

Caspase-2 als funktioneller Modulator der p21^{WAF1/CIP1}-Expression

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dominik Peters
aus Köln

Düsseldorf, November 2021

aus dem Labor für Molekulare Radioonkologie
der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Sebastian Wesselborg
2. Prof. Dr. William F. Martin

Tag der mündlichen Prüfung:

18.02.2022

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter der Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, November 2021

Dominik Peters

Zusammenfassung

Der CDK -Inhibitor p21 steuert neben der Zellzyklusregulation auch maßgeblich die DNA-Reparatur, die Seneszenz und die Zellalterung und unterliegt deshalb strenger transkriptioneller, posttranskriptioneller und posttranslationaler Regulation. Diesbezüglich wurde die translationale Regulation der p21-Expression durch Caspase-2 erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben. Um den Mechanismus dieser translationalen Regulation, für den die p21-3'UTR benötigt wird, näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems Caspase-2 *knockout* (KO) Zellen generiert. Diese bestätigten die bisherigen Ergebnisse, die auf Experimenten mit siRNA-vermitteltem *knockdown* von Caspase-2 beruhen. So war die γ IR-induzierte p21-Expression in den generierten Caspase-2 KO-Zelllinien 15, 17, 19, 35, 49 und 53, ähnlich wie bei Zellen nach Behandlung mit Caspase-2 siRNA, stark reduziert, wohingegen die Expression in der heterozygoten Caspase-2 KO-Zelllinie 32 nur leicht vermindert war. Im Rahmen der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Caspase-2 die p21-Expression nicht selbst über die Bindung der p21-3'UTR steuert, da anhand von p21-mRNA-IPs eine direkte Bindung von Caspase-2 an die p21-3'UTR ausgeschlossen werden konnte. Des Weiteren wird auch die Bindung der p21-mRNA-bindenden Proteine (RBPs) hnRNP-K, HuR und AUF1 weder durch die An- noch Abwesenheit von Caspase-2 beeinflusst. Mittels massenspektrometrischer (MS) Analyse von p21-mRNA-IPs wurden zahlreiche Proteine identifiziert, deren Bindung an die p21-3'UTR bisher noch nicht beschrieben worden war. Eine Caspase-2-abhängige Bindung von TRIM25, Pum2 und PTBP2, die im Rahmen der MS-Analyse als mögliche Kofaktoren für die Caspase-2-abhängige p21-Expression identifiziert wurden, konnte in weiteren Analysen nicht bestätigt werden. Die mRBPs DDX41, PTBP1 und RBM47 binden ebenfalls unabhängig von Caspase-2 spezifisch an die p21-3'UTR und beeinflussen die p21-Expression auf unterschiedliche Weise. Während der *knockdown* von DDX41 zu einer Erhöhung der basalen oder γ IR induzierten p21-Expression führt, wird diese im Gegensatz hierzu in Abwesenheit von RBM47 und PTBP1 reduziert. Dabei hat der *knockdown* von PTBP1 aber keinerlei Einfluss auf die Transkription oder die Stabilität der p21-

mRNA. RBM47 nimmt eine duale Funktion ein, indem es einerseits durch die Induktion der p53-Expression die Transkription der p21-mRNA fördert, aber gleichzeitig diese durch direkte Bindung der p21-3'UTR destabilisiert.

Abstract

Besides its role in cell cycle regulation, the CDK Inhibitor p21 is an important regulator of DNA repair, senescence and cell aging. Hence, p21 is strictly regulated on the transcriptional, post-transcriptional and post-translational level. With regard to this, our laboratory described for the first time the translational regulation of p21 expression by caspase-2. (2) Elucidation of the underlying mechanism which depends on the presence (3) of the p21-3'UTR, was investigated in the present work. Several caspase-2 KO cell lines were successfully generated employing the CRISPR/Cas9-system. Using these clones, the previous results which were based on the siRNA-mediated knockdown of caspase-2 could be confirmed. Similar to cells that have been transfected with the caspase-2 siRNA, γ IR-induced p21 expression was significantly reduced in the caspase-2 KO cell lines 15, 17, 19, 35, 49 and 53. In contrast, p21-expression in the heterozygote caspase-2 KO cell line 32 was only slightly decreased. Furthermore, it could be shown that caspase-2 does not control p21 expression by direct binding to the p21-3'UTR, as this could be excluded based on the p21-mRNA-IP results. Furthermore, also binding of the p21-mRNA-binding proteins (RBPs) hnRNP-K, HuR and AUF1 was not affected by the presence or absence of caspase-2. Performing mass spectrometric (MS) analyses, several so far unpublished p21-3'UTR mRBPs were identified. However, the caspase-2 dependent binding of TRIM25, Pum2 und PTBP2 to p21-3'UTR, which had been identified by MS analysis as possible cofactors of the caspase-2-dependent p21 expression, could not be confirmed. The additional identified p21-mRBPs DDX41, PTBP1 and RBM47 bind specifically, but independently of caspase-2 to the p21-3'UTR and regulate p21 expression in different manners. Whereas knockdown of DDX41 results in an increase in basal and γ IR-induced p21 expression it is reduced in the absence of RBM47 and PTBP1. However, knockdown of PTBP1 has no influence on the transcription or stability of the p21-mRNA, whereas RBM47 seems to regulate p21 in two different ways. On the one hand

RBM47 promotes the transcription of the p21-mRNA by inducing p53 expression and on the other hand it destabilizes the p21-mRNA by directly binding to its 3'UTR.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Caspase-2	3
1.1.1 Aufbau und Aktivierung von Caspase-2.....	4
1.1.2 Aktivierung von Caspase-2 nach DNA Schäden.....	6
1.1.3 Alternative Wege der Caspase-2 Aktivierung	8
1.1.4 Die Rolle von Caspase-2 bei der Kontrolle des Zellzyklus, als Tumorsuppressor und als Regulator der genomischen Stabilität.....	10
1.2 p21	11
1.2.1 Transkriptionelle Regulation von p21.....	12
1.2.2 Posttranskriptionelle Regulation von p21 vermittelt durch microRNAs (miRNAs).....	14
1.2.3 Posttranskriptionelle Regulation von p21 vermittelt durch RNA-bindende Proteine (RBPs)	16
1.2.4 Posttranskriptionelle Regulation von p21 vermittelt durch Caspase-2	19
1.3 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	22
2.1 Materialien.....	22
2.1.1 Chemikalien	22
2.1.2 Kommerzielle Reagenzien und Kits	23
2.1.3 Polymerasen.....	23
2.1.4 Größenstandards.....	24
2.1.5 Plasmide und siRNAs	24

2.1.6	Humane Zelllinien	25
2.1.7	Bakterienstamm	25
2.1.8	Primäre Antikörper	26
2.1.9	Sekundäre Antikörper	26
2.1.10	Oligonukleotide	27
2.1.11	Genexpressionsassays	27
2.1.12	Geräte	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Transiente Transfektion von Plasmiden und von <i>small-interfering RNAs</i> (siRNAs)	29
2.2.2	Herstellung von Zellextrakten	29
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Silberfärbung, Western Blot	30
2.2.4	Fluorometrischer Caspase-3-Substrattest	32
2.2.5	RNA-Isolierung, c-DNA-Synthese und <i>real-time quantitative PCR</i> (qPCR)	32
2.2.6	<i>in vitro</i> Herstellung von mRNA und Durchführung einer mRNA-IP	33
2.2.7	Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock und Plasmid-Präparation	36
2.2.8	SLIC (<i>Sequence & Ligation Independent Cloning</i>)	38
2.2.9	Generierung einer Caspase-2 KO Zelllinie mit dem CRISPR-Cas9-System	39
3	Ergebnisse	43
3.1	Identifizierung von Komponenten, die an der Caspase-2-abhängigen Expression von p21 beteiligt sind	43
3.1.1	Generierung einer Caspase-2 KO-Zelllinie	43
3.1.2	Etablierung und Analyse der p21-mRNA-IP	48
3.1.2.1	Caspase-2 ist kein direkter Bindungspartner der p21-3'UTR	49
3.1.2.2	Einfluss von Caspase-2 auf die Expression und die Bindung von miRNAs an die p21-3'UTR	51
3.1.2.3	Einfluss von Caspase-2 auf die Bindung von bekannten p21-mRBPs (<i>biased approach</i>)	53
3.1.2.4	DDX41 ein potenzieller Interaktionspartner für die Caspase-2-abhängige Expression von p21?	55
3.1.2.5	MS-Analyse zur Identifizierung von mRBPs, die in An.- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 spezifisch an die p21-3'UTR binden (<i>unbiased approach</i>)	59
3.1.2.6	Sind die mRBPs Pum2, PTBP2 und Trim25 potenzielle Kofaktoren der Caspase-2-abhängigen p21-Expression?	62
3.2	Identifizierung und Charakterisierung neuer putativer p21-mRBPs	64

3.2.1	Analyse von spezifisch mit der p21-3'UTR präzipitierten mRBPs mittels Western Blot.....	64
3.2.2	RBM47 und PTBP1 zwei Kandidaten für die Regulation der p21-Expression.....	68
4	Diskussion.....	74
4.1	Die γ IR-induzierte p21-Expression ist in den Caspase-2 KO-Zelllinien verringert	74
4.2	Caspase-2 reguliert die p21-Expression weder direkt durch Bindung der p21-3'UTR noch indirekt über die p21-mRBPs hnRNP-K, HuR, AUF1, Argonaut-2 und Trim25	76
4.3	Identifizierung von DDX41 als neuen Caspase-2-unabhängigen Regulator der p21-Expression.....	79
4.4	Identifizierung der mRBPs RBM47 und PTBP1 als neue Regulatoren der p21-Expression	81
5	Anhang	87
6	Literaturverzeichnis.....	94
7	Danksagung	111
8	Lebenslauf.....	112

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APAF-1	<i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>
ARE	<i>AU-rich elements</i>
AS	Aminosäuren
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
AU	<i>arbitrary units</i>
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BrUTP	5-bromo-UTP
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
Caspase	<i>cysteinylnl-aspartate specific protease</i>
CDKs	Cyclin-abhängige Kinasen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHK2	Checkpoint kinase 2
CIP	CDK-Inhibitor Protein
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CUGBP1	<i>CUG-binding protein 1</i>
D	Asparaginsäure
DDX41	<i>DEAD-box helicase 41</i>
DED	<i>death-effector domain</i>
DISC	<i>death-induced signaling complex</i>
DR	<i>death receptor</i>
dsRBD	<i>double stranded RNA binding domain</i>
EMT	<i>Epithelial mesenchymale Transition</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FADD	<i>fas-associated protein with death domain</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
HA	<i>homology arm</i>
HDR	<i>homology-directed repair</i>
hnRNP-K	<i>human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K</i>
IgH	<i>immunoglobulin heavy chain</i>
INK	<i>inhibitor of kinase</i>
Insc	<i>Inscuteable</i>
IP	Immunpräzipitation
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kDa	Kilo-Dalton
KH-Domäne	<i>K homology domain</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
MCL1	<i>Myeloid cell leukemia 1</i>
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
mRBP	mRNA-bindendes Protein
mRNA	messenger RNA

MS	Massenspektrometrie
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nedd2	<i>neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 2</i>
NFKBIA	<i>NFKB Inhibitor Alpha</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid related factor-2</i>
nt	Nukleotid
ORF	<i>open reading frame</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
P-bodies	<i>processing bodies</i>
PIDD	<i>p53-induced death domain-containing protein</i>
Pin1	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1</i>
PTBP2	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 2</i>
Pum2	<i>Pumilio homolog</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
PuroR	Puromycin-Resistenz
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
RBD	RNA-bindende Domäne
RBM	<i>RNA-binding motif</i>
RBM47	<i>RNA-binding protein 47</i>
RBP	RNA-bindendes Protein
RE	<i>response element</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SA	<i>splice acceptor site</i>
Sdi	<i>senescent cell-derived inhibitor</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide</i>
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SLIC	<i>Sequence & Ligation Independent Cloning</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>
TALEN	<i>transcription activator-like effector nuclease</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
tracrRNA	<i>Trans-activating crRNA</i>
Trim25	<i>Tripartite motif-containing protein 25</i>
vgl.	vergleiche
Y2H	<i>yeast two-hybrid</i>
YY2	<i>yin yang 2</i>
ZNTB20	<i>Zinc finger and BTB domain-containing 20</i>
γ-IR	Gamma-Bestrahlung

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Rangliste der mit der p21-3'UTR präzipitierten mRBPs.....	62
---	----

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierung der humanen Caspasen.	3
Abbildung 2: Alternatives Splicing der Casp2-mRNA.	4
Abbildung 3: Model des Mechanismus der Caspase-2-Aktivierung.....	6
Abbildung 4: Überblick über die Signalwege der Caspase-2 Aktivierung.	8
Abbildung 5: p21-Promotor.....	14
Abbildung 6: Posttranskriptionelle Regulation von p21 durch miRNAs.	16
Abbildung 7: Posttranskriptionelle Regulation von p21 durch RBPs.	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer mRNA-IP.	36
Abbildung 9: Verwendete Ausgangsvektoren für den <i>knockout</i> von Caspase-2.	41
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Caspase-2 <i>knockout</i> - Strategie.	44
Abbildung 11: Auswahl und Design der gRNA.	45
Abbildung 12: Überprüfung der generierten HCT116 Caspase-2 KO- Zelllinien mittels Western Blot, genomischer PCR und qPCR. ...	47
Abbildung 13: Die Induktion der p21-Expression ist in einigen Caspase-2 KO-Zelllinien nach γ IR reduziert.	48
Abbildung 14: Strategie zur Identifizierung von Komponenten, die an der Caspase-2-abhängigen Expression von p21 beteiligt sind.	49
Abbildung 15: Etablierung und Analyse der p21-mRNA-IP.	51
Abbildung 16: Nachweis von spezifisch an die p21-3'UTR gebundener miRNAs.	53
Abbildung 17: Die Bindung der untersuchten mRBPs an die p21-3'UTR wird durch die An- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 nicht beeinflusst.	55
Abbildung 18: DDX41 bindet unabhängig von Caspase-2 die p21-3'UTR und reguliert auch Caspase-2 unabhängig deren Expression. ...	57
Abbildung 19: Nach <i>knockdown</i> von DDX41 ist die DEVDase-Aktivität durch die posttranskriptionelle Modulation der p21- Expression reduziert.	59
Abbildung 20: Anreicherung von mRBPs in IPs mit der p21-3'UTR.	61
Abbildung 21: Trim25 ist kein Kofaktor der Caspase-2-abhängigen p21- Regulation.	64
Abbildung 22: Identifizierung neuer p21-mRBPs.....	65
Abbildung 23: Lokalisierung der Bereiche der p21-3'UTR, die für eine Bindung von PTBP1 und RBM47 benötigt werden.	67
Abbildung 24: Die Expression von PTBP1 und RBM47 wird weder durch γ IR noch durch die An- bzw. Abwesenheit von p53 beeinflusst.	68

Abbildung 25: Nach <i>knockdown</i> von PTBP1 ist die Expression von p21 reduziert, die DEVDase-Aktivität wird aber nur geringfügig beeinflusst.	69
Abbildung 26: Die An. bzw. Abwesenheit von PTBP1 hat keinen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation und auf die Stabilität der p21-mRNA.	70
Abbildung 27: Der <i>knockdown</i> von RBM47 führt zur Reduktion der p21-Expression und zur Erhöhung der DEVDase-Aktivität in HCT116 WT-Zellen.	71
Abbildung 28: Der <i>knockdown</i> von RBM47 führt zur Reduktion der p21-Transkription bei gleichzeitiger Stabilisierung der p21-mRNA. ...	72

1 Einleitung

Caspasen, gehören zu einer Gruppe von Cysteinproteasen, die essentielle Regulatoren der zellulären Homöostase sind. Ihre Dysregulation kann Krebs und schwere Autoimmunerkrankungen zur Folge haben (Fiandalo and Kyprianou, 2012). Der Name Caspase (*cysteinyI-aspartate specific protease*) leitet sich von ihrer Fähigkeit ab Peptidbindungen C-Terminal des Aspartat-Restes zu schneiden (Alnemri et al., 1996).

Obwohl Caspasen auch im Zusammenhang mit Proliferation, Migration und Differenzierung beschrieben werden, wurden sie ursprünglich mit den biologischen Prozessen Apoptose und Inflammation in Verbindung gebracht und wurden demzufolge in inflammatorische (Caspase-1, -4, -5, -11 und -12) bzw. apoptotische Caspasen (Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10) eingeteilt (Frisch, 2008; Lamkanfi et al., 2006). Bei den apoptotischen Caspasen unterscheidet man zudem zwischen Initiator- und Exekutor-Caspasen. Aufgrund eines Nucleotid-Polymorphismus existieren zwei verschiedene Isoformen der Caspase-12 (Abbildung 1). Die kurze Isoform der Caspase-12 (Casp12S) ist dabei nicht funktionsfähig. Die lange Isoform (CaspL) Form hingegen wird als inflammatorische Caspase klassifiziert. Sie wird vornehmlich in der afrikanischen Bevölkerung exprimiert und begünstigt die Erkrankung an einer Sepsis (Saleh et al., 2004). Caspase-14 dagegen, die in der finalen Differenzierung von Keratinozyten beteiligt ist, kann weder den apoptotischen noch den inflammatorischen Caspasen zugeordnet werden (Denecker et al., 2008).

Alle Caspasen werden als inaktive Zymogene bzw. Procaspasen exprimiert. Diese bestehen N-Terminal aus einer Prodomäne und C-Terminal aus einer Protease-Domäne. Diese Protease-Domäne ist wiederum in eine große und eine kleine Untereinheit unterteilt (Pop und Salvesen, 2009). Erst durch die Spaltung zwischen den beiden Untereinheiten und durch die Abtrennung der Prodomäne, kann ein aktives Hetero-Tetramer, bestehend aus jeweils zwei kleinen Untereinheiten und zwei großen Untereinheiten, gebildet werden (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004).

Die Caspasen-3,-6, und 7 besitzen eine kurze Prodomäne und werden als Effektor-Caspasen oder auch Exekutor-Caspasen bezeichnet (Abbildung 1). Ef-

Effektor-Caspasen werden durch Spaltung durch Initiator-Caspasen oder anderer Effektor-Caspasen kaskadenartig aktiviert. Nach der Aktivierung spalten diese wiederum bestimmte Zielproteine und lösen damit die Apoptose der Zelle aus (Li und Yuan, 2008).

Die Caspasen mit einer langen Prodomäne besitzen eine Protein-Interaktionsdomäne. Die Protein-Interaktionsdomäne der Caspasen-1,-2,-4,-5-9 und 12-L wird als CARD-Domäne (*caspase activation and recruitment domain*) bezeichnet. Die Protein-Interaktionsdomäne der Caspasen 8 und 10 wird DED-Domäne (*death-effector domain*) genannt (Creagh, 2014). Die Protein Interaktionsdomäne dieser Caspasen ermöglicht die Bildung von Multiproteinkomplexen, in denen es zur Dimerisierung und Aktivierung der Initiator-Caspasen nach dem sogenannten *induced proximity model* kommt (Salvesen und Dixit, 1999). Der Multiproteinkomplex der inflammatorischen Caspasen ist das Inflammasom (Martinon und Tschopp, 2007). Die apoptotischen Caspasen-8 und -10 hingegen, werden nach extrinsischer Stimulierung des Fas-Rezeptors (auch Todesrezeptor genannt), durch Ausbildung des DISC (*death-induced signaling complex*), bestehend aus Fas-Rezeptor, FADD (*fas-associated protein with death domain*) und Caspase-8 bzw. -10, aktiviert (Kischkel et al., 1995; Wachmann et al., 2010)

Die Aktivierung von Caspase-9 wird über den intrinsischen Signalweg, beginnend mit der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytoplasma der Zelle, ausgelöst. Durch die Bindung von Cytochrom c an APAF-1 (*Apoptotic-Protease Activating Factor-1*) kommt es zu dessen Heptamerisierung. Daraus folgend bildet sich das sogenannte Apoptosom (Liu et al., 1996; Zou et al., 1997). Über die nun frei gewordene CARD von APAF-1 wird anschließend Procaspase-9 rekrutiert und autokatalytisch aktiviert (Pop et al., 2006).

Caspase-2 wird über keinen der oben beschriebenen Multiproteinkomplexe aktiviert. Insgesamt nimmt Caspase-2 eine Sonderrolle ein, da sie auf Grund ihrer Struktur zwar den Initiator-Caspasen zugeordnet wird, aber auch typische Eigenschaften einer Effektor-Caspase besitzt. Ihre zelluläre Rolle und Funktion wird zudem bis heute kontrovers diskutiert (Krumschnabel et al., 2009).

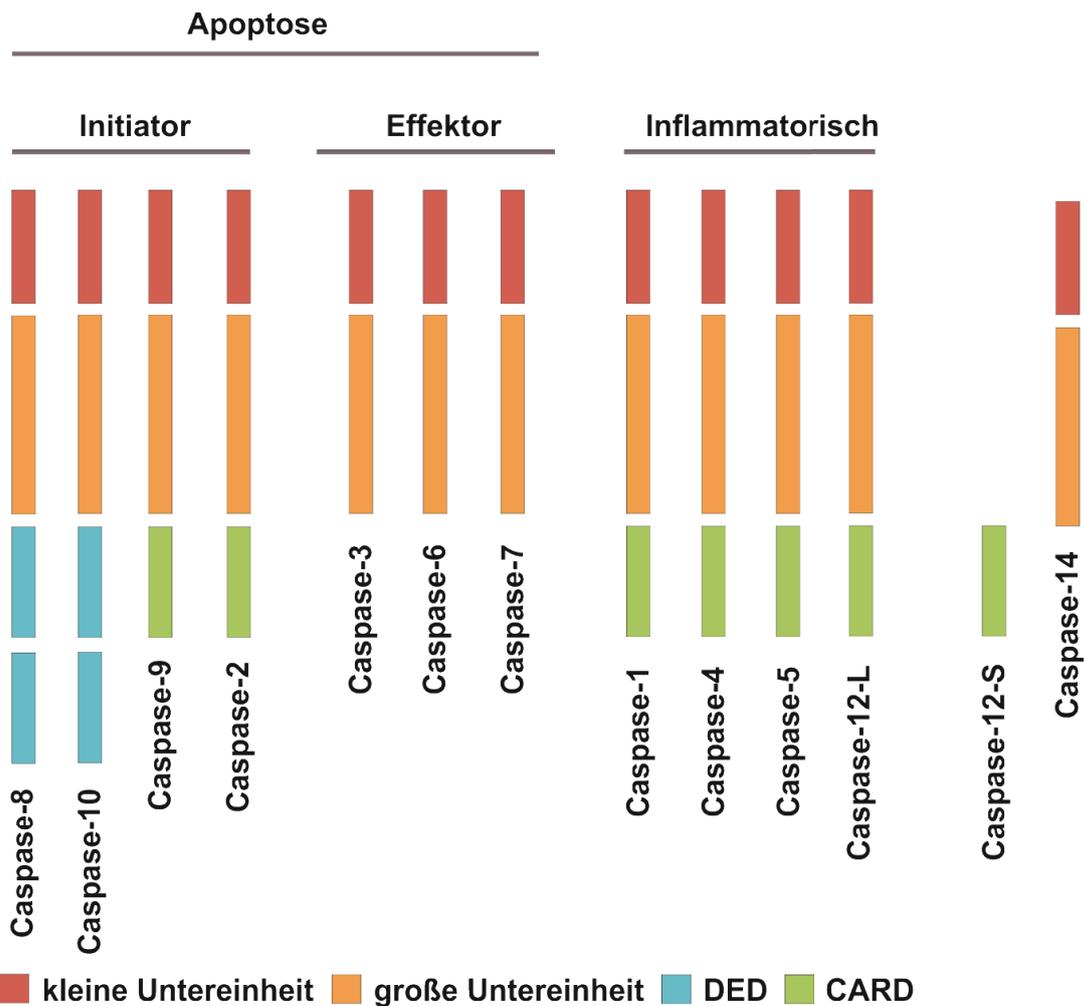


Abbildung 1: Klassifizierung der humanen Caspasen.

Caspasen lassen sich in zwei Gruppen, apoptotische Caspasen (2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10) und inflammatorische Caspasen (1, 4, 5, 6 und 12) einteilen. Die apoptotischen Caspasen unterteilen sich wiederum in Initiator-Caspasen, die eine lange Prodomäne mit einer Protein-Interaktionsdomäne CARD oder DED besitzen und die Effektor-Caspasen mit kurzer Prodomäne. Die inflammatorischen Caspasen besitzen alle eine CARD-Domäne. Von den zwei verschiedenen Isoformen von Caspase-12, ist nur die lange Isoform (Casp12L) funktionsfähig. Caspase-14 kann weder den apoptotischen noch den inflammatorischen Caspasen zugeordnet werden (Abbildung verändert entnommen aus McIlwain et al., 2013).

1.1 Caspase-2

Erstmals wurde Caspase-2 in einem Screening von Maus-Genen entdeckt, die besonders stark in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert sind, jedoch während der Entwicklung des zentralen Nervensystems herunterreguliert werden (Kumar et al., 1992). Deshalb wurde Caspase-2 zunächst *nedd2* (*neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 2*) genannt. Aufgrund starker

Homologien zum CED-3 Gen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* und zu Caspase-1 (damals noch *interleukin-1 β converting enzyme*; ICE), wurde Caspase-2 von einer anderen Arbeitsgruppe als *ICE and CED-3 homologue 1* (Ich1) bezeichnet (Wang et al., 1994).

1.1.1 Aufbau und Aktivierung von Caspase-2

Das Casp2-Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert (7q34-q35) (Kumar et al., 1995). Über alternatives Splicing werden zwei verschiedene mRNAs gebildet (Abbildung 2). Die kürzere der beiden mRNAs kodiert für ein 312 Aminosäuren (AS) langes Protein (ICH-2S oder Casp2-S). Laut *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* ist Casp2-S ein Kandidat für *nonsense mediated decay* (NMD). Allerdings führt eine Überexpression von Casp2-S in Rat-1 Zellen zu einer verminderten Zelltodrate (Wang et al., 1994). Die längere Isoform (ICH-2L oder Casp2-L) kodiert für ein 435 Aminosäuren (AS) langes Protein, dass, stark homolog zu Caspase-1 und zum CED-3 Gen des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* ist.

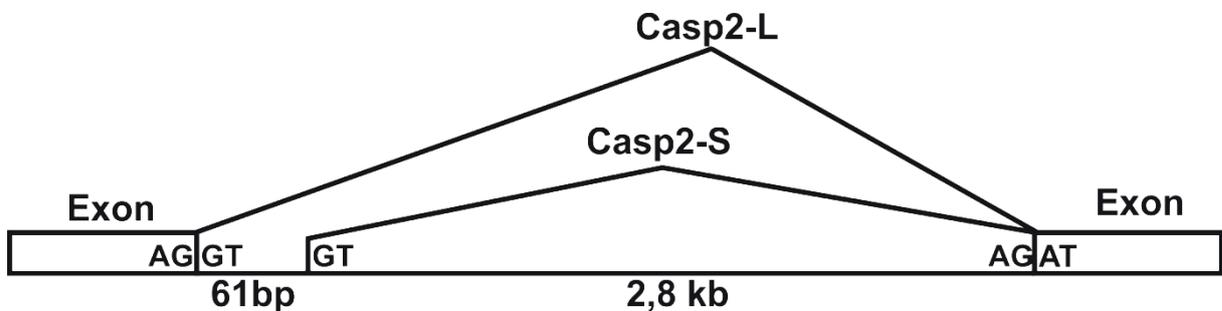


Abbildung 2: Alternatives Splicing der Casp2-mRNA.

Die Exons sind schematisch als Balken und das Intron als Strich dargestellt. Erläuterungen siehe Text (Abbildung verändert entnommen aus Wang et al., 1994)

Die inaktive Procaspase-2 besitzt eine Prodomäne mit einer für Initiator-Caspasen charakteristischen CARD-Domäne (Abbildung 3). Da Caspase-2 die einzige Caspase ist, die aktiv in den Kern transportiert wird, wurde dies zunächst auf eine Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization sequence*; NLS) innerhalb der Prodomäne zurückgeführt (Colussi et al., 1998; Zhivotovsky et al., 1999). Nach weiteren Analysen zeigte sich allerdings, dass die NLS sich innerhalb des C-terminalen Linkers befindet (Baliga et al., 2003). Die genaue Rolle,

die Caspase-2 hierbei im Kern spielt, konnte bislang allerdings noch nicht geklärt werden und wird kontrovers diskutiert (Krumshabel et al., 2009). Nach Deletion des NLS war die Fähigkeit von Caspase-2 Apoptose zu induzieren nicht beeinträchtigt (Baliga et al., 2003). Mittels BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*) konnte gezeigt werden, dass die Caspase-2 Aktivierung, ausgelöst durch zellulären Stress, im Zytoplasma stattfindet (Bouchier-Hayes et al., 2009). An die Prodomäne schließt sich die katalytische Domäne bestehend aus der großen p19-Untereinheit und der kleinen p12-Untereinheit an. Getrennt werden die beiden Untereinheiten wiederum durch einen kurzen Linker.

Die monomere Form der Procaspase-2 ist inaktiv. Die Aktivierung der Procaspase-2 erfolgt durch Dimerisierung. Die dimerisierte Form weist dabei eine Aktivität von bis zu 20% auf (Baliga et al., 2004). Wie für Initiator-Caspasen charakteristisch, wird Caspase-2 autoproteolytisch aktiviert. Es kommt dabei zunächst zur Abspaltung der p12-Untereinheit und infolgedessen zur Bildung eines aktiven und stabilen Heterodimers (p37/p14). Der Reifungsprozess der Caspase-2 wird durch die Abspaltung der Prodomäne abgeschlossen (p19/p12) (Aksenova et al., 2013; Baliga et al., 2004).

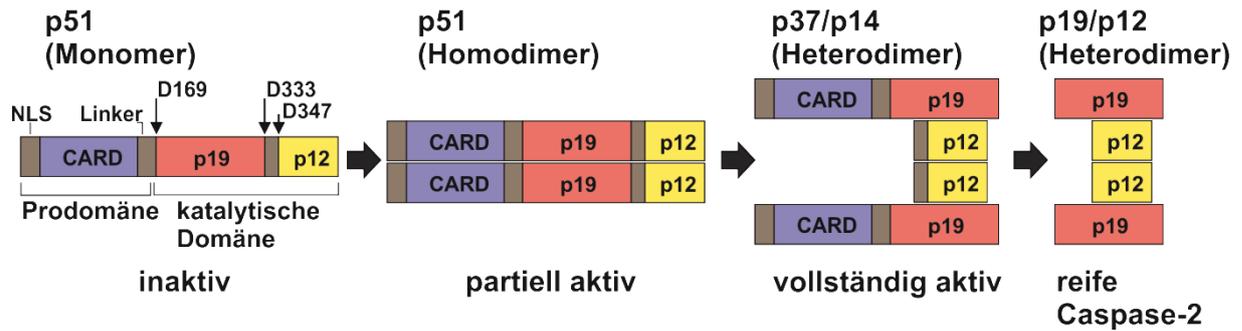


Abbildung 3: Modell des Mechanismus der Caspase-2-Aktivierung.

Die inaktive Procaspase-2 besteht aus der Prodomäne und der katalytischen Domäne. Die Prodomäne beinhaltet CARD. Die beiden Untereinheiten p19 und p12 sind durch einen Linker voneinander getrennt und bilden gemeinsam die katalytische Domäne. Die autokatalytische Spaltung der Procaspase-2 ist ein dreiteiliger Prozess. Im ersten Schritt bildet sich durch Dimerisierung ein partiell aktives Homodimer. Im zweiten Schritt kommt es durch autokatalytische Spaltung an der Asparaginsäure 333 (D333) zur Abtrennung der p12 Untereinheit und zur Ausbildung eines p37/p14 Heterodimers. Im dritten Schritt erfolgt die Abspaltung der Prodomäne, sowie des zwischen den Untereinheiten befindlichen Linkers, durch Spaltung bei D169 und D347.

Der Signalweg der Caspase-2-Aktivierung konnte bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Der folgende Abschnitt soll dennoch einen kurzen Überblick über die bislang bekannten Faktoren der Caspase-2-Aktivierung und über den Einfluss von Caspase-2 auf Seneszenz und Apoptose geben.

1.1.2 Aktivierung von Caspase-2 nach DNA Schäden

Caspase-2 kann durch unterschiedliche Arten des zellulären Stresses aktiviert werden. Nach DNA-Schäden, ausgelöst durch Gamma-Bestrahlung (γ -IR), werden zunächst die beiden Kinasen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 ATR related*) aktiviert (Abbildung 4). Diese aktivieren wiederum durch Phosphorylierung einige Zielproteine. ATM phosphoryliert hierbei PIDD (*p53-induced death domain-containing protein*) das daraufhin RAIDD binden kann. Die anschließende CARD-CARD Interaktion zwischen RAIDD und Procaspase-2 führt zur Ausbildung des PIDDosome-Komplexes und der damit verbundenen Aktivierung von Caspase-2 (Ando et al., 2012).

ATM/ATR phosphorylieren auch die Checkpoint-Kinase 2 (CHK2), die anschließend durch Phosphorylierung den Tumorsuppressor p53 aktiviert. p53 ist ein

Schlüsselprotein, das an der Induktion des Zellzyklusarrests, der DNA-Reparatur und der Einleitung von Seneszenz und Apoptose beteiligt ist (Chène, 2003). Die Regulation von über 100 Genen durch p53 konnte bislang experimentell bestätigt werden (Riley et al., 2008; Whibley et al., 2009). Es ist deshalb nicht überraschend, dass man in über 50% aller Tumoren somatische Mutationen von p53 findet (Hollstein et al., 1991). In gesunden und ungestressten Zellen ist p53 aufgrund seiner geringen Halbwertszeit nur in niedriger Konzentration zu finden. p53 wird dann durch die Ubiquitinligase MDM2 (*Mouse double minute 2 homolog*) permanent ubiquitiniert und anschließend proteosomal degradiert (Zhao und Xu, 2010). Gleichzeitig fördert p53 die Transkription von MDM2 und wirkt so indirekt in einem sogenannten negativen *feedback loop* inhibierend auf seine eigene Expression (Barak et al., 1993). Ist p53 aber durch CHK2 bereits phosphoryliert worden, kann MDM2 nicht mehr an p53 binden und dessen Abbau einleiten (Hirao et al., 2000). In Folge dessen kann p53 in der Zelle akkumulieren und leitet je nach DNA-Schaden einen vorläufigen Zellzyklusarrest, die Seneszenz oder die Apoptose der geschädigten Zelle ein.

Den Zellzyklusarrest und die Seneszenz steuert p53 maßgeblich über die vermehrte Transkription des CDK-Inhibitors p21 (Georgakilas et al., 2017). Die Apoptose leitet p53 durch die Induktion der Transkription von PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) ein (Nakano und Vousden, 2001, p. 53). PUMA gehört zur Familie der BH3-only Proteine. Durch Inhibition der antiapoptotischen Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) Proteine hat PUMA indirekt einen positiven Einfluss auf die Aktivität der proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bak (*Bcl-2 Antagonist Killer*) und Bax (*Bcl-2 Associated X protein*) (Yu und Zhang, 2008). Diese leiten den Ausstrom von Cytochrom C aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Zytoplasma der Zelle ein. Durch die anschließende Bildung des Apoptosoms werden die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 kaskadenartig aktiviert und die Apoptose der Zelle induziert (Slee et al., 1999). Dass Caspase-3 wiederum Caspase-2 durch Spaltung aktivieren kann, unterstreicht die Sonderrolle und schwierige Klassifizierung von Caspase-2 (Paroni et al., 2001; Van de Craen et al., 1999). Keine andere Initiator-Caspase wird durch eine Effektor-Caspase gespalten.

Caspase-2 wird aber auch über p53 aktiviert. Als Transkriptionsfaktor von PIDD induziert p53 dessen vermehrte Transkription und fördert so indirekt die Aktivie-

rung von Caspase-2 über das PIDDosome (Aksenova et al., 2013). Umgekehrt hat Caspase-2 aber auch einen positiven Einfluss auf die Aktivität von p53. Aktive Caspase-2 kann Mdm2 spalten und infolgedessen die Ubiquitinierung von p53 durch Mdm2 inhibieren (Oliver et al., 2011). Die Spaltung von Mdm2 ist ein weiteres Beispiel dafür, dass Caspase-2 keine klassische Initiator-Caspase ist (Van de Craen et al., 1999).

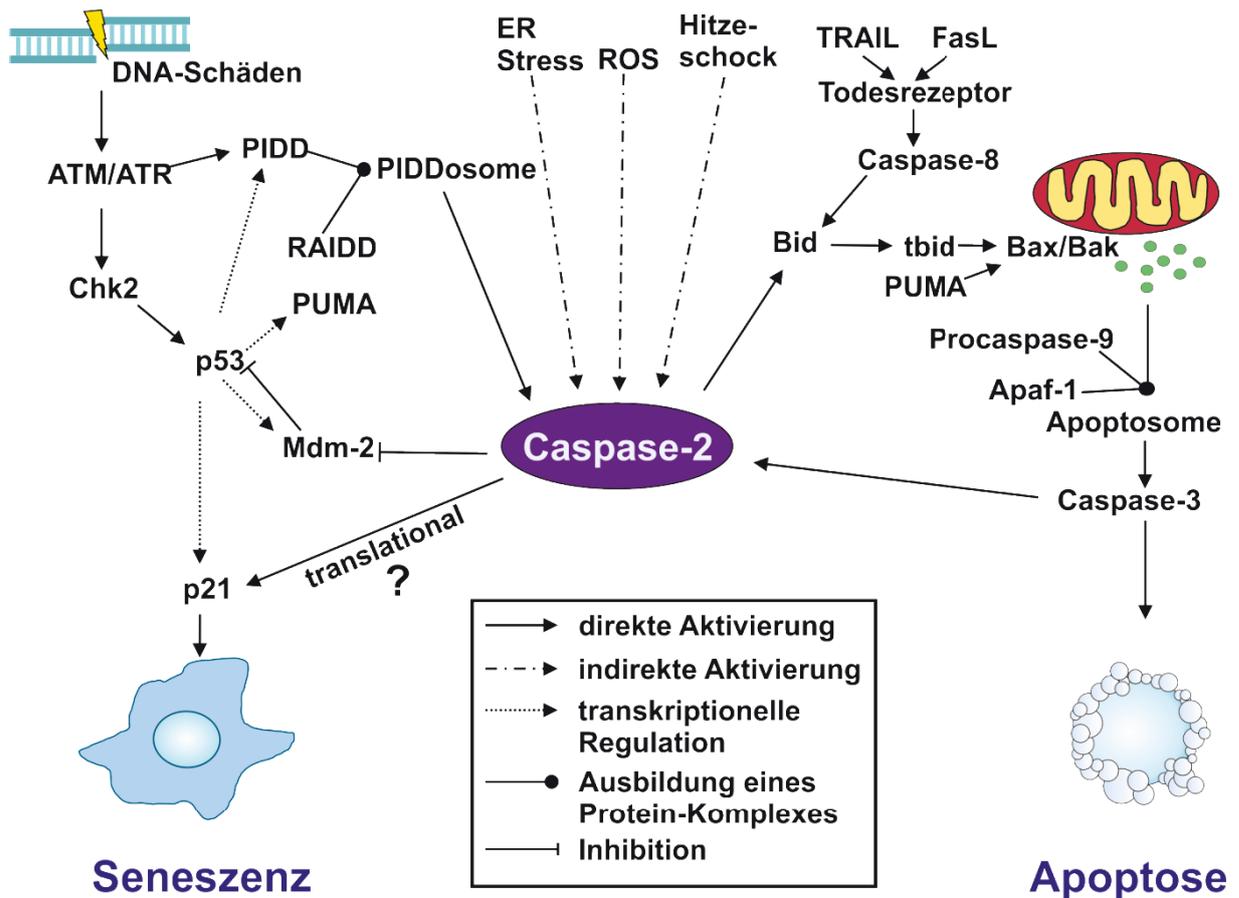


Abbildung 4: Überblick über die Signalwege der Caspase-2 Aktivierung. Erläuterungen zur Signaltransduktion vgl. Abschnitt 1.1.2 und 1.1.3.

1.1.3 Alternative Wege der Caspase-2 Aktivierung

Neben der Caspase-2 Aktivierung durch γ -IR können auch andere äußere Einflüsse eine Aktivierung von Caspase-2 induzieren (Abbildung 4). Die Fähigkeit des Organismus auf einen Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*; ROS) zu reagieren, die unter anderem als Nebenprodukte bei der Zellatmung in den Mitochondrien entstehen, ist ein wichtiger Faktor der über

beschleunigte Alterungsprozesse und die damit einhergehende Lebenserwartung entscheidet (Finkel und Holbrook, 2000). Die Lebenserwartung von Caspase-2-defizienten Mäusen ist signifikant reduziert. Bei diesen Mäusen ist eine erhöhte Konzentration von oxidierten Proteinen in der Leber messbar. Dies ist unter anderem auf einen Anstieg von ROS zurückzuführen (Zhang et al., 2007). In Jurkat T-Zellen führte ein Anstieg von ROS zu einer Caspase-2 Aktivierung und einer daraus resultierenden Caspase-2 induzierten Apoptose (Dirsch et al., 2004; Finkel und Holbrook, 2000).

Die Aktivierung von Caspase-2 im Rahmen der *death receptor* (DR)-abhängigen Apoptose konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden. In humanen T- und B-Zelllinien wird Caspase-2 zum Fas-Rezeptor (FasR) nach dessen Stimulation rekrutiert und aktiviert. Die Apoptose kann Caspase-2 in Caspase-8-defizienten Zellen jedoch nicht einleiten (Lavrik et al., 2006). Die Abwesenheit von Caspase-2 führt in humanen leukämischen Zelllinien allerdings zu verminderter Caspase-8 Aktivität und daraus resultierend zu einer verspäteten DR-abhängigen Apoptose (Droin et al., 2001). Zudem scheint Caspase-2 für die Prozessierung und somit Aktivierung von Caspase-8 eine wichtige Rolle zu spielen (Shin et al., 2005). Sowohl Caspase-2 als auch Caspase-8 können BID (*BH3 interacting-domain death agonist*) spalten. Das daraus entstehende truncierte BID (tBid) gehört wie PUMA zur Familie der BH3-only Proteine (vgl. Abschnitt 1.1.2) und hebt ebenfalls durch Assoziierung mit den antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen deren inhibitorische Wirkung auf die proapoptotischen Proteine Bak und Bax auf (Willis et al., 2007).

Auch nach ER-Stress (endoplasmatisches Retikulum) ist Caspase-2 ein wichtiger Initiator der Apoptose. So kommt es nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit ER-schädigenden Substanzen zu einer Caspase-2 Aktivierung (Dahmer, 2005; Upton et al., 2008). Mit Hilfe konfokaler Mikroskopie konnte zudem gezeigt werden, dass Caspase-2 im ER lokalisiert ist und gemeinsam mit Caspase-9 nach ER-Stress prozessiert wird. Nach Inhibition dieser beiden Caspasen war die durch ER-Stress induzierte Apoptose in HeLa-Zellen signifikant reduziert (Cheung et al., 2006). Des Weiteren sind MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*), die mit Caspase-2 siRNA (*small interfering RNA*) behandelt wurden, deutlich resistenter gegen ER-Stress (Upton et al., 2008).

Die Aktivierung von Caspase-2 durch Hitzeschock wird kontrovers diskutiert. In Jurkat T-Zellen war nach Hitzeschock eine Caspase-2 Aktivierung mit anschließender Induktion der Apoptose über die Prozessierung von BID zu beobachten (Bonzon et al., 2006; Tu et al., 2006). Diese Ergebnisse konnten allerdings bislang nicht in anderen Zelllinien reproduziert werden (Krumshnabel et al., 2009). Des Weiteren wurde bereits eine Caspase-2-unabhängige direkte Aktivierung von Bax und Bak nach Hitzeschock beschrieben (Pagliari et al., 2005). Die Auffassung, dass Caspase-2 in seiner Funktion ausschließlich für die Regulation der Apoptose verantwortlich ist, hat sich in den letzten Jahren gewandelt. Mittlerweile wird Caspase-2 eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus, als Tumorsuppressor und als Regulator der genomischen Stabilität zugeschrieben (Puccini et al., 2013).

1.1.4 Die Rolle von Caspase-2 bei der Kontrolle des Zellzyklus, als Tumorsuppressor und als Regulator der genomischen Stabilität

Sechs Schlüsselmerkmale eines Tumors wurden als sogenannte *Hallmarks of Cancer* definiert. Dazu zählen die anhaltende und verstärkte Proliferation, das nicht ansprechen auf wachstumshemmende Faktoren, die Resistenz gegenüber Zelltod, die unbegrenzte Replikationsfähigkeit, eine verstärkte Angiogenese, die Fähigkeit invasiv zu wachsen und die Fähigkeit zu metastasieren (Hanahan und Weinberg, 2011). Ursächlich für diese Tumoreigenschaften ist unter anderem der Verlust der genomischen Stabilität einer Tumorzelle. Caspase-2 scheint bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität eine wichtige Rolle zu spielen. Wie unter 1.2.1 bereits erwähnt, befindet sich das Casp2-Gen auf Chromosom 7q34-35, einer Region die bei vielen malignen hämatologischen Erkrankungen, wie akute myeloische Leukämie (AML) deletiert ist (Kumar et al., 1995). Bei Kindern, die an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erkrankt sind und die auf die Behandlung mit Chemotherapeutika ein schlechtes Ansprechen zeigen, korreliert dies meist mit reduzierter Caspase-2 Expression (Holleman et al., 2005). Des Weiteren ist eine verringerte Caspase-2 Expression bei Erwachsenen mit AML und ALL oft mit einer schlechten Prognose assoziiert (Estrov et al., 1998; Faderl et al., 1999). Nicht nur in malignen hämatologischen Erkrankungen, sondern auch in diversen soliden Tumoren, wie dem hepatozellulären

Karzinom, dem invasiven Mammakarzinom, dem Ovarialkarzinom und dem Glioblastom, ist die Expression von Caspase-2 verringert (Ren et al., 2012). Diese Beobachtungen decken sich mit einer Studie, bei der die Genexpression von Hirnmetastasen, die primär aus Adenokarzinomen der Lunge entstanden sind, untersucht wurden. Auch in diesen Zellen war eine verminderte Caspase-2 Expression messbar (Zohrabian et al., 2007). Zudem findet man vermehrt somatische Mutationen von Caspase-2 in Magenkarzinomen und kolorektalen Karzinomen (Kim et al., 2011).

Im Mausmodell führte ein *Caspase-2-Knockout* (KO) alleine aber noch nicht zu einer verstärkten Tumorbildung. In E μ -Myc transgenen Mäusen, bei denen das c-myc-Protoonkogen unter der Kontrolle eines IgH Enhancers (*immunoglobulin heavy-chain*) exprimiert wird, führt die Deletion von nur einem Allel von Caspase-2 hingegen schon zu einer verstärkten Tumorbildung (Harris et al., 1988; Ho et al., 2009). Zudem zeigen Caspase-2-defiziente MEFs nach Bestrahlung eine verstärkte Proliferation, die in genomischer Instabilität resultiert. Weitere Kennzeichen dieser MEFs sind vermehrte Aneuploidien und signifikant reduzierte Telomer-Enden (Dorstyn et al., 2012). Wie genau Caspase-2 dabei die genomische Stabilität reguliert, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. In den zuvor beschriebenen MEFs führte die Abwesenheit von Caspase-2 zu einer reduzierten Aktivierung von p53. Als Folge war die Induktion der p21-Expression nach DNA-Schädigung reduziert (Dorstyn et al., 2012). Anders als in den Caspase-2-defizienten MEFs, konnte hingegen eine p53-unabhängige translationale Kontrolle der p21-Expression durch Caspase-2 in den beiden Tumorzelllinien HCT116 und MCF-7 gezeigt werden (Sohn et al., 2011).

Die translationale Regulation von p21 durch Caspase-2 könnte eine Erklärung für die Rolle von Caspase-2 bei der Kontrolle des Zellzyklus, als Tumorsuppressor und als Regulator der genomischen Stabilität sein.

1.2 p21

Aktiviert durch Cycline wird die Zellproliferation maßgeblich durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) induziert (Malumbres, 2014). Die CDKs unterliegen dabei einer strengen Kontrolle durch zwei verschiedene Klassen von CDK-Inhibitoren. Während die INK4 (*inhibitor of kinase 4*)-Familienmitglieder

p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d} lediglich CDK4 und CDK6 spezifisch binden und inhibieren, sind die drei Familienmitglieder der CIP/KIP Familie p21^{CIP1/WAF1}, p27^{KIP1} (*CDK inhibitory protein 1*), p57^{KIP2} (*CDK inhibitory protein 2*) für die Inhibition von zahlreichen CDKs verantwortlich (Roussel, 1999; Sherr und Roberts, 1999, 1995). Strukturell gemeinsam ist den drei Familienmitgliedern der CIP/KIP-Familie nur die homologe N-terminale Region, über die die Inhibition der CDKs erfolgt (Besson et al., 2008).

Das 21 Kilo-Dalton (kDa) große Protein p21 wurde auf unterschiedliche Weise entdeckt und beschrieben. Deshalb wird p21 auch als CDK-Inhibitor Protein 1 (CIP1), als Zielgen WAF des Transkriptionsfaktors p53 und als Sdi1 (*senescent cell-derived inhibitor 1*), einem Inhibitor der DNA-Synthese in seneszenten Fibroblasten, bezeichnet (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Noda et al., 1994; Xiong et al., 1993).

p21 spielt nicht nur bei der Regulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle, sondern steuert auch maßgeblich die DNA-Reparatur, die Seneszenz und die Zellalterung. Aus diesem Grund unterliegt p21 einer sehr strengen transkriptionellen, aber auch posttranskriptionellen und posttranslationalen Regulation (Jung et al., 2010).

1.2.1 Transkriptionelle Regulation von p21

Auf Chromosom 6p21.2 befindet sich das für das p21-Protein kodierende *cdkn1a* Gen (el-Deiry et al., 1993). Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, reguliert p53 die Transkription von p21. Dabei bindet p53 an *p53-response elements* (p53-RE) (el-Deiry et al., 1993). Neben p53, binden auch p63 und p73 (Abbildung 5), die aufgrund ihrer ähnlichen Struktur zur p53-Familie gehören, an die p53-REs (Harms et al., 2004). Auslöser für die p53 vermittelte Induktion der p21 Transkription sind extrinsische Faktoren, wie DNA-Schäden oder oxidativer Stress (Jung et al., 2010). Nach DNA-Schäden spielen dabei unter anderem die Proteine BRCA1 (*Breast Cancer 1*) und Pin1 (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1*) bei der p53 Stabilisierung und Aktivierung eine große Rolle. Der Tumorsuppressor BRCA1 rekrutiert p300/CBP, die wiederum durch Acetylierung p53 stabilisieren (Chai et al., 1999). Durch Phosphorylierung der Serine -33 und -46 des p53 Proteins, aktiviert Pin p53 und fördert somit indi-

rekt die p21 Transkription nach DNA-Schäden (Wulf et al., 2002; Zheng et al., 2002). Als wichtiger Zellzyklus Regulator unterliegt p21 einer sehr strengen transkriptionellen Regulation. So binden und regulieren zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren unabhängig von p53 die p21-Transkription.

Im proximalen Teil des p21 Promotors befinden sich sechs Sp1/Sp3 Bindestellen. In Abhängigkeit von einer Vielzahl von Faktoren, zu denen auch der Wachstumsfaktor TGF- β (*Transforming growth factor β*) gehört, binden die beiden Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 über ihre Zinkfingerdomänen an die Sp1/Sp3 Bindestellen und können so die Transkription von p21 induzieren (Gartel et al., 2000; Gartel und Tyner, 1999).

Auf Basis von Interaktionsstudien wird vermutet, dass der Transkriptionsfaktor c-Myc, dessen Expression in Tumorzellen oft verstärkt ist, durch Bindung an SP1 und SP3 die Transkription von p21 indirekt reprimiert (Gartel et al., 2001). Des Weiteren wird eine Bindung von c-Myc an Miz1, einem Initiator-Sequenz (INR) bindenden Protein, das der bei der Induktion der p21 Transkription während der hämatopoetischen Zelldifferenzierung eine große Rolle spielt, vermutet (Wu et al., 2003). Microarray-Daten sprechen allerdings gegen eine Interaktion von Miz1 und p21 (Ziegelbauer et al., 2004).

Reprimiert wird die Transkription von p21 auch durch den Transkriptionsfaktor CUT. Dieser bindet mit seiner Homöodomäne im Bereich der TATA-Box des *cdkn1a* Gens (Coqueret et al., 1998). Neben den oben beschriebenen Transkriptionsfaktor-Bindestellen sind mehrere E-Box (*enhancer box*)-Elemente für die Regulation der p21 Transkription von Bedeutung. Dabei verstärken die beiden Helix-Loop-Helix (HLH) Transkriptionsfaktoren E12/E47 durch Bindung an die E-Elemente die Transkription von p21. Das HLH-Protein ID1 (*inhibitor of DNA binding 1*) heterodimerisiert wiederum mit E12/E47 und verhindert so deren Bindung an die E-Box-Elemente (Gartel und Radhakrishnan, 2005; Prabhu et al., 1997).

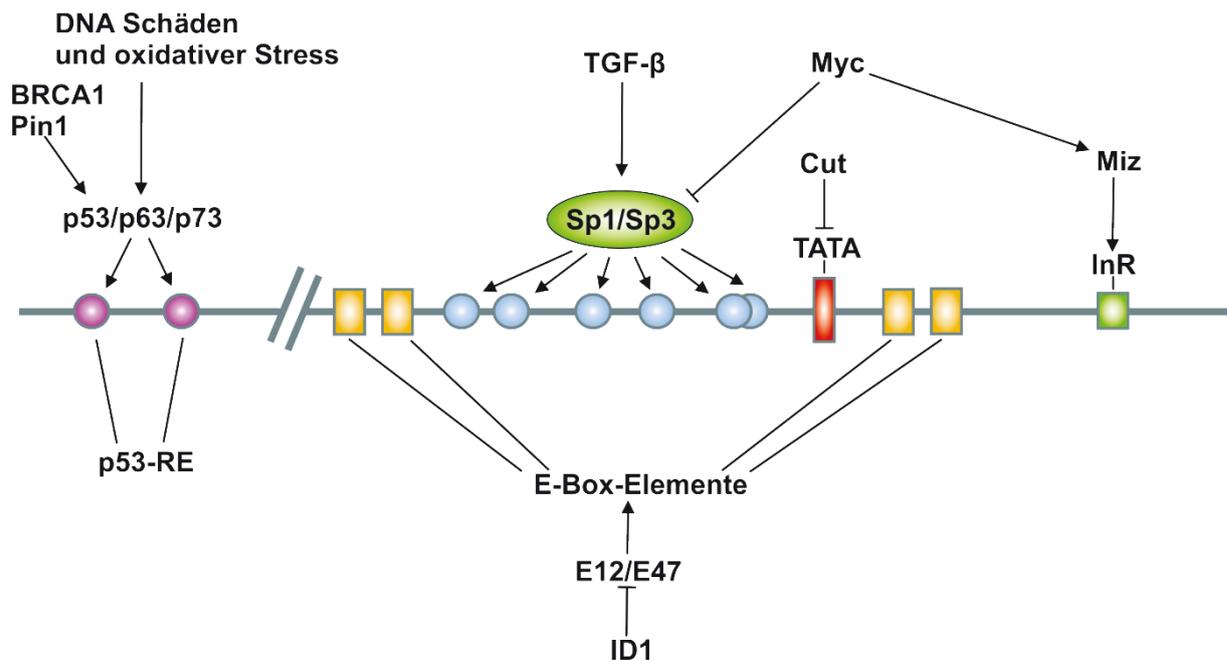


Abbildung 5: p21-Promotor.

Schematische Darstellung des p21-Promotors mit den für die transkriptionelle Regulation relevanten Sequenz-Elementen (p53-RE, Sp1/Sp3 Bindestellen, E-Box-Elemente, TATA und INR) und den dazugehörigen Transkriptionsfaktoren (p53, p63, p73, Sp1/Sp3, TGF- β , Myc, Miz, Cut, E12/E47 und ID1).

1.2.2 Posttranskriptionelle Regulation von p21 vermittelt durch microRNAs (miRNAs)

Neben der oben beschriebenen transkriptionellen Regulation unterliegt p21 auch einer strikten posttranskriptionellen Regulation. miRNAs, eine neue Klasse von kleinen nicht-kodierenden RNA-Molekülen, rücken als Regulatoren der posttranskriptionellen Regulation immer mehr in den Fokus der Forschung (O'Brien et al., 2018). Mit über 1000 Mitgliedern gehören die miRNAs zu einer der größten genetischen Familien und könnten an der Regulation von über 30% aller Protein-kodierenden Gene beteiligt sein (Lewis et al., 2005). Dabei kann eine einzelne miRNA zahlreiche Gene binden und regulieren (Lim et al., 2005). Die gleichzeitige Bindung von verschiedenen miRNAs an eine einzelne mRNA, verstärkt den Einfluss der miRNAs auf die posttranskriptionelle Regulation (Krek et al., 2005).

In einem mehrstufigen Prozess werden diese miRNAs aus nicht Protein-kodierenden genomischen Bereichen gebildet. Im ersten Schritt wird mit Hilfe der RNA-Polymerase II einzelsträngige pri-miRNA (*primary miRNA*) syntheti-

siert (Saini et al., 2007). Vermittelt durch palindromische Bereiche bildet diese pri-miRNA eine Sekundärstruktur aus, bevor die Ribonuklease Drosha diese in eine 65- bis 75-Nukleotid (nt) lange haarnadelförmige pre-miRNA (*precursor miRNA*) aufspaltet (Kim und Kim, 2007). Nach Export wird durch Spaltung durch die Endoribonuklease Dicer die reife 20- bis 22 nt lange miRNA gebildet (Lund und Dahlberg, 2006; Meister und Tuschl, 2004).

Die Bindung der miRNA an die entsprechende Ziel-mRNA wird über den *RNA-induced silencing complex* (RISC) gesteuert. Die doppelsträngige miRNA bildet dabei zunächst mit Proteinen der Argonaut-Familie den prä-RISC-Komplex aus (Wilson und Doudna, 2013). Dabei wird doppelsträngige miRNA entwunden und in zwei einzelsträngige miRNAs aufgespalten. Einer dieser miRNA Einzelstränge wird umgehend degradiert. Der im Komplex verbleibende miRNA Einzelstrang wird Leitstrang genannt (Kim et al., 2007). Dieser als *holo-RISC* bezeichnete Komplex bindet in Abhängigkeit der zwischen den Basen 2-7 gelegenen *seed-region* des Leitstranges an die Ziel-mRNA (Lewis et al., 2005). Die Bindung des holo-RISC an die 5' und oder 3'UTR der Ziel-mRNAs hat eine verminderte mRNA-Translation oder eine vermehrte Degradation der entsprechenden mRNA zur Folge (Bartel, 2004; Filipowicz et al., 2008).

miRNAs des miR-106a-363-, miR-106b-25- und des miR-17-92-Cluster besitzen identische Nukleotidsequenzen innerhalb der *seed-region*, binden mit dieser die p21-3'UTR und inhibieren auf diesem Weg die p21-Expression (Fontana et al., 2008; Ivanovska et al., 2008; Petrocca et al., 2008) (Abbildung 6A). Demzufolge führt die Überexpression dieser miRNAs zu einer verstärkten Zellproliferation (Li et al., 2009).

Die miRNAs der miR-125- und der miR-29 Familie binden die p53-3'UTR und regulieren so indirekt die p21-Expression (Park et al., 2009; Zhang et al., 2009) (Abbildung 6A). Mittels Mikroarray-Analysen und bioinformatischen Ansätzen konnten weitere miRNAs identifiziert werden, die für die posttranskriptionale Regulation von p21 verantwortlich sind (Ivanovska et al., 2008; Petrocca et al., 2008). Anhand eines Luciferase-Reporter-Assays konnte die direkte Bindung von 28 verschiedenen miRNAs an 18 miRNA Bindestellen innerhalb der p21-3'UTR nachgewiesen werden (Borgdorff et al., 2010; Wu et al., 2010) (Abbildung 6B).

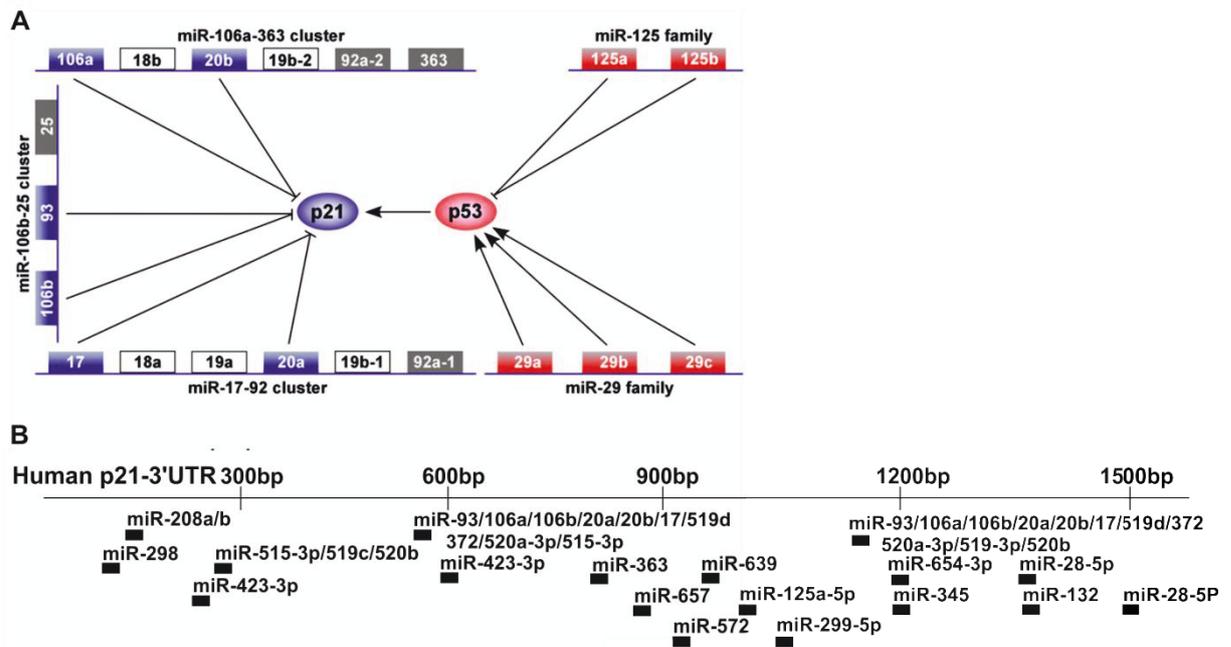


Abbildung 6: Posttranskriptionelle Regulation von p21 durch miRNAs.

A) Schematische Darstellung von 5 miRNA Clustern. Das miR-106a-363-, miR-106b-25- und das miR-17-92-Cluster regulieren p21 durch direkte Bindung an die 3'UTR. Die miRNAs der miR-125- und der miR-29 Familie steuern die p21-Expression indirekt durch posttranskriptionelle Regulation von p53 (Abbildung verändert entnommen aus Jung et al., 2010). **B)** Schematische Darstellung der humanen p21-3'UTR mit den potenziellen miRNA-Bindestellen. Insgesamt wurden mittels Luciferase-Reporter-Assays 28 potenzielle p21 regulierende miRNAs identifiziert. Einige dieser miRNAs teilen sich dieselbe Bindestelle, sodass insgesamt nur 18 Bindestellen identifiziert wurden (Abbildung verändert entnommen aus Wu et al., 2010).

1.2.3 Posttranskriptionelle Regulation von p21 vermittelt durch RNA-bindende Proteine (RBPs)

Neben miRNAs sind RNA-bindende-Proteine (RBPs) nahezu an allen Schritten der posttranskriptionellen Regulation beteiligt. Durch die Interaktion von RBPs mit anderen Proteinen, sowie kodierenden und nicht kodierenden RNAs, entstehen sogenannte Ribonukleoprotein-Komplexe. Diese funktionalen Einheiten regulieren das Splicing, die Polyadenylierung, die Stabilität, die Degradierung, die Lokalisation und die Translation der mRNA (Dreyfuss et al., 2002; Mitchell und Parker, 2014).

Viele RBPs binden an bestimmte sequenzspezifische Motive wie *AU-rich elements* (ARE) oder auch Sekundärstrukturen der RNA. Vermittelt wird die Bindung durch RNA-bindende Domänen (RBDs) (Lunde et al., 2007). Das dabei

am häufigsten vorkommende Motiv ist das RRM (*RNA recognition motif*). RRMs sind ungefähr 90 AS lang. Abgesehen von einem Leitmotiv im Zentrum ist die Struktur der RRMs divers und ermöglicht folglich eine hohe Bindungsspezifität (Maris et al., 2005). Die Pumilio-Proteine gehören zu einer weiteren prominenten RBP-Familie. Diese besitzen in der Regel acht als *Pumilio-repeats* bezeichnete Domänen, die wiederum aus zwei alpha-Helices bestehen (Wang et al., 2001, 2002). Die KH-Domäne (*K homology domain*) wurde erstmals bei hnRNP-K (*human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) entdeckt und wurde seither in zahlreichen weiteren Proteinen identifiziert, die in der Lage sind RNA oder ssDNA (*single-stranded DNA*) zu binden (Valverde et al., 2008). Doppelsträngige RNA hingegen wird von den dsRBDs (*double stranded RNA binding domains*) gebunden. Diese kleinen etwa 65 bis 70 AS großen Domänen findet man in eukaryotischen Proteinen, aber auch in Bakterien und Viren. Proteine mit dsRBDs sind oft an den Prozessen der RNA-Editierung, -Prozessierung oder des -Transports beteiligt (Banerjee und Barraud, 2014; Masliah et al., 2013).

DEAD-box Helikasen sind hochkonservierte Enzyme und wurden erstmalig im Zusammenhang mit der Auflösung von RNA-Duplex-Strukturen beschrieben (Hilbert et al., 2009; Linder und Jankowsky, 2011). Tatsächlich sind sie an nahezu allen Prozessen des RNA-Metabolismus- von der Transkription bis zur RNA-Degradation beteiligt (Putnam und Jankowsky, 2013).

In RBPs findet man zumeist nicht nur eine RBD, sondern eine Kombination von mehreren der oben beschriebenen Domänen. Dadurch wird eine hohe Spezifität und Affinität der einzelnen RBPs garantiert (Lunde et al., 2007). RBPs binden allerdings nicht nur an klar definierte Sequenzen in der RNA. Nahezu die Hälfte aller RBPs bindet vermeintlich unspezifisch an RNA. Die Bindung an die RNA wird dabei unter anderem durch die Konzentration von RBPs in der Zelle oder auch durch die Interaktion mit Kofaktoren gesteuert (Jankowsky und Harris, 2015). Des Weiteren besitzen RBPs strukturell viele undefinierte Bereiche. Diese Bereiche sind flexibel in ihrer Konformation und können sich dementsprechend unterschiedlichen Bindungspartnern anpassen (Calabretta und Richard, 2015; Järvelin et al., 2016).

Die Länge der rund 1500 bp großen p21-3'UTR lässt erahnen, dass diese einer strikten Regulation durch RBPs unterliegt. Als eines der ersten Proteine, das

die Stabilität der p21-3'UTR reguliert, wurde HuD beschrieben (Joseph et al., 1998). HuD gehört zusammen mit Hel-N, HuC und HuR zur Familie der *Elav-like-proteins* (Abbildung 7) (Ma et al., 1996). Die Proteine dieser Familie besitzen drei RRM's (Kenan et al., 1991). Über diese RRM's werden AREs der p21-3'UTR gebunden und so deren Stabilität erhöht (Yano et al., 2005). RBM38 (oder auch RNPC1) besitzt im Gegensatz zu den oben beschriebenen *Elav-like proteins* nur eine RRM mit der es die AREs der p21-3'UTR bindet und stabilisiert. Reguliert wird die RBM38 Transkription wiederum durch p53 (Shu et al., 2006). RBM38 reguliert nicht nur durch direkte Bindung an die p21-3'UTR deren Stabilität, sondern auch indirekt durch Interaktion mit HUR, dessen Bindungsaffinität sich zur p21-3'UTR in der Folge erhöht (Cho et al., 2010). Während die oben beschriebenen RBPs die Stabilität der p21-3'UTR erhöhen, bindet AUF1 (oder auch hnRNP D) mit seinen zwei RRM's die AREs der p21-3'UTR und destabilisiert diese (Abbildung 7) (Loflin et al., 1999; White et al., 2017). Dabei konkurrieren HUR und AUF1, um die Bindung im selben Bereich der p21-3'UTR. Musashi-1 bindet mit seinen beiden RRM's ebenfalls die p21-3'UTR, reguliert dabei aber nicht deren Stabilität, sondern wirkt reprimierend auf die p21-Translation (Battelli et al., 2006).

Die Poly-C-bindenden Proteine 1 und 2 (PCBP1 und 2) besitzen drei KH-Domänen mit denen sie Poly-C-Sequenzen in DNA und RNA binden können. Beide binden an die p21-3'UTR und destabilisieren diese (Abbildung 7) (Waggoner et al., 2009). Auch hnRNP K besitzt drei KH-Domänen und destabilisiert (wie PCBP1 und 2) die p21-3'UTR (Chaudhury et al., 2010; Yano et al., 2005). Des Weiteren reguliert hnRNP K nach Interaktion mit dem p21-RBP RBM42 die Aufrechterhaltung des zellulären ATP-Spiegels (Fukuda et al., 2009).

NF90 gehört zur Familie der dsRBMs (Abbildung 7). Vorwiegend ist NF90 im Kern lokalisiert. Nach seiner Translokation in das Zytoplasma, stabilisiert NF90 die p21-mRNA durch Bindung an die p21-3'UTR (Kao et al., 1994). Die Stabilität der nur 80 bp langen 5'UTR von p21, wird hingegen durch die RBPs CUGBP1 (*CUG-binding protein 1*) und Calreticulin beeinflusst. Beide Proteine konkurrieren um eine Bindungsstelle innerhalb der 5'-UTR. CUGBP1 hat dabei einen stabilisierenden und Calreticulin einen destabilisierenden Effekt (Iakova et al., 2004).

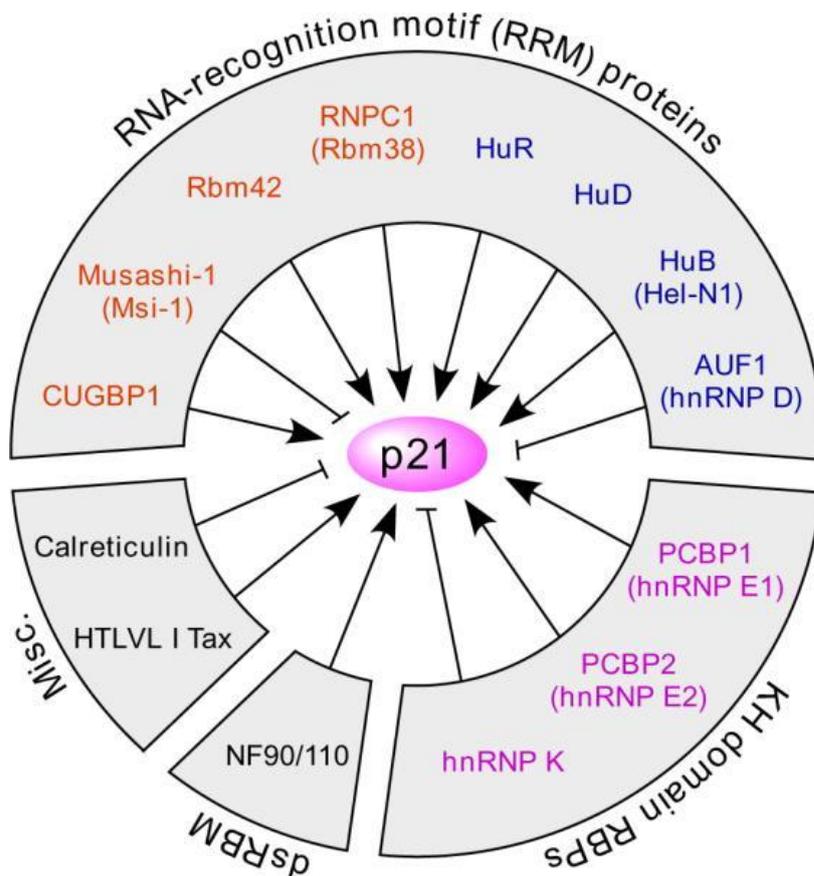


Abbildung 7: Posttranskriptionelle Regulation von p21 durch RBPs.

Die p21-mRNA-bindende Proteine (p21-mRBPs) besitzen einzelne oder oft mehrere unterschiedliche RBDs. Dazu zählen RRM, KH-Domänen und dsRBDs (Misc.; *miscellaneous*) (Abbildung verändert entnommen aus Jung et al., 2010).

1.2.4 Posttranskriptionelle Regulation von p21 vermittelt durch Caspase-2

Neben der p53-abhängigen Induktion der Seneszenz reguliert p21 gleichzeitig die Aktivierung von Caspasen und die Apoptose. Dabei verhindert p21 nach γ -IR zwar nicht die Prozessierung von Caspase-2 und die Depolarisierung der äußeren Mitochondrienmembran mit der daraus resultierenden Freisetzung von Cytochrom c, stoppt hingegen die Einleitung der Apoptose durch die Inhibition der Caspase-9-Aktivierung (Sohn et al., 2006).

Nach *knockdown* von Caspase-2 gehen HCT116 WT-Zellen nach γ -IR nicht in die Seneszenz, sondern in die Apoptose über (Sohn et al., 2011). Messbar ist dies durch eine vermehrte Prozessierung und Aktivierung von Caspase-3 und einer vermehrten Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH). Ursächlich hier-

für ist nicht eine erhöhte Expression von p53 oder Puma, sondern eine verminderte Expression von p21. Die Überexpression von Caspase-2 führt hingegen in HCT116 Kolonkarzinom-Zellen zu einer erhöhten p21-Expression. Diese erhöhte p21-Expression ist allerdings nicht auf eine verstärkte p21-Transkription zurückzuführen. Auch der vermehrte Abbau von p21 durch proteasomale Degradation oder Spaltung durch Proteasen konnte experimentell von unserer Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden: Die Behandlung von Caspase-2 defizienten Zellen mit verschiedenen Inhibitoren, die gegen proteasomale oder nicht-proteasomale Proteasen gerichtet waren, konnten die p21-Proteinexpression nicht wieder herstellen. Caspase-2 scheint die p21-Expression auf translationaler Ebene zu regulieren, da der *knockdown* von Caspase-2 in HCT116 Kolonkarzinom-Zellen nur die exogene Expression von *FLAG-getaggten* p21-Konstrukten beeinflusst, die die 3'UTR von p21 enthalten.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Wie einleitend geschildert, wurde die translationale Regulation der p21-Expression durch Caspase-2 erst vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe beschrieben. Der zugrunde liegende Mechanismus ist aber bis heute noch ungeklärt und steht deshalb im Mittelpunkt dieses Forschungsprojektes. Im Einzelnen sollte erörtert werden, ob Caspase-2 die Expression von p21 direkt über die Bindung an die p21-mRNA oder indirekt über die Interaktion mit anderen Komponenten, wie RNA-bindenden-Proteinen (mRBPs) oder microRNAs (miRNAs) reguliert. Im letzteren Fall sollte die Interaktion von Caspase-2 mit diesen Komponenten (mRBPs bzw. miRNAs) näher analysiert und charakterisiert werden. Für die Analyse sollte zunächst eine p21-mRNA-IP etabliert und die präzipitierten Proteine massenspektrometrisch (MS) identifiziert und deren Rolle in der Caspase-2-abhängigen p21 Translation untersucht werden. Im Rahmen dieses Screenings sollten auch neue Caspase-2-unabhängige p21-Interaktionspartner (mRBPs bzw. miRNAs) identifiziert werden. Um darüber hinaus auch neue experimentelle Möglichkeiten zu schaffen und um die Auswirkungen einer dauerhaften Caspase-2 Defizienz auf die p21-Expression in humanen Zellen näher zu untersuchen, sollte parallel unter Anwendung des CRISPR/Cas9-System (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-*

associated) eine HCT116 Caspase-2 *knockout* Zelllinie (Caspase-2 KO-Zelllinie) generiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Mit einer Milli-Q Biocel-Filteranlage wurde das in der Arbeit verwendete Wasser aufbereitet.

2.1.2 Kommerzielle Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Bezugsfirma
2X RNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
Ac-DEVD-AMC	BD Pharmingen
Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories
DharmaFECT 1	Dharmacon
DharmaFECT 1	Dharmacon
DharmaFECT Duo	Dharmacon
DharmaFECT Duo	Dharmacon
Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)	PAA Laboratories
Fotales Kälberserum (FCS)	GE Healthcare
GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit	Sigma-Aldrich
GoTaq qPCR Master Mix	Promega
High Capacity cDNA Kit	Applied Biosystems
Maxiprep Kit	Sigma-Aldrich
McCoy's 5a Medium	Gibco
mMESSAGE mMACHINE t 7 Kit	Ambion
Nuclear Extract Kit	active Motif
ON-TARGETplus SMARTpool	Dharmacon
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Pierce™ Protein G Agarose	Thermo Fisher Scientific
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAshredder	Qiagen
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific
RiboTrap Kit	MBL Life Science
RNaseOUT	Thermo Fisher Scientific
RNeasy MinElute Cleanup Kit	Qiagen
SilverQuest™ Silver Staining Kit	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
TaqMan Gene Expression Assays	Applied Biosystems
Trypsin-EDTA	Gibco

2.1.3 Polymerasen

Bezeichnung	Bezugsfirma
Pfu-DNA-Polymerase	Promega
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs

2.1.4 Größenstandards

Bezeichnung	Bezugsfirma
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder,	Thermo Fisher Scientific
RiboRuler High Range RNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
SmartLadder DNA	Eurogentec

2.1.5 Plasmide und siRNAs

Die Zellen wurden mit siRNAs des ON TARGETplus SMART pools (Dharmacon, Horizon Discovery, Cambridge, UK) und Plasmiden unter Verwendung von DharmaFECT1 und DharmaFECT DUO nach Herstellerangaben transfiziert.

siRNAs

Bezeichnung	Bezugsfirma
ON-TARGETplus siCASP2	Dharmacon
ON-TARGETplus siCON	Dharmacon
ON-TARGETplus siDDX41	Dharmacon
ON-TARGETplus siPTBP1	Dharmacon
ON-TARGETplus siRBM47	Dharmacon
ON-TARGETplus siTrim2	Dharmacon

Plasmidvektoren

Bezeichnung	Bezugsquelle/Referenz
AAVS1 SA-2A-puro-pA	Addgene (Hockemeyer et al., 2009)
Casp2 SA-2A-puro-pA Donor Vektor	D. Peters (vgl. Abschnitt 2.2.9)
pcDNA4 5'UTR-Flag-p21	Dr. D. Sohn
pcDNA4 5'UTR-Flag-p21-3'UTR	Dr. D.Sohn
pcDNA4 5'UTR-Flag-p21-Fragment B-E	Dr. D.Sohn
pcDNA4-5'UTR-Flag-p21-Fragment A	Dr. D. Sohn
pcDNA4-5'UTR-Flag-p21-Fragment F	Dr. D. Sohn
pcDNA4-Flag-p21-3'UTR	Dr. D. Sohn
pSpCas9(BB)-2A-GFP-Vektor	Addgene (Ran et al., 2013)
pSpCas9(BB)-2A-GFP-Vektor+gDNA	D. Peters (vgl. Abschnitt 2.2.9)

2.1.6 Humane Zelllinien

Bezeichnung	Charakteristika	Medium	Bezugsquelle
HCT116/WT	Humane Kolonkarzinom-Zellen	McCoy's 5a (PromoCell, Heidelberg) mit 10% (v/v) FCS (Biowest; Miami, FL, USA), 100 Units/ml Penicillin + 100 g/ml Streptomycin (PAA Laboratories; Pasching, Österreich)	B. Vogelstein (Baltimore, MD, USA)
HCT116/p21 ^{-/-}	p21-defizientes Derivat der HCT116/WT	wie HCT116/WT	B. Vogelstein (Baltimore, MD, USA)
HCT116/p53 ^{-/-}	p53-defizientes Derivat der HCT116/WT	wie HCT116/WT	B. Vogelstein (Baltimore, MD, USA)
HCT116/Casp2 ^{-/-}	Caspase-2 defizientes Derivat der HCT116/WT	wie HCT116/WT	D. Peters (Abschnitt 3.1.1)

2.1.7 Bakterienstamm

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
E. coli OneShot® TOP10	Amplifikation von Plasmid-DNA	Invitrogen

2.1.8 Primäre Antikörper

Antigen	Klon	Spezies, Isotyp	Bezugsquelle
Argonaute 1	D84G10	Kaninchen IgG	Cell Signaling
Argonaute 2	C34C6	Kaninchen IgG	Cell Signaling
Bromodeoxyuridine	2B1	Maus IgG ₁	MBL
Caprin1		Kaninchen IgG	Bethyl Lab(Biomol)
Caspase-2	11B4	Ratte IgG _{2a}	Alexis
DDX41		Kaninchen IgG	Sigma-Aldrich
FMRP (FMR1)	D14F4	Kaninchen IgG	Cell Signaling
hnRNP-D (AUF1)		Kaninchen IgG	Sigma-Aldrich
hnRNP-K	R332	Kaninchen IgG	Cell Signaling
HuR (ElavL1)	3A2	Maus IgG ₁	Santa Cruz
Matrin 3		Kaninchen IgG	Bethyl Lab(Biomol)
Musashi-2	EP1305Y	Kaninchen IgG	Abcam
Nucleolin		Kaninchen IgG	Abcam
p21	SX118	Maus IgG ₁	BD Pharmingen,
p53 (Ab-1)	PAb421	Maus IgG _{2a}	Calbiochem, Merck
PTBP1		Kaninchen IgG	Cell Signaling
PTBP2	2B11	Maus IgG _{2a}	Novus Biologicals
Pumilio-1		Kaninchen IgG	Cell Signaling
Pumilio-2		Kaninchen IgG	Cell Signaling
RBM47	EPR9659	Kaninchen IgG	Abcam
RC3H1 (Roquin-1)		Kaninchen IgG	Novus Biologicals
RC3H2		Kaninchen IgG	Sigma-Aldrich
Trim25		Kaninchen IgG	Cell Signaling
Tubulin (alpha-Tubulin)	DM1A	Maus IgG ₁	Sigma-Aldrich
β-Aktin AC-74	AC-74	Maus IgG _{2a}	Sigma-Aldrich

2.1.9 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Bezugsquelle
goat anti-mouse IgG (H+L) IRDyeR 680 LT	LI-COR Biosciences
goat anti-mouse IgG (H+L) IRDyeR 800 CW	LI-COR Biosciences
goat anti-rabbit IgG (H+L) IRDyeR 680 LT	LI-COR Biosciences
goat anti-rabbit IgG (H+L) IRDyeR 800 CW	LI-COR Biosciences
goat anti-rat IgG (H+L) IRDyeR 800 CW	LI-COR Biosciences

2.1.10 Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide (*primer*) wurden von der Firma Invitrogen bezogen. 25 nmol lyophilisierte Oligonukleotide wurden in ddH₂O auf eine Konzentration von 100 µM resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Bezeichnung	Basensequenz (5'→3')
fw guide-oligo	CACCGCCGAGCCTGACTCCGCGCAA
rv guide-oligoneu	AAACTTGCGCGGAGTCAGGCTCGGC
fw HA-L-Spel	ATTAACCCTCACTAAAGGGACTAGTCGTGAAGT-TATCGCCATAGGCC
rv HA-L	CGTCCCACCCTTGGCAGGAA
Template	CAAGGGTGGGACGCCCGCCCGAGCCGCTCCGAGCCT-GACTCCGCGAAGCTTCTGACCTCTTCTCTT-CCTCCCACAGGGCCTCGAGAAGATCTGGCAGCGG
fw-template	TTCTGCCAAGGGTGGGACGCCCGC
rv template	GCCCTCTCCGCTGCCAGATCTTCTCGAG
fw HA-R-Sall-slic	GATGCGGTGGGCTCTATGGGTCGACCA-AGGGCCCGCGGGCGGA
rv-HA-R -EcoRI-slic	GAATTTAGCGGCCGCGAATTCCTCTGCACAC-CCGCTCCTTC
fw RT_Casp2	AGCTGTTGTTGAGCGAATTGT
rv RT_Casp2	AGCAAGTTGAGGAGTTCCACA
fw_KO-Kontrolle	GCAAAACTCCAGCCACGCC
rv_KO-Kontrolle	CTGAAGCATCACCCCTCTGCAC

2.1.11 Genexpressionsassays

Für die qPCR-Analysen wurde das TaqMan *gene expression assay* mit dazugehörigen hier aufgeführten sequenzspezifischen Sonden der Firma Applied Biosystems verwendet.

Bezeichnung	Zielgen
Hs00892482_m1	Caspase-2
Hs00169602_m1	DDX41
Hs00259176_m1	PTBP1
Hs01001785_m1	RBM47

2.1.12 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
Agarosegel-Ektrophoresekammer	Modell 40-1214	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Bestrahlungsgerät (-IR)	Gulmay Medical RS225	IsodoseControl, Bochum
Blotapparatur	MiniProtean III	Bio-Rad Laboratories
Blot-Entwicklungsgerät	Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR® Biosciences
CCD-Kamera-System/Software	LAS 3000 / AIDA ImageQuant LAS 4000 / Multi Gauge	Fujifilm Europe, Düsseldorf, GE Healthcare, München
Heizblock	Rotilabo-Block-Heater H250	Roth
Inkubationsschüttelschrank	Certomat BS-1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
NanoDrop Spektralphotometer	NanoDrop 1000	PeqLab Biotechnologie
PCR-Gerät	TProfessional Standard Thermocycler, Blocktype: Gradient 96, 070-851	Biometra GmbH
Plate reader	Tecan Infinite M200	Thermo Fisher Scientific
Real-Time PCR-Gerät	7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
SDS-PAGE Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell-System	Bio-Rad Laboratories
Spectrophotometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech / GE Healthcare, München
Sterilarbeitsbank	HeraSafe	Heraeus / Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Waage	CPA423S / CP124S	Sartorius Stedim Biotech
Zentrifugen	Multifuge 3SR+ und-Tischzentrifuge Fresco 17 Tischzentrifuge 5417R RC5B Plus (Super-speed)	Heraeus / Thermo Fisher Scientific Eppendorf Sorvall / Thermo Fisher Scientific, Langenselbold

2.2 Methoden

2.2.1 Transiente Transfektion von Plasmiden und von *small-interfering RNAs* (siRNAs)

Unter transienter Transfektion versteht man das temporäre Einbringen von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Die Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit dem Transfektionsreagenz DharmaFECT Duo der Firma Dharmacon durchgeführt. Einen Tag nach der Aussaat der Zellen, wurden diese den Herstellerangaben entsprechend transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen je nach Dichte im Verhältnis 1:3 oder 1:4 aufgeteilt und dem Experiment entsprechend behandelt. Die Ernte der Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion.

Für die Transfektion der Zellen mit siRNAs wurde der ON-TARGETplus SMARTpool verwendet. Der ON-TARGETplus SMARTpool besteht aus vier verschiedenen siRNAs, die gegen die gleiche kodierende mRNA gerichtet sind. Als Transfektionsreagenz wurde DharmaFECT 1 der Firma Dharmacon verwendet. Die 24 h zuvor ausgesäten Zellen wurden nach Herstellerangaben mit siRNA transfiziert und 24 h später im Verhältnis 1:3 oder 1:4 aufgeteilt. Die Ernte und Analyse erfolgte weitere 48 h später (Tag 3 nach Transfektion).

2.2.2 Herstellung von Zellextrakten

Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale abgekratzt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, anschließend durch Zentrifugation pelletiert (500 x g, 5 min, 4°C) und mit kaltem (4°C) PBS gewaschen. Vor der eigentlichen Lyse wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die Effizienz des Aufschlusses zu verbessern. Danach erfolgte der eigentliche Aufschluss der Zellen mit NP-40 Lysepuffer (30 min auf Eis). Zur Entfernung der Zellrückstände wurden die Zellen anschließend zentrifugiert (20.800 x g, 30 min, 4°C) und der proteinhaltige Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mittels Bradford-Methode wurde mit dem Bio-Rad Protein-Assay (Bio-Rad Laboratories) die Proteinkonzentration ermittelt.

PBS:

0,2 g/l	KCl
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
8,0 g/l	NaCl
1,15 g/l	Na ₂ HPO ₄ wasserfrei

NP-40-Lysepuffer:

50 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
150 mM	NaCl
1 % (v/v)	NP-40
1 mM	Natrium-Pyrophosphat
1 mM	Natriumorthovanadat
10 µg/ml	Pepstatin
10 µg/ml	Aprotinin
10 µg/ml	Leupeptin
1 mM	DTT

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Silberfärbung, Western Blot

Mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) werden Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in einem diskontinuierlichen Gel auf Polyacrylamidbasis, bestehend aus einem Sammel- und Trenngel, aufgetrennt. Dafür wird zuvor ihre Eigenladung durch Zugabe des anionischen Detergenz SDS überdeckt. Die zu analysierenden Proteinproben werden deshalb zunächst mit den entsprechenden Mengen des SDS haltigen 5 x Probenpuffers versetzt, anschließend durch Erhitzen (5 min, 95°C) denaturiert und dann auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Für die gelelektrophoretische Auftrennung wurde das Mini-PROTEAN Tetra Cell-System (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Während der Elektrophorese wurde eine konstante Stromstärke von 30 mA pro Gel angelegt. Die Kammer wurde zuvor mit entsprechenden Mengen an Elektrophoresepuffer gefüllt. Zur Kontrolle des Molekulargewichts wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) eingesetzt.

Für die Visualisierung der aufgetrennten Proteine mittels Silberfärbung wurde das SilverQuest™ Silver Staining Kit der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand der Herstellerangaben. Die Dokumentation und Auswertung wurde unter Durchlicht am ImageQuant LAS 4000 mit der Multi Gauge Software durchgeführt.

Für die Analyse der durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mittels Western Blot wurde zunächst eine PVDF-Membran durch einmütiges Schütteln in Methanol aktiviert und danach durch Überführen in H₂O äquilibriert. Die Membran und das Polyacrylamid-Gel wurden im Anschluss mit je einem in Transferpuffer getränkten 3 mm Filterpapier (Whatman-Papier) über- und unterschichtet und in einer Transfereinheit eingeklemmt. Diese wurde danach in eine mit Transferpuffer gefüllte Blot-Kammer (Mini Trans-Blot Cell) überführt. Der Transfer erfolgte für 120 Minuten bei 150 mA. Nach dem Transfer wurde die Membran eine Stunde unter Schwenken in einer Blockierlösung (3% Milchpulver/PBS) inkubiert. Nach einem zweiminütigen Waschschrift in PBS-T (0,2% (v/v) Tween-20 in PBS), wurde die Membran mit einem Skalpell je nach zu untersuchenden Proteinen zurechtgeschnitten. Im Anschluss erfolgte die Inkubation im verdünnten Primärantikörper (PBS-T+ 5% BSA + 1% Natriumazid). Am nächsten Morgen wurde die Membran zunächst dreimal für 15 min mit PBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (LI-COR Biosciences) im Dunkeln bei Raumtemperatur für eine Stunde (Verdünnung in PBS-T: für IRDyeR 680 LT 1:30.000 und IRDyeR 800 CW 1:15.000). Nach drei weiteren Waschschriften für 5 Minuten in PBS-T und einem letzten 5 minütigen Waschschrift in PBS, wurde die Membran zunächst zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet. Die Analyse erfolgte am Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

5 x Probenpuffer:

250 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
10 % (w/v)	SDS
0,5 % (w/v)	Bromphenolblau
50 % (w/v)	Glycerin
500 mM	β-Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer:

25 mM	Tris/HCL(pH 8,3)
192 mM	Glycin
1% (w/v)	SDS

Transferpuffer:

25 mM	Tris/HCL (pH 8,3)
192 mM	Glycin

2.2.4 Fluorometrischer Caspase-3-Substrattest

Mit dem fluorometrischen Substrattest kann man die relativen DEVDase-Aktivität messen. Dafür wurden die zuvor hergestellten Zellysate (vgl. Abschnitt 2.2.2) verwendet. Pro Probe wurden 50 µg des Zellextrakts in einem Volumen von insgesamt 50 µl in einer schwarzen 96-Well-Platte vorgelegt. Im Anschluss wurden 150 µl Substratpuffer, der das fluorogene DEVDase-Substrat Ac-DEVD-AMC (BD Pharmingen) enthält hinzugegeben. Danach erfolgte die Messung der Fluoreszenzemission bei 442 nm über einen Zeitraum von 5 h in Abständen von 10 min mit einem Fluorometer (Tecan Infinite M200) bei einer Anregungswellenlänge von 346 nm mittels der Tecan i-control Software Version 1.5.14.0. Die Fluoreszenzemission wird durch die Freisetzung des Fluorochrom Aminomethylcoumarin, das durch aktive Caspase-3 vom Substrat Ac-DEVD-AMC abgespalten wird, erzeugt.

Substratpuffer

50 mM	HEPES, pH 7,3
100 mM	NaCl
10% (w/v)	Sucrose
0,1% (w/v)	CHAPS
10 mM	DTT
50 µM	Ac-DEVD-AMC

2.2.5 RNA-Isolierung, c-DNA-Synthese und *real-time quantitative PCR* (qPCR)

Die RNA wurde aus pelletierten Zellen (vgl. Abschnitt 2.2.2) extrahiert. Für die Aufreinigung wurde das RNeasy Kit und der QIAshredder der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Die aufgereinigte RNA wurde mit Hilfe des High Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Für die qPCR-Analysen wurde das Taqman Gene Expression Assay System mit dazugehörigen sequenzspezifischen Sonden der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Durchführung erfolgte dabei nach Herstellerangaben. Die Messung erfolgte mit dem 7300 Real-Time PCR System von Applied Biosystems.

Als Kontrolle für die Caspase-2 KO-Klone wurden auch qPCRs mit einem sequenzspezifischen Primerpaar durchgeführt. Die qPCRs mit sequenzspezifi-

schen Primern ermöglicht die Quantifizierung der PCR-Amplifikation während der PCR-Reaktion. Dies wird durch Messung der Fluoreszenzintensitäten in der exponentiellen Phase der PCR ermöglicht. Die Fluoreszenz nimmt mit der Menge von PCR-Produkten proportional zu. Für die PCR wurde der GoTaq qPCR Master Mix der Firma Promega verwendet. Dieser enthält neben der GoTaq Hot Start Polymerase, $MgCl_2$, dNTPs und entsprechenden Reaktionspuffer auch einen Farbstoff der mit der neu synthetisierten doppelsträngigen DNA interkaliert. Der Nachteil dieser Markierungsmethode ist die geringe Spezifität. Zwischen den einzelnen PCR-Produkten kann mit dieser Methode nicht unterschieden werden. Deshalb wurde nach Abschluss der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt mit deren Hilfe man die Fragment-Längen und damit die Spezifität der PCR-Reaktion überprüfen konnte. Um die Spezifität der PCR-Reaktion zu erhöhen wurden die Primer so designt, dass diese exon-überspannend und die entstehenden Amplicons einer Länge zwischen 80 und 150 bp entsprachen. Die Durchführung der qPCR erfolgte anhand der Angaben von Promega.

2.2.6 *in vitro* Herstellung von mRNA und Durchführung einer mRNA-IP

Mit Hilfe der mRNA-IP ist es möglich, die spezifisch mit einer bestimmten mRNA assoziierten mRBPs und miRNAs zu untersuchen. Im ersten Schritt musste dafür zunächst *in vitro* mRNA hergestellt werden. Dafür wurde zunächst ein Vektor, der als Template für die folgende mRNA-Synthese eingesetzt wurde, linearisiert. In zwei parallelen Ansätzen wurden 5 μ g des Vektors (pCDNA4 Flag-p21) mit jeweils 3 μ l des Enzyms FastDigest-MssI für 3 h bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt. Die Restriktion wurde durch die Zugabe von 0.5 M EDTA (1/20 des Gesamtvolumens) und 3 M Na-Acetat (1/10 des Gesamtvolumens) gestoppt. Im Anschluss erfolgte eine ETOH-Fällung durch Zugabe von ETOH (2 x des Volumens). Die Proben wurden bei -20 °C für 15 min inkubiert und danach für 15 min bei 20.800 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen und das zurückgebliebene DNA-Pellet an der Luft bei RT getrocknet, bevor es in 20 μ l nuklease-freies H_2O aufgenommen wurde. Die anschließende *in vitro* Synthese der mRNA wurde mit dem mMESSAGE mMACHINE t 7 Kit der Firma Ambion nach Herstellerangabe

ben durchgeführt. Es wurden 0,5 µg des zuvor linearisierten Plasmids und 2 µl 50 mM 5-Bromo-UTP (mitgeliefert mit dem Ribo Trap Kit) eingesetzt. Die anschließende Lithium Chlorid-Aufreinigung der RNA wurde nach Herstellerangaben mit den im mMESSAGE mMACHINE t 7 Kit enthaltenen Reagenzien durchgeführt.

Die Qualität der synthetisierten mRNA wurde mittels eines 1% Agarosegels überprüft. Durch Erhitzen wurden dafür 0,5 g Agarose in 31 ml DEPC-(Diethylpyrocarbonat) H₂O gelöst. Anschließend wurden 5 ml des 10x MOPS-Puffers, 9 ml 37% Formaldehyd und 3 µl Ethidiumbromid zum Ansatz gegeben. Nach Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 50 ml durch Zugabe von entsprechenden Mengen an DEPC-H₂O erfolgte die Auspolymerisierung des Gels für 1 h bei RT in einer Gelkammer (PerfectBlue Gelsystem Mini L). Der RNA-Größenstandard (RiboRuler High Range RNA Ladder) und die zuvor synthetisierten RNA-Proben wurden nach Anleitung des Herstellers mit entsprechenden Mengen an Ladepuffer (Thermo Scientific 2x RNA *loading dye*) versetzt. Pro Probe wurden zwischen 0,5 bis 1 µg RNA auf das Gel aufgetragen. Zur Gel-Dokumentation wurde der ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) mit der Multi Gauge Software Version 3.2 (Fujifilm) verwendet.

MOPS Puffer (10X, pH 7,0)

200 mM	MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure)
20 mM	NaOAc
10 mM	EDTA

Die mRNA-IP wurde mit dem RiboTrap Kit der Firma MBL durchgeführt (Abbildung 8 und vgl. Herstellerangaben). Für die mRNA-IP mussten zunächst entsprechende Mengen an Zelllysaten vorbereitet werden. Dafür wurden ca. 10-12 x 10⁶ HCT116 WT-Zellen pro Ansatz benötigt. 4 x 10⁶ Zellen wurden auf einer 145 mm x 20 mm Cellstar Zellkulturschale (Greiner) ausgesät. 24 h später erfolgte die Transfektion der Zellen (vgl. 2.2.1). 48 h nach Aussaat wurden die Zellen trypsiniert und im Verhältnis 1:4 gesplittet. 96 h nach Aussaat der Zellen erfolgte die Ernte und die zytoplasmatische Extraktion der Zellen mit dem Nuclear Extract Kit der Firma Active Motif. Diese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Um bei der Extraktion eine RNA Degradation zu verhindern, wurde dem im Nuclear Extract Kit enthaltenen hypotonischen Puffer zusätzlich

RNAseOut (Endkonzentration 200 U/ ml) hinzugeführt. Des Weiteren wurde die Extraktion, sowie die folgende mRNA-IP, bei 4 °C durchgeführt. Um eine unspezifische Bindung der Proteine bzw. miRNAs mit den für die IP verwendeten G-Agarose *beads* zu minimieren, wurden die zytoplasmatischen Extrakte zunächst in einem sogenannten *preclear*-Schritt gemeinsam mit den verwendeten G-Agarose *beads* 1 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Extrakte von den *beads* getrennt und die OD jedes Ansatz wurde mittels Bradford-Methode bestimmt, (vgl. Abschnitt 2.2.2), damit für die folgende mRNA-IP gleiche Mengen an Protein eingesetzt werden konnten.

Parallel zum *preclear*-Schritt wurden entsprechende Mengen an G-Agarose *beads* zunächst mit anti-BrdU Antikörpern beladen. Im Anschluss entstand durch Inkubation mit jeweils 50 pmol der 5-bromo-UTP (BrU)-markierten RNA auf dem Drehrad (1 h bei 4°C) der Komplex aus G-Agarose *beads*, anti-BrdU Antikörpern und BrU-markierter RNA. Die mRNA-IP erfolgte durch Inkubation der zytoplasmatischen Extrakte mit diesem Komplex (auf dem Drehrad für 3 h bei 4°C). Im Anschluss folgten mehrere Waschschrte mit dem im RiboTrap Kit enthaltenen Waschpuffern. Die Elution der an die mRNA gebundenen miRNAs und mRBPs wurde durch Zugabe eines BrdU/DMSO haltigen Puffers erreicht. (detaillierte Versuchsdurchführung siehe Herstellerangaben des Ribo Trap Kit).

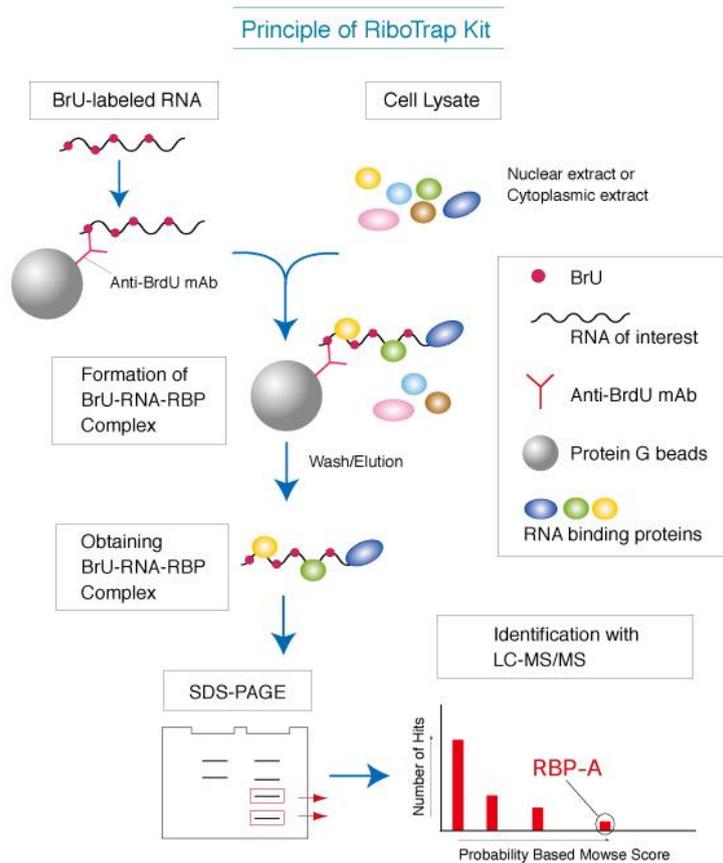


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer mRNA-IP.

Die für das jeweilige Experiment zu untersuchende mRNA wird *in vitro* transkribiert und mit BrU markiert. Anschließend wird diese an mit anti-BrdU-Antikörper beladene *beads* gekoppelt. Dieser Komplex wird mit zuvor präparierten zytoplasmatischen Extrakten inkubiert. Im Anschluss werden unspezifisch gebundene mRBPs bzw. miRNAs zunächst durch Waschrunde entfernt, bevor spezifisch gebundene mRBPs und miRNAs eluiert werden. Eine Protein-Analyse kann anschließend durch Silberfärbung, Western Blot oder MS erfolgen (Abbildung verändert entnommen aus Anleitung des Ribo Trap Kit).

2.2.7 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock und Plasmid-Präparation

Die entsprechenden chemisch kompetenten Bakterien (*E. coli* OneShot® TOP10 Invitrogen) wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 0,2 bis 0,5 µg des Plasmides oder 0,5 µl eines Ligationsansatzes (bei Klonierungen) zu den aufgetauten Bakterien gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein kurzer Hitzeschock der Bakterien (ca. 45 sec bei 42 °C). Danach wurden die Bakterien für weitere 2 min auf Eis inkubiert, bevor zu dem Ansatz das vorgewärmte SOC-Medium hinzugegeben wurde. Nach einer

Inkubation (1 min) unter Schütteln bei 37 ° C wurden die Bakterien zur Selektion auf Antibiotika-haltigen Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ausgewählte Einzelkolonien wurden zur Vermehrung über Nacht bei 37°C unter Schütteln in Antibiotika-haltigem LB-Medium kultiviert. Für die Plasmid-Präparation wurden die Bakterien am folgenden Tag zunächst pelletiert (5 min, 20.800 x g, bei 4°C). Mit den Puffern P1 bis P3 (Qiagen) wurde anschließend eine alkalische Lyse durchgeführt. Im letzten Schritt wurden durch Zentrifugation (15 min, 20.800 x g, bei 4°C) die Zellrückstände entfernt. Mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Zentrifugation für 10 min bei 20.800 x g, 4°C) wurden im nächsten Schritt unerwünschte Proteine entfernt. Danach wurde die DNA mit 100 % Ethanol gefällt (30 min, -20°C). Die DNA wurde danach mit 80% Ethanol gewaschen und in H₂O aufgenommen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit einem Restriktionsverdau überprüft. Die DNA-Konzentration der Plasmid-DNA wurde mittels NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Für die Herstellung größerer Plasmid Mengen wurde eine Maxi-Präparation mit dem GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit der Firma Sigma-Aldrich den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

P1 (Qiagen):

50 mM	Tris/HCL (pH 8,0)
10 mM	EDTA
100 µg/ml	RNase A

P2 (Qiagen):

200 mM	NaOH
1% (w/v)	SDS

P3 (Qiagen):

3,0 M	Kalium-Acetat (pH 5,5)
-------	------------------------

**LB-Medium:
pH 7,0**

1 % (w/v)	Trypton
0,5 (w/v)	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl

**SOC-Medium:
pH 7,0**

20 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
0,5 g/l	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
20 mM	Glucose

2.2.8 SLIC (*Sequence & Ligation Independent Cloning*)

SLIC ermöglicht die sequenzunabhängige Klonierung von DNA-Fragmenten. Dafür werden einzelsträngige DNA-Überhänge des entsprechenden Vektors und des einzufügenden DNA-Fragments (Insert) mit Hilfe der Exonuklease-Aktivität der T4-Polymerase erzeugt (Li und Elledge, 2007).

Zunächst wurde der entsprechende Zielvektor mit Restriktionsenzymen linearisiert. Gleichzeitig wurde ein Insert mittels PCR erzeugt. Dabei war zu beachten, dass durch die PCR ein Überhang entsteht, der homolog zum Vektor ist. Je nach Größe des Inserts musste die Größe des Überhangs angepasst werden (kleinere Fragmente sollten einen ca. 20 bp Überhang enthalten; große Fragmente bis zu 40 bp). Wurde als Template für die PCR-Reaktion bakterielle DNA verwendet, musste der Ansatz anschließend mit DpnI bei 37°C für eine Stunde inkubiert werden, um die bakterielle DNA zu entfernen. Das Insert, sowie der Vektor wurden im Anschluss mittels PCR QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt. Je 1 µg Insert und Vektor wurden danach mit 0,5 U T4-Polymerase (NEB) in einem 30 µl Ansatz bei 22°C inkubiert. Je nach Länge des Überhangs war die Inkubationszeit zu wählen (30 min bei 20 bp; 60 min für 40 bp). Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 1/10 Volumens 10mM dCTP gestoppt. Der Ansatz wurde nun auf Eis gehalten. 150 ng des Vektors wurden mit der entsprechenden Menge des Inserts in einem molekularen Verhältnis von 1:1 oder 2:1 (Vektor zu Insert) für 30 min bei 37°C *annealed*. Der Ansatz wurde anschließend nach dem unter Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Protokoll transformiert.

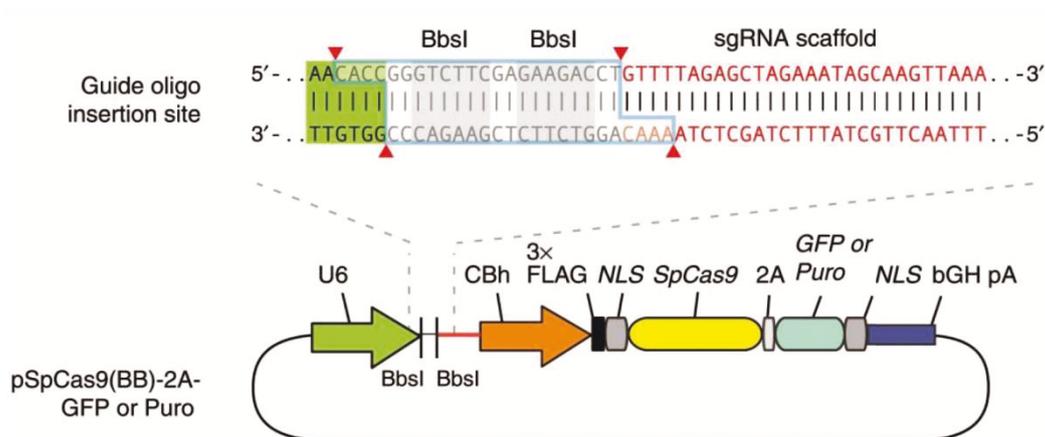
2.2.9 Generierung einer Caspase-2 KO Zelllinie mit dem CRISPR-Cas9-System

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) sind sich wiederholende DNA Abschnitte die im Erbgut vieler Bakterien und Archaeen vorkommen. Gemeinsam mit den Cas (*CRISPR-associated*)-Endonucleasen bilden sie einen adaptiven antiviralen Abwehrmechanismus von Bakterien (Horvath und Barrangou, 2010). Bei dem CRISPR-Cas9 System nutzt man diesen Mechanismus, um gezielt Doppelstrangbrüche an einer bestimmten Stelle in der DNA zu erzeugen. Dabei wird die Schnittstelle in der DNA über die sogenannte *guide* RNA (gRNA) bestimmt. Diese ist ein Fusionsprodukt aus crRNA und tracrRNA (*trans-activating crRNA*). Die crRNA beinhaltet eine 20 bp lange Nukleotidsequenz die komplementär zur Zielsequenz in der DNA ist (Zhang et al., 2016). Dieser schließt sich ein Abschnitt an der mit der tracrRNA hybridisieren kann. Die tracrRNA besteht immer aus derselben Sequenz und bildet eine durch mehrere Haarnadelstrukturen gekennzeichnete Sekundärstruktur aus, die an die Cas-Endonuklease bindet. Für die Binding von Cas9 an die gRNA ist außerdem ein sogenanntes *protospacer adjacent motif* (PAM)-mit der Sequenz 5'-NGG notwendig, dass sich unmittelbar an die Zielsequenz anschließen muss. Die Cas9 schneidet 3 bp stromaufwärts dieser Sequenz. Die anschließende DNA-Reparatur des Doppelstrangbruchs erfolgt durch *non-homologous end joining* (NHEJ) oder aber durch *homology-directed repair* (HDR), wenn gleichzeitig zu den Zellen ein Donorkonstrukt transfiziert wird (vgl. Abschnitt 3.1.1 und Ran et al., 2013). Für die Erzeugung der DNA-Doppelstrangbrüche wurde der pSpCas9(BB)-2A-GFP-Vektor verwendet. Dieser wurde von der Firma Addgene bezogen (Abbildung 9 A) und ermöglicht die Koexpression einer Cas9-Endonuklease, einer gRNA und eines grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein; GFP*) unter der Kontrolle eines U6-Promotors. Die Cas9 und das GFP sind über ein *2A self-cleaving peptide* (2A) miteinander verbunden (Liu et al., 2017). Diese virale 2A-Peptid-Sequenz ermöglicht dabei die polycistronische Expression der beiden Proteine durch cotranslationale Teilung. Der pSpCas9(BB)-2A-GFP-Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym BbsI verdaut, wodurch die in der Abbildung 9 A dargestellten einzelsträngigen DNA-Überhänge erzeugt werden. Im Anschluss erfolgte nach einem kurzen *annealing*-Schritt die Ligation der zwei teilweise komplementären Primer fw guide-oligo

und rv guide-oligoneu in den pSpCas9(BB)-2A-GFP-Vektor, um die gewünschte gRNA in den Vektor zu integrieren. Die Schritte wurden nach dem von Ran et al., 2013 dargestellten Protokoll durchgeführt. Für die Klonierung des Donorvektors wurde der AAVS1 SA-2A-puro-pA Donorvektor als Ausgangsvektor verwendet (Abbildung 9 B). Der Vektor wurde ebenfalls von der Firma Addgene bezogen und wurde ursprünglich als Donorvektor für den gezielten Gen-*knockout* mittels Zinkfinger-Nukleasen (ZFN) entworfen (Hockemeyer et al., 2009). Mit diesem Vektor ist es möglich über einen beliebigen endogenen Promotor eine Puromycin-Resistenz (PuroR) zu exprimieren. Für diesen Zweck besitzt der Vektor eine *splice acceptor site* (SA), ein *2A self-cleaving peptide* (2A) und eine Poly (A)-Sequenz (pA). Für die erfolgreiche Expression der PuroR musste die Sequenz *in frame* in das erste Intron des Zielgens integriert werden (vgl. Abschnitt 3.1.1). Für die hier durchgeführte Klonierung in das erste Intron des Casp2-Gens musste aus diesem Grund eine zusätzliche Base hinter die SA-Sequenz kloniert werden. Deshalb wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen SpeI und BglII verdaut (Schnittstellen vgl. Abbildung 9 B). Dabei wurde nicht nur die EcoRI Schnittstelle bei bp 283, sondern auch die gesamte SA entfernt. Mittels SLIC (vgl. Abschnitt 2.2.8) wurde ein Fragment in den Vektor integriert, das einen ca. 850 bp langen Homologiebereich (*homology arm*, HA) stromaufwärts der Cas9-Schnittstelle im Casp2-Intron (bezeichnet als Casp2-HA-L) und die *SA-site* inklusive eines zusätzlichen Adenosins enthält. Für die Klonierung wurden zunächst zwei einzelne Fragmente mittels PCR amplifiziert. Mit den Primern fw HA-L-SpeI und rv HA-L wurde ein ca. 850 bp langes Fragment aus genomischer DNA von HCT116 WT-Zellen amplifiziert, das 5' eine 20 bp homologe Sequenz zum Vektor besitzt. Für das zweite Fragment wurden drei verschiedene Primer (Template, fw-template, rv-template) synthetisiert. Der 81 bp lange Template-Primer diente dabei als DNA-Template für die sich anschließende PCR-Reaktion. Dieses zweite Fragment ist 5' 20 bp zum ersten Fragment und 3' 20 bp zum Donorvektor überlappend. Des Weiteren enthält es die *SA-site* mit dem zusätzlich eingefügten Adenosin. Nach erfolgreicher Klonierung des Casp2-HA-L mittels SLIC wurde auch der Casp2-HA-R mit demselben Verfahren in den Vektor kloniert. Dafür wurde der Vektor mit den Enzymen EcoRI und Sall geschnitten und anschließend aufgereinigt. Im Anschluss wurde mit den Primern fw-HA-R-Sall-slic und rv-HA-R -EcoRI-slic ein

850 bp langer genomischer Bereich stromabwärts der Cas9-Schnittstelle des Casp2 (HA-R)-Introns amplifiziert. Die beiden Primer besitzen jeweils einen 20 bp langen Überhang, der zum Donorvektor homolog ist. Dieser Überhang ermöglichte die spätere Klonierung des Fragments in den Donorvektor mittels SLIC.

A



B

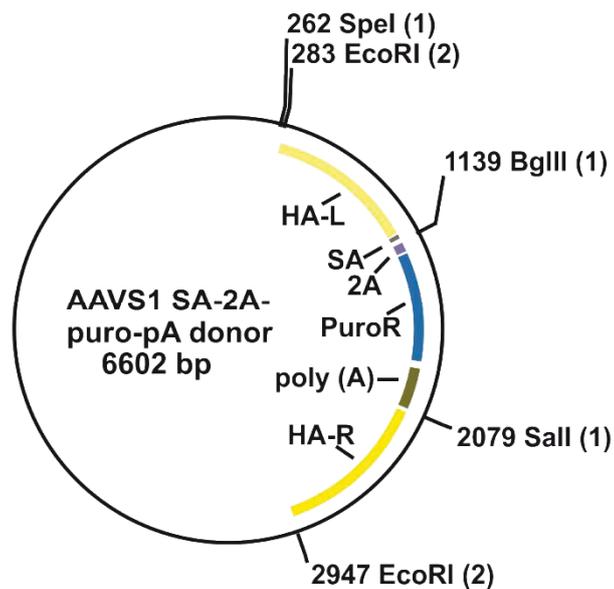


Abbildung 9: Verwendete Ausgangsvektoren für den *knockout* von Caspase-2.

A) pSpCas9(BB)-2A-GFP-Vektor mit den relevanten Komponenten insbesondere der SpCas9 und dem Schnittstellenbereich von BbsI (Abbildung verändert entnommen aus Ran et al., 2013)

B) AAVS1 SA-2A-puro-pA Donorvektor mit HA-L, HA-R, PuroR, SA-site, 2A-site, pA-Sequenz und den verwendeten Restriktionsschnittstellen.

Für den *knockout* wurden 2×10^6 HCT116 WT-Zellen auf eine 145 mm x 20 mm Cellstar Zellkulturschale (Greiner) ausplattiert. Parallel wurden 3 µg des Donorvektors mittels Verdau mit den Restriktionsenzymen SpeI und EcoRI linearisiert. Die Aufreinigung erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung und anschließender Gel-Extraktion mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Am nächsten Morgen erfolgte die Transfektion der Zellen mit 500 ng des linearisierten Donorvektors und 500 ng des pSpCas9(BB)-2A-GFP nach üblichem Protokoll (vgl. Abschnitt 2.2.1). 8 h später wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 gesplittet und unter Zugabe von Pyromycin-haltigen Medium (1 µg/ml) zur weiteren Selektion kultiviert. Gewachsene Zellklone wurden in den folgenden Tagen einzeln in 24 Well Zellkultur Multiwell Platten (Greiner) überführt und kultiviert. Ein Teil der jeweiligen Klone wurde bei -80°C in Kryo-Röhrchen (Nunc, Thermo Fisher Scientific) weggefroren. Die Analyse der Klone erfolgte mittels Western Blot, qPCR und genomischer PCR. Für die qPCR wurden die Primer fw_RT_Casp2 und rv_RT_Casp2 und für die genomische PCR die Primer fw_KO-Kontrolle und rv_KO-Kontrolle verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von Komponenten, die an der Caspase-2-abhängigen Expression von p21 beteiligt sind

3.1.1 Generierung einer Caspase-2 KO-Zelllinie

Die Abhängigkeit der p21-Expression von Caspase-2 wurde erstmalig durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben. Hierbei stellte sich heraus, dass diese Regulation auf translationaler Ebene erfolgt und von der Anwesenheit der p21-3'UTR abhängig ist (Sohn et al., 2011). Um den dahinter stehenden Mechanismus aufzuklären, wurden mehrere Strategien verfolgt. Unter anderem sollte eine Caspase-2 KO-Zelllinie generiert werden, um damit neue experimentelle Möglichkeiten für weitere Analysen zu schaffen. So sollte anhand einer Caspase-2 KO-Zelllinie überprüft werden, wie sich die dauerhafte Abwesenheit von Caspase-2 auf die p21-Expression und damit auf stressinduzierte Signalwege auswirkt. Auch sollten hiermit Limitierungen aufgehoben werden, die mit der Verwendung von siRNAs einhergehen. So wurde in den bisher durchgeführten Experimenten die Caspase-2 Expression durch Transfektion spezifischer siRNAs für einen gewissen Zeitraum herunterreguliert. Hierbei zeigte es sich, dass dies am Tag 3 nach Transfektion am effektivsten war. Dies erschwerte unter anderem die Koexpression von Plasmiden, die schon zwei Tage nach Transfektion am stärksten exprimiert werden.

Für die Generierung von Caspase-2 KO-Zelllinien wurde das CRISPR-Cas9-System angewandt (vgl. Abschnitt 2.2.9). Die dabei verfolgte *knockout*-Strategie wird in Abbildung 10 verdeutlicht. Bei erfolgreicher Integration des Donorvektors ermöglicht die eingefügte *SA-site* und das sich hinter der Sequenz für die Puromycin-Resistenz (PuroR) befindende pA, die endogene Transkription einer mRNA, die für ein Fusionsprotein, bestehend aus dem 1. Exon von Casp2 und der PuroR besteht, kodiert. Beide, Casp2 und PuroR, sind durch eine 2A-Sequenz voneinander getrennt. An diesem 21 AS langen Bereich kommt es nach erfolgter Translation zur Spaltung des Fusionsproteins, bei dem ein funktionsloses, 25 AS kleines Protein translatiert aus dem 1. Exon von Casp2 und eine funktionsfähige PuroR hervorgeht.

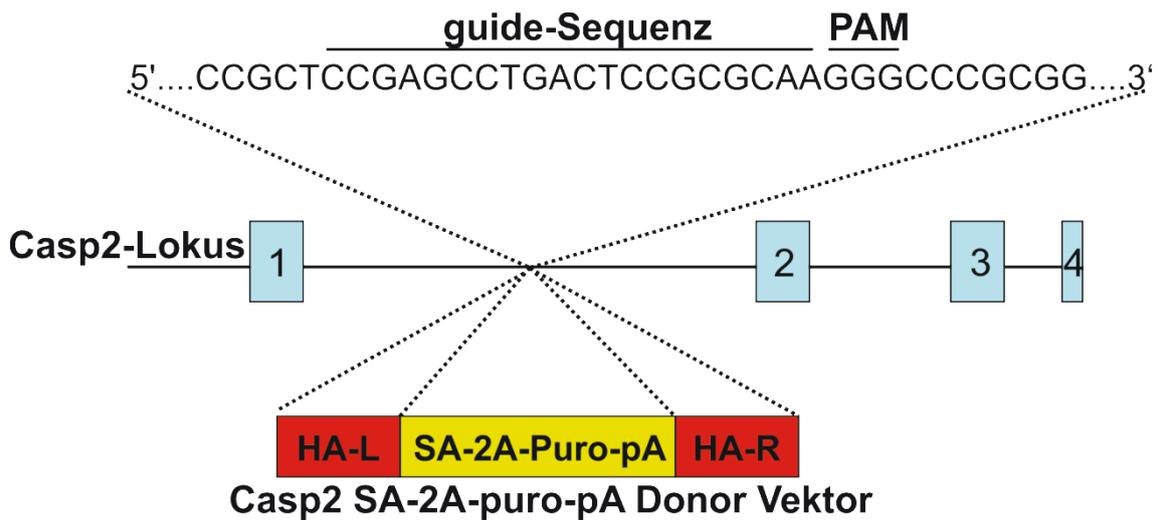


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Caspase-2 *knockout*-Strategie.

Erzeugung eines Doppelstrangbruchs mittels CRISPR-Cas9-System im 1. Intron von Casp2 und Integration einer DNA-Sequenz bestehend aus SA-*site*, 2A-Sequenz, PuroR und pA in den Bereich der Schnittstelle.

Die Integration des Donorvektors in das 1. Intron von Casp2 hatte mehrere Gründe. Für die Expression des Puromycin kann mit dieser Strategie der endogene Promotor von Casp2 zur Expression genutzt werden. Daher muss kein zusätzlicher Promotor über den Donorvektor in das Genom eingefügt werden. Der Bereich, der insertiert werden muss, ist durch diese Strategie insgesamt kleiner und die Chance einer erfolgreichen Integration wird hierdurch erhöht. Da das 2. und 3. Exon von Casp2 die CARD-Domäne kodiert und es verhindert werden sollte das auch Bereiche der CARD-Domäne exprimiert werden, musste die Integration des Donorvektors entweder im 1. Exon oder 1. Intron erfolgen. Der Bereich des 1. Exons ist mit nur 74 bp recht klein und nach Analyse mit dem CRISPR *designing tool* (vgl. <http://tools.genome-engineering.org>) war das Risiko von *off-target*-Schnittstellen bei einer Integration in diesem Bereich sehr hoch. *Off-targets* sind Schnittstellen an denen die Cas9 zusätzliche unerwünschte Doppelstrangbrüche erzeugen kann, da die gDNA starke Homologien zu diesen Bereichen besitzt. Nach Analyse des 3010 bp großen 1. Introns von Casp2 wurde die in Abbildung 11 dargestellte hoch spezifische gRNA ausgewählt.

A**all guides**

scored by inverse likelihood of offtarget binding
 mouse over for details ... [show legend](#)

	score	sequence
Guide #1	95	CCGAGCCTGACTCCGCGCAA GGG
Guide #2	93	TCCGAGCCTGACTCCGCGCA AGG
Guide #3	91	GTAAGTAGGGAACGGTCTTA GGG
Guide #4	89	AAGCCAAGAGGTCGCCCCG CGG
Guide #5	89	AACGGTCTAGGGCTCCTTA GGG
Guide #6	89	GCGGGCCCTTGCGCGGAGTC AGG
Guide #7	89	AGGCCAAGAGGTCGCCCCGC GGG
Guide #8	88	GGTAAGTAGGGAACGGTCTT AGG
Guide #9	85	GCGGGCGTCCCACCCCTTGGC AGG

← gRNA-Sequenz im 1. Intron von Caspase-2 mit höchster Spezifität

B

guide #1 quality score: 95

guide sequence: CCGAGCCTGACTCCGCGCAA **GGG**

on-target locus: chr7:+142985777

number of offtarget sites: 44 (6 are in genes)

Mögliche Exon Off Targets der gewählten gRNA

top 20 genome-wide off-target sites

show all exonic

sequence	score	mismatches	UCSC gene	locus
CCGAGCCTGACCCCGCCCCAGAG	0.2	3MMs [12:17:19]	NM_020529	chr14:-35874000
CCGCGCCTGACTACGCTGAAGGG	0.0	4MMs [4:13:17:18]	NM_000334	chr17:+62049734
CCCAGCCTGACTCGACCCACACAG	0.0	4MMs [3:14:15:17]	NM_014644	chr1:+144851903
CCAAGCCTGAATCTGAGCAACAG	0.0	4MMs [3:11:14:16]	NM_021115	chr22:+26736395
CCGAGTCTGACTCCGGGGACGAG	0.0	4MMs [6:16:18:20]	NM_017895	chr20:+47836045
CCGAGCCTGACTCGGTGGAGCAG	0.0	4MMs [14:16:18:20]	NM_001164342	chr3:-114069744

Abbildung 11: Auswahl und Design der gRNA.

A) Analyse der DNA des 1. Introns von Casp2 mittels CRISPR *designing tool* (<http://tools.genome-engineering.org>). Die *guide #1* Sequenz wies die höchste Spezifität auf (score 95). **B)** 6 mögliche Exon *off-targets* sind mit dieser Sequenz möglich. Die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Doppelstrangbrüche an diesen Stellen ist aber sehr gering (score 0-0,2).

Im Rahmen des Screenings wurden 107 Zellklone generiert. Die Expression von Caspase-2 wurde anschließend mittels Western Blot überprüft. 7 Klone zeigten keine - und ein Klon (Klon 32) eine verringerte Caspase-2 Expression (Abbildung 12 A). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass bei Klon 32 die Integration des Donorvektors nur auf einem Allel stattgefunden hat. Diese Vermutung sollte mit Hilfe einer PCR überprüft werden. Die beiden hierfür verwendeten Primer (fw_KO-Kontrolle; rv_KO-Kontrolle) liegen unmittelbar außerhalb der Schnittstelle (Abbildung 12 B). Bei erfolgreicher Integration würde somit ein PCR-Fragment mit einer Länge von 2192 bp bestehend aus den beiden Homologiearmen (HA-L und HA-R) und des SA-2A-Puro-pA Bereiches amplifiziert. Das PCR-Amplifikat in HCT116 WT-Zellen hat eine Länge von 1282 bp. Bei den Klonen 15, 17, 19, 35, 37, 49 und 53 wurde der Donorvektor erfolgreich inte-

griert (Abbildung 12 C). Bei Klon 32 bestätigte die PCR die Annahme. Bei diesem Klon hat ein heterozygoter *knockin* stattgefunden. Daher konnte mittels PCR sowohl das lange 2192 bp als auch das kurze 1282 bp Amplifikat nachgewiesen werden.

Auf transkriptioneller-Ebene wurde die Expression von Caspase-2 in einigen Klonen mittels sequenzspezifischer Primer qPCR analysiert. Dafür wurden bereits getestete Primer aus einer Primer-Bank verwendet (vgl. https://pga.mgh.harvard.edu/cgi-bin/primerbank/new_search2.cgi und Tang et al., 2016). Mit dem verwendeten Primerpaar (fw RT_Casp2; rv RT_Casp2) kann sowohl die Transkription der langen Casp2-L als auch der kurzen Casp2-S Isoform nachgewiesen werden. Die Expression von Caspase-2 war in Zellen, die zuvor mit Caspase-2 siRNA behandelt wurden, im Vergleich zu den unbehandelten WT-Zellen, stark reduziert (Abbildung 12 D). Bei Klon 32, bei dem der *knockin* nur auf einem Allel stattgefunden hat, war die Caspase-2 Expression, wie zu erwarten, halbiert. Bei den Klonen 15, 19, 35, 49 und 53, bei denen der Donorvektor auf beiden Allelen erfolgreich integriert wurde, war keine Caspase-2 mRNA nachweisbar. Dieses Ergebnis konnte auch mittels qPCR mit einer Casp2-Taqman-Sonde, die ebenfalls beide Caspase-2-Transkripte (L und S) bindet, bestätigt werden (n=1, nicht gezeigt).

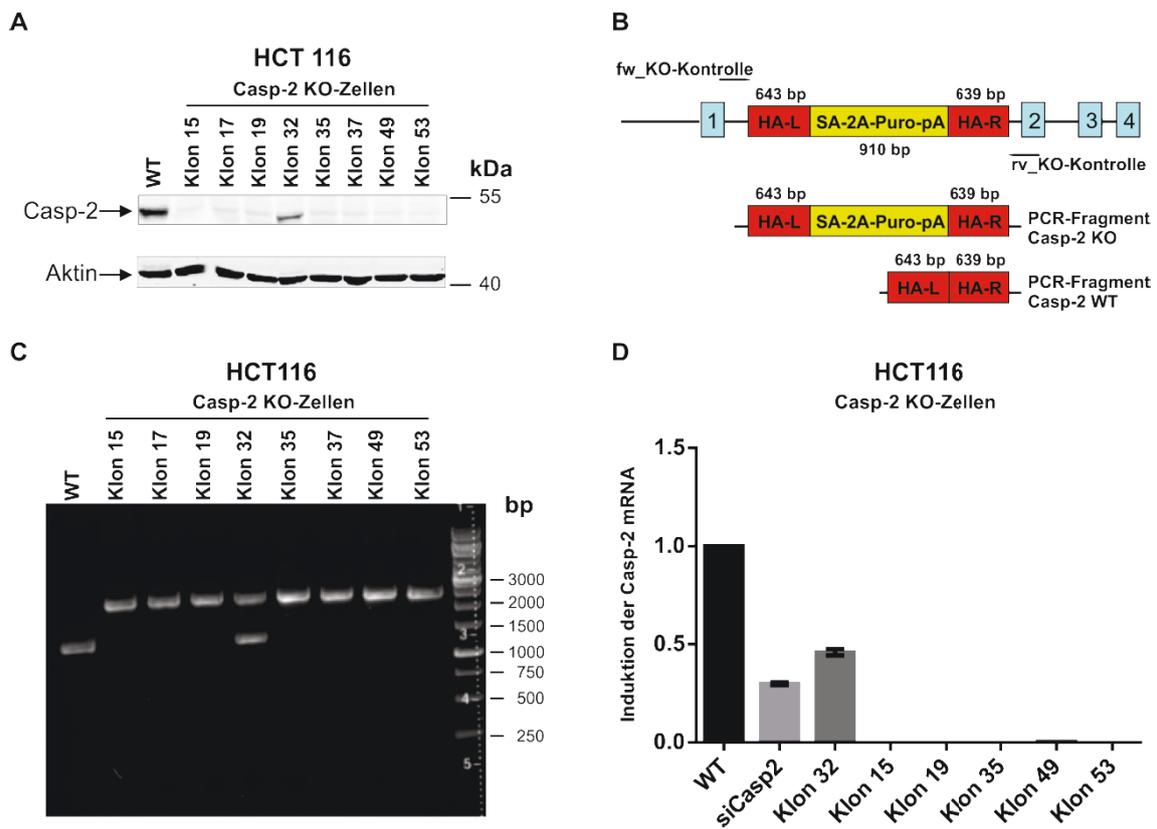


Abbildung 12: Überprüfung der generierten HCT116 Caspase-2 KO-Zelllinien mittels Western Blot, genomischer PCR und qPCR.

A) Western Blot Analyse zur Überprüfung der Caspase-2-Expression in HCT116 WT-Zellen und in potenziellen Caspase-2 KO-Zelllinien. **B)** Schematische Darstellung der Lokalisation des KO-Kontroll-Primerpaares und der daraus resultierenden PCR-Fragmente. **C)** Gelelektrophoretische Auftrennung der genomischen Kontroll-PCRs mittels einprozentigen Agarosegels. **D)** qPCR-Analyse zur Bestimmung der Caspase-2 mRNA Menge in HCT116 WT-Zellen, in siCasp2-transfizierten Zellen und in den potenziellen Caspase-2 KO-Zelllinien 32, 15, 19, 35, 49 und 53.

γ IR führt in HCT116 WT-Zellen zu einer starken Induktion der p21-Expression. Wie beschrieben (Sohn et al., 2011), ist die p21-Induktion in bestrahlten HCT116 WT-Zellen nach vorherigem *knockdown* von Caspase-2 mittels siRNA stark reduziert. In den Caspase-2 KO-Zelllinien 15, 17, 19, 35, und insbesondere in den Klonen 49 und 53 kann man diese reduzierte Expression von p21 acht Stunden nach γ IR ebenfalls erkennen (Abbildung 13 A und B). Bei Klon 32, bei dem der *knockin* nur auf einem Allel stattgefunden hat, ist die p21-Expression nur leicht vermindert. Im Vergleich zu den HCT116 WT-Zellen ist nach γ IR bei Klon 37 keine reduzierte Induktion der p21-Expression zu beobachten. *Off-target*-Effekte könnten eine mögliche Ursache hierfür sein.

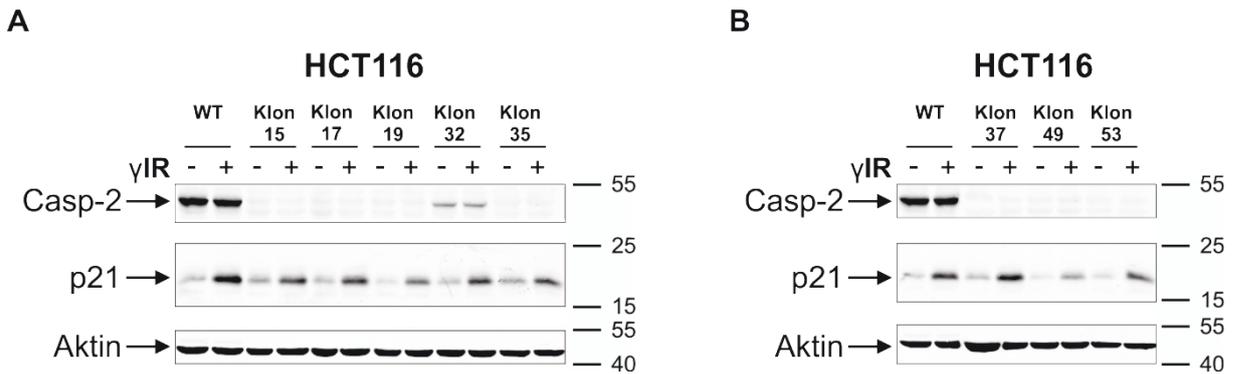


Abbildung 13: Die Induktion der p21-Expression ist in einigen Caspase-2 KO-Zelllinien nach γ IR reduziert.

A) und **B)** Western Blot zur Analyse des Expressionsstatus der angegebenen Proteine in Extrakten von unbestrahlten und mit γ IR bestrahlten (8h nach Bestrahlung mit 20 Gy) HCT116 WT-Zellen und den Caspase-2 KO-Zelllinien 32, 15, 19, 35, 49 und 53.

Die Generierung der Caspase-2 KO-Zelllinien war aufgrund verschiedener technischer Schwierigkeiten sehr zeitaufwendig, sodass diese erst am Ende der Arbeit erfolgreich hergestellt werden konnten. Deshalb war eine weitere Analyse aus zeitlichen Gründen nicht möglich. Dennoch wurden die Zellen bereits in weiteren Projekten der Arbeitsgruppe (u.a. Masterthesis Anke Hörster; Heinrich Heine Universität Düsseldorf 2016) eingesetzt. Parallel zur Generierung der Caspase-2 KO-Zelllinien stand die Etablierung einer p21-mRNA-Immunpräzipitation (p21-mRNA-IP) im Vordergrund, um die Rolle von Caspase-2 als translationaler Regulator der p21-Expression näher zu untersuchen.

3.1.2 Etablierung und Analyse der p21-mRNA-IP

Die translationale Regulation der p21-Expression durch Caspase-2 könnte entweder direkt durch die Bindung von Caspase-2 an die p21-3'UTR oder indirekt durch p21-mRBPs bzw. miRNAs erfolgen. Um diese Möglichkeiten zu überprüfen, wurde eine p21-mRNA-IP etabliert (Abbildung 14 und vgl. Abschnitt 2.2.6). Dafür wurde *in vitro* eine BrU-markierte p21-mRNA synthetisiert, die zusätzlich zum offenen Leserahmen (*open reading frame*; ORF) entweder die 3'UTR oder die 5'UTR enthielt. Im zweiten Schritt wurden beide Konstrukte sowohl mit unbehandelten Zelllysaten von HCT116 WT-Zellen, als auch mit Zelllysaten von Zellen, die entweder mit Kontroll- oder Caspase-2 siRNA (siCon bzw. siCasp2)

behandelt wurden, inkubiert. Die kopräzipitierten mRNA-bindenden-Proteine (mRBPs) wurden im Anschluss mittels Silberfärbung, Western Blot oder MS näher untersucht (Abbildung 14). Anhand dieser Vorgehensweise sollte eine direkte Bindung von Caspase-2, sowie eine Caspase-2 abhängige veränderte Bindung von mRBPs an die p21-3'UTR überprüft werden.

Parallel zu der Analyse der p21-mRBPs, sollten auch die an die p21-mRNA gebunden miRNAs identifiziert und eine eventuelle Caspase-2 abhängige Bindung dieser miRNAs an die p21-mRNA überprüft werden. Auch hierfür wurden die oben beschriebenen Konstrukte mit Zelllysaten von siCon- oder siCasp2-transfizierten HCT116 WT-Zellen inkubiert und anschließend einer Aufreinigung und Analyse der gebundenen miRNAs mittels qPCR oder RNA-Sequenzierung unterzogen (Abbildung 14).

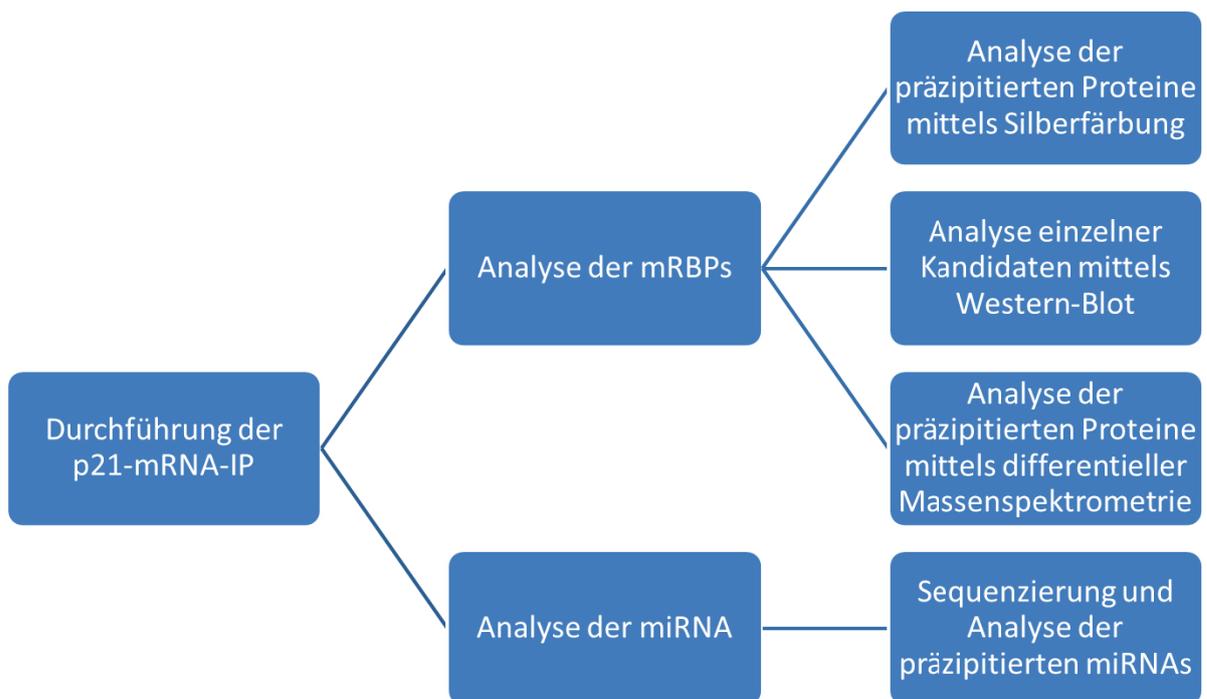


Abbildung 14: Strategie zur Identifizierung von Komponenten, die an der Caspase-2-abhängigen Expression von p21 beteiligt sind.

Erläuternde Informationen vgl. Abschnitt 3.1.2.

3.1.2.1 Caspase-2 ist kein direkter Bindungspartner der p21-3'UTR

Aus den beiden Plasmidvektoren pcDNA4 5'UTR-Flag-p21-3'UTR und pcDNA4 5'UTR-Flag-p21 wurden *in vitro* zwei verschiedene BrU-markierte Konstrukte

(p21-3'UTR und 5'UTR-p21) synthetisiert. Die Überprüfung der Qualität und der Länge der synthetisierten mRNAs erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung. Die 3'UTR, die einer strikten Regulation durch mRBPs und miRNAs unterliegt, ist mit 1527 bp deutlich länger, als die 5'UTR mit nur 80 bp (Abbildung 15 A). Die beiden mRNA-Konstrukte wurden im Anschluss mit Extrakten von unbehandelten HCT116 WT-Zellen inkubiert. Die anschließende Silberfärbung bestätigte nicht nur die erfolgreiche Etablierung dieser Methode, sondern zeigte auch eine vermehrte Proteinbindung an die 3'UTR im Vergleich zum 5'UTR Konstrukt (Abbildung 15 B).

Um die Fragestellung zu beantworten, ob Caspase-2 in der Lage ist die p21-Expression durch direkte Bindung an die p21-3'UTR zu beeinflussen und um gleichzeitig die Spezifität der p21-mRNA-IP zu überprüfen, wurde eine eventuelle Bindung von Caspase-2 sowie bekannter p21-mRBPs Proteine an die 3'UTR und 5'UTR anhand Western Blot-Analysen untersucht. Hierbei zeigte sich eindeutig, dass Caspase-2 mit keinem der beiden Konstrukte kopräzipitiert wurde (Abbildung 15 C). Dies deckt sich auch mit der Tatsache, dass Caspase-2 keine bekannte RBD besitzt. Demzufolge steuert Caspase-2 die translationale Regulation der p21-Expression sehr wahrscheinlich über einen indirekten Mechanismus. Anders als Caspase-2 konnten die RBPs hnRNP-K, HuR und AUF1, deren Bindung an die p21-3'UTR bereits beschrieben wurde, spezifisch mit der 3'UTR präzipitiert werden (Lal et al., 2004; Yano et al., 2005) (Abbildung 15 C). Auch die RISC-Komponente Argonaut-2, welche vermittelt durch miRNAs ebenfalls an mRNAs bindet, wurde vermehrt mit der durch miRNAs stark regulierten 3'UTR präzipitiert. Nukleolin dagegen wurde zwar aufgrund seiner sequenzunabhängigen Bindung in Präzipitaten beider Konstrukte nachgewiesen, aber bedingt durch dessen präferentielle Bindung an längere mRNA-Sequenzen, verstärkt in Präzipitaten der wesentlich längeren p21-3'UTR (Abdelmohsen und Gorospe, 2012). Schließlich diente die Beobachtung, dass sowohl der Transkriptionsfaktor p53, als auch Tubulin, die beide nicht als p21-mRBPs bekannt sind, weder an die 3'UTR noch die 5'UTR binden, als ein weiteres Indiz für die Spezifität der durchgeführten p21-mRNA-IP.

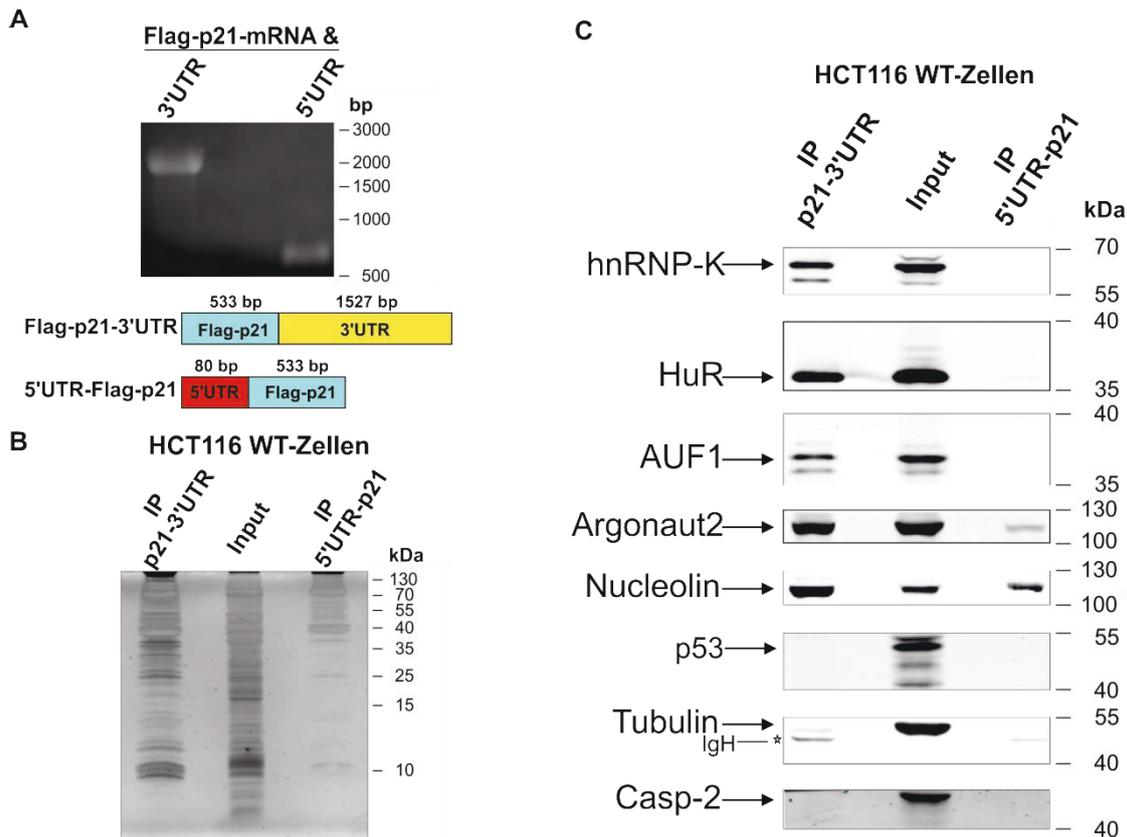


Abbildung 15: Etablierung und Analyse der p21-mRNA-IP.

A) Analytisches RNA-Gel der beiden *in vitro* synthetisierten und mit BrU-markierten p21-mRNA-Konstrukte. Die Länge der beiden Konstrukte (Flag-p21-3'UTR, 5'UTR-Flag-p21) kann der schematischen Darstellung entnommen werden. **B)** und **C)** Die p21-mRNA-Konstrukte wurden mit zytoplasmatischen Extrakten von HCT116 WT-Zellen inkubiert und mittels BrU-Antikörper wurden mRNA-IPs durchgeführt. Die spezifisch mit den p21-3'UTR oder der 5'UTR-p21 präzipitierten Proteine, wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe einer Silberfärbung (B) oder eines Western Blots (C) analysiert. Die zytoplasmatische Extraktion diente als Kontrolle und wurde ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetragen und mittels Silberfärbung (B) oder Western Blot (C) analysiert und wird im Folgenden als Input bezeichnet (IgH: *immunoglobulin heavy chain*).

3.1.2.2 Einfluss von Caspase-2 auf die Expression und die Bindung von miRNAs an die p21-3'UTR

Um diese Technik auch auf p21-mRNA-bindende miRNAs anzuwenden, wurde die RNA aus den Präzipitaten der beiden BrU-markierten p21-mRNA Konstrukte isoliert und mittels qPCR auf die Anwesenheit bekannter p21-mRNA-bindender miRNAs untersucht. Hierfür wurde die isolierte RNA zunächst mit miRNA-spezifischen Primern in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben,

bevor im Anschluss die quantitative Analyse der präzipitierten miRNAs durch qPCR erfolgte. Mit dieser Methodik konnte die Bindung der bereits bekannten p21-mRNA-bindenden miRNAs (miRNA-17 und miRNA-106b) an die p21-3'UTR nachgewiesen werden (Abbildung 16). Als Negativkontrolle wurde die Bindung von RNU6b an die beiden Fragmente getestet. Bei RNU6b handelt es sich um spleißosomale RNA, die oft für die Normalisierung von quantitativen miRNA-Analysen verwendet wird. Diese bindet genauso wie die miRNA-30e, von der unsere Arbeitsgruppe erst kürzlich nachwies, dass sie die p21-Expression auf transkriptionelle Weise induziert (Sohn et al., 2016), weder an die 5' noch 3'UTR von p21. Die Standardabweichungen zwischen den einzelnen qPCRs waren sehr hoch (Abbildung 16). Weitere Experimente wiesen sogar noch stärkere Varianzen auf (nicht gezeigt). Die starken Schwankungen entstanden durch die Vielzahl von Aufreinigungsschritten, die für die RNA-Analyse notwendig sind. Sie ließen sich auch nach mehrmaliger Wiederholung des Experimentes nicht reduzieren. Demzufolge war es mit dieser Methodik zwar möglich die Bindung oder Nicht-Bindung einer miRNA an ein bestimmtes RNA-Fragment nachzuweisen, für vergleichende Analysen von Bindungsunterschieden in An- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 war die Qualität der Proben allerdings nicht ausreichend (Abbildung 16). Der geplante *unbiased approach*, - die Analyse der Proben mittels RNA-Sequenzierung in Kooperation mit Dr. Pablo Landgraf,- konnte aus diesem Grund im Rahmen dieser Dissertation nicht durchgeführt werden.

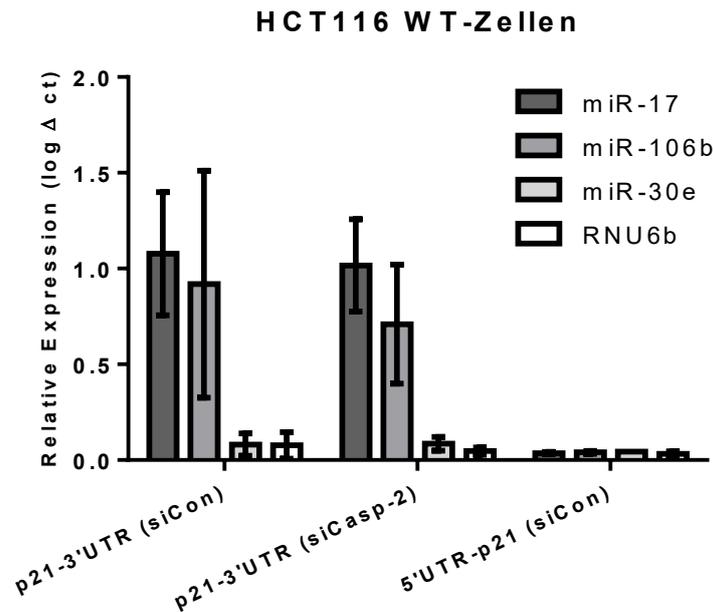


Abbildung 16: Nachweis von spezifisch an die p21-3'UTR gebundener miRNAs. p21-mRNA-IPs wurden nach RNA-Isolation auf die Kopräzipitation der angegebenen miRNAs mittels qPCR untersucht. Das Diagramm zeigt die relativen Expressionsunterschiede der jeweiligen miRNAs im Vergleich zur Ausgangsmenge im Input (log aus Δ CT). Der Mittelwert von log aus Δ CT wurde aus 2 unabhängigen Experimenten ermittelt.

3.1.2.3 Einfluss von Caspase-2 auf die Bindung von bekannten p21-mRBPs (*biased approach*)

Wie in Abschnitt 3.1.2.1 veranschaulicht, konnte eine p21-mRNA-IP erfolgreich mit zwei verschiedenen Konstrukten etabliert werden und mRBPs deren Bindung an die p21-3'UTR bereits beschrieben wurde, spezifisch mittels Western Blot nachgewiesen werden. Zudem konnte eine direkte Bindung von Caspase-2 an die p21-3'UTR ausgeschlossen werden. Im nächsten Schritt sollte die Bindung dieser p21-mRBPs an die p21-3'UTR in Abhängigkeit von Caspase-2 analysiert werden. Aus diesem Grund wurde die p21-mRNA-IP diesmal mit Zellysaten von Zellen, die drei Tage zuvor entweder mit siCon oder siCasp2 behandelt wurden, wiederholt. Hierfür wurden die präzipitierten Proteine zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Silberfärbung gefärbt, um mögliche Unterschiede im Bandenmuster zu erkennen. Entsprechende Proteinbanden sollten in einem nächsten Schritt ausgeschnitten und mittels MS analysiert werden. Allerdings waren weder beim Vergleich des Bandenmusters des Inputs, noch beim Vergleich der Bandenmuster der beiden IPs deutliche Unterschiede zu erkennen (Abbildung 17 A). Die Methodik war aufgrund der großen

Anzahl an präzipitierten Proteinen nicht sensitiv genug. Deshalb wurde die Bindung der p21-mRBPs hnRNP-K, HuR und AUF1 in Abhängigkeit der Caspase-2 Expression anhand Western Blot-Analysen untersucht. Es zeigte sich aber, dass die Expression der untersuchten p21-mRBPs nicht durch den *knockdown* von Caspase-2 beeinflusst wird (Abbildung 17 B). Des Weiteren hat auch die An- oder Abwesenheit von Caspase-2 keinen Einfluss auf die Bindung der untersuchten p21-mRBPs an die p21-3'UTR. Diese waren in beiden Eluatn in vergleichbaren Mengen nachweisbar. Somit können hnRNP-K, HuR und AUF1 als potenzielle Interaktionspartner für die Caspase-2-abhängige p21-Expression ausgeschlossen werden.

Um auf anderem Wege noch einmal zu überprüfen, ob Caspase-2 die Regulation von p21 auf translationaler Ebene über miRNAs steuert, wurde die Bindung der Argonaut Proteine 1 und 2 in Abhängigkeit der Caspase-2 Expression untersucht. Auch Ihre Bindung an die p21-3'UTR war unabhängig von Caspase-2. Dies weist darauf hin, dass auch miRNAs sehr wahrscheinlich nicht die gesuchten Kofaktoren für die Caspase-2-abhängige p21-Regulation darstellen.

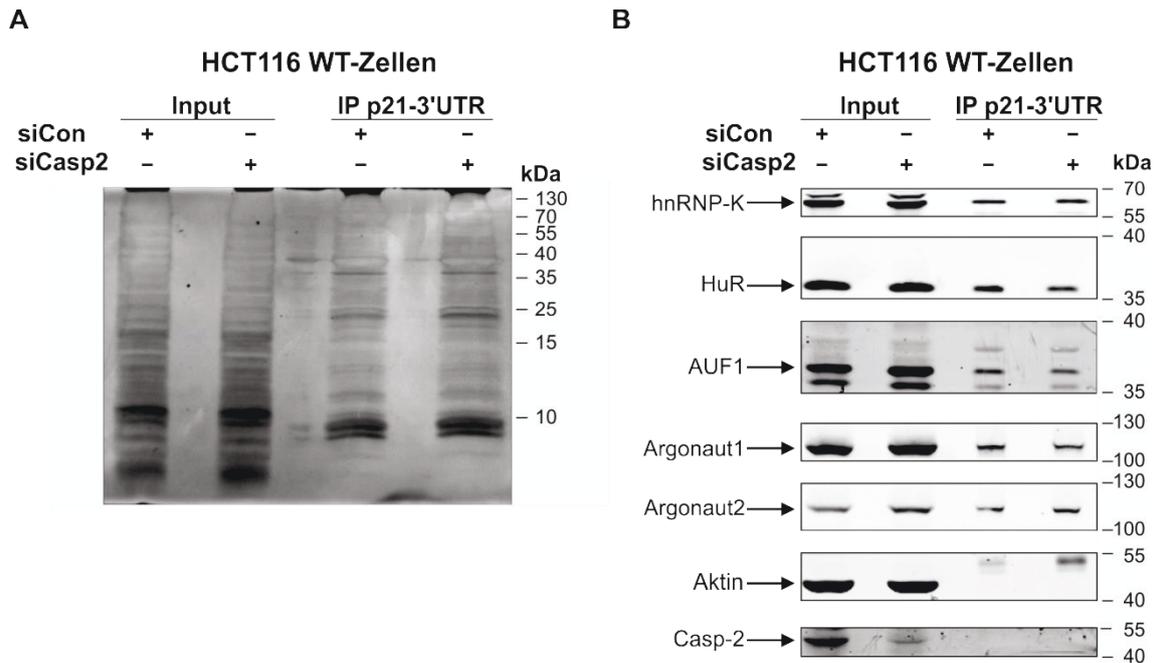


Abbildung 17: Die Bindung der untersuchten mRBPs an die p21-3'UTR wird durch die An- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 nicht beeinflusst.

A) Silberfärbung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Zytoplasmatische Extrakte von HCT116 WT-Zellen, die zuvor mit siCon oder siCasp2 transfiziert wurden, wurden zusammen mit der BrU-markierten p21-3'UTR inkubiert. Gebundene mRBPs wurden anschließend mittels BrdU-Antikörpern präzipitiert und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. **B)** Western Blot Analyse des in (A) beschriebenen Versuchsansatzes auf die Bindung der angegebenden Proteine.

3.1.2.4 DDX41 ein potenzieller Interaktionspartner für die Caspase-2-abhängige Expression von p21?

Von der Arbeitsgruppe von Dr. C. Brancolini (Universität Udine, Italien) haben wir erfahren, dass die DEAD-box RNA Helikase DDX41, ein RBP, in einem *yeast two-hybrid* (Y2H)- Screening als möglicher Interaktionspartner von Caspase-2 identifiziert wurde. Deshalb rückte die Überprüfung von DDX41 als mögliche Komponente der Caspase-2-abhängigen Expression von p21 in den Fokus weiterer Experimente.

DDX41 wurde bislang in der Literatur noch nicht als p21-mRBP beschrieben. Um eine Bindung von DDX41 an die p21-mRNA zu überprüfen wurde die schon in Abschnitt 3.1.2.1 beschriebene p21-mRNA IP wiederholt. Mit dieser konnte gezeigt werden, dass DDX41 spezifisch an die p21-3'UTR bindet, nicht jedoch an die 5'UTR der p21-mRNA (Abbildung 18 A). Um weitere Informationen über eine mögliche Interaktion von Caspase-2 und DDX41 zu bekommen, wurden

HCT116 WT-Zellen mit Caspase-2 siRNA transfiziert und die DDX41-Expression in γ IR bestrahlten und unbestrahlten Zellen analysiert (Abbildung 18 B). Unter beiden Bedingungen hat der *knockdown* von Caspase-2 keinen Einfluss auf die Expression von DDX41. Wie schon in vorherigen Experimenten zu beobachten war, wird auch die Expression von hnRNP-K, HuR und AUF1 durch die Abwesenheit von Caspase-2 weder in unbestrahlten noch in bestrahlten HCT116 WT-Zellen beeinflusst (Abbildung 17 B).

Im nächsten Schritt wurde die p21-Expression in bestrahlten und unbestrahlten HCT116 WT-Zellen nach Kotransfektion mit siDDX41 und siCasp2 untersucht (Abbildung 18 C). Die Expression von p21 ist, wie bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben, nach Transfektion mit Caspase-2 siRNA stark vermindert (Sohn et al., 2011). Im Gegensatz hierzu ist die Expression von p21 in Abwesenheit von DDX41 im Vergleich zu den Kontrollen unabhängig von γ IR deutlich erhöht. Die Expression von p53 wird hingegen durch den *knockdown* von DDX41 nicht beeinflusst. Wenn DDX41 als Kofaktor für die Caspase-2-abhängige Induktion der p21-Expression verantwortlich wäre, würde man bei Kotransfektion beider siRNAs eine Expression von p21 auf ähnlichem Niveau wie in den Kontrollzellen erwarten. Die p21-Expression ist bei Kotransfektion beider siRNAs im Vergleich zu den Kontrollen jedoch sichtbar vermindert. Eine weitere p21-mRNA-IP in An- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 bestätigte, dass DDX41 unabhängig von Caspase-2 die p21-Expression reguliert. Die Bindung von DDX41 an die p21-mRNA wurde durch den *knockdown* von Caspase-2 nicht beeinträchtigt (Abbildung 18 D).

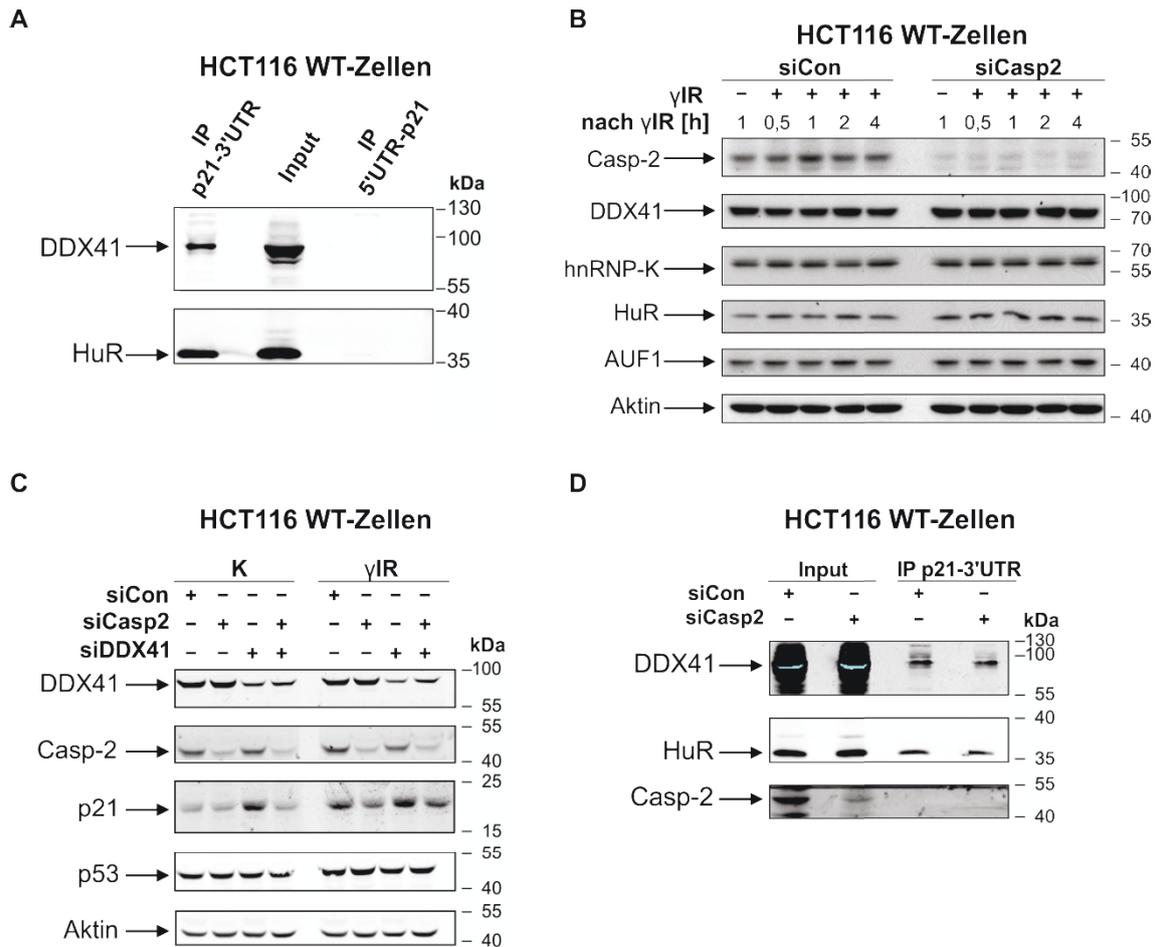


Abbildung 18: DDX41 bindet unabhängig von Caspase-2 die p21-3'UTR und reguliert auch Caspase-2 unabhängig deren Expression.

A) Western Blot Analyse zum Status von DDX41 und HuR in Präzipitaten von BrU-markierten p21-Konstrukten (p21-3'UTR; 5'UTR-p21). **B)** und **C)** Western Blot Analyse des Expressionsstatus der dargestellten Proteine aus Extrakten von bestrahlten HCT116 WT-Zellen, die zuvor mit siCon, siCasp2 oder siDDX41 transfiziert wurden. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (B) bzw. 8 h nach γ IR geerntet. **D)** Western Blot Analyse zum Status der dargestellten Proteine: Zytoplasmatische Extrakte von HCT116 WT-Zellen, die zuvor mit siCon oder siCasp2 behandelt wurden, wurden zusammen mit der BrU-markierten p21-3'UTR inkubiert und anschließend mittels BrdU-Antikörpern präzipitiert. In A und D wurde zum Vergleich der gesamte zytoplasmatische Zellextrakt aufgetragen (Input).

Um den Mechanismus näher zu charakterisieren über den DDX41 die p21-Expression reguliert, wurde anhand eines fluorometrischen Substrattests zunächst der Einfluss dieses RBPs auf die Induktion der Apoptose untersucht (vgl. Abschnitt 2.2.4). HCT116 WT-Zellen reagieren auf γ IR nur geringfügig mit der Einleitung von Apoptose, sondern gehen p21-vermittelt in die Seneszenz über (Sohn et al., 2006). Die beiden HCT116 Zelllinien p21^{-/-} und p53^{-/-}, werden hin-

gegen in die Apoptose getrieben. In siDDX41-transfizierten HCT116 WT-Zellen ist die DEVDase-Aktivität nach γ IR geringer als in den Kontrollzellen (Abbildung 19 A), wodurch diese vor der Apoptose geschützt werden. Dies ist auf die verstärkte Expression von p21 in Abwesenheit von DDX41 zurückzuführen (Abbildung 18 C). In HCT116 p21^{-/-} und HCT116 p53^{-/-} -Zellen, die nicht in der Lage sind p21 zu exprimieren, hat der *knockdown* von DDX41 hingegen keinen Einfluss auf die DEVDase-Aktivität (Abbildung 19 B), was die Spezifität dieses Prozesses unterstreicht.

Mit den dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass DDX41 spezifisch an die p21-3UTR bindet und dadurch dessen Expression Caspase-2-unabhängig reguliert. Da hierdurch die Expression von p53 nicht beeinflusst wird (Abbildung 18 C), kann vermutet werden, dass die Regulation von p21 durch DDX41 nicht auf transkriptioneller, sondern auf translationaler Ebene stattfindet. Einen ersten Hinweis hierfür lieferte eine qPCR Analyse der p21-mRNA-Expression in HCT116 WT-Zellen 4h und 24 h nach γ IR. Die Abwesenheit von DDX41 hat demnach keinen Einfluss auf die Expression der p21-mRNA (Abbildung 19 C). Der genaue Regulationsmechanismus der DDX41-abhängigen p21-Expression wird weiterhin in der Arbeitsgruppe untersucht.

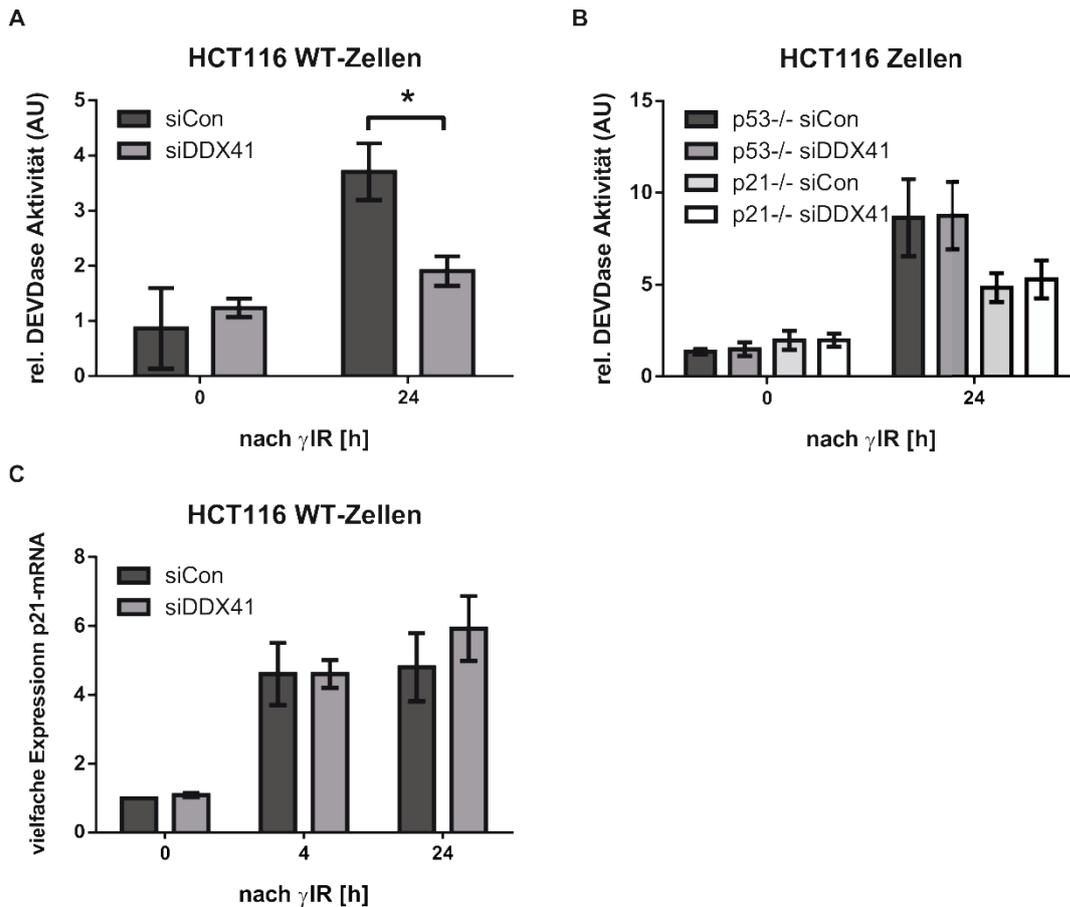


Abbildung 19: Nach *knockdown* von DDX41 ist die DEVDase-Aktivität durch die posttranskriptionelle Modulation der p21-Expression reduziert.

A) und **B)** Fluorometrischer Caspase-3-Substrattest mit HCT116 WT-Zellen (A) bzw. p53 und p21 defizienten Zellen (B), die entweder mit siCon oder siDDX41 transfiziert wurden. Die Analyse erfolgte zwei Tage nach γ IR. Die Aktivität ist in arbiträren Einheiten (*arbitrary units*; AU) dargestellt, die den Mittelwerten von drei unabhängig durchgeführten Experimenten entsprechen. Für die statistische Auswertung wurde der zweiseitige Student-t-Test angewendet *, $p < 0,05$ **C)** qPCR-Analyse zur Bestimmung der p21-mRNA Menge in HCT116 WT-Zellen, die entweder mit siCon oder siDDX41 transfiziert wurden. Die RNA wurde 0 h, 4 h bzw. 24 h nach γ IR isoliert. Die Mittelwerte der vielfachen Expression der p21-mRNA wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet.

3.1.2.5 MS-Analyse zur Identifizierung von mRBPs, die in An.- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 spezifisch an die p21-3'UTR binden (*unbiased approach*)

Die zuvor durchgeführten Untersuchungen (*biased approach*), bei denen die Bindung einiger bekannter p21-mRBPs an die p21-3'UTR in Abhängigkeit der Caspase-2 Expression untersucht wurde, waren nicht zielführend (vgl. Abschnitt 3.1.2.3). Aus diesem Grund sollte eine unvoreingenommene MS-Analyse (*unbi-*

ased approach) durchgeführt werden, um p21-mRBPs zu identifizieren, die in An- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 ein verändertes Bindevverhalten an die p21-3'UTR aufweisen. Hierfür wurden erneut p21-mRNA-IPs mit Lysaten von Zellen durchgeführt, die zuvor entweder mit siCon oder siCasp2 transfiziert wurden. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kai Stühler mittels MS identifiziert, quantifiziert und analysiert. Zur Identifizierung geeigneter Kandidaten sollten dabei nicht die absoluten Mengen an präzipitierten Proteinen miteinander verglichen werden, sondern nur solche Proteine, die spezifisch an die p21-3'UTR gebunden haben. Deshalb wurden gleichzeitig IPs mit der 5'UTR durchgeführt. Die hierbei präzipitierten Proteine wurden ebenfalls mit MS identifiziert und quantifiziert und mit den mit der 3'UTR präzipitierten Proteinmengen verglichen. Als Messgröße hierfür wurde die sogenannte *t-test difference* gebildet. Diese besteht aus der Differenz der Mittelwerte der präzipitierten Mengen eines jeweiligen Proteins zwischen 3'UTR und 5'UTR. So war es möglich eine Rangliste der präzipitierten Proteine zu erstellen, beginnend mit dem in den Proben der 3'UTR am stärksten angereicherten Proteine (vgl. Tabelle Anhang 2). In der Tabelle wurden nur Proteine aufgeführt die zwischen 3'UTR und 5'UTR signifikant unterschiedlich stark vorhanden waren. Des Weiteren wurden alle Proteine aus der Tabelle gelöscht, die mittels MS nicht eindeutig erkannt wurden, sodass für eine weitere Analyse 224 Proteine übrig blieben.

Eine Klassifizierung dieser Proteine erfolgte anschließend anhand einer von Gerstberger et al., 2014 zusammengestellten Liste, die alle potenziellen RBPs des Genoms enthält (vgl. Tabelle Anhang 2 Spalte „consensus RNA target“). Das menschliche Genom besteht aus ca. 20.500 proteinkodierenden Genen. Nur 1542 (ca. 7,5%) dieser Proteine sind RBPs und somit am RNA-Metabolismus beteiligt (Abbildung 20 A). Von diesen sind wiederum 692 (ca. 3%) mRBPs und nur 169 (ca. 0,8%) ribosomale Proteine (Gerstberger et al., 2014).

Im Gegensatz zu einem Gesamtanteil von ca. 7,5% an RBPs im Genom, beträgt der Anteil an RBPs unter den 224 Proteinen, die signifikant in den Proben mit der p21-3'UTR angereichert worden waren 56,5% (127). Der Hauptanteil hiervon waren mit 33% (74) mRBPs (Abbildung 20 B). Zusätzlich wurden acht bereits bekannte p21-mRBPs mit der p21-3'UTR spezifisch präzipitiert (3,5%).

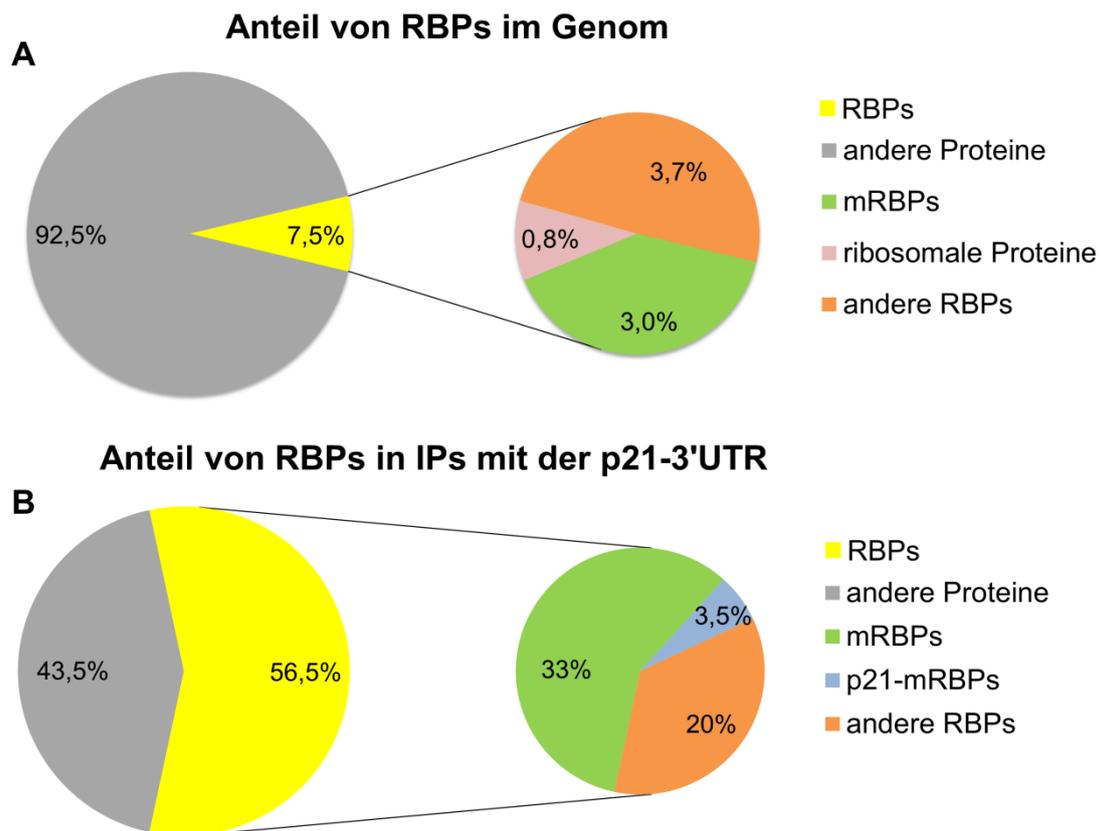


Abbildung 20: Anreicherung von mRBPs in IPs mit der p21-3'UTR.

A) Schematische Darstellung des Anteils von RBPs im Genom. Der Anteil von Genen die für RBPs kodieren beträgt 7,5%. 3% aller Gene des Genoms kodieren mRBPs. **B)** Schematische Darstellung des Anteils von RBPs die spezifisch mit der p21-3'UTR präzipitiert wurden. 56,5% der präzipitierten Proteine konnten als RBPs und 33% als mRBPs klassifiziert werden.

Neben den bereits mittels Western Blot nachgewiesenen bekannten p21-mRBPs hnRNP-K, HuR und AUF1, konnten mit Hilfe der MS-Analyse auch die p21-mRBPs PCBP2, Tristetraprolin (ZFP36), Musashi-1, *Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1* (FXR1) und das im Rahmen der Dissertation erstmals als p21-mRBP identifizierte DDX41 spezifisch mit der p21-3'UTR präzipitiert werden (vgl. Tabelle 1). Der Nachweis bereits bekannter p21-mRBPs und die starke Anreicherung von mRBPs, die noch nicht als p21-mRBPs beschrieben wurden, ist ein Indiz für die Spezifität der durchgeführten IP.

Die Proteine *Pumilio homolog 2* (Pum2), *Polypyrimidine tract-binding protein 2* (PTBP2) und *Tripartite motif-containing protein 25* (Trim25) konnten als poten-

zielle Interaktionspartner für die Caspase-2-abhängige p21-Expression identifiziert werden. Ihre Bindung an die p21-3'UTR war beim Vergleich von mRNA-IPs mit Lysaten von Zellen, die zuvor entweder mit siCon bzw. siCasp2 transfiziert worden waren, signifikant verändert. Deshalb rückten diese drei Proteine in den Fokus weiterer Experimente.

Tabelle 1: Rangliste der mit der p21-3'UTR präzipitierten mRBPs.

Rang -liste	Proteinname	Gen	t-test diff.
1	RNA-binding protein 47	RBM47	8,58
3	Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	7,91
5	Pumilio homolog 2	PUM2	7,75
9	Matrin-3	MATR3	7,36
12	human antigen R	HuR/ELAVL1	7,13
14	Tristetraprolin	ZFP36	6,30
22	RNA-binding protein Musashi homolog 1	MSI1	5,65
26	RNA-binding protein Musashi homolog 2	MSI2	5,50
28	RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 2	RC3H2	5,41
31	Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1	5,31
32	Pumilio homolog 1	PUM1	5,29
37	Fragile X mental retardation protein 1	FMR1	5,08
42	Polypyrimidine tract-binding protein 2	PTBP2	4,91
43	Probable E3 ubiquitin-protein ligase Roquin	RC3H1	4,88
44	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	FXR1	4,82
59	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	4,48
98	(AU-rich element RNA binding protein 1	AUF1/HNRNPD	3,70
103	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	DDX41	3,60
127	Tripartite motif-containing protein 25	TRIM25	2,94
137	Caprin-1	CAPRIN1	2,31

Legende

verifizierte p21-mRBPs
putative p21-mRBPs: Bindung an die p21-3'UTR unabhängig von Caspase-2
putative p21-mRBPs: Bindung an die p21-3'UTR potenziell Caspase-2-abhängig

3.1.2.6 Sind die mRBPs Pum2, PTBP2 und Trim25 potenzielle Kofaktoren der Caspase-2-abhängigen p21-Expression?

Um eine mögliche Caspase-2 vermittelte p21-Regulation über die mRBPs Pum2, PTBP2 und Trim25 zu prüfen, sollte im nächsten Schritt die p21-Expression von bestrahlten und unbestrahlten HCT116 WT-Zellen nach Transfektion mit siPum2, siPTBP und siTrim25 bei gleichzeitiger Transfektion mit si-Casp2 mittels Western Blot analysiert werden. Obwohl mehrere Antikörper für Pum2 und für PTBP2 getestet wurden, scheiterten weiterführende Experimente

an der mangelhaften Spezifität dieser Antikörper. So stellte sich heraus, dass der zu Beginn verwendete PTBP2 Antikörper nicht PTBP2, sondern primär PTBP1 gebunden hat (vgl. Bachelorthesis Lisa Cristin Hüsemann; Heinrich Heine Universität Düsseldorf 2014).

Mit Trim25 dagegen konnten weiterführende Experimente durchgeführt werden. Allerdings hatte der *knockdown* von Trim25 weder in bestrahlten noch in unbestrahlten HCT116 WT-Zellen Einfluss auf die p21-Expression (Abbildung 21 A). Auch unterscheidet sich diese nach gleichzeitigem Doppel-*knockdown* von Trim25 und Caspase-2 in unbestrahlten bzw. bestrahlten HCT116 WT-Zellen nicht von HCT116 WT-Zellen, die nur mit siCasp2 transfiziert wurden. Im Vergleich zu den Kontrollen ist die p21-Expression unter beiden Bedingungen stark reduziert, so dass dieser Effekt allein dem Caspase-2 *knockdown* zugeschrieben werden kann. Dennoch sollte die Bindung von Trim25 an die p21-3'UTR mittels Western Blot bestätigt werden, wozu erneut p21-mRNA-IPs mit Zelllysaten von Zellen durchgeführt wurden, die zuvor entweder mit siCon oder siCasp2 transfiziert wurden. Im Gegensatz zur MS-Analyse konnte aber hierdurch weder in An- noch in Abwesenheit von Caspase-2 eine Bindung von Trim25 an die p21-3'UTR festgestellt werden (Abbildung 21 B). Somit konnte Trim25 als Interaktionspartner der Caspase-2-abhängigen p21-Regulation ausgeschlossen werden.

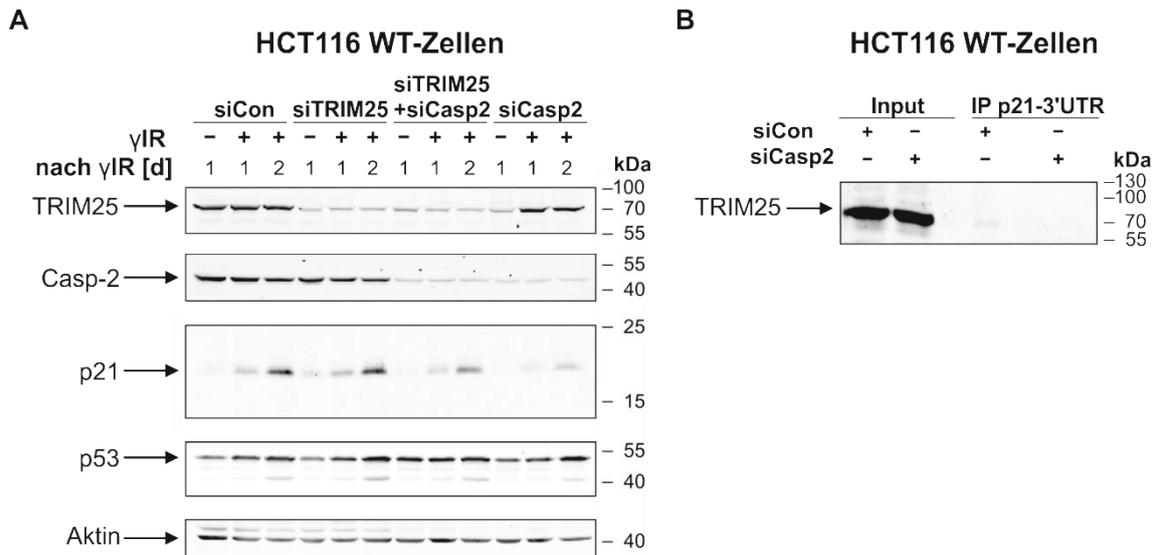


Abbildung 21: Trim25 ist kein Kofaktor der Caspase-2-abhängigen p21-Regulation.

A): Western Blot Analyse des Expressionsstatus der dargestellten Proteine aus Extrakten von HCT116 WT-Zellen, die zuvor mit siCon, siCasp2 oder siTrim25 transfiziert wurden. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten 1 d (*day*) bzw. 2 d nach γIR geerntet. **B)** Western Blot Analyse: Zytoplasmatische Extrakte von HCT116 WT-Zellen, die zuvor mit siCon oder siCasp2 behandelt wurden, wurden zusammen mit BrU-markierter p21-3'UTR inkubiert und anschließenden mittels BrdU-Antikörpern präzipitiert. Die Bindung von Trim25 an die p21-3'UTR konnte nicht bestätigt werden.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung neuer putativer p21-mRBPs

3.2.1 Analyse von spezifisch mit der p21-3'UTR präzipitierten mRBPs mittels Western Blot

Aufgrund der im vorherigen Abschnitt beschriebenen experimentellen Probleme bei der Identifizierung möglicher Interaktionspartner für die Caspase-2 abhängige p21-Regulation wurden parallel Experimente durchgeführt, um einige der durch MS-Analysen neu identifizierten Caspase-2-unabhängigen p21-mRBPs zu bestätigen. Für diesen Zweck wurden erneut p21-mRNA-IPs mit Lysaten von Zellen durchgeführt, die zuvor entweder mit siCon oder siCasp2 transfiziert wurden. Die Bindung einiger der in Tabelle 1 aufgeführten Caspase-2 unabhängigen p21-mRBPs wurde im Anschluss mittels Western Blot überprüft. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die mRBPs RBM47, PTBP1, FMR1; Matrins-

3 und Pum-1 eine starke Bindung zur p21-3'UTR aufweisen (Abbildung 22 A). Die Bindung der mRBPs Caprin1, RC3H1, RC3H2 und Musashi-2 an die p21-3'UTR ist zwar etwas schwächer, jedoch können auch diese spezifisch mit der 3'UTR nachgewiesen werden (Abbildung 22 B). Keines der überprüften mRBPs bindet an die 5'UTR von p21. Zudem wird die Bindung der untersuchten p21-mRBPs nicht durch die An- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 beeinflusst. Somit bestätigt der Western Blot die Ergebnisse der MS-Analyse (vgl. Tabelle 1).

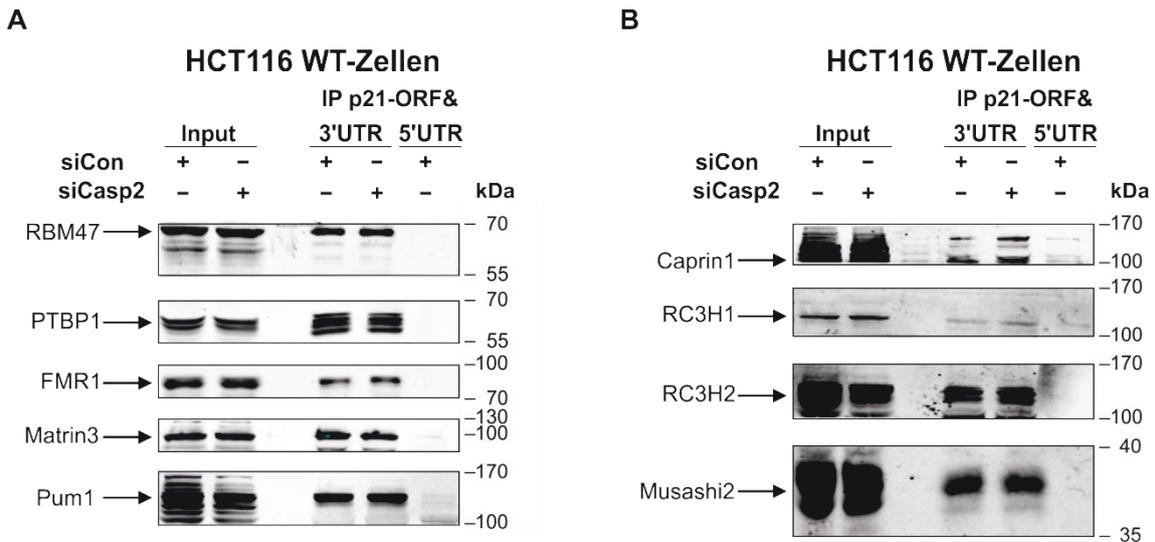


Abbildung 22: Identifizierung neuer p21-mRBPs.

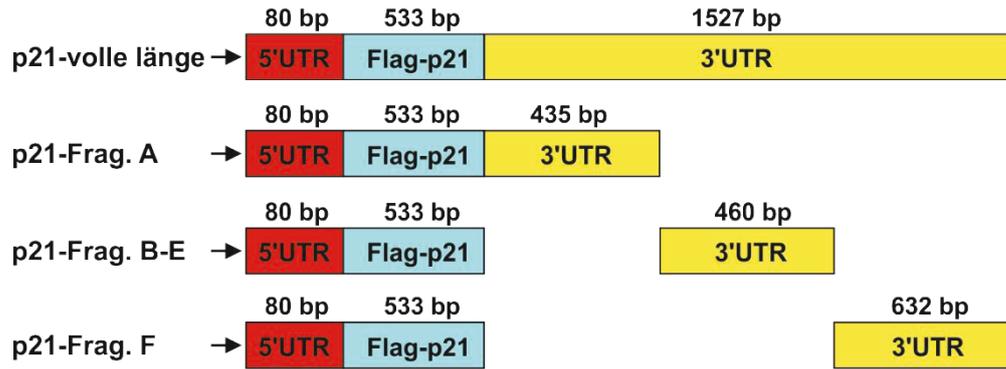
A) und **B)** Western Blot Analyse: Zytoplasmatische Extrakte von HCT116 WT-Zellen, die zuvor mit siCon oder siCasp2 transfiziert wurden, wurden zusammen mit BrU-markierter p21-3'UTR inkubiert und anschließenden mittels BrdU-Antikörpern präzipitiert. Die Bindung der angegebenen Proteine wurde überprüft.

Der Nachweis mittels MS-Analyse und insbesondere die Bestätigung der Bindung an die p21-3'UTR mittels Western Blot sind erste Hinweise darauf, dass die mRBPs RBM47, PTBP1, FMR1, Matrin-3, Pum-1, Caprin1, RC3H1, RC3H2 und Musashi-2 potenziell die p21-Expression beeinflussen können. Weitere funktionelle Analysen konzentrierten sich auf die mRBPs RBM47 und PTBP1, da diese in der MS-Analyse als p21-3'UTR-bindende Proteine stark angereichert waren (vgl. Tabelle 1).

Mit der bereits etablierten Methodik sollte im nächsten Schritt der Bereich innerhalb der p21-3'UTR, der von RBM47 und PTBP1 gebunden wird, weiter eingegrenzt werden. Dazu wurden p21-mRNA-IPs mit Fragmenten, die Teilbereiche der p21-3'UTR enthielten, durchgeführt und mit einer p21-mRNA-IP vergli-

chen, die die vollständige p21-3'UTR beinhaltete. Wie bei den vorherigen mRNA-IPs wurde hierfür zunächst die BrU-markierte mRNA der einzelnen Fragmente *in vitro* synthetisiert. Fragment A besteht aus der 80 bp langen 5'UTR, dem 533 bp langem p21-ORF und einem 435 bp langen ersten Abschnitt der p21-3'UTR (Abbildung 23 A). Wie bei Fragment A, sind auch bei Fragment B-E, die 5'UTR und der p21-ORF Teil des Konstruktes. Der 435 bp lange erste Abschnitt der p21-3'UTR fehlt bei Fragment B-E. Stattdessen ist der sich anschließende 436 bp lange Bereich Teil des Konstruktes. Das Fragment F beinhaltet neben der 5'UTR von p21 und dem p21-ORF einen distalen Bereich von bp 895 bis bp 1527 der p21-3'UTR (Abbildung 23 A). Für dieses Experiment wurden unbehandelte HCT116 WT-Zellen zunächst lysiert und die zytosolische Fraktion dieser Zellen extrahiert. Diese wurde für die folgenden mRNA-IPs verwendet. PTBP1 wurde nur bei dem Konstrukt mit der vollständigen p21-3'UTR nachgewiesen und scheint folglich die gesamte p21-3'UTR für die Bindung zu benötigen (Abbildung 23 B). RBM47 hingegen bindet zwar ebenfalls am stärksten an das vollständige p21-3'UTR Konstrukt, wurde aber darüber hinaus auch mit den Fragmenten A und F präzipitiert. Um die Spezifität der mRNA-IP zu überprüfen, wurde die Bindung der Proteine Aktin, AUF1, HuR und Nukleolin an die einzelnen Fragmente der p21-3'UTR untersucht. In Übereinstimmung mit Lal et al., 2004 binden AUF 1 und HUR im vorderen Bereich der p21-3'UTR. Eine schwache Bindung von HuR im Bereich von Fragment B-E ist ebenfalls zu erkennen (Abbildung 23 B). Im distalen Bereich der p21-3'UTR bindet ausschließlich Nukleolin, dessen Bindung an RNA wie bereits beschrieben sequenzunabhängig erfolgt. Aktin hingegen bindet weder die vollständige p21-3'UTR, noch eines der Fragmente (Abbildung 23 B), wodurch wiederum die Spezifität dieser Technik verifiziert werden konnte.

A



B

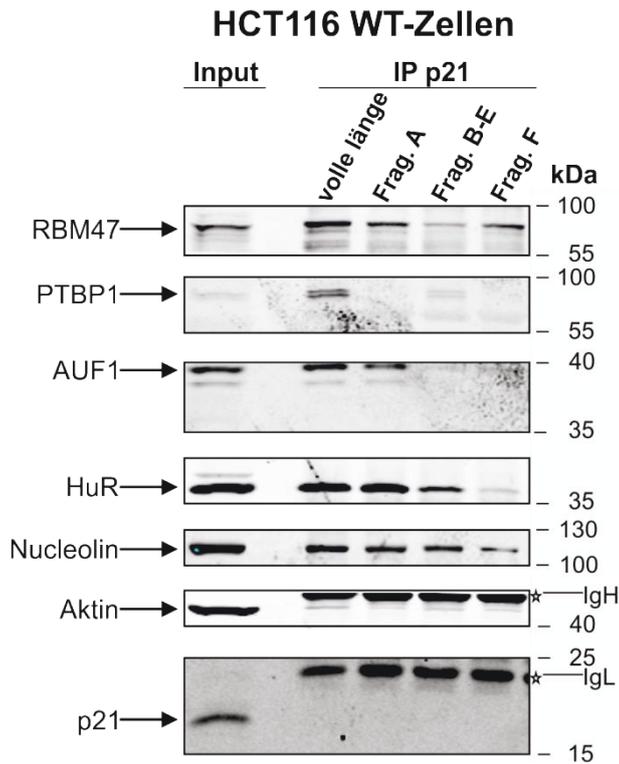


Abbildung 23: Lokalisierung der Bereiche der p21-3'UTR, die für eine Bindung von PTBP1 und RBM47 benötigt werden.

A) Schematische Darstellung der unterschiedlichen p21-mRNA-Konstrukte. Die Bereiche der p21-3'UTR, die die einzelnen Konstrukte beinhalten, können der schematischen Darstellung entnommen werden. **B)** Western Blot Analyse: Zytoplasmatische Extrakte von HCT116 WT-Zellen wurden zusammen mit den dargestellten BrU-markierten p21-mRNA-Konstrukten inkubiert und anschließend mittels BrdU-Antikörpern präzipitiert. Die Bindung der angebenen Proteine wurde im Anschluss überprüft. (IgH bzw. IgL: *immunoglobulin heavy chain/light chain*).

3.2.2 RBM47 und PTBP1 zwei Kandidaten für die Regulation der p21-Expression

Die spezifische Bindung von RBM47 und PTBP1 an die p21-3'UTR lässt vermuten, dass diese beiden mRBPs die endogene p21-Expression beeinflussen können. Um erste Erkenntnisse über die Regulation der beiden Proteine zu bekommen und um einen Zusammenhang zwischen p53-Expression und der Expression von PTBP1 bzw. RBM47 zu überprüfen, analysierten wir deren Expression in bestrahlten und unbestrahlten HCT116 WT bzw. p53^{-/-}-Zellen mittels Western Blot. Nach γ IR ist ein Anstieg von p21 und p53 bei den HCT116 WT-Zellen messbar. Auf die Expression von PTBP1 und RBM47 hat γ IR und der damit verbundene Anstieg der p53 Expression allerdings keinen Einfluss (Abbildung 24 A und B). In Übereinstimmung hiermit scheint auch die Abwesenheit von p53 die Expression beider RBPs nicht zu beeinflussen (Abbildung 24 A und B).

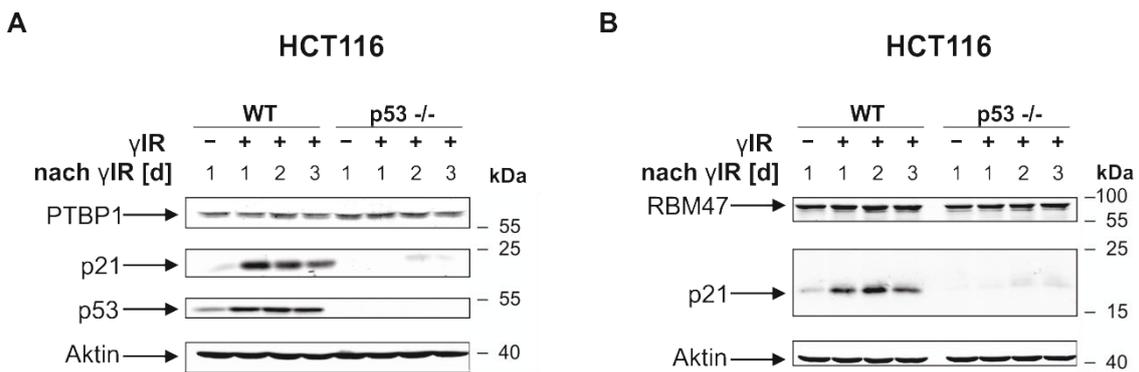


Abbildung 24: Die Expression von PTBP1 und RBM47 wird weder durch γ IR noch durch die An- bzw. Abwesenheit von p53 beeinflusst.

A) und **B)** Western Blot Analyse des Expressionsstatus der dargestellten Proteine aus Extrakten von unbestrahlten bzw. bestrahlten HCT116 WT-Zellen und HCT116 p53^{-/-}-Zellen. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (1 d, 2 d, 3 d) nach γ IR geerntet.

Der *knockdown* von PTBP1 mittels siRNA in HCT116 WT-Zellen führt zur Hemmung der bestrahlungsinduzierten p21-Expression ohne dabei die Expression von p53 zu beeinflussen (Abbildung 25 A). Da p21 die Zellen nach γ IR vor Apoptose schützt, war eine erhöhte Apoptoserate (DEVDase-Aktivität) bei den PTBP1 *knockdown*-Zellen zu erwarten, da diese wie im Western Blot zuvor gezeigt, eine verringerte p21-Expression aufweisen. In zwei unabhängigen Expe-

perimenten war allerdings nur eine minimale Erhöhung der DEVDase-Aktivität zwei Tage nach γ IR messbar (Abbildung 25 B).

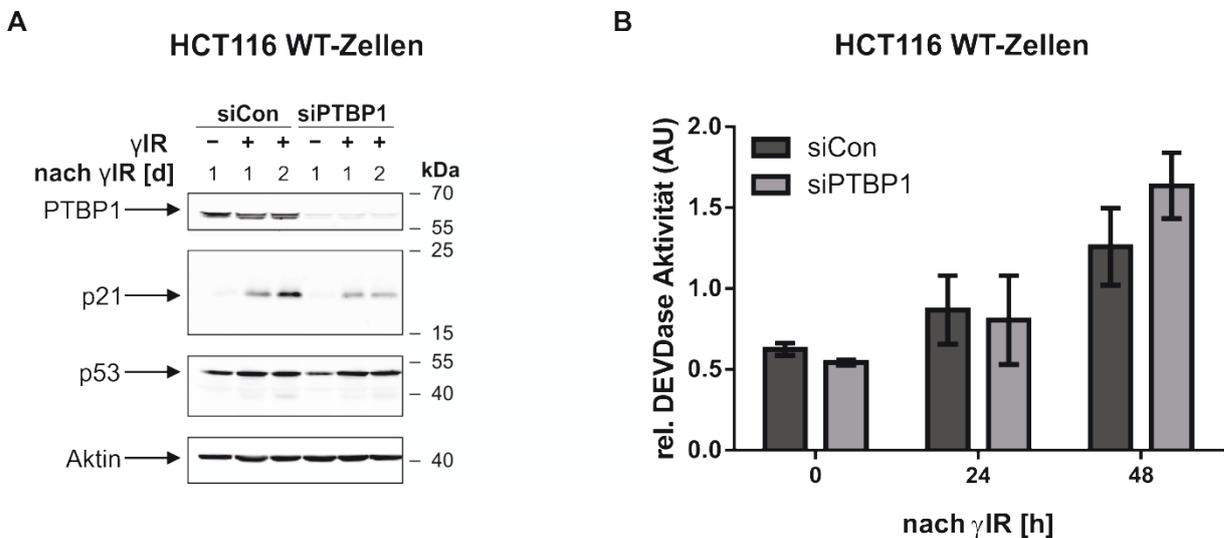


Abbildung 25: Nach *knockdown* von PTBP1 ist die Expression von p21 reduziert, die DEVDase-Aktivität wird aber nur geringfügig beeinflusst.

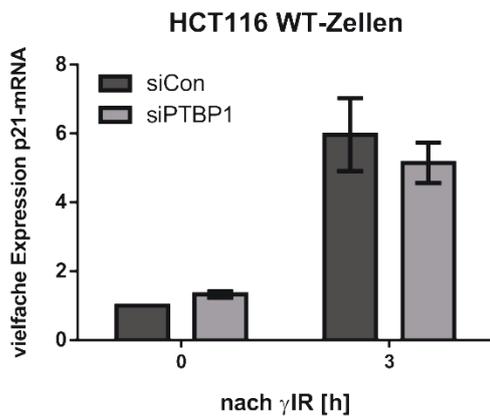
A) Western Blot Analyse des Expressionsstatus der dargestellten Proteine aus Extrakten von HCT116 WT-Zellen, die zuvor mit siCon oder siPTBP1 transfiziert wurden. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (1 d, 2 d) nach γ IR geerntet. **B)** Fluorometrischer Caspase-3-Substrattest mit Extrakten von HCT116 WT-Zellen, die zuvor entweder mit siCon oder siPTBP1 transfiziert wurden. Die Analyse erfolgte 24 h bzw. 48 h nach γ IR-Exposition. Die DEVDase-Aktivität wurde in AU gemessen. Die AUs entsprechen Mittelwerten von zwei unabhängigen Experimenten.

qPCR-Analysen sollten Aufschluss darüber geben, ob PTBP1 die p21-Expression auf transkriptioneller Ebene reguliert. Hierfür wurden HCT116 WT-Zellen zunächst mit siCon oder siPTBP1 transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit γ IR bestrahlt. Die mRNA wurde 3 h nach Bestrahlung isoliert und mittels qPCR analysiert. Die Abwesenheit von PTBP1 hat keinen Einfluss auf die Induktion der p21-Transkription nach γ IR (Abbildung 26 A)

Um zu überprüfen, ob die Stabilität der p21-mRNA durch die An- bzw. Abwesenheit von PTBP1 beeinflusst wird, wurden mRNA-Stabilitätsanalysen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 3 h nach γ IR mit Actinomycin D behandelt und die RNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert und mittels qPCR analysiert. Actinomycin D ist ein Zytostatikum, dass mit der DNA interkaliert und dadurch die RNA-Synthese effektiv hemmt. Die Stabilität der p21-mRNA wird

durch die An- bzw. Abwesenheit von PTBP1 nicht beeinflusst (Abbildung 26 B). Daher ist es unklar, in welcher Weise PTBP1 die p21-Expression reguliert.

A



B

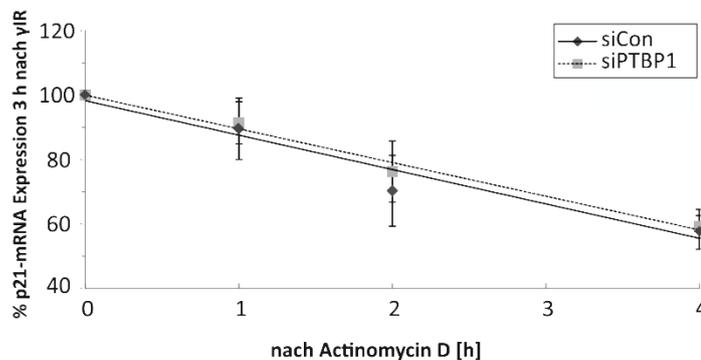


Abbildung 26: Die An- bzw. Abwesenheit von PTBP1 hat keinen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation und auf die Stabilität der p21-mRNA.

A) qPCR-Analyse zur quantitativen Bestimmung der p21-mRNA Expression in HCT116 WT-Zellen, die entweder mit siCon oder siPTBP1 transfiziert wurden. Die RNA wurde 0 h bzw. 3 h nach γ IR isoliert. Die Mittelwerte der vielfachen Expression der p21-mRNA wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. **B)** mRNA-Stabilitätsanalyse: Die Ansätze (vgl. A) wurden 3 h nach γ IR-Exposition mit Actinomycin D behandelt. Die RNA wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h) nach Actinomycin D Zugabe isoliert und analysiert. Die Mittelwerte der vielfachen Expression der p21-mRNA wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet.

Analog zu den Experimenten mit PTBP1 wurden HCT116 WT-Zellen mit RBM47 siRNA transfiziert um den Einfluss dieses RBPs auf die p21-Expression und die Apoptose in bestrahlten und unbestrahlten Zellen zu analysieren. In unbestrahlten Zellen, sowie zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach γ IR-Exposition führte der *knockdown* von RBM47 ähnlich wie der *knockdown* von PTBP1 zur Hemmung der p21-Expression (Abbildung 27 A). Im Gegensatz zum

PTBP1 *knockdown* aber ist in den RBM47-defizienten Zellen als Folge der verringerten p21-Expression 24 h und 48 h nach γ IR eine verstärkte Apoptoserate (DEVDase-Aktivität) messbar (Abbildung 27 B). Neben der p21-Expression, ist aber auch die p53-Expression in unbestrahlten und bestrahlten Zellen in Abwesenheit von RBM47 verringert (Abbildung 27 A).

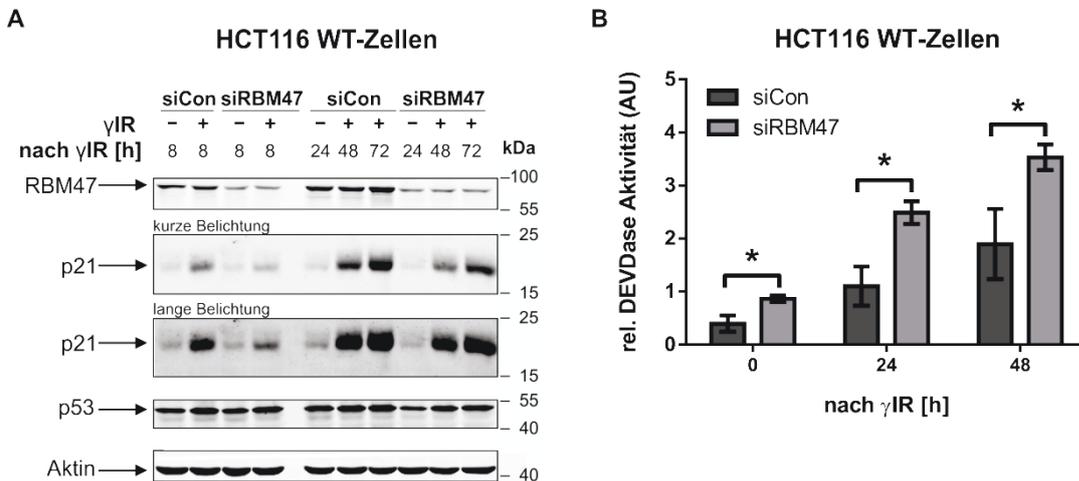


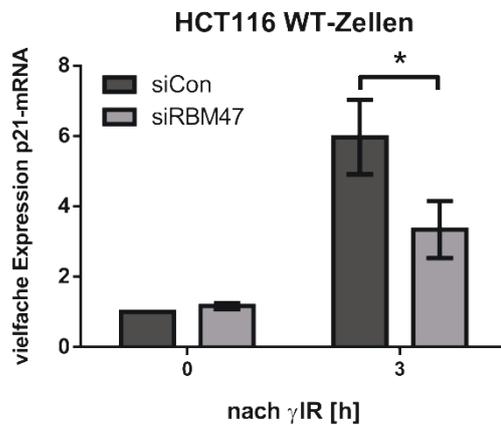
Abbildung 27: Der *knockdown* von RBM47 führt zur Reduktion der p21-Expression und zur Erhöhung der DEVDase-Aktivität in HCT116 WT-Zellen.

A) Western Blot Analyse des Expressionsstatus der dargestellten Proteine aus Extrakten von HCT116 WT-Zellen, die zuvor mit siCon oder siRBM47 transfiziert wurden. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (8 h, 24 h, 48 h, 72 h) nach γ IR geerntet. **B)** Fluorometrischer Caspase-3-Substrattest mit Extrakten von HCT116 WT-Zellen, die entweder mit siCon oder siRBM47 transfiziert wurden. Die Analyse erfolgte 24 h bzw. 48 h nach γ IR. Die Aktivität wurde in AU gemessen. Die AUs entsprechen Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten. Für die statistische Auswertung wurde der zweiseitige Student-t-Test angewendet (*, $p < 0,05$).

Als Folge der verringerten p53-Expression ist die bestrahlungsinduzierte p21-Transkription nach *knockdown* von RBM47 stark vermindert, wie mittels qPCR Analysen 3 h nach γ IR gezeigt werden konnte (Abbildung 28 A). Somit steuert RBM47 indirekt über die Regulation von p53 die transkriptionelle Regulation von p21. Unerwarteter Weise führt ein *knockdown* von RBM47 aber auch zu einer deutlichen Stabilisierung der p21-mRNA (Abbildung 28 B). Daher scheint die direkte Bindung von RBM47 an die p21-mRNA mit einer Destabilisierung der p21-mRNA zu korrelieren. RBM47 nimmt demnach eine duale Funktion ein, in dem es einerseits durch Modulation der p53-Expression die Transkription der

p21-mRNA fördert und andererseits diese durch die direkte Bindung wiederum destabilisiert.

A



B

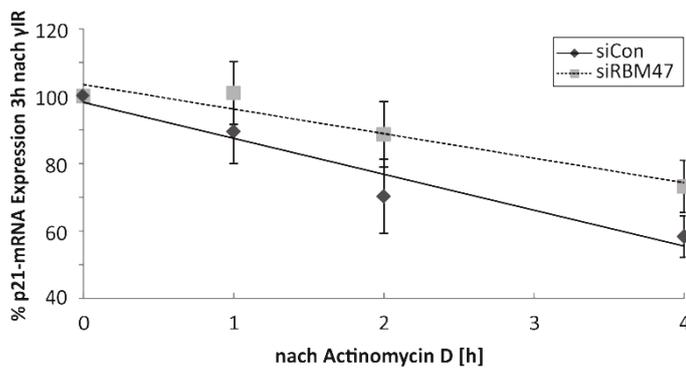


Abbildung 28: Der *knockdown* von RBM47 führt zur Reduktion der p21-Transkription bei gleichzeitiger Stabilisierung der p21-mRNA.

A) qPCR-Analyse zur Bestimmung der p21-mRNA Menge in HCT116 WT-Zellen, die entweder mit siCon oder siRBM47 transfiziert wurden. Die RNA wurde 0 h bzw. 3 h nach γ IR isoliert. Die Mittelwerte der vielfachen Expression der p21-mRNA wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet. Für die statistische Auswertung wurde der zweiseitige Student-t-Test angewendet (*, $p < 0,05$). **B)** mRNA-Stabilitätsanalyse: Die Ansätze (vgl. A) wurden 3 h nach γ IR mit Actinomycin D behandelt. Die RNA wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h) nach Actinomycin D Zugabe isoliert und analysiert. Die Mittelwerte der vielfachen Expression der p21-mRNA wurden aus drei unabhängigen Experimenten errechnet.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass es in der vorliegenden Arbeit gelungen ist zu zeigen, dass Caspase-2 die Regulation der p21-Expression nicht über direkte Bindung an die p21-mRNA ausübt. Obwohl vergleichende MS-Analysen mehrere p21-mRBPs wie z.B. Pum2, PTBP2 und Trim25 als mögliche Caspase-2 Interaktionspartner identifizierte, die in diesem Prozess eine Rolle

spielen könnten, konnte dies in weiteren Untersuchungen aber nicht bestätigt werden. Es ist aber gelungen, zahlreiche neue p21-mRBPs zu identifizieren (DDX41, PTBP1, RBM47), die nicht nur an die 3'UTR der p21-mRNA binden, sondern dadurch auch dessen Expression regulieren. Zusammen mit der Generierung zahlreicher Caspase-2 KO-Zelllinien, deren Nutzen aus Zeitgründen leider noch nicht in der vorliegenden Arbeit, aber sicherlich in zukünftigen Projekten herausgearbeitet werden wird, konnten hier neue Komponenten der p21-Regulation und deren Bedeutung in stressinduzierten Signalwegen identifiziert werden (Peters et. al., 2017; Radine et. al., 2020).

4 Diskussion

4.1 Die γ IR-induzierte p21-Expression ist in den Caspase-2 KO-Zelllinien verringert

Mit der Entdeckung und Nutzung von *zinc-finger nucleases* (ZFN) und *transcription activator-like effector nucleases* (TALEN) wurde die Gentechnik revolutioniert, da es erstmals möglich war das Genom zielgenau zu modifizieren bzw. editieren (*genome editing*) (Joung und Sander, 2013; Urnov et al., 2010). Dennoch sind diese Methoden (ZNF, TALEN) im Vergleich zur CRISPR/Cas9-Technik sehr aufwendig und kostenintensiv. Deshalb findet *genome editing* erst seit der Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systems breite Anwendung in der *in vitro*-, *in vivo*-, Grundlagen-, sowie der präklinischen Forschung (Chen et al., 2015; Cong et al., 2013; Lander, 2016). Auch in klinischen Studien kommt CRISPR-Cas9 bereits zum Einsatz und liefert in Verbindung mit CAR-T-Zellen vielversprechende Therapieoptionen für die zukünftige Krebsbehandlung (Cyanoski, 2016; Salas-McKee et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit wurden Caspase-2 KO-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9 generiert, indem ein Donorvektor in den Zielbereich (Intron 1) integriert wurde. Mittels genomischer PCR konnte die homozygote Integration (bzw. für Klon 32 die heterozygote Integration) des Donorvektors in den Zielbereich bestätigt werden (Abbildung 12 C). Sowohl die Transkription von Caspase-2, als auch die Proteinexpression von Caspase-2 ist bei den untersuchten Zelllinien vollständig, bzw. bei Klon 32 partiell, inhibiert wie durch qPCR- und Western Blot-Analysen eindeutig gezeigt werden konnte (Abbildung 12 A und D).

Die γ IR-induzierte p21-Expression ist bei den Klonen 15, 17, 19, 35, 49 und 53, genau wie bei HCT116 WT-Zellen die zuvor mit siCasp2 behandelt wurden, stark reduziert. Bei Klon 32 ist die Inhibition der p21-Proteinexpression auf Grund der noch vorhandenen reduzierten Caspase-2 Expression nur partiell zu beobachten. Bei Klon 37 hingegen ist keine Caspase-2 Expression auf transkriptioneller und auf Proteinebene messbar, dennoch ist die Induktion der p21-Expression nicht reduziert. Ursächlich hierfür könnten sogenannte *off-target*-Effekte (Zhang et al., 2015) sein. Diese *off-target*-Mutationen treten an den Stellen auf, an denen die gewählte Targetsequenz partielle Homologien aufweist.

Durch die hier gewählte Methodik, bei der die Integration innerhalb des Introns erfolgte, sollten die *off-targets* minimiert werden. Die verwendete gRNA war hoch spezifisch und dementsprechend waren *off-targets* laut CRISPR *designing tool* nur in sechs möglichen Exons mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit möglich (Abbildung 11 B). Sollte jedoch eines dieser Gene betroffen sein, könnte dies auch indirekt Einfluss auf die p21-Expression haben. Zwar ist für keines dieser möglichen *off-targets* bislang eine direkte Regulation von p21 beschrieben worden, allerdings sind zumindest bei drei dieser Proteine Dysregulationen in verschiedenen Tumoren bekannt. So korreliert bei hepatozellulären Karzinomen eine vermehrte ZNTB20 (*Zinc finger and BTB domain-containing 20*) Expression mit einer verringerten p21-Expression (Kan et al., 2016). Eine Überexpression von DDX27 (*DEAD-box helicase 27*) in gastrointestinalen Tumoren ist mit einer verstärkten Metastasierung und damit einhergehend mit einer schlechten Prognose assoziiert (Tang et al., 2018; Tsukamoto et al., 2015). Des Weiteren korreliert eine verringerte NFKBIA (*NFKB Inhibitor Alpha*)-Expression bei niedriggradigen Gliom-Patienten und Patienten mit einem Glioblastoma multiforme mit einer schlechten Prognose (Kinker et al., 2016; Zhao et al., 2014). Ein indirekter Einfluss der Proteine auf die p21-Expression scheint somit zumindest möglich. *Off-targets*, besonders für Klon 37, könnten in einem weiteren Schritt mit enzymatischen *missmatch*-Kits überprüft werden. Hierbei wird zunächst ein Bereich von 600-1000 bp im Bereich der möglichen Schnittstelle in WT-Zellen und dem entsprechenden Klon mittels PCR amplifiziert. Im Anschluss werden diese zusammengeführt, denaturiert und annealed. Sollten Mutationen entstanden sein, bilden sich Heteroduplex-Strukturen aus, die von Endonukleasen erkannt und geschnitten werden (Vouillot et al., 2015).

Diese Caspase-2 KO-Zelllinien sollten nicht nur wie schon erwähnt zur Verifizierung der p21-Regulation herangezogen werden, sondern auch für die p21-mRNA-IPs verwendet werden, um damit Kollaborationspartner zu identifizieren, die in der Caspase-2-abhängigen p21-Expression beteiligt sind.

Die Klonierung des Donorvektors, insbesondere das Einfügen der zusätzlichen Base hinter die SA-Sequenz, das notwendig war, um einen späteren *knockin* des Konstruktes *in frame* zu ermöglichen, nahm sehr viel Zeit in anspruch. Da dies bislang der erste *knockout* mittels CRISPR/Cas9 war der in der Arbeitsgruppe generiert wurde, mussten die notwendigen Arbeitsschritte nach dem

Protokoll von Ran et al., 2013 zunächst etabliert werden. Aus diesem Grund standen die Caspase-2 KO-Zelllinien erst zum Ende der Doktorarbeit zur Verfügung, sodass die geplanten Analysen nicht mehr durchgeführt werden konnten.

4.2 Caspase-2 reguliert die p21-Expression weder direkt durch Bindung der p21-3'UTR noch indirekt über die p21-mRBPs hnRNP-K, HuR, AUF1, Argonaut-2 und Trim25

Nach DNA-Schäden wird p21 für diverse Prozesse benötigt (Cazzalini et al., 2010; Karimian et al., 2016). Caspase-2 spielt bei dieser p21-Induktion eine wichtige Rolle. Wie schon zuvor gezeigt, beeinflusst Caspase-2 weder die Transkription von p21, noch wird der proteosomale Abbau von p21 durch Caspase-2 reguliert (Sohn et al., 2011). Bei einem *knockdown* von Caspase-2 in HCT116 WT-Zellen wurde ausschließlich die exogene Expression von FLAG-getaggten p21-Konstrukten, die die p21-3'UTR enthielten, beeinflusst. Daher scheint Caspase-2 p21 auf translationaler Ebene zu regulieren und hierfür die p21-3'UTR zu benötigen (Sohn et al., 2011). Diesbezüglich zeigten p21-mRNA-IPs und anschließende Western Blot- und MS-Analysen der präzipitierten Proteine, dass Caspase-2 dies nicht über direkte Bindung an die p21-mRNA vermittelt (Abbildung 15 C und Tabelle 1). Diese Beobachtung ist auch in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass Caspase-2 keine bekannten mRNA-bindenden Domänen besitzt. Dadurch wird eine Beteiligung von RBPs und/oder miRNAs, deren Expression oder Bindung an die p21-mRNA durch Caspase-2 reguliert werden, sehr wahrscheinlich. Potenzielle Kandidaten hierfür wären die p21-mRBPs hnRNP-K, Argonaut-2, HuR und AUF1, da deren Bindung an die p21-3'UTR bereits beschrieben wurde (Lal et al., 2004; Yano et al., 2005) und die auch im Rahmen dieser Arbeit durch MS-Analysen bestätigt wurden. Außerdem wurde hnRNP-K von der Arbeitsgruppe von Dr. C. Brancolini (Universität Udine, Italien) anhand eines *yeast-two-hybrid screens* als möglicher Interaktionspartner von Caspase-2 identifiziert (persönliche Mitteilung).

Darüber hinaus wurde erst kürzlich die Interaktion von Argonaut-2 und AUF1 beschrieben, bei der AUF1 den Abbau von bestimmten miRNAs verstärkt (Min

et al., 2017). Dabei bindet AUF1 häufig an die gleiche Stelle an der mRNA, wie bestimmte miRNAs, kann aber auch direkt Argonout-2 mit bestimmten miRNAs beladen oder den Abbau bestimmter miRNAs verstärken (Wu et al., 2013; Yoon et al., 2015).

Ebenso wie AUF1 war auch HuR ein Kandidat für die Caspase-2-abhängige p21-Regulation, denn neben der Bindung der 3'UTR der p21-mRNA, wurde bereits beschrieben, dass HuR Caspase-2 auf translationaler Ebene reguliert (Winkler et al., 2014). Dabei bindet HuR die IRES (*internal ribosomal entry site*) innerhalb der Caspase-2 5'UTR und inhibiert so deren Translation (Badawi et al., 2018). Der gleiche Mechanismus wurde bereits für die HuR-abhängige p27-Expression beschrieben (Kullmann et al., 2002). In Kolonkarzinom-Zellen führt die Inhibition von Caspase-2 durch HuR zu einer verstärkten Resistenz gegenüber den Chemotherapeutika Doxorubicin und Paclitaxel (Badawi et al., 2018; Eberhardt et al., 2019).

Auch das in dieser Arbeit zum ersten Mal als p21-mRBP identifizierte Trim25 reguliert die Caspase-2 Expression in Kolonkarzinom-Zellen auf translationaler Ebene durch Bindung der Caspase-2 5'UTR und trägt wie HuR zur Chemotherapie Resistenz bei (Nasrullah et al., 2019). Obwohl Trim25 keine der klassischen RBDs besitzt, wurde mehrfach beschrieben, dass es zur RNA-Stabilisierung und Prozessierung beiträgt (Heikel et al., 2016). Hierfür scheint die erst kürzlich beschriebene PRY/SPRY Domäne verantwortlich zu sein (Choudhury et al., 2017). Ursprünglich wurde Trim25 als E3 Ligase beschrieben, die im Interferon-Signalweg eine Rolle spielt und somit eine wichtige Funktion bei der antiviralen Zellantwort übernimmt (Heikel et al., 2016). Trim25 scheint aber auch besonders für die Tumorgenese und Metastasierung von Bedeutung zu sein. In vielen Tumoren liegt dementsprechend eine Trim25 Überexpression vor, die mit einer schlechten Prognose der Patienten korreliert (Hatakeyama, 2011). So zeigten auch in dieser Arbeit vergleichende MS-Analysen von p21-mRNA-IPs mit Caspase-2-profizienten und -defizienten Zell-extrakten, dass die Bindung von Trim25 an die p21-3'UTR signifikant verändert war (vgl. Tabelle 1). Anschließende Western Blot Analysen konnten allerdings weder eine Bindung von Trim25 an die p21-3'UTR bestätigen, noch war die Expression von p21 in An- bzw. Abwesenheit von Trim25 verändert. Somit konnte

Trim25 als möglicher Interaktionspartner für die Caspase-2-abhängige p21-Expression ausgeschlossen werden.

Ähnliche Resultate wurden auch zu den zuvor erwähnten RBPs hnRNP-K, Argonaut-2, HuR und AUF1 erzielt. So wurden weder deren Expression noch deren Bindung an die p21-mRNA durch Modulation der Caspase-2 Expression beeinträchtigt, weswegen neben Trim25 auch diese p21-mRBPs nicht an der Caspase-2-abhängigen p21-Expression involviert sind (Abbildung 17 B und Tabelle 1).

Im Rahmen der Arbeit wurden nur p21-mRBPs untersucht, die beim Vergleich der präzipitierten Proteinmengen zwischen 3'UTR und 5'UTR eine *t-test difference* von $>2,9$ aufwiesen und gleichzeitig signifikant unterschiedlich in An- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 präzipitiert wurden (vgl. Tabelle 1 und Anhang 2). Um eventuell doch noch in zukünftigen Analysen Interaktionspartner für die Caspase-2 abhängige p21-Regulation zu identifizieren, könnte der Kandidatenkreis auf Proteine mit geringeren Unterschieden ausgeweitet werden. Eine weitere Möglichkeit den Kandidatenkreis zu spezifizieren, wären Caspase-2 *pull-down-assays*. Durch einen Abgleich dieser Daten mit den aus der hier beschriebenen MS-Analyse, könnte eine Caspase-2-abhängige Bindung dieser Interaktionspartner an die p21-3'UTR abgeklärt werden.

Neben RBPs können natürlich auch miRNAs in der Caspase-2-abhängigen p21 Expression beteiligt sein. Die Untersuchung einzelner, mittels mRNA-IP kopräzipitierter miRNAs scheiterte jedoch an der Qualität der Proben. Zwar konnte die bereits bekannte Bindung von miR-106b und miR-17 an die p21-3'UTR (Ivanovska et al., 2008) mittels qPCR bestätigt werden, ob diese Regulation in Abhängigkeit von Caspase-2 erfolgt, konnte mit der verwendeten Methodik jedoch nicht überprüft werden. Gerade bei der Isolierung und Quantifizierung von miRNAs kann es zu großen Varianzen kommen, besonders bei der hier angewendeten Säulen-basierten Aufreinigung (Brown et al., 2018). Diese Varianzen können bei miRNA Expressions-Analysen von Zellen oder Gewebeschnitten durch die Verwendung von Referenz-miRNAs, wie z.B. RNU6B, miR-25-3p oder miR-93-5p ausgeglichen werden (Das et al., 2016; Gee et al., 2011; Torres et al., 2013). Diese eignen sich aber nicht als Referenzstandard für die Analyse von miRNAs die mittels mRNA-IP spezifisch mit der p21-mRNA kopräzipitiert wurden. Mit einer Optimierung der hier durchgeführten Methodik, könnte es

aber dennoch zukünftig möglich sein die Caspase-2-abhängige Bindung von miRNAs an die p21-3'UTR zu untersuchen. Unter anderem zeigen neuere Untersuchungen, dass sich durch Zugabe von Glykogen die Qualität der Aufreinigung bei dem hier verwendeten QIAGEN *miRNeasy kit* verbessern lässt (Duy et al., 2015).

4.3 Identifizierung von DDX41 als neuen Caspase-2-unabhängigen Regulator der p21-Expression

Neben hnRNP-K wurde auch DDX41 in der Arbeitsgruppe von Dr. C. Brancolini (Universität Udine, Italien) als möglicher Interaktionspartner von Caspase-2 mittels Y2H identifiziert. Zwar eignet sich diese Technik hervorragend um Protein-Proteininteraktionen in einem zellulären System mit *in vivo* ähnlichen Verhältnissen wie z.B. den entsprechenden eukaryotischen posttranslationalen Modifikation zu testen, dennoch ist das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen ein großes Problem (Deane et al., 2002). Ursächlich hierfür ist unter anderem, dass sich durch die Erzeugung von Fusionsproteinen die Bindungseigenschaften der ursprünglichen Proteine verändern können. Des Weiteren können mit dieser Methodik fälschlicherweise auch Proteine kolokalisiert werden, die unter physiologischen Bedingungen nicht gemeinsam in der Zelle vorliegen (Brückner et al., 2009). Dennoch war DDX41 ein interessanter Kandidat für die Caspase-2-abhängige p21-Regulation, auch wenn eine direkte Bindung von DDX41 an die p21-mRNA bislang noch nicht beschrieben wurde. DDX41 gehört zur Gruppe der DEAD-box Proteine, einer sehr heterogenen und diversen Gruppe von Proteinen, die an allen Aspekten des RNA-Metabolismus, wie Transkription, Splicing, RNA-Transport, mRNA *decay* oder auch der Ribosomen-Biogenese, beteiligt sind (Rocak und Linder, 2004). Der Name der DEAD-box Proteine leitet sich von der stark konservierten Aminosäuresequenz Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D) ab (Linder et al., 1989). Auch DDX41 scheint an diversen Prozessen beteiligt zu sein. Mutationsexperimente mit *abs* (*Abstrakt*), dem zu DDX41 homologen Protein in *Drosophila* zeigten, dass dieses für die Zellpolarität, Zellteilung und Apoptose essentiell ist (Irion et al., 2004; Irion und Leptin, 1999). Des Weiteren scheint DDX41, wie p21, eine Rolle als Tumorsuppressor einzunehmen.

Insbesondere bei Patienten mit hämatologischen Erkrankungen oder myelodysplastischen Syndromen (MDS), findet man vermehrt DDX41 Mutationen (Hosono, 2019; Lewinsohn et al., 2016). Zudem wirkt sich eine veränderte Expression von DDX41 in myeloischen Leukämie-Zelllinien auf die Proliferation und die Fähigkeit dieser Zellen Kolonien auszubilden aus (Polprasert et al., 2015). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten fluorometrischen DEVD-Substrattests zeigten, dass DDX41 Einfluss auf die Apoptose der HCT116 WT-Zellen ausübt. Der *knockdown* von DDX41 schützte HCT116 WT-Zellen vor der γ IR-induzierten Apoptose (Abbildung 19 A). Die Tatsache, dass die Abwesenheit von DDX41 in HCT116 p21^{-/-}- und HCT116 p53^{-/-}-Zelllinien, die nicht in der Lage sind p21 zu exprimieren, keinen Einfluss auf die DEVDase-Aktivität hat, war ein klarer Hinweis darauf, dass DDX41 dies über die Regulation der p21-Expression vermittelt (Abbildung 19 B).

Um zu überprüfen, ob DDX41 tatsächlich der Kofaktor für die Caspase-2 vermittelte p21-Regulation ist, wurden p21-mRNA-IPs in An- oder Abwesenheit von Caspase-2 durchgeführt. Hierbei konnte die spezifische Bindung von DDX41 an die p21-3'UTR erstmals mittels Western Blot- und MS-Analysen nachgewiesen werden (Abbildung 18 D und Tabelle 1). Zudem führt der *knockdown* von DDX41 nicht nur in unbestrahlten, sondern auch in bestrahlten HCT116 WT-Zellen zu einer verstärkten endogenen p21-Expression (Abbildung 18 C). Diese vermehrte p21-Expression erklärt die verringerte Apoptoserate dieser Zellen nach γ IR-Behandlung (Abbildung 19 A), da p21 nicht nur inhibierend auf den Zellzyklus einwirkt, sondern auch auf apoptotische Prozesse (Sohn et al., 2006). Allerdings erfolgt auch die Bindung von DDX41 an die p21-3'UTR und die hieraus resultierende Regulation der p21-Expression unabhängig von Caspase-2, da weder die Expression von DDX41 noch dessen Bindung an die p21-mRNA in An- bzw. Abwesenheit von Caspase-2 beeinflusst war (Abbildung 18 C und D). Anders als die beiden DEAD-box Proteine DDX3 und DDX5, die bereits als Regulatoren der p21-Transkription beschrieben wurden (Bates et al., 2005; Chao et al., 2006), hat DDX41 keinen Einfluss auf die p21-Transkription, wie ebenfalls in der vorliegenden Arbeit demonstriert wurde (Abbildung 19 C). Das Drosophila DDX41 Homolog *abs* reguliert die Expression von SNX2 (*Sorting Nexin-2*), einem Protein, das für den Proteintransport unter anderem im Golgi Netzwerk, den Endosomen und Lysosomen verantwortlich ist. Die mRNA-

Expression von SNX2 wird dabei von abs nicht beeinflusst (Abdul-Ghani et al., 2005). Des Weiteren reguliert abs die Expression von *Insc* (*Inscuteable*), einem Protein, das für die Zellpolarität und die Ausrichtung des Spindelapparates von Bedeutung ist, auf posttranskriptionaler Ebene (Irion et al., 2004). Auch wenn man berücksichtigen muss, dass sich homologe Proteine in ihrer Funktion in verschiedenen Spezies unterscheiden können, war dies neben der nachgewiesenen Bindung von DDX41 an die p21-3'UTR, ein weiterer Hinweis dafür, dass DDX41 p21 auf posttranskriptionaler Ebene regulieren könnte. Zudem konnte in weiterführenden Experimenten gezeigt werden, dass der *knockdown* bzw. die Überexpression von DDX41 ausschließlich die Expression von Flag-p21- oder Luciferase-Konstrukten, die die p21-3'UTR enthielten, beeinflusst (Peters et al., 2017).

Weder die p53-Proteinexpression, noch die p21-mRNA-Transkription wurde durch den *knockdown* von DDX41 verändert (Abbildung 18 C und Abbildung 19 C). Somit ist eine durch p53-vermittelte Induktion der p21-Transkription, nicht ursächlich für die hier beobachtete verstärkte p21-Proteinexpression nach DDX41 *knockdown*. Im Rahmen dieser Arbeit konnte DDX41 daher als neuer Regulator der p21-Expression identifiziert werden. Diese Regulation erfolgt jedoch unabhängig von Caspase-2 und scheint auf posttranskriptionaler Ebene stattzufinden.

4.4 Identifizierung der mRBPs RBM47 und PTBP1 als neue Regulatoren der p21-Expression

PTBP1, welches auch als hnRNP 1 bezeichnet wird, besitzt wie die anderen Mitglieder der hnRNP-Familie, eine RRM-Domäne (Ghetti et al., 1992; Singh et al., 1995). Eine Bindung an die p21-mRNA ist bislang noch nicht beschrieben worden, allerdings ist bekannt, dass PTBP1 Polypyrimidin-reiche Bereiche bindet und eine Schlüsselrolle bei der Regulation des alternativen Splicing einnimmt (Patton et al., 1991). Des Weiteren scheint neben der mRNA-Stabilisierung und des mRNA-Transports besonders die Initiation der Translation über IRES eine zentrale Funktion von PTBP1 zu sein (Romanelli et al., 2013). Während der Apoptose wird die Synthese der meisten Proteine inhibiert. IRES-vermittelt werden jedoch einige für die Apoptose benötigte Proteine in

Abhängigkeit von PTBP1 weiterhin translatiert und exprimiert (Bushell et al., 2006). Zudem steuert PTBP1 die Bindung des RISC-Komplexes, bestehend aus Argonout-2 und miR-101, an die MCL1 (*Myeloid cell leukemia 1*) –mRNA. Dadurch wird die Expression dieses anti-apoptotischen Proteins, das zur Familie der BCL-2 Proteine gehört, inhibiert (Cui und Placzek, 2018). Konträr hierzu konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass PTBP1 nicht nur die p21-3'UTR bindet, sondern auch für die Expression von p21, einem anti-apoptotischen Protein, benötigt wird (Abbildung 22 A und Abbildung 25 A). Da p21 die Zellen nach γ IR vor Apoptose schützt, wurde in den HCT116 WT-Zellen nach *knockdown* von PTBP1, bei denen die bestrahlungsinduzierte p21-Expression vermindert war, eine erhöhte Apoptoserate (DEVDase-Aktivität) erwartet (Jänicke et al., 2007). Dem war aber nicht so. Der Einfluss von PTBP1 auf die zuvor beschriebenen pro-apoptotischen Prozesse, könnte eine Erklärung dafür sein, dass trotz verminderter p21-Expression in den PTBP1-defizienten Zellen, keine erhöhte DEVDase-Aktivität messbar war (Abbildung 25 B).

Bislang gibt es keine Hinweise dafür, dass PTBP1 als Transkriptionsfaktor die Genexpression steuert. So wird auch die p21-Transkription, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, nicht durch die An- bzw. Abwesenheit von PTBP1 beeinflusst. Daher scheint PTBP1 die p21-Expression posttranskriptionell zu regulieren. Allerdings hatte ein *knockdown* von PTBP1 keinen Effekt auf die Stabilität der p21-mRNA. Hierfür kann es zahlreiche Ursachen geben. Zum einen könnte die Regulation der p21-Expression durch PTBP1 auf posttranslationaler Ebene erfolgen. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass PTBP1 die Speicherung der p21-mRNA in *processing bodies* (*P-bodies*) reguliert. In den *P-bodies* können mRNAs temporär gespeichert werden, um diese entweder zu degradieren oder zu einem späteren Zeitpunkt der Translation wieder zuzuführen (Aizer et al., 2014; Wang et al., 2018).

Der genaue Regulationsmechanismus der PTBP1-abhängigen p21-Expression konnte im Rahmen des Projektes nicht aufgeklärt werden. Da jedoch Dysregulationen von p21 und PTBP1 bei einigen Erkrankungen von klinischer Relevanz sind, könnte die Erforschung des zugrundeliegenden Regulationsmechanismus neue Therapiemöglichkeiten eröffnen. Erst vor kurzem wurde beschrieben, dass PTBP1 über die Modulation von *yin yang 2* (YY2), die Expression der Zell-

zyklusregulatoren p53, p21, Cdkn1c, und Cdkn2b beeinflusst und auf diese Weise die Proliferation vaskulärer Glattmuskelzellen steuert (Wang et al., 2019). Eine Dysregulation dieser Zellen führt zu Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose (Bennett et al., 2016). Die Tatsache, dass in zahlreichen Tumoren mit schlechter Prognose und Resistenz gegenüber Tumorthérapien sowohl die Expression von PTBP1, als auch die von p21 dysreguliert ist, könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass die p21-Expression von PTBP1 abhängig ist (Abukhdeir und Park, 2008; Cheung et al., 2009; He et al., 2014; Migaldi et al., 2000; Wang et al., 2017). Daher könnte PTBP1 ein aussichtsreiches Zielprotein für künftige Krebstherapien darstellen.

Auch die Dysregulation verschiedener RBM (*RNA-binding motif*)-Proteine korreliert mit Tumorgenese und mit Tumorprogression (Jung et al., 2020; Zhou et al., 2017). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass RBM47 eine wichtige Rolle für die Progression und Metastasierung von Tumoren spielt. So steht die Expression von RBM47 bei Patienten mit Lungenkarzinomen, Mamakarzinomen und Kolonkarzinomen im Zusammenhang mit einer verbesserten Prognose (Sakurai et al., 2016). In Drüsenzellen des Brustepithels, die eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen haben, wird die RBM47 Expression durch den transformierenden Wachstumsfaktor- β (*transforming growth factor* β , TGF- β) unterdrückt (Vanharanta et al., 2014). Auch in Lungenkarzinomzellen inhibiert TGF- β die Expression von RBM47. Dies führt zu einer verringerten Expression der beiden *nuclear factor erythroid related factor-2* (Nrf2)-Antagonisten KEAP1 und Cullin (Sakurai et al., 2016). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 wiederum spielt bei der Resistenz gegenüber oxidativen Stress und in Tumorthérapien eine wichtige Rolle (Singh et al., 2009; Wang et al., 2008).

Ursprünglich wurde RBM47, das zusammen mit SYNCRIP (alternativ auch als hnRNP-Q bezeichnet), hnRNP-R, DND1, A1CF (*APOBEC1 complementation factor*), und RBM46 zur paralogen Familie der hnRNP-R/Q-Proteine gehört, als bedeutendes Schlüsselprotein in der embryonalen Kopfentwicklung des Zebrafisch (*Danio rerio*) identifiziert (Guan et al., 2013). Die Abwesenheit von RBM47 führt in diesem Tiermodell zu Veränderungen des Wnt8a-Signalwegs und als Folge zu Zebrafisch-Phänotypen ohne Kopf oder mit stark verkleinertem Kopf. Auch bei der embryonalen Mausentwicklung spielt RBM47 eine wichtige Rolle. Die meisten RBM47 *knockout*-Embryonen sterben innerhalb der Schwanger-

schaftsmittle und die wenigen überlebenden Embryonen sind als adulte Mäuse deutlich kleiner als WT-Mäuse (Fossat et al., 2016). Insbesondere bei der prä-mRNA-Prozessierung scheint RBM47 eine wichtige Funktion zu übernehmen. So wurde bereits eine Beteiligung von RBM47 beim alternativen Splicing, aber auch als wichtiger Kofaktor bei der APOBEC1- vermittelten C-zu-U RNA-Editierung, beschrieben (Cieply et al., 2016; Fossat et al., 2014; Wolfe et al., 2019).

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten MS-Analyse war RBM47 das in den Präzipitaten der p21-3'UTR IP am stärksten angereicherte Protein (vgl. Tabelle 1). Die spezifische Bindung von RBM47 an die p21-3'UTR konnte ebenfalls mittels Western Blot-Analysen dieser IP Präzipitate bestätigt werden (Abbildung 22 A). Im Gegensatz dazu wurde die p21-mRNA in zwei Screenings mit Mamakarzinom- bzw. Lungenkarzinom-Zelllinien, bei denen IPs mit Flag-RBM47 Konstrukten durchgeführt und nach daran gebundenen mRNAs analysiert wurden, nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen detektiert (Rang 1363 von 2500 detektieren mRNAs) (Sakurai et al., 2016; Vanharanta et al., 2014). Für diese konträren Ergebnisse gibt es mehrere Erklärungen. Die Induktion von p21 erfolgt nach zellulärem Stress, wie z.B. nach DNA-Schäden. Die beiden Screenings hingegen wurden mit unbehandelten Zellen durchgeführt, sodass p21-mRNA vermutlich nur in sehr geringen Mengen in den für die IP verwendeten Zelllysaten vorlag. Im Gegensatz dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit IPs mit BrU-markierter p21-mRNA durchgeführt. Eine weitere Erklärung könnten die unterschiedlichen zellulären Systeme (BrM2-, A549-, HCT116-Zellen) mit möglicherweise unterschiedlichen mRNA-Profilen sein, die für die IPs verwendet wurden. So unterscheiden sich die mit Flag-RBM47 kopräzipitierten mRNAs der beiden Screenings deutlich (Sakurai et al., 2016; Vanharanta et al., 2014). Insgesamt scheint RBM47 ein breites mRNA-Spektrum zu binden. Vanharanta et al., 2014 konnten im Rahmen Ihres Screenings keine klare mRNA-Bindestellen-Sequenz für RBM47 definieren. Häufig erfolgte die Bindung von RBM47 aber innerhalb der 3'UTR der detektieren mRNAs (Vanharanta et al., 2014). Neben den mRNA-IPs mit der 5'UTR und p21-3'UTR wurden in der vorliegenden Arbeit auch IPs mit drei unterschiedlichen 3'UTR Fragmenten der p21-mRNA durchgeführt (Abbildung 23 B). Eine Bindung von RBM47 konnte dabei in zwei Fragmenten nachgewiesen werden (Fragment A und F), woraus sich die Schlußfol-

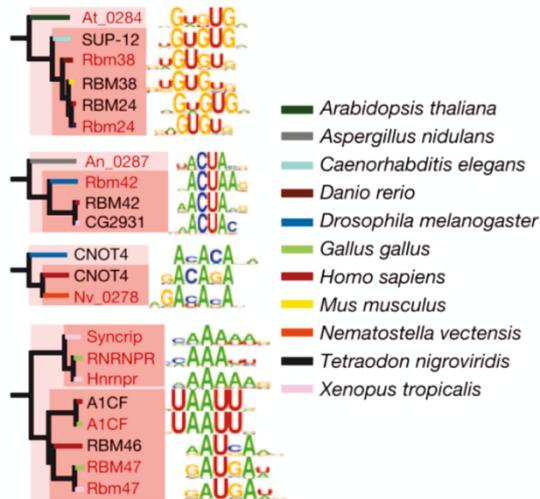
gerung ergibt, dass RBM47 an mehreren Stellen die p21-3'UTR bindet. Anders als Vanharanta et al., 2014 prognostizierten Ray et al., 2013 im Rahmen einer bioinformatischen und systemischen Analyse von RNA-Motiven eine mögliche RBM47-Bindestelle für das Bankivahuhn (*Gallus gallus*) und den westlichen Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*). Interessanterweise ist die hierbei prognostizierte wahrscheinlichste RBM47-Bindestelle GAUGA U bzw. A aber nicht Teil der humanen p21-3'UTR (vgl. Anhang 1 A und B). Zumindest Übereinstimmungen zu den letzten 5 Basen dieser prognostizierten Sequenz finden sich aber zweimal in Fragment A (AUGAA) und zweimal in Fragment F (AUGAU) (Anhang 1 B). Für Fragment B-E, bei dem nur eine äußerst schwache Bindung detektiert wurde, findet sich keine dieser Sequenzen (Abbildung 23 B und Anhang 1 B). Allerdings findet man auch für den p21-ORF, der wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte nicht von RBM47 gebunden wird, zweimal die Sequenz GAUGA, also ebenfalls eine Übereinstimmung mit 5 Basenpaaren der für Huhn und Frosch prognostizierten Sequenz. Um zu überprüfen, ob diese Sequenzbereiche entscheidend für eine RBM47 Bindung sind, könnten in einem nächsten Schritt Mutationen in diesem Bereich erzeugt werden und die mRNA-IPs mit den mutierten Konstrukten wiederholt werden. Darüber hinaus könnten auch weitere Konstrukte mit kleineren Fragmenten erstellt werden, um den Bereich, der für eine RBM47 Bindung notwendig ist, genauer einzugrenzen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von RBM47 weder durch γ IR, noch durch die Abwesenheit von p53 beeinflusst wird (Abbildung 24 B). Umgekehrt ist die p53-Expression, genauso wie die Expression von p21 in Abwesenheit von RBM47 vermindert (Abbildung 27 A). Weiterführende Experimente zeigten, dass RBM47 p53 auf transkriptioneller Ebene reguliert, da die p53-Transkription nach *knockdown* von RBM47 signifikant reduziert ist (Radine et al., 2020). Des Weiteren wird weder der proteasomale Abbau noch die Stabilität der p53-mRNA in An- bzw. Abwesenheit von RBM47 beeinträchtigt (Radine et al., 2020). Die reduzierte Expression von p53, der als Transkriptionsfaktor maßgeblich für die Induktion der p21-Expression verantwortlich ist, ist die Ursache für die beobachtete reduzierte p21-Expression in Abwesenheit von RBM47 (Abbildung 27 A). Aufgrund dieser verminderten p21-Expression war eine vermehrte Apoptoserate dieser Zellen nach γ IR mittels DEVDase-Assay messbar (Abbildung 27 B). Es wurde erwartet, dass die direkte Bindung von RBM47 an

die p21-3'UTR zu einer Stabilisierung dieser mRNA führt und somit den durch p53 vermittelten Effekt auf die p21-Expression weiter verstärkt. Mittels Stabilitäts-Assay konnte hingegen der gegenteilige Effekt demonstriert werden (Abbildung 28 B). Weiterführende Experimente zeigten, dass auch hierfür p53 benötigt wird, da in HCT116 p53^{-/-}-Zellen dieser Effekt nicht zu beobachten war (Radine et al., 2020). So scheint RBM47 eine besondere und wichtige Regulationsfunktion zu übernehmen, da es anscheinend das Zellschicksal in Richtung Seneszenz oder Apoptose lenken kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Bearbeitung dieses Projekts zwar nicht die gewünschte Identifizierung des Kofaktors ergab, über den Caspase-2 die Regulation der p21-Expression steuert, mit der erfolgreichen Generierung von verschiedenen Caspase-2 KO-Zelllinien sollte es aber möglich sein, dieses Ziel in zukünftigen Projekten zu erreichen. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit erstmalig zahlreiche RBPs identifiziert, die an die 3'UTR der p21-mRNA binden (Anhang 2). Drei von diesen neu identifizierten p21-mRBPs, nämlich DDX41, PTBP1 und RBM47 wurden dabei näher charakterisiert. Während DDX41 die p21-Expression auf translationaler Ebene inhibiert, wird diese durch PTBP1 posttranslational aktiviert. RBM47 hingegen reguliert p21 über einen dualen Mechanismus. So steuert RBM47 über die Induktion der p53-Transkription indirekt die Transkription von p21, während es durch direkte Bindung der 3'UTR die p21-mRNA destabilisiert.

5 Anhang

A



B

Sequenz 5'UTR-p21-3'UTR

5'UTR

CCGAAGTCAGTTCCTTGTGGAGCCGGAGCTGGGCGCGGATTGCGCGAGGCACCGAGGCACTCAGAGGAGGCGCC

ORF-p21

ATGGACTACAAGACGATGACGATAAAGCAAGAAGAGCATCTGTGCATATGTCAGAACCGGCTGGGGATGTCCGCTCA
GAACCCATGCGGCAGCAAGGCCCTGCCGCCCTCTTCGGCCAGTGGACAGCGAGCAGCTGAGCCGCGACTGTG
ATGCGCTAATGGCGGGCTGCATCCAGGAGGCCCGTGAAGGATGGAACCTCGACTTTGTCACCGAGACACCACTGGA
GGTGACTTCGCCTGGGAGCGTGTGCGGGGCCCTGGCCGACCAAGCTCTACCTTCCACGGGGCCCCGGCGAG
GCCGGGATGAGTTGGGAGGAGGCAGGCGGCCCTGGCACCTCACCTGCTCTGCTGCAGGGGACAGCAGAGGAAGAC
CATGTGGACCTGTCACTGTCTTGTACCCTTGTGCCCTCGCTCAGGGGAGCAGGCTGAAGGGTCCCCAGGTGGACCTG
GAGACTCTCAGGGTCAAAAACGGCGGCAGACCAGCATGACAGATTTCTACCACTCAAACGCCGGCTGATCTTCTC
CAAGAGGAAGCCC

3'UTR/ Fragment A

TAATCCGCGGACAGGAAGCCTGCAGTCTTGAAGCGCGAGGGCCTCAAAGGCCCGCTCTACATCTTCTGCCTTAGT
CTCAGTTTGTGTCTTAATTATTTTGTGTTTTAAATTTAAACACCTCCTCATGTACATACCCTGGCCGCCCCCTGCC
CCCAGCCTTGGCATTAGAATTATTTAAACAAAACTAGGCGGTTGAATGAGAGGTTCTAAGAGTGCTGGGCATTTTT
ATTTTTATGAAATACTATTTAAAGCCTCCTATCCCGTGTCTCCTTTTCTCTCTCCCGGAGGTTGGGTGGGCGGCTT
CATGCCAGCTACTTCTCCTCCCCACTTGTCCGCTGGGTGGTACCCTCTGGAGGGGTGTGGCTCCTTCCATCGT
GTCACAGGCGGTTATGAAATTCACCCCTTTCTGGACTCAGACCTG

3'UTR/ Fragment B-E

AATTCCTTTTTCATTTGAGAAGTAAACAGATGGCACTTTGAAGGGCCTCACCGAGTGGGGGCATCATCAAAAACCTTTG
GAGTCCCCTCACCTCCTAAGGTTGGGCAGGCTGACCCTGAAGTGAGCACAGCCTAGGGCTGAGCTGGGGACCT
GGTACCCTCCTGGCTCTTGATACCCCTCTGTCTTGTGAAGGCAGGGGGAAGGTGGGGTCTGGAGCAGACCAC
CCCGCCTGCCCTCATGGCCCTCTGACCTGCACTGGGGAGCCCGTCTCAGTGTGAGCCTTTTCCCTCTTTGGCTC
CCCTGTACCTTTTGGAGAGCCCCAGCTACCCTTCTCAGCTGGGCTCTGCAATTCCTCCTGCTGTCCCTC
CCCCTTGTCTTTCCCTTCACTACCCTCTCAGCTCAGGTGGCTCTGAGGTGCCGTGCCACCCCAACCCCACTG
CAATGG

3'UTR/ Fragment F

ACTGGAAGGGGAAGGGACACACAAGAAGAAGGGCACCTAGTTCTACCTCAGGCAGCTCAAGCAGCGACCGCCCC
CTCCTCTAGCTGTGGGGGTGAGGGTCCCATGTGGTGGCACAGGCCCTTGTAGTGGGGTATCTCTGTGTTAGGGG
TATATGATGGGGAGTAGATCTTTCTAGGAGGGAGACACTGGCCCTCAAATCGTCCAGCGACCTTCTCATCCACC
CCATCCCTCCCAGTTTCATTGCATTTGATTAGCAGCGGAACAAGGAGTCAAGACATTTAAGATGGTGGCAGTAGAGG
CTATGGACAGGGCATGCCACGTGGGCTCATATGGGGCTGGGAGTAGTTGTCTTTCTGGCACTAACGTTGAGCCCCT
GGAGGCACTGAAGTGCTTAGTGTACTTGGAGTATTGGGGTCTGACCCCAAACACCTTCCAGCTCCTGTAACATACTG
GCCTGGACTGTTTTCTCTCGGCTCCCCATGTGTCTGTTCCCGTTTTCTCCACCTAGACTGTAACCTCTCGAGGGC
AGGACCACACCTGTACTGTTCTGTGTCTTTCACAGCTCCTCCACAATGCTGAATATACAGCAGGTGCTCAATAAA
TGATCTTAGTGAC

Anhang 1: Putative RBM47-Bindestellen innerhalb der 5'UTR-p21-3'UTR.

A) Anhand der RNA-bindenden Motive prognostizierte Bindestellen der dargestellten Proteine für verschiedene Organismen (Abbildung verändert entnommen aus Ray et al., 2013). **B)** Übereinstimmungen von fünf bps der aus A zu entnehmenden putativen Bindesequenz für RBM47 innerhalb der humanen 5'UTR-p21-3'UTR sind rot markiert. Die Sequenz der p21-3'UTR wurde in die drei Fragmente A, B-E und F aufgeteilt.

Anhang 2: Mit der p21-3'UTR präzipitierte mRBPs sortiert nach *t-test difference*

t-test diff.	Protein names	Gene names	consensus RNA target
8,58	RNA-binding protein 47	RBM47	mRNA
8,49	Transmembrane Protein 130	TMEM130	
7,91	Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	p21-mRBP
7,83	Polypyrimidine tract-binding protein 3	PTBP3	mRNA
7,75	Pumilio homolog 2	PUM2	mRNA
7,47	F-box/WD repeat-containing protein 11	FBXW11	
7,42	SLAIN motif-containing protein 2	SLAIN2	
7,40	Far upstream element-binding protein 3	FUBP3	mRNA
7,36	Matrin-3	MATR3	mRNA
7,22	Neuronal pentraxin-2	NPTX2	
7,14	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	mRNA
7,13	ELAV-like protein 1	ELAVL1	p21-mRBP
6,42	RNA-binding protein 10	RBM10	mRNA
6,30	Tristetraprolin	ZFP36	p21-mRBP
6,27	rRNA-processing protein UTP23 homolog	UTP23	snoRNA
6,10	Splicing factor 3B subunit 4	SF3B4	mRNA
5,86	Tudor domain-containing protein 3	TDRD3	mRNA
5,85	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21	mRNA
5,81	Protein salvador homolog 1	SAV1	
5,74	RING finger protein 10	RNF10	
5,67	Serine/threonine-protein kinase MRCK alpha	CDC42BPA	
5,65	RNA-binding protein Musashi homolog 1	MSI1	p21-mRBP
5,58	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SNRPD3	snRNA
5,53	Pseudouridylate synthase 7 homolog	PUS7	rRNA
5,52	Proline/serine-rich coiled-coil protein 1	PSRC1	
5,50	RNA-binding protein Musashi homolog 2	MSI2	mRNA
5,48	EF-hand calcium-binding domain-containing protein 7	EFCAB7	
5,41	RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 2	RC3H2	mRNA
5,40	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein	SLC25A11	
5,38	Putative RNA-binding protein 15	RBM15	mRNA
5,31	Polypyrimidine tract-binding protein 1	PTBP1	mRNA
5,29	Pumilio homolog 1	PUM1	mRNA
5,25	Protein Smaug homolog 2	SAMD4B	mRNA

t-test diff.	Protein names	Gene names	consensus RNA target
5,21	Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2-like	SECISBP2L	mRNA
5,20	Nucleolysin TIAR	TIAL1	mRNA
5,17	SURP and G-patch domain-containing protein 2	SUGP2	mRNA
5,08	Fragile X mental retardation protein 1	FMR1	mRNA
5,06	Casein kinase I isoform delta	CSNK1D	
5,06	CLIP-associating protein 1	CLASP1	
5,05	Ribosomal RNA processing protein 36 homolog	RRP36	rRNA
5,01	G2 and S phase-expressed protein 1	GTSE1	
4,91	Polypyrimidine tract-binding protein 2	PTBP2	mRNA
4,88	Probable E3 ubiquitin-protein ligase Roquin	RC3H1	mRNA
4,82	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	FXR1	p21-mRBP
4,79	Nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	
4,78	E3 ubiquitin-protein ligase DZIP3	DZIP3	mRNA
4,77	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3C	APOBEC3C	
4,76	Sperm-associated antigen 5	SPAG5	
4,75	Transcription elongation factor B polypeptide 1	TCEB1	
4,74	Regulator of nonsense transcripts 2	UPF2	mRNA
4,68	Histone lysine demethylase PHF8	PHF8	
4,64	Nucleophosmin	NPM1	rRNA
4,60	Ankyrin repeat domain-containing protein 11	ANKRD11	
4,58	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17	mRNA
4,56	Pre-mRNA branch site protein p14	SF3B14	mRNA
4,55	SAFB-like transcription modulator	SLTM	mRNA
4,49	Putative RNA-binding protein 3	RBM3	mRNA
4,48	Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1	mRNA
4,48	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	p21-mRBP
4,47	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	BAIAP2	
4,45	DEP domain-containing protein 1B	DEPDC1B	
4,45	Protein FAM83F	FAM83F	
4,44	Bifunctional glutamate/proline--tRNA ligase	EPRS	tRNA
4,43	THAP domain-containing protein 11	THAP11	
4,43	Nucleolar protein of 40 kDa	ZCCHC17	unknown
4,43	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	mRNA
4,41	Kelch-like ECH-associated protein 1	KEAP1	
4,39	Protein virilizer homolog	KIAA1429	
4,38	UPF0468 protein C16orf80	C16orf80	
4,33	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	USP39	snRNA
4,31	Serine/threonine-protein kinase 3	STK3	
4,30	E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6	RBBP6	mRNA
4,30	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	MARK4	
4,28	E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1	RNF41	
4,28	Telomeric repeat-binding factor 2	TERF2	
4,23	DNA topoisomerase 3-beta-1;DNA topoisomerase	TOP3B	mRNA
4,20	Protein SCAF11	SCAF11	mRNA
4,17	RNA-binding protein PNO1	PNO1	rRNA

t-test diff.	Protein names	Gene names	consensus RNA target
4,17	Splicing Regulatory Glutamic Acid And Lysine Rich Protein 1	SREK1	mRNA
4,16	Cytoskeleton-associated protein 5	CKAP5	
4,13	Protein FAM83D	FAM83D	
4,04	WD repeat-containing protein 74	WDR74	
4,01	Zinc finger protein 408	ZNF408	
3,97	PHD and RING finger domain-containing protein 1	PHRF1	mRNA
3,96	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRPDL	
3,96	60S ribosomal protein L38	RPL38	ribosome
3,95	Chromobox protein homolog 6	CBX6	
3,92	Zinc finger protein 407	ZNF407	
3,89	Cyclin-dependent kinase 13	CDK13	
3,89	Lysine--tRNA ligase	KARS	tRNA
3,87	Transducin beta-like protein 3	TBL3	snoRNA
3,86	pre-rRNA processing protein FTSJ3	FTSJ3	rRNA
3,81	Protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	
3,80	CLIP-associating protein 2	CLASP2	
3,75	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 31	USP31	
3,74	Casein kinase I isoform alpha	CSNK1A1	
3,72	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	ARHGEF2	
3,70	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPD	p21-mRBP
3,64	Plakophilin-4	PKP4	
3,64	ATP-binding cassette sub-family F member 1	ABCF1	mRNA
3,63	Pre-mRNA-splicing regulator WTAP	WTAP	
3,62	U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	U2SURP	snRNA
3,60	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	DDX41	p21-mRBP
3,57	Zinc finger protein 638	ZNF638	mRNA
3,57	RNA-binding protein 25	RBM25	mRNA
3,53	Leukemia inhibitory factor receptor	LIFR	
3,41	Dystonin	DST	
3,40	Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1	CYFIP1	
3,39	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	mRNA
3,36	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	
3,36	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	FXR2	mRNA
3,34	PC4 and SFRS1-interacting protein	PSIP1	mRNA
3,34	Junctophilin-1	JPH1	
3,33	F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAPZA1	
3,22	2-5-oligoadenylate synthase-like protein	OASL	ncRNA
3,22	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit	U2AF2	mRNA
3,18	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase catalytic subunit TRMT61A	TRMT61A	tRNA
3,15	Dolichol-phosphate mannosyltransferase	DPM1	
3,12	Eukaryotic translation initiation factor 5B	EIF5B	tRNA
3,11	Nucleolar MIF4G domain-containing protein 1	NOM1	rRNA
3,10	Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	NUFIP2	mRNA
3,09	Proline-rich protein 11	PRR11	

t-test diff.	Protein names	Gene names	consensus RNA target
3,08	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	AIMP2	tRNA
2,99	Katanin p60 ATPase-containing subunit A1	KATNA1	
2,97	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3B	APOBEC3B	
2,96	Exosome component 10	EXOSC10	diverse
2,94	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25	TRIM25	mRNA
2,93	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	DDX23	snRNA
2,72	40S ribosomal protein S20	RPS20	ribosome
2,70	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX49	DDX49	rRNA
2,67	Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3	mRNA
2,63	Serine/arginine-rich splicing factor 11	SRSF11	mRNA
2,57	ESF1 homolog	ESF1	rRNA
2,44	DEP domain-containing protein 1A	DEPDC1	
2,39	Protein PRRC2A	PRRC2A	
2,35	Microtubule-associated protein 4	MAP4	
2,31	Caprin-1	CAPRIN1	mRNA
2,28	Splicing factor 3B subunit 2	SF3B2	mRNA
2,15	Ribosome-binding protein 1	RRBP1	mRNA
2,13	Helicase with zinc finger domain 2	HELZ2	mRNA
2,10	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	DDX20	snRNA
2,00	Receptor expression-enhancing protein 6	REEP6	
2,00	Nucleolar transcription factor 1	UBTF	rRNA
1,99	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0	mRNA
1,94	Protein PRRC2C	PRRC2C	
1,92	U3 small nucleolar RNA-interacting protein 2	RRP9	snoRNA
1,89	Translation machinery-associated protein 16	TMA16	
1,88	Probable helicase senataxin	SETX	mRNA
1,86	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	mRNA
1,85	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1	CPSF1	mRNA
1,77	Disks large homolog 5	DLG5	
1,73	Protein SOGA2	SOGA2	
1,71	Centrosomal protein of 170 kDa	CEP170	
1,71	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2	tRNA
1,66	Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	BMS1	rRNA
1,65	Putative uncharacterized protein C19orf73	C19orf73	
1,57	Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 2	MAST2	
1,57	Cytoskeleton-associated protein 2	CKAP2	
1,53	Ataxin-2-like protein	ATXN2L	mRNA
1,52	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	THRAP3	mRNA
1,48	Nuclear export mediator factor NEMF	NEMF	
1,42	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	mRNA
1,42	Serine/threonine-protein kinase MARK2	MARK2	
1,42	MAP7 domain-containing protein 3	MAP7D3	
1,41	Microtubule-associated tumor suppressor 1	MTUS1	
1,41	Enscosin	MAP7	

t-test diff.	Protein names	Gene names	consensus RNA target
1,40	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	EIF2B4	mRNA
1,31	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	HNRNPA3	mRNA
1,30	RNA 3-terminal phosphate cyclase-like protein	RCL1	rRNA
1,28	Pre-mRNA-processing factor 19	PRPF19	mRNA
1,27	Protein LYRIC	MTDH	
1,26	Replication factor C subunit 2	RFC2	
1,26	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	EIF2S1	tRNA
1,25	60S ribosomal protein L22-like 1	RPL22L1	ribosome
1,22	Telomerase-binding protein EST1A	SMG6	mRNA
1,21	Putative methyltransferase NSUN5	NSUN5	rRNA
1,20	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	DDX47	rRNA
1,20	Activator of basal transcription 1	ABT1	mRNA
1,20	Pre-mRNA 3-end-processing factor FIP1	FIP1L1	mRNA
1,19	Protein FRG1	FRG1	mRNA
1,16	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2	mRNA
1,15	RNA-binding protein 39	RBM39	mRNA
1,15	RNA-binding protein 27	RBM27	mRNA
1,12	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	SNRNP200	snRNA
1,09	Transcription elongation factor B polypeptide 3	TCEB3	
1,08	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	UTP18	snoRNA
1,08	PHD finger protein 6	PHF6	
1,07	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNPU	mRNA
1,07	Spindle and centriole-associated protein 1	SPICE1	
1,07	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRNPAB	mRNA
1,06	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	DDX10	rRNA
1,05	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	EIF2S2	tRNA
1,01	Holliday junction recognition protein	HJURP	
1,00	Mortality factor 4-like protein 2	MORF4L2	
1,00	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	SNRPD1	snRNA
0,99	Protein SOGA1;N-terminal form;C-terminal 80 kDa form	SOGA1	
0,98	Cell division cycle 5-like protein	CDC5L	mRNA
0,97	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM56	TRIM56	unknown
0,93	Microprocessor complex subunit DGCR8	DGCR8	ncRNA
0,91	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	MARK3	
0,89	Lysine-specific demethylase 2B	KDM2B	
0,87	Transcriptional repressor NF-X1	NFX1	mRNA
0,86	Replication factor C subunit 1	RFC1	
0,86	Replication factor C subunit 5	RFC5	
0,84	Replication factor C subunit 4	RFC4	
0,84	Protein FAM207A	FAM207A	
0,84	Cyclin-K	CCNK	
0,82	Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog	TSR1	rRNA
0,78	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	SYNCRIP	mRNA
0,77	MAP7 domain-containing protein 1	MAP7D1	
0,76	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	DKC1	snoRNA

t-test diff.	Protein names	Gene names	consensus RNA target
0,72	Polymerase I and transcript release factor	PTRF	rRNA
0,65	U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 1	SART1	snRNA
0,62	Regulator of nonsense transcripts 3B	UPF3B	mRNA
0,60	THAP domain-containing protein 4	THAP4	
0,59	Cyclin-dependent kinase 12	CDK12	
0,57	Pescadillo homolog	PES1	rRNA
0,57	Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	ncRNA
0,52	DDB1- and CUL4-associated factor 13	DCAF13	rRNA
0,45	DNA excision repair protein ERCC-6	ERCC6	
0,41	Transcription initiation factor IIE subunit beta	GTF2E2	
0,39	Protein ECT2	ECT2	
0,39	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	SKIV2L2	diverse
0,22	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein	TNRC6A	mRNA

6 Literaturverzeichnis

Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2012). RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol* 9, 799–808.

Abdul-Ghani, M., Hartman, K.L., and Ngsee, J.K. (2005). Abstrakt interacts with and regulates the expression of sorting nexin-2. *J. Cell. Physiol.* 204, 210–218.

Abukhdeir, A.M., and Park, B.H. (2008). P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med* 10, e19.

Aizer, A., Kalo, A., Kafri, P., Shraga, A., Ben-Yishay, R., Jacob, A., Kinor, N., and Shav-Tal, Y. (2014). Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage. *J. Cell. Sci.* 127, 4443–4456.

Aksenova, V.I., Bylino, O.V., Zhivotovsky, B.D., and Lavrik, I.N. (2013). Caspase-2: What do we know today? *Mol Biol* 47, 165–180.

Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell* 87, 171.

Ando, K., Kernan, J.L., Liu, P.H., Sanda, T., Logette, E., Tschopp, J., Look, A.T., Wang, J., Bouchier-Hayes, L., and Sidi, S. (2012). PIDD death-domain phosphorylation by ATM controls prodeath versus prosurvival PIDDosome signaling. *Mol. Cell* 47, 681–693.

Badawi, A., Biyanee, A., Nasrullah, U., Winslow, S., Schmid, T., Pfeilschifter, J., and Eberhardt, W. (2018). Inhibition of IRES-dependent translation of caspase-2 by HuR confers chemotherapeutic drug resistance in colon carcinoma cells. *Oncotarget* 9, 18367–18385.

Baliga, B.C., Colussi, P.A., Read, S.H., Dias, M.M., Jans, D.A., and Kumar, S. (2003). Role of prodomain in importin-mediated nuclear localization and activation of caspase-2. *J. Biol. Chem.* 278, 4899–4905.

Baliga, B.C., Read, S.H., and Kumar, S. (2004). The biochemical mechanism of caspase-2 activation. *Cell Death Differ.* 11, 1234–1241.

Banerjee, S., and Barraud, P. (2014). Functions of double-stranded RNA-binding domains in nucleocytoplasmic transport. *RNA Biol* 11, 1226–1232.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 12, 461–468.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.

- Bates, G.J., Nicol, S.M., Wilson, B.J., Jacobs, A.-M.F., Bourdon, J.-C., Wardrop, J., Gregory, D.J., Lane, D.P., Perkins, N.D., and Fuller-Pace, F.V. (2005). The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *EMBO J.* *24*, 543–553.
- Battelli, C., Nikopoulos, G.N., Mitchell, J.G., and Verdi, J.M. (2006). The RNA-binding protein Musashi-1 regulates neural development through the translational repression of p21WAF-1. *Mol. Cell. Neurosci.* *31*, 85–96.
- Bennett, M.R., Sinha, S., and Owens, G.K. (2016). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res* *118*, 692–702.
- Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* *14*, 159–169.
- Bonzon, C., Bouchier-Hayes, L., Pagliari, L.J., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2006). Caspase-2-induced Apoptosis Requires Bid Cleavage: A Physiological Role for Bid in Heat Shock-induced Death. *Mol Biol Cell* *17*, 2150–2157.
- Borgdorff, V., Lleonart, M.E., Bishop, C.L., Fessart, D., Bergin, A.H., Overhoff, M.G., and Beach, D.H. (2010). Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene* *29*, 2262–2271.
- Bouchier-Hayes, L., Oberst, A., McStay, G.P., Connell, S., Tait, S.W.G., Dillon, C.P., Flanagan, J.M., Beere, H.M., and Green, D.R. (2009). Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity. *Mol. Cell* *35*, 830–840.
- Brown, R.A.M., Epis, M.R., Horsham, J.L., Kabir, T.D., Richardson, K.L., and Leedman, P.J. (2018). Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal. *BMC Biotechnol.* *18*, 16.
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., and Schlattner, U. (2009). Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. *Int J Mol Sci* *10*, 2763–2788.
- Bushell, M., Stoneley, M., Kong, Y.W., Hamilton, T.L., Spriggs, K.A., Dobbyn, H.C., Qin, X., Sarnow, P., and Willis, A.E. (2006). Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated gene expression during apoptosis. *Mol. Cell* *23*, 401–412.
- Calabretta, S., and Richard, S. (2015). Emerging Roles of Disordered Sequences in RNA-Binding Proteins. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 662–672.
- Cazzalini, O., Scovassi, A.I., Savio, M., Stivala, L.A., and Prosperi, E. (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat. Res.* *704*, 12–20.
- Chai, Y.L., Cui, J., Shao, N., Shyam, E., Reddy, P., and Rao, V.N. (1999). The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene* *18*, 263–268.

- Chao, C.-H., Chen, C.-M., Cheng, P.-L., Shih, J.-W., Tsou, A.-P., and Lee, Y.-H.W. (2006). DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor. *Cancer Res.* *66*, 6579–6588.
- Chaudhury, A., Chander, P., and Howe, P.H. (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multi-functional regulatory roles. *RNA* *16*, 1449–1462.
- Chen, S., Sanjana, N.E., Zheng, K., Shalem, O., Lee, K., Shi, X., Scott, D.A., Song, J., Pan, J.Q., Weissleder, R., et al. (2015). Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. *Cell* *160*, 1246–1260.
- Chène, P. (2003). Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 102–109.
- Cheung, H.C., Hai, T., Zhu, W., Baggerly, K.A., Tsavachidis, S., Krahe, R., and Cote, G.J. (2009). Splicing factors PTBP1 and PTBP2 promote proliferation and migration of glioma cell lines. *Brain* *132*, 2277–2288.
- Cheung, H.H., Lynn Kelly, N., Liston, P., and Korneluk, R.G. (2006). Involvement of caspase-2 and caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: a role for the IAPs. *Exp. Cell Res.* *312*, 2347–2357.
- Cho, S.J., Zhang, J., and Chen, X. (2010). RNPC1 modulates the RNA-binding activity of, and cooperates with, HuR to regulate p21 mRNA stability. *Nucleic Acids Res* *38*, 2256–2267.
- Choudhury, N.R., Heikel, G., Trubitsyna, M., Kubik, P., Nowak, J.S., Webb, S., Granneman, S., Spanos, C., Rappsilber, J., Castello, A., et al. (2017). RNA-binding activity of TRIM25 is mediated by its PRY/SPRY domain and is required for ubiquitination. *BMC Biol.* *15*, 105.
- Cieply, B., Park, J.W., Nakauka-Ddamba, A., Bebee, T.W., Guo, Y., Shang, X., Lengner, C.J., Xing, Y., and Carstens, R.P. (2016). Multiphasic and Dynamic Changes in Alternative Splicing during Induction of Pluripotency Are Coordinated by Numerous RNA-Binding Proteins. *Cell Rep* *15*, 247–255.
- Colussi, P.A., Harvey, N.L., and Kumar, S. (1998). Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J. Biol. Chem.* *273*, 24535–24542.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* *339*, 819–823.
- Coqueret, O., Bérubé, G., and Nepveu, A. (1998). The mammalian Cut homeo-domain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase. *EMBO J* *17*, 4680–4694.

- Creagh, E.M. (2014). Caspase crosstalk: integration of apoptotic and innate immune signalling pathways. *Trends in Immunology* 35, 631–640.
- Cui, J., and Placzek, W.J. (2018). PTBP1 enhances miR-101-guided AGO2 targeting to MCL1 and promotes miR-101-induced apoptosis. *Cell Death Dis* 9, 552.
- Cyranoski, D. (2016). CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature* 539, 479.
- Dahmer, M.K. (2005). Caspases-2, -3, and -7 are involved in thapsigargin-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 80, 576–583.
- Das, M.K., Andreassen, R., Haugen, T.B., and Furu, K. (2016). Identification of Endogenous Controls for Use in miRNA Quantification in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Genomics Proteomics* 13, 63–68.
- Deane, C.M., Salwiński, Ł., Xenarios, I., and Eisenberg, D. (2002). Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations. *Mol. Cell Proteomics* 1, 349–356.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817–825.
- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., and Declercq, W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol* 180, 451–458.
- Dirsch, V.M., Kirschke, S.O., Estermeier, M., Steffan, B., and Vollmar, A.M. (2004). Apoptosis signaling triggered by the marine alkaloid ascididemin is routed via caspase-2 and JNK to mitochondria. *Oncogene* 23, 1586–1593.
- Dorstyn, L., Puccini, J., Wilson, C.H., Shalini, S., Nicola, M., Moore, S., and Kumar, S. (2012). Caspase-2 deficiency promotes aberrant DNA-damage response and genetic instability. *Cell Death Differ.* 19, 1288–1298.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N., and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 195–205.
- Droin, N., Bichat, F., Rébé, C., Wotawa, A., Sordet, O., Hammann, A., Bertrand, R., and Solary, E. (2001). Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells. *Blood* 97, 1835–1844.
- Duy, J., Koehler, J.W., Honko, A.N., and Minogue, T.D. (2015). Optimized microRNA purification from TRIzol-treated plasma. *BMC Genomics* 16, 95.
- Eberhardt, W., Nasrullah, U., and Haeussler, K. (2019). Inhibition of Caspase-2 Translation by the mRNA Binding Protein HuR: A Novel Path of Therapy Resistance in Colon Carcinoma Cells? *Cells* 8.

- Estrov, Z., Thall, P.F., Talpaz, M., Estey, E.H., Kantarjian, H.M., Andreeff, M., Harris, D., Van, Q., Walterscheid, M., and Kornblau, S.M. (1998). Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 92, 3090–3097.
- Faderl, S., Thall, P.F., Kantarjian, H.M., Talpaz, M., Harris, D., Van, Q., Beran, M., Kornblau, S.M., Pierce, S., and Estrov, Z. (1999). Caspase 2 and caspase 3 as predictors of complete remission and survival in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 5, 4041–4047.
- Fiandalo, M.V., and Kyprianou, N. (2012). Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Experimental Oncology* 34, 165–175.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102–114.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
- Fontana, L., Fiori, M.E., Albin, S., Cifaldi, L., Giovinazzi, S., Forloni, M., Boldrini, R., Donfrancesco, A., Federici, V., Giacomini, P., et al. (2008). Antagomir-17-5p Abolishes the Growth of Therapy-Resistant Neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One* 3.
- Fossat, N., Tourle, K., Radziewicz, T., Barratt, K., Liebhold, D., Studdert, J.B., Power, M., Jones, V., Loebel, D.A.F., and Tam, P.P.L. (2014). C to U RNA editing mediated by APOBEC1 requires RNA-binding protein RBM47. *EMBO Rep.* 15, 903–910.
- Fossat, N., Radziewicz, T., Jones, V., Tourle, K., and Tam, P.P.L. (2016). Conditional restoration and inactivation of Rbm47 reveal its tissue-context requirement for viability and growth. *Genesis* 54, 115–122.
- Frisch, S.M. (2008). Caspase-8: Fly or Die. *Cancer Research* 68, 4491–4493.
- Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201–232.
- Fukuda, T., Naiki, T., Saito, M., and Irie, K. (2009). hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions. *Genes Cells* 14, 113–128.
- Gartel, A.L., and Radhakrishnan, S.K. (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res.* 65, 3980–3985.
- Gartel, A.L., and Tyner, A.L. (1999). Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp. Cell Res.* 246, 280–289.
- Gartel, A.L., Goufman, E., Najmabadi, F., and Tyner, A.L. (2000). Sp1 and Sp3 activate p21 (WAF1/CIP1) gene transcription in the Caco-2 colon adenocarcinoma cell line. *Oncogene* 19, 5182–5188.

Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4510–4515.

Gartel, A.L., Radhakrishnan, S.K., Serfas, M.S., Kwon, Y.H., and Tyner, A.L. (2004). A novel p21WAF1/CIP1 transcript is highly dependent on p53 for its basal expression in mouse tissues. *Oncogene* *23*, 8154–8157.

Gee, H.E., Buffa, F.M., Camps, C., Ramachandran, A., Leek, R., Taylor, M., Patil, M., Sheldon, H., Betts, G., Homer, J., et al. (2011). The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br. J. Cancer* *104*, 1168–1177.

Georgakilas, A.G., Martin, O.A., and Bonner, W.M. (2017). p21: A Two-Faced Genome Guardian. *Trends Mol Med* *23*, 310–319.

Gerstberger, S., Hafner, M., and Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 829–845.

Ghetti, A., Piñol-Roma, S., Michael, W.M., Morandi, C., and Dreyfuss, G. (1992). hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic Acids Res* *20*, 3671–3678.

Guan, R., El-Rass, S., Spillane, D., Lam, S., Wang, Y., Wu, J., Chen, Z., Wang, A., Jia, Z., Keating, A., et al. (2013). rbm47, a novel RNA binding protein, regulates zebrafish head development. *Dev. Dyn.* *242*, 1395–1404.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.

Harms, K., Nozell, S., and Chen, X. (2004). The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 822–842.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* *75*, 805–816.

Harris, A.W., Pinkert, C.A., Crawford, M., Langdon, W.Y., Brinster, R.L., and Adams, J.M. (1988). The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J. Exp. Med.* *167*, 353–371.

Hatakeyama, S. (2011). TRIM proteins and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 792–804.

He, X., Arslan, A.D., Ho, T.-T., Yuan, C., Stampfer, M.R., and Beck, W.T. (2014). Involvement of polypyrimidine tract-binding protein (PTBP1) in maintaining breast cancer cell growth and malignant properties. *Oncogenesis* *3*, e84.

Heikel, G., Choudhury, N.R., and Michlewski, G. (2016). The role of Trim25 in development, disease and RNA metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 1045–1050.

- Hilbert, M., Karow, A.R., and Klostermeier, D. (2009). The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins. *Biol. Chem.* 390, 1237–1250.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824–1827.
- Ho, L.H., Taylor, R., Dorstyn, L., Cakouros, D., Bouillet, P., and Kumar, S. (2009). A tumor suppressor function for caspase-2. *PNAS* 106, 5336–5341.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKolver, R.C., Katibah, G.E., Amora, R., Boydston, E.A., Zeitler, B., et al. (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 27, 851–857.
- Holleman, A., den Boer, M.L., Kazemier, K.M., Beverloo, H.B., von Bergh, A.R.M., Janka-Schaub, G.E., and Pieters, R. (2005). Decreased PARP and procaspase-2 protein levels are associated with cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 106, 1817–1823.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53.
- Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327, 167–170.
- Hosono, N. (2019). Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. *Int. J. Clin. Oncol.* 24, 885–892.
- Iakova, P., Wang, G.-L., Timchenko, L., Michalak, M., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R., and Timchenko, N.A. (2004). Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *EMBO J.* 23, 406–417.
- Irion, U., and Leptin, M. (1999). Developmental and cell biological functions of the *Drosophila* DEAD-box protein *abstrakt*. *Curr. Biol.* 9, 1373–1381.
- Irion, U., Leptin, M., Siller, K., Fuerstenberg, S., Cai, Y., Doe, C.Q., Chia, W., and Yang, X. (2004). *Abstrakt*, a DEAD box protein, regulates *Insc* levels and asymmetric division of neural and mesodermal progenitors. *Curr. Biol.* 14, 138–144.
- Ivanovska, I., Ball, A.S., Diaz, R.L., Magnus, J.F., Kibukawa, M., Schelter, J.M., Kobayashi, S.V., Lim, L., Burchard, J., Jackson, A.L., et al. (2008). MicroRNAs in the miR-106b Family Regulate p21/CDKN1A and Promote Cell Cycle Progression. *Molecular and Cellular Biology* 28, 2167–2174.
- Jänicke, R.U., Sohn, D., Essmann, F., and Schulze-Osthoff, K. (2007). The multiple battles fought by anti-apoptotic p21. *Cell Cycle* 6, 407–413.
- Jankowsky, E., and Harris, M.E. (2015). Specificity and non-specificity in RNA-protein interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16, 533–544.

- Järvelin, A.I., Noerenberg, M., Davis, I., and Castello, A. (2016). The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Commun Signal* 14.
- Joseph, B., Orlian, M., and Furneaux, H. (1998). p21(waf1) mRNA contains a conserved element in its 3'-untranslated region that is bound by the Elav-like mRNA-stabilizing proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 20511–20516.
- Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 49–55.
- Jung, J.H., Lee, H., Cao, B., Liao, P., Zeng, S.X., and Lu, H. (2020). RNA-binding motif protein 10 induces apoptosis and suppresses proliferation by activating p53. *Oncogene* 39, 1031–1040.
- Jung, Y.-S., Qian, Y., and Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell. Signal.* 22, 1003–1012.
- Kan, H., Huang, Y., Li, X., Liu, D., Chen, J., and Shu, M. (2016). Zinc finger protein ZBTB20 is an independent prognostic marker and promotes tumor growth of human hepatocellular carcinoma by repressing FoxO1. *Oncotarget* 7, 14336–14349.
- Kao, P.N., Chen, L., Brock, G., Ng, J., Kenny, J., Smith, A.J., and Corthésy, B. (1994). Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90. *J. Biol. Chem.* 269, 20691–20699.
- Karimian, A., Ahmadi, Y., and Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair (Amst.)* 42, 63–71.
- Kenan, D.J., Query, C.C., and Keene, J.D. (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends in Biochemical Sciences* 16, 214–220.
- Kim, Y.-K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* 26, 775–783.
- Kim, K., Lee, Y.S., and Carthew, R.W. (2007). Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *RNA* 13, 22–29.
- Kim, M.S., Kim, H.S., Jeong, E.G., Soung, Y.H., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2011). Somatic mutations of caspase-2 gene in gastric and colorectal cancers. *Pathol. Res. Pract.* 207, 640–644.
- Kinker, G.S., Thomas, A.M., Carvalho, V.J., Lima, F.P., and Fujita, A. (2016). Deletion and low expression of NFKB1A are associated with poor prognosis in lower-grade glioma patients. *Sci Rep* 6, 24160.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Kramer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.

- Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., et al. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* **37**, 495–500.
- Krumschnabel, G., Sohm, B., Bock, F., Manzl, C., and Villunger, A. (2009). The enigma of caspase-2: the laymen's view. *Cell Death Differ.* **16**, 195–207.
- Kullmann, M., Göpfert, U., Siewe, B., and Hengst, L. (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev.* **16**, 3087–3099.
- Kumar, S., Tomooka, Y., and Noda, M. (1992). Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 1155–1161.
- Kumar, S., White, D.L., Takai, S., Turczynowicz, S., Juttner, C.A., and Hughes, T.P. (1995). Apoptosis regulatory gene NEDD2 maps to human chromosome segment 7q34-35, a region frequently affected in haematological neoplasms. *Hum. Genet.* **95**, 641–644.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J* **23**, 3092–3102.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Berghe, T.V., and Vandenberghe, P. (2006). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death And Differentiation* **14**, 44.
- Lander, E.S. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell* **164**, 18–28.
- Lavrik, I.N., Golks, A., Baumann, S., and Krammer, P.H. (2006). Caspase-2 is activated at the CD95 death-inducing signaling complex in the course of CD95-induced apoptosis. *Blood* **108**, 559–565.
- Lewinsohn, M., Brown, A.L., Weinel, L.M., Phung, C., Rafidi, G., Lee, M.K., Schreiber, A.W., Feng, J., Babic, M., Chong, C.-E., et al. (2016). Novel germ line DDX41 mutations define families with a lower age of MDS/AML onset and lymphoid malignancies. *Blood* **127**, 1017–1023.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20.
- Li, J., and Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* **27**, 6194–6206.
- Li, M.Z., and Elledge, S.J. (2007). Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature Methods* **4**, 251–256.
- Li, G., Luna, C., Qiu, J., Epstein, D.L., and Gonzalez, P. (2009). Alterations in microRNA Expression in Stress-induced Cellular Senescence. *Mech Ageing Dev* **130**, 731–741.

- Linder, P., and Jankowsky, E. (2011). From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 505–516.
- Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P.P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature* *337*, 121–122.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* *86*, 147–157.
- Liu, Z., Chen, O., Wall, J.B.J., Zheng, M., Zhou, Y., Wang, L., Vaseghi, H.R., Qian, L., and Liu, J. (2017). Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Scientific Reports* *7*, 2193.
- Loflin, P., Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (1999). Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev* *13*, 1884–1897.
- Lund, E., and Dahlberg, J.E. (2006). Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *71*, 59–66.
- Lunde, B.M., Moore, C., and Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 479–490.
- Ma, W.J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A., and Furneaux, H. (1996). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J. Biol. Chem.* *271*, 8144–8151.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* *15*, 122.
- Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F.H.-T. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J.* *272*, 2118–2131.
- Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation* *14*, 10–22.
- Masliah, G., Barraud, P., and Allain, F.H.-T. (2013). RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 1875–1895.
- McIlwain, D.R., Berger, T., and Mak, T.W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *5*, a008656.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* *431*, 343–349.

- Migaldi, M., Sgambato, A., Garagnani, L., Ardito, R., Ferrari, P., De Gaetani, C., Cittadini, A., and Trentini, G.P. (2000). Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. *Clin. Cancer Res.* *6*, 3131–3138.
- Min, K.-W., Jo, M.H., Shin, S., Davila, S., Zealy, R.W., Kang, S.I., Lloyd, L.T., Hohng, S., and Yoon, J.-H. (2017). AUF1 facilitates microRNA-mediated gene silencing. *Nucleic Acids Res.* *45*, 6064–6073.
- Mitchell, S.F., and Parker, R. (2014). Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Mol. Cell* *54*, 547–558.
- Moumen, A., Masterson, P., O'Connor, M.J., and Jackson, S.P. (2005). hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell* *123*, 1065–1078.
- Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* *7*, 683–694.
- Nasrullah, U., Haeussler, K., Biyanee, A., Wittig, I., Pfeilschifter, J., and Eberhardt, W. (2019). Identification of TRIM25 as a Negative Regulator of Caspase-2 Expression Reveals a Novel Target for Sensitizing Colon Carcinoma Cells to Intrinsic Apoptosis. *Cells* *8*.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M., and Smith, J.R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* *211*, 90–98.
- Nozell, S., and Chen, X. (2002). p21B, a variant of p21(Waf1/Cip1), is induced by the p53 family. *Oncogene* *21*, 1285–1294.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* *9*.
- Oliver, T.G., Meylan, E., Chang, G.P., Xue, W., Burke, J.R., Humpton, T.J., Hubbard, D., Bhutkar, A., and Jacks, T. (2011). Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop. *Mol. Cell* *43*, 57–71.
- Pagliari, L.J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D.D., Tu, S., Beere, H.M., and Green, D.R. (2005). The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 17975–17980.
- Park, S.-Y., Lee, J.H., Ha, M., Nam, J.-W., and Kim, V.N. (2009). miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 23–29.
- Paroni, G., Henderson, C., Schneider, C., and Brancolini, C. (2001). Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3. *J. Biol. Chem.* *276*, 21907–21915.

- Patton, J.G., Mayer, S.A., Tempst, P., and Nadal-Ginard, B. (1991). Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes Dev.* 5, 1237–1251.
- Peters, D., Radine, C., Reese, A., Budach, W., Sohn, D., and Jänicke, R.U. (2017). The DEAD-box RNA helicase DDX41 is a novel repressor of p21WAF1/CIP1 mRNA translation. *J. Biol. Chem.* 292, 8331–8341.
- Petrocca, F., Vecchione, A., and Croce, C.M. (2008). Emerging role of miR-106b-25/miR-17-92 clusters in the control of transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res.* 68, 8191–8194.
- Polprasert, C., Schulze, I., Sekeres, M.A., Makishima, H., Przychodzen, B., Hosono, N., Singh, J., Padgett, R.A., Gu, X., Phillips, J.G., et al. (2015). Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell* 27, 658–670.
- Pop, C., and Salvesen, G.S. (2009). Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 21777–21781.
- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., and Salvesen, G.S. (2006). The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol. Cell* 22, 269–275.
- Prabhu, S., Ignatova, A., Park, S.T., and Sun, X.H. (1997). Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5888–5896.
- Puccini, J., Dorstyn, L., and Kumar, S. (2013). Caspase-2 as a tumour suppressor. *Cell Death Differ.* 20, 1133–1139.
- Putnam, A.A., and Jankowsky, E. (2013). DEAD-box helicases as integrators of RNA, nucleotide and protein binding. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 884–893.
- Radhakrishnan, S.K., Gierut, J., and Gartel, A.L. (2006). Multiple alternate p21 transcripts are regulated by p53 in human cells. *Oncogene* 25, 1812–1815.
- Radine, C., Peters, D., Reese, A., Neuwahl, J., Budach, W., Jänicke, R.U., and Sohn, D. (2020). The RNA-binding protein RBM47 is a novel regulator of cell fate decisions by transcriptionally controlling the p53-p21-axis. *Cell Death Differ.* 27, 1274–1285.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8, 2281–2308.
- Ray, D., Kazan, H., Cook, K.B., Weirauch, M.T., Najafabadi, H.S., Li, X., Gueroussov, S., Albu, M., Zheng, H., Yang, A., et al. (2013). A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature* 499, 172–177.
- Ren, K., Lu, J., Porollo, A., and Du, C. (2012). Tumor-suppressing function of caspase-2 requires catalytic site Cys-320 and site Ser-139 in mice. *J. Biol. Chem.* 287, 14792–14802.

- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 402–412.
- Rocak, S., and Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 232–241.
- Romanelli, M.G., Diani, E., and Lievens, P.M.-J. (2013). New Insights into Functional Roles of the Polypyrimidine Tract-Binding Protein. *Int J Mol Sci* *14*, 22906–22932.
- Roussel, M.F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* *18*, 5311–5317.
- Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., and Enright, A.J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 17719–17724.
- Sakurai, T., Isogaya, K., Sakai, S., Morikawa, M., Morishita, Y., Ehata, S., Miyazono, K., and Koinuma, D. (2016). RNA-binding motif protein 47 inhibits Nrf2 activity to suppress tumor growth in lung adenocarcinoma. *Oncogene* *35*, 5000–5009.
- Salas-Mckee, J., Kong, W., Gladney, W.L., Jadowsky, J.K., Plesa, G., Davis, M.M., and Fraietta, J.A. (2019). CRISPR/Cas9-based genome editing in the era of CAR T cell immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* *15*, 1126–1132.
- Saleh, M., Vaillancourt, J.P., Graham, R.K., Huyck, M., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Steinberg, M.H., Nolan, V., Baldwin, C.T., Hotchkiss, R.S., et al. (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* *429*, 75–79.
- Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 10964–10967.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* *9*, 1149–1163.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* *13*, 1501–1512.
- Shin, S., Lee, Y., Kim, W., Ko, H., Choi, H., and Kim, K. (2005). Caspase-2 primes cancer cells for TRAIL-mediated apoptosis by processing procaspase-8. *EMBO J.* *24*, 3532–3542.
- Shu, L., Yan, W., and Chen, X. (2006). RNPC1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, is required for maintaining the stability of the basal and stress-induced p21 transcript. *Genes Dev.* *20*, 2961–2972.
- Singh, A., Ling, G., Suhasini, A.N., Zhang, P., Yamamoto, M., Navas-Acien, A., Cosgrove, G., Tudor, R.M., Kensler, T.W., Watson, W.H., et al. (2009). Nrf2-dependent sulfiredoxin-1 expression protects against cigarette smoke-induced oxidative stress in lungs. *Free Radic. Biol. Med.* *46*, 376–386.

- Singh, R., Valcárcel, J., and Green, M.R. (1995). Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science* 268, 1173–1176.
- Slee, E.A., Adrain, C., and Martin, S.J. (1999). Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6, 1067–1074.
- Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., and Jänicke, R.U. (2006). p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res.* 66, 11254–11262.
- Sohn, D., Budach, W., and Jänicke, R.U. (2011). Caspase-2 is required for DNA damage-induced expression of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1. *Cell Death Differ* 18, 1664–1674.
- Sohn, D., Peters, D., Piekorz, R.P., Budach, W., and Jänicke, R.U. (2016). miR-30e controls DNA damage-induced stress responses by modulating expression of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 and caspase-3. *Oncotarget* 7, 15915–15929.
- Tang, J., Chen, H., Wong, C.-C., Liu, D., Li, T., Wang, X., Ji, J., Sung, J.J., Fang, J.-Y., and Yu, J. (2018). DEAD-box helicase 27 promotes colorectal cancer growth and metastasis and predicts poor survival in CRC patients. *Oncogene* 37, 3006–3021.
- Tang, L., Shen, H., Li, X., Li, Z., Liu, Z., Xu, J., Ma, S., Zhao, X., Bai, X., Li, M., et al. (2016). MiR-125a-5p decreases after long non-coding RNA HOTAIR knockdown to promote cancer cell apoptosis by releasing caspase 2. *Cell Death Dis* 7, e2137.
- Torres, A., Torres, K., Wdowiak, P., Paszkowski, T., and Maciejewski, R. (2013). Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecol. Oncol.* 130, 588–594.
- Tsukamoto, Y., Fumoto, S., Noguchi, T., Yanagihara, K., Hirashita, Y., Nakada, C., Hijiya, N., Uchida, T., Matsuura, K., Hamanaka, R., et al. (2015). Expression of DDX27 contributes to colony-forming ability of gastric cancer cells and correlates with poor prognosis in gastric cancer. *Am J Cancer Res* 5, 2998–3014.
- Tu, S., McStay, G.P., Boucher, L.-M., Mak, T., Beere, H.M., and Green, D.R. (2006). In situ trapping of activated initiator caspases reveals a role for caspase-2 in heat shock-induced apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 8, 72–77.
- Upton, J.-P., Austgen, K., Nishino, M., Coakley, K.M., Hagen, A., Han, D., Papa, F.R., and Oakes, S.A. (2008). Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3943–3951.
- Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S., and Gregory, P.D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 11, 636–646.

- Valverde, R., Edwards, L., and Regan, L. (2008). Structure and function of KH domains. *FEBS J.* *275*, 2712–2726.
- Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W., and Vandenaabeele, P. (1999). The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ.* *6*, 1117–1124.
- Vanharanta, S., Marney, C.B., Shu, W., Valiente, M., Zou, Y., Mele, A., Darnell, R.B., and Massagué, J. (2014). Loss of the multifunctional RNA-binding protein RBM47 as a source of selectable metastatic traits in breast cancer. *Elife* *3*.
- Vouillot, L., Thélie, A., and Pollet, N. (2015). Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda)* *5*, 407–415.
- Wachmann, K., Pop, C., van Raam, B.J., Drag, M., Mace, P.D., Snipas, S.J., Zmasek, C., Schwarzenbacher, R., Salvesen, G.S., and Riedl, S.J. (2010). Activation and Specificity of human Caspase-10. *Biochemistry* *49*, 8307–8315.
- Waggoner, S.A., Johannes, G.J., and Lieber, S.A. (2009). Depletion of the poly(C)-binding proteins alphaCP1 and alphaCP2 from K562 cells leads to p53-independent induction of cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKN1A) and G1 arrest. *J. Biol. Chem.* *284*, 9039–9049.
- Wang, C., Schmich, F., Srivatsa, S., Weidner, J., Beerenwinkel, N., and Spang, A. (2018). Context-dependent deposition and regulation of mRNAs in P-bodies. *Elife* *7*.
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., and Yuan, J. (1994). Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* *78*, 739–750.
- Wang, X., Zamore, P.D., and Hall, T.M. (2001). Crystal structure of a Pumilio homology domain. *Mol. Cell* *7*, 855–865.
- Wang, X., McLachlan, J., Zamore, P.D., and Hall, T.M.T. (2002). Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain. *Cell* *110*, 501–512.
- Wang, X.-J., Sun, Z., Villeneuve, N.F., Zhang, S., Zhao, F., Li, Y., Chen, W., Yi, X., Zheng, W., Wondrak, G.T., et al. (2008). Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* *29*, 1235–1243.
- Wang, Z., Gan, X., Qiu, C., Yang, D., Sun, X., and Zeng, Z. (2019). Role of polypyrimidine tract-binding protein 1/yin yang 2 signaling in regulating vascular smooth muscle cell proliferation and neointima hyperplasia. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *383*, 114747.
- Wang, Z.-N., Liu, D., Yin, B., Ju, W.-Y., Qiu, H.-Z., Xiao, Y., Chen, Y.-J., Peng, X.-Z., and Lu, C.-M. (2017). High expression of PTBP1 promote invasion of colorectal cancer by alternative splicing of cortactin. *Oncotarget* *8*, 36185–36202.

- Whibley, C., Pharoah, P.D.P., and Hollstein, M. (2009). p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat. Rev. Cancer* 9, 95–107.
- White, E.J.F., Matsangos, A.E., and Wilson, G.M. (2017). AUF1 regulation of coding and noncoding RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315, 856–859.
- Wilson, R.C., and Doudna, J.A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu Rev Biophys* 42, 217–239.
- Winkler, C., Doller, A., Imre, G., Badawi, A., Schmid, T., Schulz, S., Steinmeyer, N., Pfeilschifter, J., Rajalingam, K., and Eberhardt, W. (2014). 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* 5, e1321.
- Wolfe, A.D., Arnold, D.B., and Chen, X.S. (2019). Comparison of RNA Editing Activity of APOBEC1-A1CF and APOBEC1-RBM47 Complexes Reconstituted in HEK293T Cells. *J. Mol. Biol.* 431, 1506–1517.
- Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M.J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., and Larsson, L.-G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* 22, 351–360.
- Wu, S., Huang, S., Ding, J., Zhao, Y., Liang, L., Liu, T., Zhan, R., and He, X. (2010). Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. *Oncogene* 29, 2302–2308.
- Wu, X., Chesoni, S., Rondeau, G., Tempesta, C., Patel, R., Charles, S., Dagnawala, N., Zucconi, B.E., Kishor, A., Xu, G., et al. (2013). Combinatorial mRNA binding by AUF1 and Argonaute 2 controls decay of selected target mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 41, 2644–2658.
- Wulf, G.M., Liou, Y.-C., Ryo, A., Lee, S.W., and Lu, K.P. (2002). Role of Pin1 in the regulation of p53 stability and p21 transactivation, and cell cycle checkpoints in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 277, 47976–47979.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701–704.
- Yano, M., Okano, H.J., and Okano, H. (2005). Involvement of Hu and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in neuronal differentiation through p21 mRNA post-transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 280, 12690–12699.
- Yoon, J.-H., Jo, M.H., White, E.J.F., De, S., Hafner, M., Zucconi, B.E., Abdelmohsen, K., Martindale, J.L., Yang, X., Wood, W.H., et al. (2015). AUF1 promotes let-7b loading on Argonaute 2. *Genes Dev.* 29, 1599–1604.

- Yu, J., and Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene 27 Suppl 1*, S71-83.
- Zhang, J.-H., Adikaram, P., Pandey, M., Genis, A., and Simonds, W.F. (2016). Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. *Bioengineered 7*, 166–174.
- Zhang, X.-H., Tee, L.Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S., and Yang, S.-H. (2015). Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids 4*, e264.
- Zhang, Y., Padalecki, S.S., Chaudhuri, A.R., De Waal, E., Goins, B.A., Grubbs, B., Ikeno, Y., Richardson, A., Mundy, G.R., and Herman, B. (2007). Caspase-2 deficiency enhances aging-related traits in mice. *Mech. Ageing Dev. 128*, 213–221.
- Zhang, Y., Gao, J.-S., Tang, X., Tucker, L.D., Quesenberry, P., Rigoutsos, I., and Ramratnam, B. (2009). MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene. *FEBS Lett. 583*, 3725–3730.
- Zhao, T., and Xu, Y. (2010). p53 and stem cells: new developments and new concerns. *Trends Cell Biol. 20*, 170–175.
- Zhao, Z., Zhong, X., Wu, T., Yang, T., Chen, G., Xie, X., Wei, Y., Ye, M., Zhou, Y., and Du, Z. (2014). Identification of a NFKBIA polymorphism associated with lower NFKBIA protein levels and poor survival outcomes in patients with glioblastoma multiforme. *Int. J. Mol. Med. 34*, 1233–1240.
- Zheng, H., You, H., Zhou, X.Z., Murray, S.A., Uchida, T., Wulf, G., Gu, L., Tang, X., Lu, K.P., and Xiao, Z.-X.J. (2002). The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature 419*, 849–853.
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A., and Orrenius, S. (1999). Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ. 6*, 644–651.
- Zhou, R.-B., Lu, X.-L., Zhang, C.-Y., and Yin, D.-C. (2017). RNA binding motif protein 3: a potential biomarker in cancer and therapeutic target in neuroprotection. *Oncotarget 8*, 22235–22250.
- Ziegelbauer, J., Wei, J., and Tjian, R. (2004). Myc-interacting protein 1 target gene profile: A link to microtubules, extracellular signal-regulated kinase, and cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A 101*, 458–463.
- Zohrabian, V.M., Nandu, H., Gulati, N., Khitrov, G., Zhao, C., Mohan, A., DeMattia, J., Braun, A., Das, K., Murali, R., et al. (2007). Gene expression profiling of metastatic brain cancer. *Oncology Reports 18*, 321–328.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell 90*, 405–413.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken, die mich während der Promotion unterstützt haben. Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Reiner U. Jänicke danken, der dieses Forschungsprojekt geleitet und mich während der gesamten Zeit und dies trotz seiner schweren Erkrankung auf wissenschaftlicher Ebene unterstützt hat. Insbesondere der konstruktive Austausch und die regelmäßigen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren stets eine große Bereicherung und haben diese Arbeit in der hier vorgelegten Form ermöglicht. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. Sebastian Wesselborg bedanken, der sich bereit erklärt hat das Erstgutachten für die Dissertation zu übernehmen.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. William F. Martin für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Dennis Sohn, der mir ebenfalls während der gesamten Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und auch im Anschluss an die praktische Arbeit immer für meine Fragen ein offenes Ohr hatte. Zudem danke ich Christine Hachmann, die bei experimentellen Problemen immer Rat wusste. Ich möchte mich an dieser Stelle auch bei allen anderen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Radioonkologie und des Instituts für Molekulare Medizin I bedanken. Neben dem regelmäßigen fachlichen Austausch, gehörten insbesondere die gemeinsamen Gänge zur Mensa zu den täglichen Highlights. Zudem möchte ich mich bei Dr. Anja Stefanski bedanken, die die MS-Analysen durchgeführt hat.

Ganz besonders danke ich meinen Freunden, auf die ich mich in jeder Lebenslage blind verlassen kann und die mich immer motiviert haben, diese Arbeit doch noch zu schreiben.

Zuletzt und vor allem möchte ich meiner ganzen Familie danken, die mich während meines ganzen Studiums unterstützt und motiviert hat. Hierbei gilt natürlich der größte Dank meiner Mutter und auch meinem Vater, der das Ende der Arbeit leider nun nicht mehr miterleben kann. Für die mit Abstand größte Aufmunterung haben meine beiden Nichten Leni und Sara und mein Neffe Julian gesorgt.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum/ -ort 17.06.1987 in Köln
Staatsangehörigkeit deutsch

Berufspraxis

04.2017-12.2018 Klinischer Monitor bei der ClinAssess GmbH in Leverkusen
seit 01.2019 Medical Science Liaison Manager Onkologie bei der Eisai GmbH in Frankfurt a. M.

Ausbildung

seit 06.2012- Promotion an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Titel: Caspase-2 als funktioneller Modulator der p21^{WAF1/CIP1}-Expression
10.2006-05.2012 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
08.1997-08.2006 Erich-Kästner Gymnasium in Köln-Niehl
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Weiterbildung

01.2017-03.2017 Fortbildung zum Klinischen Monitor (CRA) an der *human care* PharmaSchule Mittlerer Niederrhein in Krefeld

Praktika

09.2010-12.2010 Auslandspraktikum: University of Michigan; Department of Pediatrics and Pathology in der Arbeitsgruppe von M.D. Ph.D Elisabeth R. Lawlor