

Charakterisierung von m⁶A modifizierten mRNAs in LPS-aktivierten RAW-264.7 Makrophagen

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von Claudine Georges
aus Esch-sur-Alzette (Luxemburg)

Berichter: Professor Dr. rer. nat. Dirk Ostareck

Priv.-Doz. Dr. med. Martina Crysandt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.25

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek
online verfügbar.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1. Sepsis	1
1.2. Funktion von Immunzellen insbesondere der Makrophagen	3
1.3. LPS und TLR4-abhängige Aktivierung des MyD88-und-TRIF- Signalweges in Makrophagen	4
1.4. Die Rolle der m ⁶ A RNA Modifikation in der Entzündung und der Sepsis	7
1.5. N ⁶ -Methyladenosin	8
1.6. Katalysatoren der m ⁶ A Modifikation und Effektorproteine	10
1.7. Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Zellbiologische Methoden	15
2.1.1. Kultivierung der RAW 264.7 Makrophagen	15
2.1.2. Zellzahlermittlung mittels Biorad TC20 automated cell counter	15
2.1.3. LPS Stimulation der Makrophagen	16
2.1.4. Actinomycin D Stimulation der Makrophagen	16
2.1.5. Ernte der RAW Makrophagen mit Trizol	16
2.1.6. RNA Extraktion	16
2.1.7. Präparation von Triton-Lysaten	17
2.2. Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Nanodrop2000-Spektrometer	18
2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese für RNA	18
2.2.3. Reverse Transkription	19
2.2.4. Quantitative PCR	20
2.3. Proteinchemische Methoden	21
2.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	21
2.3.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	21
2.3.3. Western-blot	23
2.4. Geräteliste	24
2.5. Chemikalienliste	25
3. Ergebnisse	27
3.1. mRNA-Expression m ⁶ A-modifizierter mRNAs in RAW-264.7 Makrophagen nach LPS Stimulation	27
3.2. Expression der durch differenziell m ⁶ A methylierte mRNAs kodierte Proteine	30
3.3. Einfluss der differenziellen m ⁶ A Methylierung auf die Stabilität der modifizierten mRNAs	31
4. Diskussion	34

4.1.	Expression differentiell m ⁶ A modifizierter mRNAs in RAW264.7 Makrophagen nach LPS-Stimulation	34
4.2.	Expression der durch differenziell m ⁶ A methylierte mRNAs kodierten Proteine ..	37
4.3.	Einfluss der differentiellen m ⁶ A Methylierung auf die Stabilität der modifizierten mRNAs	39
5.	Zusammenfassung.....	42
6.	Ausblick.....	44
	Literaturverzeichnis.....	46
	Anhang:.....	55
	Anhang 1: Qualitätskontrolle der extrahierten RNA	55
	Anhang 2: Verwendete Primer für die PCR	55
	Anhang 3.: Verwendete Primärantikörper für den Western blot	57
	Anhang 4: Verwendete Sekundärantikörper für den Western blot	57
	Anhang 5.: Verwendete Lysatmenge für den Western blot	58
	Danksagung:	59
	Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung.....	60
	Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung.	61

Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenosin
aa	<i>Amino acid</i>
A-sites	<i>Adenosin sites</i>
BMDMs	<i>Bone Marrow Derived Macrophages</i>
ActD	Actinomycin D
ALKBH5	<i>AlkB homolog 5 demethylase</i>
C	Cytosin
APS	Ammoniumpersulfat
CapG	<i>Capping acting protein, Gelsolin like</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
dd	Doppelt destilliert
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dsDNase	<i>double-stranded DNA-specific endonuclease</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Evi2b	<i>Ecotropic viral integration site 2B</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FTO	<i>Fat mass and obesity-associated protein</i>
G	Guanine
GO	<i>Gene Ontology</i>
H ₂ O	Wasser
HNRNPC	<i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C</i>
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
IL	Interleukin
LPB	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MAT2A	Methionin-Adenosyltransferase 2A
METTL3	Methyltransferase-like-3
METTL14	Methyltransferase-like-14
METTL16	Methyltransferase-like-16
MD2	<i>Myeloid Differentiation Factor 2</i>
MGI	<i>Mouse Genomic Informatics</i>
miCLIP	<i>m⁶A individual-nucleotide resolution UV crosslinking and immunoprecipitation</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
m ⁶ A	N ⁶ -Methyladenosin
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88</i>
MyD88S	MyD88-Variante
Ncbi	<i>National center for biotechnology information</i>
Ndufv1	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
NOD1	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 1</i>
Nts	<i>Nucleotides</i>
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
Pa-1	<i>PTIP associated 1</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pick1	<i>Protein interacting with C kinase 1</i>
PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
PPR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RBM15/15B	<i>RNA-binding motif protein 15/15B</i>
RLA	RNA Ladepuffer
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>

rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Reverse Transkription
Rnf8	<i>Ring fing protein 8</i>
SAM	S-adenosil-methionine
SDS	Natriumdodecylsulfat
si	<i>small interfering</i>
snRNA	<i>small nuclear ribonucleid acid</i>
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessement score</i>
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling proteins</i>
ss	<i>Splice site</i>
T	Thymine
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNF α	<i>Tumor Necrosis Faktor alpha</i>
TRIF	<i>Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Protein Inducing IFN-β</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
WTAP	<i>Wilms Tumour 1 Associating Protein</i>
YTHFC	<i>YTH Domain Family Protein</i>
YTHDC	<i>YTH Domain Containing</i>
ZC3H13	<i>Zinc finger CCCH-type containing 13</i>
Znfx1	<i>Zinc Finger NFX1-type containing 1</i>

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1.1. Aktivierung des TLR4-Rezeptorkomplexes durch LPS

Abbildung 1.2. DRACH Motiv: Nukleotidsequenz die von Adenosin-Methylierung katalysierenden Enzymen bevorzugt modifiziert wird. m⁶Aboost wird zur Validierung potentieller und durch RNAseq identifizierter m⁶A auf DRACH-Motive trainiert

Abbildung 1.3. m⁶A Methylierung –Katalysatoren und interagierende Proteine

Abbildung 1.4. Verteilung m⁶A-modifizierter mRNAs zwischen mESCs und RAW264.7 Zellen

Abbildung 3.1. Zeitabhängige Expression differentiell m⁶A-modifizierter mRNAs in RAW264.7 Makrophagen nach LPS-Stimulation

Abbildung 3.2. Zeitabhängige Analyse der Protein-Expression von m⁶A-methylierten mRNA Zielstrukturen in LPS stimulierten Makrophagen

Abbildung 3.3: Stabilität der m⁶A-methylierter mRNAs in LPS stimulierten Makrophagen

Abbildung 6.1. Genomische Information der im Detail untersuchten *Cd14* mRNA

Abbildung Anhang 1. Agarose Gelelektrophorese-ein exemplarisches Beispiel

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 2.1.: Reaktionsschritte der qPCR

Tabelle 2.2: Geräteliste

Tabelle 2.3.: Chemikalienliste

Tabelle 3.1.: Differenziell m⁶A methylierte mRNAs nach LPS-Stimulation

Tabelle A2: verwendete Primer für die PCR

Tabelle A3: Verwendete Primärantikörper

Tabelle A4: Verwendete Sekundärantikörper

Tabelle A5: Verwendete Lysatmenge für den Western blot

1. Einleitung

1.1. Sepsis

Die Sepsis wird der dritten internationalen Konsensuskonferenz entsprechend als lebensbedrohliche Organdysfunktion definiert, die durch eine fehlregulierte Immunreaktion des Körpers auf eine Infektion ausgelöst wird (Singer et al. 2016). Die Immunreaktion ist ein entscheidender Abwehrmechanismus gegen Pathogene wie Bakterien und Viren (Kliem & Schaub 2024). Nach einer Akutphase, in der Immunzellen wie z.B. Makrophagen, Zytokine produzieren und die Pathogene aktiv eliminieren, sollte der Körper in einen Zustand der Homöostase zurückkehren (Chen et al. 2023; Du et al. 2020; Locati et al. 2020). In der Sepsis kommt es jedoch zu einer überschießenden, systemischen Entzündungsreaktion, die mit einer starken Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, dem sogenannten *cytokine storm*, einhergeht (Chousterman et al. 2017; Singer et al. 2016; Arora et al. 2023; Lin 2020). Der *cytokine storm*, ausgelöst durch Makrophagen, führt zu schweren pathologischen Veränderungen, einschließlich, endothelialer Dysfunktion, Gerinnungsstörungen und Multiorganversagen (Ince et al. 2016; Colbert & Schmidt 2016; Joffe et al. 2020; Iba & Levy 2020; Jacobi 2002; Semeraro et al. 2010; Du et al. 2020). Die immunsuppressive Phase, die oft im Anschluss an den hyperinflammatorischen Zustand der Sepsis auftritt, ist ein wichtiger Aspekt der Pathophysiologie der Erkrankung. (Chen et al. 2023). Der Zustand der Immunparalyse äußert sich durch die Freisetzung unreifer Immunzellen mit z.B. beeinträchtigter Antigenepräsentationskapazität und deregulierter Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokine sowie durch verminderte Aktivierung und gesteigerte Apoptose von T-Lymphozyten (Chen et al. 2023). Dies führt dazu, dass Patienten anfälliger für Zweitinfektionen werden oder es zur Reaktivierung ruhender Pathogene kommt, während die Primärinfektion nicht effektiv eliminiert wird (van der Poll et al. 2017; Chen et al. 2023; Oberholzer, A. et al. 2001).

Der *Sequential Organ Failure Assessment Score* (SOFA) dient der Bewertung der Organdysfunktion bei Patienten mit Sepsis (Singer et al. 2016). Eine akute Veränderung des SOFA Scores ≥ 2 Punkte bei zugrunde liegender oder vermuteter Infektion gilt als sicherer Indikator einer Sepsis (Singer et al. 2016). Der SOFA Score schließt sechs relevante Organsysteme ein, das kardiovaskuläre, respiratorische, neurologische,

hepatische, renale und das Gerinnungs-System (Vincent et al. 1996). Der septische Schock, der eine schwerwiegende Komplikation der Sepsis kennzeichnet, wird durch einen Serumlaktatspiegel von $>2\text{mmol/l}$ mit Anzeichen einer Kreislaufinstabilität definiert (Singer et al. 2016). Weltweit liegt die Inzidenz der Sepsis bei 19,1 Millionen (Fleischmann et al. 2016). Die hohe Rate der Krankenhaussterblichkeit, 5 Millionen der 19,1 Millionen erfassten Fälle führen zum Tode, verdeutlicht die dringende Notwendigkeit einer verbesserten Diagnose und optimierter Behandlungskonzepte (Prescott & Angus 2018).

Die Pathogenese der Sepsis ist komplex und wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst, die sowohl von der Infektionsquelle als auch vom Patienten abhängen (Bracht et al. 2019). Hierzu gehört insbesondere eine Dysregulation der Genexpression, die durch den Entzündungsprozess, zu einer inadäquaten Kontrolle der Synthese für die Immunreaktion relevanter Proteine z.B. von Zytokinen führt (Ren Q. et al. 2020, Hotchkiss R.S. et al. 2013, Boomer J.S. et al. 2011, Wong H. R. et al. 2013). Die Regulation der Proteinsynthese erfolgt nicht nur auf der Ebene der durch zelluläre Signale kontrollierten Gen-Aktivierung und *Deoxyribonucleic Acid* (DNA)-Transkription, als deren Ergebnis Ribonukleinsäuren (RNA) mit unterschiedlichen Funktionen, wie die Proteine kodierende *messenger Ribonucleic Acid* (mRNA) synthetisiert werden, sondern auch durch post-transkriptionale RNA-Modifikationen, das Epitranskriptom (Machnicka et al. 2013; Chokkalla et al. 2020; Meyer & Jaffrey 2014; Wang & He 2014; Watson 1963; Slobodin & Dikstein 2020). Zu den mehr als 140 derzeit bekannten RNA-Modifikationen, die dem Epitranskriptom zugerechnet werden, ist eine spezifische Form der Adenosin-Ribonukleotid-Methylierung, das N⁶-Methyladenosine (m⁶A) (Wiener & Schwartz 2021; Machnicka et al. 2013). Erfolgt die m⁶A Modifikation in einer mRNA, kann sie, in Abhängigkeit von den mit dem modifizierten Adenosin interagierenden regulatorischen Proteinen unter anderem durch Beeinflussung des prä-mRNA *Splicing*, den mRNA-Abbau und die mRNA-Translation regulieren und erlaubt so eine dynamische Reaktion auf extrazelluläre Veränderungen (Chen et al. 2023; Zhao et al. 2017; Meyer & Jaffrey 2014; Wang & He 2014; Mendel et al. 2021; Chokkalla et al. 2020). Die RNA m⁶A Modifikation spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Chen et al. 2023). Ein besseres Verständnis der Mechanismen, durch die m⁶A Modifikationen die Entzündungsreaktion und die Zytokinexpression regulieren,

könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Kontrolle der Immunreaktion beitragen. Dies eröffnet die Möglichkeit, den Verlauf von Sepsis zu beeinflussen und die Überlebensrate der Patienten zu verbessern.

1.2. Funktion von Immunzellen insbesondere der Makrophagen

Die Immunreaktion ist ein komplexer Prozess, der als Antwort auf Verletzungen und das Eindringen von Pathogenen einsetzt (Duan et al. 2022; Miyake 2007). Ziel der Immunantwort ist es, den Körper zu schützen und Krankheitserreger zu bekämpfen (Wicherska-Pawlowska et al. 2021; Kliem & Schaub 2024). Es werden zwei Hauptarten von Immunantworten definiert, die unspezifische, angeborene Immunantwort und die spezifische, erworbene Immunantwort. (Netea et al. 2019; Wicherska-Pawlowska et al. 2021).

Das angeborene, unspezifische Immunsystem, bildet die primäre Reaktionsmöglichkeit des Körpers gegen Krankheitserreger (Wang & Shao 2023; Mantovani & Garlanda 2023). Ihm werden verschiedene Zellen, Organe und Moleküle, zugeordnet, deren Interaktion eine effektive Pathogen-Abwehr gewährleistet (Riera Romo et al. 2016; Chaplin 2010). Makrophagen kommen in nahezu allen Gewebe im Körper vor und spielen eine entscheidende Rolle in der unspezifischen Abwehr von Krankheitserregern sowie der Regulation und Intensität der Immunantwort (Silva & Correia-Neves 2012; Pidwill et al. 2020; Kadomoto et al. 2021; Locati et al. 2020). Makrophagen erkennen Pathogene und Gewebeschäden mittels *Pattern Recognition Receptors* (PRR) wie den *Toll Like Receptor 4* (TLR4) und werden nach einer Stimulation in unterschiedliche Subtypen unterteilt, die entweder die antimikrobielle Abwehr und Entzündungsreaktion fördern oder hemmen (Franken et al. 2016; Murray & Wynn 2011; Locati et al. 2020). Makrophagen eliminieren Pathogene phagozytotisch und setzen unterschiedliche pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine frei (Pidwill et al. 2020; Du et al. 2020). Zudem initiieren sie den *cytokine storm* während der Infektion (Du et al. 2020). Ihre deregulierte Aktivierung kann zu chronischen Entzündungszuständen führen (Du et al. 2020; Li et al. 2018). Darüber hinaus, fungieren Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen indem sie Anteile von phagozytierten Pathogenen auf der Oberfläche präsentieren und so die Aktivierung des

angeborenen Immunsystems initiieren (Pidwill et al. 2020; Gordon & Martinez 2010; Silva & Correia-Neves 2012).

Das erworbene Immunsystem ist adaptiv und entwickelt sich im Laufe des Lebens durch Exposition gegenüber Antigenen (Yatim & Lakkis 2015). B-Zellen und T-Zellen exprimieren Antigen-spezifische Oberflächenrezeptoren, durch die Erreger erkannt und spezifische Immunantworten ausgelöst werden können (Medzhitov 2007; Chaplin 2010; Bonilla & Oettgen 2010; Yatim & Lakkis 2015). Darüber hinaus ermöglicht die Bildung von Gedächtniszellen, die nach einer Primärreaktion auf ein Antigen erfolgt, die Induktion einer schnellen und effektiven Reaktion bei erneuter Konfrontation mit dem Erreger (Seifert & Kuppers 2016; Bonilla & Oettgen 2010). B-Zellen besitzen die Fähigkeit Antikörper zu produzieren, Zytokine zu exprimieren und freizusetzen und fungieren als spezifische Antigen-präsentierende Zellen (Kliem & Schaub 2024). T-Zellen koordinieren die Immunantwort und tragen zur Eliminierung infizierter Zellen bei (Tenbrock & Rauen 2022).

Ziel der Immunreaktion ist es den Körper zu schützen, eine deregulierte Immunantwort kann jedoch neben generalisierten neurologischen und inflammatorischen Reaktionen, die unter anderem zur Ausprägung von Alzheimer und Arteriosklerose beitragen können, auch zur Entwicklung einer Sepsis führen (Fioranelli et al. 2018; Delano & Ward 2016; Bettcher et al. 2021; Kliem & Schaub 2024).

1.3. LPS und TLR4-abhängige Aktivierung des MyD88-und-TRIF- Signalweges in Makrophagen

Die Aktivierung der Makrophagen und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine erfolgt durch verschiedene Rezeptoren und zugehörige Signalwege (Zhang X. & D. M. Mosser 2008, Atri C. et al. 2018, Liu L. et al. 2020). Ein wesentlicher Aktivierungsmechanismus wird durch die Interaktion struktureller Membranbestandteile gram-negativer Bakterien, den Lipopolysacchariden (LPS) mit dem TLR4 Rezeptor ausgelöst (Li et al. 2019; Gauthier & Chen 2022; Franken et al. 2016). Die über TLR4 vermittelte Immunreaktion bewirkt eine effektive Abwehrreaktion relevanter Pathogene (Kliem & Schaub 2024; Li et al. 2019). Eine kontrollierte Immunantwort ist für die Abwehr von Infektionen essentiell, jedoch kann eine

deregulierte Aktivierung des Immunsystems durch LPS mit unkontrollierter Freisetzung von Zytokinen eine gram-negative Sepsis auslösen (Singer et al. 2016; Chousterman et al. 2017; Arora et al. 2023; Ciesielska et al. 2021; Kliem & Schaub 2024; Cohen 2002).

Die Aktivierung des Transmembran-Rezeptors TLR4 erfolgt vermittelt durch das extrazelluläre LPS-bindende Protein (LBP) und das Membranprotein *Cluster of Differentiation 14* (CD14) und initiiert über verschiedene Signalwege die Immunreaktion (Abb.1.1.) (Eletto et al. 2022; Medzhitov 2007; Poltorak et al. 1998; Ryu et al. 2017; Ciesielska et al. 2021). TLR4-abhängig löst der *Myeloid Differentiation factor 2* (MD2) Signalkaskaden aus, die zur Transkription von Genen führen, die pro-inflammatorische Zytokine wie den *Tumor Necrosis Faktor-alpha* (TNF- α) und Interleukin (IL)-6 kodieren (Ciesielska et al. 2021; Miyake 2007; Jang et al. 2021; Saraiva & O'Garra 2010; Tan & Kagan 2014).

LPS besteht aus einem Oligosaccharid, einem Lipid A, und einem O-Antigen (Park et al. 2009). Multiple Acylketten und zwei Phosphatgruppen des Lipids A sind für die Dimerisierung des TLR4-MD2 Komplexes erforderlich, der die nachfolgende Aktivierung des *Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88* (MyD88) und des *Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Protein Inducing IFN- β* (TRIF)-Signalweges bewirkt (Park et al. 2009; Huang et al. 2022).

Der MyD88-Signalweg ist entscheidend für die Aktivierung von *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) und *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B), die wiederum zur Transkription von Genen führen, die pro-inflammatorische Moleküle kodieren (Deguine & Barton 2014; Guha & Mackman 2001; Park et al. 2009; Tan & Kagan 2014).

CD14 initiiert die Endozytose von TLR4 und reguliert die Aktivierung des TRIF-Signalweges (Zanoni et al. 2011). Der TRIF-abhängige Signalweg führt zur Produktion von Typ I Interferonen (IFN) sowie weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen und trägt zur Verstärkung der Immunantwort bei (Husebye et al. 2006; Kagan et al. 2008; Zanoni et al. 2011).

Die Endozytose und der folgende Abbau des TLR4-Rezeptors regulieren die Beendigung der Immunantwort (Ciesielska et al. 2021; Husebye et al. 2006). Zusätzlich tragen negative Feedback-Regulatoren dazu bei, eine übermäßige Immunreaktion zu verhindern (Du et al. 2020). Hierzu zählen die *Suppressor Of Cytokine Signaling proteins*

(SOCS), welche den NF- κ B Signalwege unterdrücken (Duncan et al. 2020; Du et al. 2020; Liew et al. 2005; Beutler 2004; Yoshimura et al. 2007).

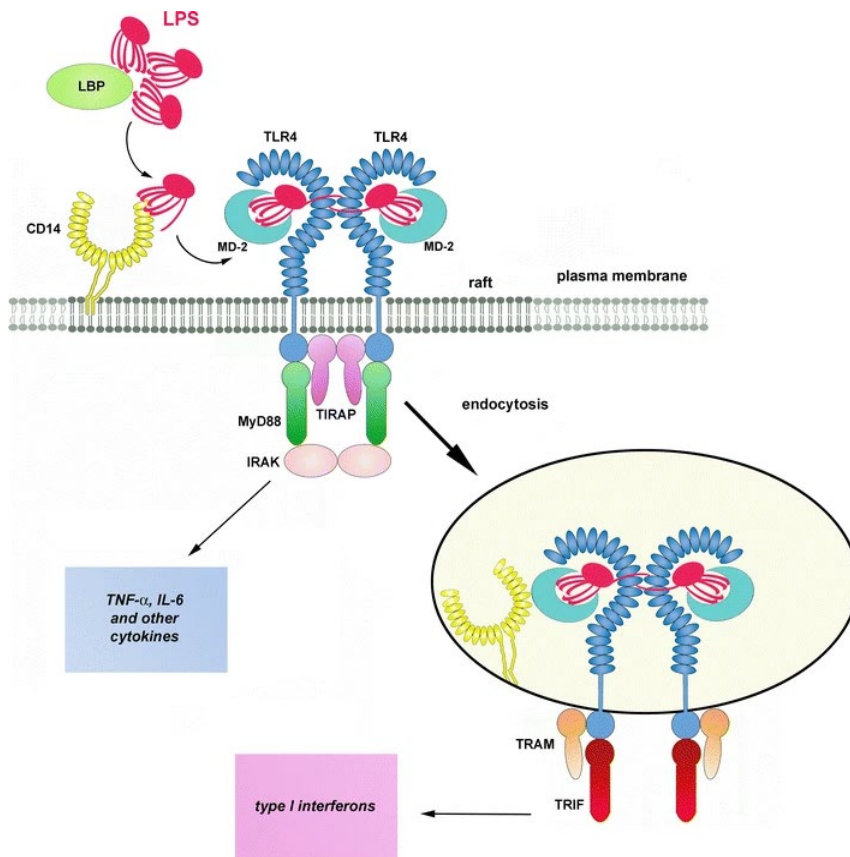


Abb. 1.1. Aktivierung des TLR4-Rezeptorkomplexes durch LPS

Die Aktivierung von TLR4 erfolgt vermittelt durch LBP und CD14 (Eletto et al. 2022; Medzhitov 2007; Poltorak et al. 1998; Ryu et al. 2017). Die Aktivierung des MyD88-Signalweges führt zur Aktivierung von Genen, die pro-inflammatorische Zytokine kodieren (Deguine & Barton 2014; Guha & Mackman 2001; Park et al. 2009; Tan & Kagan 2014). Die Endozytose des TLR4- Rezeptors bewirkt die Aktivierung des TRIF-Signalweges mit nachfolgender Expression von Typ I Interferonen (Zanoni et al. 2011; Kagan et al. 2008; Husebye et al. 2006) (weitere Details im Text). Reprinted from: Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K. *et al.* Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 557–581 (2015). Springer Nature. PMID: PMC4293489 <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1762-5> (Płociennikowska et al. 2015)

Open Access article licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

1.4. Die Rolle der m⁶A RNA Modifikation in der Entzündung und der Sepsis

Die m⁶A Methylierung und die beteiligten Mediatoren (vgl. Abb.1.3.) spielen eine komplexe Rolle bei der Regulation der Entzündungsreaktion, die sich auf die Pathogenese der Sepsis auswirkt (Guo et al. 2022; Chen et al. 2023).

Eine LPS-Stimulation führt zum Beispiel im Lebergewebe von Hühnern und in menschlichen Zahnmarkzellen zu einer erhöhten m⁶A Methylierung (Feng et al. 2018; Guo et al. 2022). Dagegen wurden in murinen RAW264.7 Makrophagen eine erniedrigte Expression des primären, die m⁶A Methylierung katalysierenden Enzyms *Methyltransferase like 3* (METTL3) und eine reduzierte m⁶A Modifikation beobachtet (Cai et al. 2022; Jiang et al. 2021). Ein durch *small interfering* (si)-RNAs vermittelte *knock-down* von METTL3 führt durch alternatives Splicing, zur Expression einer spezifischen MyD88-Variante (MyD88S) und resultiert in einer verminderten Zytokinexpression in menschlichen Zahnmarkzellen (Feng et al. 2018). Im Gegensatz hierzu steigert ein *knock-down* von METTL3 in murinen RAW264.7 Makrophagen und *Bone Marrow-Derived Macrophages* (BMDMs) die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 (Cai et al. 2022). Diese Effekte werden durch eine erhöhte Stabilität von *Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 1* (NOD1), einem intrazellulären PRR, vermittelt (Franchi et al. 2009; Cai et al. 2022). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen Zell-spezifische Unterschiede in der Regulation und funktionellen Wirkung der m⁶A Methylierung (Guo et al. 2022; Feng et al. 2018; Cai et al. 2022).

Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und spielen eine essentielle Rolle in der Bekämpfung von Antigenen (Du et al. 2020; Locati et al. 2020). Zur Eindämmung der Immunreaktion und einer systemischen Entzündungsreaktion trägt SOCS1 bei (Du et al. 2020; Yoshimura et al. 2007). In Maus-Makrophagen senkt ein *knock-down* des *Writers* METTL14, der mit METTL3 ein funktionales Dimer bildet, die m⁶A-Methylierung der *Socs1* mRNA und erhöht die Expression pro-inflammatorischer Zytokine nach LPS-Stimulation (Du et al. 2020; Jiang et al. 2021; Liu et al. 2014). Die reduzierte m⁶A Expression der *Socs1* mRNA verhindert die Bindung des m⁶A-Readers *YTH Domain Family Protein1* (YTHDF1) und somit auch die *Socs1* mRNA Translation (Du et al. 2020; Wang et al. 2015). Die verringerte Interaktion von YTHDF1 mit der differenziell m⁶A methylierten *Socs1* mRNA führt zu einer

gesteigerter Aktivierung des TLR4/NF- κ B-Signalweges und fördert die Entzündungsreaktion (Du et al. 2020).

In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass die m⁶A Expression in Kardiomyozyten septischer Ratten nach LPS-Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Zellen vermindert ist (Han et al. 2021). Die Tatsache, dass 46 mRNAs eine verringerte m⁶A Methylierung aufweisen, während 27 mRNAs eine erhöhte m⁶A Methylierung in der LPS-Gruppe zeigen, deutet auf eine differenzielle Regulation hin (Han et al. 2021). *Gene Ontology* (GO)-Term-Analysen, die die Funktionen der exprimierten Genprodukte berücksichtigen, zeigen, dass die mRNAs mit verringerter m⁶A Methylierung vorwiegend an Prozessen beteiligt sind, die mit Entzündungs- und Immunreaktionen verbunden sind (Han et al. 2021; Ashburner et al. 2000).

Diese gegensätzlichen Beobachtungen verdeutlichen die Bedeutung der Kontextabhängigkeit bei der Regulation der m⁶A-Methylierung und der beteiligten Enzyme. Verschiedene Zelltypen und Gewebe können unterschiedlich auf entzündliche Stimuli reagieren und es wirken verschiedene Mechanismen bei der Regulation der m⁶A-Methylierung nach LPS-Stimulation (Guo et al. 2022; Feng et al. 2018; Zhang et al. 2019; Han et al. 2021).

1.5. N⁶-Methyladenosin

N⁶-Methyladenosin (m⁶A) ist eine der häufigsten Modifikationen eukaryotischer mRNAs (Roundtree et al. 2017; Oerum et al. 2021). Die reversible Methylierung der mRNA erfolgt an der N⁶-Position von Adenosin bevorzugt an RRACH/DRACH Sequenz-Motiven (Abb.1.2.) im Bereich des Stop-codons, in Introns und am Ende der 3'UTR (Dominissini et al. 2012; Csepany et al. 1990; Wen et al. 2023). Die Buchstaben D, R und H stehen für unterschiedliche Basen, D= Adenosin (A), Guanin (G) oder Uracil (U), R= A oder G, H= A, Cytosin (C) oder U (Meyer et al. 2012; Dominissini et al. 2012). Nur ein geringer Teil dieser Motive wird durch Methyltransferasen modifiziert (Dominissini et al. 2012).



Abb. 1.2. DRACH Motiv: Nukleotidsequenz die von Adenosin-Methylierung katalysierenden Enzymen bevorzugt modifiziert wird. m⁶Aboost wird zur Validierung potentieller und durch RNAseq identifizierter m⁶A auf DRACH-Motive trainiert.

Der METTL3/14-Komplex methyliert bevorzugt das Adenosin an der 5 Position der mRNA im DRACH Motiv (Dominissini et al. 2012; Csepany et al. 1990; Wen et al. 2023). Die Buchstaben des Motivs stehen für die quantitative Verteilung unterschiedliche Basen und ihre mögliche Anordnung (Dominissini et al. 2012; Meyer et al. 2012). Die quantitative Verteilung der Basen, welche die Sequenz definieren wird durch die Höhe des Buchstabens bestimmt (Schneider and Stephens 1990). Die Größe der Buchstaben ist proportional zu der Frequenz und die Basen werden in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit angeordnet, wobei sich die häufigste Base auf dem Stapel befindet (Schneider & Stephens 1990). Material from: Schneider, T. D. and R. M. Stephens (1990). "Sequence logos: a new way to display consensus sequences." *Nucleic Acids Res* **18**(20): 6097-6100. Oxford University Press. Doi: [10.1093/nar/18.20.6097](https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6097) PMCID: PMC332411 (Schneider & Stephens 1990); Kortel, N., et al. (2021). "Deep and accurate detection of m6A RNA modifications using miCLIP2 and m6Aboost machine learning." *Nucleic Acids Res* **49**(16): e92. Oxford University Press. DOI: [10.1093/nar/gkab485](https://doi.org/10.1093/nar/gkab485) PMCID: [PMC8450095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38450095/) (Kortel et al. 2021)

Drei unterschiedliche Proteinklassen sind an der m⁶A Methylierung beteiligt (Shi et al. 2019). Methyltransferasen katalysieren den Transfer der Methylgruppe auf die N⁶-Position der mRNA (Wen et al. 2023; Liu et al. 2014; Bokar et al. 1997). Die Entfernung der Methylgruppe erfolgt durch Demethylasen, wie *Fat Mass and Obesity-Associated Protein* (FTO) (Wen et al. 2023; Jia et al. 2011; Zheng et al. 2013; Shi et al. 2019). *Reader* erkennen die m⁶A Modifikationen spezifisch (Wen et al. 2023; Shi et al. 2019).

Die m⁶A Methylierung erlaubt eine dynamische Antwort auf Veränderungen der Umwelt und spielt bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse, wie der mRNA-Stabilität,

dem mRNA Splicing und der mRNA Translation eine wichtige Rolle (Feng et al. 2018; Wang et al. 2019; Feng et al. 2021). Die m⁶A Methylierung wurde mit einer Vielzahl von Krankheitszuständen in Verbindung gebracht, unter anderem Diabetes Typ II, Fettleibigkeit, Infertilität, neurologische Erkrankungen sowie die Entstehung und Metastasierung von Karzinomen (Wen et al. 2023; Huang et al. 2015; Zheng et al. 2013; Angelova et al. 2018). Darüber hinaus, wurde festgestellt, dass m⁶A eine Rolle bei der Regulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems spielt (Chen et al. 2023).

1.6. Katalysatoren der m⁶A Modifikation und Effektorproteine

Die m⁶A Methylierung ist dynamisch und reversibel und wird durch Methyltransferasen und Demethylasen reguliert (Abb.1.3.) (Shi et al. 2019). Methyltransferasen auch als *Writer* bekannt, katalysieren den Transfer einer Methylgruppe von *S-Adenosyl-Methionine* (SAM) auf das Adenosin-Substrat der mRNA (Wen et al. 2023; Shi et al. 2019). METTL3 bildet zusammen mit der katalytisch inaktiven METTL14 den wichtigsten Methyltransferase-Komplex der mRNA (Wang et al. 2016; Sledz & Jinek 2016). Als katalytisch aktive Untereinheit des Komplexes, überträgt METTL3 die Methylgruppe von SAM auf die N⁶-Position von Adenosin in der RNA (Bokar et al. 1997; Poh et al. 2022). METTL14 stabilisiert die Bindung des Komplexes an die RNA und erhöht die Affinität der Bindung von SAM an METTL3 (Oerum et al. 2021). Ein *knock-down* von METTL14 führt zu einer Reduktion der *TNF-α* mRNA-Expression, während die Expression von *IL-10* erhöht ist (Zheng et al. 2022).

Der METTL3/14-Komplex bindet im Zellkern an *Wilms Tumour 1 Associating Protein* (WTAP) (Ping et al. 2014). WTAP erleichtert die Bindung zwischen METTL3 und METTL14 und stabilisiert den Komplex (Ping et al. 2014; Liu et al. 2014).

Als weiterer Bestandteil des Komplexes, ist *Zinc finger CCCH-Type Containing 13 Protein* (ZC3H13) an der Lokalisierung des Methyltransferase-Komplexes im Zellkern beteiligt (Wen et al. 2018). Ein *Knock-out* von ZC3H13 in embryonalen Stammzellen von Mäusen reduziert die METTL3 und METTL14-Konzentrationen im Nukleus und verringert die m⁶A Methylierung (Wen et al. 2018).

Als weitere Methyltransferase methyliert METTL16 die U6 *small nuclear ribonucleic acid* (snRNA) und *Methionin-Adenosyltransferase 2A* (MAT2A) mRNA (Pendleton et al. 2017; Satterwhite & Mansfield 2021). MAT2A ist an der Synthese von SAM, dem universellen Methylgruppendonor in Zellen beteiligt (Satterwhite & Mansfield 2021; Halim et al. 1999; Cantoni & Durell 1957). Im Gegensatz zu METTL3 erfolgt die Methylierung bevorzugt an UACAGAGAA Sequenzen (methyliertes Adenosin ist unterstrichen) (Pendleton et al. 2017; Warda et al. 2017; Mendel et al. 2018; Shima et al. 2017).

Demethylasen auch *Eraser* genannt entfernen die Methylgruppe durch oxidative Demethylierung von der mRNA (Jiang et al. 2021; Shi et al. 2019). Zu den *Erasern* gehören *AlkB Homolog 5 Demethylase* (ALKBH5) und FTO (Zheng et al. 2013; Zhang et al. 2021; Jia et al. 2011). ALKBH5 ist vermehrt in männlichen Geschlechtsorganen nachweisbar und spielt eine essentielle Rolle in der Spermatogenese (Zheng et al. 2013). Eine Inaktivierung von ALKBH5 führt zu Infertilität in männlichen Mäusen (Zheng et al. 2013; Tang et al. 2018).

Die Funktion der m⁶A Modifizierung hängt maßgeblich von spezifischen Proteinen ab, den *Readern*, die mit Sequenzmotiven, die m⁶A modifizierte Adenosine enthalten, interagieren (Li et al. 2014; Zhu et al. 2014; Shi et al. 2019; Jiang et al. 2021). Die spezifisch gebundenen *Reader* vermitteln unterschiedliche zelluläre Prozesse (Zaccara et al. 2019; Shi et al. 2019; Jiang et al. 2021). Zu den *Reader*-Proteinen gehören *YTH Domain Containing Protein 1/2* (YTHDC1/2) und *YTH Domain Family Protein 1-3* (YTHDF1-3) (Dominissini et al. 2012). YTHDC1 Proteine sind vorwiegend im Nukleus, YTHDC2 Proteine sind sowohl im Nukleus und Zytoplasma und YTHDF Proteine sind hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Shi et al. 2017; Hartmann et al. 1999; Wang et al. 2014; Wang et al. 2015; Zhou et al. 2015; Wojtas et al. 2017). YTHDC1 beeinflusst unter anderem das mRNA-Spleißen und den Transport der mRNA ins Zytoplasma (Roundtree et al. 2017; Xiao et al. 2016). YTHDC2 fördert durch die Rekrutierung der 5'–3' *Exoribonuclease* Xrn1, den Abbau von m⁶A-methylierten mRNAs und reguliert die mRNA Translation (Hsu et al. 2017; Wojtas et al. 2017; Kretschmer et al. 2018). Zur YTHDF Familie gehören die Proteine YTHDF1-3, die eine hohe Aminosäuresequenz-Homologie aufweisen und eine annähernd gleiche YTH Domäne besitzen (Patil et al. Jaffrey 2018). YTHDF1 verstärkt die Translation von m⁶A modifizierten mRNAs, YTHDF2 beschleunigt den Abbau der

veränderten mRNA und YTHDF3 besitzt beide Funktionen (Wang et al. 2014; Shi et al. 2017; Wang et al. 2015).

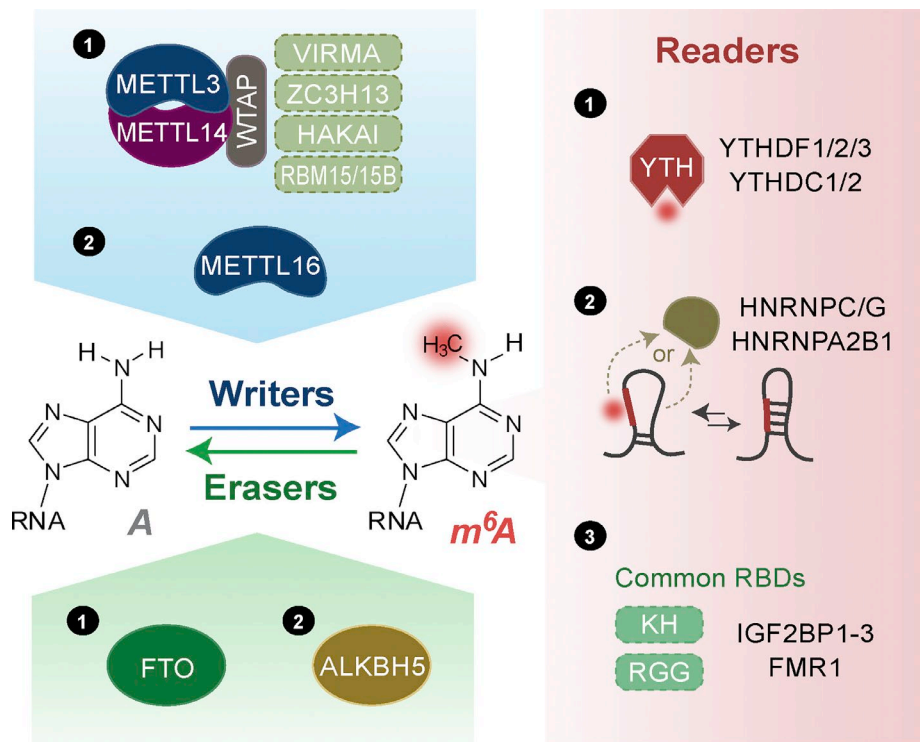


Abb. 1.3. m⁶A Methylierung –Katalysatoren und interagierende Proteine

Methyltransferasen wie der METTL3/14-Komplex katalysieren den Transfer einer Methylgruppe von *S-adenosil-methionine* (SAM) auf die Ziel-mRNA (Shi et al. 2019; Wen et al. 2023; Wang et al. 2016; Sledz & Jinek 2016). Die Entfernung der Methylgruppe von der N⁶-Position von Adenosin erfolgt über *Eraser* wie z.B FTO (Shi et al. 2019; Zhang et al. 2021; Jia et al. 2011). Spezifische *Reader* binden spezifisch an Sequenzelemente mit m⁶A Methylierung (Shi et al. 2019; Jiang et al. 2021). Reprinted from: Where, when and how: context-dependent functions of RNA methylation writer, readers, and erasers, Mol Cell, Volume 73, Issue 4, Page number 641, Shi, Wei et al., Copyright 2019 with permission from Elsevier doi:10.1016/j.molcel.2019.04.025 PMCID: [PMC6527355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6527355/) (Shi et al. 2019).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die m⁶A Modifikation der mRNA ist die häufigste Modifikation im Epitranskriptom eukaryonter Zellen und reguliert post-transkriptional die Stabilität, Translation und Abbau spezifischer mRNAs (Sun et al. 2019; Feng et al. 2018; Wang et al. 2019; Feng et al. 2021). In früheren Dot blot Experimenten der Arbeitsgruppe mit einem spezifischen m⁶A-Antikörper konnte nachgewiesen werden, dass nach zwei und sechs Stunden LPS-Stimulation von RAW264.7 Makrophagen die m⁶A Methylierung signifikant zunimmt (Yannick Schumacher et al., unpublizierte Daten).

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Adenosin-Methyltransferasen, *Reader* und *Eraser* in LPS-aktivierten Makrophagen eine veränderte Expression auf mRNA und Proteinebene aufzeigen (Anja Hackman et al. 2019 Masterarbeit, Ostareck-Lederer und Ostareck, unpublizierte Daten).

Basierend auf diesen Experimenten wurde aus unbehandelten und mit LPS (10ng/ml, 2h und 6h) behandelten RAW264.7 Makrophagen die poly(A)⁺ RNA gereinigt (Yannick Schumacher et al. unpublizierte Daten). Aus der poly(A)⁺ RNA wurde m⁶A-modifizierte RNA nach dem miCLIP2-Protokoll (*m⁶A individual-nucleotide resolution UV crosslinking and immunoprecipitation*) (Linder et al. 2015; Buchbender et al. 2020) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Julian König, IMB Mainz isoliert und mittels *RNAseq* analysiert.

Zur Detektion von m⁶A Modifikationen wurde *m6Aboost machine learning* genutzt (in Kooperation mit Dr. Katharina Zarnack, Goethe-Universität Frankfurt), das bereits für eine vergleichenden Analyse der mRNA m⁶A Modifikationen in murine *embryonic stem cells* (mESC) und RAW264.7 Makrophagen entwickelt wurde (Kortel et al. 2021).

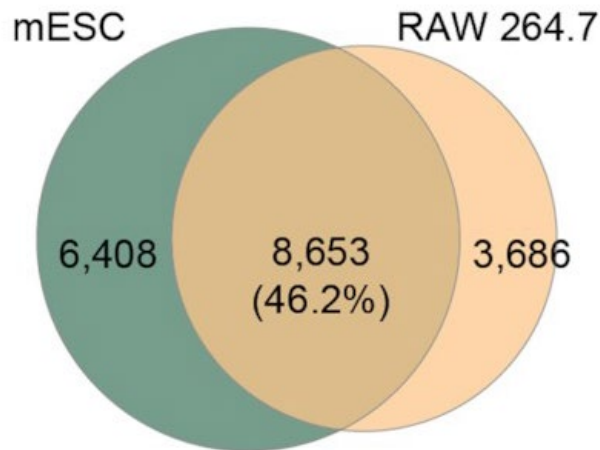


Abb. 1.4. Verteilung m⁶A-modifizierter mRNAs zwischen mESCs und RAW264.7 Zellen

Durch *m⁶Aboost* wurden nach RNAseq Analyse m⁶A-modifizierte mRNAs identifiziert. Dafür wurde die sequenzierte RNA mit miCLIP2 isoliert. Diese spezifische Immunopräzipitation erfolgte mit poly(A)⁺ RNA, aufgereinigt aus mESCs und RAW264.7 Zellen. 46,2% der m⁶A-modifizierten Adenosine konnten sowohl in mESCs, als auch in RAW264.7 Zellen detektiert werden. Reprinted from Kortel, N., et al. (2021). "Deep and accurate detection of m6A RNA modifications using miCLIP2 and m6Aboost machine learning." *Nucleic Acids Res* **49**(16) (Kortel, N., et al. (2021)

DOI: [10.1093/nar/gkab485](https://doi.org/10.1093/nar/gkab485) PMCID: PMC8450095

Open Access article licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

Unsere Arbeitsgruppe identifizierte sieben mRNAs in RAW264.7 Zellen, die unter Verwendung des oben genannten Protokolls (Kortel, N., et al., 2021) nach 6h LPS Stimulation (10ng/ml) eine signifikant veränderte m⁶A Methylierung aufweisen.

Ziel meiner Arbeit ist es, den Einfluss von LPS auf die mRNA- und Proteinexpression sowie die Stabilität der differenziell m⁶A methylierter mRNAs nach LPS-Stimulation in RAW 264.7 Makrophagen zu untersuchen. Im Rahmen der Arbeit habe ich RAW264.7 Makrophagen mit LPS aktiviert. QRT-PCR Messungen wurden durchgeführt, um die Expression und Stabilität ausgewählter mRNAs, deren m⁶A Methylierung durch LPS beeinflusst war, zu bestimmen. Mit Western blots erfolgte der Nachweis spezifischer mRNA Translationsprodukte.

2. Material und Methoden

2.1. Zellbiologische Methoden

2.1.1. Kultivierung der RAW 264.7 Makrophagen

Als Modellsystem wurden murine Makrophagen RAW264.7 gewählt (RAW264.7, TIB-71, ATCC). Die Makrophagen wurden nach dem Auftauen für eine Woche bei 37° und 5% CO₂ in DMEM *high glucose* (Gibco Life Technologies), 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom) und 1% Penicillin und Streptomycin (Gibco Life Technologies) kultiviert. Dazu wurden die Zellen mit einer Dichte von 4×10^6 Zellen pro 15 cm Petrischale in 20 ml Medium ausgesät und nach zwei-tägiger Kultivierung passagiert. Für die Versuche wurden die Zellen mit einer Dichte von $0,16 \times 10^6$ Zellen pro Well für die RNA Extraktion und 4×10^6 Zellen für die Tryton-Lysate ausgesät.

2.1.2. Zellzahlermittlung mittels Biorad TC20 automated cell counter

Für die Berechnung der Zellzahl wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium abgekratzt. 20µl Zellsuspension wurden 1:1 mit Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) verdünnt. Die verdünnte Zelllösung wurde anschließend 1:1 mit 0,4% Tryptan-Blau vermengt und je 10µl der Zellverdünnung wurden in die Kammern A und B des Zähl-Slides pipettiert und im automatisierten Zellzähler TC20 (Biorad) gemessen. Anschließend wurde der Mittelwert der lebenden Zellen errechnet.

PBS (pH 7,4):

- 137 mM Natriumchlorid
- 2,7 mM Kaliumchlorid
- 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
- 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat

2.1.3. LPS Stimulation der Makrophagen

Die Stimulation der RAW 264.7 Makrophagen mit 10 oder 100 ng/ml LPS (*E.coli* Serotyp 0111:B4 (Sigma, Aldrich) erfolgte im Medium für 0, 2 und 6 Stunden.

2.1.4. Actinomycin D Stimulation der Makrophagen

Die RAW Makrophagen wurden mit 5µg/ml Actinomycin D (Sigma #A9415) für 1, 2, 3 und 4 Stunden stimuliert. 100pg *in vitro* transkribierte cap-Luc-poly(A)⁺ mRNA wurde als exogene Extraktionskontrolle dazugegeben.

2.1.5. Ernte der RAW Makrophagen mit Trizol

Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen und in 750µl Trizol geerntet. Die Zellen wurden bei -20°C gelagert.

Trizol-Reagenz:

- 0,8 M Guanidiniumthiocyanat
- 0,4 M Ammoniumthiocyanat
- 0,1 M Natriumacetat pH 5
- 5% Glycerin
- 38% wassergesättigtes Phenol (pH 4,5 - 5)

2.1.6. RNA Extraktion

Die Zellen wurden nach dem Auftauen kurz im Vbrax (Scientific Industries) bei maximaler Geschwindigkeit für ungefähr 10 Sekunden geschüttelt. Jede Probe wurde mit 200µl Chloroform versehen, 15 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt und 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei RT und 10.000 xg 20 Minuten zentrifugiert. Die obere klare Schicht, in der sich die RNA befindet wurde abgenommen und 1:1 mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) vermengt. Die Proben wurden erneut 15 Sekunden geschüttelt und weitere 5 Minuten bei RT und

10.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuem Gefäß mit 1µl Glycogen (20µg/µl) und 350µl Isopropanol versetzt und im Vibrax (Scientific Industries) geschüttelt. Die RNA wurde anschließend über Nacht bei -20°C gelagert.

Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 20.000 xg, wurde die RNA mit 500 µl 80% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C, 20.000 xg für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen. Nach wiederholtem Waschen und Zentrifugieren bei 4°C wurde der entstandene Überstand verworfen. Das Pellet wurde kurz runterzentrifugiert und die restliche Flüssigkeit wurde entnommen. Das entstandene RNA-Pellet wurde je nach Größe mit 10-20µl Nuklease-freiem Wasser versetzt und bei 750 rpm und 55°C gelöst. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.1.7. Präparation von Triton-Lysaten

Die Zellen wurden zur Gewinnung von Gesamtzell-Lysaten auf Eis mit 15 ml PBS gewaschen und anschließend in 10 ml PBS abgeschabt. Die Zellmischung wurde resuspendiert und für 5 Minuten bei 4°C und 400 xg zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde entnommen und das entstandene Pellet wurde 1:1 mit 300µl Tritonpuffer resuspendiert. Die Proben wurden im Vortexer 20 Sekunden durchmischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und für 10 Minuten bei 4°C und 20.000 xg zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in neues Eppi überführt und nach Schockgefrieren mit flüssigen Stickstoff bei -80°C gelagert.

Tritonlysepuffer:

50 mM Tris pH 7,4

300 mM Natriumchlorid

1 % Triton X-100

1 mM DTT

1 mM PMSF

1 µg/ml Pepstatin

2 µg/ml Leupeptin

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Nanodrop2000-Spektrometer

Unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen Gesetzes erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA Proben mit dem Nanodrop2000-Spektrophotometer (PEQLAB Biotechnologie GmbH) bei einer Wellenlänge von 260nm. Der Reinheitsgrad der RNA wurde durch das Verhältnis A260/A280 bestimmt, wobei reine RNA Werte von ~2,0 aufweist. Signifikante Abweichungen deuten auf Verunreinigungen durch Proteine hin, die bei 280nm absorbieren. Werte des A260/A230 Verhältnisses liegen bei reiner RNA zwischen 1,8 und 2,2. Deutlich niedrigere Werte weisen Verunreinigungen durch Phenol auf.

2.2.2. Agarose-Gelelektrophorese für RNA

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Kontrolle der RNA-Integrität.

1% Agarose Gel wurde mit 0,6g Ultrapure Agarose (Invitrogen) und 60ml 1x TAE in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend mit dem 8µl Farbstoff des Farbstoffes GelRed (Biotium Inc.) versetzt. 1 µg der RNA-Proben wurde mit 8µl RNA Ladepuffer (RLA) versetzt und bei 65°C 10 Minuten inkubiert, kurz auf Eis gelagert und bei 4°C zentrifugiert.

Als Marker wurden 2 µl des RiboRulerHr (Thermo Fisher Scientific Inc.) mit 8 µl RLA eingesetzt und anschließend ebenfalls bei 65°C für 10 Minuten inkubiert.

Negativ geladenen Nukleinsäuren wurden abschließend 1,5h bei 45 Volt ihrer Größe nach aufgetrennt.

Das Gel wurde für 1:15 Sekunden im ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Europe GmbH) belichtet und anschließend analysiert.

TAE 50x

- 242 g Tris-Base
- 57,1 g Eisessig
- 100 ml 0,5 M EDTA

- 1000 ml dd_H2O

RNA-Ladepuffer 10 ml

- 4,8 ml Formamid
- 1,75 ml Formaldehyd
- 400 µl 1 M MOPS (pH=7,0)
- 33 µl 3 M Natriumacetat
- 20 µl 0,5 M EDTA
- 1 ml 50% Glycin
- 0,5 ml 1% Bromphenolblau
- 10 ml dd H2O

2.2.3. Reverse Transkription

Um die extrahierte RNA in komplementäre DNA, cDNA umzuschreiben wurde das *Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis with dsDNase* benutzt (Thermo Fisher Scientific Inc, #K1682).

Zunächst wurden 1 µg der RNA auf 8 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Die RNA Verdünnung wurde mit 2µl DNase mix bei 37°C für 2 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 5 µl des *random primer mix* bei 65°C für 5 Minuten.

Nach Hinzugabe von 5 µl Maxima RT und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 50°C.

Nach weiteren 5 Minuten bei 85°C wurde die cDNA 1:10 mit 180µl Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

- DNase Mix 2 µl:
 - 1 µl 10X DNase buffer
 - 1 µl DNase
- Random primer mix 5 µl:
 - 3 µl dd Wasser
 - 1 µl 100 µM R6 primer (100 pmol)
 - 1 µl 10 mM dNTP Mix (0,5 mM final concentration)

- Enzyme mix 5 µl
 - 4 µl 5x buffer
 - 1 µl Maxima RT

2.2.4. Quantitative PCR

Die qPCR im StepOnePlus System (Thermo Fisher Scientific Inc.) dient dem Nachweis der mRNA Expression. Die relative mRNA Expression wurde anhand der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001) ermittelt indem die Werte des Ziel-Gens auf das Referenzgen *NADH:ubiquinone oxidoreductase core subunit V1 (Ndufv1)* normalisiert wurden.

Eine Reaktion von insgesamt 10 µl enthielt:

- 4,6 µl cDNA
- 0,2 µl 10 µM forward primer
- 0,2 µl 10 µM reverse primer
- 5 µl SYBR 2x Mix

PowerSYBRGreen 2x Mix (Thermo Fisher Scientific inc., #4368702):

- SYBR Green Dye
- AmpliTaq Gold
- DNA Polymerase LD
- dNTPS mit dUTP/dTTP-Mischung
- Passive Reference 1
- Puffer

Reaktionsschritt der qPCR :

Tabelle 2.1. Reaktionsschritte der qPCR

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95°C	10 min	1x
95°C	30 sec	45x
57°C	30 sec	
60°C	30 sec	
95°C	30 sec	1x
60°C	30 sec	1x
95°C	15 sec	1x

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zunächst wurde 5x Roti-Quant-Reagenz (Carl Roth GmbH) 1:5 mit Wasser verdünnt. Jeweils 1µl Probe wurde mit 1 ml der Roti-Quant-Verdünnung für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Absorption wurde im Biophotometer plus (Eppendorf AG) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Leerwert diente der verwendete Puffer. War die Konzentration > 0,3, wurden die Proben mit dem Puffer verdünnt.

Mit Hilfe einer Eichgeraden, die auf einer Standardreihe mit BSA (Bovines Serumalbumin) beruhte, konnte über die Formel $y = mx + b$ die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.3.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die *SDS-PAGE* dient der Auftrennung von Proteinen nach der Methode von U.K. Laemmli (Brunelle & Green 2014; Matsumoto et al. 2019; Laemmli 1970). Das Gel wird unterteilt in ein Sammelgel und ein Trenngel. Durch die Komplexbildung an Natriumdodecylsulfat (SDS) zeigen alle Proteine eine einheitliche negative Ladung auf und wandern im elektrischen Feld zunächst durch das Sammelgel und anschließend durch das Trenngel

in Richtung der Anode. Durch ein kurzes Aufkochen der Proteinproben bei 95°C kommt es zur Denaturierung und Linearisierung der Proteine. Dies erlaubt eine Trennung der Proteine nach Größe welche proportional zu ihrem Molekulargewicht ist, da längere Proteine im Gel stärker zurückgehalten werden als kürzere. Acrylamid-Bisacrylamid dient als Quervernetzer der Acrylamid-Ketten. Durch die Zugabe des Katalysators TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl Ethylenediamine) und des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) wird die Polymerisation gestartet.

Die Proteinproben wurden zunächst mit einem 2x SDS-Puffer versetzt und anschließend für 5 Minuten bei 95°C aufgekocht. Als Proteinmarker wurden 5µl des *PageRulers* (Thermo Fisher Scientific Inc.) eingesetzt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 5%igem Polyacrylamid Sammelgel mit neutralem pH sowie ein 12%iges Polyacrylamid-Trenngel mit basischem pH.

Die Gelelektrophorese erfolgte anschließend für 2 Stunden bei 150 Volt einem Laufpuffer.

10% Laufpuffer (1 l):

- 188g Glycin
- 30,3 g Tris-Base
- 10 g SDS
- 1000 ml Wasser

2x SDS-Probenpuffer:

- 2,5 ml Tris (1 M, pH=6,9)
- 4 ml 10 % SDS
- 2 ml 100 % Glycerol
- 1 ml 2-Mercaptoethanol
- 200 µl 1% Bromphenolblau
- 300 µl Wasser

Trenngel 12% (40 ml):

- 13,2 ml Wasser
- 16 ml 30% acrylamide mix
- 10 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)

- 400 µl ammonium persulfate
- 16 µl TEMED

Sammelgel 6 ml:

- 4,1 ml Wasser
- 1,0 ml 30% acrylamide mix
- 750 µl 1,0 M Tris (pH 6,8)
- 6 µl 10% ammonium persulfate
- 6 µl TEMED

2.3.3. Western-blot

Die Elektrophorese in einer Nass-Blot-Kammer (Bio-Rad Laboratories Inc.) dient dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Immobilon P (Millipore Merck KGaA) Transfermembran. Die Transfermembran wurde zunächst 2 Minuten in Methanol aktiviert, kurz in Nuklease-freiem Wasser gewaschen und 10 Minuten zusammen mit dem SDS-Gel bei Raumtemperatur in 1x Western Buffer äquilibriert. Anschließend erfolgte der Transfer über Nacht bei 4°C bei 25 Volt in Western-Puffer. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde die Membran am folgenden Tag mit 5% Milch in 1x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung) mit 0,05% Tween (TBST) eine Stunde geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper schüttelnd bei Raumtemperatur oder bei 4°C. Die Inkubationszeiten und Verdünnungen unterschieden sich je nach Antikörper und sind im Anhang aufgeführt. Nach dem dreifachen Waschen der Membran mit TBST für 5 Minuten erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach erneuten dreifachem Waschen mit TBST wurde die Membran für 1 min bei RT mit einem Substrat inkubiert, welches an die am Sekundärantikörper gekoppelte *horseradish peroxidase* bindet. Dafür wurden die Reagenzien *Super Signal Luminol Enhancer Solution* und *Peroxide Solution* (ECL) (Thermo Fisher Scientific Inc.) 1:1 gemischt. Je nach Antikörper wurde auch ECL prime von GE Healthcare genutzt. Die Detektion erfolgte im ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Europe GmbH).

10x Western-Puffer (1 l):

- 30,3 g Tris-Base
- 144 g Glycin
- ad 1000 H₂O

1x Western-Puffer:

- 300 ml 10x Western-Puffer
- 2700 ml kaltes dd Wasser

10x TBS (1 l):

- 500 ml Tris (1 M, pH=7,4)
- 300 ml Natriumchlorid (5 M)
- 200 ml H₂O

2.4. Geräteliste

Tabelle 2.2.: Geräteliste

Material	Hersteller
Zentrifuge 5424	Eppendorf
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Vibrax VXR basic	IKA-Werke
Vibrax Genie 2	Scientific Industries
RT-PCR Maschine	Thermo Fisher Scientific Inc.
Wasserbad	Memmert
Zellkulturbank HERASafe KS	Thermo Fisher Scientific Inc.
CO ₂ -Brutschrank	Sanyo
Biophotometer plus	Eppendorf AG
Automatischer Zellzähler TC20	Bio-Rad Laboratories Inc.
Zell-Zähl Slides	Bio-Rad Laboratories Inc.
Genpulser Xcell	Bio-Rad Laboratories Inc.
Nass-Blot-Kammer	Bio-Rad Laboratories Inc.
PVDF- Immobilon P Transfermembran	Millipore Merck KGaA
ImageQuant LAS 4000-Gerät	GE Healthcare Europe
Nanodrop2000- Spektrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Mikrowelle	Bosch
Elektrophoresekammer für Agarosegele	European Molecular Biology Laboratory
M100	European Molecular Biology Laboratory
Elektrophoresekammer für SDS Page	Olympus EP50
V150	Heidolph
Mikroskop	Biometra

Rührgerät MR 3001 800W
 95 °C TB2 Thermoblock
 Spannungsgeber
 Thermomixer comfort
 Waage

Biometra Standard Power Pack 25
 Eppendorf
 Kern

2.5. Chemikalienliste

Tabelle 2.3.: Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller
PBS	Gibco Life Technologies
DMEM	Gibco Life Technologies
10% fetales Kälberserum	Gibco Life Technologies
1% Penicillin/ Streptomycin	Thermo Fisher Technologies
Chloroform	AppliChem GmbH.
Isopropanol	AppliChem GmbH.
100% Ethanol	Otto Fischar GmbH.
Glycogen	Roche Diagnostics GmbH.
Isoamylalkohol	Applichem ITW Companies
Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
PowerSYBRGreen 2xMix	Thermo Fisher Scientific Inc.
5x Roti-Quant-Reagenz	Carl Roth GmbH.
TEMED	AppliChem GmbH.
PageRulers	Thermo Fisher Scientific Inc.
ECL	Thermo Fisher Scientific Inc.
ECL Prime	GE Healthcare
30% acrylamide mix	Carl Roth GmbH.
GelRed	Biotium Inc.
Magermilchpulver	Sucofin
Ultrapure Agarose	Invitrogen by life technologies
RiboRulerHr	Thermo Fisher Scientific Inc.
Tryptan-Blau	Sigma-Aldrich GmbH.
Paraformaldehydlösung 4% in PBS (PFA)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Methanol	VWS International S.A.S
LPS	Sigma-Aldrich GmbH.
Actinomycin D	Sigma-Aldrich GmbH.
Vinculin-AK, V9131	Sigma-Aldrich GmbH.
CD-14-AK, 60253-1-Ig	Proteintech
CAPG-AK, GTX114301	Genetex
c-SCR-AK, a7950-1	Abcam
Pa-1-AK, sc-393387	Santa Cruz Biotechnology
Pick1-AK, 10983-2-AP	Proteintech
Kaninchen-HRP-AK, NA934V	GE Healthcare

Maus-HRP-AK, NA931V	GE Healthcare
TWEEN	Merck KGaA
Glycin	Roti Quant GmbH.
Tris-Base	Carl Roth GmbH.
1% (v/v) Triton X-100	Merck KGaA
50mM Tris-HCl	Sigma Aldrich GmbH
1mM DTT	Gerbu
1mM PMSF	Carl Roth GmbH
1µg/ml Pepstatin	AppliChem
2µg/ml Leupeptin	AppliChem
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH.
Guanidiniumthiocyanat	Carl Roth GmbH.
Ammoniumthiocyanat	Carl Roth GmbH.
Natriumacetat	AppliChem GmbH.
Glycerin	Roti Quant GmbH.
Aqua-Phenol	Carl Roth GmbH.
EDTA	Merck GmbH.
Eisessig	Carl Roth GmbH
Formamid	AppliChem GmbH.
Formaldehyd	SigmaAldrich GmbH.
1 M MOPS (pH=7,0)	AppliChem GmbH.
1% Bromphenolblau	ICN Biomedical GmbH.
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH.
2-Mercaptoethanol	SigmaAldrich GmbH.
APS	SigmaAldrich GmbH.

3. Ergebnisse

3.1. mRNA-Expression m⁶A-modifizierter mRNAs in RAW-264.7 Makrophagen nach LPS Stimulation

Die Zielsetzung der Arbeit bestand zunächst darin die mRNA- und Proteinexpression sowie die Stabilität spezifischer mRNAs in einem LPS-induziertem Entzündungsmodell in RAW264.7 Makrophagen zu untersuchen. Unsere Arbeitsgruppe identifizierte sieben mRNAs in RAW264.7 Zellen, die unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls (Kortel, N., et al., 2021) nach 6h LPS Stimulation (10ng/ml) eine signifikant veränderte m⁶A Methylierung aufweisen (Tabelle 3.1.). In meiner Arbeit untersuchte ich die Expression der differentiell methylierten mRNAs nach LPS-Stimulation, um festzustellen wie sich die m⁶A Methylierung in einem durch LPS-induzierten Entzündungsmodell auf die Genexpression auswirkt. Darüber hinaus, wurde die Stabilität dieser mRNAs bestimmt, um zu analysieren, ob die m⁶A Modifikation die mRNA-Stabilität beeinflussen könnte und so möglicherweise die Halbwertszeit reguliert.

mRNA	MG1	ENSEMBL Gene	ENSEMBL Transcript	alternative transcript	expressed product	NCBI	Chromosome [GRCm38.p6]	Cromos. strand	nts	amino acids	m6A sites
Znfx1	MG1:2138982	ENSEMBL:ENSMUSG00000039501	ENSMUST00000048988.14	Znfx1-201 E1-14 Znfx1-205 E1-8	protein	NM_001033196.2	Chromosome 2: 166,877,713-166,904,935	reverse	7218	1909	1
Evi2b	MG1:1890682	ENSEMBL:ENSMUSG00000093938	ENSMUST00000179322.2		protein	NM_001077496.1	Chromosome 11: 79,405,882-79,414,588	reverse	2751	869	14
Capg	MG1:1098259	ENSEMBL:ENSMUSG00000056737	ENSMUST00000071044.13		protein	NM_007599.4	Chromosome 6: 72,521,374-72,539,966	forward	1247	349	1
Pick1	MG1:894645	ENSMUSG00000068206.14	ENSMUST000000163571.8		protein	NM_008837.3	Chromosome 15: 79,113,582-79,133,666	forward	2043	416	3
CD14	MG1:88318	ENSMUSG00000051439	ENSMUST00000061829.8		protein	NM_009841.4	Chromosome 18: 36,858,120-36,859,851	reverse	1681	366	2
Rnf8	MG1:1929069	ENSEMBL:ENSMUSG00000090083	ENSMUST00000024817.15 ENSMUST00000172485.8 ENSMUST00000234362.2	Rnf8-201 Rnf8-206 Rnf8-210	protein NMD? E3 NMD? E3, ES protein	NM_021419.2 NM_030240.1	Chromosome 17: 29,833,764-29,863,965 Chromosome 7: 126,614,205-126,616,524	forward reverse	2096 1780 1448	488 199 253	5 24
PA-1	MG1:1914528	ENSEMBL:ENSMUSG00000030680	ENSMUST000000200948.2								

Tabelle 3.1. Differenziell m⁶A methylierte mRNAs nach LPS-Stimulation

mRNAs, für die nach 6 Stunden LPS Stimulation durch RNAseq eine signifikante differentielle m⁶A Methylierung ermittelt wurde und deren *methylation-sites* durch m6Aboost validiert werden konnten. **Znfx1, Evi2b, CapG und Pick1** mRNA zeigen eine erhöhte m⁶A Methylierung, die m⁶A Methylierung der **Cd14, Rnf8 und Pa-1** mRNA ist dagegen reduziert.

Um die Rolle der ausgewählten mRNA-Targets in der LPS-stimulierten Entzündungsreaktion von RAW264.7 Makrophagen zu untersuchen, analysierten wir zunächst deren Expression in Makrophagen, die zu den gegebenen Zeiten (0h, 2h und 6h) mit 10 ng/ml LPS stimuliert wurden. Nach Extraktion der Gesamt-RNA, folgte die Überprüfung der RNA-Reinheit und der Integrität mittels Nanodrop und RNA-Agarose-

Gelelektrophorese (Anhang 1). Die verschiedenen Primer für die qPCR der Zielstrukturen sind im Anhang 2 aufgeführt.

Zur Bestimmung der relativen mRNA-Expression wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001) angewandt und die ermittelten Werte auf die mRNA des Referenzgens *Ndufv1* normalisiert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Stimulation mit LPS, wurde die Expression der *Tnfa* mRNA bestimmt. Die *Tnfa* mRNA-Expression steigt nach zweistündiger LPS-Stimulation auf das ca. 60-fache an und sinkt nach 6 Stunden wieder auf das ca. 15-fache des Ausgangswertes ab (Abb.3.1.A). Dagegen zeigt die mRNA-Expression von *Actb* kaum eine Änderung nach LPS-Behandlung, nach zweistündiger Stimulation steigt die Expression auf das ca. 1,5-fache, nach sechsstündiger Exposition auf das ca. 2-fache an (Abb.3.1.A).

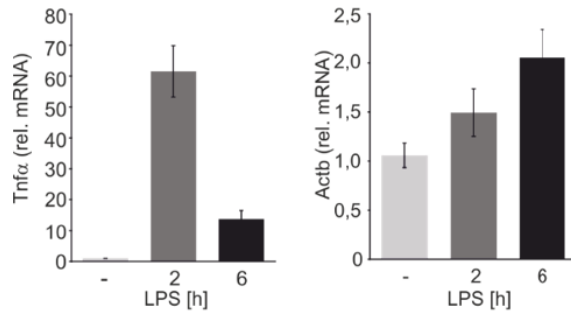
Für die mRNAs, welche die Proteine *Zinc Finger NFX1-Type Containing 1* (*Znfx1*), *Ecotropic Viral Integration Site 2B* (*Evi2b*), *Gelsolin-like capping actin protein* (*Capg*) und *Protein Interacting With PRKCA 1* (*Pick 1*) kodieren, wurde eine erhöhte m⁶A Methylierung nach LPS Stimulation ermittelt.

Nach zweistündiger LPS Stimulation ist die relative mRNA-Expression von *Znfx1* unverändert und steigt nach 6 Stunden auf das ca. 6-fache an (Abb.3.1.B). Die relative *Evi2b* mRNA-Expression zeigt einen zeitabhängigen Anstieg nach zwei und sechs Stunden. Nach zwei Stunden steigt die *Evi2b*-mRNA Menge auf das ca. 1,2-fache, nach sechs Stunden auf das ca. 1,5-fache an (Abb.3.1.B). Auch die Werte der *Capg*-mRNA qPCR zeigen einen Anstieg. Nach zwei Stunden steigt die Expression von *Capg* auf das ca. 1,2-fache und nach sechs Stunden auf das ca. 1,4-fache an (Abb.3.1.B). Die Konzentration der mRNA von *Pick1* fällt nach zwei Stunden auf das ca. 0,8-fache ab und steigt nach sechs Stunden wieder ungefähr auf das Ausgangsniveau an (Abb.3.1.B).

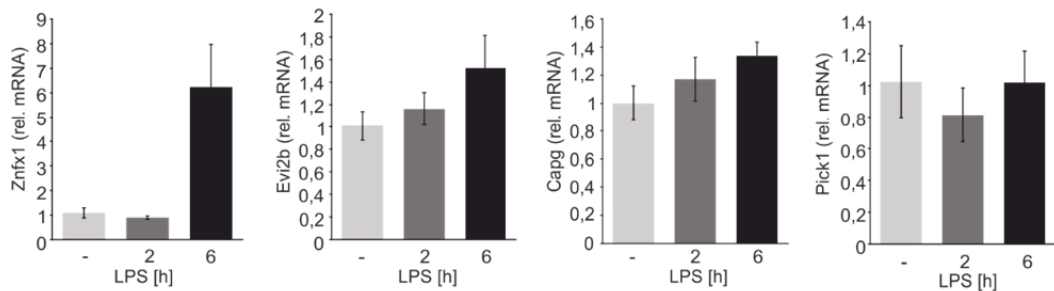
Die mRNAs *Human monocyte differentiation antigen (Cd-14)*, *PAXIP1 Associated Glutamate Rich Protein 1* (*Pa-1*) und *Ring Finger Protein 8* (*Rnf8*) zeigen eine verminderte m⁶A Methylierung nach Stimulation mit LPS auf. Die relativen mRNA-Werte von *Cd14* zeigen einen zeitabhängigen Anstieg nach zwei und sechs-stündiger Stimulation auf das ungefähr zwei und 4,5-fache des Ausgangswertes (Abb.3.1.C). Die relative mRNA-Konzentration von *Rnf8* sinkt nach LPS-Stimulation der Zellen. Nach zwei Stunden sinkt die *Rnf8* Expression auf das 0,7 fache ab und steigt nach sechs Stunden wieder auf das

0,8-fache des Ausgangswertes an (Abb.3.1.C). Auch die mRNA-Expression von *Pa-1* sinkt nach einer Stimulation mit LPS. Nach zweistündiger Induktion, fällt die mRNA-Expression auf das 0,6-fache und steigt nach sechs Stunden wieder ca. auf den Ausgangswert an (Abb.3.1.C).

A)



B)



C)

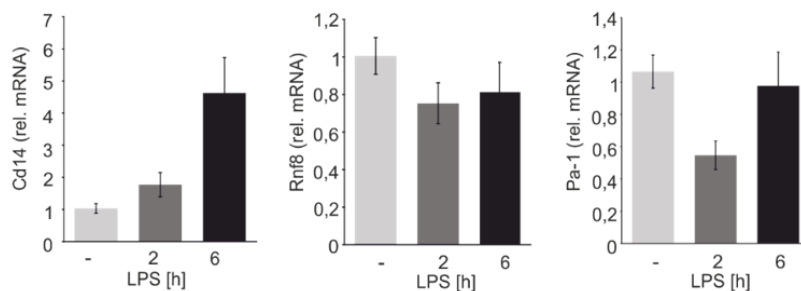


Abb.3.1: Zeitangängige Expression differentiell m⁶A-modifizierter mRNAs in RAW264.7 Makrophagen nach LPS-Stimulation

Effekt der LPS Stimulation mit 10ng/ml für 0h, 2h und 6h auf die Expression ausgewählter mRNAs in RAW264.7 Makrophagen. Die mRNA-Expression von *Tnfa*, *Actb*, *Znfx1*, *Evi2b*, *Capg*, *Pick1*, *Cd14*, *Pa-1* und *Rnf8* wurden mittels qPCR bestimmt. *Ndufv1* wurde als Normalisierungskontrolle verwendet. **(A)** Die mRNA-Expression von *Tnfa* und *Actb* dient als Kontrolle für eine erfolgreiche LPS-Stimulation. **(B)** Expression der *Znfx1*, *Evi2b*, *Capg* und *Pick1* mRNAs, die eine erhöhte m⁶A Methylierung nach LPS Stimulation

zeigten. **(C)** Expression der *Cd14*, *Rnf8* und *Pa-1* mRNAs, die eine verringerte m⁶A Methylierung nach LPS Stimulation zeigten.

3.2.Expression der durch differenziell m⁶A methylierte mRNAs kodierte Proteine

In weiterführenden Experimenten wurde mit spezifischen Antikörpern, die nur für die Proteine CAPG, Pick1, PA-1 und CD14 verfügbar waren, im Western Blot untersucht, wie sich eine LPS-induzierte Entzündungsreaktion auf die Proteinexpression von CAPG, PICK1, PA-1 und CD14 auswirkt. CAPG und PICK1 zeigen auf mRNA-Ebene nach LPS-Stimulation eine erhöhte m⁶A Methylierung auf. PA-1 und CD14 hingegen zeigen nach LPS-Induktion auf der Ebene der mRNA eine erniedrigte m⁶A Methylierung auf.

RAW264.7 Zellen wurden 0h, 2h und 6h mit 10ng/ml LPS stimuliert, anschließend wurden die Gesamtzell-Lysate präpariert. Als Ladekontrolle wurde VINCULIN, welches nach LPS-Stimulation keine Veränderung in der Expression aufweist, genutzt. Als Kontrolle für eine erfolgreiche LPS-Induktion wurde die cSRC Proteinexpression analysiert (Liepelt et al. 2014) (Abb.3.2.A). Auf Protein-Ebene zeigen CD14, PA-1 und PICK1 einen zeitabhängigen signifikanten Anstieg nach zwei und sechs Stunden (Abb.3.2.B). CAPG weist keine signifikante Veränderung nach LPS-Stimulation des Protein-Levels auf (Abb.3.2.B).

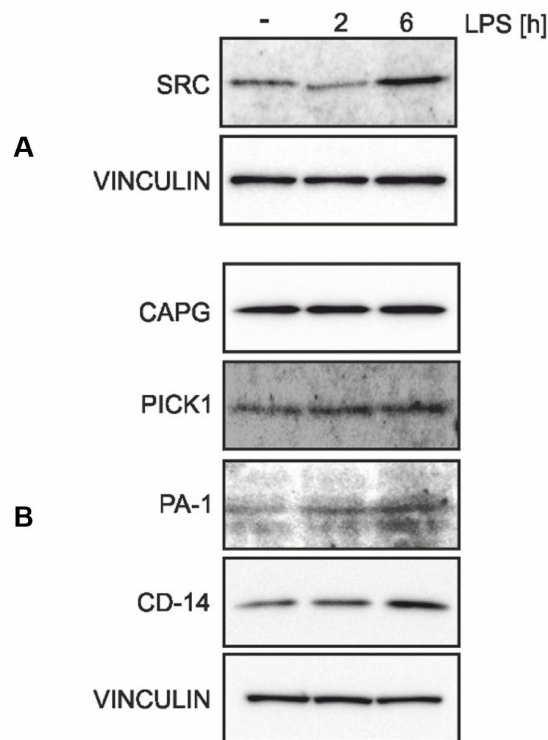


Abb.3.2.: Zeitabhängige Analyse der Protein-Expression von m⁶A-methylierten mRNA in LPS-stimulierten Makrophagen

Der Effekt einer LPS-induzierten Entzündungsreaktion auf die Proteinexpression der ausgewählten mRNAs *Capg*, *Pick1*, *Pa-1*, *Cd14* wurde in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit geeigneter Antikörper mittels Western-blots bestimmt. RAW264.7 Makrophagen wurden für 0h, 2h und 6h mit 10 ng/ml LPS induziert. **(A)** VINCULIN diente als interne Kontrolle. Das Protein SRC diente dem Nachweis der erfolgreichen LPS Induktion der Makrophagen (Liepelt et al. 2014). **(B)** Expressionslevel der Proteine CAPG, PICK1, PA-1 und CD14 nach LPS Stimulation. VINCULIN dient als interne Expressionskontrolle. Für CD14 wurden 5µg, für CAPG 5-10µg, für PA-1 50µg und für PICK1 20-40µg Tritonlysate auf das Gel geladen.

3.3. Einfluss der differenziellen m⁶A Methylierung auf die Stabilität der modifizierten mRNAs

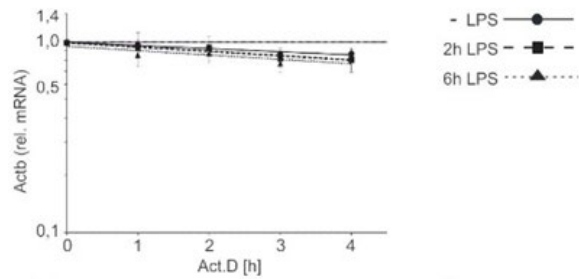
In weiterführenden Experimenten wurde die Stabilität der mRNAs nach LPS-Stimulation untersucht. RAW264.7 Zellen wurden für 0h, 2h und 6h mit LPS aktiviert und anschließend für die angegebenen Zeiten (0h, 1h, 2h, 3h und 4h) mit Actinomycin D, welches die mRNA-Transkription inhibiert (Lai et al. 2019) behandelt.

Die Stabilität der *Actb* mRNA, die als Kontrolle dient, wird nicht beeinflusst (Abb.3.3.A). Für die mRNAs, die eine verstärkte m⁶A Methylierung nach LPS-Induktion aufweisen,

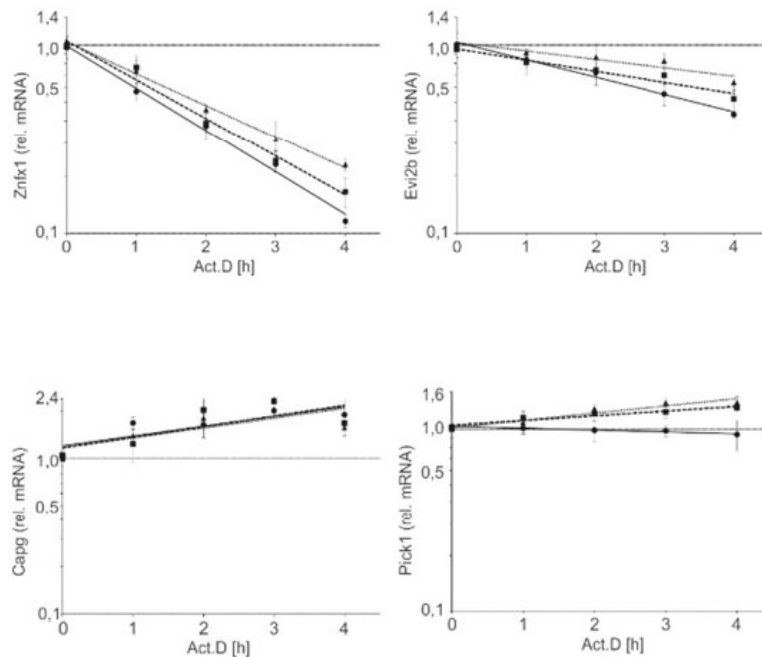
zeigt sich, dass die LPS-Stimulation von 264.7 Zellen die Stabilität der *Znfx1*, *Evi2b* und *Pick1* mRNA signifikant erhöht (Abb.3.3.B), während die Stabilität der *Capg* mRNA nicht durch eine LPS-Induktion beeinflusst wird (Abb.3.3.B). Die Stabilität der *Evi2b* und *Znfx1* mRNA zeigt eine signifikante zeitabhängige Erhöhung nach zwei -und sechsständiger LPS-Stimulation, während die Stabilität der *Pick* mRNA einen geringeren zeitabhängigen Effekt nach LPS-Stimulation aufweist. Die Stabilität der *Pick* mRNA nach sechs Stunden LPS-Stimulation ist nur geringfügig höher als nach zwei Stunden, während die Stabilität der mRNA von *Evi2b* und *Znfx1* nach sechs Stunden signifikant höher ist als nach zwei Stunden Stimulation (Abb.3.3.B).

Ein unterschiedliches Bild ergibt sich auch für die mRNAs mit verminderter m⁶A Methylierung. Die Stimulation der Makrophagen mit LPS über sechs Stunden führt zu einer Erhöhung der Stabilität der *Cd14* mRNA. Eine Stimulation über zwei Stunden hingegen hat noch keinen signifikanten Effekt auf die Stabilität der *Cd14* mRNA (Abb.3.3.C). Die Stabilität der *Pa-1* mRNA ist nach zwei Stunden LPS-Stimulation signifikant reduziert, während eine Stimulation über sechs Stunden zu einer leichter Erhöhung der Stabilität führt (Abb.3.3.C). Die Stabilität der *Rnf8* mRNA ist nach zweistündiger Stimulation leicht und nach sechs Stunden LPS-Stimulation signifikant erhöht (Abb.3.3.C).

A)



B)



C)

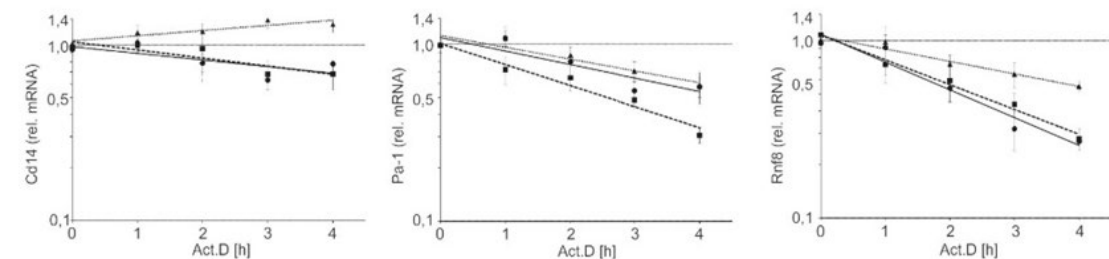


Abb. 3.3.: Stabilität der m⁶A-methylierter mRNAs in LPS stimulierten Makrophagen

Effekt einer LPS Stimulation auf die Stabilität der mRNA von *Actb*, *Znfx1*, *Evi2b*, *CapG*, *Pick1*, *Cd14*, *Pa-1* und *Rnf8*. RAW 264.7 Makrophagen wurden 0h, 2h und 6h mit LPS stimuliert. Actinomycin D wurde hinzugefügt um die mRNA Transkription zu inhibieren (Lai et al. 2019). Zur Normalisierung diente die exogen hinzugefügte *Luc* mRNA (A) Als Kontrolle diente die *Actb* mRNA. (B) Stabilität der mRNAs mit erhöhter m⁶A Methylierung nach LPS-Stimulation. (C) Stabilität der mRNAs mit verminderter m⁶A Methylierung nach LPS-Induktion.

4. Diskussion

4.1. Expression differentiell m⁶A modifizierter mRNAs in RAW264.7

Makrophagen nach LPS-Stimulation

Zu Beginn der Arbeit wurde untersucht, wie sich die während der Aktivierung von Makrophagen mit LPS veränderte m⁶A Methylierung spezifischer mRNAs, *Evi2b*, *Znfx1*, *Capg*, *Pick1*, *Cd14*, *Rnf8* und *Pa-1*, auf deren Stabilität und die Expression der durch sie kodierten Proteine auswirkt. Da die m⁶A Methylierung die Stabilität, Translation und Funktion der mRNA beeinflussen kann, könnte eine veränderte m⁶A Methylierung nach LPS-Stimulation möglicherweise die Immunantwort auf Pathogene regulieren (Feng et al. 2018; Wang et al. 2019; Feng et al. 2021).

Die Expression der *Evi2b* und *Capg* mRNAs ist nach zwei und sechs Stunden LPS-Stimulation erhöht (Abb.3.1.B). Die *Znfx1* mRNA-Expression nimmt nach zweistündiger LPS-Stimulation zunächst leicht ab und steigt nach sechs Stunden signifikant an (Abb.3.1.B). Für die *Pick1* mRNA deutet sich eine Reduktion der Expression nach zwei Stunden Stimulation mit LPS an, nach sechs Stunden erreicht sie wieder das Ausgangsniveau (Abb. 3.1.B). Die erhöhte m⁶A Methylierung der *Evi2b*, *Znfx1*, *Capg* und *Pick1* mRNA deutet darauf hin, dass diese Modifikation des Epitranskriptoms eine immunregulatorische Wirkung haben könnte.

PICK1 besitzt entzündungshemmende Fähigkeiten und trägt dazu bei, die Aktivierung von NF-κB zu hemmen und die M1-Makrophagenpolarisierung, welche die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine auslöst, zu unterdrücken (Xie et al. 2016; Kadomoto et al. 2021; Bashir et al. 2016). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine Stimulation mit LPS für zwei Stunden zu einer Reduktion der mRNA-Expression führt (Abb.3.1.B). Die Reduktion seiner Expression nach LPS-Stimulation könnte dazu führen, dass diese hemmenden Mechanismen weniger effektiv sind und zu einer verstärkten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führen, um die Entzündungsreaktion zu verstärken.

CAPG, ein Aktin-bindendes Protein, ist an der Regulation der Aktin-Dynamik beteiligt und spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und Zelladhäsion (Yun et al. 2018; Witke et al. 2001; Fu et al. 2022). Die Beteiligung von CAPG an der Progression der akuten myeloischen Leukämie und der Aktivierung des NF-κB-Signalwegs, deuten darauf hin,

dass CAPG möglicherweise eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Immunreaktion hat (Ma et al. 2023). Eine Ausschaltung von CAPG führt zu einer Reduktion der Expression, von NF- κ B nachgeschalteten Genen (Ma et al. 2023). Die nachgewiesene Erhöhung der *Capg* mRNA-Expression nach LPS-Stimulation, deutet darauf hin, dass *Capg* direkt durch immunstimulierende Signale beeinflusst wird und möglicherweise an grundlegenden zellulären Prozessen der Immunantwort beteiligt ist (Abb.3.1.B). Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die funktionelle Bedeutung von CAPG in der Immunantwort und dem NF- κ B-Signalweg zu klären.

Die *Znfx1* mRNA zeigt eine dynamische Reaktion auf die LPS Stimulation (Abb.3.1.B). ZNFX1 ist möglicherweise in der frühen Immunantwort auf LPS von Bedeutung und seine Expression wird im Laufe der Zeit moduliert. ZNFX1, ein RNA bindendes Protein gehört zur Familie der *zinc finger proteins*, die eine breite Palette von Funktionen in der Regulation der Genexpression und der Zelldifferenzierung haben (Liu et al. 2024; Laity et al. Wright 2001; Cassandri et al. 2017). Studien legen nahe, dass ZNFX1 an der Regulation von Autophagie, Reaktionen auf Virusinfektionen und der Pathogenese infektiöser Erkrankungen, einschließlich der Tuberkulose, beteiligt ist (Laity et al. Wright 2001; Cassandri et al. 2017; Liu et al. 2024; Vavassori et al. 2021). ZNFX1 reguliert die Reaktion auf Virusinfektionen und ein Mangel prädisponiert für schwere Infektionen sowie entzündliche Multisystemerkrankungen (Vavassori et al. 2021). Unsere Resultate legen nahe, dass ZNFX1 nach Stimulation mit LPS verstärkt exprimiert wird und die Immunantwort moduliert.

EVI2B spielt eine wichtige Rolle bei der myeloischen Differenzierung und der Funktion hämatopoetischer Vorläuferzellen (Zjablovskaja et al. 2017). Die Expression von EVI2b ist in reifen neutrophilen Granulozyten und Monozyten, die Schlüsselkomponenten des Immunsystems sind, am höchsten (Dai et al. 2023; Zjablovskaja et al. 2017). Die Beobachtung einer erhöhten *Evi2b* mRNA-Expression von nach LPS-Stimulation legt nahe, dass dieses Gen auch eine Rolle in der LPS-Antwort spielen könnte (Abb.3.1.B). Da neutrophile Granulozyten und Monozyten als Komponenten des Immunsystems an der Antigen-Eliminierung beteiligt sind, könnte die Regulation von EVI2B deren Funktionen während der Immunantwort modulieren (Mayadas et al. Lowell 2014).

Die m⁶A Methylierung der *Cd14*, *Pa-1* und *Rnf8* mRNAs ist nach LPS-Stimulation reduziert, was auf eine Modulation der Expression dieser Gene durch differentielle

mRNA m⁶A Methylierung im Zusammenhang mit LPS-induzierter Immunantwort hinweist. Dies legt nahe, dass die Methylierung dieser Gene durch die Immunstimulation beeinflusst wird und die Regulation und die Expression der Gene in der Immunantwort verändern.

Cd14, zeigt eine zeitabhängige Erhöhung der mRNA-Expression nach LPS-Stimulation (Abb.3.1.C). CD14 ist ein wichtiger Rezeptor des angeborenen Immunsystems, der eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des TLR4/MD2-Komplexes durch LPS spielt (Beutler & Rietschel 2003; Anas et al. 2010; Ciesielska et al. 2021; Borzecka et al. 2013). Die Bindung von CD14 an LPS führt zur TLR4-abhängigen Aktivierung des MyD88- und TRIF-Signalweges (Kim & Kim 2017; Huber-Lang et al. 2014; Ciesielska et al. 2021). Die beobachtete zeitabhängige Erhöhung der *Cd14* mRNA-Expression nach LPS-Stimulation zeigt, dass Makrophagen mit erhöhter CD14-Expression auf die Immunstimulation reagieren (Abb.3.1.C). Eine Reduktion der *Cd14* mRNA-m⁶A Methylierung könnte zu einer verstärkten Expression des Rezeptors führen und so dazu beitragen die Aktivierung der MyD88- und TRIF-Signalwege zu initiieren, um eine schnellere und effektivere Antwort auf die LPS Stimulation zu gewährleisten.

RNF8 ist eine E3 Ligase, die wichtige Funktionen bei RNA-Reparaturvorgängen hat und zudem die NF-κB-induzierte Entzündungsreaktion moduliert (Gao et al. 2017; Mailand et al. 2007). RNF8 wurde als negativer Regulator des TNFα-induzierten NF-κB-Signalweg identifiziert (Gao et al. 2017). Der Transkriptionsfaktor NF-κB spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Immunantwort und reguliert die Expression von mehreren immunologisch bedeutenden Genen wie Zytokinen (Gao et al. 2017; Lawrence 2009). Die Ergebnisse der qPCR, zeigen, dass die mRNA-Expression von *Rnf8* nach LPS Stimulation reduziert ist (Abb.3.1.C). Dies könnte darauf hindeuten, dass die negative Kontrolle des NF-κB-Signalwegs mit dem Beginn der durch LPS-induzierten Entzündungsreaktion aufgehoben wird. Durch die Reduktion der *Rnf8* mRNA-Expression könnte der NF-κB-Signalweg und damit die Entzündungsreaktion verstärkt werden.

PA-1, ist ein Protein, das an der Regulation der zellulären Antwort auf DNA-Schäden und DNA-Reparatur beteiligt ist (Gong et al. 2009). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass eine LPS-Stimulation zunächst zu einer Reduktion und anschließend einem erneuten Anstieg der mRNA-Expression auf Ausgangsniveau führt (Abb.3.1.C). Dies könnte darauf

hindeuten, dass PA-1, Teil eines Regulationsmechanismus ist, der die Expression von Genen, die an der Immunantwort beteiligt sind, koordiniert. Dies könnte bedeuten, dass die Zellen auf die anfängliche LPS-Stimulation reagieren, indem sie die Transkription von *Pa-1* vorübergehend herunterregulieren, um die Immunantwort zu modulieren und dann die Expression wieder normalisieren, wenn die akute Antwort auf den Stimulus nachlässt. Die vorübergehende Reduktion und der sich anschließende Anstieg der *Pa-1* mRNA-Expression könnten wichtige Schritte sein, um die Immunantwort zeitlich zu koordinieren und das Gleichgewicht zwischen Entzündung und Immunregulation aufrechtzuerhalten.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die funktionelle Rolle der m⁶A Methylierung bei der Regulation der mRNA-Expression während der LPS-induzierten Entzündungsreaktion zu verstehen. Die m⁶A Methylierung beeinflusst die mRNA-Stabilität und Translation, eine Veränderung nach LPS-Stimulation könnte also eine direkte Auswirkung auf die mRNA Expression haben (Feng et al. 2021; Feng et al. 2018; Wang et al. 2019). Die Verwendung eines METTL3-Inhibitors, welcher gezielt die m⁶A Methylierung hemmt, und die anschließende Untersuchung der Expression der differentiell m⁶A methylierten mRNAs nach LPS-Stimulation könnte wichtige Einblicke in die Mechanismen liefern, durch die die m⁶A Methylierung die Immunantwort moduliert. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der Immunantwort und potenziell zur Identifizierung neuer therapeutisch relevanter mRNA Modifikationen führen.

4.2. Expression der durch differenziell m⁶A methylierte mRNAs kodierten Proteine

Für CAPG, PICK1, PA-1 und CD14 wurde nicht nur die relative mRNA-Expression, sondern auch die Proteinsynthese nach LPS-Induktion mittels Western blot analysiert. CD14, PA-1 und PICK1 zeigen auf Proteinebene nach LPS-Stimulation einen zeitabhängigen Anstieg (Abb3.2.B). CAPG zeigt nach LPS Stimulation keine Veränderung der Protein-Expression (Abb3.2.B).

Der Transmembranrezeptor CD14, spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung von LPS und der nachfolgenden Aktivierung des TRIF und MyD88-Signalweges (Ciesielska

et al. 2021; Gangloff et al. 2005; Zanoni et al. 2011; Borzecka et al. 2013). Der zeitabhängige Anstieg von CD14 auf mRNA- und Proteinebene deutet darauf hin, dass die Zellen auf die LPS-Stimulation reagieren, indem sie die Produktion von CD14 erhöhen, umso möglicherweise die Immunantwort zu verstärken (Abb.3.1.C, Abb.3.2.B). Die Regulation von CD14 erfolgt also nicht nur auf transkriptionaler Ebene, sondern auch post-transkriptional.

PICK1 besitzt möglicherweise entzündungshemmende Eigenschaften (Xie et al. 2016). Auf mRNA-Ebene zeigte sich nach einer Stimulation mit LPS eine Abnahme der Expression (Abb.3.1.B). Dagegen wurde eine erhöhte PICK1-Proteinsynthese in Gegenwart von LPS detektiert (Abb.3.2.B). Der beobachtete zeitabhängige Anstieg der PICK1 Proteinexpression ist möglicherweise auf eine post-transkriptionale Regulation, die eine effizientere mRNA Translation bewirkt, zurückzuführen. Dies könnte durch verschiedene Mechanismen geschehen, wie z. B. eine verstärkte Initiation der mRNA-Translation. Die möglichen entzündungshemmenden Funktionen von PICK1 (Xie et al. 2016) könnten dadurch verstärkt werden. Dies unterstreicht eine auf verschiedenen Ebenen regulierte mögliche Funktion von PICK1 bei der Modulation der Immunreaktion.

PA-1 ist als Gen-spezifischer Transkriptionsregulator beschrieben, der mit dem MLL3/MLL4-haltigem Histon-H3K4-Methyltransferase-Komplex assoziiert ist (Cho et al. 2007). Der Verlauf der PA-1-Expression zeigt einen Anstieg der Proteinsynthese nach LPS-Stimulation (Abb.3.2.B). Die unterschiedliche Regulation auf mRNA- und Proteinebene weist auf komplexe Kontrollmechanismen hin, die eine dynamische PA-1-Regulation ermöglichen. Um die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Regulation zu verstehen, sind weitere Untersuchungen nötig.

CAPG zeigt auf Proteinebene keine signifikante Veränderung nach LPS-Induktion (Abb.3.2.B), obwohl das mit NF- κ B assoziierte CAPG möglicherweise eine bedeutende Rolle in der Immunantwort spielt (Ma et al. 2023). Wir konnten keine Abhängigkeit der CAPG Expression von der LPS-Stimulation nachweisen, eine mögliche Regulation zu einem späteren Zeitpunkt könnte durch eine verlängerte Untersuchungszeit analysiert werden.

Weiterführende Untersuchungen zu den Auswirkungen der mRNA m⁶A Methylierung auf die Expression spezifischer Proteine nach LPS-Induktion werden dazu beitragen, die Funktion der m⁶A Methylierung im Rahmen der Kontrolle und Modulation von bakteriell verursachten Entzündungsprozessen besser zu verstehen. Die Bestimmung der Proteinexpression nach Reduktion der m⁶A Methylierung mit einem METTL3-Inhibitor wird dazu eine geeignete Methode sein. Der Abgleich der Proteindaten mit den Ergebnissen der mRNA-Expression wird Aufschluss über Korrelationen der veränderten Proteinsynthese mit der mRNA-Expression geben und zum Verständnis der Funktion der m⁶A Methylierung bei der Regulation der mRNA Translation beitragen.

4.3. Einfluss der differenziellen m⁶A Methylierung auf die Stabilität der modifizierten mRNAs

In Experimenten in denen RAW264.7 Makrophagen mit Actinomycin D behandelt wurden, welches die Transkription der mRNA inhibiert (Lai et al. 2019), wurde untersucht, ob die unter LPS-Stimulation veränderte m⁶A Methylierung die Stabilität der modifizierten mRNAs beeinflusst. N⁶ Methyladenosin beeinflusst unter anderem mRNA *Splicing*, Transport und Abbau (Liu & Gregory 2019; Shi et al. 2019). Eine veränderte m⁶A Methylierung nach LPS-Stimulation könnte daher regulatorisch in der Immunantwort wirken, wenn über eine veränderte mRNA-Stabilität die Synthese der Proteine in der Entzündungsreaktion zeitlich koordiniert wird.

Evi2b und *Znfx1* mRNA weisen eine erhöhte m⁶A Methylierung auf. Die Stabilität beider mRNAs ist nach LPS-Aktivierung der Makrophagen signifikant erhöht (Abb.3.3.B). Der Anstieg der mRNA-Expression (Abb.3.1.B) und die gleichzeitige Zunahme der Stabilität der *Evi2b* und *Znfx1* mRNA nach LPS-Stimulation könnten Teil eines komplexen Regulationsnetzwerkes sein, das darauf abzielt, die Expression dieser Gene zeitlich zu koordinieren und an die Anforderungen der Immunantwort anzupassen. Die erhöhte m⁶A Methylierung kann dazu beitragen, sowohl die mRNA Expression, als auch die mRNA Stabilität zu erhöhen.

Die Beobachtung, dass die Stabilität der *CapG* mRNA durch eine LPS-Induktion nicht verändert wurde (Abb.3.3.B), zeigt, dass die *CapG* mRNA-Stabilität kein regulatorischer

Angriffspunkt während der Immunantwort ist. Die Zunahme der *Capg* mRNA-Expression (Abb.3.1.B) ohne Veränderung der mRNA-Stabilität (Abb.3.3.B) weist darauf hin, dass die Regulation von CAPG hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene erfolgt. Die Transkription des Gens kann gesteigert werden, um die Anforderungen der Immunantwort zu erfüllen. Die erhöhte m⁶A Methylierung scheint dies nicht zu beeinflussen.

Die Stabilität der *Pick1* mRNA ist nach LPS-Stimulation erhöht (Abb.3.3.B.), das korreliert mit einer gesteigerten m⁶A Methylierung, die dazu beitragen kann, dass die Stabilität der *Pick1* mRNA während der Immunantwort aufrechterhalten wird. Die dynamische Regulation der *Pick1* mRNA-Expression (Abb.3.1.B) und die erhöhte Stabilität, weisen auf eine Funktion von PICK1 in der Immunantwort hin.

Dass eine sechs-stündige LPS-Stimulation zu einer erhöhten Stabilität der *Cd14* mRNA führt, während eine Stimulation über zwei Stunden keinen signifikanten Einfluss hat, ist ein Hinweis darauf, dass nach Immunstimulierung eine zeitabhängige Regulation der *Cd14* mRNA-Stabilität erfolgt (Abb.3.3.C). Eine erhöhte Stabilität der mRNA, stellt möglicherweise sicher, dass zur Aufrechterhaltung der Immunantwort mehr CD14 synthetisiert werden kann. Durch die Reduktion der m⁶A Methylierung der *Cd14* mRNA nach LPS Stimulation wird möglicherweise die Interaktion mit m⁶A *Readern* vermittelt, die wiederum die mRNA Stabilisierung und die Translationsrate beeinflussen könnten. Der Anstieg der CD14 Synthese unterstützt dann die Aktivierung von Immunzellen und verstärkt die Entzündungsreaktion.

Die Stabilität der *Rnf8* mRNA ist erst nach sechs Stunden LPS-Stimulation signifikant erhöht (Abb.3.3.C). Der langsame Anstieg der *Rnf8* mRNA Stabilität kann für den Aufbau einer langanhaltenden und effektiven Immunantwort der Makrophagen erforderlich sein. Die reduzierte m⁶A Methylierung kann zu einer erhöhten mRNA Stabilität nach der Aktivierung durch LPS beitragen und damit zur Sicherung einer angemessenen Immunantwort.

Die Beobachtung, dass eine zweistündige Stimulation mit LPS zu einer Reduktion der Stabilität der *Pa-1* mRNA führt, während eine sechsstündige Stimulation zu einer leichten Erhöhung der Stabilität führt, deutet darauf hin, dass PA-1 während der Immunantwort dynamisch reguliert wird (Abb.3.3.C) . Eine kurzfristige Exposition gegenüber LPS könnte eine schnelle Immunantwort auslösen die zu einer Verringerung

der Stabilität der *Pa-1* mRNA führt. Die Erhöhung der Stabilität der *Pa-1* mRNA nach sechsstündiger Stimulation, deutet auf eine Modulation der PA-1 Expression im Verlauf der LPS-abhängigen Immunreaktion hin. Eine längere LPS-Exposition bewirkt dann eine Anpassung der mRNA Stabilität. Dies wäre ein durch LPS induziertes zelluläres Programm zur Adaption der PA-1 Synthese über einen längeren Zeitraum, um die Immunantwort aufrechtzuerhalten oder zu verstärken.

Weitere Untersuchungen sind zum Verständnis dafür notwendig, wie die m⁶A-Methylierung die Stabilität der untersuchten mRNAs während der Immunantwort auf LPS beeinflusst. Durch eine Analyse der RNA Abbaukinetik könnte ein möglicher Einfluss der m⁶A Methylierung auf den Abbau der mRNA nach LPS Stimulation aufgeklärt werden.

5. Zusammenfassung

Eine Auswertung von *RNAseq* Daten mit dem auf maschinellem Lernen beruhenden Algorithmus m6Aboost ermöglichte die Identifizierung von sieben mRNAs, die nach LPS-Stimulation signifikante Veränderungen in ihren post-transkriptionalen m⁶A Modifikationen aufweisen. Die in DRACH-Motiven lokalisierten m⁶A modifizierten Adenosine waren nach LPS-Stimulation in einem signifikant größeren Anteil der *Znfx1*, *Evi2b*, *Capg* und *Pick1* mRNAs detektierbar, während die m⁶A Methylierung der spezifischen Adenosine in den mRNAs *Cd14*, *Pa-1* und *Rnf8* vermindert war.

Ziel der Arbeit ist es, die mRNA- und Proteinexpression sowie die Stabilität der differenziell m⁶A methylierten mRNAs in einem LPS-induziertem Entzündungsmodell zu untersuchen.

Die *Znfx1* mRNA Expression zeigt nach LPS-Stimulation eine komplexe zeitabhängige Regulation mit einer anfänglichen leichten Reduktion, gefolgt von einem signifikanten Anstieg nach sechs Stunden. Die erhöhte Stabilität der *Znfx1* mRNA nach LPS-Stimulation könnte dazu beitragen, eine gesteigerte ZNFX1 Proteinsynthese zu unterstützen, deren Nachweis, hier jedoch aufgrund nicht verfügbarer Antikörper nicht möglich war.

Die *Evi2b* mRNA weist nach LPS-Stimulation einen zeitabhängigen Anstieg auf, der mit einer erhöhten Stabilität der mRNA einhergeht. Dies deutet darauf hin, dass die gesteigerte *Evi2b* mRNA Synthese während der Immunantwort durch eine erhöhte Stabilität der mRNA unterstützt wird.

Die Expression der *Capg* mRNA wird durch LPS-Stimulation erhöht, die mRNA Stabilität und die Synthese des Proteins CAPG bleiben jedoch unbeeinflusst.

Für die *Pick1* mRNA wurde eine zweiphasige Regulation mit einer anfänglichen Abnahme und anschließenden Rückkehr auf das Ausgangsniveau ermittelt. Die Stabilität der *Pick1* mRNA ist nach LPS-Stimulation erhöht. Die unter LPS leicht erhöhte PICK1-Synthese, deutet auf eine immunologisch relevante Funktion hin.

Die Synthese der *Cd14* mRNA wird durch LPS verstärkt, auch die mRNA Stabilität ist erhöht. Diese Effekte resultieren in einem gut detektierbaren Anstieg der CD14 Proteinsynthese. Dies kann durch die Rolle von CD14 bei der Aktivierung des TLR4-Rezeptors bedingt sein und hebt seine LPS-abhängig regulierte Funktion hervor.

Pa-1 mRNA zeigt, nach zwei Stunden eine Abnahme, gefolgt von einer Rückkehr auf Ausgangsniveau, ähnlich der *Pick1* mRNA. Die Stabilität der *Pa-1* mRNA ist nach zwei Stunden vermindert, nimmt danach jedoch wieder zu. Auf Proteinebene ist eine geringfügige zeitabhängige Zunahme nachweisbar.

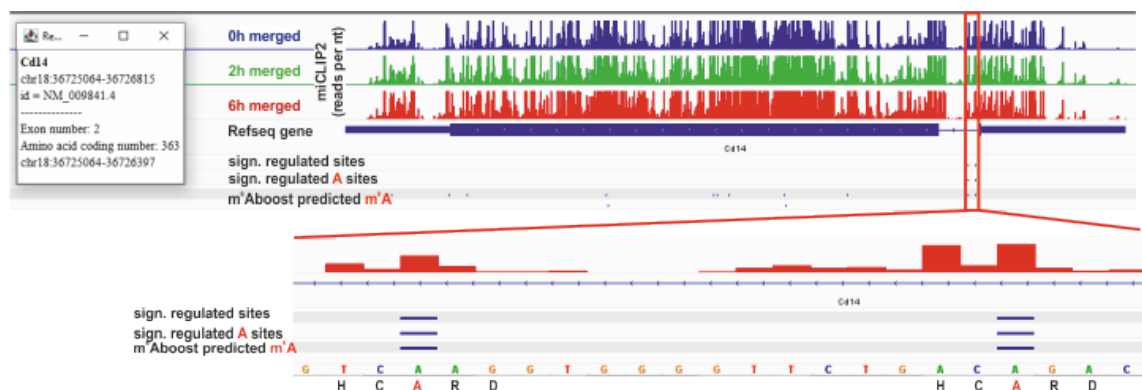
Für die Expression der *Rnf8* mRNA ist nach zwei und sechs Stunden eine leichte Abnahme zu verzeichnen. Nach sechs Stunden ist die *Rnf8* mRNA Stabilität jedoch erhöht, was darauf hindeutet, dass die mRNA Stabilität zu einem Anstieg der RNF8 Proteinsynthese beitragen kann, der hier jedoch in Ermangelung geeigneter Antikörper nicht nachgewiesen werden konnte.

6. Ausblick

Um zu analysieren, welche Funktion die Methyltransferase 3 für die Expression der differenziell m⁶A methylierten mRNAs hat, sollte in weiterführenden Experimenten der METTL3-Inhibitor STM2457 (Yankova et al. 2021) in Kombination mit LPS-Stimulation eingesetzt werden. Die Ergebnisse könnten wichtige Einblicke in den Mechanismus der Regulation der Expression spezifischer mRNAs geben, die möglicherweise die Makrophagen-Aktivität kontrollieren.

Die Identifizierung und Charakterisierung spezifischer m⁶A Methylierungsstellen hilft, die funktionelle Bedeutung dieser Modifikationen zu verstehen. Dazu könnten *select* qPCR (Xiao et al. 2018) Experimente mit dem Ziel spezifisch m⁶A methylierte Adenosine im Kontext von DRACH Motiven zu identifizieren, durchgeführt werden. Reporter mRNAs mit der Wildtyp-Sequenz und solche, in denen die m⁶A methylierten Adenosine durch spezifische primer ausgetauscht wurden, können hinsichtlich ihrer Funktion für das mRNA *Splicing*, die mRNA Stabilität oder mRNA Translation *in vitro* und *in vivo* analysiert werden.

A)



B)

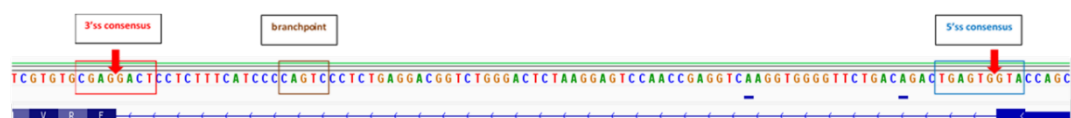


Abb. 6.1. Genomische Information der im Detail untersuchten *Cd14* mRNA.

(A) Dargestellt sind die zwei Exons und das Intron des *Cd14* Gens auf dem Minus Strang von Chromosom 18, sowie die Position potenzieller Signale bei 0h, 2h und 6h LPS Behandlung. Im vergrößerten Bereich befinden sich die signifikant differenziell methylierten Adenosine (*A sites*), welche nur im Intron vorhanden sind. **(B)** IGV Screenshot der Intronsequenz mit angrenzendem Exon 1 und 2. Hervorgehoben sind die für das *Splicing* des Introns relevanten 5' (5'ss) und 3' (3'ss) *splice site* sowie der *branch point*. Die beiden m⁶A *sites* befinden sich in der Nähe der 5'ss, eine Beeinflussung des *Splicing* durch differenzielle Methylierung ist daher möglich. Für die Analyse wurde der *Integrative Genomics Viewer* (IGV) verwendet <https://igv.org/doc/desktop/> (Robinson J.T. et al. 2011)

Die Charakterisierung der zellulären Funktion dieser spezifischen mRNAs und der durch sie kodierten Proteine kann basierend auf Literaturrecherchen mit verschiedenen Assays erfolgen, um das Verständnis ihrer Rolle in der Entzündungsreaktion zu vertiefen und so möglicherweise neue Therapieansätze zu etablieren. Da es sich bei den RAW264.7 Zellen um Maus-Makrophagen handelt, sollte des Weiteren untersucht werden, ob die Ergebnisse auf die homologen humanen mRNAs übertragbar sind, um gegebenenfalls auch Patientenproben in die zukünftigen Analysen einzubeziehen.

Literaturverzeichnis

- Anas, A., T. van der Poll, and A. F. de Vos. 2010. 'Role of CD14 in lung inflammation and infection', *Crit Care*, 14: 209.
- Angelova, M. T., D. G. Dimitrova, N. Dinges, T. Lence, L. Worpenberg, C. Carre, and J. Y. Roignant. 2018. 'The Emerging Field of Epitranscriptomics in Neurodevelopmental and Neuronal Disorders', *Front Bioeng Biotechnol*, 6: 46.
- Arora, J., A. A. Mendelson, and A. Fox-Robichaud. 2023. 'Sepsis: network pathophysiology and implications for early diagnosis', *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 324: R613-R24.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, and G. Sherlock. 2000. 'Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium', *Nat Genet*, 25: 25-9.
- Atri, C., et al. (2018). "Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases." *Int J Mol Sci* **19**(6).
- Bashir, S., Y. Sharma, A. Elahi, and F. Khan. 2016. 'Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases', *Inflamm Res*, 65: 1-11.
- Bettcher, B. M., M. G. Tansey, G. Dorothee, and M. T. Heneka. 2021. 'Publisher Correction: Peripheral and central immune system crosstalk in Alzheimer disease - a research prospectus', *Nat Rev Neurol*, 17: 724.
- Beutler, B. 2004. 'Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling', *Nature*, 430: 257-63.
- Beutler, B., and E. T. Rietschel. 2003. 'Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin', *Nat Rev Immunol*, 3: 169-76.
- Bokar, J. A., M. E. Shambaugh, D. Polayes, A. G. Matera, and F. M. Rottman. 1997. 'Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase', *RNA*, 3: 1233-47.
- Boomer, J. S., et al. (2011). "Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure." *JAMA* **306**(23): 2594-2605.
- Bonilla, F. A., and H. C. Oettgen. 2010. 'Adaptive immunity', *J Allergy Clin Immunol*, 125: S33-40.
- Borzecka, K., A. Plociennikowska, H. Bjorkelund, A. Sobota, and K. Kwiatkowska. 2013. 'CD14 mediates binding of high doses of LPS but is dispensable for TNF-alpha production', *Mediators Inflamm*, 2013: 824919.
- Bracht, H., S. Hafner, and M. Weiss. 2019. '[Sepsis Update: Definition and Epidemiology]', *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 54: 10-20.
- Brunelle, J. L., and R. Green. 2014. 'One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)', *Methods Enzymol*, 541: 151-9.
- Buchbender, A., H. Mütter, F. X. R. Sutandy, N. Kortel, H. Hanel, A. Busch, S. Ebersberger, and J. König. 2020. 'Improved library preparation with the new iCLIP2 protocol', *Methods*, 178: 33-48.
- Cai, Y., R. Yu, Y. Kong, Z. Feng, and Q. Xu. 2022. 'METTL3 regulates LPS-induced inflammatory response via the NOD1 signaling pathway', *Cell Signal*, 93: 110283.
- Cantoni, G. L., and J. Durell. 1957. 'Activation of methionine for transmethylation. II. The methionine-activating enzyme; studies on the mechanism of the reaction', *J Biol Chem*, 225: 1033-48.
- Cassandri, M., A. Smirnov, F. Novelli, C. Pitolli, M. Agostini, M. Malewicz, G. Melino, and G. Raschella. 2017. 'Zinc-finger proteins in health and disease', *Cell Death Discov*, 3: 17071.
- Chaplin, D. D. 2010. 'Overview of the immune response', *J Allergy Clin Immunol*, 125: S3-23.

- Chen, H., X. Zhang, H. Su, J. Zeng, H. Chan, Q. Li, X. Liu, L. Zhang, W. K. K. Wu, M. T. V. Chan, and H. Chen. 2023. 'Immune dysregulation and RNA N6-methyladenosine modification in sepsis', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 14: e1764.
- Cho, Y. W., T. Hong, S. Hong, H. Guo, H. Yu, D. Kim, T. Guszczynski, G. R. Dressler, T. D. Copeland, M. Kalkum, and K. Ge. 2007. 'PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex', *J Biol Chem*, 282: 20395-406.
- Chokkalla, A. K., S. L. Mehta, and R. Vemuganti. 2020. 'Epitranscriptomic regulation by m(6)A RNA methylation in brain development and diseases', *J Cereb Blood Flow Metab*, 40: 2331-49.
- Chousterman, B. G., F. K. Swirski, and G. F. Weber. 2017. 'Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis', *Semin Immunopathol*, 39: 517-28.
- Ciesielska, A., M. Matyjek, and K. Kwiatkowska. 2021. 'TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling', *Cell Mol Life Sci*, 78: 1233-61.
- Cohen, J. 2002. 'The immunopathogenesis of sepsis', *Nature*, 420: 885-91.
- Colbert, J. F., and E. P. Schmidt. 2016. 'Endothelial and Microcirculatory Function and Dysfunction in Sepsis', *Clin Chest Med*, 37: 263-75.
- Csepany, T., A. Lin, C. J. Baldick, Jr., and K. Beemon. 1990. 'Sequence specificity of mRNA N6-adenosine methyltransferase', *J Biol Chem*, 265: 20117-22.
- Dai, Z., Z. Liu, R. Yang, W. Cao, and T. Ji. 2023. 'EVI2B Is a Prognostic Biomarker and Is Correlated with Monocyte and Macrophage Infiltration in Osteosarcoma Based on an Integrative Analysis', *Biomolecules*, 13.
- Deguine, J., and G. M. Barton. 2014. 'MyD88: a central player in innate immune signaling', *F1000Prime Rep*, 6: 97.
- Delano, M. J., and P. A. Ward. 2016. 'The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome', *Immunol Rev*, 274: 330-53.
- Dominissini, D., S. Moshitch-Moshkovitz, S. Schwartz, M. Salmon-Divon, L. Ungar, S. Osenberg, K. Cesarkas, J. Jacob-Hirsch, N. Amariglio, M. Kupiec, R. Sorek, and G. Rechavi. 2012. 'Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq', *Nature*, 485: 201-6.
- Du, J., W. Liao, W. Liu, D. K. Deb, L. He, P. J. Hsu, T. Nguyen, L. Zhang, M. Bissonnette, C. He, and Y. C. Li. 2020. 'N(6)-Adenosine Methylation of Socs1 mRNA Is Required to Sustain the Negative Feedback Control of Macrophage Activation', *Dev Cell*, 55: 737-53 e7.
- Duan, T., Y. Du, C. Xing, H. Y. Wang, and R. F. Wang. 2022. 'Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity', *Front Immunol*, 13: 812774.
- Duncan, S. A., R. Sahu, S. Dixit, S. R. Singh, and V. A. Dennis. 2020. 'Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS)1 and SOCS3 Proteins Are Mediators of Interleukin-10 Modulation of Inflammatory Responses Induced by Chlamydia muridarum and Its Major Outer Membrane Protein (MOMP) in Mouse J774 Macrophages', *Mediators Inflamm*, 2020: 7461742.
- Eletto, D., F. Mentucci, A. Voli, A. Petrella, A. Porta, and A. Tosco. 2022. 'Helicobacter pylori Pathogen-Associated Molecular Patterns: Friends or Foes?', *Int J Mol Sci*, 23.
- Feng, Y., H. Dong, B. Sun, Y. Hu, Y. Yang, Y. Jia, L. Jia, X. Zhong, and R. Zhao. 2021. 'METTL3/METTL14 Transactivation and m(6)A-Dependent TGF-beta1 Translation in Activated Kupffer Cells', *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 12: 839-56.
- Feng, Z., Q. Li, R. Meng, B. Yi, and Q. Xu. 2018. 'METTL3 regulates alternative splicing of MyD88 upon the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human dental pulp cells', *J Cell Mol Med*, 22: 2558-68.
- Fioranelli, M., A. G. Bottaccioli, F. Bottaccioli, M. Bianchi, M. Rovesti, and M. G. Rocchia. 2018. 'Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease: A Review Psychoneuroendocrineimmunology-Based', *Front Immunol*, 9: 2031.
- Fleischmann, C., A. Scherag, N. K. Adhikari, C. S. Hartog, T. Tsaganos, P. Schlattmann, D. C. Angus, K. Reinhart, and Trialists International Forum of Acute Care. 2016. 'Assessment

- of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations', *Am J Respir Crit Care Med*, 193: 259-72.
- Franchi, L., N. Warner, K. Viani, and G. Nunez. 2009. 'Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense', *Immunol Rev*, 227: 106-28.
- Franken, L., M. Schiwon, and C. Kurts. 2016. 'Macrophages: sentinels and regulators of the immune system', *Cell Microbiol*, 18: 475-87.
- Fu, Y., X. Zhang, X. Liang, Y. Chen, Z. Chen, and Z. Xiao. 2022. 'CapG promoted nasopharyngeal carcinoma cell motility involving Rho motility pathway independent of ROCK', *World J Surg Oncol*, 20: 347.
- Gangloff, S. C., U. Zahringer, C. Blondin, M. Guenounou, J. Silver, and S. M. Goyert. 2005. 'Influence of CD14 on ligand interactions between lipopolysaccharide and its receptor complex', *J Immunol*, 175: 3940-5.
- Gao, S., J. Wu, L. Liang, and R. Xu. 2017. 'RNF8 negatively regulates NF-kappaB signaling by targeting IkappaB kinase: implications for the regulation of inflammation signaling', *Biochem Biophys Res Commun*, 488: 189-95.
- Gauthier, T., and W. Chen. 2022. 'Modulation of Macrophage Immunometabolism: A New Approach to Fight Infections', *Front Immunol*, 13: 780839.
- Gong, Z., Y. W. Cho, J. E. Kim, K. Ge, and J. Chen. 2009. 'Accumulation of Pax2 transactivation domain interaction protein (PTIP) at sites of DNA breaks via RNF8-dependent pathway is required for cell survival after DNA damage', *J Biol Chem*, 284: 7284-93.
- Gordon, S., and F. O. Martinez. 2010. 'Alternative activation of macrophages: mechanism and functions', *Immunity*, 32: 593-604.
- Guha, M., and N. Mackman. 2001. 'LPS induction of gene expression in human monocytes', *Cell Signal*, 13: 85-94.
- Guo, F., Y. Zhang, J. Ma, Y. Yu, Q. Wang, P. Gao, L. Wang, Z. Xu, X. Wei, and M. Jing. 2022. 'm(6)A mRNA Methylation Was Associated With Gene Expression and Lipid Metabolism in Liver of Broilers Under Lipopolysaccharide Stimulation', *Front Genet*, 13: 818357.
- Halim, A. B., L. LeGros, A. Geller, and M. Kotb. 1999. 'Expression and functional interaction of the catalytic and regulatory subunits of human methionine adenosyltransferase in mammalian cells', *J Biol Chem*, 274: 29720-5.
- Han, Y. C., H. Z. Xie, B. Lu, R. L. Xiang, H. P. Zhang, J. Y. Li, and S. Y. Zhang. 2021. 'Lipopolysaccharide Alters the m6A Epitranscriptomic Tagging of RNAs in Cardiac Tissue', *Front Mol Biosci*, 8: 670160.
- Hartmann, A. M., O. Nayler, F. W. Schwaiger, A. Obermeier, and S. Stamm. 1999. 'The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59(fyn)', *Mol Biol Cell*, 10: 3909-26.
- Hotchkiss, R. S., et al. (2013). "Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **13**(12): 862-874.
- Hsu, P. J., Y. Zhu, H. Ma, Y. Guo, X. Shi, Y. Liu, M. Qi, Z. Lu, H. Shi, J. Wang, Y. Cheng, G. Luo, Q. Dai, M. Liu, X. Guo, J. Sha, B. Shen, and C. He. 2017. 'Ythdc2 is an N(6)-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis', *Cell Res*, 27: 1115-27.
- Huang, D., P. Wang, J. Chen, Y. Li, M. Zhu, Y. Tang, and W. Zhou. 2022. 'Selective targeting of MD2 attenuates intestinal inflammation and prevents neonatal necrotizing enterocolitis by suppressing TLR4 signaling', *Front Immunol*, 13: 995791.
- Huang, Y., J. Yan, Q. Li, J. Li, S. Gong, H. Zhou, J. Gan, H. Jiang, G. F. Jia, C. Luo, and C. G. Yang. 2015. 'Meclofenamic acid selectively inhibits FTO demethylation of m6A over ALKBH5', *Nucleic Acids Res*, 43: 373-84.
- Huber-Lang, M., A. Barratt-Due, S. E. Pischke, O. Sandanger, P. H. Nilsson, M. A. Nunn, S. Denk, W. Gaus, T. Espevik, and T. E. Molnes. 2014. 'Double blockade of CD14 and complement C5 abolishes the cytokine storm and improves morbidity and survival in polymicrobial sepsis in mice', *J Immunol*, 192: 5324-31.

- Husebye, H., O. Halaas, H. Stenmark, G. Tunheim, O. Sandanger, B. Bogen, A. Brech, E. Latz, and T. Espevik. 2006. 'Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity', *EMBO J*, 25: 683-92.
- Iba, T., and J. H. Levy. 2020. 'Sepsis-induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation', *Anesthesiology*, 132: 1238-45.
- Ince, C., P. R. Mayeux, T. Nguyen, H. Gomez, J. A. Kellum, G. A. Ospina-Tascon, G. Hernandez, P. Murray, D. De Backer, and Adq Xiv Workgroup. 2016. 'The Endothelium in Sepsis', *Shock*, 45: 259-70.
- Jacobi, J. 2002. 'Pathophysiology of sepsis', *Am J Health Syst Pharm*, 59 Suppl 1: S3-8.
- Jang, D. I., A. H. Lee, H. Y. Shin, H. R. Song, J. H. Park, T. B. Kang, S. R. Lee, and S. H. Yang. 2021. 'The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha) in Autoimmune Disease and Current TNF-alpha Inhibitors in Therapeutics', *Int J Mol Sci*, 22.
- Jia, G., Y. Fu, X. Zhao, Q. Dai, G. Zheng, Y. Yang, C. Yi, T. Lindahl, T. Pan, Y. G. Yang, and C. He. 2011. 'N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO', *Nat Chem Biol*, 7: 885-7.
- Jiang, X., B. Liu, Z. Nie, L. Duan, Q. Xiong, Z. Jin, C. Yang, and Y. Chen. 2021. 'The role of m6A modification in the biological functions and diseases', *Signal Transduct Target Ther*, 6: 74.
- Joffe, J., J. Hellman, C. Ince, and H. Ait-Oufella. 2020. 'Endothelial Responses in Sepsis', *Am J Respir Crit Care Med*, 202: 361-70.
- Kadomoto, S., K. Izumi, and A. Mizokami. 2021. 'Macrophage Polarity and Disease Control', *Int J Mol Sci*, 23.
- Kagan, J. C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov. 2008. 'TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta', *Nat Immunol*, 9: 361-8.
- Kim, S. J., and H. M. Kim. 2017. 'Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14', *BMB Rep*, 50: 55-57.
- Kliem, C. V., and B. Schaub. 2024. 'The role of regulatory B cells in immune regulation and childhood allergic asthma', *Mol Cell Pediatr*, 11: 1.
- Kortel, N., C. Ruckle, Y. Zhou, A. Busch, P. Hoch-Kraft, F. X. R. Sutandy, J. Haase, M. Pradhan, M. Musheev, D. Ostareck, A. Ostareck-Lederer, C. Dieterich, S. Huttelmaier, C. Niehrs, O. Rausch, D. Dominissini, J. Konig, and K. Zarnack. 2021. 'Deep and accurate detection of m6A RNA modifications using miCLIP2 and m6Aboost machine learning', *Nucleic Acids Res*, 49: e92.
- Kretschmer, J., H. Rao, P. Hackert, K. E. Sloan, C. Hobartner, and M. T. Bohnsack. 2018. 'The m(6)A reader protein YTHDC2 interacts with the small ribosomal subunit and the 5'-3' exoribonuclease XRN1', *RNA*, 24: 1339-50.
- Laemmli, U. K. 1970. 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227: 680-5.
- Lai, W. S., R. M. Arvola, A. C. Goldstrohm, and P. J. Blackshear. 2019. 'Inhibiting transcription in cultured metazoan cells with actinomycin D to monitor mRNA turnover', *Methods*, 155: 77-87.
- Laity, J. H., B. M. Lee, and P. E. Wright. 2001. 'Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity', *Curr Opin Struct Biol*, 11: 39-46.
- Lawrence, T. 2009. 'The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1: a001651.
- Li, C., M. M. Xu, K. Wang, A. J. Adler, A. T. Vella, and B. Zhou. 2018. 'Macrophage polarization and meta-inflammation', *Transl Res*, 191: 29-44.
- Li, F., D. Zhao, J. Wu, and Y. Shi. 2014. 'Structure of the YTH domain of human YTHDF2 in complex with an m(6)A mononucleotide reveals an aromatic cage for m(6)A recognition', *Cell Res*, 24: 1490-2.

- Li, P., Y. H. Wu, Y. T. Zhu, M. X. Li, and H. H. Pei. 2019. 'Requirement of Rab21 in LPS-induced TLR4 signaling and pro-inflammatory responses in macrophages and monocytes', *Biochem Biophys Res Commun*, 508: 169-76.
- Liepert, A., J. C. Mossanen, B. Denecke, F. Heymann, R. De Santis, F. Tacke, G. Marx, D. H. Ostareck, and A. Ostareck-Lederer. 2014. 'Translation control of TAK1 mRNA by hnRNP K modulates LPS-induced macrophage activation', *RNA*, 20: 899-911.
- Liew, F. Y., D. Xu, E. K. Brint, and L. A. O'Neill. 2005. 'Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses', *Nat Rev Immunol*, 5: 446-58.
- Lin, H. Y. 2020. 'The severe COVID-19: A sepsis induced by viral infection? And its immunomodulatory therapy', *Chin J Traumatol*, 23: 190-95.
- Linder, B., A. V. Grozhik, A. O. Olarerin-George, C. Meydan, C. E. Mason, and S. R. Jaffrey. 2015. 'Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome', *Nat Methods*, 12: 767-72.
- Liu, H., Z. Han, L. Chen, J. Zhang, Z. Zhang, Y. Chen, F. Liu, K. Wang, J. Liu, N. Sai, X. Zhou, C. Zhou, S. Hu, Q. Wen, and L. Ma. 2024. 'ZNFX1 promotes AMPK-mediated autophagy against Mycobacterium tuberculosis by stabilizing Prkaa2 mRNA', *JCI Insight*, 9.
- Liu, J., Y. Yue, D. Han, X. Wang, Y. Fu, L. Zhang, G. Jia, M. Yu, Z. Lu, X. Deng, Q. Dai, W. Chen, and C. He. 2014. 'A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation', *Nat Chem Biol*, 10: 93-5.
- Liu, L., et al. (2020). "Progranulin inhibits LPS-induced macrophage M1 polarization via NF-small ka, CyrillicB and MAPK pathways." *BMC Immunol* **21**(1): 32.
- Liu, Q., and R. I. Gregory. 2019. 'RNAmoD: an integrated system for the annotation of mRNA modifications', *Nucleic Acids Res*, 47: W548-W55.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Locati, M., G. Curtale, and A. Mantovani. 2020. 'Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity', *Annu Rev Pathol*, 15: 123-47.
- Ma, Q., M. Zhao, B. Long, and H. Li. 2023. 'Super-enhancer-associated gene CAPG promotes AML progression', *Commun Biol*, 6: 622.
- Machnicka, M. A., K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki, and H. Grosjean. 2013. 'MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update', *Nucleic Acids Res*, 41: D262-7.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, H. Fastrup, F. Melander, J. Bartek, C. Lukas, and J. Lukas. 2007. 'RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins', *Cell*, 131: 887-900.
- Mantovani, A., and C. Garlanda. 2023. 'Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins', *N Engl J Med*, 388: 439-52.
- Matsumoto, H., H. Haniu, and N. Komori. 2019. 'Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE', *Methods Mol Biol*, 1855: 101-05.
- Mayadas, T. N., X. Cullere, and C. A. Lowell. 2014. 'The multifaceted functions of neutrophils', *Annu Rev Pathol*, 9: 181-218.
- Medzhitov, R. 2007. 'Recognition of microorganisms and activation of the immune response', *Nature*, 449: 819-26.
- Mendel, M., K. M. Chen, D. Homolka, P. Gos, R. R. Pandey, A. A. McCarthy, and R. S. Pillai. 2018. 'Methylation of Structured RNA by the m(6)A Writer METTL16 Is Essential for Mouse Embryonic Development', *Mol Cell*, 71: 986-1000 e11.
- Mendel, M., K. Delaney, R. R. Pandey, K. M. Chen, J. M. Wenda, C. B. Vagbo, F. A. Steiner, D. Homolka, and R. S. Pillai. 2021. 'Splice site m(6)A methylation prevents binding of U2AF35 to inhibit RNA splicing', *Cell*, 184: 3125-42 e25.
- Meyer, K. D., and S. R. Jaffrey. 2014. 'The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 313-26.

- Meyer, K. D., Y. Saletore, P. Zumbo, O. Elemento, C. E. Mason, and S. R. Jaffrey. 2012. 'Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons', *Cell*, 149: 1635-46.
- Miyake, K. 2007. 'Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors', *Semin Immunol*, 19: 3-10.
- Murray, P. J., and T. A. Wynn. 2011. 'Protective and pathogenic functions of macrophage subsets', *Nat Rev Immunol*, 11: 723-37.
- Netea, M. G., A. Schlitzer, K. Placek, L. A. B. Joosten, and J. L. Schultze. 2019. 'Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens', *Cell Host Microbe*, 25: 13-26.
- Oerum, S., V. Meynier, M. Catala, and C. Tisne. 2021. 'A comprehensive review of m6A/m6Am RNA methyltransferase structures', *Nucleic Acids Res*, 49: 7239-55.
- Park, B. S., D. H. Song, H. M. Kim, B. S. Choi, H. Lee, and J. O. Lee. 2009. 'The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex', *Nature*, 458: 1191-5.
- Patil, D. P., B. F. Pickering, and S. R. Jaffrey. 2018. 'Reading m(6)A in the Transcriptome: m(6)A-Binding Proteins', *Trends Cell Biol*, 28: 113-27.
- Pendleton, K. E., B. Chen, K. Liu, O. V. Hunter, Y. Xie, B. P. Tu, and N. K. Conrad. 2017. 'The U6 snRNA m(6)A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention', *Cell*, 169: 824-35 e14.
- Pidwill, G. R., J. F. Gibson, J. Cole, S. A. Renshaw, and S. J. Foster. 2020. 'The Role of Macrophages in Staphylococcus aureus Infection', *Front Immunol*, 11: 620339.
- Ping, X. L., B. F. Sun, L. Wang, W. Xiao, X. Yang, W. J. Wang, S. Adhikari, Y. Shi, Y. Lv, Y. S. Chen, X. Zhao, A. Li, Y. Yang, U. Dahal, X. M. Lou, X. Liu, J. Huang, W. P. Yuan, X. F. Zhu, T. Cheng, Y. L. Zhao, X. Wang, J. M. Rendtlew Danielsen, F. Liu, and Y. G. Yang. 2014. 'Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase', *Cell Res*, 24: 177-89.
- Plociennikowska, A., A. Hromada-Judycka, K. Borzecka, and K. Kwiatkowska. 2015. 'Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling', *Cell Mol Life Sci*, 72: 557-81.
- Poh, H. X., A. H. Mirza, B. F. Pickering, and S. R. Jaffrey. 2022. 'Alternative splicing of METTL3 explains apparently METTL3-independent m6A modifications in mRNA', *PLoS Biol*, 20: e3001683.
- Poltorak, A., I. Smirnova, X. He, M. Y. Liu, C. Van Huffel, O. McNally, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, X. Du, P. Thompson, E. K. Chan, J. Ledesma, B. Roe, S. Clifton, S. N. Vogel, and B. Beutler. 1998. 'Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region', *Blood Cells Mol Dis*, 24: 340-55.
- Prescott, H. C., and D. C. Angus. 2018. 'Enhancing Recovery From Sepsis: A Review', *JAMA*, 319: 62-75.
- Oberholzer, A., et al. (2001). "Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity." *Shock* **16**(2): 83-96.
- Ren, Q., et al. (2020). "Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF-kappaB p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice." *Biomed Pharmacother* **122**: 109772.
- Riera Romo, M., D. Perez-Martinez, and C. Castillo Ferrer. 2016. 'Innate immunity in vertebrates: an overview', *Immunology*, 148: 125-39.
- Robinson, J. T., et al. (2011). "Integrative genomics viewer." *Nat Biotechnol* **29**(1): 24-26.
- Roundtree, I. A., M. E. Evans, T. Pan, and C. He. 2017. 'Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation', *Cell*, 169: 1187-200.
- Roundtree, I. A., G. Z. Luo, Z. Zhang, X. Wang, T. Zhou, Y. Cui, J. Sha, X. Huang, L. Guerrero, P. Xie, E. He, B. Shen, and C. He. 2017. 'YTHDC1 mediates nuclear export of N(6)-methyladenosine methylated mRNAs', *Elife*, 6.

- Ryu, J. K., S. J. Kim, S. H. Rah, J. I. Kang, H. E. Jung, D. Lee, H. K. Lee, J. O. Lee, B. S. Park, T. Y. Yoon, and H. M. Kim. 2017. 'Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer', *Immunity*, 46: 38-50.
- Saraiva, M., and A. O'Garra. 2010. 'The regulation of IL-10 production by immune cells', *Nat Rev Immunol*, 10: 170-81.
- Satterwhite, E. R., and K. D. Mansfield. 2021. 'RNA methyltransferase METTL16: Targets and function', *Wiley Interdiscip Rev RNA*: e1681.
- Schneider, T. D., and R. M. Stephens. 1990. 'Sequence logos: a new way to display consensus sequences', *Nucleic Acids Res*, 18: 6097-100.
- Seifert, M., and R. Kuppers. 2016. 'Human memory B cells', *Leukemia*, 30: 2283-92.
- Semeraro, N., C. T. Ammollo, F. Semeraro, and M. Colucci. 2010. 'Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and thromboembolic disease', *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2: e2010024.
- Shi, H., X. Wang, Z. Lu, B. S. Zhao, H. Ma, P. J. Hsu, C. Liu, and C. He. 2017. 'YTHDF3 facilitates translation and decay of N(6)-methyladenosine-modified RNA', *Cell Res*, 27: 315-28.
- Shi, H., J. Wei, and C. He. 2019. 'Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers', *Mol Cell*, 74: 640-50.
- Shima, H., M. Matsumoto, Y. Ishigami, M. Ebina, A. Muto, Y. Sato, S. Kumagai, K. Ochiai, T. Suzuki, and K. Igarashi. 2017. 'S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N(6)-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1', *Cell Rep*, 21: 3354-63.
- Silva, M. T., and M. Correia-Neves. 2012. 'Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems', *Front Immunol*, 3: 174.
- Singer, M., C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Cooper-Smith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent, and D. C. Angus. 2016. 'The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)', *JAMA*, 315: 801-10.
- Sledz, P., and M. Jinek. 2016. 'Structural insights into the molecular mechanism of the m(6)A writer complex', *Elife*, 5.
- Slobodin, B., and R. Dikstein. 2020. 'So close, no matter how far: multiple paths connecting transcription to mRNA translation in eukaryotes', *EMBO Rep*, 21: e50799.
- Sun, T., R. Wu, and L. Ming. 2019. 'The role of m6A RNA methylation in cancer', *Biomed Pharmacother*, 112: 108613.
- Tan, Y., and J. C. Kagan. 2014. 'A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide', *Mol Cell*, 54: 212-23.
- Tang, C., R. Klukovich, H. Peng, Z. Wang, T. Yu, Y. Zhang, H. Zheng, A. Klungland, and W. Yan. 2018. 'ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E325-E33.
- Tenbrock, K., and T. Rauen. 2022. 'T cell dysregulation in SLE', *Clin Immunol*, 239: 109031.
- van der Poll, T., F. L. van de Veerdonk, B. P. Scicluna, and M. G. Netea. 2017. 'The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets', *Nat Rev Immunol*, 17: 407-20.
- Vavassori, S., J. Chou, L. E. Faletti, V. Haunerding, L. Opitz, P. Joset, C. J. Fraser, S. Prader, X. Gao, L. A. Schuch, M. Wagner, J. Hoefele, M. E. Maccari, Y. Zhu, G. Elakis, M. T. Gabbett, M. Forstner, H. Omran, T. Kaiser, C. Kessler, H. Olbrich, P. Frosk, A. Almutairi, C. D. Platt, M. Elkins, S. Weeks, T. Rubin, R. Planas, T. Marchetti, D. Koovely, V. Klammt, N. A. Soliman, S. von Hardenberg, C. Klemann, U. Baumann, D. Lenz, A. Klein-Franke, M. Schwemmle, M. Huber, E. Sturm, S. Hartleif, K. Haffner, C. Gimpel, B. Brotschi, G. Laube, T. Gungor, M. F. Buckley, R. Kottke, C. Stauffer, F. Hildebrandt, S. Reu-Hofer, S. Moll, A. Weber, H. Kaur, S. Ehl, S. Hiller, R. Geha, T. Roscioli, M. Giese, and J.

- Pachlopnik Schmid. 2021. 'Multisystem inflammation and susceptibility to viral infections in human ZNF1 deficiency', *J Allergy Clin Immunol*, 148: 381-93.
- Vincent, J. L., R. Moreno, J. Takala, S. Willatts, A. De Mendonca, H. Bruining, C. K. Reinhart, P. M. Suter, and L. G. Thijs. 1996. 'The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine', *Intensive Care Med*, 22: 707-10.
- Wang, J., S. Yan, H. Lu, S. Wang, and D. Xu. 2019. 'METTL3 Attenuates LPS-Induced Inflammatory Response in Macrophages via NF-kappaB Signaling Pathway', *Mediators Inflamm*, 2019: 3120391.
- Wang, P., K. A. Doxtader, and Y. Nam. 2016. 'Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases', *Mol Cell*, 63: 306-17.
- Wang, X., J. Feng, Y. Xue, Z. Guan, D. Zhang, Z. Liu, Z. Gong, Q. Wang, J. Huang, C. Tang, T. Zou, and P. Yin. 2016. 'Structural basis of N(6)-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex', *Nature*, 534: 575-8.
- Wang, X., and C. He. 2014. 'Dynamic RNA modifications in posttranscriptional regulation', *Mol Cell*, 56: 5-12.
- Wang, X., Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan, and C. He. 2014. 'N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability', *Nature*, 505: 117-20.
- Wang, X., B. S. Zhao, I. A. Roundtree, Z. Lu, D. Han, H. Ma, X. Weng, K. Chen, H. Shi, and C. He. 2015. 'N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency', *Cell*, 161: 1388-99.
- Wang, Y., and W. Shao. 2023. 'Innate Immune Response to Viral Vectors in Gene Therapy', *Viruses*, 15.
- Warda, A. S., J. Kretschmer, P. Hackert, C. Lenz, H. Urlaub, C. Hobartner, K. E. Sloan, and M. T. Bohnsack. 2017. 'Human METTL16 is a N(6)-methyladenosine (m(6)A) methyltransferase that targets pre-mRNAs and various non-coding RNAs', *EMBO Rep*, 18: 2004-14.
- Watson, J. D. 1963. 'Involvement of RNA in the synthesis of proteins', *Science*, 140: 17-26.
- Wen, J., R. Lv, H. Ma, H. Shen, C. He, J. Wang, F. Jiao, H. Liu, P. Yang, L. Tan, F. Lan, Y. G. Shi, C. He, Y. Shi, and J. Diao. 2018. 'Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m(6)A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal', *Mol Cell*, 69: 1028-38 e6.
- Wen, T., T. Li, Y. Xu, Y. Zhang, H. Pan, and Y. Wang. 2023. 'The role of m6A epigenetic modifications in tumor coding and non-coding RNA processing', *Cell Commun Signal*, 21: 355.
- Wicherska-Pawlowska, K., T. Wrobel, and J. Rybka. 2021. 'Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases', *Int J Mol Sci*, 22.
- Wiener, D., and S. Schwartz. 2021. 'The epitranscriptome beyond m(6)A', *Nat Rev Genet*, 22: 119-31.
- Witke, W., W. Li, D. J. Kwiatkowski, and F. S. Southwick. 2001. 'Comparisons of CapG and gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing', *J Cell Biol*, 154: 775-84.
- Wojtas, M. N., R. R. Pandey, M. Mendel, D. Homolka, R. Sachidanandam, and R. S. Pillai. 2017. 'Regulation of m(6)A Transcripts by the 3'-->5' RNA Helicase YTHDC2 Is Essential for a Successful Meiotic Program in the Mammalian Germline', *Mol Cell*, 68: 374-87 e12.
- Wong, H. R. (2013). "Genome-wide expression profiling in pediatric septic shock." *Pediatr Res* **73**(4 Pt 2): 564-569.
- Xiao, W., S. Adhikari, U. Dahal, Y. S. Chen, Y. J. Hao, B. F. Sun, H. Y. Sun, A. Li, X. L. Ping, W. Y. Lai, X. Wang, H. L. Ma, C. M. Huang, Y. Yang, N. Huang, G. B. Jiang, H. L. Wang, Q. Zhou, X. J.

- Wang, Y. L. Zhao, and Y. G. Yang. 2016. 'Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing', *Mol Cell*, 61: 507-19.
- Xiao, Y., Y. Wang, Q. Tang, L. Wei, X. Zhang, and G. Jia. 2018. 'An Elongation- and Ligation-Based qPCR Amplification Method for the Radiolabeling-Free Detection of Locus-Specific N(6)-Methyladenosine Modification', *Angew Chem Int Ed Engl*, 57: 15995-6000.
- Xie, J., X. Wu, Q. Zhou, Y. Yang, Y. Tian, C. Huang, X. Meng, and J. Li. 2016. 'PICK1 confers anti-inflammatory effects in acute liver injury via suppressing M1 macrophage polarization', *Biochimie*, 127: 121-32.
- Yankova, E., W. Blackaby, M. Albertella, J. Rak, E. De Braekeleer, G. Tsagkogeorga, E. S. Pilka, D. Aspris, D. Leggate, A. G. Hendrick, N. A. Webster, B. Andrews, R. Fosbeary, P. Guest, N. Irigoyen, M. Eleftheriou, M. Gozdecka, J. M. L. Dias, A. J. Bannister, B. Vick, I. Jeremias, G. S. Vassiliou, O. Rausch, K. Tzelepis, and T. Kouzarides. 2021. 'Small-molecule inhibition of METTL3 as a strategy against myeloid leukaemia', *Nature*, 593: 597-601.
- Yatim, K. M., and F. G. Lakkis. 2015. 'A brief journey through the immune system', *Clin J Am Soc Nephrol*, 10: 1274-81.
- Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo. 2007. 'SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation', *Nat Rev Immunol*, 7: 454-65.
- Yun, D. P., Y. Q. Wang, D. L. Meng, Y. Y. Ji, J. X. Chen, H. Y. Chen, and D. R. Lu. 2018. 'Actin-capping protein CapG is associated with prognosis, proliferation and metastasis in human glioma', *Oncol Rep*, 39: 1011-22.
- Zaccara, S., R. J. Ries, and S. R. Jaffrey. 2019. 'Reading, writing and erasing mRNA methylation', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20: 608-24.
- Zanoni, I., R. Ostuni, L. R. Marek, S. Barresi, R. Barbalat, G. M. Barton, F. Granucci, and J. C. Kagan. 2011. 'CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4', *Cell*, 147: 868-80.
- Zhang, W., Y. Qian, and G. Jia. 2021. 'The detection and functions of RNA modification m(6)A based on m(6)A writers and erasers', *J Biol Chem*, 297: 100973.
- Zhang, X. and D. M. Mosser (2008). "Macrophage activation by endogenous danger signals." *J Pathol* **214**(2): 161-178.
- Zhang, Y., X. Gu, D. Li, L. Cai, and Q. Xu. 2019. 'METTL3 Regulates Osteoblast Differentiation and Inflammatory Response via Smad Signaling and MAPK Signaling', *Int J Mol Sci*, 21.
- Zhao, B. S., I. A. Roundtree, and C. He. 2017. 'Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18: 31-42.
- Zheng, G., J. A. Dahl, Y. Niu, P. Fedorcsak, C. M. Huang, C. J. Li, C. B. Vagbo, Y. Shi, W. L. Wang, S. H. Song, Z. Lu, R. P. Bosmans, Q. Dai, Y. J. Hao, X. Yang, W. M. Zhao, W. M. Tong, X. J. Wang, F. Bogdan, K. Furu, Y. Fu, G. Jia, X. Zhao, J. Liu, H. E. Krokan, A. Klungland, Y. G. Yang, and C. He. 2013. 'ALKBH5 is a mammalian RNA demethylase that impacts RNA metabolism and mouse fertility', *Mol Cell*, 49: 18-29.
- Zheng, Y., Y. Li, X. Ran, D. Wang, X. Zheng, M. Zhang, B. Yu, Y. Sun, and J. Wu. 2022. 'Mettl14 mediates the inflammatory response of macrophages in atherosclerosis through the NF-kappaB/IL-6 signaling pathway', *Cell Mol Life Sci*, 79: 311.
- Zhou, J., J. Wan, X. Gao, X. Zhang, S. R. Jaffrey, and S. B. Qian. 2015. 'Dynamic m(6)A mRNA methylation directs translational control of heat shock response', *Nature*, 526: 591-4.
- Zhu, T., I. A. Roundtree, P. Wang, X. Wang, L. Wang, C. Sun, Y. Tian, J. Li, C. He, and Y. Xu. 2014. 'Crystal structure of the YTH domain of YTHDF2 reveals mechanism for recognition of N6-methyladenosine', *Cell Res*, 24: 1493-6.
- Zjablovskaja, P., M. Kardosova, P. Danek, P. Angelisova, T. Benoukraf, A. A. Wurm, T. Kalina, S. Sian, M. Balastik, R. Delwel, T. Brdicka, D. G. Tenen, G. Behre, F. Fiore, B. Malissen, V. Horejsi, and M. Alberich-Jorda. 2017. 'EVI2B is a C/EBPalpha target gene required for granulocytic differentiation and functionality of hematopoietic progenitors', *Cell Death Differ*, 24: 705-16.

Anhang:

Anhang 1: Qualitätskontrolle der extrahierten RNA

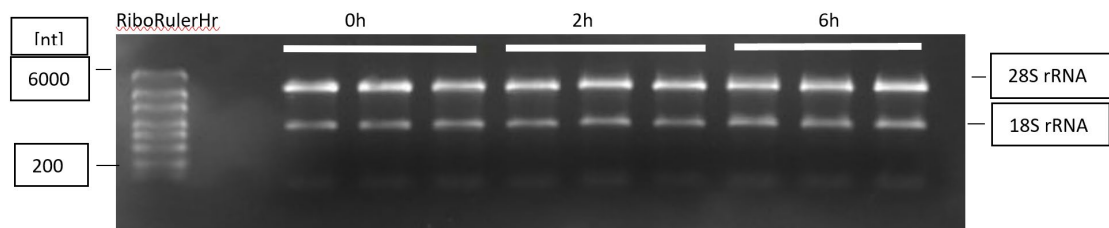


Abb. Anhang 1.: Agarose Gelelektrophorese-ein exemplarisches Beispiel

Die Zellen wurden für 0, 2 und 6 Stunden mit LPS 10 ng/ml stimuliert. Um die Kontrolle der RNA Integrität zu überprüfen, wurde die RNA zunächst in einem 1% igen Agarosegel aufgetrennt. Die beiden deutlich abgetrennten 18 S und 28 S rRNA gelten als Beleg für eine intakte DNA.

Anhang 2: Verwendete Primer für die PCR

Tabelle A2: verwendete Primer für die PCR

Name	Sequenz	Produktgröße	Quelle
Tnf- α _For	TCCCCAAAGGGATGAGAAG	217	Liepelt et al. 2014
Tnf- α _Rev	GCACCACTAGTTGGTTGTC	217	Liepelt et al. 2014
Nduvf1 _For	GCCTCCAATTCGAGGTAGCTAT	103	Su et al., 2007
Nduvf1 _Rev	CACGCACCACAAACACATCA	103	Su et al., 2007
Actb _For	CTCTAGACTTCGAGCAGGAGATGG	163	Borkham-Kamphorst et al.2013
Actb _Rev	ATGCCACAGGATTCCATACCCAAGA	163	Borkham-Kamphorst et al.2013
qFF-Luc2 For	CCTTCCGCATAGAACTGCCT	244	Liepelt et al 2014
qFF-Luc2 Rev	GGTTGGTACTAGCAACGCAC	244	Liepelt et al. 2014
Evi2b_4 _For	AGAAGTTCACAGGAGAAAACATCTG	Evi2b-201: 1858	
Evi2b_4 _Rev	GAGTGATTTGGGCAGGTGATG	Evi2b-201: 1858	
Evi2b_8 _For	GAAAGAAGTTCACAGGAGAAAACAT	Evi2b-201: 1858	
Evi2b_8 _Rev	CAGCTGGTGTGCTTGTTTCAG	Evi2b-201: 1858	
Pagr1a_6 _For	GAGACGGACACCAGGAAGC	Pagr1a-202: 1430	

Pagr1a_6_Rev	TCCTGAGGATCGGAGTGGAG	Pagr1a-202: 1430	
Pagr1a_3_For	TAGCTCCAGGTTTGTACCGC	Pagr1a-202: 1430	
Pagr1a_3_Rev	TCTCGCTTTCACATCGCCTT	Pagr1a-202: 1430	
CapG_1_For	CCCCGAGGAAGACATTACAG	CapG201: 1247	
CapG_1_Rev	AGCAGTTCAGAGGCAAAAG	CapG201: 1247	
CapG_2_For	AGGAGCCAGCCGAGATGATT	CapG201: 1247	
CapG_2_Rev	TTAGCTTTTCTCCCCTCCAGATC	CapG201: 1247	
CD14_8_For	TCTACCGACCATGGAGCGTG	CD14-201: 1641	
CD14_8_Rev	GAAGGTATTCCAGGCTGCGG	CD14-201: 1641	
CD14_2_For	TCTACCGACCATGGAGCGTC	CD14-201: 1641	
CD14_2_Rev	TGAAAGCGCTGGACCAATCT	CD14-201: 1641	
Rnf8_3_For	GCAGGAGCATCAGGCTCTAA	Rnf8-201: 5404 Rnf8-206: 2042 Rnf8-210: 1780	
Rnf8_3_Rev	CTCGTTCTCCAGCAAGTCGT	Rnf8-201: 5404 Rnf8-206: 2042 Rnf8-210: 1780	
Rnf8_4_For	CTCGGAAGGGGAGCTAAAG	Rnf8-201: 5404 Rnf8-206: 2042 Rnf8-210: 1780	
Rnf8_4_Rev	TTAGAGCCTGATGCTCCTGC	Rnf8-201: 5404 Rnf8-206: 2042 Rnf8-210: 1780	
Pick1_5_For	AGCTGTACAAAGGGATGACGGA	Pick1-203: 2054	
Pick1_5_Rev	TAGCCGAATGCCGAACCTTCTC	Pick1-203: 2054	
Pick1_6_For	GGTAGAGGTGGCGAAGATGAT	Pick1-203:2054	
Pick1_6_Rev	GCTTTACCAAGCCATCGTTAC	Pick1-203: 2054	
Znfx1_1_For	GAACTTCAACCTTGAGGTGTCCC	Znfx1-2021: 7218 Znfx1-205: 2751	
Znfx1_1_Rev	GGAGACACCCTTAATCTGCTA	Znfx1-2021: 7218 Znfx1-205: 2751	
Znfx1_7_For	TGGCAGAATTCCAAGCGACT	Znfx1-2021: 7218 Znfx1-205: 2751	
Znfx1_7_Rev	GGCTGTTGTCTCCACCATGA	Znfx1-2021: 7218 Znfx1-205: 2751	

Die zur Analysen der differentiell m⁶A methylierten mRNAs verwendeten primer sind hervorgehoben.

Anhang 3.: Verwendete Primärantikörper für den Western blot

Tabelle A3: Verwendete Primärantikörper

AK	Blocken	Verdünnung	Spezies	Inkubationszeit	ECL und Belichtung	Firma/Katalognummer
α -CD-14	5% Milch in TBST	1:2000	Maus	1 Std. bei RT	ECL, 10 sek.	Proteintech, 60253-1-Ig
α -CAPG (N3C3)	5% Milch in TBST	1:1000	Kaninchen	1 Std. bei RT	ECL prime, 10 sek.	GeneTex, GTX114301
α -c-SCR	5% Milch in TBST	1:500	Kaninchen	1 Std. bei RT	ECL prime, 30 sec	Abcam, ab7950-1
α -VINCULIN (Klon hVIN-1)	5% Milch in TBST	1:3000	Maus	1 Std. bei RT	ECL, 10 sec	Sigma-Aldrich, V9131
α -PA-1	5% Milch in TBST	1:500	Maus	Über Nacht bei 4°C	ECL prime, 30 sec	Santa Cruz, sc-393387
α -Pick1 lot: 00081075	5% Milch in TBST	1:1000	Kaninchen	1,5 Std. bei RT	ECL prime, 30 sec	Proteintech, 10983-2-AP

Anhang 4: Verwendete Sekundärantikörper für den Western blot

Tabelle A4: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Blocken	Verdünnung	Spezies	Inkubationszeit	Firma/Katalognummer
α -Kaninchen-HRP lot: 381236	5% Milch in TBST	1:5000	Esel	1 Std.	GE Healthcare, NA934V
α -Maus-HRP lot: 372943	5% Milch in TBST	1:5000	Schaf	1 Std.	GE Healthcare, NA931V

Die Verdünnung der Sekundär- und Primärantikörper erfolgte im gleichen Medium wie geblockt wurde.

Anhang 5.: Verwendete Lysatmenge für den Western blot

Tabelle A5: Verwendete Lysatmenge in Western blots

Antikörper	Lysatmenge in µg
α-CD-14	5
α-CAPG	5-10
α-c-SCR	20
α-VINCULIN	5
α-PA-1	50
α-PICK1	20-40

Danksagung:

Als erstes möchte ich Prof. Dr. rer. nat. Antje Ostareck-Lederer und Prof. Dr. rer. nat. Dirk Ostareck für das interessante Thema meiner Doktorarbeit und für die hervorragende persönliche Betreuung im Labor herzlich danken.

Ein weiterer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Gernot Marx, für die Möglichkeit, meine Abschlussarbeit an der Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care angefertigt haben zu können.

Zudem möchte ich Dr. Julian König (IMB Mainz) und Dr. Katharina Zarnack (Goethe-Universität Frankfurt) für die vorausgegangene Identifizierung m⁶A methylierter mRNAs danken.

Für die Vorarbeiten zu diesem Projekt bedanke ich mich ebenfalls bei Yannic Schumacher und Anja Hackmann.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meiner Eltern, Geschwistern, sowie meiner Tante und Onkel bedanken, die mich im Laufe des Studiums stets unterstützt haben.

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

- in der ***Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care, Funktionsbereich Forschung*** des Universitätsklinikums Aachen

hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Claudine Georges** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „**Charakterisierung von m⁶A modifizierten mRNAs in LPS-aktivierten RAW-264.7 Makrophagen**“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

Bitte Namen angeben ----->	Claudine Georges	Prakt. Betreuerin Antje Ostareck-Lederer	Kooperations-partner Julian König	Kooperations-partnerin Katharina Zarnack	Doktorvater Dirk Ostareck	Summe (%)
Studienüberwachung		30			70	100
Studienkonzeption		30			70	100
Sequenzierung m ⁶ A methylierter mRNAs			100			100
Identifizierung m ⁶ A methylierter mRNAs				50	50	100
Kultivierung der RAW-264.7 Makrophagen	100					100
Stimulation der RAW-264.7 Makrophagen mit LPS und Behandlung mit Actinomycin D	100					100
Agarose Gelelektrophorese für RNA	100					100
Reverse Transkription und Durchführung der qPCR	100					100
SDS-Page und Durchführung der Western-blot	100					100
Analyse der Expression m ⁶ A methylierter mRNAs	100					100
Analyse der Stabilitäten m ⁶ A methylierter mRNAs	100					100
Analyse der Proteinexpression	100					100
Datenauswertung	100					100
Interpretation der Datenauswertung	50	25			25	100

Ich habe Chat GPT zur Übersetzung der Zusammenfassung in die englische Version und zur sprachlichen Korrektur einzelnen Sätze in der Dissertation benutzt.

Unterschrift der Doktorandin/des Doktoranden

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Claudine Georges

Unterschrift des Doktorvaters

