch bedingten intestinalen Polypen bei adenomatösen Polyposis coli (Apc)- multiple intestinal neoplasia min/+ Mäusen führt [Gounaris et al., 2007; Oguma et al., 2008]. Bei diesem Gendefekt ist das Allel des murinen Apc-Locus am Codon 850 derart mutiert, dass ein funktionsloses Protein exprimiert wird (sogenannte „Nonsense“ Mutation). Das durch APC kodierte Protein ist ein wichtiger Tumorsuppressor im Wnt-Signalweg, dessen Verlust zu einem gesteigerten und unkontrollierten Wachstum und zu einer fehlerhaften Differenzierung von Epithelzellen führt. Apc^{Min+/-} Mäuse gelten daher als geeignetes genetisches Modell für die humane Kolonkarzinogenese [Senda et al., 2005; 2007]. Zudem entwickeln Apc^{Min+/-} Mäuse mit einem defizienten TLR (Toll-like receptor) Signalweg seltener spontane Tumoren [Rakoff-Nahoum et al., 2007]. Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom sind die Serumspiegel von einigen prominenten Zytokinen wie z.B. TNF α , IL-8, IL-6 und VEGF signifikant erhöht, sodass erhöhte Plasmaspiegel dieser Zytokine nicht nur als negative Prognosefaktoren genutzt werden sondern auch als potentielle Zielmoleküle der modernen zielgerichteten Krebstherapie dienen [Knupfer et al., 2009]. Einige dieser Anti-Zytokinstrategien wie z.B. Etanercept (Enbrel[®], löslicher TNF α -Rezeptor) oder Infliximab (Remicade[®], Antikörper gegen lösliches TNF α) sind bereits seit einigen Jahren etablierte Medikamente zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen. Zytokine modulieren das Tumorstadium und verstärken die Invasivität von Tumorzellen durch eine Stimulation von onkogenen Signalwegen in Tumorzellen wie z.B. die Aktivierung von NF- κ B durch TNF α und IL-1 β bzw. eine Aktivierung von STAT3 durch IL-6 [Lin et al., 2007]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass bestimmte Onkogene wie k-Ras NF κ B-Signalwege in Tumorzellen induzieren können und damit die Produktion verschiedener proinflammatorischer Mediatoren auslösen können [Ancrile et al., 2007; Sparmann et al., 2005]. Durch Verwendung eines humanen Zytokin-Antikörper-Arrays (*Ray Biotech*) sollte der Einfluss einer transienten siRNA-vermittelten PKC δ Depletion in DLD-1 Zellen auf die Expression von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren untersucht werden. Der von uns verwendete Array diente u.a. zur Detektion von putativen HuR-Zielgenen wie IL-3, IL-8, GRO und TGF-

β_1 (Tab. 8, Abb. 21, 22). Die Auswertung ergab, dass für GRO und IL-8 hohe extrazelluläre Spiegel in unstimulierten DLD-1 Zellen vorliegen, was möglicherweise darauf hindeutet, dass die konstitutive Sekretion dieser beiden Zytokine bei der Kolonkarzinogenese eine kausale Rolle spielt. Da uns jedoch zum damaligen Zeitpunkt keine gesunden Darmepithelzellen (z.B. humane embryonale Darmepithelzellen CCD-841) zur Verfügung standen, konnten keine entsprechenden Referenzmessungen mit gesunden Darmepithelzellen durchgeführt werden. Als mögliche PKC δ modulierte Zytokine in DLD-1 Zellen zeigen sich das IL-3 und GRO (Abb. 21). Jedoch soll erwähnt werden, dass der modulierende Einfluss auf den extrazellulären Gehalt der besagten Faktoren von der Methode der PKC Attenuation abhängt. Während eine pharmakologische Behandlung der Zellen mit Rottlerin zur Hemmung von extrazellulärem GRO führt, zeigt sich bei PKC δ -siRNA depletierten Zellen im Vergleich zu Kontroll siRNA transfizierten Zellen eine umgekehrte Tendenz (Abb. 21). Umgekehrt sind die extrazellulären IL-3 Spiegel nach Rottlerinbehandlung geringfügig erhöht während die genetische PKC δ Depletion zu einer leichten Abnahme der IL-3 Spiegel führt (Abb. 22). Da Rottlerin wie bereits zuvor erwähnt, mittlerweile als ein relativ unselektiver Kinaseinhibitor gilt, sollten die Ergebnisse der genetischen PKC δ Attenuation mehr Gewichtung erfahren. Für eine eindeutige Aussage über die mögliche Bedeutung der PKC bei der Zytokinexpression bedarf es einer statistischen Auswertung aus mehreren unabhängigen Versuchen. Hierbei sollte erwogen werden, ob anstelle eines auf Western Blot basierendem Detektionsverfahren besser eine ELISA basierte Detektionsmethode verwendet werden sollte. Um weiterhin aussagen zu können, ob die beobachteten Einflüsse der PKC möglicherweise direkte Konsequenz eines gehemmten kanonischen PKC δ -HuR-Signalwegs in DLD-1 Zellen sind, müssten zusätzlich Experimente zur Bestimmung der intrazellulären Zytokinpiegel und der entsprechenden mRNA-Spiegel durchgeführt werden. Entsprechende Befunde zur HuR-abhängigen posttranskriptionellen Regulation von IL-3 sind in der Literatur für T-Zellen bereits beschrieben [González-Feliciano et al., 2014].

Der Arbeitsgruppe ist nach Anfertigung dieser Arbeit der Nachweis gelungen, dass die Behandlung mit Rottlerin eine ähnliche supprimierende Wirkung auf die Migration von DLD-1 Zellen zeigt wie eine siRNA-vermittelte transiente Hemmung der PKC δ Expression [Doller et al., 2011]. Zusätzlich konnte in weiterführenden Untersuchungen

gezeigt werden, dass HuR in DLD-1 Zellen tatsächlich konstitutiv phosphoryliert ist, insbesondere an der Serinposition 318. Mit Hilfe von Immunpräzipitationsversuchen konnte von wissenschaftlichen Kollegen der Arbeitsgruppe belegt werden, dass diese konstitutive Phosphorylierung in mit Rottlerin behandelten Zellen stark reduziert wird, was die Effizienz von Rottlerin in Bezug auf die Hemmung der PKC δ -vermittelten HuR Phosphorylierung unterstreicht [Doller et al., 2011]. Schließlich haben zellfreie Phosphorylierungsversuche mit rekombinanten HuR und PKC Proteinen zeigen können, dass Rottlerin im Gegensatz zu Gö6976 die PKC vermittelte *in vitro* Phosphorylierung von HuR vollständig aufhebt. Für zukünftige Untersuchungen wäre die mittlerweile etablierte, zum damaligen Zeitpunkt aber noch unbekannt CRISPR-Cas9 vermittelte Genattenuation eine weitere geeignete Methode, um die funktionelle Bedeutung von PKC δ für verschiedene HuR Funktionen in Kolonkarzinomzellen weiterhin zu bestätigen. Neben PKCs sind weitere Proteinkinasen bei der Fehlregulation von HuR und der damit verbundenen erhöhten mRNA-stabilisierenden Wirkung bei der Tumorentwicklung beteiligt. Beispielsweise konnte in humanen Glioblastomzellen nachgewiesen werden, dass eine verstärkte IL-6 Bildung über ein mutiertes EGF-Rezeptorsignal nachfolgend die kanonische p38 MAPK-MK2- Signalkaskade aktiviert wird, welche dann zum erhöhten nukleozytoplasmatischen HuR-Shuttling führt. Letzteres führt wiederum zu einer Stabilisierung von IL-6 mRNA. Die erhöhte Synthese von IL-6 scheint maßgeblich zur Entartung von niedrigmalignen Gliomen hin zu hochaggressiven Glioblastomen beizutragen [Gurgis et al., 2015]. Ähnlich kann die durch TNF α -induzierte Expression des interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) in Lungenendothelzellen zusätzlich über eine p38 MAPK-MK2-vermittelte Aktivierung von HuR posttranskriptionell gesteigert werden [Wu et al., 2016]. Auch in hypertrophierten Kardiomyozyten spielt die gesteigerte HuR Translokation ins Zytoplasma eine wichtige pathophysiologische Rolle. Wie die Arbeitsgruppe von Slone *et al.* in Versuchen mit Ratten zeigen konnten, führt die Stimulation von Kardiomyozyten mit Phenylephrin oder Angiotensin II über eine transkriptionelle Aktivierung von NFAT (nukleärer Faktor von aktivierten T-Zellen) als Endstrecke der Gq-p38-MAPK Signalkaskade zur deren Hypertrophie [Slone et al., 2016]. Zudem konnte die Gruppe um Martinez-Chantar *et al.* zeigen, dass eine durch Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) stimulierte Aktivierung der AMP-activated protein kinase

(AMPK) den nukleozytoplasmatischen Transport von HuR fördern und hierdurch die mRNA-Stabilität von z.B. Cyclin A2 erhöhen kann, was wiederum zur Progression der Zellzyklus Prozessen in den Hepatozyten führt und die Entwicklung von einem hepatozellulären Karzinom begünstigt [Martinez-Chantar et al., 2006].

Eigene Arbeitsgruppe konnte in Fortsetzung zu den hier dargestellten Experimenten zeigen, dass Proteinkinase C α in glomerulären Mesangiumzellen HuR an der Serinposition 158 und 221 phosphoryliert und diese Phosphorylierung nach Stimulation der Zellen mit Adenosintriphosphat (ATP) in Abhängigkeit des purinergen Rezeptorproteins P2Y induziert wird [Doller et al., 2007]. Im Gegensatz dazu führt die Behandlung von Mesangiumzellen mit Angiotensin II über Aktivierung von PKC δ zu einer HuR Phosphorylierung an Serin 221 und 318 [Doller et al., 2008, 2010]. Die gemeinsame Endstrecke beider unterschiedlicher physiologischer Stimuli ist somit die posttranslationale Modifizierung an Serin 221 innerhalb der Hinge Region des HuR Proteins, welche interessanterweise auch eine typische nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) besitzt. Eine Modifizierung an dieser Aminosäureposition führt zu einem verstärkten Export von HuR ins Zytoplasma. Die stimuluspezifische Phosphorylierung von HuR an Serin 158 bzw. 318 durch ATP bzw. Angiotensin II führt, wie wir inzwischen wissen, zur erhöhten Bindungsaffinität von HuR an bestimmte Ziel mRNAs wie z.B. Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA. Die für die RNA-Bindung relevanten Serine befinden sich einerseits innerhalb der RNA-bindenden Motive (RRM) -2 (PKC α) bzw. -3 (PKC δ). Dies lässt vermuten, dass eine über PKC vermittelte Phosphorylierung gleichermaßen die RNA-Bindung des HuRs als auch dessen intrazellulären Transport beeinflusst. Über molekulare Mechanismen des konstitutiv erhöhten nukleozytoplasmatischen HuR-Shuttlings in Krebszellen, insbesondere über die pathophysiologische Bedeutung einer über PKC vermittelten Phosphorylierung des HuR gibt es bislang in der Literatur keine Hinweise. Wie in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von RNA-Pulldown Experimenten gezeigt werden konnte, führt die Behandlung von humanen Kolonkarzinomzellen mit Rottlerin zu einem vollständigen Verlust der konstitutiven HuR Bindung an prototypische Zielgene wie COX-2 und Cyclin A (Abb. 18). Interessanterweise konnte eine starke HuR Bindung an COX-2 mRNA sowohl im Kern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die konstitutive HuR Bindung an COX-2 und andere Ziel mRNAs vollständig durch

Rottlerin gehemmt wird, was auf eine kritische Rolle der PKC δ bei der basalen HuR Bindung an ARE-reiche Transkripte in diesen Tumorzellen hinweist. Die mögliche funktionelle Bedeutung der gehemmten HuR Bindung an besagte Zielgene wird durch die starke Reduktion der jeweiligen zellulären RNA Spiegel nach Rottlerin Behandlung gestützt (Abb. 17). PKC δ wird in der Fachliteratur u.a. als Proteinkinase mit einer proapoptischen und antiproliferativen Wirkung beschrieben und ist darüber hinaus als Zelltodmediator nach Chemo- und/oder Strahlentherapie bekannt [Irie et al., 2012; Yonezawa et al., 2009; Gonelli et al., 2009; Zhao et al., 2012]. PKC δ wird beispielsweise sowohl für die Entstehung von DNA-Schäden als auch für Fas-Rezeptor-vermittelten Zelltod verantwortlich gemacht [Griner et al., 2007; Zhao et al., 2012; Basu et al., 2010]. Da in meinen Experimenten jedoch keine Spaltung der PKC δ nachgewiesen werden konnte, ist die konstitutive HuR- Phosphorylierung durch PKC δ in DLD-1-Zellen vermutlich funktionell nicht auf eine Caspase-3- abhängige PKC δ -Spaltung zurückzuführen. Allerdings ist bekannt, dass nicht nur die gespaltene Form der PKC δ , sondern auch das vollständige Enzym in der Lage ist, Apoptose induzieren zu können [DeVries-Seimon et al., 2007]. Im Gegensatz zu Studien, die eine eindeutige proapoptische Rolle von PKC δ gezeigt haben, kann PKC δ in einigen Tumorzellen auch als ein Überlebensfaktor (survival factor) fungieren [Mackay et al., 2007]. Demzufolge scheint die funktionelle Rolle der PKC δ bei der Apoptose letztendlich ein streng Zelltyp-abhängiges Phänomen zu sein. Darüber zeigen die meisten Tumorzellen eine hohe Apoptoseresistenz was in Einklang mit dem in vielen Krebszellen hochregulierten antiapoptotisch wirksamen HuR steht. Prominente Beispiele von antiapoptotischen Faktoren, deren mRNA durch HuR stabilisiert wird, sind Bcl-2, Mcl-1 und SIRT1 [Abdelmohsen et al., 2007]. Hieraus kann gefolgert werden, dass der hohe nukleäre PKC δ Gehalt in der humanen Kolonkarzinom Zelllinie DLD-1 über direkte Phosphorylierung von kernständigem HuR eine zentrale Rolle bei dessen antiapoptotischen Wirkung spielt. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese macht durch die Beobachtung von Pongracz *et al.* deutlich, dass die Expressionsspiegel der PKC δ Isoform im Kolonkarzinomgewebe im Unterschied zu vielen anderen Tumorgewebearten deutlich erhöht sind. Dies läßt auf eine prokarzinogene Rolle der PKC δ im Kolongewebe schließen [Pongracz et al., 1995]. Interessanterweise ist eine erhöhte Expression beider Gene kausal an der Kolonkarzinogenese beteiligt [Dixon et

al., 2001; Lim et al., 2009; Wang et al., 2000; Prescott et al., 2000]; s.a. Einleitung 1.3.2 bzw. 1.4.4].

Zusammenfassend lassen die hier vorgestellten Daten einen kanonischen PKC δ -HuR-Signalweg vermuten, welcher in Kolonkarzinomzellen gegenüber nichttransformierten Zellen konstitutiv aktiv ist.

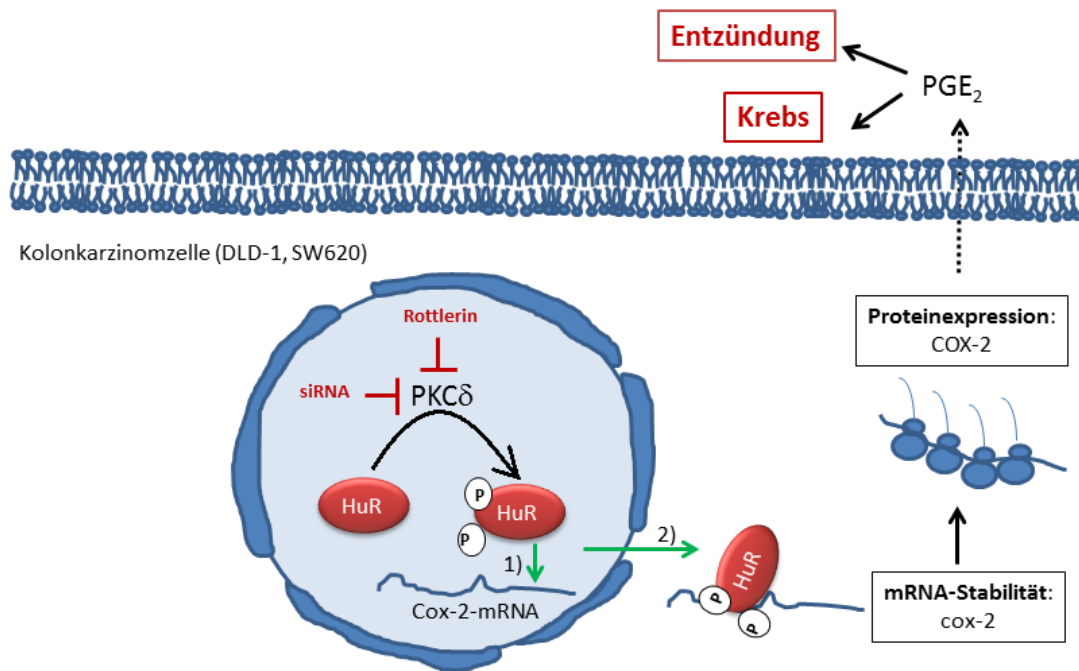


Abb. 23: Zusammenfassendes Schema der Mechanismen und funktionellen Bedeutung der PKC δ -kontrollierten HuR-Aktivität für die erhöhte Cyclooxygenase-Expression und der damit verbundenen PGE₂-Synthese in humanen Kolonkarzinomzellen.

Ausblick:

Die hier gemachten Befunde konnten das tumorhemmende Potential von PKC δ -inhibitorischen Strategien durch zielgerichtete Pharmaka unterstützen. Damit können nicht nur HuR, sondern auch andere tumorigene Zielgene über spezifische Hemmung günstig beeinflusst werden. Zusätzlich zeigt die Arbeit, dass eine direkte Manipulation verschiedener HuR Aktivitäten (Transport, RNA Bindung) ein attraktiver Ansatz zukünftiger Darmkrebstherapien ist. Neben der erhöhten zytosolischen Lokalisation könnte der Phosphorylierungsgrad von HuR als neuer valider diagnostischer Marker für das Frühstadium des kolorektalen Karzinoms in der klinischen Praxis genutzt werden.

5. Zusammenfassung

Weltweit stellt das kolorektale Karzinom die dritthäufigste Krebsdiagnose bei Männern und die zweithäufigste bei Frauen dar. Von den bekannten beeinflussbaren Risikofaktoren sind Ernährung, Rauchen und körperliche Aktivität zu nennen, hingegen gelten Alter, familiäre Belastung und männliches Geschlecht als nicht beeinflussbare Risikofaktoren. Neben Genmutationen, welche beispielsweise bei der Familiären Adenomatösen Polyposis coli und beim “Lynch Syndrom” eine wichtige Rolle spielen, kann auch die pathologisch verstärkte Expression von tumorrelevanten Proteinen wie z.B. induzierbare COX-2, Cyclin A, B und D, c-Fos, EGF, MMP-9, VEGF sowie das ubiquitäre RNA-Bindeprotein HuR maßgeblich zur Entstehung des Kolonkarzinoms beitragen. Viele der bislang identifizierten Zielgene des HuRs sind an der Regulation tumorpromovierender Eigenschaften wie Proliferation, Invasion, Metastasierung und Apoptose beteiligt, was HuR zu einem hochattraktiven Target der molekularen Tumorthherapie macht. Bislang ist bekannt, dass eine gesteigerte HuR-Bindung an AREs in der 3’UTR vieler Zielgene entweder zur Stabilisierung und/oder Translationsveränderung von kurzlebigen mRNAs von tumorrelevanten Genprodukten führen kann. Eine pathologisch erhöhte zytosolische HuR Akkumulation, welche bekanntlich oft mit einer ungünstigen Prognose der Tumorpatienten korreliert, wird jedoch im Wesentlichen als Folge eines fehlerhaft regulierten erhöhten Exportes des überwiegend im Zellkern lokalisierten HuR Proteins ins Zytoplasma (sogenanntes “HuR-Shuttling”) betrachtet, während genomische oder epigenetische Mechanismen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle spielen. Der Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der bisher nur wenig bekannten zugrundeliegenden Mechanismen des erhöhten HuR-Shuttlings in der Kolonkarzinom-Zelllinie DLD-1 unter besonderen Berücksichtigung PKC δ -abhängiger Signalwege. Durch Zugabe des pharmakologischen PKC δ -Inhibitors Rottlerin konnte die subzelluläre HuR-Lokalisation in den Kolonkarzinom Zelllinien DLD-1 und SW-620 deutlich reduziert werden, wobei die maximale Wirkung erst nach einer Inhibitionszeit von 16 Stunden erreicht wurde. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Rottlerin die PKC δ Aktivität in DLD-1 Zellen hemmt. Hingegen konnten Inhibitoren von verschiedenen MAPK-Kinasen (SB203580, SP600125, PD98059, Raf-1-Inhibitor) die basale zytoplasmatische

HuR Lokalisation nicht beeinflussen, ebensowenig der pharmakologische Inhibitor der Calcium-abhängigen PKCs (PKC α und PKC β) Gö6976. Auf der anderen Seite bewirkte das Phorbolster PMA eine deutliche Steigerung der PKC-Aktivität. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit nach tumorrelevanten Genen gesucht, deren Expression in humanen Kolonkarzinomzellen posttranskriptionell von HuR und gleichzeitig von PKC δ kontrolliert wird. Mit Hilfe von RNA-Pulldown Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der PKC δ funktionell zu einer starken Reduktion der an HuR-gebundenen mRNAs wie c-myc, cyclin A und D sowie COX-2 führt. Schließlich haben Aktivitätsmessungen der Gesamt-PKC Aktivität gezeigt, dass diese in Kolonkarzinom-Zelllinien nachweisbar und damit basal aktiv ist. Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit können zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Bedeutung des ubiquitären RNA-Bindeproteins HuR für die Kolonkarzinogenese sowie der prokarzinogenen Rolle der PKC δ im Kolongewebe beitragen.

6 Summary

Colorectal carcinoma is the third most common cancer diagnosis made in men and the second most common in women worldwide. Whereas nutrition, smoking and physical activity are known risk factors that can be influenced directly, others such as age, familial predisposition and male gender account as risk factors which can not be influenced. In addition to gene mutations which play an important role in familial adenomatous polyposis coli and in the "Lynch syndrome", the pathological overexpression of tumor-relevant proteins such as e.g. inducible COX-2, cyclin A, B and D, c-Fos, EGF, MMP-9, VEGF and the ubiquitous RNA binding protein HuR seem to essentially contribute to the development of colorectal cancer. Since many target genes of HuRs which have been identified so far, are involved in the regulation of tumor-promoting processes including proliferation, invasion, metastasis and apoptosis, HuR represents a highly attractive target for a molecular tumor therapy. It is well established that increased HuR binding to AU-rich elements in the 3'UTR of the target RNAs leads to a stabilization and/or altered translation of short-lived mRNAs of tumor-relevant gene products. However, the pathologically increase in cytosolic HuR expression within many cases correlates with a negative prognosis of tumor patients, is considered as result of an increased export of the predominantly nuclear-localized HuR protein into the cytoplasm (so-called "HuR-shuttling"). By a contrast, genomic or epigenetic mechanisms probably play only a minor role in this scenario. The object of the present work was to elucidate the mechanisms underlying the increased HuR-shuttling in the colon carcinoma cell line DLD-1, with a particular focus put on the PKC δ -mediated signalling pathways. By employing the pharmacological PKC δ inhibitor rottlerin the cytoplasmic HuR abundance in the colon carcinoma cell lines DLD-1 and SW-620 was significantly reduced with maximal effects were observed at 16 hours. Upon inhibitor treatment this result illustrates that Rottlerin interferes with the basal HuR shuttling in colon carcinoma cells and reduced basal PKC δ activity as shown by a PKC activity assay. In contrast neither inhibitors of various MAPK kinases (SB203580, SP600125, PD98059, Raf-1 inhibitor) nor a pharmacological inhibitor of calcium-dependent PKCs (PKC α and PKC β) Gö6976, could affect basal cytoplasmic HuR levels in tumor cells. On the other hand, the phorbol ester PMA caused a

substantial increase in PKC activity. I tried also to identify novel tumor-relevant genes under the post-transcriptional control of HuR and PKC δ . By means of RNA pulldown experiments I could demonstrate that inhibition of PKC δ functionally leads to a strong reduction of the HuR-bound mRNAs coding for c-myc, cyclin A and D and COX-2. The latest ones were additionally identified as target genes which were strongly downregulated after depletion of PKCs.

Finally, activity measurements of total PKC activity implicates a clear increase in basal PKC δ activity in colon carcinoma cell lines. The results of this work can contribute to a better understanding of the pathophysiological relevance of the ubiquitous RNA binding protein HuR for colon carcinogenesis and the potential tumorigenic role of PKC δ in colon cancer cells.

7 Literaturverzeichnis

- Abdelmohsen K**, Gorospe M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev. RNA*. 2010; 1:214–229
- Abdelmohsen K**, Kuwano Y, et al. Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biol Chem*. 2008; 389:243–255
- Abdelmohsen K**, Lal A. Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle*, 2007, 6(11):1288-92
- Abdelmohsen K**, Pullmann R Jr., et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol. Cell*. 2007; 25:543–557
- Abdelmohsen K**, Srikantan S, et al. miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(51): 20297-302
- Abdelmohsen K**, Srikantan S, et al. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *EMBO J*. 2009; 28:1271–82
- Allport VC**, Pieber D et al. Human labour is associated with nuclear factor- κ B activity which mediates cyclooxygenase-2 expression and is involved with the functional progesterone withdrawal, 2001, *Mol. Hum. Reprod*. 7:581-86
- Ambros V**. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004; 431:350–355
- Ancrile B**, Lim KH, Counter CM. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev*. 2007; 21:1714–1719
- Appleby S**, Ristimäki A, et al. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene, 1994, *Biochem J* 302: 723-727
- Balding J**, Livingstone WJ et al. Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Mediators Inflamm*. 2004; 13(3): 181-7
- Baltimore D**, Boldin MP, et al. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol*. 2008; 9:839–845
- Baron JA**, Sandler RS, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and cancer prevention, 2000, *Annu Rev Med* 51: 511-23
- Bartel DP**. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116(2): 281-97
- Bartel DP**. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009;

136:215-233

- Basu A.** Involvement of protein kinase C-delta in DNA damage-induced apoptosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2003, 7, 341–350
- Basu A, Pal D.** Two faces of protein kinase Cdelta: the contrasting roles of PKC δ in cell survival and cell death. *Scientific World Journal.* 2010; 10:2272–84
- Bingham SA, Day NE, Luben R, et al.** Dietary fiber in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361:1496
- Blobe GC, Obeid LM, et al.** Regulation of protein kinase C and role in cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* 1994; 13(3-4):411-31
- Boyle T, Keegel T, Bull F, et al.** Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:1548
- Brennan CM, Gallouzi IE, et al.** Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol* 2000; 151:1-14
- Brennan CM, Steitz JA.** HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:266-77
- Brodie C, Bogi K, et al.** Protein kinase C delta (PKCdelta) inhibits the expression of glutamine synthetase in glial cells via the PKCdelta regulatory domain and its tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 30713–30718
- Burnette WN.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981; 112(2): 195-203
- Butterworth AS, Higgins JP, Pharoah P.** Relative and absolute risk of colorectal cancer for individuals with a family history: A meta-analysis. *Eur J Cancer* 2006, 42:216-227
- Byun HO, Jung HJ, Kim MJ, Yoon G.** PKC δ phosphorylation is an upstream event of GSK3 inactivation-mediated ROS generation in TGF- β 1-induced senescence. *Free Radic Res.* 2014, 48(9):1100-8
- Center MM, Jemal A, Ward E.** International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:1688
- Chao A, Thun MJ, Connell CJ, et al.** Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA* 2005; 293:172
- Chen J, Cascio J, et al.** Posttranscriptional Gene Regulation of IL-17 by the RNA-

Binding Protein HuR Is Required for Initiation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 2013;191(11): 5441–50

Cheng YC, Liou JP, et al. MPT0B098, a novel microtubule inhibitor that destabilizes the hypoxia-inducible factor-1 α mRNA through decreasing nuclear-cytoplasmic translocation of RNA-binding protein HuR. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(7):1202-12

Cho NP et al. Cytoplasmic HuR over-expression is associated with increased cyclooxygenase-2 expression in laryngeal squamous cell carcinomas. *Pathology*, 2007; 39, 545–550

Cok SJ, Morrison AR, et al. The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency, 2001, *J Biol Chem* 276: 23179-85

Colon-Gonzalez F, Kazanietz, MG. C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 2006; 827–837

Costantino CL et al. The role of HuR in gemcitabine efficacy in pancreatic cancer: HuR up-regulates the expression of the gemcitabine metabolizing enzyme deoxycytidine kinase. *Cancer Res.* 2009, 69, 4567–72

Coussens LM, Werb Z, et al. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420(6917):860-7

Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet.* 2009; 10:704–714

Cross T, Griffiths G, et al. PKC-delta is an apoptotic lamin kinase. *Oncogene.* 2000, 19(19):2331-7

Dai CM, Zhou XF, et al. Synthesis by precipitation polymerization of molecularly imprinted polymer for the selective extraction of diclofenac from water samples. *J Hazard Mater.* 2011; 198:175–181

Dalmau J, Furneaux HM, et al. The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/ sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. *Am. J. Pathol.* 1992, 141, 881–886

Dean JLE, Wait R et al. The 3' Untranslated Region of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Is a Target of the mRNA-Stabilizing Factor HuR. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(8):3400

Deng WG, Zhu Y, et al. Up-regulation of p300 binding and p50 acetylation in tumor necrosis factor- α -induced cyclooxygenase-2 promoter activation, *J Biol Chem*, 2003;

278:4770-77

Denkert C et al. Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10, 5580–86

Denkert C, Koch I, et al. Expression of the ELAV-like protein HuR in human colon cancer: association with tumor stage and cyclooxygenase-2. *Mod Pathol.* 2006, 19(9):1261-9

Denning MF, Wang Y, et al. Caspase activation and disruption of mitochondrial membrane potential during UV radiation-induced apoptosis of human keratinocytes requires activation of protein kinase C. *Cell Death Differ.* 2002; 9(1):40-52

Denning MF, Wang Y, et al. Protein kinase Cdelta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1998; 273(45):29995-30002

Deszo EL, Brake DK, et al. CD45 negatively regulates monocytic cell differentiation by inhibiting phorbol 12-myristate 13-acetate-dependent activation and tyrosine phosphorylation of protein kinase Cdelta. *J Biol Chem.* 2001; 276(13):10212-7

DeVries-Seimon TA et al. Induction of apoptosis is driven by nuclear retention of protein kinase C d. *J. Biol. Chem.*, 2007, 282, 22307–22314

DeVries TA, Neville MC, et al. Nuclear import of PKCdelta is required for apoptosis: identification of a novel nuclear import sequence. *Embo J.* 2002; 21:6050–60

Dixon DA. Regulation of COX-2 expression in human cancers. *Prog Exp Tumor Res*, 2003;37:52-71

Dixon DA, Kaplan CD, et al. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*, 2000; 275:11750–57

Dixon DA, Tolley ND, et al. Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest*, 2001;108, 1657–65

Doller A, Akool el-S, et al. Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cδ elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28:2608–25

Doller A, Huwiler A et al. Protein kinase C alpha dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of

cyclooxygenase-2. *Mol. Biol. Cell.* 2007; 18:2137–48

Doller A, Pfeilschifter J, et al. Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell Signal.* 2008, 20(12):2165-73

Doller A, Schlepckow , et al. Tandem phosphorylation of serines 221 and 318 by protein kinase C δ coordinates mRNA binding and nucleocytoplasmic shuttling of HuR. *Mol Cell Biol.* 2010; 30:1397–1410

Doller A, Schulz S, et al. RNA-dependent association with myosin IIA promotes F-actin-guided trafficking of the ELAV-like protein HuR to polysomes. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41(19):9152-67

Donahue JM, Chang ET, et al. The RNA-binding protein HuR stabilizes survivin mRNA in human esophageal epithelial cells. *Biochem J.* 2011; 437(1):89-96

Dong R, Lu JG, et al. Stabilization of Snail by HuR in the process of hydrogen peroxide induced cell migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 356:318–321

Dozois EJ, Boardman LA, Suwanthanma W, et al. Young-onset colorectal cancer in patients with no known genetic predisposition: can we increase early recognition and improve outcome? *Medicine Baltimore*, 2008; 87:259

DuBois RN, Abramson SB, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. 1998, FASEB J. 12:1063–1073

Duque J, Díaz-Muñoz MD, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1beta in colon carcinoma cells. *Cellular Signalling*, 2006;18: 1262-69

Eberhardt W, Badawi A et al. Cytoskeleton-Dependent Transport as a Potential Target for Interfering with Post-transcriptional HuR mRNA Regulons. *Front Pharmacol.* 2016; 7:251

Eberhardt W, Doller A, et al. Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther.* 2007;114(1):56-73

Eberhardt W, Doller A., et al. Regulation of the mRNA-binding Protein HuR by Posttranslational Modification: Spotlight on Phosphorylation. *Curr Protein and Peptide Science*, 2012, 13, 380-390

Emoto Y, Manome Y, et al. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J* 1995;14(24):6148-56

Erkinheimo TL et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with poor outcome and

with cyclooxygenase 2 expression in serous ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2003, 63, 7591–94

Esnault S, Malter JS. Hyaluronic acid or TNF- α plus fibronectin triggers granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA stabilization in eosinophils yet engages differential intracellular pathways and mRNA binding proteins. *J Immunol* 2003; 171:6780-7

Fabian MR, Sonenberg N, et al. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 2010; 79:351–379

Fan XC, Steitz JA. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95:15293–98

Fan XC, Steitz JA. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J*, 1998; 17(12): 3448-60

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990, 61,759-767

Figueroa A, Cuadrado A, et al. Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 4991–5004

Fujii T, Garcia-Bermejo ML, et al. Involvement of protein kinase C delta (PKCdelta) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKCdelta. *J Biol Chem.* 2000; 275:7574–82

Fujiwara Y, Kasashima K, et al. Microtubule association of a neuronal RNA-binding protein HuD through its binding to the light chain of MAP1B. *Biochimie* 93,2011; 817–822

Gallegos LL, Kunkel MT et al. Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling. *J Biol Chem* 2006; 281, 30947–30956

Gallouzi IE, Steitz JA. Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science.* 2001; 294:1895–1901

Garg R, Benedetti LG, et al. Protein kinase C and cancer: what we know and what we do not. *Oncogene.* 2014; 33(45): 5225–37

Garneau NL, Wilusz J et al. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007; 8(2):113-26

Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1998; 61, 65-131

Ghosh M, Aguila HL, et al. Essential role of the RNA-binding protein HuR in progenitor cell survival in mice. *J. Clin. Invest.* 2009;119,3530–43

Giardiello FM, Hamilton SR, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis, 1993, *N Engl J Med* 328: 1313–16

Giorgione JR, Lin JH, et al. Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase C δ compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. *J Biol Chem* 2006; 281, 1660–1669

Gonelli A, Mischiati C, et al. Perspectives of protein kinase C (PKC) inhibitors as anti-cancer agents. *Mini Rev Med Chem.* 2009; 9:498–509

González-Feliciano JA, Hernández-Pérez M, et al. The Role of HuR in the Post-Transcriptional Regulation of Interleukin-3 in T Cells. *PLoS One.* 2014; 9(3): e92457

Gonzalez-Guerrico AM, Kazanietz MG. Phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via autocrine activation of the extrinsic apoptotic cascade: a key role for protein kinase C delta. *J Biol Chem.* 2005; 280:38982–91

Gounaris E, Erdman SE, et al. Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104:19977–19982

Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007; 7:281–294

Grossoni VC, Falbo KB, Kazanietz MG, et al. Protein kinase C delta enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *Mol Carcinog*, 2007; 46(5):381-90

Guan Z, Buckman SY, et al. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 1998; 273: 12901–08

Gubin MM, Calaluce R, et al. Overexpression of the RNA binding protein HuR impairs tumor growth in triple negative breast cancer associated with deficient angiogenesis. *Cell Cycle* 2010, 9(16):3337-46

Guo J, Li M, et al. MiR-291b-3p induces apoptosis in liver cell line NCTC1469 by reducing the level of RNA-binding protein HuR. *Cell Physiol Biochem.* 2014; 33(3):810-22

Guo X, Wu Y, et al. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast

cancer. *RNA Biol.* 2009; 6(5):575-83

Gupta S, Bhattacharya D, Achary AN, et al. Colorectal carcinoma in young adults: a retrospective study on Indian patients: 2000-2008. *Colorectal Dis* 2010; 12:e182

Haas AL et al. Introduction: evolving roles for ubiquitin in cellular regulation, 1997, *FASEB J* 11:1053–54

Half E, Tang XM, et al. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res.* 2002; 62(6):1676-81

Harper KA, Tyson-Capper AJ, et al. Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochem Soc Trans.* 2008, 36(Pt 3): 543-5

Hau HH, Walsh RJ, et al. Tristetraprolin recruits functional mRNA decay complexes to ARE sequences. *J Cell Biochem*, 2007;100(6):1477-92

Heinonen M et al. Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Res.* 2005, 65, 2157–61

Hemminki A, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz–Jeghers syndrome. *Nature* 1998; 391:184–7

Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65:3168–3181

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Zugegriffen 01. Oktober 2017

http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/kid_2015_c18_c21_darm.pdf?__blob=publicationFile. Zugegriffen am 29. September 2017

Humphries MJ, Limesand KH, et al. Suppression of apoptosis in the protein kinase Cdelta null mouse in vivo. *J Biol Chem.* 2006; 281(14):9728-37

Huwiler A, Akool el-S, et al. ATP potentiates interleukin-1 beta-induced MMP-9 expression in mesangial cells via recruitment of the ELAV protein HuR. *J Biol Chem.* 2003; 278(51):51758-69

Huwiler A, Pfeilschifter J. Stimulation by extracellular ATP and UTP of the mitogen-activated protein kinase cascade and proliferation of rat renal mesangial cells. *Br J Pharmacol.* 1994; 113(4):1455-63

Irie K, Yanagita RC, et al. Challenges to the development of bryostatin-type anticancer drugs based on the activation mechanism of protein kinase Cdelta. *Med Res Rev.* 2012; 32:518–535

- Isakov N.** Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol.* 2018; 48:36-52
- Ishimaru D,** Ramalingam S, et al. Regulation of Bcl-2 expression by HuR in HL60 leukemia cells and A431 carcinoma cells. *Mol Cancer Res.* 2009; 7:1354–66
- Itzkowitz SH,** Yio X, et al. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,* 2004; 287(1):G7-17
- Jackson DN & Foster DA.** The enigmatic protein kinase C δ : complex roles in cell proliferation and survival. *FASEB J,* 2004; 18,627–636
- Jaken S,** Parker PJ. Protein kinase C binding partners. *Bioessays.* 2000; 22:245–254
- Jeyaraj SC,** Singh M, et al. Transcriptional control of human antigen R by bone morphogenetic protein. *J. Biol. Chem.* 2010; 285:4432-40
- Joshi P,** Dhaneshwar SS. An update on disease modifying antirheumatic drugs. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2014;13(4): 249-61].
- Kakuguchi W,** Kitamura T, et al. HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2010; 8(4):520-8
- Kang MJ,** Ryu BK, et al. NF- κ B activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3KAKT signaling, to promote gastric tumorigenesis. *Gastroenterology.* 2008; 135:2030-42
- Karahalios A,** English RD, Simpson JA. Weight change and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2015; 181:832
- Kawai T,** Lal A, et al. Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR. *Mol Cell Biol.* 2006; 26:3295–3307
- Kawamori T,** Rao CV, et al. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis, 1998, *Cancer Res* 58: 409–12
- Keene JD.** Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:5-7
- Khabar KS.** Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cell Mol Life Sci.* 2010; 67(17):2937-55
- Kikkawa U,** Takai Y, et al. Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 1983; 258:11442–45
- Kim HH,** Kuwano Y, et al. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression.

Genes Dev. 2009; 23: 1743–48

Kim HH, Yang X, Gorospe M et al. Modification at HuR (S242) alters HuR localization and proliferative influence. *Cell Cycle*, 2008, 7, 3371-77

Kim S, Merrill BM, et al. Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry*. 1997; 36(17):5185-92

Kim VN, Han J, et al. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2009; 10:126-139

King PH, Levine TD, et al. 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.*, 1994, 14, 1943-52

Klampfer L. Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2011; 11(4):451-64

Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*. 2006;11:441–450

Knox RD, Luey N, Sioson L, et al. Medullary colorectal carcinoma revisited: a clinical and pathological study of 102 cases. *Ann Surg Oncol* 2015; 22:2988

Kolligs FT, Crispin A et al. Risk of advanced colorectal neoplasia according to age and gender. *PLoS One*. 2011; 6(5): e20076

Knupfer H, Preiss R. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results. *Int. J. Colorectal Dis*. 2009;25:135–140

Krzystek-Korpacka M, Zawadzki M et al. Subsite heterogeneity in the profiles of circulating cytokines in colorectal cancer. *Cytokine*. 2018; pii: S1043-4666(18)30212-6

Kullmann M, Gopfert U, et al. ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev*. 2002; 16:3087–99

Kurosu T, Ohga N, et al. HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium. *Br J Cancer*. 2011;104(5): 819–829

Kwong LN, Dove WF. APC and its modifiers in colon cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2009; 656: 85–106

Lafarga V, Cuadrado A, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21 (Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Mol. Cell. Biol*. 2009; 29:4341–51.

- Lafon I**, Carballes F, et al. Developmental expression of AUF1 and HuR, two c-myc mRNA binding proteins. *Oncogene*, 1998;16: 3413–21
- Lai WS**, Carballo E, et al. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor α mRNA. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:4311–4323
- Lai WS**, Carballo E, et al. Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem*. 2000; 275(23):17827-37
- Lal A**, Mazan-Mamczarz K, et al. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J* 2004; 23:3092-102
- Lal A**, Kawai T, et al. Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin α . *EMBO J*. 2005;24:1852–62
- Lanza G**, Gafà R, Matteuzzi M, Santine A. Medullary-type poorly differentiated adenocarcinoma of large bowel: a distinct clinico-pathologic entity characterized by microsatellite instability and improved survival. *J Clin Oncol* 1999, 17: 2429–2438
- La Porta CA**, Comolli R. PKC-dependent modulation of I κ B α -NF κ B pathway in low metastatic B16F1 murine melanoma cells and in highly metastatic BL6 cells. *Anticancer Res*. 1998; 18(4A): 2591-7
- Lasa M**, Mahtani KR, Finch A, et al. Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(12):4265-74
- Lattore E**, Tebaldi T, et al. Downregulation of HuR as a new mechanism of doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Mol Cancer* 2012; 11:13
- Lauby-Secretan B**, Scoccianti C, Loomis D, et al. Body Fatness and Cancer – Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med* 2016; 375:794
- Leach KL**, James ML, et al. Characterization of a specific phorbol ester aporeceptor in mouse brain cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80:4208–12
- Lebedeva S**, Jens M, et al. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol. Cell*. 2011; 43:340–352
- Lee HW**, Smith L, et al. Ubiquitination of protein kinase C- α and degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 1996; 271, 20973–20976
- Leontieva OV**, Black JD. Identification of two distinct pathways of protein kinase C α

downregulation in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279, 5788–5801

Leucci E, Zriwil A, et al. Inhibition of miR-9 de-represses HuR and DICER1 and impairs Hodgkin lymphoma tumour outgrowth in vivo. *Oncogene*. 2012; 31(49):5081-9

Levy NS, Chung S, et al. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 1998; 273:6417-23

Li H, Park S, et al. Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J Biol Chem*. 2002; 277:44623-30

Li L, Lorenzo PS, et al. Protein kinase Cdelta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(12):8547-58

Lim SJ et al. Cytoplasmic expression of HuR is related to cyclooxygenase- 2 expression in colon cancer. *Cancer Res. Treat.*, 2009; 41, 87–92

Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007; 117:1175–1183

Liu C, Crawford JM, et al. *The Gastrointestinal Tract, Robins Pathologic Basis of Disease*, 8th ed, ch 18, p 827; 2009

Liu L, Rao JN, et al. Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2-dependent HuR phosphorylation. *Mol. Biol. Cell*, 2009, 20(23), 4885-98

Liu Q, Dreyfuss G. In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1995; 15(5):2800-8

Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal*. 1998; 10(8): 529-42

Lomonaco SL, Kahana S, et al. Phosphorylation of protein kinase Cdelta on distinct tyrosine residues induces sustained activation of Erk1/2 via down-regulation of MKP-1: role in the apoptotic effect of etoposide. *J. Biol. Chem*. 2008, 283, 17731–17739

López de Silanes I, Lal A, et al. HuR: post transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol*. 2005, 2(1):11-3

López de Silanes I, Zhan M, et al. Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:2987-92

Lord RV, Danenberg KD, et al. Cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus, Barrett's adenocarcinomas, and esophageal SCC: ready for clinical trials. *Am J Gastroenterol*.

1999; 94(8):2313-5

Lu W, Finnis S, et al. Tyrosine 311 is phosphorylated by c-Abl and promotes the apoptotic effect of PKCdelta in glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 352, 431–436

Lu Z, Hornia A et al. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol. Cell Biol* 1997; 17, 3418–3428

Lu ZM, Liu D, et al. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1998; 18, 839–845

Luna-Ulloa LB, Hernández-Maqueda JG, et al. Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis*, 2011; 32(11):1615-24

Ma WJ, Cheng S, et al. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem.* 1996; 271:8144–51

Ma WJ; Furneaux, H. Localization of the human HuR gene to chromosome 19p13.2. *Hum. Genet.* 1997, 99, 32–33

Mackay HJ et al. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat. Rev. Cancer*, 2007; 7, 554–562

Majumder PK, Pandey P, et al. Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem.* 2000; 275(29): 21793-6

Malakhova OA, Yan M, et al. Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev.* 2003; 17(4):455-60

Marasa BS, Srikantan S, et al. MicroRNA profiling in human diploid fibroblasts uncovers miR-519 role in replicative senescence. *Aging (Albany NY)*, 2010; 2(6):333–343

Masuda K, Abdelmohsen K, et al. Global dissociation of HuR-mRNA complexes promotes cell survival after ionizing radiation. *EMBO J.* 2011; 30:1040–53

Mauro LV, Grossoni VC, et al. PKC delta promotes tumoral progression of human ductal pancreatic cancer. *Pancreas.* 2010; 39:e31–41

Mazan-Mamczarz K, Galban S, et al. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:8354–8359

- Mazan-Mamczarz K**, Hagner PR, Corl S et al. Post-transcriptional gene regulation by HuR promotes a more tumorigenic phenotype. *Oncogene*, 2008, 27, 6151-63
- Mazroui R**, Di Marco S, et al. Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J. Cell Biol.* 2008; 180:113–127
- McBride AE**, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001; 106(1):5-8
- Meng Z**, King PH, et al. The ELAV RNA- stability factor HuR binds the 5'-untranslated region of the human IGF-IR transcript and differentially represses cap-dependent and IRES-mediated translation. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:2962-79
- Mitchell JA**, Warner TD. Cyclooxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy, 1999, *Br J Pharmacol* 128(6):1121-32
- Mitchell P**, Tollervey D. mRNA stability in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev.* 2000; 10:193–198
- Mizuno H**, Sakamoto C, et al. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology.* 1997, Feb; 112(2):387-97
- Molina MA**, Sitja-Arnau M, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res.* 1999; 59(17):4356-62
- Mukherjee N**, Corcoran DL, Nusbaum JD, et al. Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol. Cell.* 2011; 43:327–339
- Mukhopadhyay D**, Houchen CW, et al. Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2, 2003, *Mol Cell* 11: 113-126
- Mullis KB.** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris).* 1990; 48(8):579-82
- Myer VE**, Fan XC, et al. Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J.*, 1997, 16(8), 2130-39
- Nabors LB**, Gillespie GY, et al. HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res* 2001; 61:2154-61

Najbauer J, Johnson BA, et al. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *J Biol Chem.* 1993; 268(14):10501-9

Newman MA, Hammond SM. Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev.* 2010; 24:1086-92

Newton AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* 2003; 370, 361–371

Nguyen SP, Bent S, Chen YH, Terdiman JP. Gender as a risk factor for advanced neoplasia and colorectal cancer: A systematic review and metaanalysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009, 7:676-681

Niesporek S et al. Expression of the ELAV-like protein HuR in human prostate carcinoma is an indicator of disease relapse and linked to COX-2 expression. *Int. J.* 2008, *Oncol.*,32, 341-7

Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995; 9(7):484-96

Oguma K, Oshima H, et al. Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *EMBO J.* 2008; 27:1671–1681

Ohno S, Nishizuka Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *J. Biochem.* 2002, **132**, 509–511

Okhrimenko H, Lu W, et al. Roles of tyrosine phosphorylation and cleavage of protein kinase Cdelta in its protective effect against tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 23643–23652

Orphanides G, Reinberg D. A unified theory of gene expression. *Cell.* 2002; 108:439–451

Oshima M, Dinchuk JE, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2), 1996, *Cell* 87: 803–9

Ostareck-Lederer A, Ostareck DH et al. Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J Biol Chem.* 2006; 281(16):11115-25

Pai R, Dunlap D, et al. Inhibition of fibroblast growth factor 19 reduces tumor growth by modulating beta-catenin signaling. *Cancer Res.* 2008; 68:5086–5095

- Parekh DB**, Ziegler W, et al. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 2000; 19, 496–503
- Parrett ML**, Harris RE, et al. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. 1997, *Int J Oncol* 10: 503–507
- Pascale A**, Amadio M, et al. Defining a neuron: neuronal ELAV proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65:128–140
- Pascale A**, Amadio M, et al. Neuronal ELAV proteins enhance mRNA stability by a PKC α -dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(34):12065-70
- Persaud SD**, Hoang V, et al. Involvement of proteolytic activation of PKC δ in cisplatin-induced apoptosis in human small cell lung cancer H69 cells. *Int J Oncol.* 2005; 27(1):149-54
- Pongracz J**, Clark P et al. Expression of protein kinase C isoenzymes in colorectal cancer tissue and their differential activation by different bile acids. *Int J Cancer.* 1995; 61(1):35-9
- Prescott SM et al.** Cyclooxygenase. -2 and carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta,* 2000, 1470, M69–M78
- Prevostel C**, Alice V, et al. Protein kinase C α actively downregulates through caveolae-dependent traffic to an endosomal compartment. *J Cell Sci* 2000; 113, 2575–2584
- Rakoff-Nahoum S**, Medzhitov R. Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. *Science.* 2007;317:124–127
- Rasola A**, Fassetta M, et al. A positive feedback loop between hepatocyte growth factor receptor and beta-catenin sustains colorectal cancer cell invasive growth. *Oncogene.* 2007; 26:1078–1087
- Rebane A**, Aab A, Steitz JA. Transportins 1 and 2 are redundant nuclear import factors for hnRNP A1 and HuR. *RNA.* 2004;10(4):590-9
- Reyland ME**, Anderson SM, et al. Protein kinase C delta is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary gland acinar cells. *J Biol Chem.* 1999; 274(27):19115-23
- Robinow S**, Campos AR, et al. The elav gene product of *Drosophila*, required in neurons, has three RNP consensus motifs. *Science* 1988, 242, 1570–1572.
- Schmassmann A**, Peskar BM, et al. Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. 1998, *Br J Pharmacol;* 123(5): 795-804

- Schub R**, Steinheber FU. Rightward shift of colon cancer. A feature of the aging gut. *J Clin Gastroenterol* 1986; 8:630
- Schultz A**, Ling M et al. Identification of an amino acid residue in the protein kinase CC1b domain crucial for its localization to the Golgi network. *J. Biol. Chem.* 2004; 279, 31750–31760
- Schulze-Lohoff E**, Hugo C, et al. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am J Physiol.* 1998; 275(6 Pt 2): F962-71
- Shamma A**, Yamamoto H, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(4):1229-38
- Shao J**, Sheng H, et al. Regulation of constitutive cyclooxygenase-2 expression in colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2000, 275(43):33951-6
- Sheflin LG**, Zou AP, et al. Androgens regulate the binding of endogenous HuR to the AU-rich 3'UTRs of HIF-1alpha and EGF mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:644-51
- Shen L**, Issa J.-P. Epigenetics in colorectal cancer. *Current Opinion in Gastroenterology.* 2002. 18(1): 68-73
- Shen S**, Alt A, et al. PKCdelta activation: a divergence point in the signaling of insulin and IGF-1-induced proliferation of skin keratinocytes. *Diabetes.* 2001; 50(2):255-64
- Sheng H**, Shao J, et al. Transforming Growth Factor-β1 Enhances Ha-*ras*-induced Expression of Cyclooxygenase-2 in Intestinal Epithelial Cells via Stabilization of mRNA. *J Biol Chem*, 2000; 275:6628-35
- Shiff SJ**, Rigas B, et al. The role of cyclooxygenase inhibition in the antineoplastic effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs). *J Exp Med.* 1999;190(4): 445-50
- Siegel RL**, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:7
- Sinicrope FA**, Gill S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004; 23(1-2):63-75
- Slattery ML**, Wolff RK, et al. IL-6 genotypes and colon and rectal cancer. *Cancer Causes Control.* 2007; 18(10): 1095–1105
- Smith JJ**, Rucknagel KP, et al. Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases

PRMT1 and PRMT3. *J Biol Chem.* 1999;274(19):13229-34

Smith WL, DeWitt DL, et al. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 2000; 69:145-82

Soltoff SP. Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. *Trends Pharmacol. Sci.* 2007, 28, 453–458

Song SH, Jong HS, et al. Transcriptional silencing of cyclooxygenase-2 by hypermethylation of the 5' CPG island in human gastric carcinoma cells, 2001, *Cancer Res* 61: 4628-35

Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras oncogene and inflammation: partners in crime. *Cell Cycle.* 2005; 4:735–736

Srikantan S, Gorospe M. HuR function in disease. *Front. Biosci.* 2012, 17, 189–205

Srivastava J, Procyk KJ, et al. Phosphorylation is required for PMA- and cell cycle induced degradation of protein kinase C δ . *Biochem J* 2002; 368, 349–355

Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9:219–230

Steinberg, SF. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J.* 2004; 384(Pt 3):449-59

Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* 2008, 88, 1341–1378

Stoecklin G, Colombi M et al. Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. *EMBO J.* 2002; 21:4709–4718

Storz P, Doppler H et al. Protein kinase C δ selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF- κ B in oxidative stress signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2004, 24, 2614–2626

Strahl BD, Briggs SD, et al. Methylation of histone H4 at arginine 3 occurs in vivo and is mediated by the nuclear receptor coactivator PRMT1. *Curr Biol* 2001;11(12): 996-1000

Subbaramaiah K, Chung WJ et al. Transcription of Cyclooxygenase-2 Is Enhanced in Transformed Mammary Epithelial Cells. *J Biol Chem*, 1998; 273:32943–49

Subbaramaiah K, Marmo TP, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 mRNA stability by taxanes: evidence for involvement of p38, MAPKAPK-2, and HuR, 2003, *J Biol Chem* 278: 37637-47

Tanaka Y, Gavriellides MV, et al. Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J Biol Chem.* 2003; 278:33753–62

Thun MJ, Namboodiri MM, et al. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer, 1991, *N Engl J Med* 325: 1593–96

Topisirovic I, Siddiqui N, et al. Stability of eukaryotic translation initiation factor 4E mRNA is regulated by HuR, and this activity is dysregulated in cancer. *Mol Cell Biol.* 2009;29(5): 1152-62

Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65:87

Tran H, Maurer F, et al. Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol* 2003; 23:7177-88

Tucker ON, Dannenberg AJ et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 1999; 59(5):987-90

Valencia-Sanchez MA, Liu J et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 2006; 20:515–524

van Rees BP, Saukkonen K, et al. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol.* 2002; 196(2):171-9

Vasudevan S, Tong Y, et al. Switching from repression to activation: microRNAs can upregulate translation. *Science.* 2007; 318:1931–34

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10:789-99

Walsh G, Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol.* 2006; 24(10):1241-52

Wang D, Mann JR, et al. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 2005;128(5):1445-61

Wang H, Huang L, et al. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* 2001;293(5531):853-7

Wang H, Kazanietz MG. p23/Tmp21 differentially targets the Rac-GAP beta2-chimaerin and protein kinase C via their C1 domains. *Mol Biol Cell.* 2010; 21:1398–1408

- Wang H**, Xiao L, et al. p23/Tmp21 associates with protein kinase Cdelta (PKCdelta) and modulates its apoptotic function. *J Biol Chem.* 2011; 286:15821–31
- Wang J** et al. The expression of RNA-binding protein HuR in nonsmall cell lung cancer correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymph node metastasis. *Oncology*, 2009; 76, 420–429
- Wang Q**, Wang X, Evers BM. Induction of cIAP-2 in human colon cancer cells through PKC delta/NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 51091–51099
- Wang Q**, Wang X, et al. PKCdelta-mediated regulation of FLIP expression in human colon cancer cells. *Int. J. Cancer*, 2006, 118, 326–334
- Wang W**, Fan J, et al. AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR. *Mol Cell Biol* 2002; 22:3425-36
- Wang W**, Lin S, et al. HuR Regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during the cell division cycle. *EMBO J* 2000; 19:2340-50
- Wang W**, Yang X, Cristofalo VJ, Holbrook NJ, Gorospe M. Loss of HuR influences gene expression during replicative senescence. *Mol Cell Biol* 2001; 21:5889-98
- Williams CS**, Mann M et al. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. 1999, *Oncogene*, 18(55):7908-16
- Wilson VG**, Rangasamy D. Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp Cell Res.* 2001; 271(1):57-65
- Winkler C**, Doller A, et al. Attenuation of the ELAV1-like protein HuR sensitizes adenocarcinoma cells to the intrinsic apoptotic pathway by increasing the translation of caspase-2L. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1321
- Winter J**, Jung S et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009;11:228–234
- Wolff H**, Saukkonen K, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.* 1998; 58(22):4997-5001
- Wolin KY**, Yan Y, Colditz GA, Lee IM. Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2009; 100:611
- Xiao L**, Eto M, et al. ROCK mediates phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via p21Cip1 up-regulation and JNK. *J Biol Chem.* 2009; 284:29365–75
- Xiao L**, Caino MC, et al. Phorbol ester-induced apoptosis and senescence in cancer cell models. *Methods Enzymol.* 2008;446:123–139

- Xiao L**, Gonzalez-Guerrico A, et al. PKC-mediated secretion of death factors in LNCaP prostate cancer cells is regulated by androgens. *Mol Carcinog.* 2009;48:187–195
- Xie W**, Herschman HR, et al. *v-src* Induces Prostaglandin Synthase 2 Gene Expression by Activation of the c-Jun N-terminal Kinase and the c-Jun Transcription Factor. *J Biol Chem*, 1996; 271:31742–48
- Xu F**, Zhang X, et al. Loss of repression of HuR translation by miR-16 may be responsible for the elevation of HuR in human breast carcinoma. *J Cell Biochem.* 2010; 111(3):727-34
- Yamagata R**, Shimoyama T. Cyclooxygenase-2 expression is increased in early intestinal-type gastric cancer and gastric mucosa with intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 14(4):359-63
- Yamaguchi K**, Lantowski A, et al. Histone deacetylase inhibitors suppress the induction of c-Jun and its target genes including COX-2, 2005, *J Biol Chem* 280: 32569-77
- Yang X**, Wang W, et al. Prostaglandin A2-mediated stabilization of p21 mRNA through an ERK-dependent pathway requiring the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 2004; 279: 49298-306
- Yao KM**, Samson ML, et al. Gene elav of *Drosophila melanogaster*: a prototype for neuronal-specific RNA binding protein gene family that is conserved in flies and humans. *J. Neurobiol.* 1993, 24(6), 723-739
- Yazawa K**, Tsuno NH, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 inhibits colon cancer cell adhesion to extracellular matrix by decreased expression of beta1 integrin. *Cancer Science*, 2005; 96(2):93-9
- Yeh CH**, Hung LY, et al. RNA binding protein HuR interacts with thrombomodulin 5'untranslated region and represses internal ribosome entry site-mediated translation under IL-1 beta treatment. *Mol. Biol. Cell.* 2008; 19:3812–22
- Yi J**, Chang N, et al. Reduced nuclear export of HuR mRNA by HuR is linked to the loss of HuR in replicative senescence. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:1547–1558.
- Yonezawa T**, Kurata R, et al. PKC delta and epsilon in drug targeting and therapeutics. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2009; 3:96–101
- Yoshida K**. PKCdelta signaling: mechanisms of DNA damage response and apoptosis. *Cell. Signal.* 2007 19, 892–901

- Young LE**, Sanduja S, Bemis-Standoli K, et al. The mRNA Binding Proteins HuR and Tristetraprolin regulate cyclooxygenase 2 expression during colon carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2009, 136(5):1669-79
- Yu TX**, Wang PY et al. Chk2-dependent HuR phosphorylation regulates occludin mRNA translation and epithelial barrier function. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39(19): 8472–87
- Yurgelun MB**, Kulke MH, Fuchs CS, et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2017; 35:1086
- Zauber AG**. The impact of screening on colorectal cancer mortality and incidence: Has it really made a difference? *Dig Dis Sci* 2015, 60:681-691
- Zhang F**, Subbaramaiah K, et al. Dihydroxy Bile Acids Activate the Transcription of Cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 1998; 273:2424–28
- Zhang HT**, Zhang D et al. Transcriptional activation of PRMT5 by NF-Y is required for cell growth and negatively regulated by the PKC/c-Fos signaling in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1839(11):1330-40
- Zhang X**, Zou T, et al. Stabilization of XIAP mRNA through the RNA binding protein HuR regulated by cellular polyamines. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37(22):7623-37
- Zhao M**, Xia L, et al. Protein kinase cdelta in apoptosis: a brief overview. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012; 60:361–72
- Zrachia A**, Dobroslav M, et al. Infection of glioma cells with Sindbis virus induces selective activation and tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta. Implications for Sindbis virus-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 23693–23701

Danksagung

Diese Arbeit ist am Pharmazentrum Frankfurt/ZAFES am Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main entstanden. Die dargestellten Experimente sind im Zeitraum von Juni 2007 bis März 2008 durchgeführt worden.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Eberhardt, für die sehr gute Förderung und Betreuung meiner Arbeit während der vergangenen Jahre, für Zeit der Unterstützung, gepaart mit verständnisvoller Geduld, angenehme Arbeitsatmosphäre und die Auswahl des interessanten und ergiebigen Themas. Seine Vorschläge, Aufmunterungen und die Diskussion mit ihm haben ganz wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Selbst in stressigen Zeiten und nach so vielen Jahren Verzögerung hatte er immer Zeit für meine Arbeit gefunden.

Dr. Anke Doller und Frau Roswitha Müller möchte ich für die geduldige und liebevolle Einarbeitung in die angewendeten Methoden und freundliche Betreuung während der Laborzeit danken. Professor Dr. J. Pfeilschifter danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die Möglichkeit an seinem Institut arbeiten zu können. Schließlich bedanke ich mich auch bei allen anderen Arbeitsgruppen des Instituts, die mir bei Fragen und Problemen stets hilfreich zur Seite standen.

Meinem Mann Dipl.-Ing. Vitali Melnikov danke ich für seine außerordentliche, geduldige Unterstützung bei der Verfassung der Arbeit sowie für seinen unerschütterlichen Glauben an diese Arbeit. Ihm möchte ich diese Arbeit widmen.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zur Regulation des mRNA-Bindeproteins *human antigen R* (HuR) in humanen Kolonkarzinomzellen

am Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie (Direktor: Prof. Dr. med. Josef Pfeilschifter) des Klinikums der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Wolfgang Eberhardt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Teile der vorliegenden Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Doller A, Winkler C, Azrilian I, Schulz S, Hartmann S, Pfeilschifter J, Eberhardt W. High-constitutive HuR phosphorylation at Ser 318 by PKC δ propagates tumor relevant functions in colon carcinoma cells. *Carcinogenesis* 32(5): 676-85, 2011

(Ort, Datum)

(Unterschrift)