



**Das RNA-bindende Protein RAVER1 moduliert die  
miR/RISC-Aktivität und TGF $\beta$ -abhängige EMT durch  
Regulation des alternativen Spleißens**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Akademisches Grades  
*Doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat)

Vorgelegt der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Naturwissenschaftliche Fakultät I (Biowissenschaften)

Von

Alice Wedler

1. Gutachter/in: Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier
2. Gutachter/in: Prof. Dr. Christian R. Eckmann
3. Gutachter/in: Prof. Dr. Michaela Müller-McNicoll

Datum der öffentlichen Verteidigung: 23.04.2024

*„Alle Wissenschaftler versuchen, an der Pyramide menschlichen Wissens weiter zu bauen. Ich hoffe, dass ich einen kleinen Stein dazutun konnte.“*

Stephen Hawking

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1. RNA-Prozessierung und Regulierung</b> .....	1
<b>1.1.1. Post-transkriptionelle Regulation durch Alternatives Spleißen</b> .....	2
<b>1.1.2. Post-transkriptionelle Regulation durch miRNAs</b> .....	6
<b>1.2. Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung</b> .....	9
<b>1.2.1. RNA-Prozessierung in Tumoren</b> .....	10
<b>1.2.2. Netzwerk von Signalkaskaden fördern das Tumorwachstum</b> .....	12
<b>1.2.2.1. Pro-proliferative und Anti-apoptotische Fähigkeiten</b> .....	13
<b>1.2.2.2. Invasion und Metastasierung</b> .....	17
<b>1.2.2.3. Immunevasion: Die Flucht vor dem Immunsystem</b> .....	18
<b>1.3. PTBP1: Mehr als nur ein Spleißfaktor</b> .....	20
<b>1.4. RAVER1: Adhäsionskomplex, Spleißfaktor oder mehr?</b> .....	23
<b>1.5. Zielstellung</b> .....	28
<b>2. Material und Methoden</b> .....	29
<b>2.1. Material</b> .....	29
<b>2.1.1. Chemikalien und Reagenzien</b> .....	29
<b>2.1.2. Bakterien</b> .....	29
<b>2.1.3. Zelllinien</b> .....	29
<b>2.1.4. Antikörper</b> .....	30
<b>2.1.5. Plasmide</b> .....	31
<b>2.1.6. Oligonukleotide</b> .....	33
<b>2.1.7. siRNAs</b> .....	34
<b>2.1.8. Northern Blot Sonden</b> .....	34
<b>2.1.9. Standardsysteme und Kits</b> .....	35
<b>2.1.10. Standardpuffer</b> .....	35
<b>2.1.11. Geräte</b> .....	36
<b>2.2. Methoden</b> .....	38
<b>2.2.1. Zellbiologische Methoden</b> .....	38
<b>2.2.1.1. Zellkultur</b> .....	38

<b>2.2.1.2. Zell-Transfektionen</b> .....	38
<b>2.2.1.2.1. siRNA Transfektion</b> .....	38
<b>2.2.1.2.2. Plasmid Transfektion</b> .....	38
<b>2.2.1.3. CRISPR/Cas9 vermittelte Deletion</b> .....	38
<b>2.2.1.4. Herstellung von Lentiviren und Transduktion</b> .....	39
<b>2.2.1.5. Maus-Xenotransplantation</b> .....	39
<b>2.2.2. Molekularbiologische Methoden</b> .....	40
<b>2.2.2.1. Klonierngen</b> .....	40
<b>2.2.2.2. RNA Isolierung</b> .....	41
<b>2.2.2.3. Reverse Transkription</b> .....	41
<b>2.2.2.4. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)</b> .....	42
<b>2.2.2.5. Semiquantitative PCR (sq-PCR)</b> .....	42
<b>2.2.3. Biochemische Methoden</b> .....	43
<b>2.2.3.1. SDS-PAGE und Western Blot Analysen</b> .....	43
<b>2.2.3.2. Northern Blot Analysen</b> .....	44
<b>2.2.3.3. Luziferasereporter Analysen</b> .....	44
<b>2.2.3.4. Ko-Präzipitationen von Protein-Protein-Liganden</b> .....	45
<b>2.2.3.5. Massenspektrometrische Analysen (LC-MS/MS)</b> .....	46
<b>2.2.4. Zellphänotypische Analysen</b> .....	46
<b>2.2.4.1. 2D-Proliferationsanalysen</b> .....	47
<b>2.2.4.2. 3D-Sphäroidwachstumsanalysen</b> .....	47
<b>2.2.4.3. Bemessung der Anoikis-Resistenz</b> .....	47
<b>2.2.4.4. Bestimmung der Zellviabilität</b> .....	47
<b>2.2.4.5. Bestimmung der Apoptose</b> .....	48
<b>2.2.4.6. TGF<math>\beta</math>-Behandlung</b> .....	48
<b>2.2.4.7. Zellzyklusanalysen</b> .....	48
<b>2.2.5. Immunofloureszenz-basierte Methoden</b> .....	49
<b>2.2.6. Bioinformatische Analysen</b> .....	50
<b>2.2.6.1. Next generation sequencing und nachfolgende Analysen</b> .....	50
<b>2.2.6.2. Gene Set Enrichment Analysen</b> .....	51

<b>2.2.6.3. Datenbank-basierte Analysen</b> .....	52
<b>2.2.7. Statistische Auswertungen und Visualisierungen</b> .....	53
<b>3. Ergebnisse</b> .....	54
<b>3.1. Die Rolle der Proteine RAVER1 und PTBP1 in der Tumorprogression</b> .....	54
<b>3.1.1. RAVER1 als möglicher pro-onkogener Faktor im Lungenadenokarzinom</b> .....	54
<b>3.1.2. Einfluss von RAVER1 auf die Tumorzellproliferation</b> .....	56
<b>3.2. Funktion der RAVER1-PTBP1 Assoziation in Perinukloelären Kompartimenten</b> .....	63
<b>3.2.1. Analyse der RAVER1-PTBP1 Assoziation</b> .....	64
<b>3.2.2. Einfluss von RAVER1 auf die PNC Homöostase</b> .....	65
<b>3.3. Einfluss von RAVER1 auf proliferative Signalwege</b> .....	68
<b>3.4. Einfluss von RAVER1 auf die posttranskriptionelle Regulation</b> .....	74
<b>3.5. Analyse des alternativen Spleißens durch RAVER1 und PTBP1</b> .....	78
<b>3.6. Assoziation von RAVER1 mit weiteren Proteinen</b> .....	82
<b>3.7. Einfluss von RAVER1 und PTBP1 auf den miR/RISC Signalweg</b> .....	84
<b>3.8. Zusammenhang zwischen dem alternativen Spleißens und modulierter Signalwege unter RAVER1- und PTBP1-Depletion</b> .....	90
<b>3.8.1. <i>In Silico</i> Analyse des alternativen Spleißens des TGF<math>\beta</math>-Signalweges</b> .....	93
<b>3.8.2. <i>In Silico</i> Analyse des Einflusses von RAVER1 und PTBP1 in der Immunantwort ..</b> .....	96
<b>4. Diskussion</b> .....	102
<b>4.1. Molekularbiologische Funktion von RAVER1 in PNCs</b> .....	102
<b>4.2 RAVER1 als pro-onkogener Faktor in der LUAD-Tumorprogression</b> .....	106
<b>4.3. RAVER1 agiert als alternativer Spleißfaktor und beeinflusst die Tumorprogression</b> .....	109
<b>4.4. Regulation der zellulären Immunantwort durch RAVER1?</b> .....	113
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	119
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	120
<b>7. Anhang</b> .....	135
<b>7.1. Publikationsliste</b> .....	135

<b>7.2. Zusätzliche Daten .....</b>	<b>136</b>
<b>7.3. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>147</b>
<b>7.4. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
<b>7.5. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>155</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>156</b>
<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>157</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>158</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. RNA-Prozessierung und Regulierung

Im biologischen Kontext tragen alle Zellen dieselbe genetische Information in sich, dennoch gibt es unterschiedliche Zellarten mit vielfältigen Funktionen. Dabei besitzt das identische Genom die Fähigkeit, Muskelzellen zur Durchführung von Bewegungen, Immunzellen zur pathogenen Abwehr oder neuronale Zellen zur Weiterleitung von Reizen zu bilden. Um diese Vielfalt an Zellfunktionen zu gewährleisten, verfügen höhere eukaryotische Zellen über eine Vielzahl von Mechanismen, welche die Diversität von RNAs und Proteinen regulieren. Eine Schlüsselrolle in diesem Prozess spielen RNA-bindende Proteine (RBP), die maßgeblich zur Regulation der Vielfalt des Proteoms beitragen [1].

Die Initiation der Genexpression kann durch Transkriptionsfaktoren (TF), z.B. MYC und E2F, sowohl positiv als auch negativ reguliert werden [2, 3]. Dabei binden TFs Sequenz-spezifisch und beeinflussen die Aktivität der RNA Polymerase (Pol) II, welche zur Transkription der pre-mRNA (Vorläufer-mRNA; *precursor messenger RNA*) führt [4].

Die Verarbeitung der pre-mRNA ist ein weiterer Mechanismus zur Diversifizierung. Da die meisten Gene Introns enthalten, ist das Entfernen dieser nicht-kodierenden Bereiche zur Entstehung einer kürzeren reifen mRNA ein essenzieller Schritt der Genexpression. Zusätzlich zum konstitutiven Spleißen, führt alternatives Spleißen aus einem einzigen Gen zu mehreren mRNA-Isoformen, die unterschiedliche Proteine kodieren, sowie Unterschiede in ihren untranslatierten Bereichen (UTR, *untranslated region*) aufweisen können. Häufig erfolgt das alternative Spleißen Zell- oder Gewebe-spezifisch und spielt eine wichtige Rolle in biologischen Signalwegen der Entwicklung, aber auch bei der Entstehung von Krankheiten [5, 6].

Nach dem Spleiß-Prozess vermitteln RBPs wie ELAVs (*embryonic lethal abnormal vision*) und IGF2BPs (*insulin-like growth factor 2 binding protein*) den mRNA Export, die Translation oder regulieren den mRNA Abbau [7-9]. Ebenso können nicht-kodierende RNAs (ncRNA, *non-coding RNA*), darunter microRNAs, kleine nukleoläre RNAs, lange ncRNAs, zirkuläre RNAs und Enhancer-RNAs, das Spleißen, die RNA-Prozessierung, den mRNA-Abbau und die Proteintranslation beeinflussen [10, 11].

Ein weiterer Mechanismus durch den diverse zelluläre Prozesse reguliert werden – u.a. die Steuerung der Genexpression auf RNA-Ebene – ist die Organisation und Bildung von membranlosen Kondensaten. Diese beinhalten neben Proteinen in der Regel insbesondere kodierende als auch nicht-kodierende RNAs [12]. Diese Kondensate können vielseitige Formen annehmen, darunter der Nukleolus sowie Speckles im Zellkern oder *Processing-Bodies (P-Bodies)* im Zytoplasma. Obwohl Gegenstand aktiver Forschung konnten all diese Granulate in Zusammenhang mit der Kontrolle diverser zellulärer

Funktionen gebracht werden, insbesondere der direkten, wie indirekten Kontrolle der Genexpression. Nukleoli sind in nahezu jeder eukaryotischen Zelle vorhanden und stellen eine der größten membranlosen Strukturen dar, in denen die Synthese der ribosomalen RNA und die Assemblierung der Ribosomen stattfindet [13]. Die meisten Komponenten des Spleißosomens sowie der RNA Pol II befinden sich in nukleären Speckles („Kernsprekel“), wodurch ein Zusammenhang zwischen Kondensat-Organisation und Regulation insbesondere des post-transkriptionellen Spleißens vermutet [14]. Zytoplasmatische *P-Bodies* hingegen enthalten nicht-translatierte mRNAs sowie Faktoren des mRNA-Abbaus und sind in der Kontrolle der Translation sowie dem Abbau involviert [15]. Jedes dieser Kondensate umfasst unterschiedliche molekulare Komponenten, welche für Stunden bis zu Tagen stabil verbleiben können. Interessanterweise werden häufig intrinsisch ungeordnete Proteine in membranlosen Kondensaten, wie die hoch ungeordnete TNRC6-Proteinfamilie (*trinucleotide repeat-containing gene 6*) in *P-Bodies*, oder SRSFs (Serine (S)/Arginin (R)-reicher Spleißfaktor) in nukleären Speckles, vorgefunden [12, 16, 17].

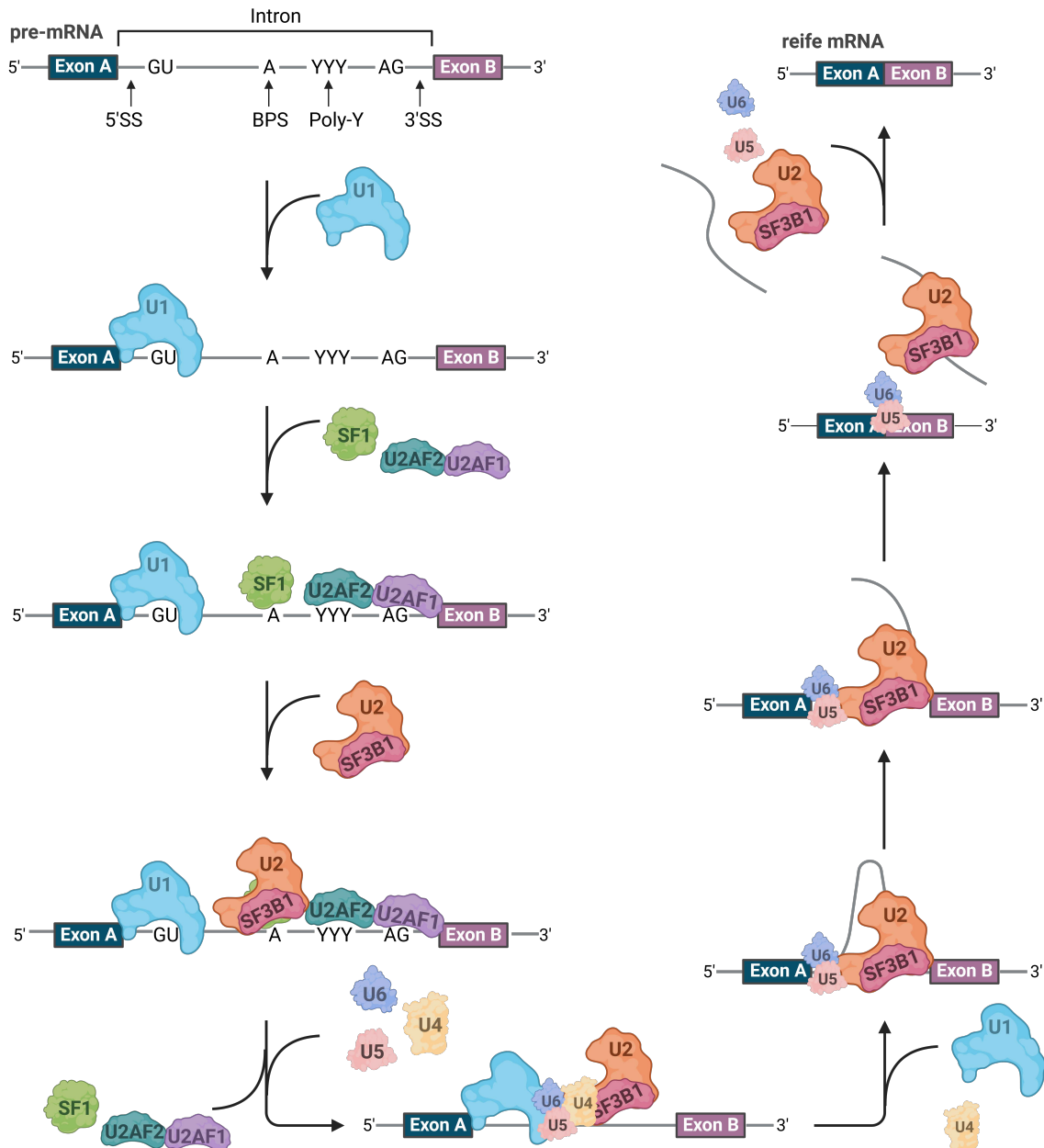
Zusammenfassend sind insbesondere die Prozesse des alternativen Spleißens, die 95 % der Gene betreffen, sowie die microRNA-vermittelte Regulation, die ~ 50 % aller Transkripte betrifft, als Schlüsselkomponenten zur Bildung Zelltyp-spezifischer Proteinvarianten von entscheidender Bedeutung [18, 19]. Zelluläre Prozesse können ferner durch die Bildung von Kondensaten reguliert werden.

### 1.1.1. Post-transkriptionelle Regulation durch Alternatives Spleißen

Trotz der Identifizierung von etwa 20.000 Protein-kodierende Gene durch das *Human Genome Project*, war die Anzahl wesentlich geringer als die Vermutungen bisher nahelagen [20, 21]. So weisen im Vergleich *Caenorhabditis elegans* ~19.000 oder *Drosophila melanogaster* ~ 14.000 Protein-kodieren Gene auf [20-22]. Nichtsdestotrotz ist das humane Genom weit komplexer und generiert durch alternatives Spleißen über 85.000 verschiedene Protein-kodierende Transkripte. In einem präzise abgestimmten Prozess werden nicht-kodierende Introns entfernt und kodierende Exons miteinander verbunden, sodass eine reife mRNA mit protein-kodierendem offenen Leseraster sowie dem 5' und 3' untranslatierten Bereich entsteht (Abbildung 1) [5, 18]. Das Spleißen kann entweder während der Transkription (ko transkriptionelles Spleißens), oder nach der Transkription, nachdem das Transkript von der DNA abgespalten wurde (post-transkriptionelles Spleißen) erfolgen. Während das ko transkriptionelle Spleißen einer Regulation von transkriptions-abhängigen Mechanismen unterliegt, können beim post-transkriptionellen Spleißen zusätzliche Modulierungen stattfinden, sowie nachgeschaltete Prozesse, wie der RNA-Export [23]. Es ist jedoch gegenwärtig nicht eindeutig, wie viele Spleiß-Prozesse bevorzugt einer ko- beziehungsweise post-transkriptionellen Regulation unterliegen.



Generell wird der mehrstufige Spleiß-Vorgang, ob ko- oder post-transkriptionell, vom Spleißosom koordiniert, einer Struktur, die aus den fünf Uracil-reichen kleinen nukleären Ribonukleoproteinen (snRNP; *s*mall *n*uclear *r*ibonucleoprotein) U1, U2, U4, U5 und U6 sowie zahlreichen assoziierten Proteinen besteht [24, 25].

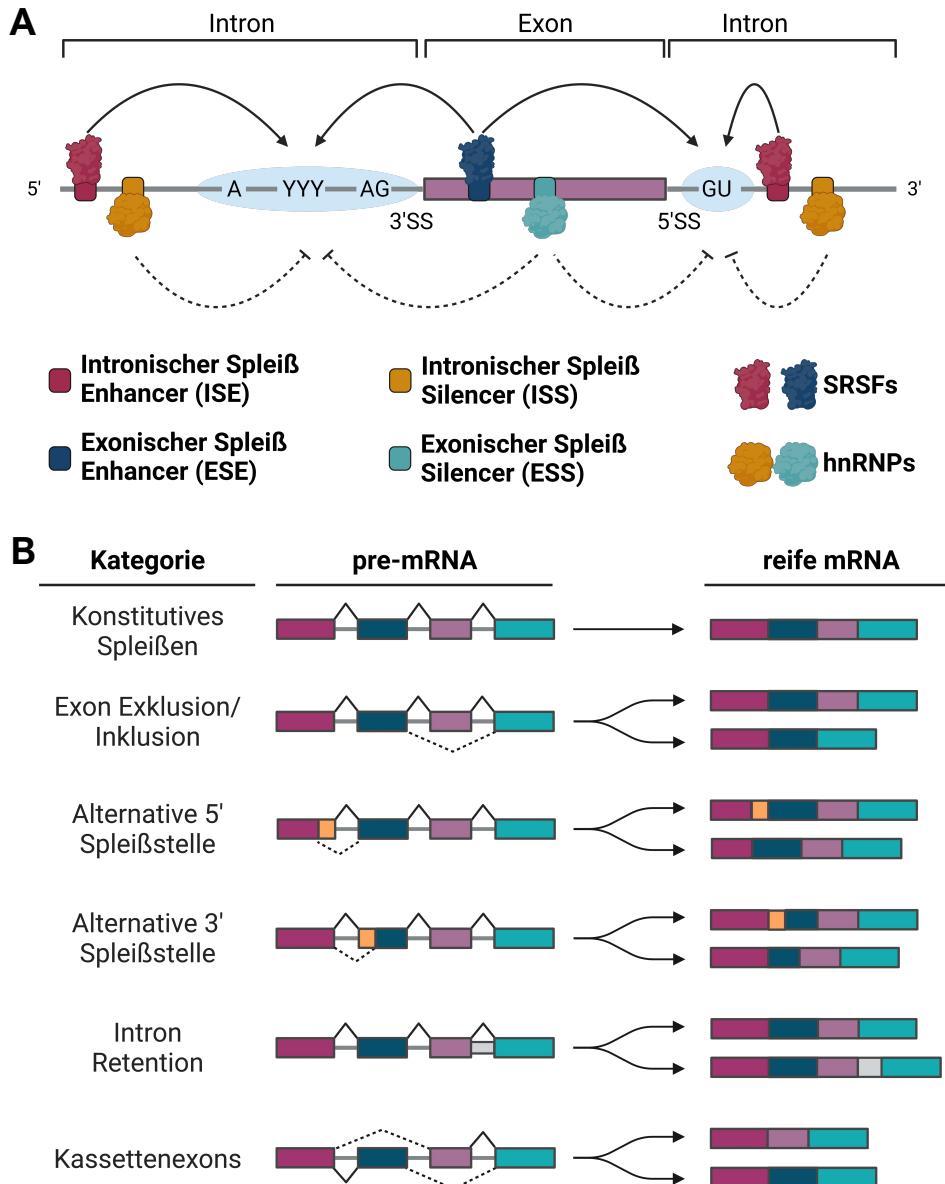


**Abbildung 1: Spleißosom-Assemblierung und katalytische Schritte des Spleißens.** Das Spleißen der pre-mRNA durchläuft mehrere Schritte in der Assemblierung des Spleißosoms. Die Initiierung des Spleiß-Vorgangs beginnt mit der Bindung des snRNPs U1 an die 5' Spleißstelle (5'SS), und der Rekrutierung von SF1 und U2AF an die *Branchpoint*-Stelle (BPS) und die 3' Spleißstelle (3'SS). Dadurch erfolgt die Anbindung des snRNPs U2 in Verbindung mit SF3B1. Die Bindung des tri-snRNPs U4/U5/U6 an die pre-mRNA führt zur Ablösung von SF1 und U2AF und zur Bildung eines inaktiven Komplexes. Durch Umstrukturierung und Entfernen der snRNPs U1 und U4 entsteht anschließend der katalytisch aktive Komplex. Dieser führt die Spleiß-Reaktion durch, bei der das Intron entfernt wird mit dem Resultat der reifen mRNA. Weitere Abkürzungen sind im Fließtext erläutert. Die schematische Darstellung wurde aus Bessa *et al.* (2020) und Ren *et al.* (2021) adaptiert [26, 27].

Der Spleißvorgang beginnt mit der Erkennung der Exon-Intron-Grenzen in der pre-mRNA [26, 27]. 5' Spleißstellen (SS) befinden sich am 5' Ende, 3'SS sind am 3' Ende eines Introns lokalisiert, während *Branchpoint*-Stellen (BPS) 18-40 Nukleotide (nt) *upstream* einer 3'SS zu finden sind [28]. Die Initiation des Spleißens erfolgt durch die Bindung des snRNP U1 an die Konsensus-Sequenz CAG/GUAAGU der 5'SS, wobei besonders das GU an Position 4/5 entscheidend ist, und kann im Falle eines ko-transkriptionellen Spleißens von der C-terminalen Domäne der RNA Pol II unterstützt werden [29, 30]. Die BPS der pre-mRNA wird von dem Spleißfaktor 1 (SF1) erkannt, während U2 snRNP-Hilfsfaktor 1 (U2AF1; *U2 snRNP auxiliary factor 1*) und U2AF2 die Konsensus-Sequenz (AG-Dinukleotid) der 3' SS und den Polypyrimidin- (Poly(Y))Trakt erkennen und binden [26, 27]. Durch die Bindung an diese drei Konsensus-Sequenzen assoziiert das snRNP U2 mit der BPS und wird durch SF3B1 (Spleißfaktor 3B Untereinheit 1) stabilisiert [26]. Eine intronische Erkennung führt zur Interaktion des U4/U5/U6-tri-snRNPs und gleichzeitig zur Dissoziation von SF1 und den Hilfsfaktoren, sodass ein katalytisch inaktiver Komplex gebildet wird [26, 27]. Eine Umwandlung in einen katalytisch aktiven Komplex erfolgt durch verschiedene Konformations- und Zusammensetzungsänderungen, sowie der Abspaltung der U1 und U4 snRNPs [26, 31]. Die eigentliche Spleiß-Reaktion erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende Umesterungsreaktionen und erneuter Konformations- und Kompositionsänderungen, wodurch eine Exon-Exon Ligation zur Bildung der reifen mRNA führt [27, 32].

Der Spleiß-Prozess umfasst dabei sowohl das konstitutive als auch das alternative Spleißen. Konstitutives Spleißen erzeugt ein einziges Transkript aus einer pre-mRNA. Dies tritt auf, wenn die pre-mRNA starke Spleißstellen mit gut erkennbaren Konsensus-Sequenzen aufweist, die problemlos vom Spleißosom erkannt werden können. Im Gegensatz dazu konkurrieren beim alternativen Spleißen mindestens zwei verschiedene 5'SS oder 3'SS miteinander. Diese alternativen Spleißstellen sind oft weniger stark und benötigen daher zusätzliche Spleiß-regulatorische Elemente (SREs) für ihre Erkennung (Abbildung 2A) [27, 33]. Abhängig von ihrer Position und Aktivität können *cis*-agierende SREs in vier Kategorien eingeteilt werden: Exonische und Intronische Spleiß *Enhancer* (ESE/ ISE), sowie Exonische und Intronische Spleiß *Silencer* (ESS/ ISS). *Cis*-agierende Elemente können *trans*-agierende Spleißfaktoren rekrutieren, um den Einschluss beziehungsweise Ausschluss eines Elements zu beeinflussen. *Enhancer* („Verstärker“) Elemente werden in der Regel von *trans*-agierenden RBPs, wie der SRSF-Familie erkannt, wodurch das Exon inkludiert wird [26, 34]. Im Gegensatz dazu interagieren *Silencer* („Dämpfer“) Elemente mit *trans*-agierenden Faktoren, wie den heterogenen Ribonukleoproteinen (hnRNPs), mit dem Resultat der Inhibierung der Spleißstelle und folglich der Exklusion des Exons [26, 35]. Dennoch gibt es verschiedene alternative Spleiß-Ereignisse, bei denen SRSFs und hnRNPs, aber auch weitere Spleißfaktoren wie NOVA (Neuro-onkologisches ventrales Antigene), FOXP (forkhead Box

Protein) und PTB (Polypyrimidin-Track Bindendes Protein), sowohl als *Enhancer*, als auch als *Silencer* fungieren [27]. Die Aktivität der SREs hängt stark von ihrer relativen Position innerhalb der pre-mRNA ab, wodurch erneut eine hohe Flexibilität in der Spleiß-Regulation gewährleistet wird [30].



**Abbildung 2: Komplexe Interaktion zwischen *cis*- und *trans*-agierenden Faktoren zur Regulation des alternativen Spleißens.** (A) Die Bindung der *trans*-Faktoren wie SRSFs oder hnRNPs an *cis*-agierende Elemente innerhalb Exons oder Introns kann zur Inklusion oder Exklusion eines Exons führen. Durchgezogene Linien kennzeichnen dabei eine Stimulierung, gestrichelte Linien eine Inhibierung der Spleißstelle durch den jeweiligen Faktor. (B) Die Kombination unterschiedlicher *cis*-agierender Elemente mit verschiedenen *trans*-agierenden Faktoren kann zu unterschiedlichen Spleiß-Ereignissen führen. Pink-, petrol-, lila-, orange- und türkis-farbene Exons oder graue Introns können dabei in unterschiedlichen Kombinationen gespleißt werden. Durchgezogenen und gestrichelte Linien deuten dabei auf die unterschiedlichen Spleiß-Ereignisse einer jeweiligen Kategorie. Schematische Darstellungen wurde nach Bessa *et al.* (2020) modifiziert [26].

Unter anderem wirkt eine Poly-G-Sequenz innerhalb eines Introns als ISE und interagiert mit hnRNP H, welches zur Inklusion des Exons führt [35]. Gleichzeitig kann ein Poly-G innerhalb

eines Exons auch als ESS fungieren und somit eine *Silencer* Funktion übernehmen, die zur hnRNP H-vermittelten Hemmung und folglich zur Exon Exklusion führt [36]. Bei SRSFs wird häufig eine *Enhancer* Funktion beobachtet, wenn ein SRE sich innerhalb eines Exons befindet (ESE) [37]. Jedoch kann das Spleißen auch durch SRSF1 inhibiert werden, wenn sich ein SRE innerhalb des Introns befindet (ISS) [38]. *Cis*- und *trans*-agierenden Faktoren regulieren hierdurch mehrere verschiedene Spleiß-Ereignisse, wie schematisch in Abbildung 2B gekennzeichnet. Als häufigstes Ereignis betrifft die Exklusion eines Exons etwa 40% aller alternativ gespleißten Transkripte [26]. Zudem können alternative 5' oder 3' Spleiß-Stellen innerhalb einer intronischen Sequenz verwendet werden, ein Intron beibehalten werden (Intron Retention) oder Kassettenexone (*mutually exclusive*), bei denen nur eins von beiden inkludiert wird, reguliert werden. Alternative Spleißfaktoren werden dabei häufig gewebespezifisch exprimiert, wodurch eine Zelldifferenzierung gewährleistet werden kann [39]. So werden über 50 % der alternativen Spleiß-Isoformen unterschiedlich in verschiedenen Geweben exprimiert [18]. Im Gehirn, dem funktionell vielfältigsten Gewebe, wurden zum Beispiel die Spleißfaktoren nPTB (PTBP2), NOVA1 und NOVA2 identifiziert, welche das Spleißen einiger Nervensystem-spezifischer Exone vermitteln [39].

Der Prozess des Spleißens, insbesondere des alternativen Spleißens, ist ein komplex hochregulierter Mechanismus, welcher häufig gewebe- und entwicklungspezifisch stattfindet. Er trägt dazu bei, ein vielfältiges Proteom mit variablen Aktivitäten zu generieren, sodass eine breite Funktion von verschiedenen Zell- und Gewebeanlagen erst ermöglicht wird. Durch Änderungen in der Promotor-Aktivität entsteht zwar eine Variabilität von Transkripten, jedoch ändert dies nur die Menge der mRNA. Alternatives Spleißen trägt ebenfalls zu einer Änderung der mRNA-Abundanz bei, wenn durch den Spleiß-Prozess ein frühzeitiges Stop-Codon eingefügt wird und die mRNA dadurch abgebaut wird (NMD, *nonsense-mediated decay*) [40, 41]. Bemerkenswert ist jedoch auch, dass etwa 75% der alternativen Spleiß-Ereignisse innerhalb der protein-kodierenden Region einer mRNA liegen [42]. Dies kann zu Veränderungen in der primären Proteinstruktur führen, die sich in einer modifizierten Proteineigenschaft und -funktion äußern können, wie zum Beispiel einer modulierten Bindung, Beeinflussung der Lokalisierung oder veränderter enzymatischer Aktivität.

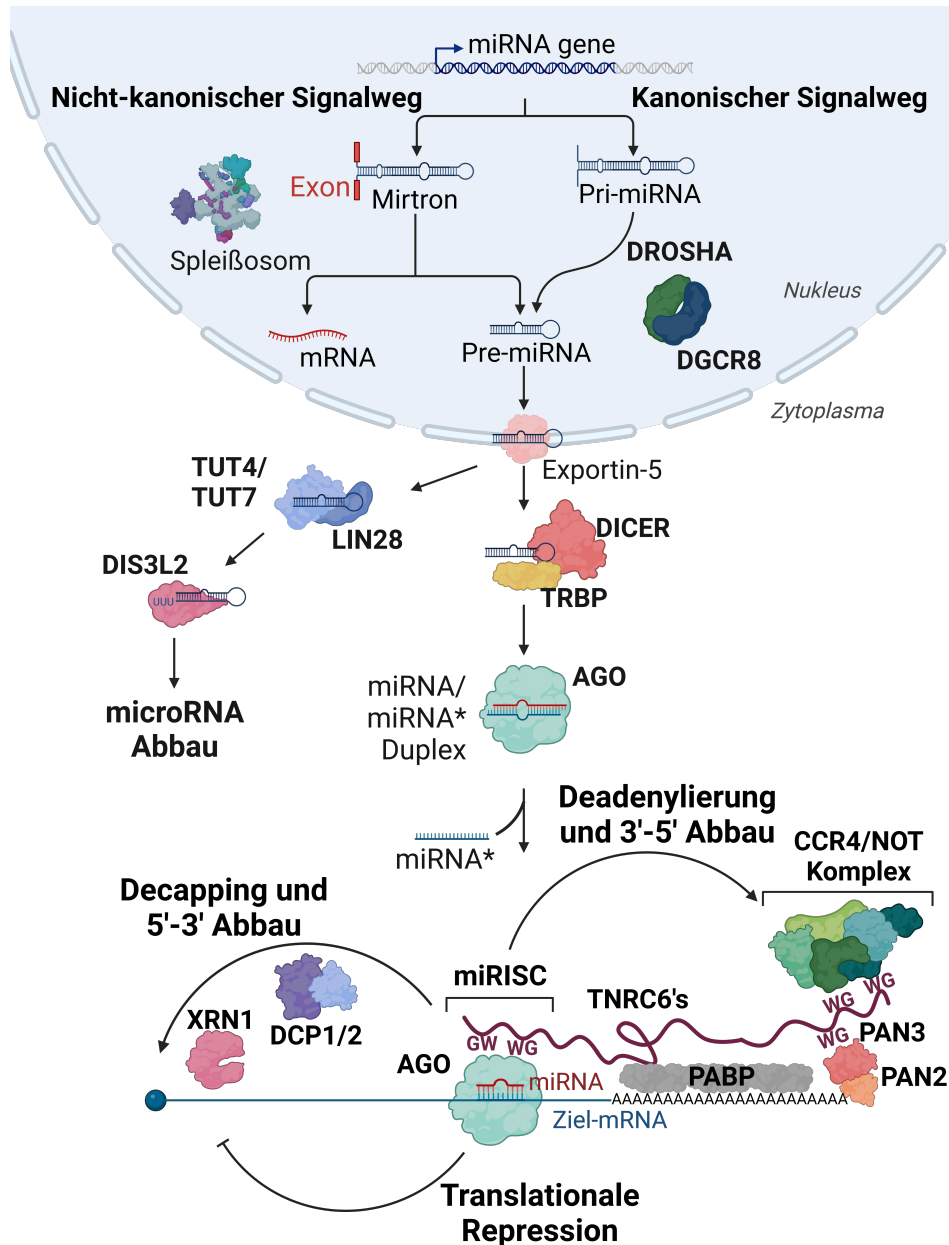
Eine Assoziation zwischen einem deregulierten Spleiß-Prozess und einer hohen Anzahl an Krankheiten, einschließlich Krebs, ist dabei nicht verwunderlich [30, 39].

### 1.1.2. Post-transkriptionelle Regulation durch miRNAs

Etwa die Hälfte aller Protein-kodierenden Transkripte in Säugetieren werden von microRNAs (miRs, miRNAs) reguliert [19]. Die etwa 20-22 nt-langen nicht-kodierenden RNAs spielen dabei eine entscheidende Rolle in der Feinabstimmung der Protein-Expression. Störungen

innerhalb der miR-Biogenese, ihrer Funktion oder dessen Abbau können daher zur Dysfunktionalität der Zelle führen.

Die meisten miRNAs entstehen durch einen RNA Pol II-abhängigen Prozess als primäre Vorläufer-miRNAs (pri-miRNAs), auch kanonischer Signalweg genannt (Abbildung 3) [43].



**Abbildung 3: miRNA Biogenese und Funktion.** Die kanonische Biogenese der miRNAs über eine RNA Pol II abhängige Transkription führt zu einer primären miRNA (pri-miRNA) und anschließender Prozessierung durch DROSHA und DGCR8 zur Vorläufer miRNA (pre-miRNA). Alternativ können pre-miRNAs auch aus intronischen Regionen, sogenannten Mirtrons, während des Spleißens entstehen (nicht-kanonisch). Nach zytoplasmatischem Export werden pre-miRNAs von DICER1 und TRBP weiter zu einem miRNA/miRNA\* Duplex prozessiert oder durch LIN28 und TUT4/7 für einen DIS3L2-vermittelten Abbau modifiziert. Eine Assoziation zwischen dem miRNA Duplex und AGO führt zur Dissoziation des Passagier miRNA\* Stranges, während die reife miRNA zusammen mit AGO den miRISC bildet. Eine Bindung des miRISC an die Ziel-mRNA führt zur Rekrutierung weiterer Proteine, wodurch eine Repression der Translation sowie mRNA Abbau induziert werden. Abkürzungen sind im Fließtext indiziert. Schemata wurden nach Jonas und Izaurralde (2015) und Lin und Gregory (2016) erstellt [52, 45].

Die haarnadel-ähnliche Struktur der pri-miRNA agiert als Substrat des RNase III Endonuklease DROSHA, welche zusammen mit dem dsRNA-bindenden Protein DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) die Prozessierung zur ~ 70 nt langen pre-miRNA (Vorläufer miRNA, *precursor miRNA*) vermittelt [44]. Etwa 30% der pre-miRNAs entstehen als Beiprodukt des Spleißens aus Introns, sogenannten Mirtrons, in einem nicht kanonischen Signalweg [19, 45]. Nach dem Exportin-5 abhängigen Export ins Zytoplasma erfolgt ein zweiter Prozessierungsschritt durch die RNase III DICER1, unterstützt durch TRBP (*Transaktivierung-reagierenden RNA-bindendes Protein*) [46, 47]. Diese vermitteln das Verkürzen der pre-miRNA zu einem ~ 20 Basenpaar (bp) kurzem miRNA/miRNA\* Duplex, der die reife miRNA und den Passagier-Strang (miRNA\*) beinhaltet. Die Familie der Argonaut-Proteinen (im humanen System AGO1-4) inkorporieren den miRNA Duplex und bilden dabei den miRISC (*miRNA-induced silencing complex*), wobei die reife miRNA gebunden bleibt und der Passagier-Strang dissoziiert [48]. Dabei besitzt lediglich AGO2 eine katalytische Aktivität, wodurch der Passagier-Strang gespalten und dissoziiert wird. Nicht-katalytisches AGO1, 3 und 4 prozessieren den Passagier-Strang in einem langsameren spaltungsunabhängigen Mechanismus.

Die Bindung des miRISC an Ziel-mRNAs erfolgt meist im 3'UTR der mRNA, wobei 6-7 nt der miRNA („*seed region*“) nahezu komplementär zur Ziel-mRNA sind [49, 50]. In frühen Stadien der miRNA-vermittelten Regulation führt eine Bindung des miRISC zu einer Repression der Translation, während in späteren Stadien der mRNA-Abbau eingeleitet wird (Abbildung 3) [45]. Hierbei rekrutiert AGO die Proteinfamilie TNRC6. Diese Proteinfamilie, im Vertebraten bestehend aus TNRC6A (GW182), TNRC6B und TNRC6C, zeichnet sich durch ihre hohe Unstrukturiertheit und das Vorhandensein mehrerer Glycin-Tryptophan (GW) Wiederholungen aus, welche als Gerüst zur Koordination verschiedener Interaktionen dienen [51]. Ebenfalls können TNRC6-Proteine zur Phasen-Separation führen, wodurch *P-Bodies* gebildet werden und eine funktionelle Regulation innerhalb dieser Kondensate stattfinden kann [16]. Die N-terminale GW-reiche Domäne bindet an AGO-Proteine, wodurch eine Interaktion mit einem oder bis zu drei AGOs ermöglicht wird. Gleichzeitig rekrutiert die C-terminale *Silencing*-Domäne den CCR4/NOT Komplex, den Deadenylation Komplex PAN2-PAN3 sowie Poly-Adenin (A) bindende Proteine (PABP) [51]. Dies führt zunächst zu einer initialen Deadenylation durch PAN2-PAN3, gefolgt von weiterer Deadenylation durch den CCR4/NOT Komplex, welches in einem 3' zu 5' mRNA-Abbau resultiert [52, 53]. Ein verkürzter Poly(A)-Schwanz der mRNA rekrutiert ebenfalls die *Decapping* Proteine DCP1 und 2, die zur Entfernung der 5' Cap-Struktur (7-Methylguanosin) und anschließendem XRN1 (*Exoribonuklease 1*)-abhängigen 5' zu 3' mRNA-Abbau führen [45, 52].

Eine Regulation der miRNA Abundanz wird durch RNA-bindende Proteine während der Prozessierung beeinflusst (Abbildung 3). Das bekannteste Beispiel ist hierbei der LIN28 (Lin-

28 Homolog) -abhängige Abbau von miRNAs, der unter anderem die Prozessierung der let-7 miRNA-Familie inhibiert. Eine Bindung an die pre-miRNA im Zytoplasma führt zur Rekrutierung der terminalen Uridyl-Transferasen TUT4 oder TUT7. Diese katalysieren das Hinzufügen eines kurzen Oligonukleotides aus Poly-Uracil (U) an die pre-miRNA, wodurch die Prozessierung durch DICER reprimiert wird. Stattdessen erfolgt ein Abbau der Poly(U)-pre-miRNA vermittelt durch DIS3L2 (*DIS3-like exonuclease 2*) [45].

miRNAs spielen eine entscheidende regulatorische Rolle in biologischen Prozessen und Signalwegen. Veränderungen in den miRNA Expressionsprofilen oder der miRISC-vermittelten mRNA-Regulation können zur Entstehung von Krankheiten, wie Krebs, führen. [45].

## 1.2. Molekulare Mechanismen der Tumorentstehung

Vogelstein und Kinzler fassten jahrelange Tumorforschung in einem Satz zusammen: „*Cancer is, in essence, a genetic disease.*“ (Krebs ist, im Wesentlichen, eine genetische Krankheit) [54]. Dennoch bedarf es mehr als eine einzelne Mutation, um eine Tumorentstehung zu bedingen. Mutationen in Onkogenen können zu konstitutiv aktiven Genen führen, beispielweise durch chromosomale Translokationen oder erhöhter Genamplifikation. Unter anderem wird häufig eine BRAF-Mutation in Tumoren beobachtet, die zur Aktivität der Kinase-Domäne führt. Hierdurch kann auch in Abwesenheit benötigter Signale eine Signalweiterleitung via MAPK-Kaskade (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) vermittelt werden, wodurch eine Expression pro-proliferativer Gene gefördert wird [55]. Im Gegensatz dazu können Mutationen die Aktivität von Tumorsuppressoren inhibieren. Eine der bekanntesten Mutation betrifft das TP53-Gen (Tumorsuppressor Protein 53), welches in nahezu allen Tumorarten identifiziert wurde [56]. TP53 Mutationen erstrecken sich über alle kodierenden Exone, treten jedoch häufig in der DNA-Bindungsdomäne des Proteins auf, wodurch der Transkriptionsfaktor seine Fähigkeit zur DNA-Bindung verliert [57]. In den letzten Jahrzehnten wurden erhebliche Fortschritte bezüglich des Verständnisses der Rolle von Mutationen und chromosomaler Instabilität in der Tumorentstehung erzielt. Diese genomischen Veränderungen können die Expression von Genen erhöhen oder reprimieren, zu einem vorzeitigen Stop-Codon führen (*nonsense* Mutation), insbesondere aber die Funktion von Proteinen durch *gain of function/ loss of function* Mutationen sowie *downstream* Prozesse beeinflussen. Dies führt unter anderem dazu, dass die Maschinerie rund um die RNA-Prozessierung, insbesondere dem alternativen Spleißen, beeinträchtigt wird. Dies hat nicht nur Folgen in der biologischen Aktivität einzelner Faktoren, sondern kann in ihrer Gesamtheit und unter Ausnutzung von Synergien maßgeblich die Tumorpheriferation fördern, respektive die Apoptose limitieren.

### 1.2.1. RNA-Prozessierung in Tumoren

Die Funktion einer gesunden Zelle ist von der Zusammensetzung ihrer nicht-kodierenden RNAs, Protein-kodierenden RNAs und Proteinen abhängig. Veränderungen dieser Komposition, sei es durch direkt betreffende Mutationen, deregulierte RNA-Transkription, moduliertes alternatives Spleißen oder aberrante post-transkriptionelle Regulation, sind der Grundstein für die Entstehung von diversen Krankheiten [5, 58]. Tumore sind dabei von einer unkontrollierte Zellproliferation, einer gestörten Apoptose und dem Überleben beschädigter Zellen abhängig. Tumorzellen umgehen mehrere Sicherheitsvorkehrungen, indem sie tumorfördernde (onkogene) Gene bevorzugt exprimieren und tumorsuppressive Gene inhibieren. Sowohl Protein-kodierende als auch nicht-kodierende Gene wie miRNAs, können als Onkogene oder Tumorsuppressoren agieren, welches die Zusammensetzung von RNAs und somit funktionelle Proteine beeinflusst [59]. Als Resultat werden somit biologische Prozesse und Signalwege gestört, mit der Konsequenz einer unkontrollierten Proliferation und gesteigertem metastatischem Potential von Tumorzellen [45].

Etwa 15 % aller genetischen Erkrankungen sind interessanterweise auf Mutationen innerhalb der Spleißstellen-Konsensus-Sequenz oder den *cis*-agierenden Elementen zurückzuführen, wodurch präzise Spleiß-Prozesse beeinträchtigt werden [60, 61]. Jegliche Veränderung innerhalb der Spleiß-Maschinerie, sei es durch Mutation in der pre-mRNA oder durch veränderte Spleißosom- und Spleißfaktor-Zusammensetzung, hat Auswirkungen auf die Abundanz resultierender mRNA-Isoformen und somit dessen Proteinfunktion [27]. In einer breiten Anzahl von Tumorentitäten konnte ein übergreifend verändertes Spleiß-Muster identifiziert werden, welches maßgeblich zu neoplastischer Transformation, Tumorprogression und Therapie-Resistenzen führten [62, 63]. Besonders alternative Spleißfaktoren wurden im letzten Jahrzehnt als neue Klasse von Onkoproteinen oder Tumorsuppressoren hervorgehoben, die erheblich zur Tumorprogression beitragen [32].

Mutationen innerhalb von Spleißfaktoren können zu einer veränderten Funktion führen. So wurde unter anderem eine SRSF2 Mutation in myelodysplastischem Syndrom (MDS) mit einer erhöhten Progression von MDS zur akuten myeloischen Leukämie assoziiert [64]. Eine *missense* Mutation in der proximalen Nähe der RNA-Erkennungsmotiv Domäne (RRM, *RNA recognition motif*) erhöht eine Bindungsspezifität für die CCCNG Konsensus-Sequenz, welches zu einem frühzeitigen Stop-Codon in der EZH2 (Histone Methyltransferase) RNA führt [65]. Aberrante Expressionslevel der Spleißfaktoren können ebenfalls eine Spleiß-Deregulation verursachen. Der pro-onkogene SRSF1 ist häufig in Tumoren der Brust, Lunge, Darm oder Blase aufgrund einer erhöhten Locus-Amplifikation überexprimiert [32]. SRSF1 reguliert unter anderem die Exon-Inklusion in der BIN1 (*bridging interactor 1*) pre-mRNA, mit dem Resultat einer Isoform ohne tumorsuppressive Aktivität [66]. Die Inklusion



von Exon 12A bewirkt, dass BIN1 nicht mehr in der Lage ist an den onkogenen Transkriptionsfaktor MYC zu binden und dessen Aktivität zu inhibieren. Auch SRSF6 wird in verschiedenen Tumorentitäten überwiegend überexprimiert vorgefunden, wodurch pro-onkogene Spleißvarianten unterschiedlicher RNAs gefördert werden [67]. Ebenfalls wurden pro-onkogene Funktionen der Spleiß-Familie hnRNPs unter anderem in malignen Lungen-, Darm- und Ovarial-Karzinomen festgestellt [68-71]. Eine erhöhte Expression von PTBP1 (hnRNP-I) fördert Tumorproliferation und -wachstum sowie Invasion [70, 71].

Veränderungen in der Expression dieser Spleißfaktoren wurden mit verschiedenen Einflüssen auf Transkription, post-transkriptionelle Modifikationen und post-translationalen Regulation in Verbindung gebracht [32]. Onkogenes MYC trägt unter anderem zur verstärkten Expression von Spleißfaktoren aus der hnRNP-Familie (z.B. PTBP1, hnRNPA1 und hnRNPA2) sowie der SRSF-Familie, darunter SRSF2, SRSF3 und SRSF7, bei [72, 73]. miRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation kann ebenfalls einen Einfluss auf Spleißfaktoren nehmen. Eine erhöhte Expression von SRSF1 in Tumoren konnte mit inhibierten Leveln der miR-28 und miR-505 assoziiert werden [74]. SRSF-Proteine unterliegen zusätzlich post-translationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen, die ihre Lokalisation und dadurch Aktivität beeinflussen. Phosphorylierungen durch SRSF-spezifische Protein Kinasen (z.B. SRPK1), eine Onkogen-Familie welche häufig in Tumoren überexprimiert ist, fördern den nukleären Import von aktiven SRSFs [32].

Neben einem dysfunktionalen Spleißen wurden auch Veränderungen in der miRNA- Biogenese sowie dem miRNA-Abbau in verschiedenen Tumorentitäten identifiziert. Transkriptionsfaktoren können die miRNA-Expression positiv sowie negativ beeinflussen. Beispielweise reguliert das Onkogen MYCN die Expression der onkogenen Clusterfamilie miR-17-92 im Neuroblastom [75, 76]. Die Transkriptionsfamilie der Zinkfinger-E-Box-bindenden Homöoboxen (ZEB), bestehend aus ZEB1 und ZEB2, binden direkt an regulatorische Elemente des miR-200 Gens, sodass eine Expression inhibiert wird [77]. Die tumorsuppressive let-7 miRNA inhibiert verschiedene onkogen-kodierende mRNAs, darunter HMGA2 (*high mobility group A2*), LIN28B und IGF2BP1. Diese drei Proteine bilden ein „onkogenes Dreieck“, wodurch wiederum let-7 inhibiert wird und eine Tumorproliferation sowie Migration gefördert wird [78]. LIN28B inhibiert hierbei die Biogenese der let-7 miRNA durch Abbau der Vorläufer miRNA, sodass häufig eine reverse Expression beider Faktoren in Tumoren beobachtet wird [79]. Mutationen im DICER1-Locus, welche die RNase IIIb Domäne betreffen, führen zu einer stark reduzierten Prozessierung von miRNAs, im speziellen der let-7 Familie [80]. Gleichzeitig ist eine DICER1 Expression vermehrt in Tumoren dereguliert und kann je nach Tumortyp inhibiert oder gefördert werden, woraus eine aberrante miRNA Biogenese resultiert [45].

Auch könnten subzelluläre Organisation, insbesondere nukleäre Kondensate, zur Tumorentstehung beitragen [81]. In Tumorzellen wird häufig eine Änderung in der Komposition, der Größe und der Anzahl von Nukleoli beobachtet [81, 82]. Hierdurch soll eine erhöhte Ribosom-Biogenese und folglich erhöhte Protein-Synthese, welche für eine Zellproliferation benötigt wird, gewährleistet werden [83]. Des Weiteren scheinen perinukleoläre Kompartimente (PNCs, *perinucleolar compartment*) eine Rolle in der Tumorprogression und Invasion zu spielen. Ein vermehrtes Auftreten dieser Strukturen wird mit einer verschlechterten Prognose sowie einem erhöhten metastatischen Potential in Verbindung gebracht [84-86]. PNCs enthalten RBPs wie PTBP1, CUG-BP (CUG-bindendes Protein), KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) und RAVER1, sowie RNA Pol III Transkripte wie MRP und ALU. Obwohl eine genaue Funktion in der Tumorproliferation noch nicht bekannt ist, wird vermutet, dass PNCs an dem RNA Metabolismus der Pol III Transkripte involviert sind oder Expressionsänderungen der angereicherten Proteine widerspiegeln, die an der Transkription und Prozessierung von RNA Pol II Transkripten beteiligt sind [87].

Durch ein dysfunktionales Netzwerk aus Mutationen, transkriptioneller Regulation, alternativem Spleißen, post-transkriptioneller, post-translationaler Regulation sowie subzellulärer Organisation kann aus einer normalen Zelle eine Tumorzelle entstehen. Diese Veränderungen beeinflussen unterschiedliche Signalwege, die eine Zell-Differenzierung in proliferative und maligne Tumore bewirken.

### **1.2.2. Netzwerk von Signalkaskaden fördern das Tumorwachstum**

Hanahan und Weinberg postulierten sechs wesentliche Veränderungen in der Zellphysiologie, die durchlaufen werden müssen, bevor malignes Tumorwachstum entstehen kann [88]. So sind Tumore durch sechs „Hallmarks“ (Kennzeichen) charakterisiert: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Wachstums-inhibitorischen Signalen, Umgehung des programmierten Zelltodes, grenzenloses replikatives Potential, anhaltende Angiogenese sowie Gewebeinvasion und Metastasierung. Später erweiterten sie ihre Hypothese um zwei weitere Veränderungen: einer Modifikation des zellulären Metabolismus sowie der Vermeidung einer Immunzellen-vermittelten Zerstörung [89].

Ebenfalls ergänzten sie ihre Hypothese, bei der eine genomische Instabilität sowie eine Tumor-fördernde Entzündungen zum Erwerb der Hallmarks führen [89]. Die These der genomischen Instabilität beruht auf die bereits mehrfach beschrieben Mutationen innerhalb neoplastischer Zellen, wodurch bestimmte mutierte Genotypen einen selektiven Vorteil ermöglichen. Eine mehrstufige Tumorprogression ist durch die Anhäufung von Mutation und eventueller Dominanz in der lokalen Gewebeumgebung gekennzeichnet. Einige vererbte Genotypen erfordern epigenetische Modifikationen, wie DNA Methylierung oder Histon Modifikation, um veränderte Genexpressionen auch durch nicht-mutierte Änderungen zu

regulieren. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass nahezu jede neoplastische Läsion mit Zellen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems infiltriert ist, um eine Tumorentstehung abzuwehren [90]. Entzündungsreaktion führen zur Freisetzung bioaktiver Moleküle, wie Wachstumsfaktoren und Zytokine, an die Tumor-Mikroumgebung. Diese Mikroumgebung kann zunächst inhibitorische Effekte auf aggressive, maligne Zellen ausüben. Im Verlauf der Progression können Tumorzellen durch den Erwerb verschiedener Hallmarks hemmende Signale umgehen und stattdessen für ihr eigenes Wachstum, Invasion und Metastasierung nutzen [91, 92].

Die Hypothese der benötigten sechs plus zwei Hallmarks verdeutlicht, dass Tumore ein komplexes Netzwerk an Signalkaskaden koordinieren und erweitern, um die Tumorprogression zu ermöglichen.

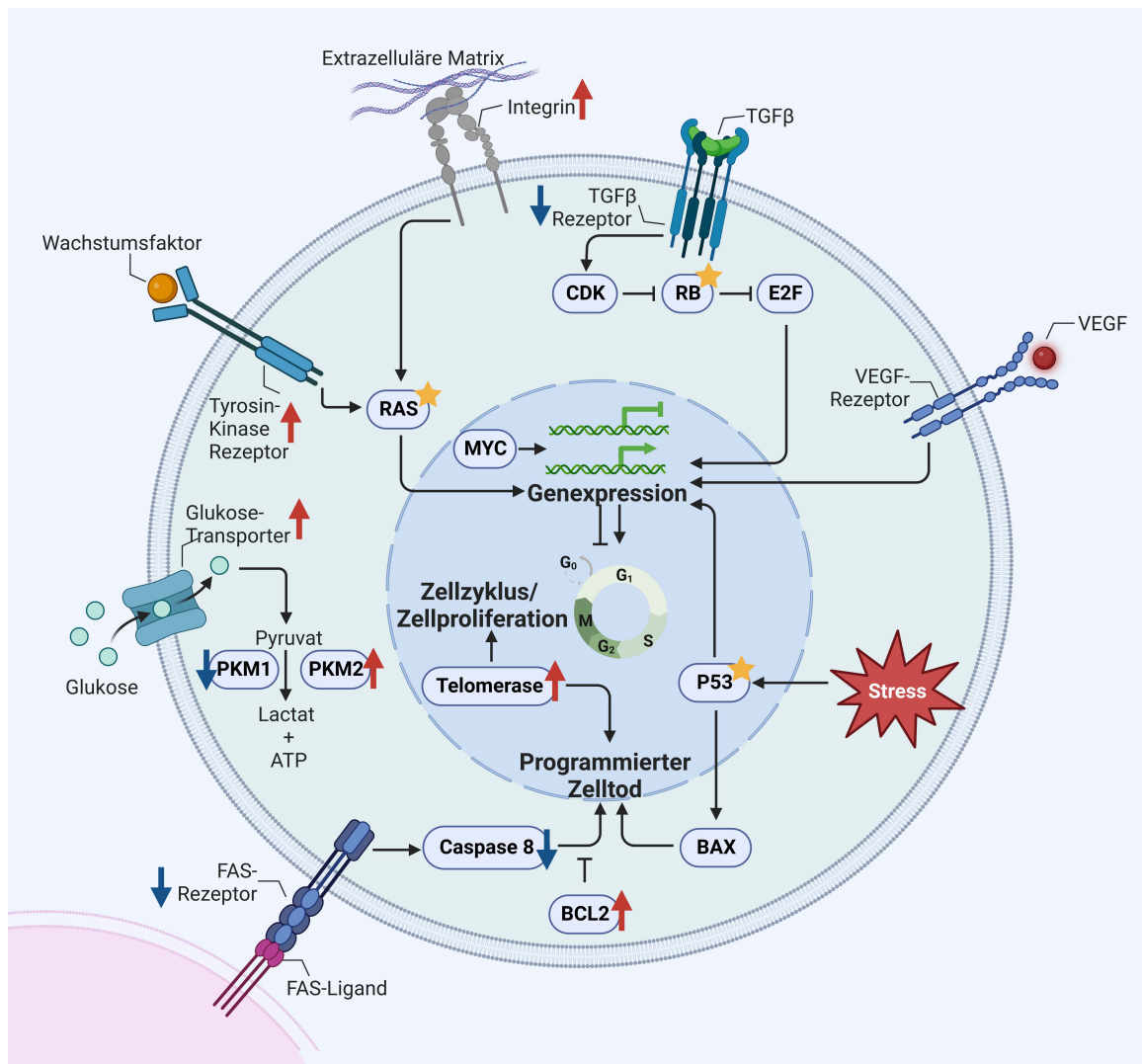
### 1.2.2.1. Pro-proliferative und Anti-apoptotische Fähigkeiten

Bevor eine Normalzelle von dem Ruhezustand in einen proliferativen Zustand übergeht, benötigt sie Wachstumssignale. Präzise freigesetzte membrangängige Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix sowie Zell-Zell-Adhäsions-Moleküle werden hierbei von Transmembranrezeptoren erkannt (Abbildung 4). Tumorzellen umgehen diese Abhängigkeit, indem sie eigene Wachstumssignale, wie TGF $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ) oder PDGF (*platelet-derived growth factor*) produzieren [93]. Rezeptoren, welche für die Weiterleitung der Wachstumssignale verantwortlich sind, besitzen häufig eine Tyrosin-Kinase-Aktivität. In Tumorzellen ist eine Überexpression dieser Rezeptoren häufig zu beobachten, wie z.B. beim epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*) [94]. Dies kann zu einer Hyperaktivität führen, wodurch schon geringe Level an Wachstumsfaktoren eine Proliferation auslösen [93]. Ebenso fördern Tumorzellen die Expression von extrazellulären Matrix Rezeptoren (Integrine), die bevorzugt wachstumsfördernde Signale übermitteln [88]. Diese multifunktionalen Oberflächen-Rezeptoren verbinden Zellen mit der extrazellulären Matrix, wodurch eine Mobilität der Zelle, Resistenz gegenüber Apoptose oder ein Eintritt in den aktiven Zellzyklus ausgelöst werden kann. Sowohl Wachstumsfaktor-Rezeptoren als auch Integrine vermitteln ihre zytoplasmatische Signalkaskade unter anderem in Abhängigkeit von der RAS (Ratten-Sarkom) -Proteinfamilie. Etwa 25 % der humanen Tumore tragen verschiedene *gain of function* (Funktionsgewinn) RAS-Mutationen, welche mit einem Tumorwachstum assoziiert sind [95]. Dabei ist RAS nicht nur für eine Weiterleitung von Wachstumsfaktoren oder extrazellulären Signalen verantwortlich, sondern auch mit anderen Signalwegen verbunden, wodurch eine Genexpression zur Förderung einer Tumorproliferation aktiviert wird [96].

Ein weiteres Hallmark von Tumoren ist ihre Resistenz gegenüber Wachstums-inhibitorischen Signalen [88, 89]. Diese dienen in gesunden Geweben zur Aufrechterhaltung der zellulären

Ruhe und Homöostase. Ähnlich wie bei wachstumsfördernden Signalen, spielen auch hier Transmembran-Rezeptoren eine Schlüsselrolle bei der intrazellulären Signalweiterleitung. Häufig werden diese Rezeptoren von tumorsuppressiven Faktoren zur Inhibierung des Zellwachstums und Proliferation reguliert. Zwei prominente Faktoren sind die Proteine RB (Retinoblastom) und TP53, welche häufig einer *loss of function* (Funktionsverlust) Mutation unterliegen [56, 97]. Die biologische Funktion von RB umfasst die Tumorsuppression, sowie Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung und der Apoptose. RB interagiert dabei mit über 100 anderen Proteinen, unter anderem mit der Transkriptionsfamilie E2F [98]. Eine Interaktion zwischen RB und E2F reguliert den Zellzyklus, wobei in der frühen G1-Phase hypo-phosphoryliertes RB mit E2F assoziiert ist und eine Expression der Zellzyklus-progressiven Gene inhibiert [99]. In späteren G1-Phasen fördern Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs, *cyclin-dependent kinase*) die Hyper-Phosphorylierung von RB, was zur Dissoziation von E2F führt und somit den Eintritt in die S-Phase ermöglicht, indem eine E2F-geförderte Expression vermittelt wird [100]. TGF $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) induziert normalerweise eine Dephosphorylierung von RB, sodass ein RB/E2F-vermittelter Zellzyklus-Arrest gefördert wird [101]. Tumorzellen können jedoch die Sensitivität gegenüber TGF $\beta$  verringern, indem die Expression der TGF $\beta$ -Rezeptoren (TGFBR1/2) inhibiert wird [102, 103]. Darüber hinaus können Veränderungen im alternativen Spleißen von Cyclinen, der Schlüsselregulatoren zur Aktivierung der Cyclin-abhängige Kinasen, den Eintritt in eine nächste Zellzyklusphase unterstützen. Zum Beispiel besitzt Cyclin D1 zwei unterschiedliche Isoformen (A und B), wobei Cyclin D1B die C-terminale Protein-Domäne fehlt [104]. Beide Isoformen fördern die Tumorphiliferation, wenn auch mit unterschiedlichen Mechanismen. Cyclin D1A fördert die G1/S Transition durch Phosphorylierung von RB, während Cyclin D1B im Nukleus verbleibt und dort die Aktivierung von Genen mit metastatischem Phänotyp fördert [105, 106].

Eine Zellproliferation hängt jedoch von mehr als der Vermeidung extrazellulärer Wachstums-inhibierender Signale ab [88]. Der Tumorsuppressor TP53 koordiniert intrazelluläre Signale, wie Stress oder DNA-Schäden, und reguliert die Induktion eines Zell-Arrestes sowie einer Apoptose [107]. Unter Stress wird TP53 durch Phosphorylierungen stabilisiert und aktiviert. Abhängig von der Art des Stress-Signals und der intrazellulären Umgebung bindet TP53 an DNA-Elemente von pro-apoptotischen Genen wie BAX (BCL2-assoziiert X) oder an Zellzyklus-Arrest-regulierenden Genen, wie CDKN1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) [108, 109]. Etwa 50 % aller humanen Tumore weisen jedoch eine TP53 Mutation auf, resultierend in einer funktionalen Inaktivierung [56, 107]. TP53 ist daher ein Beispiel für vielfältige signalübergreifende Wirkung und Vernetzung mehrerer Hallmarks, wie der Resistenz gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen und der Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose). Die Auslösung einer Apoptose kann hierbei sowohl durch intrazelluläre Signale wie Stress, als auch durch extrazelluläre Signale erfolgen.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung pro-proliferativer Mechanismen in Karzinomen.** Verschiedene meist Rezeptor-abhängige Signalwege fördern in Tumorzellen eine Expression pro-proliferativer Gene und inhibieren anti-proliferative Gene. Gleichzeitig führen unterschiedliche Mechanismen zur Inhibition des programmierten Zelltodes. Sterne kennzeichnen häufige Mutationen, rote Pfeile hochregulierte und blaue Pfeile runterregulierte Faktoren. Abkürzungen sind im Fließtext erklärt.

Diese Signalwege werden erneut über eine Liganden-Rezeptor Bindung intrazellulär weitergeleitet, wie beim FAS Ligand (FASL) und Rezeptor (FASR), welche zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) -Rezeptoren gehören [110, 111]. FASR besitzt eine intrazelluläre Domäne namens FADD (*FAS associated death domain*), die durch Zytokin-Bindung aktiviert wird und eine Rekrutierung sowie Aktivierung der Protease Caspase 8 zur Folge hat [112]. Aktive Caspase 8 wiederum fördert die Aktivierung von *downstream* Caspasen, wie Caspase 3 und 7, was zur Proteolyse zellulärer Proteine und somit zur Einleitung einer Apoptose führt [113]. Tumore umgehen diesen Mechanismus unter anderem durch globale Regulation der Rezeptor-Expression oder durch alternatives Spleißen des Rezeptors [114, 115]. Spleißfaktoren wie PTBP1 und RBM5 (*RNA-Bindemotiv Protein 5*) führen zu einer Exon-Exklusion, wodurch eine lösliche, nicht Transmembran-gebundene Isoform zur Inhibition eines apoptotisches Signals führt [115, 116]. Ebenfalls weisen einige

Tumore eine inhibierte Caspase-8 Expression oder eine erhöhte Expression anti-apoptotischer Isoformen der BCL2 (B-cell lymphoma 2) -Familie, wie BCL2-xL, bei gleichzeitig inhibierter pro-apoptotischer BCL2-xS Isoform auf [117, 118].

Die drei zuvor beschriebenen Hallmarks tragen zusammen dazu bei, dass Tumore unabhängig von ihren Umgebungssignalen proliferieren können. Allerdings verfügen gesunde Zellen einen intrinsischen Mechanismus, der ihre Replikation limitiert, in die Seneszenz führt und somit weitere Zellteilungen verhindert [88]. Während jeder Zellteilung werden Telomere, welche sich an den Chromosom-Enden befinden und diese schützen, schrittweise verkürzt [119]. Sind Telomere zu kurz, führt dies zu einer Instabilität der Chromosomen, was dazu führt, dass eine Zelle sich nicht erneut teilen kann (Seneszenz) oder eine Induktion des programmierten Zelltodes ausgelöst wird. Diesen Mechanismus umgehen Tumorzellen, indem sie das Enzym Telomerase reaktivieren, welches kontinuierlich Telomere an den Chromosomen verlängert [120].

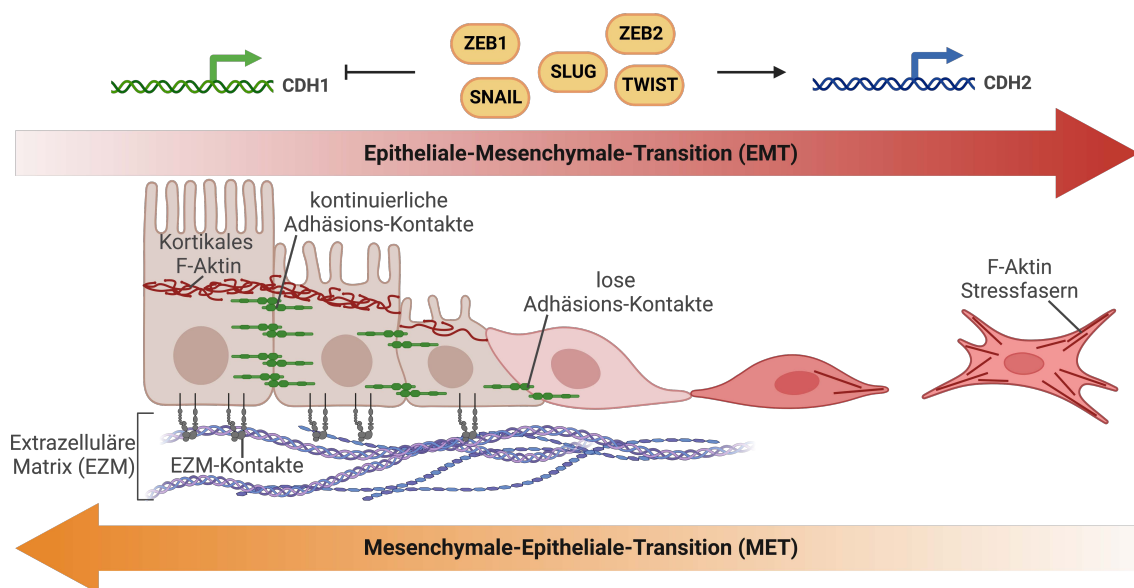
Eine unkontrollierte Zellproliferation von Tumoren resultiert nicht nur aus einer Deregulation der Genexpression und somit Replikation der Zellen, sondern auch durch eine Anpassung des energetischen Metabolismus [89]. Unter Normalbedingungen unterliegen Zellen der aeroben Glykolyse, jedoch führt ein unkontrolliertes Tumorzellwachstum ab einem gewissen Punkt zu einer anaeroben Umgebung. Tumorzellen umgehen diese Herausforderung, indem sie auf einen anaeroben Glukosemetabolismus umstellen, auch Warburg-Effekt genannt [89, 121]. Durch diesen Wechsel des Glukosestoffwechsels wird die ATP-Produktion erheblich ineffektiver, sodass mehr Glukose relativ zur Sauerstoffmenge benötigt wird. Um dies zu gewährleisten, werden unter anderem Glukosetransporter, wie GLUT1 und GLUT3, vermehrt exprimiert, um die Glukoseaufnahme in das Zytoplasma zu erhöhen [122]. Die Pyruvat Kinase M (PKM), ein Schlüsselenzym innerhalb der Glykolyse, wird zusätzlich in Tumoren unterschiedlich gespleißt. Inklusion des Exon 9 führt zur konstitutiv aktiven Isoform 1 (PKM1), während eine PTBP1-vermittelte Inklusion von Exon 10 zur weniger aktiven Isoform 2 (PKM2) führt [72, 123]. In Tumorzellen wird bevorzugt PKM2 gespleißt, wodurch eine anabolische Synthese von Makromolekülen wie Nukleotiden erhöht wird und somit die Tumorpheriferation fördert [124].

Mit steigendem Tumorzellwachstum benötigen Tumore mehr Nährstoffe, Sauerstoff und die Fähigkeit, metabolische Abfälle abzutransportieren [89]. Um das Wachstum und die Expansion des Tumors zu fördern, müssen Tumorzellen die Angiogenese, ein Prozess zur Bildung von Blut- und Lymphgefäßen, einleiten und beibehalten, um eine kontinuierliche Versorgung des Tumors sicherzustellen. Faktoren wie vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  und TNF $\alpha$  fördern dabei die Angiogenese, während Proteine wie Angiostatin und Endostatin die Angiogenese inhibieren [125]. Um die Angiogenese zu induzieren, weisen Tumorzellen eine Dysbalance der unterstützenden und

der inhibierenden Faktoren auf. Durch Hypoxie, einem Sauerstoffmangel, den proliferierende und unterversorgte Tumore aufweisen, oder durch Onkogene wie MYC kann die Expression von VEGF induziert werden [126, 127]. Die Bindung des sequestrierten VEGF-Liganden an seinen Rezeptor (VEGF-R) fördert eine Angiogenese, vaskuläre Permeabilität und Zellmigration [128]. Gleichzeitig wird das alternative Spleißen von VEGF-A in Tumoren häufig durch Spleißfaktoren wie SRSF1 und SRSF5 verschoben, von der Angiogenese-inhibierenden Isoform zur Angiogenese-fördernden Isoformen [129, 130].

### 1.2.2.2. Invasion und Metastasierung

Die Entwicklung von epithelialen Geweben hin zu pathologisch malignen Tumoren resultiert früher oder später in der lokalen Invasion und Metastasierung, welches dem Tumor ermöglicht an (vorerst) nährstoffreichen Orten neu zu kolonisieren und zu proliferieren [88, 89]. Dies erfordert die Re-Organisation des Zytoskeletts, der Zell-Zell-Kontakte und der Verbindungen zur extrazellulären Matrix. Der Prozess von einer epithelialen Zelle hin zu einer mesenchymalen Zelle, welche invasiv ist und sich verbreiten kann, wird als Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Epitheliale-Mesenchymale-Transition führt zur Invasion und Metastasierung.** Übergang epithelialer Zellen mit festen Adhäsionskontakten hin zu mesenchymalen Zellen ohne Zell-Zell-Kontakte und Verbindung zur extrazellulären Matrix mithilfe von Transkriptionsfaktor-vermittelter Genexpression. Ein EMT kann zur Invasion und Neu-Kolonisierung von Tumorzellen führen. Hierfür entwickeln sie erneute epitheliale Zell-Charakteristika innerhalb der Mesenchymalen-Epitheliale-Transition. Schema wurde nach Brabletz *et al.* (2021) und Legget *et al.* (2021) erstellt [131, 132].

Diese reversible Transformation umfasst ein breites Spektrum von Übergangsschritten, die durch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und Signalwegen beeinflusst werden [133]. Obwohl eine EMT für eine Initiierung der Metastasierung essenziell ist, ist der gegenteilige Prozess (MET) erforderlich, um metastasierte Zellen in einer neuen Umgebung wieder zu einer

Tumorformation zu treiben. Die Aktivierung der EMT kann durch Wachstumsfaktoren (u.a. TGF $\beta$ ), Hypoxie oder extrazellulären Matrix Komponenten erfolgen, welche durch Transkriptionsfaktoren (z.B. SNAIL, SLUG (SNAI2), TWIST oder ZEB1/2) und miRNAs (u.a. miR-200 Familie) die Expression von EMT-Faktoren regulieren [103, 131, 132, 134]. Unter anderem wird dabei die Expression von epithelialen Genen wie CDH1 (E-Cadherin) inhibiert und mesenchymal-charakterisierende Gene, unter anderem CDH2 (N-Cadherin) und CTNNB1 ( $\beta$ -Catenin), induziert [131]. Epitheliale Zellen zeichnen sich durch ihre Unbeweglichkeit, starke Zell-Zell-Kontakte, Bindungen an die extrazelluläre Matrix sowie der Umgebung von kortikalem F-Aktin aus. Nach einer vollständig abgeschlossenen EMT weisen mesenchymale Zellen einen Verlust der apikal-basalen Polarität aufgrund mangelnder Zell-Zell-Kontakte auf, begleitet von einer Umverteilung von  $\beta$ -Catenin und gleichzeitiger Formierung von F-Aktin-reichen Stressfasern [131, 135].

Neben Änderungen der Expressionsmuster können auch alternativ gespleißte Isoformen zur Induktion einer EMT beitragen. Das Transmembran-Glykoprotein CD44 wird von verschiedenen Spleißfaktoren, wie ESRP1 (Epitheliales Spleiß-regulatorisches Protein 1), SRSF2 oder hnRNP-L reguliert, welches in den beiden Isoformen CD44s (Standard) und CD44v (Variante) resultiert [136-138]. Epitheliale Zellen exprimieren überwiegend CD44v, während bei einer EMT bevorzugt CD44s gespleißt. Dabei führt CD44s zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges mit dem Resultat einer Inhibierung der CDH1 Expression [136].

### 1.2.2.3. Immunevasion: Die Flucht vor dem Immunsystem

Unter physiologischen Konditionen erkennen Immun-Effektor-Zellen infizierte und neoplastische Zellen anhand fremder Antigene [139-141]. Innerhalb von Immun-Kontrollpunkten (*Checkpoints*) regulieren T-Zellen aktivierende oder inhibierende Stimuli, je nachdem ob eigene oder fremde Antigene auf Zellen präsentiert und identifiziert werden. Die Modulation des Immunsystems und der Kontrollpunkte in Karzinomen führt zur Umgehung der Immun-Überwachung und stellt somit ein weiteres Hallmark dar [89]. Dabei durchlaufen Tumore und infiltrierende Immunzellen drei Phasen: Eliminierung, Equilibrium und Entkommen [142]. Während der Eliminierungsphase erkennt das Immunsystem Tumorzellen, resultierend in der Eliminierung dieser Zellen. Hierbei exprimieren Tumorzellen nach wie vor hohe Level an MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I Molekülen. Deren Antigen-Prozessierung und -Präsentation ist intakt und sie werden problemlos von zytotoxischen CD8+ T-Zellen erkannt. Während der zweiten Phase (Equilibrium) koexistieren Immun- und Tumorzellen aufgrund heterogener Tumorzellen, die in der Lage sind, einer Immun-Kontrolle zu entgehen. Diese exprimieren dabei weniger MHC Klasse I Moleküle, assoziiert mit Defekten in der Antigen-Präsentation und damit einhergehender verminderter Erkennung durch CD8+ T-Zellen [143, 144]. In der letzten Phase des Entkommens umgehen Tumorzellen die



Immun-Überwachung durch zahlreiche intrinsische Mechanismen, ebenso wie extrinsische Mechanismen zur Suppression der Immunzellen mithilfe der Tumor-Mikroumgebung [142]. Intrinsische Mechanismen umfassen neben einer inhibierten Antigen-Präsentation auch erhöhte Liganden-Expression von inhibitorischen Rezeptoren, wie PDL1 (*programmed cell death protein 1 ligand 1*) und FAS-Ligand [145, 146]. Expression und Präsentation dieser Liganden inhibiert die T-Zell-Aktivierung und führt zur Induktion der Apoptose-Kaskaden von T- und NK (Natürliche Killer) -Zellen [147, 148]. Extrinsische Mechanismen beinhalten die Infiltration der Tumor-Mikroumgebung mit suppressiven Zellen (regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ), Makrophagen und MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) zur Inhibierung von Immun-aktivierenden Zellen [149-151]. Ebenfalls beeinflusst die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen in die Mikroumgebung die effektive Kapazität des Immunsystems. [152]. In der Tumor-Mikroumgebung differenzieren Makrophagen zu Tumor-assoziierten M2-Makrophagen, welche Interleukin (IL)-10 anstatt IL-12 produzieren und hierdurch die CD8+ T-Zell Antwort via IFN $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) inhibieren [153]. MDSCs, eine heterogene Zell-Population, inhibieren die Immunantwort durch Produktion und Sekretion von TGF $\beta$ , wodurch die Aktivität zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen reduziert wird [154, 155]. Eine erhöhte Anzahl an  $T_{reg}$  Zellen, eine weitere Population immunsuppressiver Zellen innerhalb der Mikroumgebung, inhibiert ebenfalls die CD8+ T-Zell Antwort und fördert die Tumourprogression [156].

Insgesamt führt die Tumor-Mikroumgebung durch den Austausch unterschiedlicher Zytokine und Chemokine und verschiedener Mechanismen zu einer reduzierten Immunantwort und fördert gleichzeitig die Tumourprogression, Invasion und Metastasierung unter anderem durch Induktion einer EMT [152]. Einer der komplexeren Signalwege, der durch Zytokine vermittelt wird, stellt TGF $\beta$  dar, der von nahezu allen Zell-Typen sekretiert werden kann [157]. TGF $\beta$  kann sowohl eine Entzündungsreaktion durch infiltrierte immunregulatorische Zellen zur Tumor-Eliminierung inhibieren und dadurch eine Tumorgenese fördern, gleichzeitig kann die Sekretion auch zur Repression der Tumourprogression führen, je nach zellulärem Kontext [158]. Durch die Bildung eines komplexen Netzwerkes können unterschiedlichste Faktoren dazu führen, dass der TGF $\beta$ -Signalweg moduliert wird, mit dem Resultat der Progression maligner Tumore.

Die Bindung von TGF $\beta$  an seine Rezeptoren führt zur Aktivierung von SMAD-abhängigen und -unabhängigen *downstream* Signalwegen, mit dem Resultat beeinflusster Genexpression (vgl. Abbildung 20, Seite 73). Bindung von TGF $\beta$  an das TGFBR2-Dimer führt zur Autophosphorylierung und Aktivierung von TGFBR1. Innerhalb des kanonischen SMAD-abhängigen Signalwegs führen aktive Rezeptoren zur Phosphorylierung intrazellulärer SMAD-Proteine, wodurch ein nukleärer Export und anschließende transkriptionelle Regulation induziert wird [159, 160]. Alternativ kann in einem nicht-kanonischen SMAD-unabhängigen

Prozess die Aktivierung verschiedener MAPK-Kaskaden wie TAK1-MKK4-JNK oder TAK1-MKK3/6-p38 durch TGF $\beta$  induziert werden, wodurch ebenfalls eine Genexpression reguliert wird. So kann eine TGF $\beta$  Stimulation in frühen Phasen der Tumorprogression zur Inhibierung des Zellzyklus durch G1-Arrest oder zur Induktion der Apoptose führen [161, 162]. In vielen Tumoren sind jedoch Schlüsselkomponenten des TGF $\beta$ -Signalweges, wie TGFBR1, TGFBR2, SMAD2 und SMAD4 häufig durch Mutationen oder Verlust der Allel-Heterozygotie inaktiviert [163]. Insbesondere aber die transkriptionelle Repression von TGFBR2 ist für die meisten Tumor-assoziierten TGF $\beta$ -Resistenzen verantwortlich [102].

In späteren Phasen der Tumorprogression, mit steigender extrazellulärer Matrix und infiltrierten Immunzellen, ändert TGF $\beta$  seine tumorsuppressive Wirkung hin zu einer onkogenen Funktion [164, 165]. Ein TGF $\beta$ -Stimulus kann zur Genexpression der Transkriptionsfaktoren wie SNAI2 und ZEB1/2 führen, welche eine EMT-Induktion fördern [166]. Gleichzeitig zeichnet sich auch eine Interaktion zwischen TGF $\beta$  und weiteren Faktoren innerhalb der Tumor-Mikroumgebung ab. TGF $\beta$  beeinflusst positiv wie auch negativ die Produktion und Sekretion weiterer Chemokine, Wachstumsfaktoren oder Matrix Komponenten und kann dadurch zu einem aggressiveren Tumorphänotyp führen [165]. Somit modulieren Tumore nicht nur die Rekrutierung und Expansion von immun-supprimierenden Zellpopulationen innerhalb ihrer Mikroumgebung, sondern verändern auch den Phänotyp und die Funktion der infiltrierenden Zellen und Faktoren hin zu einem Tumor-fördernden Mechanismus.

### **1.3. PTBP1: Mehr als nur ein Spleißfaktor**

Die oben beschriebenen notwendigen Hallmarks, die eine Tumorprogression kennzeichnen, entstehen nicht allein durch einzelne genetische Mutationen, sondern resultieren aus einem komplexen Netzwerk von deregulierten Mechanismen, wie der RNA-Prozessierung. Spleißfaktoren wie das Polypyrimidin-Trakt-Bindende Protein 1 (PTBP1), tragen eine maßgebliche Rolle bei der Tumorentstehung und Proliferation [70, 71]. Um einen Einblick in eine biologische Funktion innerhalb von Karzinomen zu erhalten, bedarf es zunächst eines grundsätzlichen funktionellen Verständnisses. PTBP1 ist dabei ein intensiv studiertes RNA-bindendes Protein. Initial wurde es als alternativer Spleißfaktor identifiziert, später jedoch mehreren regulatorischen Funktionen in der post-transkriptionellen Expression zugeordnet (Abbildung 6) [167].

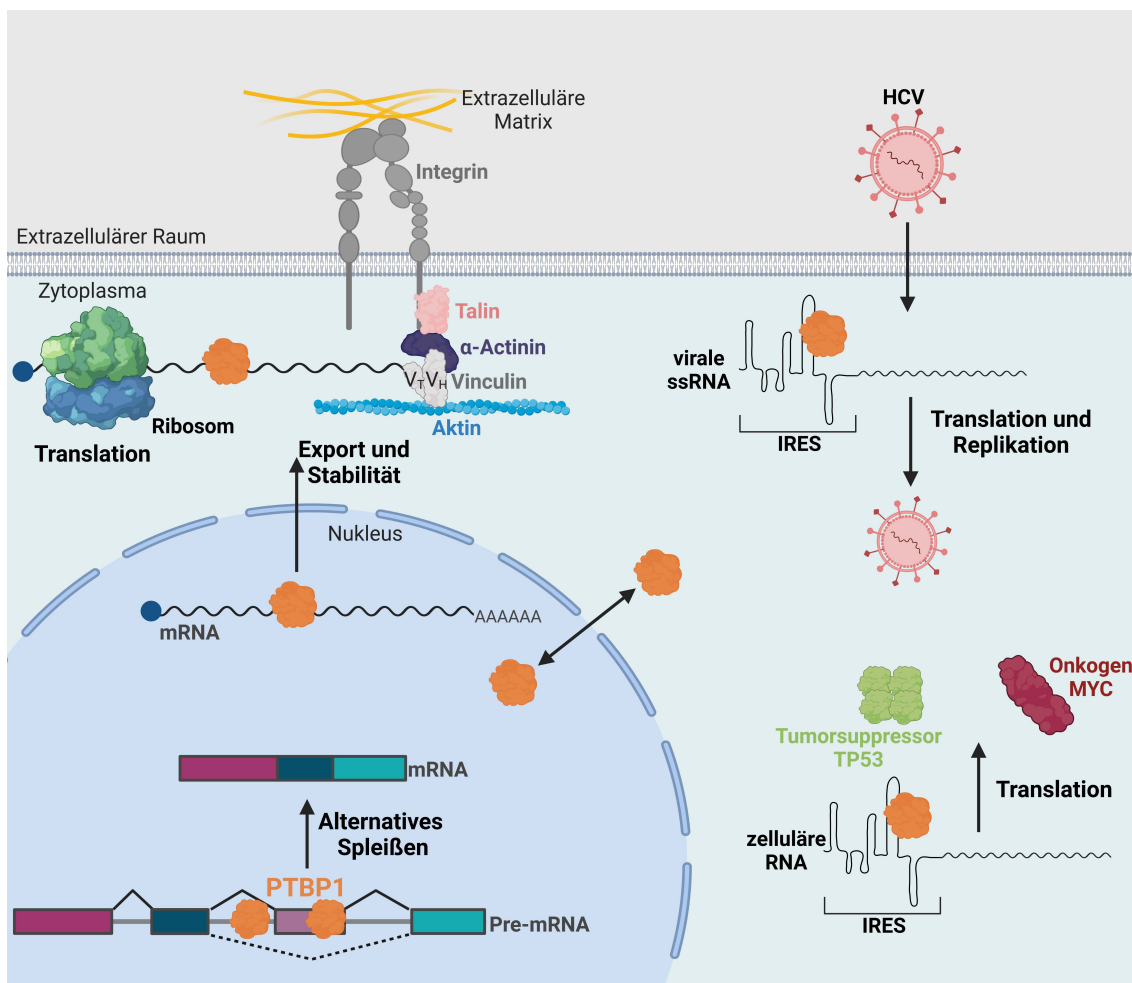
PTBP1, auch bekannt als PTB oder hnRNP-I, zeichnet sich durch vier RRM, einer zweiteiligen Nukleus Lokalisierungs-Determinante (NLD) sowie einem N-terminalem Nukleus-Export-Signal (NES) aus [168-170]. Obwohl PTBP1 überwiegend im Nukleus detektiert wurde, mit zusätzlichen Anreicherungen in PNCs, wurde es auch im Zytoplasma während der Zell-Differenzierung vorgefunden [171, 172]. Der genomische Locus von PTBP1 kodiert 15

Exons, welcher zu unterschiedlichen Isoformen gespleißt wird. PTBP1-1 ist die primär identifizierte Isoform, welche alle 15 Exone enthält und ein etwa 59 kDa großes Protein kodiert [171]. Durch alternatives Spleißen der Exone 2-10 entsteht die Isoform 2 (PTBP1-2), welcher die RRM1 und RRM2 fehlt [173]. PTBP1-3 und PTBP1-4 werden durch zwei verschiedene alternative 3' Spleißstellen innerhalb des Exons 9 charakterisiert [174]. Ebenfalls konnte eine Isoform identifiziert werden, bei der das Exon 11 exkludiert wird, wodurch ein frühzeitiges Stop-Codon zu einem NMD der mRNA führt [175]. Hierdurch werden etwa 20% der PTBP1 mRNA Level durch negatives *Feedback* reguliert.

Ursprünglich wurde angenommen, dass PTBP1 als Kompetitor von U2AF2 agiert, indem es den Poly(Y)-Trakt bindet und dadurch die Bindung von U2AF2 und somit die Spleißosom-Assemblierung verhindert [176]. Jedoch konnten noch weitere Bindungselemente innerhalb der pre-mRNA für PTBP1 identifiziert werden [177]. PTBP1 weist dabei eine regulatorische Funktion in der Exon Exklusion, aber auch der Inklusion auf, je nach Position seiner pre-mRNA Bindung. Bindet es exonische und/oder flankierende intronische Sequenzen um ein alternatives Exon, führt dies zur Repression. Die Inklusion des Exons tritt auf, wenn PTBP1 *upstream* an der 5'SS oder *downstream* an der 3'SS des konstitutiven Exons bindet und hierdurch die Erkennung des alternativen Exons fördert [178]. Durch Bindung an Poly(Y)-Trakte innerhalb von intronischer Sequenzen wird angenommen, dass PTBP1 zu Loop-Strukturen in der pre-mRNA führt, wodurch entweder *Branchpoint*-Stellen oder gesamte Exone unzugänglich für das Spleißosom werden [167]. PTBP1 kann dabei als Monomer, Dimer oder Oligomer eine Exklusion fördern, indem es Interaktionen zwischen RRM3 und RRM4 nutzt. Hierdurch entstehen ebenfalls Gerüststrukturen, die eine Rekrutierung mit Ko-Faktoren, wie Raver1, fördern könnten. PTBP1 ist dabei an der Spleiß-Regulation verschiedenster pre-mRNAs mit unterschiedlichen biologischen Funktionen beteiligt. Unter anderem ist PTBP1 an der Repression des SM (*smooth muscle*) -Kassettenexons von  $\alpha$ -Actinin beteiligt, wodurch bevorzugt das NM (*non-muscle*) -Exon inkludiert wird [179]. Auch die Regulation der Kassettenexone 2 und 3 von  $\alpha$ -Tropomyosin (TPM1) führt zur Muskel-spezifischen Isoform mit inhibiertem Exon 3 durch PTBP1 [180]. Ebenfalls fördert PTBP1 das Verbleiben von Introns in einem post-transkriptionellen Spleißmechanismus, welches häufig zum Abbau der Intron-enthaltenden mRNA führt [181-183]. Eine PTBP1-vermittelte Exklusion von Introns wird beim ko-transkriptionellen Spleißen beobachtet, bei dem PTBP1 durch Bindung von Chromatin-assoziierten, neu-synthetisierten RNA Pol II Transkripten eine Initiation des Spleißosomes fördert [183].

PTBP1 besitzt zwei weitere Paraloge, nPTB (PTBP2) und ROD1 (PTBP3), die etwa 70 % Sequenzhomologie teilen. Alle drei PTB-Familienmitglieder werden gewebespezifisch exprimiert: PTBP1 wird ubiquitär in den meisten Geweben und Zelltypen außer Neuronen exprimiert, während nPTB spezifisch in neuronalen Zellen vorkommt und ROD1 bevorzugt in

hämatopoetischen Zellen exprimiert wird [184, 185]. Wie die gesamte hnRNP-Proteinfamilie unterliegen auch PTBs einer breiten funktionellen Regulation durch alternatives Spleißen [186, 187]. Interessanterweise unterliegen alle drei Familienmitglieder einem gegenseitigen alternativen Spleißen. PTBP1 selbst fördert die Exklusion des Exon 11 der NMD-unterliegenden Isoform, wodurch eine homöostatische Expression in nicht-neuronalen Zellen auto-reguliert werden kann [175]. Ähnlich wie PTBP1 führt die Exklusion des Exon 10 von nPTB zu einem NMD. In nicht-neuronalen Zellen fördert PTBP1 die Repression des Exons und reguliert somit die nPTB Expression [188]. Sowohl PTBP1 als auch nPTB inhibieren die Inklusion des Exon 2 von ROD1, wodurch ein verkürztes nicht-funktionales Peptid entsteht [189].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung verschiedener PTBP1-Funktionen.** PTBP1 agiert im Nucleus als alternativer Spleißfaktor, kann aber auch ins Zytoplasma migrieren. Ebenso ist er am Export reifer mRNA beteiligt sowie an der zytoplasmatischen Stabilität. Eine Koordination von mRNA für fokale Adhäsionen wird durch Bindung und ortsspezifische Rekrutierung vermittelt. Ebenfalls kann PTBP1 IRES-Elemente viraler mRNA, aber auch zellulärer mRNA, binden, wodurch eine 5'Cap-unabhängige Translation initiiert wird.

IRES: interne Ribosom-Eintrittsstelle; HCV: Hepatitis C Virus.

Diese Kreuzregulation verdeutlicht, wie alternative Spleißregulatoren post-translational modifiziert werden können, um Differenzierungs- und gewebespezifisches Spleißen sowie eine *Feedback* Regulation zu ermöglichen. PTBP1 besitzt die Fähigkeit zwischen dem

Nukleus und dem Zytoplasma zu pendeln. Im Nukleus fungiert PTBP1 als alternativer Spleißfaktor, während es im Zytoplasma in der post-translationalen Regulation, RNA Lokalisierung und mRNA Stabilität involviert ist. So konnte beobachtet werden, dass PTBP1 einen Export der Hepatitis B Virus RNA stimuliert [170]. Durch Bindung an die CD154 mRNA (CD40 Ligand) innerhalb CU-reicher Sequenzen des 3'UTR wird die mRNA stabilisiert und kann auf aktivierten T-Zellen präsentiert werden [190]. Während der frühen Bildung von fokalen Adhäsionen im Zytoplasma assoziiert und koordiniert PTBP1 die mRNAs Vinculin und  $\alpha$ -Actinin [191]. Des Weiteren ist PTBP1 an der IHRES- (interne Ribosom-Eintrittsstelle) medierten Translations-Initiation von zellulären, aber auch viralen mRNAs beteiligt [192, 193]. Für die IRES-vermittelte Translation sind spezifische Strukturen an dem 5'UTR der mRNA erforderlich, um die Translationsmaschinerie zu rekrutieren. Zusätzliche initiale Translationsfaktoren (ITAFs; *initiation of translation accessory factors*) wie PTBP1 können durch Bindung eine effizientere Translationsinitiation ermöglichen [194]. Einige Viren besitzen ebenfalls eine IRES, um eine Initiationsfaktoren-unabhängige Translation innerhalb einer Wirtszelle zu gewährleisten [195]. PTBP1 bindet unter anderem an die IRES der viralen mRNAs des Hepatitis C Virus (HCV) und des Norovirus und wird daher nicht nur für die Translation, sondern auch für die Replikation benötigt [192, 196, 197]. Auch die Translation zellulärer mRNAs wie TP53 und MYC kann in Abhängigkeit von PTBP1 initiiert werden. Besonders während einer Tumorpheriferation kann diese Funktion eine entscheidende Rolle in der Progression spielen. In HeLa-Zellen wurde unter DNA schädigendem Stress eine vermehrte Tumorsuppressor TP53 Translation in Abhängigkeit einer PTBP1-IRES Bindung beobachtet [198]. Im Gegensatz dazu konnte eine geförderte Melanom-Zellproliferation bei gleichzeitig erhöhter Expression des Onkogenes MYC mit einer PTBP1-vermittelten IRES-medierten Translation in Verbindung gebracht werden [199].

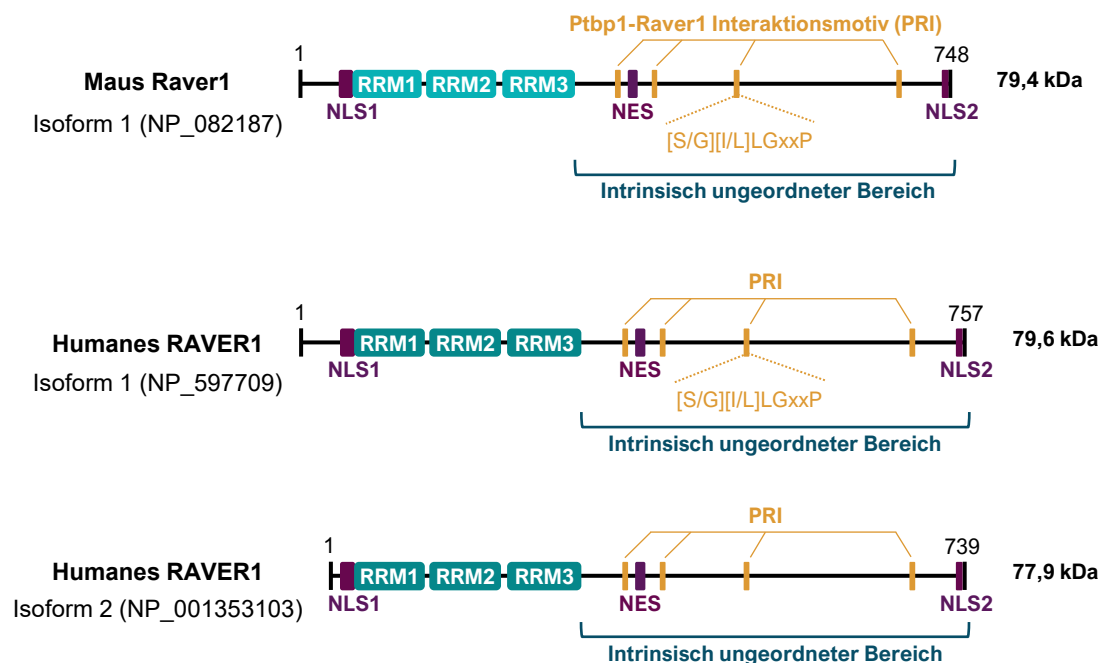
PTBP1 wird in zahlreichen Tumoren vermehrt exprimiert, darunter Gliom-, Darm- oder Ovarialkarzinome [200-202]. Der Effekt auf die Malignität ist jedoch Zelllinien-abhängig [70]. Dabei scheinen PTBP1-regulierte IRES-Translation, mRNA Stabilität und insbesondere alternatives Spleißen von Genen innerhalb der Proliferation, Metastasierung, Invasion, Metabolismus und Apoptose eine entscheidende Rolle zu spielen [203].

Im Normalgewebe, aber auch in Tumoren agiert PTBP1 nicht als alleiniger Faktor. Zum einen führen verschiedene Kombinationen an Spleißfaktoren innerhalb der pre-mRNA zu unterschiedlichen Spleiß-Möglichkeiten, zum anderen konnte ein direkter Kofaktor, RAVER1, identifiziert werden [172, 180].

#### **1.4. RAVER1: Adhäsionskomplex, Spleißfaktor oder mehr?**

Im Rahmen von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen zur Identifikation neuer Liganden von Metavinculin (MVcl)/ Vinculin (Vcl) wurde das zuvor unbekannte Protein Raver1 identifiziert

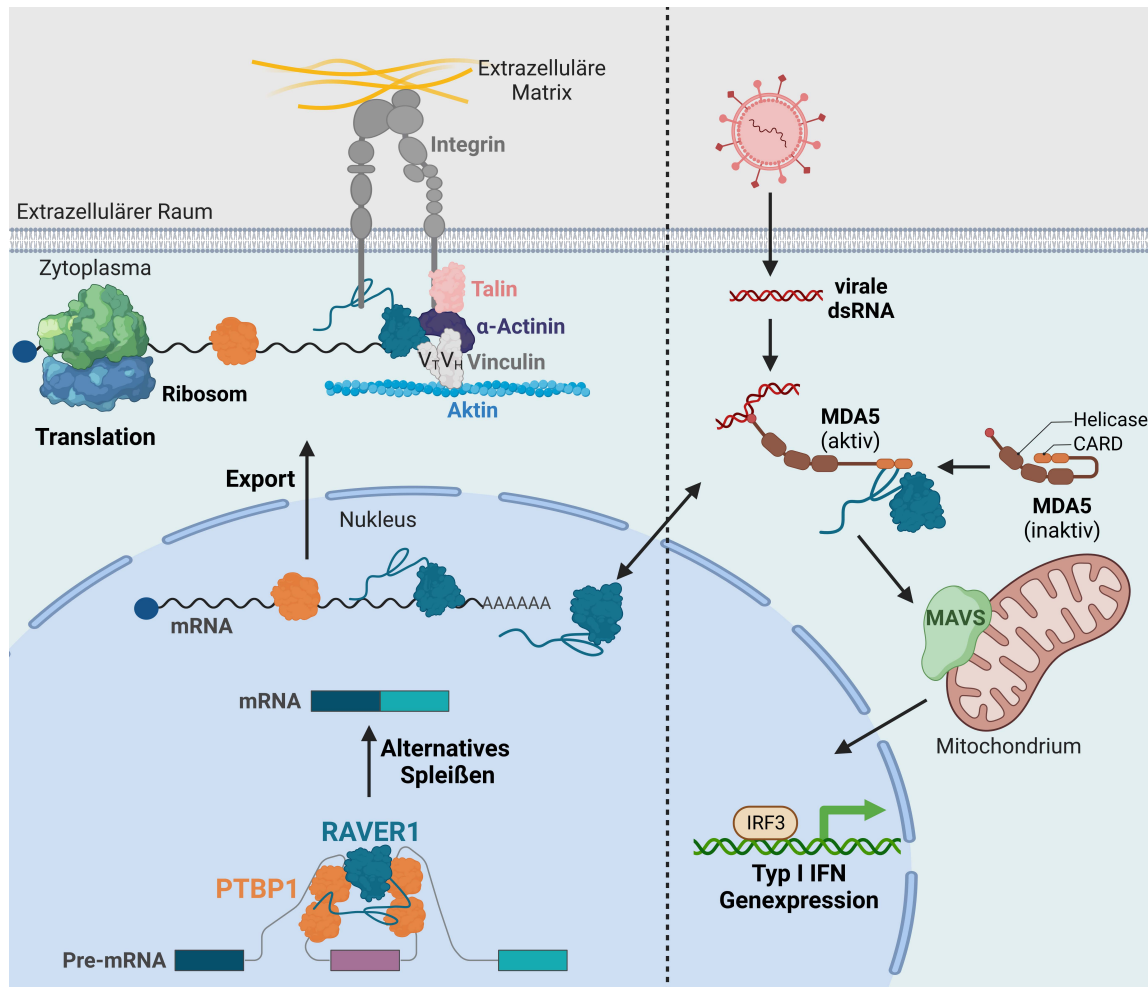
[172]. Murines Raver1 ist charakterisiert durch drei RRMs, zwei Kernlokalisierungssignalen (NLS, *nuclear localization signal*) und einer Rev-ähnlichen Kernexportsequenz (NES, *nuclear export sequence*) (Abbildung 7). Eine C-terminale Prolin-reiche Sequenz deutet dabei auf eine hohe intrinsisch ungeordnete Region (IDR, *intrinsic disordered region*) des Proteins hin. Zudem weist Raver1 eine Sequenzhomologie zur hnRNP-Proteinfamilie auf. Die Expression von Raver1 wurde in verschiedenen Mausgeweben nachgewiesen, wobei gewebespezifische Expressionsniveaus beobachtet wurden. In humanen Geweben unterschiedlichster Herkunft wurden ebenfalls verschiedene Expressionsniveaus des humane RAVER1 identifiziert, welches 87% Homologie zum Maus-Ortholog aufweist [204]. Vorhersagen der kodierenden Sequenz deuten dabei auf zwei mögliche Start-Codons hin, welche ein 757 Aminosäure (AS) und ein 739 AS langes Protein vermuten lassen.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des RAVER1 Proteins.** Raver1 besitzt drei N-terminale RRM (*RNA recognition motifs*), welche homolog zur hnRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*)-Proteinfamilie sind. Zwei NLS (*nuclear localization sequence*) und eine NES (*nuclear export sequence*) sorgen für eine primäre Lokalisierung im Nukleus mit der Möglichkeit ins Zytoplasma zu migrieren. Innerhalb der C-terminalen ungeordneten Region befinden sich insgesamt vier konservierte Ptbp1-Raver1 Interaktionsmotive (PRI) mit der Konsensus-Sequenz [S/G][I/L]LGxxP. Isoform 1 und 2 des humanen RAVER1 unterscheiden sich in der Nutzung eines alternativen Start-Codons. Indiziert wurden die verwendeten Identifikationsnummern nach NCBI Protein ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein))

Ebenfalls konnten *cis*- regulatorische Elemente in der 5'-Region identifiziert werden, die auf eine negative Regulation durch NFκB (*nuclear factor κ-light-chain-enhancer* of activated *B*-cells) hinweisen. In Muskelzellen war Raver1 in der Lage mit Vcl/MVcl sowie mit α-Actinin einen ternären Komplex zu bilden (Abbildung 8) [172]. Vcl und seine Muskelgewebe-spezifische Isoform MVcl sind Schlüsselregulatoren für die Bindung des Aktin-Zytoskeletts von Adhäsionsverbindungen (AJ, *adhesion junctions*) an die Zellmembran

und somit essenzielle Faktoren für die Zellmobilität, Migration und Entwicklung [205, 206]. Raver1 wurde mit verschiedenen kontraktile Elementen von Muskelzellen der Skelett-, Herz- sowie glatter Muskulatur assoziiert, was auf eine wesentliche Rolle von Raver1 in der Zellmatrix, speziell bei Zell-Zell-Kontakten, hinweist [172, 207].



**Abbildung 8: Mögliche multifunktionale Regulation durch RAVER1.** Im Nucleus agiert Raver1 als Ko-Repressor des Ptbp1-vermittelten alternativen Spleißens. Es wird vermutet, dass Raver1 ähnlich zu Ptbp1, am Export der reifen mRNA beteiligt ist und eine Lokalisation an Adhäsionsverbindungen (AJ) fördert. Dort kann es sowohl an α-Actinin als auch der Schwanzdomäne (V<sub>T</sub>) von Vinculin binden. Gleichzeitig kann RAVER1 Fragmente der VCL RNA binden, wodurch eine AJ-spezifische Translation vermutet werden kann. Durch seine Fähigkeit zwischen dem Nucleus und dem Zytosol zu pendeln, kann humanes RAVER1 im Zytosol an das Sensorprotein MDA5 binden, wodurch eine Aktivierung einer MAVS-vermittelten Typ I IFN Genexpression zur Abwehr viraler Infektionen gefördert wird. Schematische Darstellung wurde nach Hüttelmaier *et al.* (2001), Jokusch *et al.* (2003), Madl und Sattler (2009), Chen *et al.* (2013) und Romanelli *et al.* (2013) erstellt [167, 172, 208-210].  
 IRF3: *IFN regulatory factor 3*; V<sub>H</sub>: *Vinculin Head*; V<sub>T</sub>: *Vinculin Tail*.

Kristallografischen Analysen zeigten, dass RRM1 von humanem RAVER1 eine Interaktion mit aktiviertem VCL, aber auch mit inaktivem MVCL vermitteln kann [211-213]. Gleichzeitig wurde eine *in vitro* Bindung von 12 Nukleotiden kurzen RNA-Fragmenten, darunter eine kodierende Region der VCL-mRNA, an die RRM1 von RAVER1 gezeigt. Obwohl RRM-Domänen typischerweise einzelsträngige RNA über konservierte Aminosäurereste, welche an der Oberfläche des β-Faltblattes exponiert sind, erkennen, wurden vermehrte RRM-medierte

Protein-Interaktionen festgestellt, was die RRM zu einer multifunktionalen Plattform macht [214]. Interessanterweise wurde Raver1 auch im Nukleus lokalisiert vorgefunden, was auf eine multifunktionale Rolle dieses Proteins hinweist [172]. Raver1 kann zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus pendeln, wobei eine verstärkte Lokalisierung im Zytoplasma von differenzierten Zellen und eine vermehrte Lokalisierung im Nukleus von undifferenzierten Zellen beobachtet wurde. Sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus konnte eine Lokalisierung von Ptbp1 und Raver1 mit Anreicherung in PNCs festgestellt werden. Es wurde eine Interaktion zwischen der RRM2 von Ptbp1 und einem der vier konservierten Ptbp1-Raver1-Interaktionsmotiven (PRI) innerhalb der C-terminalen Prolin-reichen Region von Raver1 nachgewiesen werden [215, 216]. Gleichzeitig wurde Raver1 als Korepressor des Ptbp1-vermittelten alternativen Spleißens von TPM1 identifiziert [180]. Dabei konnte Raver1 in Abhängigkeit von Ptbp1 die Exklusion von Exon 3 in Muskelzellen fördern, wobei eine repressive Wirkung von Raver1 abhängig von den PRIs beobachtet wurde [180, 215]. Es wurde vermutet, dass das Ptbp1-abhängige Spleißen durch Bildung einer *Loop*-Struktur gefördert wird, bei der mehrere Ptbp1-Proteine an verschiedene Poly(Y)-Trakte *up-* und *downstream* des relevanten Exons binden und eine Gerüststruktur aufbauen [167]. Diese strukturelle Anordnung könnte den Kofaktor Raver1 rekrutieren und zur Exklusion des Exons beitragen. Neben seiner Rolle in der Regulation des alternativen Spleißens wurde PTBP1 ebenfalls als Beteiligter am Export von mRNA in zytoplasmatische Kompartimente identifiziert [217, 218]. Es wurde spekuliert, dass Raver1 und/ oder Ptbp1 eine Funktion innerhalb des nukleären Spleißens und an der Regulation des Transports reifer  $\alpha$ -Actinin oder Vinculin mRNA ins Zytoplasma haben könnten. Dort könnte eine AJ-spezifische Translation und die Assemblierung von Zytoskelettverbindungen durch Raver1 ermöglicht werden [172, 208, 211]. Interessanterweise wurden anatomische oder histologische Merkmale von Raver1-*Knockout* Mäusen nicht affektiert, jedoch wurde eine reduzierte neuronale synaptische Plastizität beobachtet [219]. Auch hier wurde angenommen, dass Raver1 einen Einfluss auf die synaptische Aktivität durch die Regulation des alternativen Spleißens oder die aktivitätsabhängige mRNA Lokalisierung und Translation besitzt. Zusätzlich zur Assoziation mit Proteinen des Adhäsionskomplexes oder dem Spleißfaktor Ptbp1 wurde RAVER1 ebenfalls mit dem RNA-Sensorprotein MDA5 (Melanom Differenzierungs-assoziiertes Protein 5) assoziiert vorgefunden [210]. Die Wirtszelle erkennt Pathogen-assoziierte molekulare Muster, wie die von viraler dsRNA, durch Mustererkennung-Rezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*). Zu den PRRs zählen unter anderem die endosomalen Toll-ähnlichen Rezeptoren sowie die zytosolischen RIG-I (Retinsäure-induzierbares Gen I) -ähnlichen Rezeptoren, dessen Familie aus drei Proteinen besteht: RIG-I, MDA5 und LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2*). Die Bindung viraler RNA an RLRs (*RIG-I like receptor*) führt zur Aktivierung von IFN Typ I Genexpression, wobei die N-terminale Caspase Aktivierungs- und



Rekrutierungs-Domäne (CARD) der RLRs mit dem Adaptor mitochondriales antivirales Signalprotein (MAVS) interagiert. [220-222]. Die spezifische Interaktion von RAVER1 mit MDA5 förderte dabei die Induktion antiviraler *downstream* Gene durch Aktivierung von IFN-, ISRE- (*IFN sensitive response elements*) und NFκB- Promotoren [210]. Während der COVID-19 Pandemie wurden genomweite Assoziationsstudien durchgeführt, die eine Mutation innerhalb des RAVER1-Loci identifizierten [223]. Mittels CRISPRi (CRISPR Interferenz) konnte eine reprimierte Expression von RAVER1 durch Mutation nachgewiesen werden, welche mit einem verschlechterten COVID-19 Erkrankungsverlauf assoziiert wurde. Dies ließ vermuten, dass eine reduzierte Aktivität von RAVER1 zu einer verminderten MDA5-vermittelten Immunantwort führt. Erst kürzlich wurden RAVER1 und PTBP1 als Schlüsselregulatoren mit dem inflammatorischen Zelltod assoziiert, der durch die Rezeptor-interagierende Serin (P)/ Threonin (K)-Proteinkinase 1 (RIPK1) vermittelt wird [224]. Diese Verbindung wurde jedoch nicht aufgrund einer direkten Protein-Interaktion, sondern aufgrund der Regulation des alternativen Spleißens der RIPK1 mRNA hergestellt. Die Spleiß-Funktion könnte dazu führen, dass das kanonische Transkript die Induktion des Zelltods von Makrophagen fördert.

## 1.5. Zielstellung

Das hnRNP-ähnliche Protein RAVER1 besteht aus drei RRM- und einer erweiterten C-terminalen intrinsisch ungeordneten Region (IDR), die für die Assoziation mit PTBP1 von entscheidender Bedeutung ist [172, 215, 216]. Beide Proteine sind in perinukleolären Kompartimenten (PNCs) angereichert und ko-regulieren das alternative Spleißen gewebespezifischer Transkripte [172, 180]. Dabei könnte die IDR von RAVER1 als flexible Plattform für eine Protein-RNA-Interaktion, und deren funktioneller Unterstützung, dienen, wie es bereits bei RBPs mit kürzeren oder längeren IDRs beschrieben wurde [225]. In Tumoren wurde die Häufigkeit von PNCs mit einem erhöhten Metastasierungspotential und einer verschlechterten Prognose assoziiert [84, 85, 226]. Trotz dieser Erkenntnisse sind die molekularen Mechanismen, die ein RAVER1-moduliertes alternatives Spleißen mit der Tumorprogression verknüpfen, sowie der Rolle von RAVER1 bei der PNC-Homöostase und insbesondere die Funktion der C-terminalen IDR weitgehend unklar.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Protein-Protein-Interaktion zwischen RAVER1 und PTBP1 in Abhängigkeit der IDR charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollten insbesondere weitere Protein-Protein-Interaktionen von RAVER1 identifiziert werden. Darüber hinaus sollte die Rolle von RAVER1, insbesondere seiner IDRs, in der Assoziation mit PTBP1 und der Assemblierung, respektive Homöostase von PNCs, sowie deren potenzielle Bedeutung für die Tumorzellvitalität charakterisiert werden.

In Assoziation mit diesen mechanistischen Untersuchungen sollte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine potenzielle pathophysiologische Funktion von RAVER1 in der Tumorprogression analysiert werden. Hierbei war vorgesehen, die Analyse öffentlich zugänglicher Daten, z.B. der Expression und Prognoserelevanz von RAVER1 in soliden Tumoren, mit der phänotypischen Charakterisierung des Proteins in Tumorzellen mittels Depletions- und Deletionsstudien *in vitro* und *in vivo* (Xeno-Transplantationsstudien) zu verbinden. RNA-Sequenzierungen sollten den molekularen Mechanismus von RAVER1 in der Tumorproliferation weiter aufklären, sowie für übergreifende Spleiß-Analysen verwendet werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte erstmals eine tragende Funktion von RAVER1 in der Regulation des alternativen Spleißens und eine damit verbundene Regulation zentraler Signalübertragungswege (z.B. TGF $\beta$ -Signalweg) und der Regulation der miR/RISC-Aktivität identifiziert werden. Entsprechend wurde im Rahmen der Arbeit eine vertiefende Analyse der Rolle von RAVER1 im TGF $\beta$ -Signalweg und der miR-vermittelten Genexpressionskontrolle durchgeführt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem, Roth oder Sigma Aldrich bezogen. Für molekularbiologische Arbeiten stammen Enzyme, 2xPCR-Mastermixe und DNA-Größenstandards von Promega, Roche und NEB (New England Biolabs). Die Bezugsquelle des qRT-PCR Mastermixes war HighQu GmbH. Transfektionsreagenzien, Protein-Größenstandards sowie 4-12% Bis-Tris-Protein Gele wurden von Thermo Fisher Scientific (Life Technologies) bezogen. Zellkulturschalen wurden von TPP und Corning verwendet und sämtliche Zellkulturlösungen (DMEM, DMEM/F12 (mit HEPES), RPMI, PBS, Trypsin, GlutaMax, OptiMEM, Natrium Pyruvat, Penicillin/Streptomycin) wurden von Thermo Fisher Scientific (Life Technologies) bezogen. Die Zellkulturlösung EMEM wurde von der Firma ATCC bezogen. PAN Biotech diente als Bezugsquelle des FBS (*fetal bovine serum*).

#### 2.1.2. Bakterien

Für Klonierungen der in 2.1.5 gelisteten Plasmide wurden *E.coli* TOP10 (Tabelle 1) genutzt. Zur Selektion erfolgte die Kultivierung der Bakterien in LB-Medium mit supplementiertem Antibiotikum (30 µg/ml Kanamycin oder 150 µg/ml Ampicillin).

LB (Luria Bertani) -Medium                      1% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl  
 LB-Agar    LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar

**Tabelle 1:** Verwendeter Bakterienstamm

Erregerstamm	Genotyp
<i>E. coli</i> TOP10	F-mcrA $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>

#### 2.1.3. Zelllinien

**Tabelle 2:** Verwendete parentale Zelllinien

Zelllinie	Nummer	Ursprungsgewebe (human)	Publikation
A549	CRM-CCL-185	Lunge	[227]
H1650	CRL-5883	Lunge	[228]
H522	CRL-5810	Lunge	[228]
ES-2	CRL-1978	Ovar	[229]
Hep-G2	HB-8065	Leber	[230]
BE(2)-C	CRL-2268	Gehirn	-
C643	300298	Schilddrüse	[231]
HEK293T/17	CRL-11268	Embryonale Niere	[232]

**Tabelle 3:** Generierte Zelllinien

Zellklon/Zelllinie	Parentale Zelllinie	Referenz
A549 R-KO1 / R-KO2	A549	Diese Arbeit
A549 iRFP	A549	Diese Arbeit
A549 R-KO2 iRFP	A549 R-KO2	Diese Arbeit
A549 R-KO2 SBP-FLAG	A549 R-KO2	Diese Arbeit
A549 R-KO2 SBP-FLAG-RAVER1	A549 R-KO2	Diese Arbeit
A549 R-KO2 SBP-FLAG-RAVER1- $\Delta$ IDR	A549 R-KO2	Diese Arbeit
A549 R-KO2 SBP-FLAG-RAVER1- $\Delta$ RRM	A549 R-KO2	Diese Arbeit
A549 R-KO2 SBP-FLAG-RAVER1-PRImut	A549 R-KO2	Diese Arbeit
A549 R-KO1 GFP	A549 R-KO1	Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)
A549 R-KO1 GFP-RAVER1	A549 R-KO1	Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)
A549 R-KO1 GFP-RAVER1- $\Delta$ IDR	A549 R-KO1	Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)
A549 R-KO1 GFP-RAVER1- $\Delta$ RRM	A549 R-KO1	Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)
A549 R-KO1 GFP-RAVER1-PRImut	A549 R-KO1	Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)
A549 GFP	A549	Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)
A549 GFP-RAVER1	A549	Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)

R-KO: RAVER1 *knockout*

#### 2.1.4. Antikörper

**Tabelle 4:** Verwendete primäre Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Bezugsquelle	Katalognummer/ Publikation
anti-RAVER1 (7D3)	Maus	BSBS AB facility	[207]
Anti-RAVER1	Kaninchen	Sigma Aldrich	HPA043575
anti-PTBP1 (BB7)	Maus	BSBS AB facility	[233]
anti-CDH2 (8C11)	Maus	Santa Cruz	sc-53488
anti-CTNNB1 (D10A8)	Kaninchen	Cell Signaling	8480
anti-GFP	Maus	Proteintech	66002-1-Ig
anti-GFP (IP)	Maus	Roche	11814460001
anti-HA	Kaninchen	Proteintech	51064-2-AP
anti-FLAG	Kaninchen	Sigma	F7425
anti-GAPDH	Kaninchen	Bethyl	A300-641A
anti-VCL	Maus	Sigma Aldrich	V9131

IP: Immunopräzipitation

**Tabelle 5:** Verwendete sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Bezugsquelle	Katalognummer
IRDye 680RD Esel anti-Kaninchen IgG	LI-COR	926-68073
IRDye 680RD Esel anti-Maus IgG	LI-COR	926-68072
IRDye 800CW Esel anti-Maus IgG	LI-COR	926-32212
IRDye 800CW Esel anti-Kaninchen IgG	LI-COR	926-32213

Alexa Fluor 647 AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Esel Anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova	711-606-152
Alexa Fluor 647-AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Esel Anti-Maus IgG (H+L) (min X)	Dianova	715-606-150
Alexa Fluor 488-AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Esel Anti-Maus IgG (H+L) (min X)	Dianova	715-546-150
Alexa Fluor 488-AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Esel Anti-Rabbit IgG (H+L) (min X)	Dianova	711-546-152

### 2.1.5. Plasmide

Kommerziell erhältliche Plasmide (Tabelle 6) wurden entweder direkt für Transfektionen oder für weitere Klonierungen (Tabelle 7) genutzt. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8 beschrieben.

**Tabelle 6:** Kommerzielle Plasmide

Plasmid	Resistenz	Bezugsquelle	Katalognummer
pCR®-blunt	Kanamycin	Invitrogen Life Technologies	K270020
pmirGLO Dual luciferase	Ampicillin	Promega	E1330
pLVX	Ampicillin	Clontech	632164
pEGFP-C2	Kanamycin	Clontech	-
pCI neo-NHA	Ampicillin	Addgene	115359
pMD2G	Ampicillin	Addgene	12259
psPAX2	Ampicillin	Addgene	12260
pcDNA6/TR	Ampicillin	Invitrogen	V102520
pcDNA3.1_RAVER1_PRImut	Ampicillin	GeneScript	RAVER1- PRI Mutante: L378A, L379A, I412A, L413A, L511A, L512A, L693A, L694A

**Tabelle 7:** generierte Plasmide

Plasmid	Ausgangsplasmid	Insert	Schnittstellen	Klonierungsstrategie
pcDNA3.1_Cas9_T2A_GFP	Erhalten von Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)			
psg_RFP_GFP-BbsI	Erhalten von Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)			
psg_RFP_RAV ER1_Ex1	psg_RFP_GFP-BbsI	sgRNA gegen RAVER1-Exon1	BbsI	Oligo-Hybridisierung
psg_RFP_RAV ER1_Ex8	psg_RFP_GFP-BbsI	sgRNA gegen RAVER1-Exon 8	BbsI	Oligo-Hybridisierung

pmiRGLO-MCS	pmiRGLO	MCS	NheI/ XhoI	Oligo-Hybridisierung (AG Hüttelmaier)
pmirGLO_miR- 21-5p	Erhalten von Dr. Simon Müller (ehemals AG Hüttelmaier)			
pmirGLO_let- 7a-5p	Erhalten von Dr. Bianca Busch (ehemals AG Hüttelmaier)			
pmiRGLO_3'UT R MDM2	Erhalten von Dr. Nadine Bley (AG Hüttelmaier)			
pmiRGLO_3'UT R CD274	Erhalten von Dr. Nadine Bley (AG Hüttelmaier)			
pmiRGLO_3'UT R HMGA2	Erhalten von Dr. Bianca Busch (ehemals AG Hüttelmaier)			
pmiRGLO_3'UT R LIN28B	Erhalten von Dr. Bianca Busch (ehemals AG Hüttelmaier)			
pLVX_GFP	Erhalten von Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)			
pLVX_GFP- RAVER1 (WT)	pLVX_GFP	RAVER1 CDS	EcoRI/ XhoI	Amplifikation von HEK293T/17 cDNA
pLVX_SBP-Flag	Erhalten von Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)			
pLVX_SBP- Flag-RAVER1 (WT)	pLVX_SBP-Flag	RAVER1 CDS	EcoRI/ XhoI	Amplifikation von HEK293T/17 cDNA
pLVX_SBP- Flag-RAVER1- $\Delta$ IDR	pLVX_SBP-Flag	RAVER1 – Deletion der IDR (AS 409- 740)	EcoRI/ XhoI	Fusions-PCR aus Fragmenten von RAVER1 CDS
pLVX_SBP- Flag-RAVER1- $\Delta$ RRM	pLVX_SBP-Flag	RAVER1 – Deletion der RRMs (AS80-316)	EcoRI/ XhoI	Fusions-PCR aus Fragmenten von RAVER1 CDS
pLVX_SBP- Flag-RAVER1- PRI Mut	pLVX_SBP-Flag	RAVER1 – PRI Mutante	EcoRI/ XhoI	Subklonierung von pcDNA3.1_RAVER1_P RI Mut
pLVX_iRFP	Erhalten von Dr. Marcell Lederer (AG Hüttelmaier)			
pEGFP-AGO2	Erhalten von Dr. Juliane Braun (ehemals AG Hüttelmaier)			
pCI_HA- TNRC6B-Ex6	pCI neo-NHA	TNRC6B AS833-1087	MfeI/ XbaI in EcoRI/ XbaI	Amplifikation von A549 cDNA unter RAVER1- <i>knockdown</i>
pCI_HA- TNRC6B- $\Delta$ Ex6	pCI neo-NHA	TNRC6B AS833-1087 (ohne Exon 6)	MfeI/ XbaI in EcoRI/ XbaI	Amplifikation von A549 cDNA unter RAVER1- <i>knockdown</i>

CDS: *coding sequence*; AS: Aminosäure

### 2.1.6. Oligonukleotide

Oligonukleotide für Klonierung und PCRs wurden durch Eurofins Genomic GmbH synthetisiert.

**Tabelle 8:** Oligonukleotide zur Klonierung

Plasmid	Oligo sense (5'-3')	Oligo antisense (5'-3')
psg_RFP_RAVER1_Ex1	CACCGCGCCGCAAGAT ACTGATCCG	AAAACCGGATCAGTATCTTG CGGCG
psg_RFP_RAVER1_Ex8	CACCGACCCCCAGCAG GGCCAAGCA	AAAAGTCTTGGCCCTGCT GGGGT
pLVX_GFP-RAVER1 (WT)	CCCGAATTCATGCCGCT CCGCCCCGGC	GCACTCGAGCCTTGAGTTAT CTCTGGTGCCAGCCACTTA G
pLVX_SBP-Flag-RAVER1 (WT)	CCCGAATTCATGCCGCT CCGCCCCGGC	GCACTCGAGCCTTGAGTTAT CTCTGGTGCCAGCCACTTA G
pLVX_SBP-Flag-RAVER1- ΔIDR – Fragment 1	CCCGAATTCATGCCGCT CCGCCCCGGC	GCGTAGTGGCCGCCGAGG CCCTTCTTCTGGCCCTGGG TCT
pLVX_SBP-Flag-RAVER1- ΔIDR – Fragment 2	AGACCCAGGGCCAGAA GAAGGGCCTCGGCGGC CACTACGC	GCACTCGAGCCTTGAGTTAT CTCTGGTGCCAGCCACTTA G
pLVX_SBP-Flag-RAVER1- ΔRRM – Fragment 1	CCCGAATTCATGCCGCT CCGCCCCGGC	ATACTGCGGCCGGGGGGC CCGATCAGTATCTTGCGGC GGT
pLVX_SBP-Flag-RAVER1- ΔRRM – Fragment 2	ACCGCCGCAAGATACT GATCGGGCCCCCGGC CGCAGTAT	CCCCTCGAGGTTATCTCTG GTGCCAGCCAC
pCI_HA-TNRC6B-Ex6/ pCI_HA-TNRC6B-ΔEx6	GGCCAATTGCAACCAG AGGCTTCTGGTTC	GGCTCTAGACAGACAAATC CATTTTGCTGCTTGG

**Tabelle 9:** Oligonukleotide für semi-quantitative-PCR

Gen	Oligo sense (5'-3')	Oligo antisense (5'-3')
GAPDH	GCCGCATCTTCTTTTGGCT	CCCAATACGACCAAATCCGT
DROSHA	GTGAGAGAAGGTCCCCAGAAAG	CTTGGGGAGCGATGATTCAC
DICER1	CAGGTTGAACTGCTTGAAGCAG	CACAGAGCTTCATAATTTCTCGATA GGG
TARBP2	CTCCAGCTGCGACACAGAT	GGCTCCTGGTTAGGACTACAGA
TNRC6A	CGTCCCAAATGGCAACAGCC	GCCACTCAGACCTTCGATGACA
TNRC6B	GCAACGTTTCGACCTTCCAATTC C	CCTCCTTTGAGTGAGCACTTCATTT G
TNRC6C	CGCTCTGCTGGAAAAGAAGG	TGAGGGGATAGAACTGAGGCAC
CNOT2	CGGTCAGAAAAGATATGCTGG CATC	GTCCAATCCTGTACATTTTCACTT CC

PAN3	CAGCCCATGATCCTCTAACATC ACC	CAGCAGACAACGACATTCCTGG
AGO2	GCATCATCTTCTACCGCGAC	GTCATGTTCTTATCCACCAGGTG

**Tabelle 10:** Oligonukleotide für qRT-PCR

Gen	Oligo sense (5'-3')	Oligo antisense (5'-3')
GAPDH	CAACGAATTTGGCTACAGCA	AGGGGAGATTTCAGTGTGGTG
EEF2	GGAGTCGGGAGAGCATATCA	GGGTCAGATTTCTTGATGGG
RPLP0	CCTCATATCCGGGGGAATGTG	GCAGCAGCTGGCACCTTATTG
RAVER1	TGGCCAATCCAAGGGCTATG	CTTCAGCTGCCCATCCTGG
PTBP1	CTTGCTGTCATTTCCGTTTG	TCCCAGATATAGCCGTTGGT

### 2.1.7. siRNAs

siRNAs wurden durch Eurofins Genomic GmbH synthetisiert.

**Tabelle 11:** siRNAs

Ziel-Gen	Sequenz (5'-3')
Kontrolle ( <i>cel-miR-239b-5p</i> )	UUUGUACUACACAAAAGUACUG
siRAVER1 Pool	UGUAGGUUCAGGUAGGGAUUC
	ACUUGAGCUGGAAGGCUUUGC
	UGUAGCUGUCAGACAGUCC
	UUACCCGCCAGGUUGCUGG
siPTBP1 Pool	UUA GAU UAC ACU CAU ACC A
	UUG AAC UUC UUG CUG UCA U
	GAA UAU GUU CUG GAA GUU C
	UUC UCU GGA AUG AUG GAA G

### 2.1.8. Northern Blot Sonden

Northern Blot Sonden wurden durch Eurofins Genomic GmbH mit indiziertem Farbstoff synthetisiert.

**Tabelle 12:** Northern Blot Hybridisierungssonden

Sonde	Sequenz (5'-3')
miR-21-5p	Dye682-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA-Dye682
let-7a-5p	Dye782-AACTATACAACCTACTACCTCA-Dye782
miR-200b-3p	Dye782-TCATCATTACCAGGCAGTATTA-Dye782
S5	Dye782-AAGTACTAACCAGGCCCGAC-Dye782
U6	Dye782-CAGGGGCCATGCTAATCTTCTCTGT-Dye782



### 2.1.9. Standardsysteme und Kits

DC Protein Assay	Bio-Rad
NuPAGE® Bis-Tris Electrophoresis System	Invitrogen Life Technologies
Dual-Glo™ Luciferase Assay System	Promega
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Caspase-Glo® Assay System	Promega
PureLink™ Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen Life Technologies
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit	Zymo Research
Zero Blunt® PCR Cloning Kit	Invitrogen Life Technologies
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs

### 2.1.10. Standardpuffer

PBS (phosphate buffered saline), pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-T (PBS-Tween)	PBS; 1 % Tween-20 (v/v)
TAE (Tris/Acetate/EDTA)	40 mM Tris 20 mM Eisessig 1 mM EDTA (pH 8,0)
NuPAGE Transferpuffer	50 mM Tris 40 mM Glycerin 0,04 % SDS (v/v) 10 % Methanol (v/v)
Ponceau-S	0,1 % Ponceau-S (w/v); 5 % Essigsäure (v/v)
TBE (Tris/Borat/EDTA)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA (pH 8,0)
20x SSC (saline sodium citrate) pH 7,0	3 M NaCl; 300 mM Trinatriumcitrat
SCC Waschpuffer (Northern Blot)	0,1x SSC (v/v); 0,1 % SDS (v/v)
2x Formamid Probenpuffer	18 mM EDTA (pH 8,0) 0,025 % SDS (v/v) 0,025 % Bromphenolblau (w/v) 93,65 % Formamid (v/v)

TRIZOL	0,8 mM Guanidinthiocyanat 0,4 mM Ammoniumthiocyanat 0,1 mM Natriumacetat (pH 4,0) 5 % Glycerin (w/v) 48 % Roi-Aqua-Phenol (v/v)
Total-Lyse-Puffer	50 mM Tris (pH 7,4) 50 mM NaCl 1 % SDS (v/v) 2 mM MgCl <sub>2</sub>
SBP-AP Puffer	150 mM KCl 50 mM TRIS (pH 7,5) 5 % Glycerin (w/v) 5 mM EDTA (pH 8,0) 0,25 % NP-40 (v/v)
SBP-AP-MS Puffer	150 mM KCl 50 mM TRIS (pH 7,5) 5 % Glycerin (w/v) 5 mM EDTA (pH 8,0) 0,1 % DDM (v/v)

### 2.1.11. Geräte

Mikroskopie	Nikon TE-2000E Nikon TS-100 Leica SP8X Sartorius Incucyte S3®
Durchflusszytometer	BD FACS Melody MACSQuant® Analyzer 9 Miltenyi BioTech
Lumineszenz/Absorption	GloMax® Discover 96 Well Microplate Reader
Spektroskopie	Tecan Spark
Gelelektrophorese	XCell SureLock™ Mini-Cell und XCell II™ Blot Modul Invitrogen Mini Gel Tank und Mini Blot Modul BioRad Mini-Sub® Cell GT
Infrarot-Scanner	LI-COR Odyssey Infrared Scanner LI-COR Pearl® Small Animal Imaging System
qRT-PCR	Roche Light Cycler 480 II
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler Nexus II
UV Crosslinker	Biostep® Crosslinker 254nm
Zentrifugen	Heraeus Biofuge® Stratos Heraeus Mikrozentrifuge Fresco™ 17 Eppendorf MiniSpin

Zellzähler	Bio-Rad T-20
LC-MS/MS (AG Sinz)	Thermo Fisher Scientific UltiMate™ 3000 RSLCnano-HPLC Thermo Fisher Scientific Q- Exactive™ Plus Massenspektrometer Thermo Fisher Scientific Nanospray Flex™ Ionenquelle

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1. Zellkultur

Die Zelllinien A549, ES-2, Hep-G2, C-643, PANC-1 und HEK293T/17 wurden in *Dublecco's modified Eagle's medium* (DMEM), H1650 und H522 wurden in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) Medium und BE(2)-C Zellen wurden in einer 1:1 Mischung aus DMEM/F12 (mit HEPES) und EMEM kultiviert. Alle Medien wurden zuvor mit 10 % FBS und 1 % L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX) versetzt. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 2.2.1.2. Zell-Transfektionen

##### 2.2.1.2.1. siRNA Transfektion

Zur Gen-Depletion via RNA-Interferenz (RNAi) wurden siRNAs (Tabelle 11) mithilfe des Liposom-basierenden Reagenzes Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) transfiziert. Hierfür wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen in eine Kavität einer 6-well Platte eingesät und mit 30 pmol siRNA und 8 µl RNAiMAX nach Herstellerprotokoll transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt oder die Zellen für weitere Analysen entsprechend neu eingesät. Zur Überprüfung einer effektiven Depletion wurden die Zellen 72 Stunden nach Transfektion geerntet und via Western Blot (2.2.3.1) und qRT-PCR (2.2.2.4) analysiert.

##### 2.2.1.2.2. Plasmid Transfektion

Sämtliche Plasmid Transfektionen wurden mithilfe des Liposom-basierenden Reagenzes Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) durchgeführt. Luziferase-Reporter wurden 24 Stunden post siRNA-vermittelter Depletion transfiziert, indem  $1 \cdot 10^5$  Zellen in eine 24-well Kavität eingesät wurden und mit 250 ng pmiRGLO (Tabelle 7) und 1 µl Lipofectamine™ 3000 sowie 1 µl P3000 entsprechend Herstellerprotokoll transfiziert wurden. 24 Stunden nach Reporter Transfektion wurde das Medium gewechselt und 48 Stunden nach Transfektion wurde die Aktivität der Luziferase analysiert (2.2.3.3). Für transiente Überexpressionsstudien wurden  $4 \cdot 10^6$  Zellen in einer 6 cm Schale mit je 2 µg Plasmid (Tabelle 6, Tabelle 7) und 10 µl Lipofectamine™ 3000 sowie 10 µl P3000 entsprechend Herstellerprotokoll transfiziert.

##### 2.2.1.3. CRISPR/Cas9 vermittelte Deletion

Für eine CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)/Cas9 vermittelte RAVR1 Deletion wurden zwei sgRNAs entworfen, welche das PAM Motiv (NGG) sowie 20

Nukleotide komplementär zur genomischen Region des Ziel-Genes enthalten. Beide sgRNA-kodierenden Plasmiden (psg\_RFP\_RAVR1\_Ex1 und psg\_RFP\_RAVR1\_Ex8) und das Cas9-Nuklease-kodierende Plasmid (pcDNA-Cas9-T2A-GFP) wurden unter Verwendung von Lipofectamine™ 3000 nach Herstellerangaben transfiziert. Hierfür wurden  $5 \cdot 10^5$  A549-Zellen in einer 6-well Kavität, je 500 ng der drei Plasmide, 5  $\mu$ l Lipofectamine™ 3000 sowie 5  $\mu$ l P3000 verwendet. 24 Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumswechsel durchgeführt, nach 48 Stunden wurden die Zellen mittels des Durchflusszytometers BD FACS Melody auf RFP- und GFP-positive Einzelzellklone sortiert und die Zellen für drei Passagen zur Vermeidung einer Kontamination mit 1 % Penicillin/Streptomycin behandelt. Der *knockout* wurde mittels Western Blot Analysen (2.2.3.1) bestätigt.

#### 2.2.1.4. Herstellung von Lentiviren und Transduktion

Zur Herstellung von lentiviralen Partikeln wurden  $3,5 \cdot 10^6$  HEK293T/17 Zellen in lentiviralem Verpackungsmedium (OptiMEM, 1 % GlutaMAX, 20 % FBS, 1 mM Natriumpyruvat) aufgenommen, in eine 6 cm Schale eingesät und 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden 2  $\mu$ g psPAX2, 1  $\mu$ g pMD2.G, 2  $\mu$ g pcDNA6/TR sowie 1,5  $\mu$ g pLVX-Plasmid (zusätzlich iRFP-kodierend) (Tabelle 6, Tabelle 7) mit 15  $\mu$ l Lipofectamine™ 3000 sowie 13  $\mu$ l P3000 nach Herstellerangaben transfiziert. 6 Stunden nach Transfektion wurde ein Mediumswechsel mit lentiviralem Verpackungsmedium durchgeführt. 24 und 48 Stunden nach Transfektion wurde der mit Viruspartikeln angereicherte Zellkulturüberstand gesammelt. Der zusammengeführte Überstand wurde mittels 45  $\mu$ m Filter von verbliebenen Zellen abfiltriert und aliquotiert. Eine Titerbestimmung wurde durchgeführt, indem  $1 \cdot 10^5$  HEK293T/17 Zellen pro 24-well Kavität mit verschiedenen Volumina der Viruspartikel für 72 Stunden inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen und die Anzahl der iRFP-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie (MACSQuant®) bestimmt und somit eine MOI (*multiplicity of infection*) mit folgender Formel berechnet:

$$MOI = \text{Anz. transduzierter Zellen} \times \% \text{ iRFP pos. Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für eine lentivirale Transduktion wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen mit 10 MOI Virus für 72 Stunden inkubiert, anschließend fünfmal mit PBS gewaschen und mittels Durchflusszytometrie (BD FACS Melody) auf iRFP-positive Zellen selektiert. Alle in dieser Arbeit generierten stabilen Expressionszelllinien sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

#### 2.2.1.5. Maus-Xenotransplantation

Die Durchführung von Maus-Xenotransplantationsstudien wurde durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt gemäß § 8 Tierschutzgesetz genehmigt (42502-2-1625 MLU) und entsprechend der Richtlinien der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

basierend auf den ARRIVE Richtlinien, durchgeführt. Immun-defiziente athymische Nacktmäuse (FOXN1 nu/nu) wurden von Charles River (Wilmington, MA) bezogen und in der Core Facility Tierhaltung, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, gehalten. Stabil transduzierte iRFP-markierte parentale oder RAVER1 *knockout* A549 Zellen (je  $1 \cdot 10^6$ ) wurden in PBS mit 50 % (v/v) Matrigel (Sigma) geerntet und subkutan in 6 Wochen alte weibliche Nacktmäuse injiziert (6 Versuchsmäusen pro Bedingung). Zur wöchentlichen Kontrolle des Tumorstadiums wurden die Versuchstiere mit Isofluran narkotisiert und mittels Infrarotbildgebung analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der Software *Image Studio*<sup>TM</sup> (LI-COR). Zusätzlich wurde das Tumolvolumen durch Messung der Höhe (L1), Breite (L2) und Tiefe (L3) des Tumors bestimmt und mittels folgender Formel berechnet:

$$V = \pi/6 \times L1 \times L2 \times L3$$

Nach 25 Tagen wurde das Abbruchkriterium erreicht, sodass die Versuchsmäuse getötet, die Tumore isoliert und das Tumorgewicht bestimmt wurde.

Die Durchführung der Maus Xenotransplantations-Analysen wurde mit freundlicher Unterstützung von Tommy Fuchs (AG Hüttelmaier) begleitet.

## 2.2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1. Klonierungen

Die generierten Plasmide inklusive Ausgangsvektoren, der Klonierungsstrategie, der Restriktionsschnittstellen und der verwendeten Oligonukleotiden sind den Tabellen 6-8 zu entnehmen.

Zur Generierung von sgRNA-Plasmiden und antisense-Reporterplasmiden wurden die entsprechenden Oligonukleotide (Tabelle 8) hybridisiert, indem je 5 µl des *sense*- und *antisense*-Oligonukleotides mit 10 µl Wasser zunächst für 5 Minuten bei 95 °C und anschließend für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert wurde. Zur Generierung von 3'UTR-Reporterplasmiden und Überexpressionsplasmiden wurde eine *template*-spezifische PCR mit dem Phusion® High-Fidelity PCR Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Als *template* wurde entweder HEK293T/17 cDNA (2.2.2.3) oder ein kommerzielles Plasmid (Tabelle 6) verwendet, sowie die in Tabelle 8 angegebenen Oligonukleotide. Das generierte Produkt wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurden die Proben mit 6x Gel Loading Dye (NEB) versetzt und in einem Ethidiumbromid-haltigen 1 %-igen Agarosegel (pegGOLD Universal Agarose, peglab) in TAE-Puffer (2.1.10) bei 140 V aufgetrennt. Das entsprechende DNA-Fragment wurde mit UV-Licht visualisiert, extrahiert und mithilfe des PureLink<sup>TM</sup> Quick Gel Extraction Kits nach Herstellerprotokoll eluiert. Es folgte die Klonierung mittels Zero Blunt® PCR Cloning Kit nach Herstellerprotokoll und anschließender Subklonierung in den Zielvektor. Generell wurden je 2 µg Plasmid mit den jeweiligen Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben inkubiert und anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt

und eluiert. Die Ligation des *Inserts* in den Zielvektor erfolgte mittels des QuickLigation™ Kits (NEB) ebenfalls nach Herstellerangaben. Anschließend erfolgte die Transformation in den Bakterienstamm *E. coli* TOP10 (2.1.2) durch einen einminütigen Hitzeschock bei 42 °C, gefolgt von zweiminütiger Inkubation auf Eis und der Inkubation in 800 µl LB-Medium (2.1.2) bei 37 °C für eine Stunde. Zur Selektion positiver Klone wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten, mit Ampicillin oder Kanamycin (2.1.2), entsprechend ihrer Resistenz, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Antibiotika-selektierte Klone wurden über Nacht bei 37 °C in flüssigem LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert. Es folgte eine Aufreinigung der Plasmide mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits beziehungsweise ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kits nach Herstellerprotokoll. Alle Plasmide wurden mittels Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzierung durch Eurofins Genomics GmbH verifiziert.

#### **2.2.2.2. RNA Isolierung**

Die Gesamt-RNA aus Zellen wurde mittels TRIZOL (2.1.10) und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Hierfür wurden Zellen einer 6-well Kavität mit 1 ml TRIZOL lysiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugieren bei 13000 rpm, 4 °C für 10 Minuten. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt und durch erneute Zentrifugation (13000 rpm, 4 °C für 10 Minuten) pelletiert. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit je 500 µl 80 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Qualität und Konzentration wurde mittels des Tecan Spark Spektrometers ermittelt. Die isolierte RNA wurde für weitere Analysen, wie der reversen Transkription (2.2.2.3), *next generation sequencing* (2.2.6.1) oder *Northern Blot* Analysen (2.2.3.2) verwendet.

#### **2.2.2.3. Reverse Transkription**

Für die quantitative *real time* Polymerasenkettenreaktion (qRT-PCR) beziehungsweise der semiquantitativen-PCR (sq-PCR) wurde eine entsprechende Menge RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurden 2 µg Total-RNA mit 1 µl *random* Hexamer Primer (R6, 150 ng/ml) für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend auf 4 °C heruntergekühlt. Ein Mastermix der M-MVL Reverse Transkriptase (Promega) bestehend aus je 4 µl 5x M-MVL Reverse Transkriptase-Puffer, 1 µl dNTPs (10 mM) und 0,5 µl der M-MVL Reverse Transkriptase wurden zur denaturierten RNA gegeben. Die Hybridisierung der Hexamer Primer erfolgte für je 5 Minuten bei 20 °C, 25 °C und 30 °C, gefolgt von der reversen Transkription für 1 Stunde bei 42 °C mit anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 72 °C für 15 Minuten.

#### 2.2.2.4. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung von Veränderungen der mRNA-Abundanzen wurde die quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) mit der SYBR® Green I Technologie und das Roche LightCycler 480 II PCR-System genutzt. Gen-spezifische Oligonukleotidpaare (Tabelle 10) wurden zuvor mittels der *Primer-blast Software* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) generiert. Zur Vermeidung einer Amplifikation von genomischer DNA-Kontamination, überspannen die verwendeten Oligonukleotidpaare mindestens eine Exon-Exon-Grenze und bilden eine Amplikongröße kleiner als 300 Nukleotide. Es wurden pro Reaktion ein Mastermix bestehend aus 2,5 µl ORA qPCR Green ROX L Mix (HighQu), je 0,2 µM Oligonukleotid *sense* und *antisense* und 2,5 µl 1:10 verdünnter cDNA (2.2.2.3) vermischt und in einer 384-*well* Plate analysiert, wobei jeweils ein technisches Duplikat pro Probe verwendet wurde. Die PCR Reaktion startete mit einer initialen Denaturierung für 5 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 50 Zyklen einer Denaturierung (95 °C, 10 Sekunden), einer Oligonukleotid Hybridisierung (60 °C, 10 Sekunden) und einer Elongation (72 °C, 20 Sekunden) mit abschließender Schmelzkurve von 55 °C bis 95 °C. Während der Amplifikation interkaliert der SYBR® Green Fluoreszenz-Farbstoff in die neu-synthetisierte DNA und emittiert dabei Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur amplifizierten cDNA und erlaubt somit Rückschlüsse auf die Abundanz eines spezifischen Transkriptes. Die Auswertung der Analyse erfolgte mittels der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode unter Verwendung des  $C_t$ -Wertes (threshold cycle) nach Livak und Schmittgen (2001) [234]. Hierdurch können Veränderungen in der RNA Abundanz zwischen der Kontroll- und der *knockdown*-Population relativ zur einem internen Kontrolltranskript berechnet werden, wie folgende Formel zeigt:

$$rel. mRNA Abundanz = 2^{-((C_t^X - C_t^K)_{Population} - ((C_t^X - C_t^K)_{Kontrollpopulation}))}$$

*X* – Zieltranskript  
*K* – Kontrolltranskript

Standardmäßig dienten EEF2, RPLP0 und GAPDH als Kontrolltranskripte.

#### 2.2.2.5. Semiquantitative PCR (sq-PCR)

Zur Detektion verschiedener Spleißvarianten eines Transkriptes wurde eine semiquantitative PCR (sq-PCR) durchgeführt. Transkript-spezifische Oligonukleotidpaare (Tabelle 9) wurden so gewählt, dass sie sowohl das gespleißte als auch das nicht gespleißte Produkt umspannen und mindestens eine Exon-Exon-Grenze überspannen. Für die PCR-Reaktion wurde ein Mastermix aus 5 µl OneTaq® 2x Mastermix (NEB), je 0,5 µl Oligonukleotid *sense/antisense* (10 µM) und 4 µl cDNA (1:10 verdünnt, 2.2.2.3) verwendet. Die PCR Reaktion wurde in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Nexus II) durchgeführt und startete mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 3 Minuten, gefolgt von 35 Zyklen einer Denaturierung (94 °C,



30 Sekunden), einer Oligonukleotid Hybridisierung (57 °C, 30 Sekunden) und einer Elongation (68°C, 30 Sekunden) mit einer abschließenden Elongation bei 68 °C für 5 Minuten. Anschließend wurden die Proben mit 6x Gel Loading Dye (NEB) versetzt und mittels 2 %-igem Ethidiumbromid-haltigem Agarosegel (pegGOLD Universal Agarose, peglab) in TAE-Puffer (2.1.10) bei 140 V aufgetrennt. Es folgte die Visualisierung unter UV-Licht und eine Quantifizierung der Bandenintensität von mindestens drei unabhängigen Experimenten mithilfe der Software *Image Studio*<sup>TM</sup> (LI-COR). GAPDH diente als Kontroll-Transkript.

### 2.2.3. Biochemische Methoden

#### 2.2.3.1. SDS-PAGE und *Western Blot* Analysen

Die Protein Abundanz wurde mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) und *Western Blot* Analysen bestimmt. Hierfür wurden konfluente parentale- oder *knockout*-Zelllinien (2.2.1.3) oder depletierte Zelllinien 72 Stunden nach siRNA Transfektion (2.2.1.2.1) mit PBS durch Abschaben von der Zellkulturplatte geerntet. Nach Überführung in ein Reaktionsgefäß wurden die Zellen in einer Zentrifuge bei 4500 rpm für 5 Minuten pelletiert. Anschließend erfolgte die Proteinextraktion aus dem Zellpellet mit TLB (2.1.10) supplementiert mit 0,5 % Benzonase (Merck Millipore), um genomische DNA zu verdauen, für 10 Minuten. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des DC Protein Assay Kit nach Herstellerangaben ermittelt, unter der Verwendung einer BSA-Standardverdünnungsreihe. Die Proteinkonzentration wurde durch Absorption mittels GloMax® Discover 96 Well Microplate Reader (650 nm) bestimmt.

In dieser Arbeit wurde für die SDS-PAGE und *Western Blot* die Systeme von XCell SureLock<sup>TM</sup> Mini-Cell/ XCell II<sup>TM</sup> Blot Modul oder Invitrogen Mini Gel Tank/ Mini Blot Modul nach Herstellerangaben verwendet. Gleiche Proteinmengen des Totalproteinextraktes wurden mit 4x NuPAGE® LDS-Probenpuffer (Invitrogen) und 50 mM DTT versetzt und für 10 Minuten bei 65 °C denaturiert. Eine Auftrennung der Proteine erfolgte mittels NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Protein Gelen (Invitrogen) in dem korrespondierenden NuPAGE® MOPS SDS Laufpuffer (Invitrogen). Anschließend erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Protran, GE Healthcare) unter Verwendung des NuPAGE Transferpuffers (2.1.10). Zur Überprüfung der Qualität des Proteintransfers wurde die Membran mit Panceau-S (2.1.10) gefärbt und anschließend mit 5 % (w/v) Magermilch/PBS-T (2.1.10) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit primären Antikörpern (Tabelle 4) erfolgte in 3 % (w/v) BSA/PBS-T für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit IRDye-markiertem sekundären Antikörper (Tabelle 5) in 5% (w/v) Magermilch/PBS-T für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS-T.

Die Detektion der Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte mittels Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR) bei 680 nm respektive 800 nm. Zur Quantifizierung der Bandenintensität wurde die Software *Image Studio™* (LI-COR) verwendet. Die quantifizierten Proteinmengen von drei unabhängigen Experimenten wurden relativ zur Kontrollpopulation und den internen Ladekontrollen VCL und GAPDH normalisiert.

### 2.2.3.2. Northern Blot Analysen

Die Analyse von microRNAs wurde mittels *Northern Blot* Analysen durchgeführt, bei der total-RNA Proben (2.2.2.2) mittels Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Hierfür wurden je 6 µg RNA mit 2x Formamid Probenpuffer (2.1.10) versetzt und für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert. Es folgte die Probenauffrennung in einem 15 %-igen Harnstoff-Polyacrylamid-Gel (siehe unten) in TBE-Puffer (2.1.10) mit anschließendem Transfer auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche) ebenfalls in TBE-Puffer unter Verwendung der Systeme von XCell SureLock™ Mini-Cell/ XCell II™ Blot Modul oder Invitrogen Mini Gel Tank/ Mini Blot Modul nach Herstellerangaben. Nach UV-*crosslinken* der Membran mittels Crosslinker 254 nm (Biostep®) bei 0,150 J/cm<sup>2</sup> folgte das Waschen der Membran in SSC Waschpuffer (2.1.10) für 10 Minuten. Die *Dye*-markierten Hybridisierungssonden (Tabelle 12) wurden in *PerfectHyb Plus* Hybridisierungspuffer (Sigma Aldrich) 1:10000 verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimalig mit SSC Waschpuffer gewaschen, bevor eine Detektion der Fluorophor-gekoppelten Hybridisierungssonden via *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR) bei 680 nm respektive 800 nm stattfand. Zur internen Normalisierung dienten die nicht-kodierenden RNAs U6 und S5. Die Quantifizierung der Bandenintensität von drei unabhängigen Experimenten erfolgte mittels *Image Studio™ Software* (LI-COR).

15% Harnstoff-Polyacrylamidgel	7,2 g Harnstoff
	1,5 ml 5x TBE
	4 ml H <sub>2</sub> O
	7 ml 30 % Rotiphorese® Acrylamid
	75 µl APS (10 %)
	15 µl TEMED

### 2.2.3.3. Luziferasereporter Analysen

Zur Untersuchung microRNA-abhängiger Effekte wurden Luziferasereporter Analysen unter Verwendung des pmirGLO *Dual-Luciferase miRNA Targets Expression* Vektors (Promega) durchgeführt. Durch Einfügen einer microRNA-*antisense* Sequenz oder 3'UTR-Elementen *downstream* des Reportergens *firefly* Luziferase (FFL) kann die microRNA Aktivität quantitativ bestimmt werden, wobei eine reduzierte Luziferase Aktivität auf eine Bindung der microRNA

an die klonierte Sequenz hindeutet. Zur internen Normalisierung dient die *Renilla* Luziferase (RL), während das MCS-kodierende Leerplasmid als Kontroll-Vektor verwendet wurde. Die in dieser Arbeit verwendeten Luziferasereporter waren zum einen microRNA-*antisense* Reporter, welche eine perfekt komplementäre Sequenz zur miR-21-5p beziehungsweise (bzw.) let-7a-5p enthielten und zum anderen 3'UTR-Reporter, welche die natürlichen microRNA Bindestellen enthielten (Tabelle 7). Die Luziferase-Aktivitäten von drei unabhängigen Experimenten wurden 48 Stunden nach Transfektion der Luziferasereporter (2.2.1.2.2) mit dem *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. Zur Auswertung wurde das Luziferase-Verhältnis (FFL/RL) durch die Normalisierung der FFL-Aktivität zur RL-Aktivität berechnet und zum jeweiligen Kontroll-Vektor sowie Kontroll-Population normalisiert, wodurch eine relative Luziferase-Aktivität (rel. Luz. Aktivität) erhalten wurde.

#### 2.2.3.4. Ko-Präzipitationen von Protein-Protein-Liganden

Zur Analyse von Protein-Protein-Assoziation wurden Affinitäts- und Immunopräzipitationen durchgeführt.

Für eine Affinitätspräzipitationen (AP) von SBP-Flag-getaggten RAVER1 Konstrukten, welche stabil in RAVER1-*knockout* Zellen re-exprimiert wurden (Tabelle 3, 2.2.1.4), wurden je  $1 \cdot 10^7$  Zellen pro AP verwendet. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und in PBS mit einem Zellschaber von der Platte gelöst und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Es folgte eine Zellkern-Extraktion, wobei das Zellpellet in 300  $\mu$ l SBP-IP Puffer mit 100  $\mu$ g/ml Digitonin (Sigma) resuspendiert, für 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert wurde. Das Zellpellet wurde erneute in 300  $\mu$ l SBP-IP Puffer (2.1.10) mit Digitonin resuspendiert und direkt für 3 Minuten (4000 rpm) zentrifugiert. Das Pellet wurde für die Affinitätspräzipitation in 1 ml SBP-AP Puffer mit Protease-Inhibitor (1:100, Sigma Aldrich) resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis lysiert und anschließend bei 4 °C für 10 Minuten (13000 rpm) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und je 50  $\mu$ l als Input-Proben entnommen, welche bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert wurden. In der Zwischenzeit wurden Streptavidin-gekoppelte magnetische *beads* (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1, Invitrogen) mit SBP-AP Puffer eingewaschen. Das restliche Lysat wurde für 2 Stunden bei 4 °C mit je 25  $\mu$ l *beads* unter Rotation inkubiert. Unter Verwendung eines Magnetständers wurden anschließend die Proben dreimalig mit je 500  $\mu$ l SBP-AP Puffer gewaschen. Für eine Analyse von RAVER1-Protein-Assoziation wurden die *beads* in 30  $\mu$ l 1x NuPAGE® LDS-Probenpuffer (Invitrogen) und 50 mM DTT aufgenommen und die Proteine bei 65 °C für 10 Minuten denaturiert. Ko-präzipitierte Proteine wurden mittels Western Blot Analysen detektiert (2.2.3.1).

Ko-Immunopräzipitationen mit anschließender LC-MS/MS Analyse (2.2.3.5) wurden nach gleichem Protokoll durchgeführt, jedoch mit dem SBP-AP-MS Puffer (2.1.10), welcher DDM anstelle von NP-40 als Detergens enthielt.

Für Ko-Immunopräzipitationen (IP) von GFP-AGO2 mit HA-Konstrukten (Tabelle 7) wurden HEK293T/17 Zellen entsprechend 2.2.1.2.2 transfiziert und 72 Stunden später mittels Zellschaber geerntet. Zellpellets (ohne vorherige Zellkernextraktion) wurden, wie oben beschrieben, vorbereitet, indem sie in SBP-AP Puffer resuspendiert, auf Eis inkubiert, zentrifugiert, Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und Inputs entnommen wurden. In der Zwischenzeit wurden Protein G-gekoppelte magnetische *beads* (Dynabeads™ Protein G, Invitrogen) eingewaschen und mit je 2 µg GFP-Antikörper (Roche, Tabelle 4) für 15 Minuten unter Rotation bei Raumtemperatur gekoppelt. Nach Inkubation des Zelllysates mit den *beads* für 2 Stunden bei 4 °C, folgten drei Waschschrte mit anschließender Elution in 30 µl 1x NuPAGE® LDS-Probenpuffer (Invitrogen) und 50 mM DTT. Ko-präzipitierte Proteine wurden mittels Western Blot Analysen analysiert (2.2.3.1).

#### **2.2.3.5. Massenspektrometrische Analysen (LC-MS/MS)**

Die massenspektrometrische Analyse und Auswertung via Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurde freundlicherweise von Dr. Christian Ihling (AG Sinz, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Hierfür wurden je drei Proben der Kontroll- und der RAVER1-immunopräzipitierten Proben (2.2.3.4) mit einem modifizierten FASP (*filter-aided sample preparation*) Protokoll nach Wisniewski *et al.* (2009) vorbereitet [235]. Die Peptid-Lösung wurde an einem UltiMate™ 3000 RSLCnano-HPLC System gekoppelt an eine Q-Exactiv<sup>TM</sup> Plus Massenspektrometer mit einer Nanospray Flex™ Ionenquelle (alle von Thermo Fisher Scientific) analysiert. Zur Peptididentifikation und -quantifikation wurden die generierten Daten mit der Swiss-Prot Datenbank unter Verwendung der *Proteome Discoverer* Software (Version 2.4, Thermo Fisher Scientific) abgeglichen. Peptide wurden via LFQ (*label-free quantification*) quantifiziert und einer quantilen Normalisierung unterzogen, um eine Anreicherung durch RAVER1 zu identifizieren.

#### **2.2.4. Zellphänotypische Analysen**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten zellphänotypischen Analysen wurden mit Tumorzelllinien unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurden einerseits RAVER1-*knockout* Zellen (2.2.1.3) und andererseits siRNA-transfizierte Zellen (2.2.1.2.1) 24 Stunden nach Transfektion in die jeweiligen Kavitäten eingesät (2.2.4.1-2.2.4.3) und für weitere Analysen (2.2.4.4-2.2.4.7) inkubiert. Es wurden je drei unabhängige Experimente mit mindestens vier technischen Replikaten pro Bedingung durchgeführt.

### 2.2.4.1. 2D-Proliferationsanalysen

Zur Analyse der 2D-Zellproliferation wurden  $1 \cdot 10^3$  Zellen pro 96-well Kavität eingesät und für fünf weitere Tage inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurde die Konfluenz der Zellen mittels Hellfeldmikroskopie unter Verwendung des Incucyte® S3 (Sartorius) mit einem 4x Objektiv dokumentiert und hinsichtlich der Konfluenz zum Endzeitpunkt analysiert. Zur Quantifizierung wurde die Zellviabilität analog zu 2.2.4.4 ermittelt.

### 2.2.4.2. 3D-Sphäroidwachstumsanalysen

Zur Analyse des 3D-Sphäroidwachstums wurden  $1 \cdot 10^3$  Zellen in eine Kavität einer *ultra low attachment* 96-well Platte (Corning® 96 Well Clear Round Bottom Ultra Low Attachment Microplate) eingesät, für 3 Minuten bei 300 g zentrifugiert und für fünf weitere Tage inkubiert. Das Sphäroid-Wachstum am Endzeitpunkt wurde mittels Hellfeldmikroskopie unter Verwendung des IncuCyte® S3 (Sartorius) mit einem 10x Objektiv dokumentiert und zusätzlich die Zellviabilität (2.2.4.4) ermittelt.

### 2.2.4.3. Bemessung der Anoikis-Resistenz

Zur Bestimmung der Anoikis-Resistenz und des Selbsterneuerungspotenzials wurden  $1 \cdot 10^3$  Zellen in DMEM mit 1 % FBS und 1 % GlutaMAX in eine Kavität einer *ultra low attachment* 96-well Platte (Corning® 96 Well Clear Flat Bottom Ultra Low Attachment Microplate) eingesät und für 5 weitere Tage inkubiert. Zur Analyse mittels Hellfeldmikroskopie (Incucyte® S3) wurden die Zellen am Endzeitpunkt in eine Rundbodenplatte überführt, für 3 Minuten bei 300 g zentrifugiert und mit einem 4x Objektiv dokumentiert. Zusätzlich wurde die Zellviabilität analog zu 2.2.4.4 ermittelt.

### 2.2.4.4. Bestimmung der Zellviabilität

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurden  $1 \cdot 10^3$  Zellen entsprechend 2.2.4.1-2.2.4.3 in die jeweiligen Kavitäten eingesät, wobei mindestens vier technische Replikate pro Bedingung eingesät wurden. Zusätzlich wurden  $1 \cdot 10^3$  Zellen als *Input* (Tag 0) direkt hinsichtlich der Zellviabilität analysiert. Die Zellviabilität wurde mittels *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) nach Herstellerangaben bestimmt und die emittierte Lumineszenz mittels *GloMax®* (Promega) gemessen. Hierbei wird der intrazelluläre ATP-Gehalt von metabolisch aktiven (vitalen) Zellen analysiert, wobei in Gegenwart von ATP, Mg<sup>2+</sup> und O<sub>2</sub> das Luciferin zu Oxyluciferin und AMP, Pyrophosphat, CO<sub>2</sub> und (emittiertem) Licht umgewandelt und detektiert wird. Zur Berechnung der Zellviabilität unter Depletion oder Deletion wurden die gemessene Lumineszenz zum *Input* und anschließend zur Kontrollpopulation normalisiert, um die relative Viabilität zu erhalten.

#### 2.2.4.5. Bestimmung der Apoptose

Zur Analyse der intrinsischen Apoptose wurde die Caspase 3/7 Aktivität mittels Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega) bestimmt. Es wurden je acht technische Replikate von  $3 \cdot 10^3$  Kontroll- oder PTBP1-depletierten Zellen bzw.  $6 \cdot 10^3$  RAVER1-depletierten Zellen 24 Stunden nach siRNA Transfektion (2.2.1.2.1) in eine 96-well Kavität eingesät und für weitere vier Tage kultiviert. Die höhere Zellzahl nach RAVER1-Depletion wurde verwendet, um die inhibierte Zellproliferation zu kompensieren. Anschließend wurden je vier technische Replikate pro Bedingung zur Bestimmung der Zellviabilität (2.2.4.4) verwendet, während die restlichen vier technischen Replikate für die Messung der Caspase 3/7 Aktivität verwendet wurden. Hierbei wird ein prolumineszentes Substrat durch die zelluläre Caspase 3/7 gespalten, wodurch es als Substrat für die zugegebene Luziferase dient und emittierte Lumineszenz gemessen werden kann. Zur Berechnung der relativen Caspase 3/7 Aktivität wurde die Caspase 3/7 Aktivität zur jeweiligen Zellviabilität normalisiert und in Relation zur Kontrollpopulation gesetzt.

#### 2.2.4.6. TGF $\beta$ -Behandlung

Für die Induktion der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) wurden  $3 \cdot 10^3$  Kontroll-, PTBP1-depletierte bzw.  $6 \cdot 10^3$  RAVER1-depletierte Zellen 24 Stunden nach siRNA Transfektion (2.2.1.2.1) in eine 96-well Kavität eingesät und für weitere 24 Stunden kultiviert. Die höhere Zellzahl nach RAVER1-Depletion wurde verwendet, um die inhibierte Zellproliferation zu kompensieren.  $3 \cdot 10^3$  Zellen /Kavität der parentalen, GFP- und GFP-RAVER1 re-/ überexprimierende Zellen (2.2.1.4) bzw.  $6 \cdot 10^3$  Zellen/Kavität.RAVER1-deletierter Zellen (2.2.1.3) wurden ebenfalls für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ng/ml rekombinanten humanen TGF- $\beta$ 1 (aus HEK293, PeproTech) für 72 Stunden inkubiert. Die Zelldichte wurde mittels Incucyte® S3 bestimmt und mithilfe des artifiziellen Intelligenz-Moduls (*AI Cell Health Analysis Software*, v2022B) analysiert, wobei durch künstliche Intelligenz zwischen lebenden und apoptotischen Zellen unterschieden wird. Zusätzlich wurde die Zellviabilität (2.2.4.4) und die Caspase3/7 Aktivität (2.2.4.5) bestimmt. Eine Apoptose-Induktion wurde berechnet durch die Normalisierung der Caspase3/7 Aktivität zur Zellviabilität in Relation zur unbehandelten Kontrollpopulation.

#### 2.2.4.7. Zellzyklusanalysen

Für Zellzyklusanalysen wurden RAVER1- und PTBP1-depletierte Zellen (2.2.1.2.1) 72 Stunden nach Transfektion mit Trypsin geerntet und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml kalten PBS resuspendiert und langsam 3 ml 96 %-iger eiskalter Ethanol in das Reaktionsgefäß hinzugegeben. Es folgte die Fällung der DNA über Nacht bei  $-20$  °C. Nach 10-minütiger Zentrifugation (2000 rpm) wurde das Pellet in je 200  $\mu$ l PBS mit RNase A (2  $\mu$ g/ml, Sigma Aldrich) und Propidiumiodid (1:2000, Miltenyi

Biotec) resuspendiert und für 30 Minuten bei 37 °C dunkel inkubiert. Hierbei dient die RNase A der Entfernung von RNA und das Propidiumiodid der Färbung der DNA. Der DNA-Gehalt wurde mit der Unterstützung von Dr. Nadine Bley (CFI, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) mittels Durchflusszytometrie (MACSQuant) gemessen und mit FlowJo (Version 10, BD) analysiert.

### 2.2.5. Immunofluoreszenz-basierte Methoden

Zur Untersuchung der Zellmorphologie und der perinukleolären Kompartimenten wurden Immunfärbungen durchgeführt und mikroskopisch dokumentiert. Hierfür wurden Zellen adhärent wachsend auf angeätzten Deckgläschen für 48 Stunden kultiviert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS folgte die Fixierung der Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit einer 4 %-igen Paraformaldehyd (PFA) Lösung (Sigma Aldrich). Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 5 Minuten (RT) permeabilisiert. Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden die Zellen mit 1 % BSA (w/v) /PBS Lösung für eine Stunde (RT) blockiert. Anschließend folgte die Inkubation mit primären Antikörpern (1:10-1:200; Tabelle 4) in 1 % BSA/PBS Lösung für eine Stunde bei RT. Nach einmaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper (1:500; Tabelle 5) in 1 % BSA/PBS Lösung für eine Stunde bei RT. Durch die gleichzeitige Inkubation mit TRITC-gekoppelten Phalloidin (1:500; Sigma Aldrich) wurde das F-Aktin-Zytoskelett visualisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS, folgte eine 5-minütige Inkubation bei RT mit DAPI (1:10000 in H<sub>2</sub>O) zur Anfärbung des Zellkerns. Es folgte eine Nachfixierung für 10 Minuten mit einer 4 %-igen PFA-Lösung bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser, gefolgt von einer Dehydrierung mit 96 %-igem Ethanol, wurden die Zellen mit *ProLong<sup>TM</sup> Diamond Antifade Mountant* (Invitrogen) auf einem Objektträger eingedeckelt. Die Bilderfassung wurde von Dr. Nadine Bley (CFI, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (SPX8, Leica) unter Verwendung des 63x Öl-Objektivs durchgeführt. Die sequenzielle Bildaufnahme erfolgte unter standardisierten Einstellungen nach Anregung der Fluorophor-gekoppelten Antikörper durch einen Weißlichtlaser mit entsprechender Wellenlänge oder einem Diodenlaser (405 nm) zur Detektion von DAPI. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit HyD Detektoren erfasst.

Die Analyse und Quantifizierung von perinukleolärer Kompartimenten wurde mittels NuclearParticleDetector2D (MiToBo Cell Image Analyzer, [236] unter Verwendung der Fiji Software (Version 1.54d) mit einer minimalen Regionsgröße von 10 analysiert.

## 2.2.6. Bioinformatische Analysen

### 2.2.6.1. *Next generation sequencing* und nachfolgende Analysen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *next generation sequencing* (NGS) Analysen wurden durch Novogene (Hong Kong; <https://en.novogene.com/>) durchgeführt. Bioinformatische Analysen der Rohdaten wurden von Dr. Markus Glaß (Core Facility Imaging, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und Laura Schian (AG Hüttelmaier) durchgeführt. Aus je drei unabhängigen Experimenten wurde total RNA von Kontroll-, RAVER1- und PTBP1-depletierten A549 Zellen isoliert (2.2.1.2.1; 2.2.2.2). Je 1 µg RNA wurde an Novogene versandt, wo eine Strand-spezifische *paired-end* RNA Sequenzierung mittels Illumina NovaSeq 6000 nach Standardprotokoll durchgeführt wurde. Dies führte zu 150 Basenpaarlangen *reads* mit durchschnittlich 2 x 28 Millionen *reads* pro Probe.

Die Qualität der rohen *fastq*-Dateien wurde mittels FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) bewertet. Cutadapt v2.8 [237] wurde verwendet, um Sequenzadapter und schlechte Rand-Qualitäten zu trimmen, HiSat2 v2.1.0 [238] wurde für das *Alignment* gegen das humane Genom (UCSC hg38) verwendet. Die differentielle Genexpression und die *false discovery rate* (FDR) wurde mithilfe des R-Pakets edgeR v3.38.4 [239] auf Annotationsbasis von Ensembl (GRCh38.100) berechnet, wobei eine TMM (*trimmed mean of M-values*)-Normalisierung durchgeführt wurde. Eine Berechnung der *z-scores* erfolgte dabei unter Verwendung folgender Formel:

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

$X$  –  $\log_2$ FC [FPKM]

$\mu$  – Mittelwert  $\log_2$ FC [FPKM] von Kontroll-, RAVER1- und PTBP1-Depletion

$\sigma$  – Standardabweichung  $\log_2$ FC [FPKM] von Kontroll-, RAVER1- und PTBP1-Depletion

Eine Liste der analysierten differentiellen Genexpressionen sind in Wedler *et al.* (2023) veröffentlicht und in der *supplementary table* TS6 einzusehen [272].

Die differentielle Isoformexpression wurden mithilfe von rMATS turbo v4.1.2 [240] quantifiziert, wobei die zuvor generierten Zuordnungsdateien und Gencode v29-Annotationen [241] verwendet wurden. Der in der rMATS Analyse ermittelte *IncLevel* beschreibt den PSI (*percent spliced in*)-Wert, wobei die Betrachtung der Kontroll- versus der *Knockdown*-Population durch die Differenz beider Werte durch nachfolgende Formel erfolgte:

$$\text{IncLevelDifference} = \text{Mittelwert (IncLevel siC)} - \text{Mittelwert (IncLevel Knockdown)}$$

Eine vollständige Liste der differentiellen Isoformexpression nach rMATS ist in Wedler *et al.* (2023) veröffentlicht und in der *supplementary table* TS8 einzusehen [272].



Mittels des R-Pakets biomaRt v.2.56.0 [242] wurden Protein-kodierende Gene bestimmt. Hexamer-Frequenzen innerhalb signifikant alternativ gespleißter Exons ( $|\Delta\text{PSI}| > 0,05$ ;  $\text{FDR} < 0,05$ ) wurden auf Basis der genomischen Koordinaten aus den rMATS-Analysen, im spezielleren der als SE.MATS.JCEC.txt generierten Datei, abgeleitet und aus den Protein-kodierenden Genen extrahiert. Aus diesen Koordinaten wurden Exon-cDNA-Sequenzen unter Verwendung von getfasta aus dem Tool bedtools (Version v2.30.0) [243] mit dem humanen Referenzgenom (UCSC hg38) extrahiert, wobei Längen unterhalb des 5. Perzentils und oberhalb des 95. Perzentils entfernt wurden. Hexamer-Frequenzen der verbleibenden Sequenzen wurden mithilfe des R-Pakets Biostrings v2.68.1 [244] ermittelt. Normalisierte Hexamer-Frequenzen wurden durch die Division der absoluten Hexamer-Frequenzen durch die Gesamtzahl der Hexamere in allen Sequenzen berechnet.

Eine Anreicherung von RBP-Bindungsstellenmotiven innerhalb signifikant alternativ gespleißter Exone wurde unter Verwendung des R-Pakets MEME suite (Version 1.8.0) [245] identifiziert.

Zur Analyse verschiedener an- oder abgereicherter Hexamere in alternativ gespleißten Exonen wurde eine Selektion auf Basis der Anreicherungsfrequenz oberhalb  $9e-4$  durchgeführt. Diese selektierten Motive wurden mittels des R-Paketes Biostrings konvertiert und gegen eine Datenbank von bekannten RBP Motiven (Ray2013\_rbp\_Homo\_sapiens.dna\_encoded.meme von <https://meme-suite.org/meme/>) mithilfe der runTomTom Funktion des R-Paketes MEME Suite abgeglichen. [246] (vgl. Wedler *et al.* (2023), *supplementary table* TS10 [272]).

### 2.2.6.2. Gene Set Enrichment Analysen

Gene Set Enrichment Analysen (GSEA) wurde mittels GSEA Software (Version 4.2.3, [247], [248]) und MSigDB Gensets (v2023.1, <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>) durchgeführt. Hierfür wurden absteigend gereichte  $\log_2$  foldchanges (FC) Protein-kodierender Gene aus der differentiellen Genexpression-Analyse (2.2.6.1) oder der Massenspektrometrie-Analyse (2.2.3.5) mit einer klassisch angereicherten Statistik und einer Minimalgröße des jeweiligen Gen-Sets von 10 analysiert. Vollständige Analysen wurden in Wedler *et al.* (2023), *supplementary table* TS7 und TS12 veröffentlicht [272].

Over-representation analysis (ORA) wurden mittels des R-Paketes clusterProfiler (v4.8.1, [249]) von Dr. Markus Glaß und Laura Schian durchgeführt. Hierfür wurden Protein-kodierende Gene mit signifikant alternativ gespleißten Exonen ( $|\Delta\text{PSI}| > 0,05$ ;  $\text{FDR} < 0,05$ ) (2.2.6.1) auf sowohl gemeinsame als auch RAVER1- und PTBP1-spezifische Ereignisse aufgeteilt, und für anschließende ORA verwendet. Die entsprechenden Ereignisse wurden mit dem MSigDB C5 Gene Ontology (GO) Gen-set und dem C2 Canonical Pathway (CP) Gen-Sets (v2023.1,

<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>) analysiert und auf signifikante Ereignisse ( $p < 0,05$ ) selektiert.

### 2.2.6.3. Datenbank-basierte Analysen

Innerhalb dieser Arbeit wurden Datenbank-basierte *in silico* Analysen durchgeführt. Hierfür wurden RNA-Sequenzierungsdaten von Lungen-Adenokarzinomen (LUAD) und Lungennormalgewebe aus dem TCGA (*the cancer genome atlas*) Research Network (<https://www.cancer.gov/>) sowie aus der Datenbank des GDC-Portals (<https://portal.gdc.cancer.gov>) bezogen. Für Überlebensanalysen mittels Hazard Ratio (HR) wurde die Plattform Kaplan-Meier (KM) Plotter (<http://kmplot.com/analysis/>; Stand 25.09.2023) verwendet. Es wurden speziell die mRNA *gene chip* Daten für Lungenkarzinome verwendet, nach Adenokarzinomen selektiert und ein „*best cutoff analysis*“ gewählt. Für Überlebensanalysen und Korrelationsanalysen nach Spearman der gesamten TCGA-Kohorte ( $n=33$ ) wurde das Onlineportal *Gene Expression Profiling Interactive Analysis* (GEPIA, [www.gepia2.cancer-pku.cn](http://www.gepia2.cancer-pku.cn); Stand: 25.09.2023) verwendet.

Zur Vorhersage und Visualisierung der RAVER1-Struktur (UniProt: E9PAU2) wurden AlphaFold DB (v2022-11-01) [250] und PyMOL Molecular Graphics System (v2.0, Schrödinger LLC) verwendet. Analysen einer Protein-Assoziation mit RAVER1 (E9PAU2) wurden mittels BioGRID Webtool (v4.4.220, <https://thebiogrid.org/>) durchgeführt.

Protein- und RNA-Expressionsdaten aus Normalgeweben wurden aus der Datenbank *The Human Protein Atlas* ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org); Stand 25.09.2023) bezogen. Dabei wurden Daten der *Normal tissue data* (Protein-Expression) sowie der *RNA consensus tissue gene data* (RNA-Expression) verwendet.

Sequenzierungsdaten der RAVER1- und PTBP1-depletierten Hep-G2 wurden entsprechend [251] von ENCODE ([www.encodeproject.org/](http://www.encodeproject.org/); Stand 25.09.2023) bezogen. Dabei wurden Daten der Experimente ENCSR603TCV, ENCSR064DXG, ENCSR491FOC und ENCSR576GOW verwendet.

NCBI Gene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/); Stand 25.09.2023) und NCBI Protein ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/); Stand 25.09.2023) wurde zur Analyse von RNA- und Protein-Isoformen verwendet. Hierfür wurden folgende Referenznummern genutzt: NM\_133452/ NP\_597709 (RAVER1); NM\_012154/ NP\_036286 (AGO2); NM\_001199302/ NP\_001186231 (CNOT2); NM\_001271282/ NP\_001258211 (DICER1); NM\_001382508/ NP\_001369437 (DROSHA); NM\_175854/ NP\_787050 (PAN3); NM\_004178/ NP\_004169 (TARBP2); NM\_014494/ NP\_055309 (TNRC6A); NM\_001162501/ NP\_001155973 (TNRC6B); NM\_018996/ NP\_061869 (TNRC6C); NM\_145332/ NP\_003179/ NP\_663304/ NP\_663306

(MAP3K7/TAK1); NM\_004612/ NP\_004603 (TGFBR1); NM\_003300/ NP\_003291 (TRAF3); NM\_153460/ NP\_703190 (IL17RC); NM\_001556/ NP\_001547 (IKBKB/IKK $\beta$ ).

### 2.2.7. Statistische Auswertungen und Visualisierungen

Alle dargestellten Experimente wurden, falls nicht anders erwähnt, dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Hieraus wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und letzteres, soweit nicht anders beschrieben als Fehlerbalken in Grafiken angegeben. Proben wurden zunächst auf eine Normverteilung mittels Shapiro-Wilk Test geprüft. Eine statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test (normalverteilte Proben), Mann-Whitney Test (nicht-normalverteilte Proben) und Pearson R Korrelationen unter Verwendung der GraphPad PRISM Software (v9.5.1) berechnet und als p-Wert gekennzeichnet, welche als nicht signifikant (ns) oder als Asterisk wie folgt dargestellt wurden: (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,005$ . Die Durchführung eines hypergeometrischen Tests wurde mittels des Webtools [www.systems.crump.ucla.edu/hypergeometric](http://www.systems.crump.ucla.edu/hypergeometric) (Stand 25.09.2023) durchgeführt. Dabei wurde eine Populationsgröße (N, Gesamtzahl der exprimierten Gene) von 15423, Anzahl der möglichen Erfolge (M) von 30 und Probengröße (s, Gesamtanzahl der alternativ gespleißten Gene) von 3256 (siRAVER1) bzw. 3101 (siPTBP1) angenommen.

Grafiken zur Darstellung experimenteller Ergebnisse wurden unter der Verwendung der GraphPad PRISM Software (v9.5.1) erstellt. Schematische Darstellungen wurden mittels BioRender (BioRender.com) visualisiert und dürfen mit folgenden Publikationslizenzen verwendet werden: AF25WJUXUC, MF25WJV7EC, CF25WJVRAC, XB25WJWWD7, EH25WJXG0A.

### 3. Ergebnisse

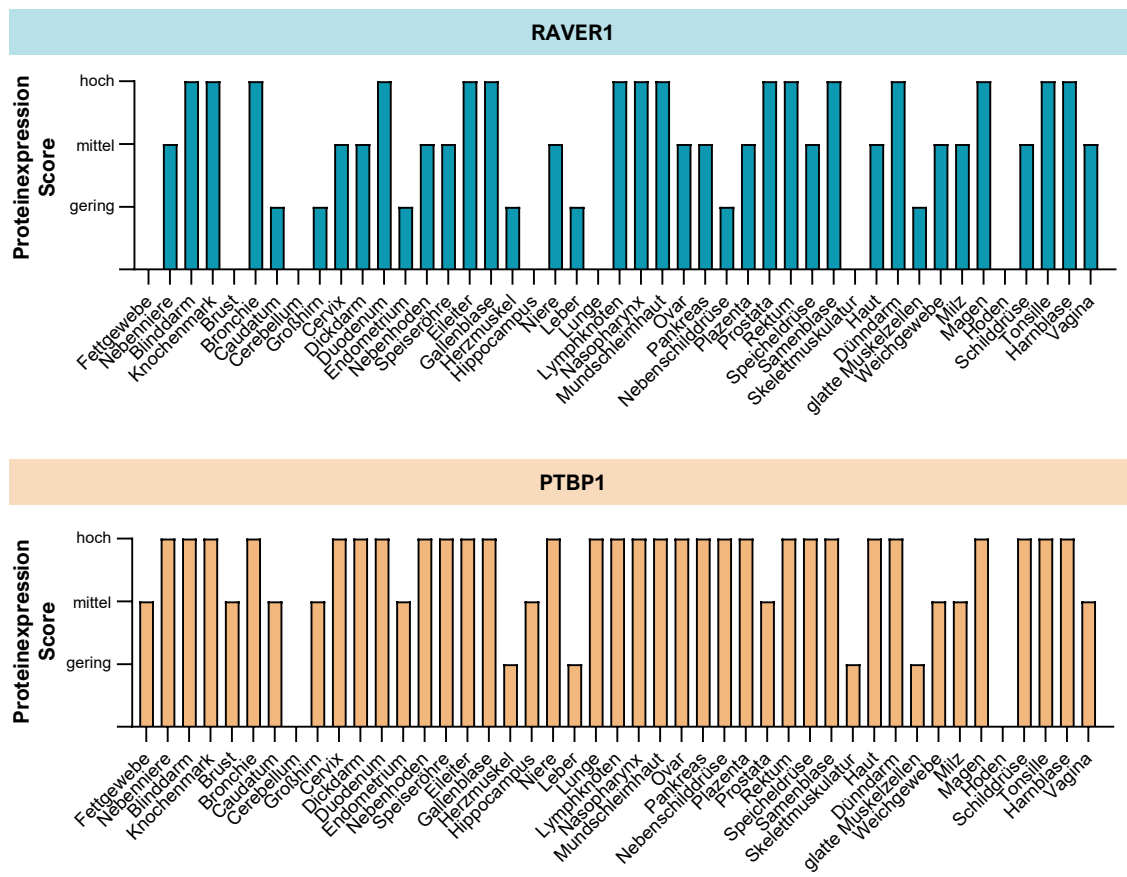
#### 3.1. Die Rolle der Proteine RAVER1 und PTBP1 in der Tumorprogression

Murines Raver1 wurde als hnRNP-ähnliches Protein klassifiziert, da es RNA-bindende Domänen besitzt, eine Ko-Lokalisierung und Interaktion mit dem hnRNP-Protein Ptbp1 aufweist und zusätzlich in der Lage ist, zwischen Kern und Nukleus zu pendeln [172]. Unter anderem sind hnRNP Proteine im Spleißen von RNAs involviert, wie es für Ptbp1 bereits mehrfach und für Raver1 in Assoziation mit Ptbp1 für die RNA TPM1 beschrieben ist [180, 252, 253]. Humanem PTBP1 wurde neben der Funktion im alternativen Spleißen auch eine Rolle im Rahmen der Tumorprogression zugewiesen [254, 255]. Zu Beginn dieser Forschungsarbeit war jedoch die Funktion des humanen Proteins RAVER1 nur geringfügig beschrieben, insbesondere eine potenzielle Funktion innerhalb einer Tumorprogression nicht analysiert. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation die funktionelle Rolle von RAVER1 in Bezug auf einen möglichen Einfluss auf die Tumorzellproliferation untersucht. Dabei war eine vergleichende Analyse zum bekannten funktionellen Kofaktor PTBP1 unabdingbar, da neben der bekannten Ko-Lokalisierung und Assoziation ebenfalls eine gemeinsame Funktion innerhalb des alternativen Spleißens beschrieben war und somit eine PTBP1-abhängige Modulierung alternativer Transkripte vermutet wurde.

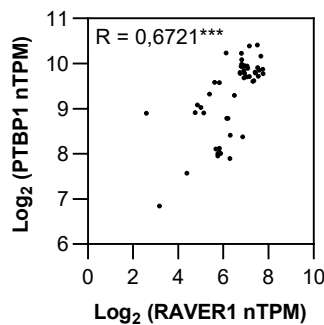
##### 3.1.1. RAVER1 als möglicher pro-onkogener Faktor im Lungenadenokarzinom

Sowohl RAVER1 als auch PTBP1 werden ubiquitär in nahezu allen Organen und Geweben, nach Angaben des *The Human Protein Atlas*, exprimiert (Abbildung 9). Dabei zeigt PTBP1 im Mittel eine höhere Proteinexpression als RAVER1 (Abbildung 9A). Gleichzeitig wird eine positive Pearson-Korrelation ( $R = 0,6721$ ;  $p < 0,001$ ) der RNA Expression beider Faktoren in 50 Geweben beobachtet (Abbildung 9B). Ferner wurde eine allgemeine Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier mit 33 unterschiedlichen Tumoren basierend auf RNA-Sequenzierungsdaten der TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) durchgeführt. Diese lässt vermuten, dass eine erhöhte Expression von RAVER1, aber auch von PTBP1 mit einer verschlechterten Prognose assoziiert sind (Abbildung 10A). Hierbei gibt ein signifikanter HR (Hazard Ratio) über 1 eine Assoziation zwischen der Expression des jeweiligen Faktors und einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten an. Gleichzeitig zeigen beide Proteine ebenfalls in einer Pan-Tumor-Analyse eine stark assoziierte Expression (Abbildung 10B). Speziell im Lungenadenokarzinom (LUAD) zeigt sich, neben der verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit bei hoher Expression, auch eine signifikant gesteigerte Expression von RAVER1 und PTBP1 im Vergleich zum normalen Lungengewebe (Abbildung 10A).

A



B



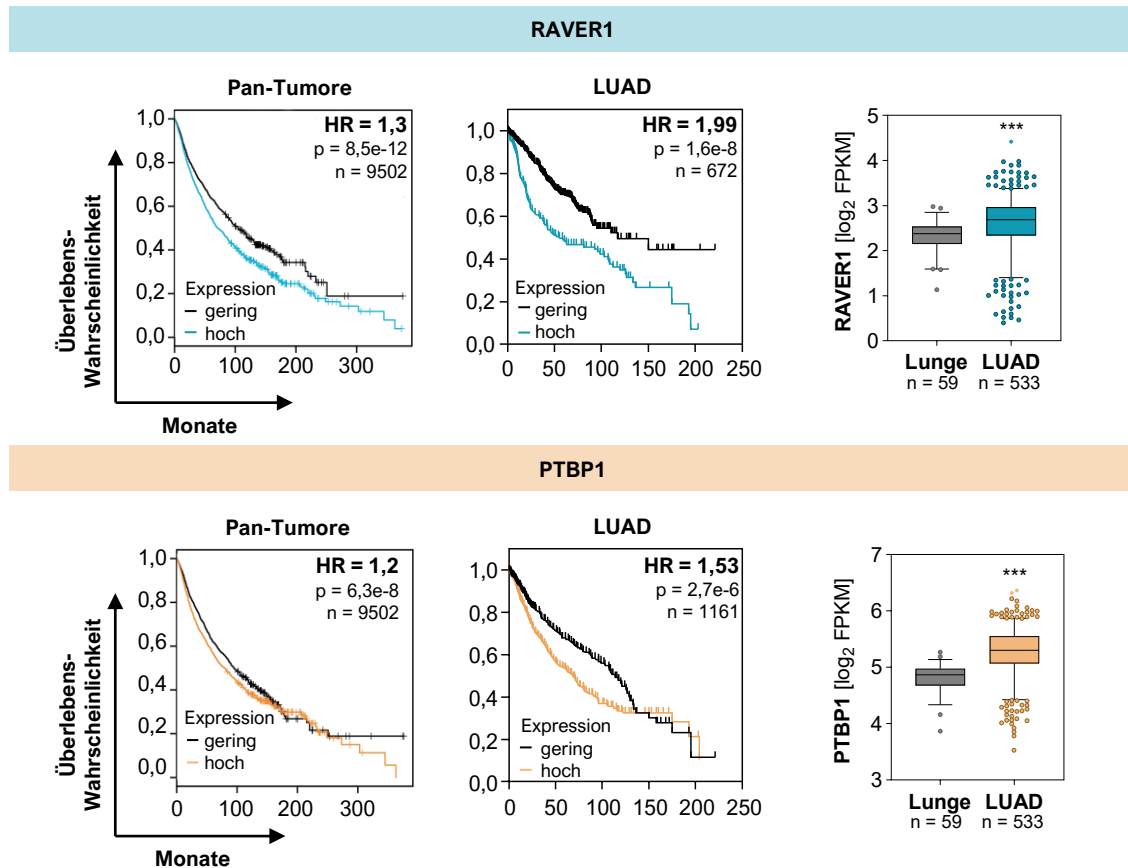
**Abbildung 9: Ubiquitäre Expression von RAVER1 und PTBP1 korrelieren miteinander. (A)**

Proteinexpression entsprechend *The Human Protein Atlas* von RAVER1 (türkis) und PTBP1 (apricot) aus 45 unterschiedlichen Geweben. Proteinexpression wurde anhand von Immunhistochemischen Färbungen ermittelt und einem Score (Wertung) aus nicht detektiert, geringe, mittlere und hohe Expression zugeordnet. (B) XY-Präsentation mit Korrelationsanalyse der Gewebe-übergreifenden RNA-Konsensus-Expressionsdaten (*The Human Protein Atlas*) von RAVER1 und PTBP1. Der Konsensus-Datenset bestehend aus normalisierter Expression (nTPM) von 50 Gewebearten, wurde aus Kombination der HPA und GTEx Transkriptom Datensets durch interne Normalisierung gebildet. Eine Korrelationsanalyse wurde nach Pearson R durchgeführt. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

nTPM: *normalized transcripts per kilobase million*; R: Pearson R Korrelationskoeffizient.

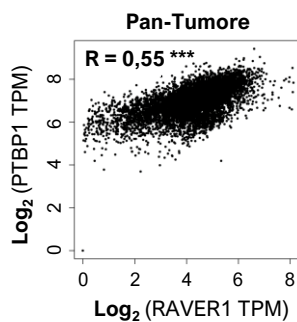
Dies lässt vermuten, dass sowohl RAVER1 als auch PTBP1 pro-onkogene Eigenschaften speziell in Lungenadenokarzinomen besitzen und ihre stark assoziierte Expression sowohl im Normalgewebe als auch um Tumorgewebe beibehalten wird.

A



**Abbildung 10: RAV1 und PTBP1 besitzen pro-onkogene Eigenschaften.** (A) Überlebensanalysen mit Kaplan-Meier Kurve aus 33 unterschiedlichen Tumoren (Pan-Tumore, links) wurden mittels GEPIA2 ([www.gepia2.cancer-pku.cn](http://www.gepia2.cancer-pku.cn)) durchgeführt. Kaplan-Meier Plotter ([www.kmplot.com](http://www.kmplot.com)) wurde für Überlebensanalysen von Lungenadenokarzinom Patienten (LUAD, Mitte) verwendet. RNA-Expression (rechts) von RAV1 und PTBP1 aus normalem Lungengewebe (grau) und LUAD (türkis: RAV1, apricot: PTBP1) wurde entsprechend der GTEx Daten und der TCGA-LUAD Kohorte dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt, Fehlerbalken geben das 95% Konfidenzintervall an. (B) Korrelationsanalyse (Pearson R) der Pan-Tumor RNA-Expression von RAV1 und PTBP1 wurde mittels GEPIA2 durchgeführt und als XY-Diagramm dargestellt. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

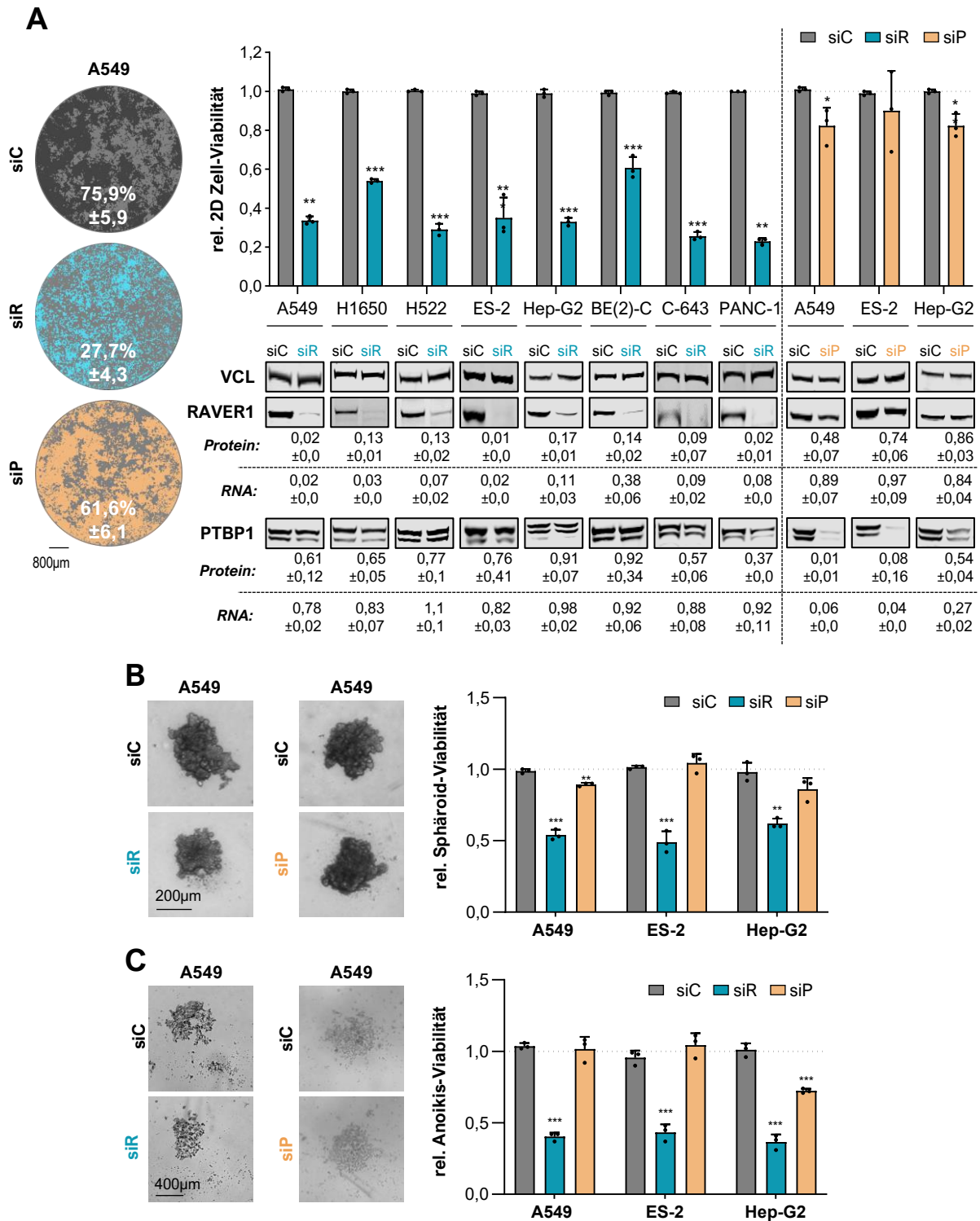
B



### 3.1.2. Einfluss von RAV1 auf die Tumorzellproliferation

Zur Analyse, ob die potenziell pro-onkogenen Faktoren RAV1 und PTBP1 einen Einfluss auf die Tumorzellproliferation besitzen, wurden unterschiedliche phänotypische Analysen *in vivo* und *in vitro* durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst siRNA-vermittelte Depletionen von RAV1 oder PTBP1 in Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft (siehe Tabelle 3) durchgeführt und hinsichtlich einer 2D Zellproliferation und Viabilität analysiert (Abbildung 11A).



**Abbildung 11: Depletion von RAVER1 führt zur Reduktion der Proliferation. (A)** siRNA-vermittelte Depletion von RAVER1 (siR, türkis) und PTBP1 (siP, apricot) in induzierten Tumorzelllinien wurden hinsichtlich ihrer 2D-Zellproliferation sechs Tage nach Depletion analysiert. Repräsentative Konfluenz-Aufnahmen (links) wurden mittels Incucyte® S3 (Sartorius) dokumentiert und analysiert. Dunkelgrau (siC), türkis (siR) und apricot- (siP) markierte Masken zeigen die Zelldichte/-konfluenz, während hellgrau freie, nicht bewachsene Flächen markiert. Eine Analyse der 2D Zell-Viabilität wurde mittels CellTiterGlo® sechs Tagen nach Depletion durchgeführt. Relative 2D Zell-Viabilität wurde durch Normalisierung zum Input und zur Kontrolle (siC) ermittelt. Änderung in der RAVER1- und PTBP1-Proteinexpression wurden mittels Western Blot analysiert. VCL (Vinculin) diente als Abgleich-Kontrolle. RAVER1- und PTBP1-Proteinabundanz unter Depletion wurden zu VCL und siC normalisiert.

-Fortsetzung auf nächster Seite-

Die RNA-Expression von RAVER1 und PTBP1 wurden mittels qRT-PCR analysiert und zu siC sowie interner Kontrollen (EEF2, RPLP0 und GAPDH) normalisiert. Mittlere Protein- und RNA-Abundanz sowie deren Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten wurde unter exemplarischen Western Blot Aufnahmen angegeben. **(B, C)** Analyse des Sphäroid-Wachstums (B) und der Anoikis Resistenz (C) nach RAVER1 und PTBP1 Depletion in induzierten Tumorzelllinien. Mikroskopische Aufnahmen (links, repräsentative Bilder) wurden sechs Tage nach Depletion mittels Incucyte® S3 (Sartorius) durchgeführt. Eine Bestimmung der relativen Viabilität (rechts) wurde entsprechend (A) durchgeführt.

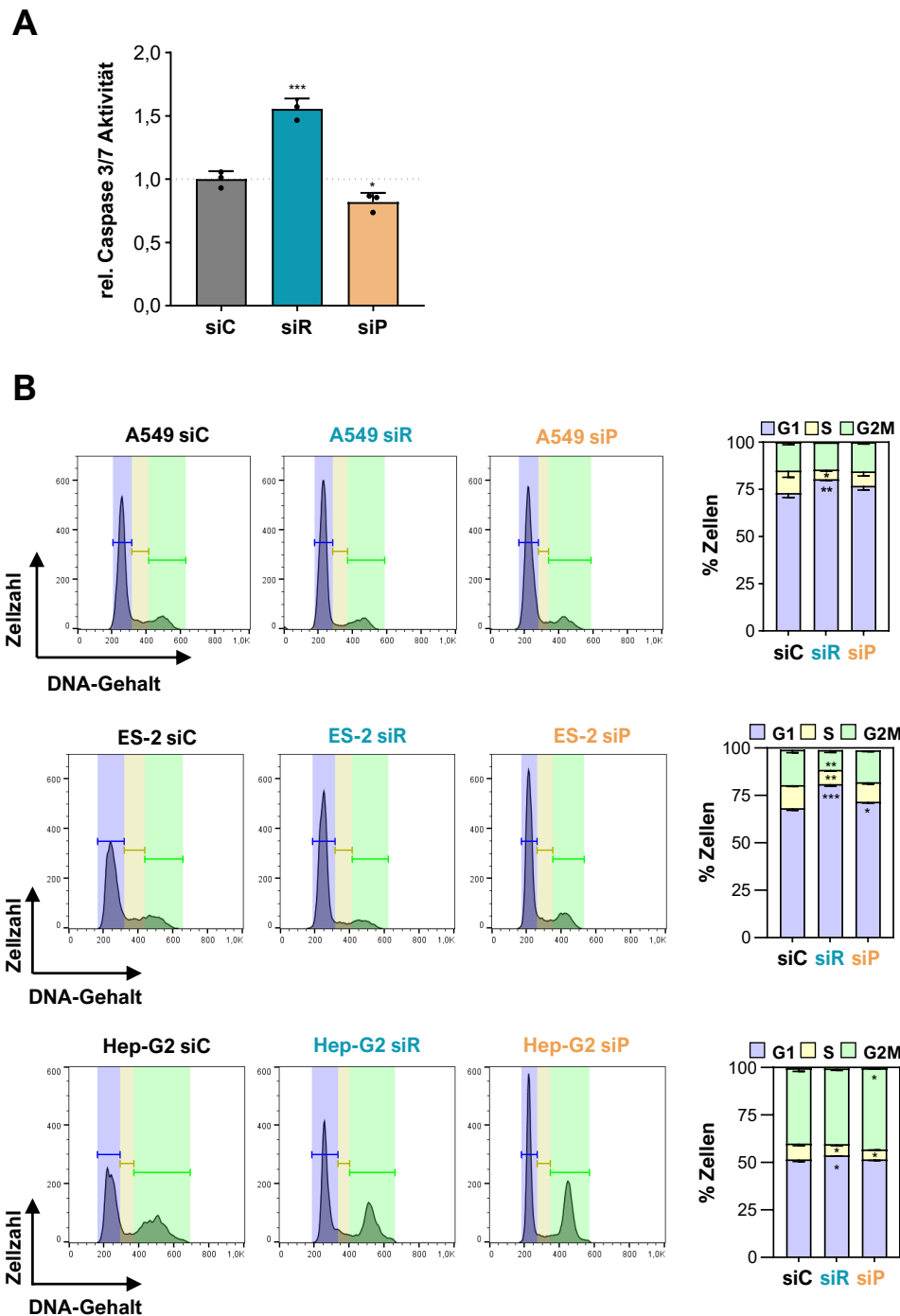
Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. Fehlerbalken geben eine Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten an. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Zur Viabilitätsbestimmung wurde hierbei das ATP-Level der Zellen gemessen, wodurch Rückschlüsse zur Viabilität getroffen werden können. Es konnte Zelllinien-übergreifend gezeigt werden, dass eine Depletion von RAVER1 zur signifikanten Reduktion der relativen 2D Zell-Viabilität führt. Dahingegen zeigt eine PTBP1-Depletion eine geringe Reduktion der 2D Zell-Viabilität in A549 und Hep-G2 Zelllinien, die im zusätzlichen Fall von ES-2 Zellen nicht signifikant ist. Auch komplementäre 2D Zellkonfluenzanalysen, welche unter Verwendung eines Hellfeldmikroskops analysiert wurden, bestätigen unter RAVER1-Depletion in der LUAD-abgeleiteten Zelllinie A549 eine deutliche Reduktion, während eine PTBP1-Depletion einen wesentlich geringeren Einfluss auf die Konfluenz besitzt (Abbildung 11A). Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die PTBP1-Proteinexpression in einer Mehrheit der Zelllinien durch eine RAVER1-Depletion reduziert wird, welches allerdings auf RNA-Ebene nicht einheitlich der Fall ist (Abbildung 11A). Umgekehrt wird ebenfalls eine Reduktion der RAVER1 Proteinexpression, nicht aber der RNA-Expression, unter PTBP1-Depletion detektiert (Abbildung 11A).

Zur weiteren phänotypischen Charakterisierung wurden Sphäroid- und Anoikis-Resistenz-Analysen in den Zelllinien A549 (Lunge), ES-2 (Ovar) und Hep-G2 (Leber) durchgeführt. Dabei soll eine Sphäroid-Analyse ähnliche Bedingungen wie ein *in vivo* Tumor hinsichtlich der Zell-Zell Kontakte und Hypoxie abbilden, während bei der Anoikis-Resistenz-Analyse Zellen ohne Adhäsionsmöglichkeit intrinsische und extrinsische Apoptose-Signale umgehen können und im erweiterten Sinne ein metastasierendes Potential der Tumorzellen analysiert werden kann [256, 257]. Das Sphäroid-Wachstum und die Sphäroid-Viabilität war unter RAVER1-Depletion ähnlich zum 2D Wachstum in allen drei analysierten Zelllinien vermindert, während eine PTBP1-Depletion erneut nur eine marginale Reduktion in den Linien A549 und Hep-G2 oder keinen Effekt in der Zelllinie ES-2 zeigte (Abbildung 11B). Auch bei der Anoikis-Resistenz zeigte sich eine einheitlich reduzierte Resistenz sowie Viabilität unter RAVER1-Depletion, nicht aber unter PTBP1-Depletion, bei der lediglich in der Hep-G2 Zelllinie eine Reduktion beobachtet werden konnte (Abbildung 11C). Neben einer Analyse des Zellwachstums wurde zusätzlich eine Analyse hinsichtlich der intrinsischen Apoptose unter RAVER1- und PTBP1-Depletion in A549 Zellen durchgeführt. Hierbei wird durch Messung der Caspase 3/7 Aktivität auf die intrinsische Apoptose geschlossen. Durch Depletion von



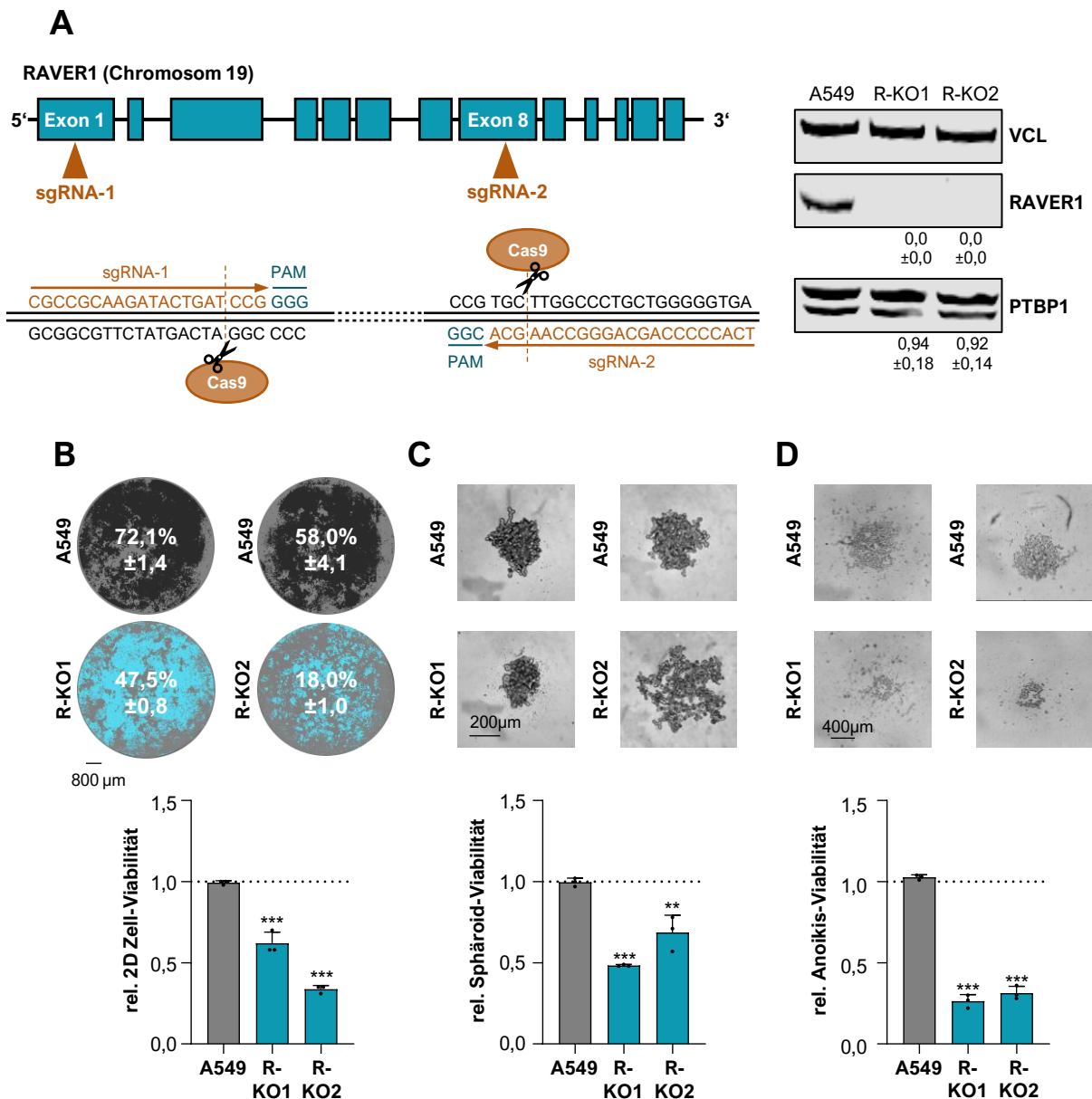
RAVER1 in A549 Zellen wurde ein Anstieg der relativen Caspase 3/7 Aktivität beobachtet, während eine Depletion von PTBP1 keinen Effekt zeigte (Abbildung 12A).



**Abbildung 12: RAVER1-Depletion resultiert in erhöhter Apoptose und G1/S Zell-Arrest.** (A) Analyse der Caspase 3/7 Aktivität unter Kontroll (siC)-, RAVER1 (siR)- und PTBP1 (siP)-Depletion in A549. Berechnung der relativen (rel.) Aktivität durch Normalisierung zur Viabilitätsmessung (CellTiterGlo®) und zur Kontrolle. (B) Zellzyklusanalysen wurden in Kontroll-, RAVER1- und PTBP1-depletierten A549, ES-2 und Hep-G2 Zellen durchgeführt. Die Auswertung wurde mit FlowJo durchgeführt und zeigt die Verteilung der Zellen nach ihrem DNA-Gehalt (links) und den prozentualen Anteilen der Zellen innerhalb der G1, S oder G2M Phase (rechts). Statistische Signifikanz wurde mittels Student's t-Test ermittelt. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Die Analyse des Zellzyklus wurde durch Anfärbung der zellulären DNA und anschließender durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt. Hierbei werden Zellen hinsichtlich der

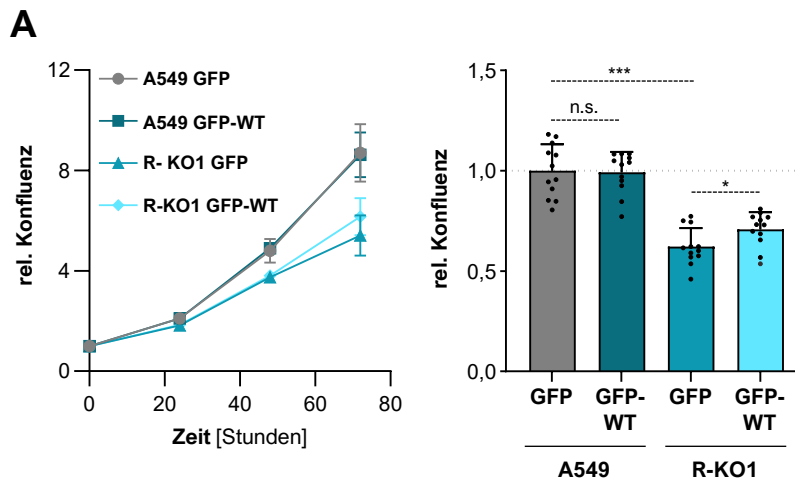
Verteilung ihres DNA-Gehalts gemessen und anschließend der Phasen G1, S und G2M zugeordnet. Es konnte eine konsistente Anreicherung von Zellen in der G1- und S- Phasen unter RAVER1-Depletion in den Zelllinien A549, ES-2 und Hep-G2, und zusätzlich der G2M-Phase in den ES-2 Zellen gezeigt werden (Abbildung 412B). Eine PTBP1-Depletion führte in A549 Zellen zu keiner Veränderung der Zellzyklusphasen, beziehungsweise zu einer leichten Anreicherung von Zellen in der G1 (ES-2), oder der S- und G2M Phasen (Hep-G2). Zusammenfassend kann hieraus geschlossen werden, dass RAVER1, nicht aber PTBP1, eine konservierte pro-proliferative und gleichzeitig anti-apoptische Rolle in Tumorzellen aufweist. Neben einer siRNA-vermittelten Depletion wurde zusätzlich eine Deletion innerhalb des RAVER1-Loci in der Zelllinie A549 mithilfe des *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/Cas Systems durchgeführt. Eine schematische Deletionsstrategie ist in Abbildung 13A dargestellt. Hierbei wurden zwei *single guide* RNAs (sgRNAs) perfekt komplementär *upstream* des *protospacer adjacent motif* (PAM) mit der Sequenz NGG designt und zusammen mit der Endonuklease Cas9 in parentale A549 transfiziert. Sowohl die sgRNA-kodierenden Plasmide als auch das Cas9-kodierende Plasmid kodieren gleichzeitig fluoreszierende Proteine (RFP- *red fluorescent protein*; GFP- *green fluorescent protein*), sodass die transfizierten Zellen nach RFP- (sgRNA) und GFP (Cas9) -positiven Einzelzell-Klonen mittels Durchflusszytometrie selektiert und sortiert werden konnten. Die sgRNA-vermittelte Bindung des sgRNA-Cas9-Komplexes an den genomischen Locus führt hierbei zu einem Sequenz-spezifischen Doppelstrangbruch, welcher durch die Endonuklease Cas9 vermittelt wird [258]. Anschließend führen zelluläre Reparaturmechanismen zu einer Ligation des Doppelstrangbruches. Durch die Verwendung zweier sgRNAs sollte eine Deletion des RAVER1 Loci zwischen Exon 1 und Exon 8 realisiert werden, um eine möglichst effiziente Deletion zu erhalten, ohne weitere annotierte Bereiche zu affektieren. Durch die Validierung des Verlustes der RAVER1 Protein-Expression mittels Western Blot Analysen konnten zwei Einzelzellklone identifiziert werden (Abbildung 13A, Abbildung 36A im Anhang). Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen RAVER1, dessen Epitope innerhalb des deletierten Bereiches bzw. innerhalb des C-Terminus lokalisiert sind, kann geschlossen werden, dass es sich hierbei um eine vollständige Deletion von RAVER1 handelt, die zu einem Verlust der Protein-Expression führt. Interessanterweise war die PTBP1 Proteinexpression unter RAVER1-Deletion nicht affektiert, entgegen der Depletionsanalysen, was auf eine Kompensation durch Deletion hindeutet (Abbildung 13A, vgl. Abbildung 11A). Wie auch bei den Depletionsstudien wurden phänotypische Analysen unter RAVER1-Deletion durchgeführt. Für beide RAVER1-*Knockout* (KO) Klone konnte ebenfalls eine Reduktion der 2D-Zellproliferation, des Sphäroid-Wachstums und der Anoikis-Resistenz sowie der jeweiligen Viabilität detektiert werden (Abbildung 13B -D).



**Abbildung 13: CRISPR/Cas9-vermittelte RAV1-Deletion führt zur reduzierten Zellproliferation.** (A) Schematische Darstellung der CRISPR/Cas9-vermittelten Deletionsstrategie. Zwei sgRNAs binden innerhalb des 1. und 8. Exons von RAV1 *upstream* eines PAM, wodurch je ein Cas9-mediierter Doppelstrangbruch zur Deletion des Genabschnittes führt. Analyse der RAV1- und PTBP1-Proteinabundanz der parentalen A549 Population sowie zweier RAV1-Deletionsklonen (R-KO1, R-KO2) erfolgte mittels Western Blot, wobei VCL als Kontrolle diente. Proteinabundanz wurde von drei unabhängigen Experimenten ermittelt, zur parentalen Population sowie zu VCL normalisiert und sind mit Standardabweichung indiziert. (B-D) Konfluenz der 2D-Zellproliferation (B), Sphäroid (C) und der Anoikis Resistenz (D) unter RAV1 Deletion in A549 wurden mittels Incucyte® S3 (Sartorius) analysiert und repräsentativ dargestellt (oberer Abschnitt). Dunkelgrau- (A549) bzw. türkis- (R-KO) markierte Masken (B) zeigen die Zelldichte/-konfluenz, während hellgrau freie, nicht bewachsene Flächen markiert. Die Analyse der Zell-Viabilität (unterer Abschnitt) wurde mittels CellTiterGlo® durchgeführt. Relative (rel.) Viabilität wurde durch Normalisierung zum Input und zur Kontrolle (A549) ermittelt. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

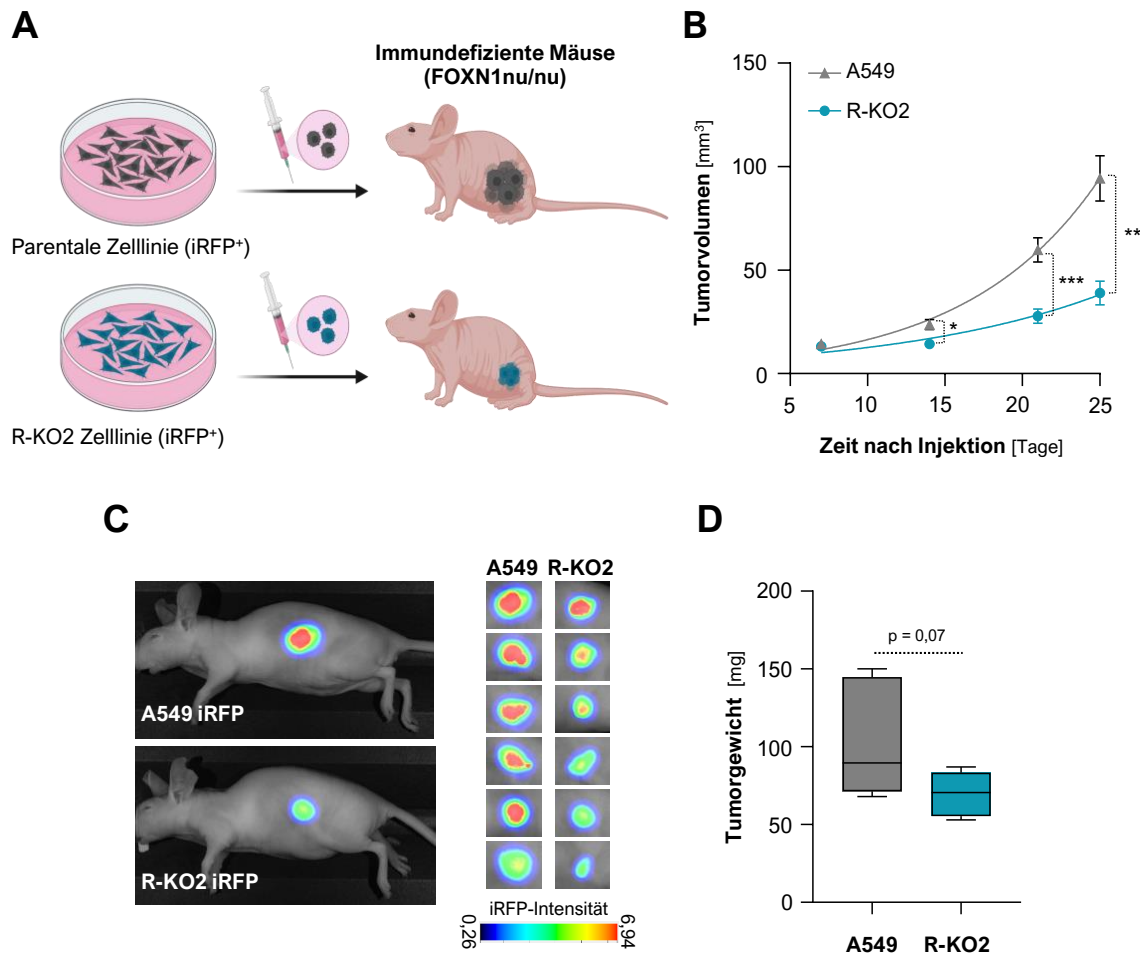
Des Weiteren wurden Über- und Re-Expressionsstudien hinsichtlich der 2D Zellproliferation durchgeführt (Abbildung 14). Eine Überexpression von RAV1 in parentalen A549 Zellen wies dabei keine Veränderung der relativen Konfluenz auf. Eine stabile Re-Expression von

GFP-RAVER1 in dem RAVER1-KO Klon 1 (R-KO1) zeigen jedoch eine leichte, wenn auch nicht vollständig wiederhergestellte Zellproliferation anhand der relativen Konfluenz.



**Abbildung 14: Re-Expression von RAVER1 fördert die Zellproliferation. (A)** Konfluenz der 2D-Zellproliferation von RAVER1-Überexpression in A549 und RAVER1-deletierten A549 (R-KO1) wurden mittels Incucyte® S3 (Sartorius) analysiert. Transduktion von GFP- bzw. GFP-RAVER1 (GFP-WT) wurden freundlicherweise von Dr. Marcell Lederer durchgeführt. Mikroskopische Aufnahmen von zwölf Einzelkavitäten pro Bedingung wurden 24 Stunden nach dem Einsäen (Zeitpunkt 0) alle 24 Stunden von Dr. Nadine Bley durchgeführt. Es folgte eine Quantifizierung mittels Incucyte® *Adherent-Cell-by-Cell* Modul, mit Normalisierung zum Zeitpunkt 0, welche als XY-Präsentation der relativen (rel.) Konfluenz in Abhängigkeit der Zeit dargestellt wurde (links). Die rel. Konfluenz zum Zeitpunkt von 72 Stunden, normalisiert zum Zeitpunkt 0 und zur A549 GFP-Kontrolle, wurde als Balkendiagramm dargestellt (rechts). Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von 12 Aufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten dar. n.s.: nicht signifikant; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Zusätzlich zu den ausgeführten *in vitro* Analysen wurden *in vivo* Analysen in den spezielleren Maus-Xenotransplantationen durchgeführt. Hierbei wurde der RAVER1-deletierte Klon 2 (R-KO2) sowie die parentale Zelllinie A549 stabil mit iRFP (*near infrared fluorescent protein*) transduziert, um eine spätere nicht-invasive Bildgebung zu ermöglichen. Eine gleiche Anzahl an Zellen wurde subkutan in die Flanke immundefizienter Nacktmäuse (FOXN1 *nu/nu*) injiziert (Abbildung 15A). Zur Bewertung des Tumorstadiums wurde das Tumorgewicht in regelmäßigen Abständen gemessen und bildgebende Verfahren sowie Messung des Tumorgewichts am Endzeitpunkt (Tag 25) durchgeführt (Abbildung 15B-D). Über die Zeit war das Tumorgewicht der R-KO2 Tumore signifikant geringer im Vergleich zu den parentalen Tumoren (Abbildung 15B). Es konnte ebenfalls eine starke Tendenz des reduzierten Tumorgewichts unter RAVER1-Deletion festgestellt werden, auch wenn diese mit  $p = 0,07$  nicht signifikant war (Abbildung 15D). Zusätzlich weisen alle RAVER1-deletierten Tumore ein reduziertes iRFP-Signal am Endzeitpunkt auf (Abbildung 15C). Basierend auf der reduzierten Tumorzellproliferation unter RAVER1-Depletion und -Deletion *in vitro* und *in vivo* kann geschlossen werden, dass RAVER1 eine pro-onkogene Funktion hinsichtlich gesteigerter Proliferation und des Tumorstadiums speziell im LUAD aufweist.



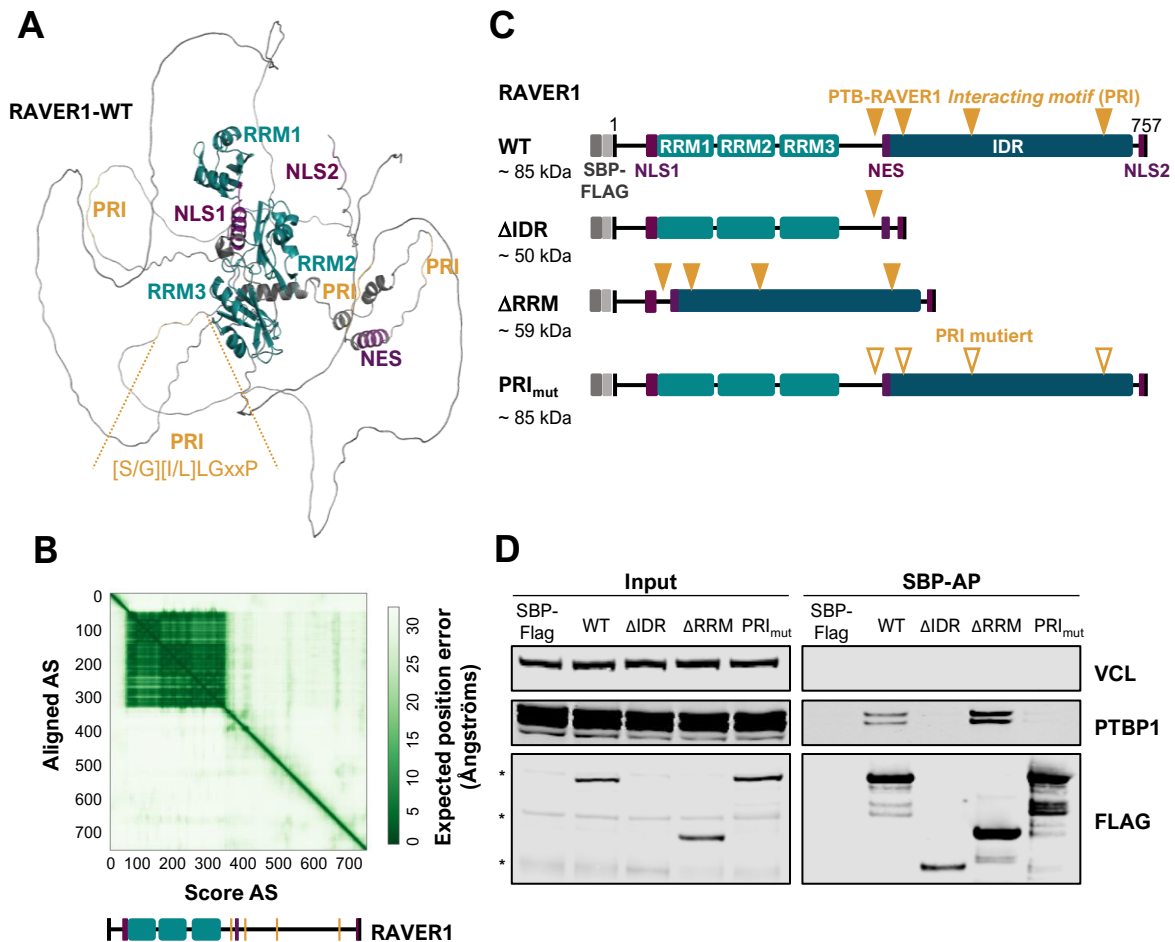
**Abbildung 15: RAVER1 hat einen pro-onkogenen Einfluss *in vivo*.** (A) Schematische Darstellung der durchgeführten Maus-Xenotransplantationsstudien. Parentaler A549 und RAVER1-depletierter Einzelzellklon (R-KO2) wurden stabil mit iRFP transduziert und je  $1 \cdot 10^6$  Zellen subkutan in FOXN1 *nu/nu* Mäuse injiziert ( $n = 6$  pro Bedingung). (B-D) Das Tumorzustand der Versuchstiere aus (A) wurde alle sieben Tage nach Injektion gemessen (B). Fehlerbalken stellen den Standardfehler (SEM; *standard error of mean*) dar. Nah-Infrarot bildgebende Verfahren gekoppelt mit Hellfeld- Mikroskopischen Aufnahmen (C) sowie Messung des Tumorgewichts (D) erfolgten am Tag 25 nach Injektion (Endzeitpunkt). Fehlerbalken in (D) zeigen den minimalen/maximalen Wert an. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 3.2. Funktion der RAVER1-PTBP1 Assoziation in Perinukleolären Kompartimenten

Die Lokalisierung von RAVER1 und PTBP1 innerhalb perinukleolärer Kompartimenten (PNC, *perinucleolar compartment*) wurde erstmals in murinen Myoblasten von Hüttelmaier *et al.* (2001) beschrieben [172]. Des Weiteren konnte eine Assoziation zwischen einem erhöhten Auftreten dieser PNCs und einer verschlechterten Tumor-Prognose sowie einem erhöhten Metastasierungspotential festgestellt werden [84, 85, 226]. Folglich sollte die Hypothese, ob die pro-onkogene Funktion von RAVER1 in Zusammenhang mit dessen Lokalisierung und der PNC Homöostase stehen, analysiert werden.

### 3.2.1. Analyse der RAVER1-PTBP1 Assoziation

Obwohl eine Interaktion zwischen RAVER1 und PTBP1 bereits zuvor beschrieben wurde, erfolgte in dieser Studie darüber hinaus eine Analyse der Abhängigkeit verschiedener Proteindomänen oder Regionen von RAVER1. Dies diente dazu, die Bedeutung von PTBP1-Interaktionsmotiven mit der PNC-Lokalisierung näher zu untersuchen.



**Abbildung 16: Intrinsic ungeordnetes RAVER1 interagiert mit PTBP1.** (A, B) Analyse der Proteinstruktur von RAVER1 (E9PAU2) wurden mittels AlphaFold durchgeführt. Visualisierung und farbliche Markierung der vorhergesagten Struktur erfolgte mittels PyMOL (A). *Aligned Error Plot* der vorhergesagten Proteinstruktur ist in (B) dargestellt. (C, D) Unterschiedliche RAVER1-Fragmente (C) wurden in A549 RAVER1-deletierten Zellen (R-KO2) re-exprimiert und einer SBP-Affinitätspräzipitation (SBP-AP) nach Kernfraktionierung mit anschließender Western Blot Analyse durchgeführt. Der Nachweis von VCL diente der Negativ-Kontrolle, ein anti-FLAG Antikörper wurde zur Detektion der SBP-FLAG-getaggten RAVER1 Fragmente verwendet. Asteriske markieren unspezifische Hintergrundbanden.

AS: Aminosäure; WT: Wildtyp RAVER;  $\Delta$ IDR: Deletion der IDR;  $\Delta$ RRM: Deletion der RRM;  $\text{PRI}_{\text{mut}}$ : mutierte PRI Motive.

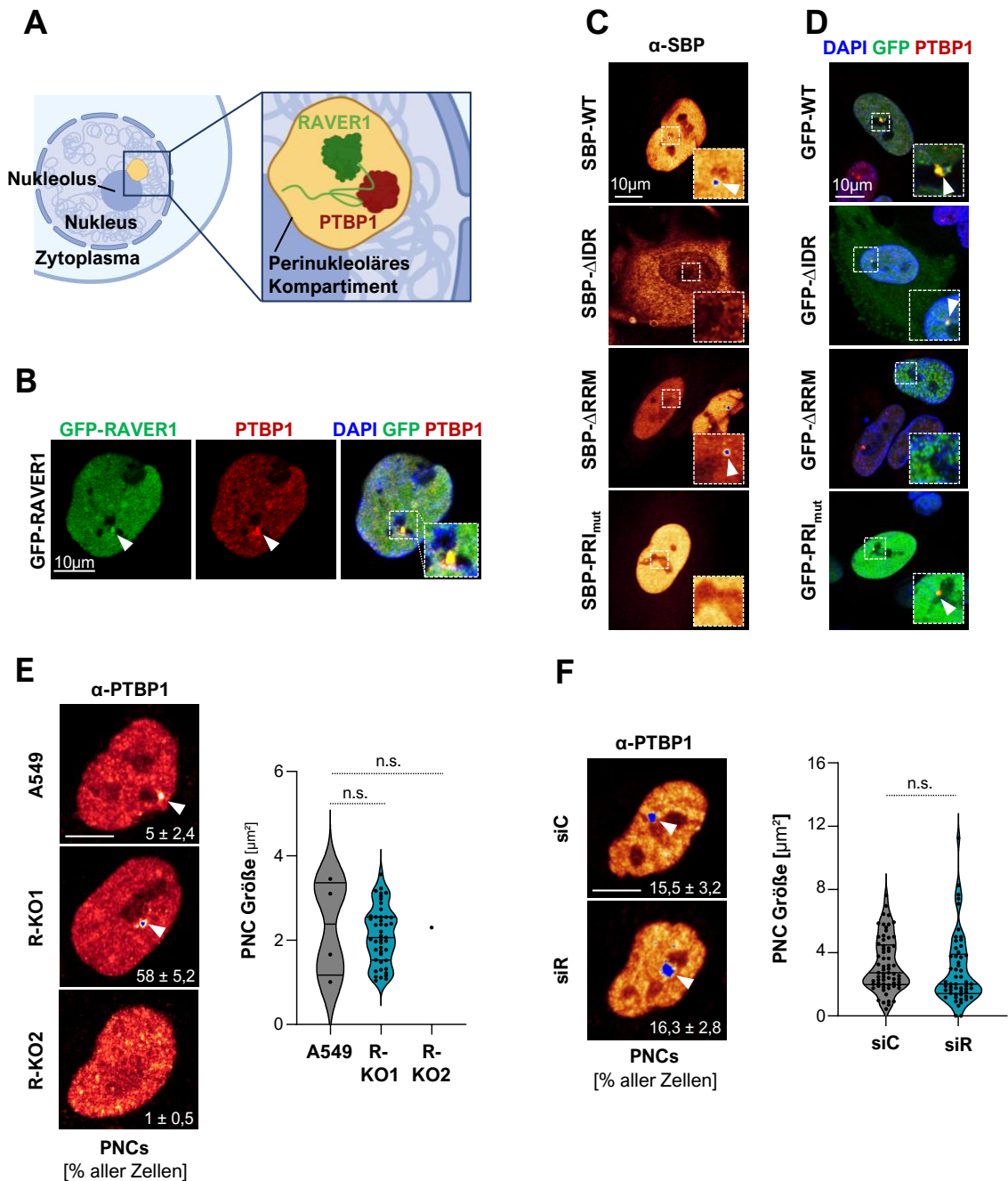
Zur Charakterisierung der Struktur von RAVER1 wurde eine Analyse der Proteinstruktur Datenbank AlphaFold durchgeführt (Abbildung 16A-B, Abbildung 37A im Anhang). Dabei wird mittels eines Algorithmus basierend auf bekannten Proteinstrukturen eine 3D-Vorhersage der Struktur getroffen und ein *Aligned Error Plot* erstellt [259]. Hierbei zeigen (dunkel-) grüne Bereiche einen niedrigen erwarteten Fehler (*expected position error*) und somit eine hohe

Konfidenz der vorhergesagten Struktur, während hellere Bereiche einen hohen erwarteten Fehler und somit eine niedrige Konfidenz anzeigen. Eine niedrige Konfidenz deutet hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit auf einen intrinsisch ungeordneten Bereich (IDR, *intrinsically disordered region*) innerhalb des Proteins hin, da keine Zuordnung zu einer vorhergesagten Struktur erfolgen konnte. Die niedrigen Konfidenzen im N-terminalen, vor allem aber im C-terminalen Bereich von RAVER1, legen einen hohen Anteil an intrinsisch ungeordneten Regionen nahe (Abbildung 16B). In diesem Bereich befinden sich zudem die vier PTBP1-RAVER1-Interaktionsmotive (PRIs). Dahingegen zeigen die bereits beschriebenen drei putativen RNA-Bindungsdomänen (RRM) eine hohe Konfidenz (siehe Abbildung 16A, B). Zur Analyse der RRM- oder IDR-abhängigen Interaktion mit PTBP1 wurden RAVER1-deletierte Zellen (R-KO2) mit RAVER1-Wildtyp (WT), RRM- ( $\Delta$ RRM), beziehungsweise IDR-deletierten ( $\Delta$ IDR) Fragmenten sowie einem PRI-mutierten ( $\text{PRI}_{\text{mut}}$ ) Fragment re-exprimiert, wobei alle Fragmente stets die Lokalisierungssequenzen NES, NLS1 und NLS2 und zusätzlich eine N-terminale SBP-Flag-Fusion (*streptavidin binding protein*) besitzen (Abbildung 16C). Es wurden SBP-Affinitätspräzipitationen (AP) der Kernfraktionen mit anschließenden Western Blot Analysen durchgeführt. Eine initiale Kernfraktion wurde hier gewählt, um die Ausbeute der als kernständig angenommenen RAVER1-Fragmente innerhalb der AP zu erhöhen und somit nur kernständige Assoziationen zu analysieren. Es konnte gezeigt werden, dass PTBP1 mit RAVER1-WT und dem RRM-deletierten Fragment ko-präzipitiert, nicht aber mit dem IDR-deletierten oder dem PRI-mutierten Fragment (Abbildung 16D).

### 3.2.2. Einfluss von RAVER1 auf die PNC Homöostase

Wie in Abbildung 17A schematisch dargestellt, wurden RAVER1 und PTBP1 in PNCs angereichert vorgefunden [172]. Dabei stellen PNCs membranlose Kondensate dar, bestehend aus einer Assemblierung von Proteinen und Nukleinsäuren, deren maligne Funktion jedoch noch nicht vollständig untersucht ist [12, 260]. Im Folgenden sollte analysiert werden, ob RAVER1 einen Einfluss auf die PNC Homöostase besitzt.

Zur initialen Analyse, ob die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Zelllinie A549 ebenfalls gleiche Lokalisierungsmerkmale und das Vorhandensein von PNCs aufweist, wurden Immun-Färbungen durchgeführt (Abbildung 17B). Hierfür wurden parentale A549 Zellen mit GFP-fusionierten RAVER1 überexprimiert und eine Immunfärbung gegen PTBP1, sowie einer Anfärbung mit DAPI zur Visualisierung der Kerne durchgeführt und anschließend die Fluoreszenz von GFP-RAVER1, PTBP1 und DAPI mittels konfokalem Laser-Mikroskop analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Proteine kernständig waren und ebenfalls in PNCs angereichert vorlagen (weiße Markierung). Die Überlagerung beider Bilder zeigte eine deutliche Ko-Lokalisierung beider Proteine.



**Abbildung 17: RAVER1 ist entbehrlich für eine PNC Homöostase.** (A) Schematische Darstellung von Perinukleolären Kompartimenten (PNCs). PNCs stellen dabei membranlose Strukturen dar, welche sich an der Peripherie des Nukleolus befinden und in denen Proteine wie PTBP1 und RAVER1, sowie RNA Pol III Transkripte angereichert sind [260]. (B) Immunfärbungen von PTBP1 wurden in GFP-RAVER1 überexprimierenden A549 Zellen durchgeführt. Visualisierung von GFP, PTBP1 und DAPI erfolgte mittels konfokaler Laser-Mikroskopie. (C, D) In RAVER1-deletierte A549 (R-KO2) wurden mit SBP-FLAG-getagte (C) bzw. GFP-getagte (D) Fragmente (entsprechend Abbildung 16C) re-exprimiert und mittels Immunfärbung von SBP (C) oder PTBP1 und GFP-Fluoreszenz untersucht. Analysen aus (D) wurden mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Marcell Lederer, Dr. Nadine Bley und Alexander Rausch durchgeführt. (E, F) Immunofluoreszenz Aufnahmen von PTBP1 in parentalen und RAVER1-deletierten Zellen (E, n = 80 Zellen pro Bedingung) bzw. in Kontroll- (siC) und RAVER1- (siR) depletierten A549 (F, n = 300 Zellen pro Bedingung). Prozentuale Anzahl der Zellen mit PTBP1-angereicherten PNCs mit Standardabweichung sind innerhalb der Bilder gekennzeichnet. PTBP1-angereicherte PNCs wurden hinsichtlich ihrer Größe mithilfe NuclearParticleDetector2D (Fiji) analysiert und die Größenverteilung mittels Violin Plots dargestellt. Eine statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-Test (E) und Mann-Whitney Test (F). PNCs sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet, während gestrichelte Boxen einen vergrößerten Bereich darstellen. Kerne wurden mit DAPI angefärbt (B, D, E, F). Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 10 µm (B-F).



Hierbei ist allerdings anzumerken, dass nicht jede Zelle eine Anreicherung von PNCs aufweist. Ferner sollte analysiert werden, ob die in Abbildung 16C beschriebenen Fragmente als Re-Expression in RAVER1-deletierten A549 Zellen ebenfalls in PNCs angereichert vorkommen. Hierfür wurde eine Immunfärbung gegen das Fusionsprotein SBP durchgeführt und die Lokalisierung ebenfalls mittels konfokaler Laser-Mikroskopie analysiert (Abbildung 17C). Die Re-Expressionen von RAVER1-WT und des RRM-deletierten Fragments lokalisierten im Nukleus und waren in PNC-ähnlichen Kompartimenten angereichert. Das PRI-mutierte Fragment lokalisierte zwar im Nukleus, jedoch konnte keine gesonderte Anreicherung festgestellt werden. Das IDR-deletierte Fragment wies neben einer leichten kernständigen Lokalisierung ohne Anreicherungen vor allem eine verstärkte Lokalisierung im Zytoplasma auf. Da eine Ko-Färbung von SBP und PTBP1 als PNC-Marker nicht möglich war, konnten Anreicherungen in PNCs nicht eindeutig zugeordnet werden. Hierfür wurden anschließend RAVER1-Knockout Zellen (A549 R-KO1) mit GFP-fusionierten Fragmenten, anstelle des SBP-Flag-Tags, stabil exprimiert und mittels mikroskopischer Analyse Immunfluoreszenzen gemessen (Abbildung 17D). Ähnlich zu den in Abbildung 17C beschriebenen Immunfluoreszenzen konnte erneut eine Lokalisierung von RAVER1-WT im Kern sowie einer Ko-Lokalisierung mit dem PNC-Marker PTBP1 in PNCs detektiert werden, genauso wie eine Lokalisierung des PRI<sub>mut</sub> Fragmentes im Kern ohne Anreicherung in PNCs. Das IDR-deletierte Fragment konnte durch diese Färbung deutlicher im Kern detektiert werden und in einigen Fällen auch angereichert in PNCs. Interessanterweise zeigten Zellen mit dem RRM-deletierten Fragment zwar ebenfalls eine Kernlokalisierung, jedoch konnten keine eindeutigen PNCs durch Ko-Lokalisierung mit PTBP1 detektiert werden. Vielmehr schien es sich hierbei um unspezifische granuläre Anreicherungen/Aggregate zu handeln. Hieraus kann geschlossen werden, dass sowohl die IDR, als auch die RRMs einen Einfluss auf die Lokalisierung von RAVER1 haben könnten, jedoch die PRIs einen eindeutigen Einfluss auf eine PNC Anreicherung besitzt.

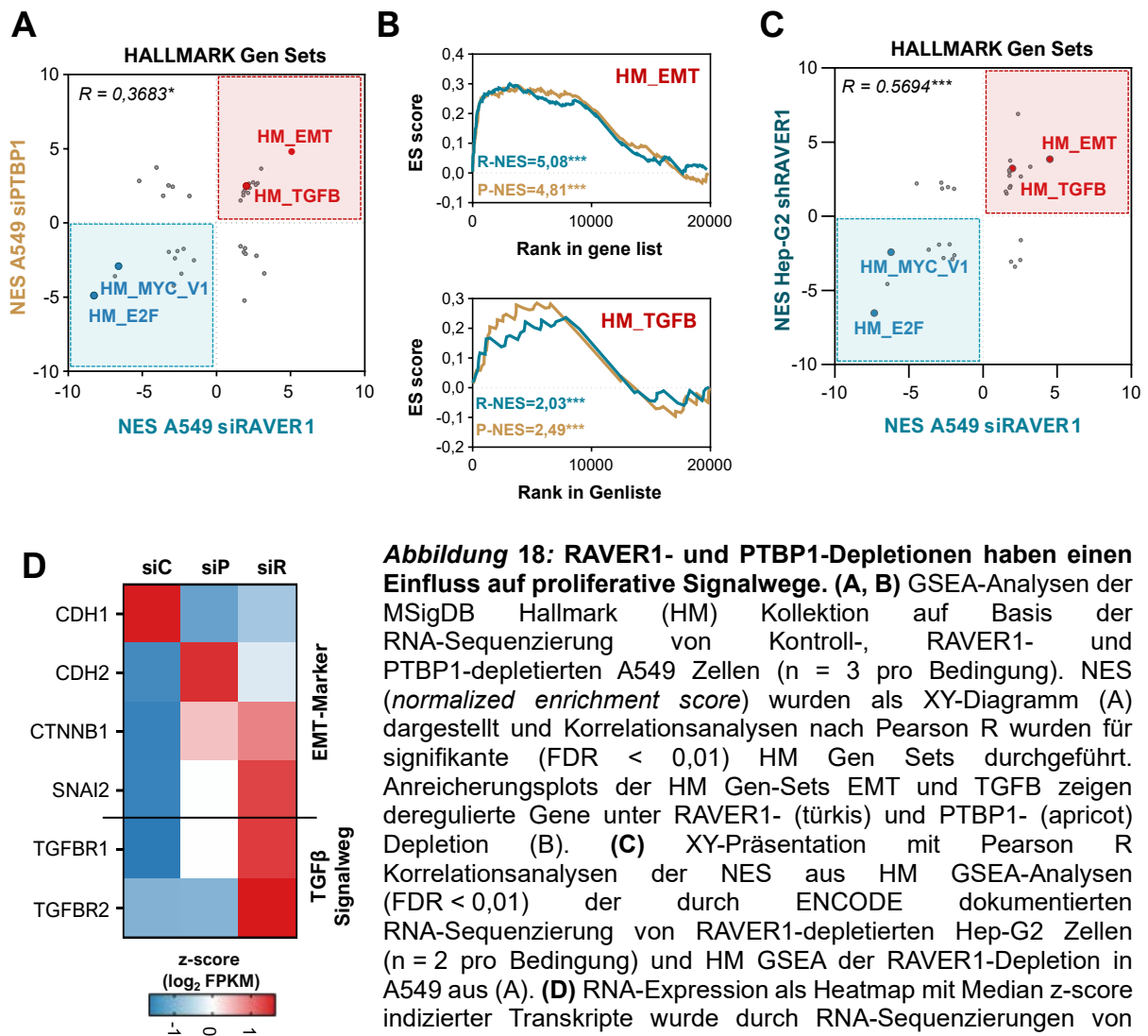
Zur Beantwortung der Fragestellung, ob RAVER1 einen Einfluss auf die PNC-Homöostase besitzt, wurden Immunfärbungen mit anschließender mikroskopischer Analyse gegen den PNC-Marker PTBP1- unter RAVER1-Depletion und Deletion durchgeführt (Abbildung 17E-F). In parentalen A549 Zellen konnten etwa 5 % der analysierten Zellen mit einer Anreicherung von PTBP1 in PNCs festgestellt werden, während im RAVER1-KO Klon 1 (R-KO1) etwa 58 % der Zellen eine Anreicherung aufwiesen (Abbildung 17E). Dahingegen ließ sich bei dem RAVER1-KO Klon 2 (R-KO2) nur etwa 1 % der Zellen mit einer PTBP1 Anreicherung in PNCs beobachten. Die hohe Varianz innerhalb der beiden RAVER1-Deletionen, bei ähnlichem Proliferationseffekt, deuten auf eine hohe klonale Einzelzell-Variabilität hin. So kann vermutet werden, dass Klon 1 eine PNC-positive Zelle und Klon 2 eine PNC-negative Zelle als parentalen Hintergrund besaßen [261]. Die Größe der gemessenen PNCs unterschied sich

hierbei nicht zwischen den RAVER1-deletierten Zellen und den parentalen Zellen. Um die vermutete klonale Variabilität zu umgehen, wurden zusätzlich RAVER1-Depletionen in A549 analysiert (Abbildung 17F). Hierbei konnte kein Unterschied der Häufigkeit einer PTBP1-Anreicherung mit 15 % bzw. 16 % zwischen der Kontrolle (siC) und der RAVER1-Depletion (siR) festgestellt werden. Auch die Größe der PNCs war nicht signifikant verändert. Es ist anzumerken, dass eine PNC Quantifizierung mittels Fiji NuclearParticleDetector2D abhängig von der gewählten Objektiv-Vergrößerung sowie der Auflösung der quantifizierten Bilder ist und dementsprechend Unterschiede in der Gesamtanzahl und Größenunterschiede zwischen den Depletions- und Deletionsstudien zu deuten sind. Ebenfalls wurde eine veränderte Anzahl der PNCs je nach Passage der Zelllinie beobachtet (nicht quantifizierte Beobachtung, Daten nicht gezeigt).

Anhand der Immunfärbungen kann vermutet werden, dass RAVER1 entbehrlich für die PNC Integrität und der PTBP1 Rekrutierung in PNCs ist und gleichzeitig die Regulation der Tumorzellproliferation RAVER1-PNC unabhängig stattfinden kann.

### 3.3. Einfluss von RAVER1 auf proliferative Signalwege

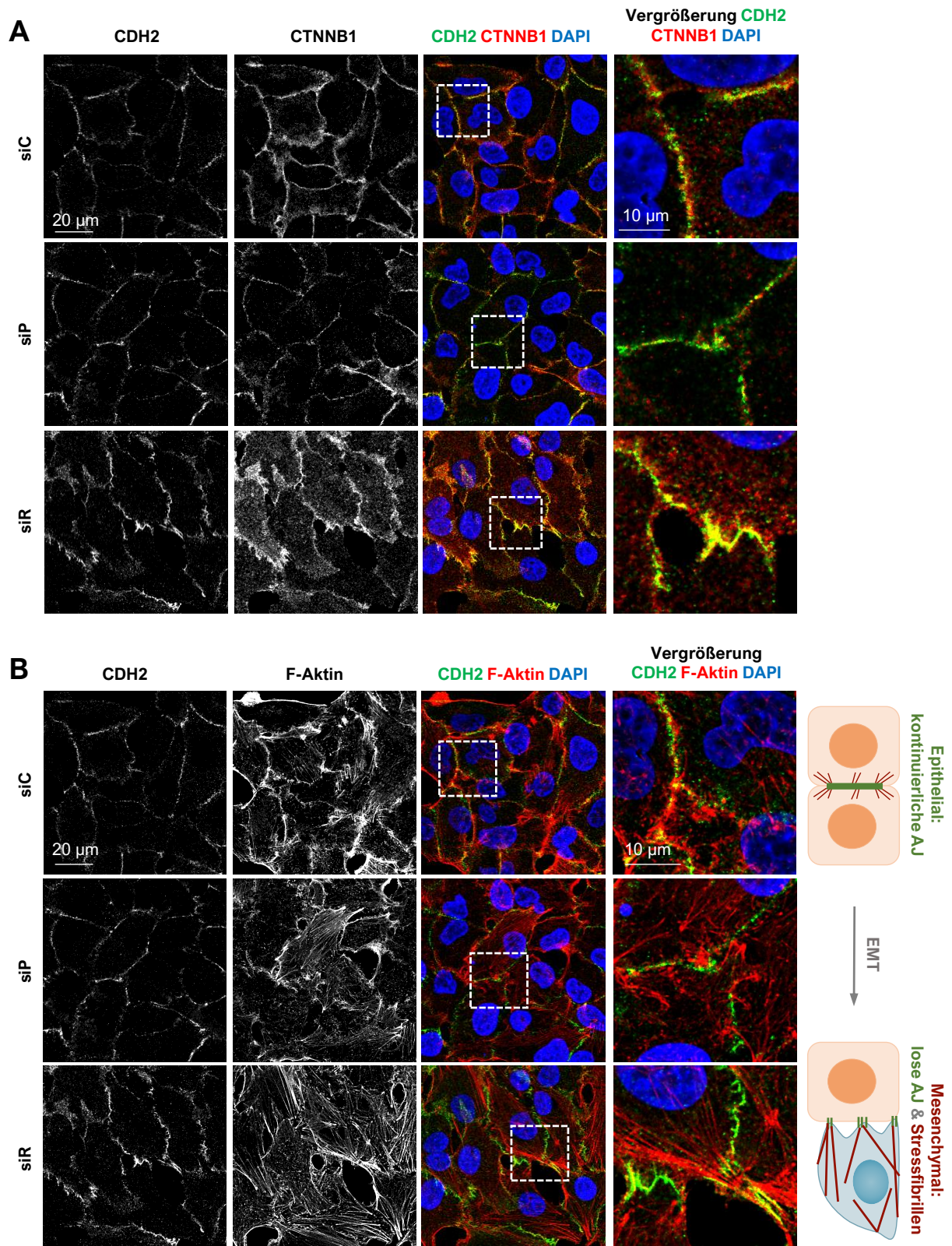
Zur umfassenderen Analyse hinsichtlich einer Auswirkung von RAVER1- oder PTBP1-Depletionen in Bezug auf proliferative Signalwege auf RNA-Ebene wurden RAVER1- und PTBP1-depletierte A549 Zellen einer RNA-Sequenzierung und weiterer Analysen unterzogen. Hierbei kann mittels *Gene Set Enrichment Analyses* (GSEA) unter Verwendung der RNA-Sequenzierungsdaten ein Überblick betroffener Signalwege oder Reaktionswege erstellt werden [248]. Die aus der RNA-Sequenzierung erhaltenden *foldchanges* (FC) wurden hierfür nach Protein-kodierenden Genen selektiert und absteigend ihres  $\log_2FC$  sortiert und für weitere GSEA verwendet. Die GSEA-Analyse der MSigDB Hallmark Gen Sets (HM) beinhaltet dabei definierte biologische Prozesse, wie der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) oder dem *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Signalweg. Für jedes Gen Set wird bei dieser Analyse ein Anreicherungswert (ES; *enrichment score*) gebildet, welche das Ausmaß widerspiegelt, in dem ein Gen-Set mit der geordneten Expressionsliste über- oder unter-repräsentiert ist. Dabei wird der ES berechnet, indem die gereichte Expressionsliste durchlaufen wird und mit den Genen aus dem Gen-Set verglichen wird. Ist ein Gen in beiden Listen vorhanden, so wird die laufende Summenstatistik erhöht, beziehungsweise verringert, wenn es nicht vorhanden ist. Ein positiver ES deutet dabei auf eine Anreicherung des Gen Sets in der gereichten Expressionsliste hin, ein negativer ES auf eine Abreicherung des Gen Sets. Zusätzlich wird eine Normalisierung der Gen-Sets durchgeführt, die die Größe der Gen Sets berücksichtigt, welches durch einen NES (*normalized enrichment score*) ausgedrückt wird.



**Abbildung 18: RAVER1- und PTBP1-Depletionen haben einen Einfluss auf proliferative Signalwege.** (A, B) GSEA-Analysen der MSigDB Hallmark (HM) Kollektion auf Basis der RNA-Sequenzierung von Kontroll-, RAVER1- und PTBP1-depletierten A549 Zellen ( $n = 3$  pro Bedingung). NES (*normalized enrichment score*) wurden als XY-Diagramm (A) dargestellt und Korrelationsanalysen nach Pearson R wurden für signifikante ( $FDR < 0,01$ ) HM Gen Sets durchgeführt. Anreicherungsplots der HM Gen-Sets EMT und TGFB zeigen deregulierte Gene unter RAVER1- (türkis) und PTBP1- (apricot) Depletion (B). (C) XY-Präsentation mit Pearson R Korrelationsanalysen der NES aus HM GSEA-Analysen ( $FDR < 0,01$ ) der durch ENCODE dokumentierten RNA-Sequenzierung von RAVER1-depletierten Hep-G2 Zellen ( $n = 2$  pro Bedingung) und HM GSEA der RAVER1-Depletion in A549 aus (A). (D) RNA-Expression als Heatmap mit Median z-score indizierter Transkripte wurde durch RNA-Sequenzierungen von Kontroll- (siC), RAVER1- (siR) und PTBP1- (siP) depletierter A549 Zellen ( $n = 3$  pro Bedingung) ermittelt. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Sowohl in RAVER1- als auch PTBP1-depletierten A549 Zellen konnte eine verringerte Expression von Signalwegen detektiert werden, die als anti-proliferativ beschrieben werden, wie unter anderem E2F (HM\_E2F) und MYC (HM\_MYC\_V1) (Abbildung 18A, Tabelle 14 im Anhang). Interessanterweise konnte zudem eine Anreicherung der Gen Sets EMT (HM\_EMT) und des TGFβ-Signalwegs (HM\_TGFB) in beiden Depletionen detektiert werden, welches in Abbildung 18B als Anreicherungs-Plots (türkis: RAVER1-, apricot: PTBP1-Depletion) dargestellt wurde. Insgesamt konnte eine signifikante Pearson-Korrelation zwischen den Hallmark Gen Set Analysen ( $FDR < 0,1$ ) unter RAVER1- und PTBP1-Depletion beobachtet werden ( $R = 0,3683$ ;  $p = 0,03$ ; Abbildung 18A). Zur Überprüfung, ob die hier beobachteten Veränderungen der Hallmark Gen Sets Zelllinien- beziehungsweise Tumor-spezifisch sind, wurden zusätzlich RNA-Sequenzierungen RAVER1 depletierter LHC- (*liver hepatocellular carcinoma*) abgeleiteter Hep-G2 Zelllinien der ENCODE-Datenbank [262] mittels GSEA analysiert (Abbildung 18C, Tabelle 14 im Anhang). Dabei konnte eine positive Korrelation

zwischen der RAVER1-Depletion in A549 und der Hep-G2 Zelllinien festgestellt werden (Pearson Korrelation:  $R = 0,5694$ ;  $p < 0,001$ ). Auch hier konnte eine Abreicherung der Gen Sets E2F und MYC beobachtet werden, während unter anderem die Gen-Sets EMT und TGF $\beta$  angereichert unter RAVER1-Depletion in beiden Tumorzelllinien vorlagen (Abbildung 18C). Die beobachteten pro-proliferativen Eigenschaften von RAVER1 (vgl. 3.1.2, Abbildung 11-13) konnten innerhalb der GSEA Analyse durch den Einfluss von RAVER1 auf pro-onkogene und tumorsuppressive Gen Sets weiter bestätigt werden. Jedoch schien die starke Anreicherung der EMT, welche fundamental für eine Transition hinsichtlich einer Malignität ist [131], durch RAVER1-Depletion als Widerspruch zum pro-onkogenen Faktor RAVER1, weshalb eine Induktion der EMT unter Depletion weiter analysiert werden sollte. Die Betrachtung selektierter EMT-Marker zeigte, dass die mesenchymalen Marker CDH2 (N-Cadherin), CTNNB1 ( $\beta$ -Catenin) und SNAI2 (Slug) unter RAVER1- und PTBP1-Depletion in A549 auf RNA-Ebene hochreguliert wurden, während der epitheliale Marker CDH1 (E-Cadherin) reduziert exprimiert wurde (Abbildung 18D). Gleichzeitig wurde nur unter RAVER1-Depletion eine erhöhte Expression der TGF $\beta$ -Rezeptoren TGFBR1 und TGFBR2 detektiert. Eine Immunfluoreszenz Analyse der EMT-Marker CDH2 und CTNNB1 sowie des Zytoskelett-Proteins F-Aktin zeigten epitheliale Kontroll-Zellen mit kontinuierlichen und reifen Zell-Zell-Kontakten, sichtbar durch die starke Abundanz von CTNNB1 und CDH2 innerhalb von Adhäsionsverbindungen (AJ; *adhesion junctions*) an der Zellmembran (Abbildung 19A). Ebenfalls waren vereinzelte Aktin-Fasern um die AJ lokalisiert. Unter PTBP1-Depletion konnte keine Änderung im Signal der Proteine, beziehungsweise der AJ oder der Zellmorphologie beobachtet werden. Dahingegen wurde unter RAVER1-Depletion eine Anreicherung von CDH2 an den Adhäsionskontakten beobachtet, während CTNNB1 eine verstärkte Abundanz im Zytoplasma, aber nicht an den AJ aufwies. Generell wurden hierbei keine durchgängigen Zell-Zell-Kontakte, sondern lose Adhäsionskontakte beobachtet. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass es zu einer Umstrukturierung der F-Aktin Fasern hin zu Stressfasern und somit einer Veränderung der Zellmorphologie kam, welches einem mesenchymalen Zellcharakter entspricht. Dies deutet darauf hin, dass eine RAVER1-Depletion eine EMT fördert, während eine PTBP1-Depletion zwar generell Änderungen in dem EMT Signalweg ausweist, diese aber nicht zu einer morphologischen Änderung beitragen und somit kein starker Einfluss von PTBP1 auf eine EMT nachgewiesen werden konnte. Obwohl eine erhöhte EMT für eine Tumorprogression spricht, wird unter RAVER1-Depletion eine verringerte Zellproliferation und erhöhte Apoptose beobachtet (vgl. 3.1.2, Abbildung 11, 12A). Gleichzeitig wurde eine Anreicherung des TGF $\beta$  Gen-Sets beobachtet, wobei der TGF $\beta$ -Signalweg nicht nur die Induktion einer EMT fördern kann, sondern ebenfalls in Zusammenhang mit einer inhibierten Tumorproliferation und induzierten Apoptose steht und somit als „*TGF $\beta$  Paradox*“ bezeichnet wird [263].

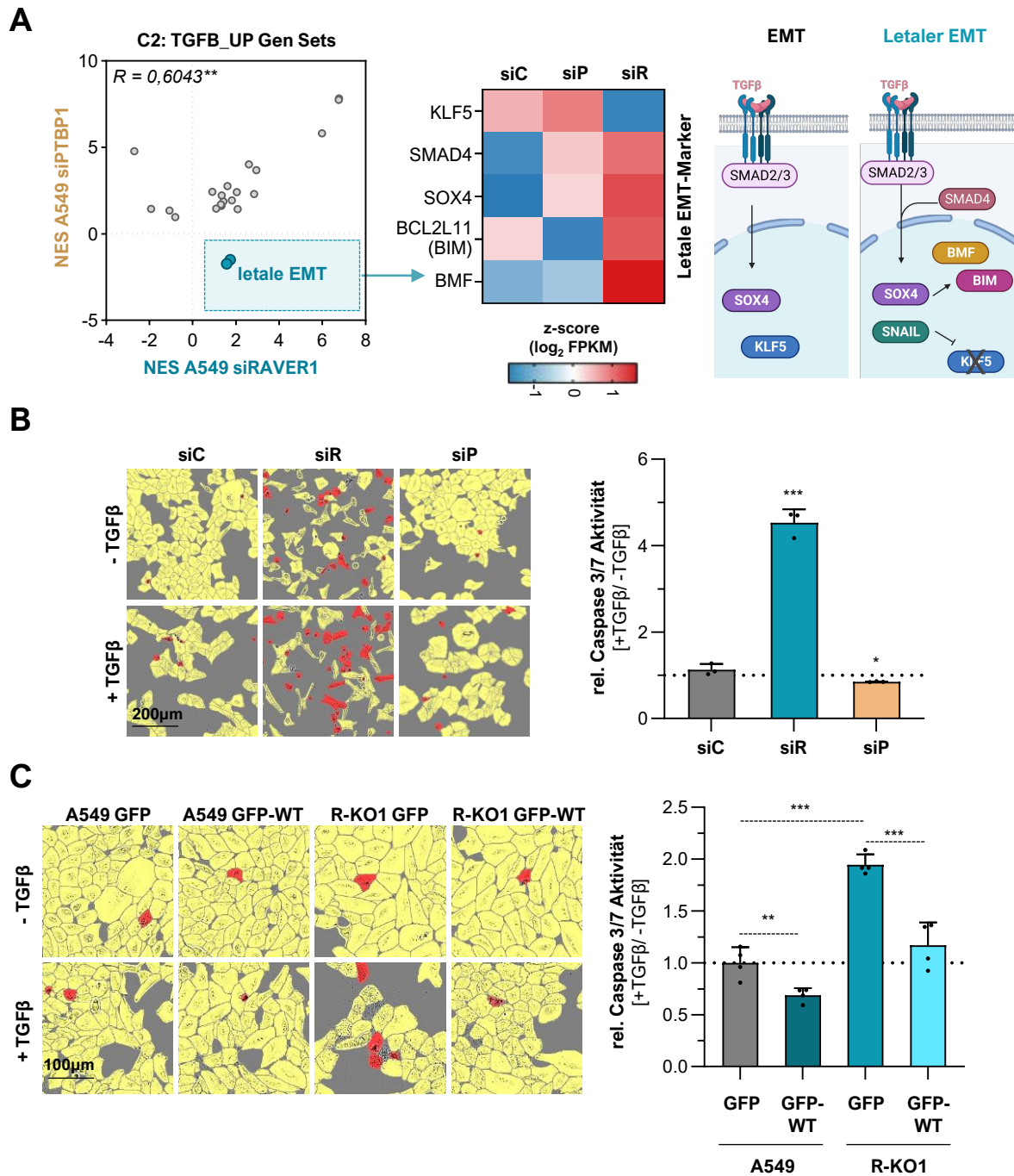


**Abbildung 19: RAVER1-Depletion führt zur Induktion einer EMT. (A, B) Analyse von EMT-Markern in Kontroll- (siC), RAVER1- (siR) und PTBP1-depletierten (siP) A549 Zellen. Durchgeführt wurden Immunfärbungen von CDH2 und CTNNB1 (A) sowie CDH2 und F-Aktin (B) mit anschließender Immunfluoreszenz Aufnahme unter Verwendung eines konfokalen Laser-Mikroskops. Kerne wurden mit DAPI angefärbt. Gestrichelte Boxen markieren den jeweils rechts dargestellten vergrößerten Bereich. Eine schematische Darstellung der EMT mit Änderungen der Zell-Zell-Kontakte und Entstehung von Stressfibrillen ist in (B) dargestellt [131, 264]. Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 20  $\mu\text{m}$ , in der Vergrößerung von 10  $\mu\text{m}$ .**

Ferner kann eine TGF $\beta$  induzierte EMT neben einer Tumorprogression ebenfalls hin zu einer Induktion der Apoptose, auch bekannt als letale EMT, führen, was erneut auf die paradoxe Wirkungsweise des Zytokins deutet [265].

Daher wurde ein Zusammenhang zwischen der Anreicherung des TGF $\beta$  Gen-Sets und einer erhöhten Apoptose unter RAVER1-, nicht aber PTBP1-Depletion vermutet, die in einer Induktion einer letales EMT resultieren könnte. Zur initialen Analyse dieser Hypothese wurden vertiefende GSEA Analysen hinsichtlich der MSigDB C2 Kollektion, im speziellen aller TGF $\beta$ \_UP assoziierten Gen-Sets, welche hochregulierte Gene nach TGF $\beta$ -Stimulation umfasst, durchgeführt (Abbildung 20A, Tabelle 15 im Anhang). Hierbei konnten ähnlich zur *Hallmark* Analyse eine positive Pearson-Korrelation der Anreicherungen beider Depletionen in A549 beobachtet werden ( $R = 0,6043$ ;  $p = 0,003$ ). Nichtsdestotrotz lagen unter RAVER1-Depletion, nicht aber unter PTBP1-Depletion, zwei Gen Sets angereichert vor, die als TGF $\beta$ -induzierte Apoptose beziehungsweise letale EMT beschrieben wurden [266]. Ein ähnliches Bild konnte auch für den -basierten Datensatz der Hep-G2 depletierten Zellen beobachtet werden, bei denen eine nicht-signifikante Anreicherung der beiden letalen EMT Gen-Sets unter RAVER1-Depletion beobachtet werden konnte (Anhang, Tabelle 15). Eine selektive Betrachtung von letalen EMT Markern zeigte hierbei eine Reduktion der KLF5 RNA unter RAVER1-Depletion in A549 Zellen, aber nicht unter PTBP1-Depletion, während die RNAs SMAD4, SOX4, BCL2L11 und BMF vermehrt unter RAVER1-Depletion exprimiert wurden (Abbildung 20A). Unter PTBP1-Depletion wurde kein einheitliches Bild der erhöhten Expression dieser Faktoren detektiert, wie es bei einer letalen EMT SMAD4 exprimierender Zellen zuvor beschreiben wurde [265, 266]. Die RNA-Daten deuten hierbei auf eine TGF $\beta$ -induzierte letale EMT unter RAVER1-Depletion, nicht aber unter PTBP1-Depletion hin. Zur weiteren Analyse, ob die veränderten letalen EMT Marker zu einer Induktion der Apoptose durch TGF $\beta$  auf zellulärer Ebene führen, wurde eine Induktion der EMT mit TGF $\beta$  unter Depletionsbedingungen durchgeführt und anschließend neben konfokaler Mikroskopieanalysen ebenfalls die Caspase 3/7 Aktivität gemessen (Abbildung 20B).

Die mikroskopischen Analysen konnten mittels des *AI (artificial intelligence) Cell Health* Moduls auf lebende (gelb) und tote (rot) Zellen unterschieden werden. Ohne TGF $\beta$ -Induktion konnte bereits beobachtet werden, dass unter RAVER1-Depletion vermehrt tote Zellen detektiert wurden. Zudem war auch hier eine morphologische Veränderung der Zellen zu erkennen. Unter PTBP1-Depletion konnten nicht mehr tote Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Unter TGF $\beta$ -Behandlung der Depletionen wurde ersichtlich, dass die Anzahl der toten Zellen unter RAVER1-Depletion anstieg, unter PTBP1-Depletion jedoch keine Veränderung festzustellen war. Die zusätzliche Quantifizierung mittels Caspase 3/7 Aktivität bestätigte das beobachtete mikroskopische Bild.



**Abbildung 20: Induktion einer letalen EMT durch RAVER1-Depletion.** (A) Analyse von TGFβ-induzierter letaler EMT Marker und RAVER1- und PTBP1-Depletion in A549. XY-Diagramm (links) mit Korrelationsanalysen nach Pearson R zeigen GSEA-Analysen der MSigDB C2 Kollektion gefiltert nach TGFB\_UP Gen Sets. GSEA-Analysen wurden auf Basis der RNA-Sequenzierung von Kontroll-, RAVER1- und PTBP1-depletierten A549 Zellen durchgeführt (n = 3 pro Bedingung). Heatmap (Mitte) zeigt die RNA-Expression von selektiven letalen EMT-Markern entsprechend der RNA-Sequenzierung von Kontroll- (siC), RAVER1- (siR) und PTBP1- (siP) depletierter A549 Zellen (n = 3 pro Bedingung) als Median z-score. Eine schematische Darstellung von TGFβ-induzierter (letaler) EMT ist rechts abgebildet [265, 267]. (B) TGFβ-Induktion in A549 Zellen wurde nach RAVER1 (türkis)- und PTBP1 (apricot)-Depletion für 72 Stunden durchgeführt. Anschließende mikroskopische Aufnahmen (links) unter Verwendung des Incucyte® S3 (Sartorius) wurden mittels des AI (artificial intelligence) Cell Health Moduls analysiert. Repräsentative Bilder zeigen in Gelb lebende Zellen und in Rot apoptotisch/tote Zellen, während grau zellfreien Hintergrund darstellt. Messungen der intrinsischen Apoptose-Aktivität (rechts) wurden mittels CaspaseGlo® durchgeführt.

-Fortführung auf nächster Seite-

Relative (rel.) Caspase 3/7 Aktivität unter TGF $\beta$ -Induktion wurde durch Normalisierung zur Viabilitätsmessung (CellTiterGlo®), zur unbehandelten Kontrolle sowie zur jeweiligen unbehandelten (-TGF $\beta$ ) Probe berechnet. (C) TGF $\beta$ -Induktion und anschließender Bestimmung der rel. Caspase 3/7 Aktivität von Über-Expression in parentalen bzw. Re-Expression von GFP-RAVER1 (GFP-WT) in RAV1-deletierten (R-KO1) A549 Zellen wurden entsprechend (B) durchgeführt. Schwarze Punkte innerhalb der Balkendiagramme stellen drei unabhängige Experimente dar. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt (B, C). \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Unter Kontrollbedingungen konnte keine erhöhte Apoptose durch TGF $\beta$  detektiert werden, unter PTBP1-Depletion sogar ein leichter Rückgang der Caspase 3/7 Aktivität. Unter Depletion von RAV1 konnte jedoch ein über vierfacher Anstieg der relativen Caspase 3/7 Aktivität durch TGF $\beta$  im Vergleich zur behandelten Kontrolle festgestellt werden, was auf einen letalen EMT unter TGF $\beta$ -Behandlung deuten lässt. Zusätzlich konnte ein Rückgang der relativen Caspase-3/7 Aktivität unter GFP-RAVER1 Überexpression in A549 durch TGF $\beta$ -Behandlung beobachtet werden (Abbildung 20C). Eine Deletion von RAV1 (R-KO1) führte, ähnlich wie eine Depletion, zu einem Anstieg der relativen Caspase-3/7 Aktivität unter TGF $\beta$ , welche durch Re-Expression von GFP-RAVER1 nahezu wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 20C).

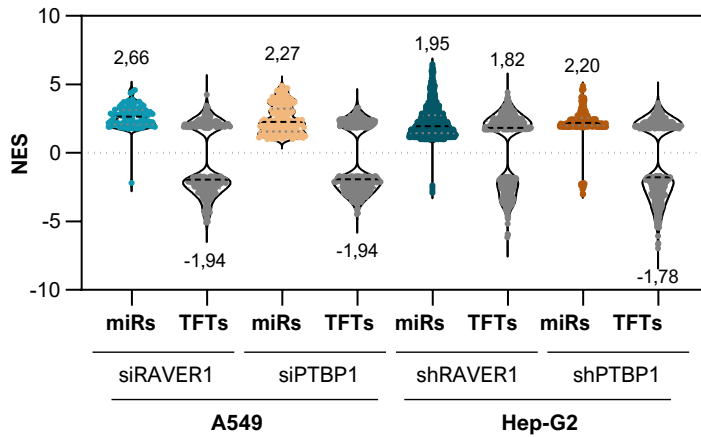
Anhand von RNA-Sequenzierungsdaten konnte gezeigt werden, dass RAV1 und PTBP1 einen Einfluss auf die Signalwege wie TGF $\beta$  und EMT besitzen, jedoch nur eine RAV1-Depletion auch zu einer morphologischen Änderung hinsichtlich einer EMT führt. Dies resultierte unter TGF $\beta$ -Behandlung zu einer Induktion der Apoptose, vermutlich eine letale EMT, und folglich einer verringerten Proliferation.

### 3.4. Einfluss von RAV1 auf die posttranskriptionelle Regulation

Aus den vorherigen Analysen ging hervor, dass RAV1 und PTBP1 den TGF $\beta$ -Signalweg beeinflussen, wenn auch mit unterschiedlichen Auswirkungen. Wie genau eine Beeinflussung stattfinden konnte, sollte durch GSEA Analysen der MSigDB C3 Kollektion, im Spezielleren Gen Sets mit gemeinsamen Transkriptionsfaktor-(TFT) oder microRNA- (miR) Motiven genauer untersucht werden (Abbildung 21). Hierfür wurden die während dieser Arbeit generierten RNA-Sequenzierungsdaten der A549 depletierten Zellen sowie der ENCODE-bezogenen Daten der Hep-G2 depletierten Zellen analysiert. Für die miR-Motiv Gen Sets der A549 Depletionen wurde zusätzlich auf A549-exprimierende microRNAs (CPM > 10) selektiert, wobei publizierte microRNA-Sequenzierungsdaten der Arbeitsgruppe verwendet wurden (siehe Müller, Wedler *et al.* (2020) [268]). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine starke Anreicherung der miR-Motiv Gen Sets unter RAV1- und PTBP1-Depletion mit einem Median NES von 2,66 beziehungsweise 2,27 (A549) stattfand, wobei es in nahezu keinem Gen Set zu einer Abreicherung kam (Abbildung 21A). Im Kontrast hierzu waren die TFT-Motiv Gen Sets in beiden Bedingungen sowohl an- als auch abgereichert, wobei der medianen NES mit je -1,94 auf eine generellen Abreicherung dieser Motive hindeutete.



**A**

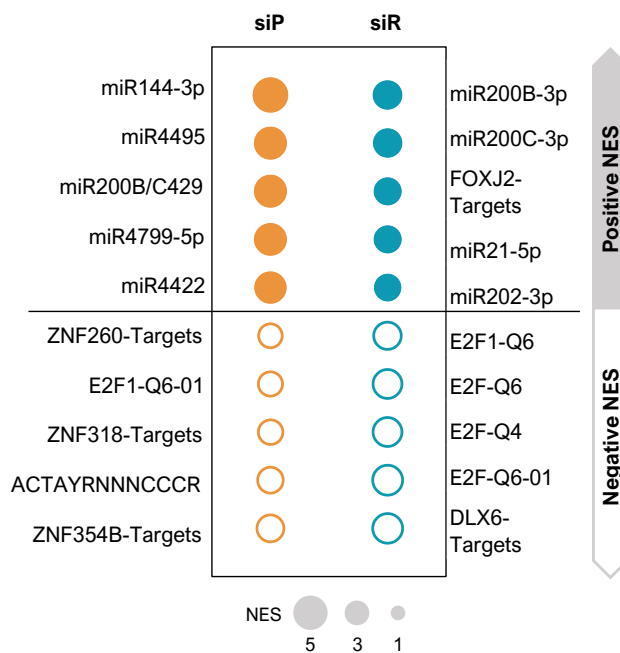


**Abbildung 21: RAVER1 und PTBP1 haben einen Einfluss auf die posttranskriptionelle Regulation. (A)**

Violin-Plot zeigt die signifikanten (FDR < 0,05) NES von GSEA-Analysen der MSigDB miR (farblich) und TFT (grau) C3 Kollektionen auf Basis der RNA-Sequenzierung von RAVER1- und PBTP1-Depletionen in A549 und Hep-G2 (ENCODE). Indiziert sind die jeweiligen NES-Mediane. (B)

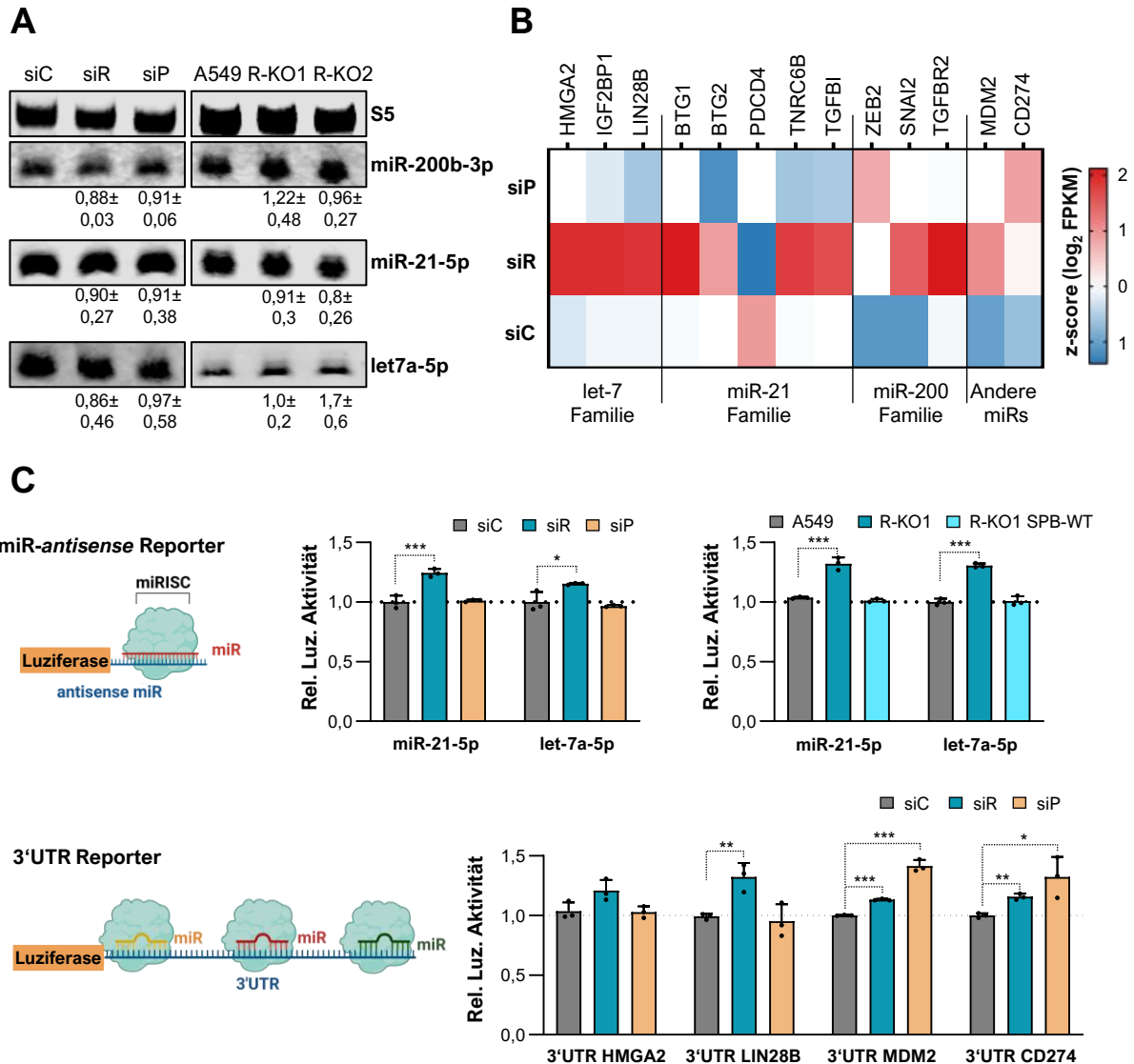
Top fünf NES der gesamten C3 Kollektion (entsprechend A) der RAVER1 (türkis)- bzw. PTBP1 (apricot)-Depletion in A549 wurden als Blasendiagramm dargestellt. Die Größe der Blasen kennzeichnet die Höhe der NES, wobei gefüllte Blasen positive NES und ungefüllte Blasen negative NES anzeigen.

**B**



In Hep-G2 Zellen wurde ebenfalls eine Anreicherung der miR-Motive unter beiden Depletionen beobachtet, mit einem medianen NES von 1,95 (RAVER1) und 2,2 (PTBP1). Währenddessen zeigten die TFT-Motiv Gen Sets ähnlich zu den A549 Daten sowohl an- als auch abgereicherte Gen Sets auf, wobei unter RAVER1-Depletion der mediane NES bei 1,82 und unter PTBP1-Depletion bei -1,76 lag. Obwohl beide RAVER1- und PTBP1-Depletionen ein ähnliches Bild in beiden Zelllinien hinsichtlich der miR- und der TFT-Motive zeigten, wurden jedoch unterschiedliche Motive besonders stark an- beziehungsweise abgereichert detektiert (Abbildung 21B). Die jeweils fünf am stärksten abgereicherten Gen Sets in A549 Zellen unterschieden sich hinsichtlich der TFT Motive. Besonders unter RAVER1-Depletionen wurden fast ausschließlich Motive der E2F Familie festgestellt. Diese Motive wurden auch in den Hep-G2 Depletionen beobachtet, wenn auch nicht unter den Top 5 der abgereicherten Motive (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die These einer funktionellen Rolle von RAVER1 im Zellzyklus, vor allem in der G1/S Transition, wie es bereits in Zellzyklus-Analysen

beobachtet wurde (vgl. 3.1.2). Ebenfalls gab es Unterschiede in den fünf stärksten angereicherten Gen Sets in den A549 RAVER1- und PTBP1-Depletionen. So waren vor allem miR-144, miR-4495, miR-4799 und miR-4422 Motive unter PTBP1-Depletion in A549 angereichert, während unter RAVER1-Depletion in A549 FOXJ2-Targets, miR-21 und miR-202 Motive angereicht vorlagen. Unter RAVER1-Depletionen konnte zudem eine starke Anreicherung von Motiven der miR-200 Familie (miR-200b, miR-200c) festgestellt werden, die teilweise auch unter PTBP1-Depletion und ebenfalls in dem Hep-G2 Datensatz stark angereichert vorlagen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise wurde der miR-200 Familie bereits eine Rolle in der TGF $\beta$  induzierten EMT nachgewiesen [103, 134]. Dies legt nahe, dass RAVER1 den TGF $\beta$ -Signalweg mit resultierender EMT, respektive letaler EMT, durch eine stärkere Beeinflussung der miR/RISC Aktivität reguliert als PTBP1. Daher wurde vermutet, dass vor allem RAVER1 die miR Biogenese, den *turnover* oder die miR/RISC Aktivität beeinflusst. Northern Blot Analysen wurden verwendet, um eine mögliche Änderung im Expressionsmuster von microRNAs zu detektieren (Abbildung 22A). Dabei wurde Hybridisierungs sonden gegen die microRNAs miR-200b-3p, miR-21-5p und der microRNA let-7a-5p verwendet. Unter RAVER1- und PTBP1-Depletion in A549 Zellen sowie eines RAVER1-*Knockouts* in A549 kam es zu keiner essenziellen Veränderung dieser microRNAs. Nichtsdestotrotz wurden mRNA Zieltranskripte der let-7, der miR-21-, der miR-200 und weiterer miR-Familien unter RAVER1-Depletion in A549 erhöht exprimiert (Abbildung 22B). Hierzu zählen unter anderem die let-7 Ziele HMGA2 und LIN28B [78], das miR-21 Ziel BTG2 [268], das miR-200 Ziel TGFBR2 [134] und andere allgemein starke miR Ziele wie MDM2 oder CD274 [269, 270]. Jedoch waren nicht alle miR Zieltranskripte generell erhöht, wie im Falle des miR-21-5p Zieltranskriptes PDCD4 [268] zu erkennen war. Unter PTBP1-Depletion wurde jedoch kein genereller Trend einer erhöhten miR-abhängigen Ziel-mRNA Expression beobachtet. Hierbei wurde festgestellt, dass ein Teil der let-7 und miR-21 Zieltranskripte verringert exprimiert wurden, während *targets* der miR-200 und weiterer miRs, wie CD274 unter Depletion erhöht exprimiert detektiert wurden. Es ist anzunehmen, dass eine microRNA-abhängige Deregulation der RNAs nicht aufgrund veränderter microRNA Mengen vermittelt wurde, sondern vermutlich die Aktivität des miR/RISC Komplexes durch eine Depletion von RAVER1 oder PTBP1 unterschiedlich beeinflusst wurden. Um eine weiterführende Aussage bezüglich der miR/RISC Aktivität treffen zu können, wurden Luziferase Reporter-Analysen durchgeführt, um gegebenenfalls sekundäre Transkriptionseffekte ausschließen zu können. Dabei wurden Minimalreporter verwendet, die eine perfekt komplementäre Sequenz zur miR-21-5p beziehungsweise let-7a-5p oder 3'UTR Reporter aufweisen, welche den 3'UTR mit den darin enthaltenen microRNA Bindestellen enthielten (Abbildung 22C).



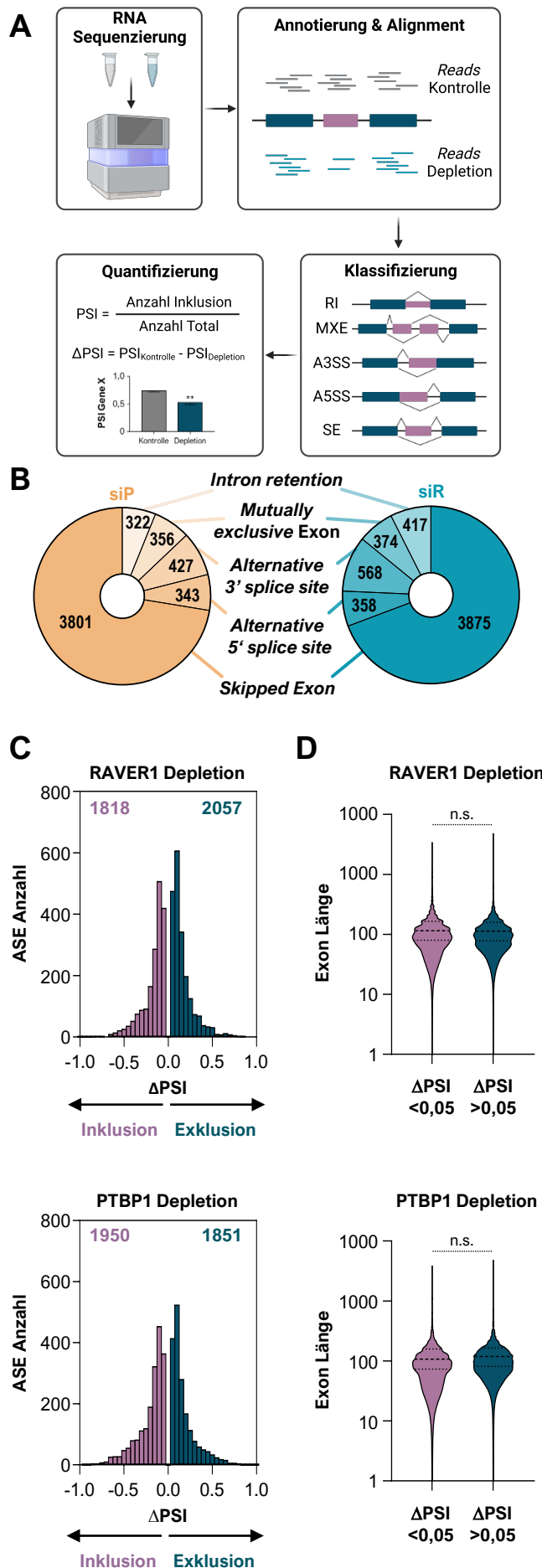
**Abbildung 22: RAVER1 beeinflusst die miR/RISC Aktivität.** (A) Northern Blot Analysen wurden verwendet zur Bestimmung der miR Abundanz unter Kontroll- (siC), RAVER1- (siR) und PTBP1- (siP) Depletion in A549 (links) bzw. in parentalen A549 und RAVER1-deletierten (R-KO) Zellen. S5 diente der internen Kontrolle. RNA-Abundanz von 3 unabhängigen Experimenten wurde zur S5 RNA und zu siC bzw. A549 normalisiert und mit Standardabweichung angegeben. (B) Expression induzierter RNAs wurde als Heatmap entsprechend RNA-Sequenzierung von Kontroll-, RAVER1- und PTBP1-depletierter A549 Zellen ( $n = 3$  pro Bedingung) als Median z-score dargestellt. Eine Regulation durch diverse miR-Familien sind entsprechend gekennzeichnet. (C) Luziferase Reporter wurden zur Analyse der miR/RISC Aktivität mit der Unterstützung von Dr. Nadine Bley durchgeführt. Schematische Darstellung (links) der verwendeten miR-antisense und 3'UTR Luziferase-Reporter. Die verwendeten miR-antisense Reporter weisen einen 21 Nukleotid-langen Bereich perfekt komplementär zur analysierten miR downstream der Firefly-Luziferase kodierenden Region auf. 3'UTR-Reporter kodieren einen 3'UTR mit endogenen miR Bindestellen der untersuchten Transkripte downstream zum Luziferase-kodierenden Gen. Neben einer Firefly-Luziferase (FFL) kodierten die Plasmide zur internen Normalisierung eine Renilla-Luziferase (RL). Als Hintergrundkontrolle diente zusätzlich die Transfektion eines Leerplasmides ohne miR-Bindestellen. Relative Luziferase-Aktivitäten (rechts) der siC- (grau), siR- (türkis) und siP- (apricot) transfizierten A549 bzw. der parentalen A549 (grau), R-KO1 (türkis) und der Re-Expression mit SBP-FLAG-RAVER1 (SBP-WT, helltürkis) wurden durch Normalisierung zur internen RL-Aktivität, zum Leerplasmid sowie zu siC bzw. A549 berechnet. Schwarze Punkte zeigen rel. Aktivität aus drei unabhängigen Experimenten und Fehlerbalken induzieren Standardabweichung. Statistische Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test ermittelt. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Minimalreporter-Analysen unter RAVER1-Depletion in A549 Zellen zeigten einen signifikanten, aber moderaten Anstieg der relativen Luziferase-Aktivität. Unter PTBP1-Depletion wurde hingegen keine Veränderung der Minimalreporter Aktivitäten beobachtet. Zusätzliche Minimalreporter-Analysen unter RAVER1 *knockout* in A549 ließen ebenfalls einen moderaten Anstieg der relativen Luziferase-Aktivität beobachten, die durch Re-Expression dem Niveau der parentalen Population entsprach (Abbildung 22C). Des Weiteren wiesen 3'UTR Reporter-Analysen der miR-Zieltranskripte HMGA2, LIN28B, MDM2 und CD274 unter RAVER1-Depletion einen leichten Anstieg der relativen Luziferase-Aktivität auf, wenn auch nicht immer unterhalb des Signifikanz-Niveaus von  $p < 0,05$ . Unter PTBP1 wurde hingegen nur für die 3'UTR-Reporter von MDM2 und CD274 ein Anstieg der Luziferase-Aktivität beobachtet.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass die Depletion von RAVER1 zu einer breiten Reduzierung der microRNA-abhängige Inhibition von mRNAs, 3'UTR-Reportern und minimalen microRNA-abhängigen Reportern führte. Dies legt nahe, dass RAVER1 und moderat auch PTBP1 die Aktivität der miR/RISC-vermittelten Regulation fördert.

### 3.5. Analyse des alternativen Spleißens durch RAVER1 und PTBP1

PTBP1 ist ein mehrfach charakterisierter Regulator des alternativen Spleißens [167, 203]. Unter anderem reguliert PTBP1 das alternative Spleißen von  $\alpha$ -Actinin und PKM1/2 [72, 179]. Eine ko-regulatorische Funktion wurde RAVER1 im Falle von TPM1 nachgewiesen, bei der PTBP1 und RAVER1 die Exklusion des Exons 3 in Muskelzellen fördern [180]. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit sollte nun eine potenzielle Rolle im alternativen Spleißen von RAVER1, insbesondere im Hinblick auf seine pro-onkogenen Funktion und Ko-Regulation mit PTBP1 analysiert werden. Aufgrund der bereits beschriebenen Modulation der miR/RISC-Aktivität (vgl. 3.4) durch RAVER1 und abgeschwächt durch PTBP1 wurde vermutet, dass diese Regulation durch RAVER1/PTBP1-abhängige Spleiß-Ereignisse vermittelt wird. Unter Verwendung von RNA-Sequenzierungsdaten aus RAVER1- und PTBP1-Depletionsstudien in A549 Zellen sowie ENCODE-basierten Daten aus Hep-G2 Zellen wurden Spleiß-Ereignisse mittels rMATS identifiziert, wie in der schematischen Abbildung 23A gezeigt. Bei dieser Analyse werden RNA-Sequenzierungsdaten mit einer Transkript-Annotation abgeglichen und dabei Spleiß-Verbindungen (*splice junctions*) detektiert [240]. Im Anschluss folgt eine Klassifizierung der beobachteten Spleiß-Verbindungen. Zu den fünf in dieser Analyse verwendeten Klassifizierungen des alternativen Spleißens zählen das Beibehalten von Introns (*Intron retention*, RI), gegenseitig ausschließende Exons (*mutually exclusive exon*, MXE), alternative 3' bzw. 5' Spleißstellen (A3SS/A5SS) und dem Exkludieren von Exonen (*skipped exon*, SE).



**Abbildung 23: Analyse des RAVER1- und PTBP1-vermittelten alternativen Spleißens mittels rMATS. (A, B)** Für die quantitative Untersuchung alternativ gespleißter Transkripte unter RAVER1- (siR) und PTBP1- (siP) Depletion in A549 wurden rMATS Analysen freundlicherweise von Dr. Markus Glaß durchgeführt. Eine schematische Darstellung (A) zeigt den Ablauf der Analyse auf Basis der durchgeführten RNA-Sequenzierungen mit einer durchschnittlichen Tiefe von 2x28 Millionen reads pro Probe. Eine Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich zwischen Kontroll- und Depletions-Population aus drei unabhängigen Experimenten. Das Tortendiagramm (B) zeigt die Anzahl signifikant gespleißter Proteinkodierender Transkripte (FDR < 0,05; |ΔPSI| > 0,05) je nach Klassifizierung des Spleiß-Ereignisses unter RAVER1- (türkis) und PTBP1-Depletion (apricot) Depletion. (C, D) Histogramm (C) zeigt die Verteilung der Anzahl an alternativ gespleißten Transkripten unter RAVER1- (oben) bzw. PTBP1-Depletion (unten), welche einem SE-Ereignis entsprechend (B) zugeordnet wurden. Anzahl der vermehrt Inkludierten (lila) bzw. Exkludierten (petrol) Exone sind innerhalb der Histogramme angegeben. Eine Verteilung der in-/exkludierten Exon Längen (D) sind als Violin Plot dargestellt. Statistische Signifikanzen (D) wurden mittels Student's t-Test analysiert.

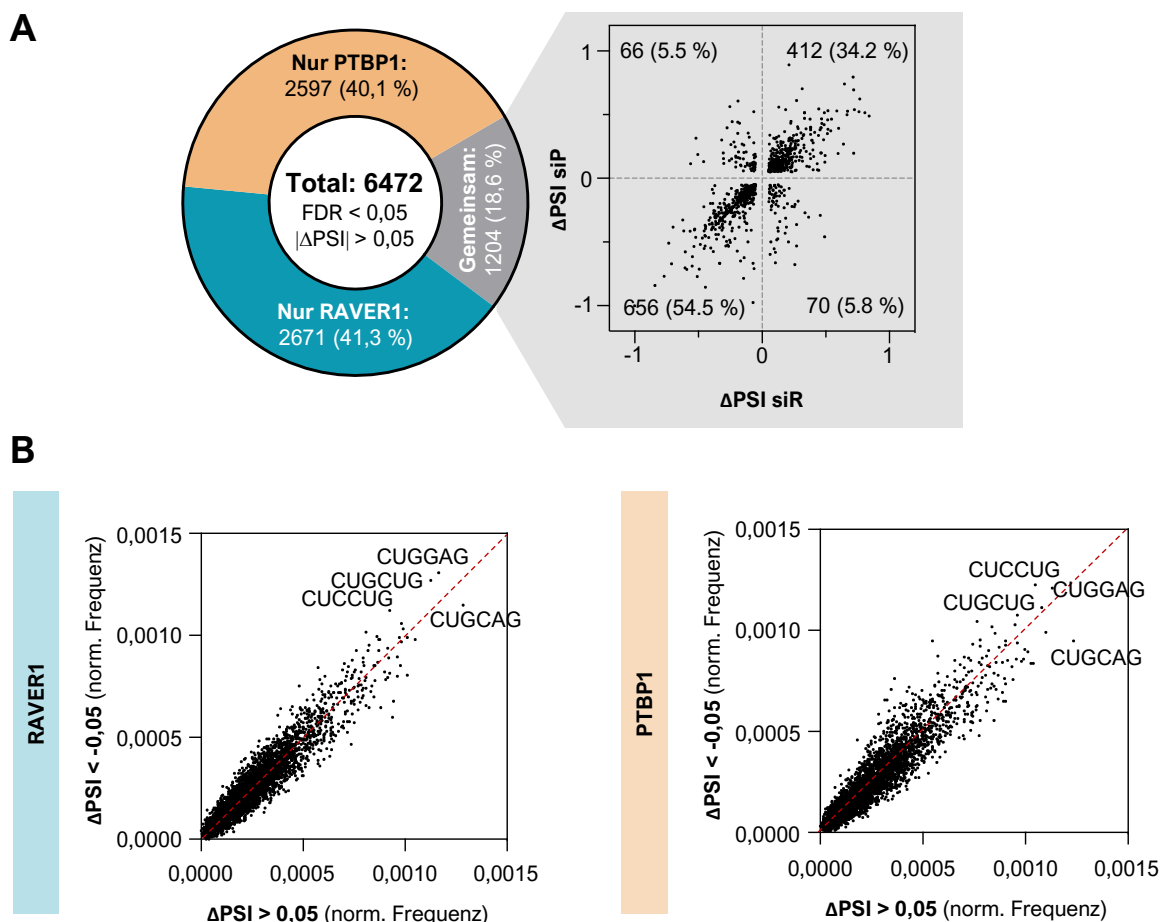
ASE: Anzahl skipped exons;  
 A3SS/A5SS: alternative 3'/5' Spleißstelle;  
 MXE: mutually exclusive exon; RI: intron retention; SE: skipped exon.

Neben der berechneten Wahrscheinlichkeit für eine spezifische Isoform wird ebenfalls ein *IncLevel* Wert berechnet, welcher in dieser Arbeit auch als *Percent Spliced-In* (PSI) Wert bezeichnet wird. Dieser drückt den Anteil der Transkript-Isoform mit Inklusion, respektive Exklusion eines spezifischen Exons in Relation zu allen Kontext-Isoformen unter den exprimierten Transkripten eines Gens aus. In den vorliegenden Analysen wurde die Differenz (anteilige Veränderung des Spleiß-Ereignisses) von Kontroll- zur *knockdown*-Population berechnet, wobei der  $\Delta$ PSI Wert angibt, ob unter Depletion ein bestimmtes Exon inkludiert ( $\Delta$ PSI < 0) oder exkludiert ( $\Delta$ PSI > 0) vorliegt. Depletionsstudien von RAVER1 bzw. PTBP1 in A549 zeigen, dass insgesamt 5592 (RAVER1) bzw. 5249 (PTBP1) signifikante (FDR < 0,05) Spleiß-Ereignisse in Protein-kodierenden Genen ( $|\Delta$ PSI| > 0,05) vorlagen (Abbildung 23B). Der Großteil dieser Spleiß-Vorgänge (> 3800 Ereignisse) waren dabei sowohl unter RAVER1- als auch PTBP1-Depletion exkludierte, respektive inkludierte Exon Spleiß-Ereignisse. Dabei konnte kein erheblicher Unterschied hinsichtlich eines angereicherten Einfügens oder eines Überspringens des Exons in beiden Depletionen festgestellt werden, aufgrund der nahezu gleichverteilten Spleiß-Ereignisse (Abbildung 23C). Auch die Verteilung der Exon-Längen bei inkludierten oder exkludierten SE Ereignissen unter RAVER1- oder PTBP1-Depletion deuteten in beiden Depletionen auf keine bevorzugte Länge des jeweilig gespleißten Exons hin (Abbildung 23D). Eine ähnliche Verteilung der Spleiß-Ereignisse konnte auch in den Hep-G2 Depletionen beobachtet werden. Von insgesamt 4004 (RAVER1) bzw. 3771 (PTBP1) signifikanten Spleiß-Ereignissen wurde auch hier der überwiegende Teil (~ 65 %) im Bereich der in-/exkludierten SE Ereignisse beobachtet (siehe Anhang Tabelle 16). Ebenfalls konnte keine bevorzugt gespleißte Exon-Länge sowie eine Gleichverteilung von Inklusionen und Exklusionen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Hieraus kann geschlossen werden, dass RAVER1 und PTBP1 hauptsächlich in dem In- respektive Exkludieren von Exonen eine Rolle spielen. Sie zeigen hingegen keine Präferenz bezüglich In-/Exkludieren noch hinsichtlich der Exonlänge.

Ein Vergleich der signifikanten Protein-kodierenden SE Ereignisse unter RAVER1- und PTBP1-Depletion in A549 zeigte, dass 41,3 % der Ereignisse nur unter RAVER1-Depletion detektiert wurde, 40,1 % nur unter PTBP1-Depletion und nur 18,8 % der Ereignisse sowohl in der Depletion von RAVER1 als auch PTBP1 beobachtet wurden (Abbildung 24A). Vergleicht man die gemeinsamen Ereignisse hinsichtlich In- respektive Exklusion nach RAVER1- bzw. PTBP1-Depletion, so wurde eine hohe Assoziation (Pearson-Korrelation: R = 0,72; p < 0,001; gemeinsame Ereignisse ~ 89 %) festgestellt, wobei der Großteil dieser gemeinsamen Ereignisse Inklusionen (54,4 %) waren und nur 34,2 % überlappende Exklusionen darstellte. Analysiert man die ENCODE-basierten Hep-G2 Daten, so wurden nur 9,5 % der signifikanten Protein-kodierenden SE Ereignisse unter RAVER1- und PTBP1-Depletion in Hep-G2 gleichförmig gespleißt (siehe Anhang, Tabelle 17). Hierbei wurde trotzdem eine positive

Pearson-Korrelation ( $R = 0,3$ ;  $p < 0,001$ ) beobachtet, wobei der größte Anteil mit 45,6 % der gemeinsamen Ereignisse ebenfalls der Inklusion unterlag und nur 25,3 % dem gemeinsamen Exkludieren eines Exons entsprach (Tabelle 18, Anhang). Obwohl der Anteil gemeinsamer gespleißter Transkripte durch RAVER1 und PTBP1 mit unter 20 % geringer ausfiel, als vermutet, deuten die Daten aus zwei unterschiedlichen Zelllinien auf eine hohe Synergie beider Proteine.

Ferner wurden Hexamer-Frequenz-Analysen der in- und exkludierten Exonen unter RAVER1- und PTBP1-Depletion in A549 durchgeführt (Abbildung 24B). Bei dieser Analyse werden statistische Hexamere, welche häufiger als zufällig vorkommen, analysiert. Hierbei konnten sowohl unter RAVER1- als auch PTBP1-Depletion vor allem CU-reiche Motive identifiziert werden, welches für PTBP1 bereits beschrieben war [176, 177, 271].



**Abbildung 24: RAVER1 und PTBP1 sind Ko-Regulatoren. (A)** Vergleich der signifikanten Protein-kodierenden *skipped exon* (SE) Ereignisse in RAVER1- und PTBP1- depletierter A549 Zellen entsprechend der rMATS Analyse aus Abbildung 23. Als Tortendiagramm (links) sind prozentuelle Anteile der RAVER1- (türkis), PTBP1- (apricot) spezifischen bzw. der gemeinsamen (grau) Ereignisse dargestellt. XY-Diagramm (rechts) gibt  $\Delta$ PSI Korrelation der gemeinsamen SE-Ereignisse unter RAVER1- (siR) und PTBP1- (siP) Depletion an. Induziert wurde die jeweilige Anzahl der Ereignisse innerhalb der Quadranten. **(B)** Normalisierte Hexamer Frequenz der SE-Ereignisse ( $FDR < 0,05$ ;  $|\Delta$ PSI|  $> 0,05$ ) in XY-Präsentation unter RAVER1-(links) und PTBP1-Depletion in A549 (rechts). Die Berechnung der Hexamer Frequenzen wurden von Dr. Markus Glaß und Laura Schian durchgeführt.

Interessanterweise konnten ebenfalls Motive bekannter RBPs, wie die der Spleißregulator Familie SRSF, innerhalb der alternativ gespleißten Exone unter RAVER1-, aber auch PTBP1-Depletion in A549 sowie Hep-G2 detektiert werden (siehe Anhang, Tabelle 19-22).

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass RAVER1 und PTBP1 hauptsächlich das alternative Spleißen durch Inklusion oder Exklusion von Exons regulieren. Obwohl RAVER1 und PTBP1 größtenteils unabhängig voneinander agierten, wurde eine ko-regulatorische Funktion innerhalb gemeinsam gespleißter Transkripte beobachtet.

### 3.6. Assoziation von RAVER1 mit weiteren Proteinen

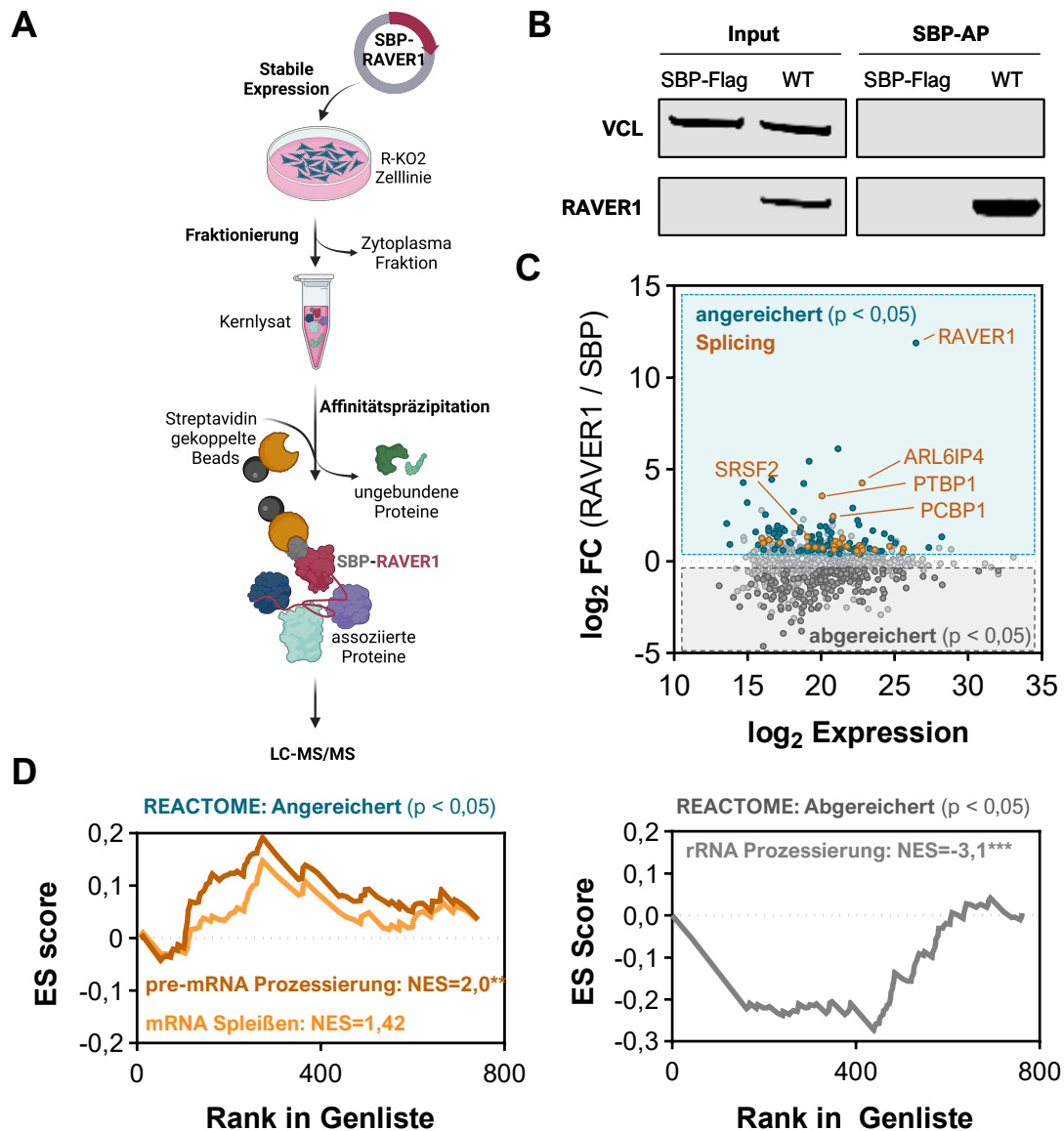
Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass RAVER1 im alternativen Spleißen überwiegend PTBP1-unabhängig agiert. Gleichzeitig lassen Motive innerhalb gespleißter Exone Bindemotive weiterer Spleißfaktoren vermuten, dass RAVER1 nicht nur mit PTBP1 assoziiert, sondern mit weiteren Faktoren interagiert und seine Funktion innerhalb des alternativen Spleißens vermittelt. Initiale Analysen des Webtools BioGRID lassen ebenfalls darauf schließen, dass RAVER1 nicht nur mit PTBP1 interagiert, sondern auch mit verschiedenen RBPs (siehe Tabelle 13, eine vollständige Tabelle ist in *supplementary table TS11* in Wedler *et al.* (2023) zu finden [272]).

**Tabelle 13: RAVER1 interagiert mit RNA-bindenden Proteinen.** Selektive Protein-Interaktionsdaten von RAVER1 wurden entsprechend des Webtools BioGRID ([www.thebiogrid.org](http://www.thebiogrid.org); Stand 01.07.2023) entnommen. Eine vollständige Liste aller Interaktionspartner ist Wedler *et al.* (2023) zu entnehmen [272].

<b>Interaktor A</b>	<b>Organismus Interaktor A</b>	<b>Interaktor B</b>	<b>Organismus Interaktor B</b>
Ptbp1	Mus musculus	RAVER1	Homo sapiens
CELF1 (CUGBP)	Homo sapiens	RAVER1	Homo sapiens
ELAVL1	Homo sapiens	RAVER1	Homo sapiens
FUS	Homo sapiens	RAVER1	Homo sapiens
MEX3B	Homo sapiens	RAVER1	Homo sapiens
TIA1	Homo sapiens	RAVER1	Homo sapiens
TNRC6C	Homo sapiens	RAVER1	Homo sapiens
XPO1	Homo sapiens	RAVER1	Homo sapiens

Dies wurde experimentell in RAVER1-deletierten A549 Zellen mittels stabiler SBP-FLAG-RAVER1 Re-Expression untersucht. Als Kontrolle diente die stabile Expression von SBP-FLAG. Hierfür wurden SBP-Affinitätspräzipitation (AP) der Kernfraktionen durchgeführt und anschließend mittels LC-MS/MS durch Dr. Christian Ihling (AG Andrea Sinz) analysiert (Abbildung 25A-C). Eine initiale Kernfraktion wurde gewählt, um ausschließlich kernspezifische Assoziationen mit RAVER1 zu analysieren und Assoziationen mit zytoplasmatischen Proteinen aufgrund der Versuchsbedingungen auszuschließen.





**Abbildung 25: RAVER1 interagiert mit PTBP1 und anderen Spleißfaktoren. (A-C)** LC-MS/MS Analysen von SBP-RAVER1 Affinitätspräzipitation. Der experimentelle Ablauf ist in (A) schematisch dargestellt. Die Affinitätspräzipitation (AP) wurden von Kernfraktionen der SBP-FLAG bzw. SBP-FLAG-RAVER1 Re-Expression in RAVER1-deletierten (R-KO2) A549 Zellen durchgeführt und mittels Western Blot analysiert (B). VCL (Vinculin) diente als interne Ladekontrolle. LC-MS/MS Analysen wurden durch Dr. Christian Ihling (AG Sinz) durchgeführt. MA-Diagramm der  $\log_2 FC$  (M, Y-Achse) und der durchschnittlichen  $\log_2$  Expression (A, X-Achse) zeigen die Anreicherung der detektierten Peptide aus Kontroll- (SBP) und RAVER1-AP. Eine farbliche Markierung erfolgte für signifikant ( $p < 0,05$ ) angereicherte (türkis) bzw. abgereicherte Proteine (grau) sowie Spleißregulatoren (orange). Eine vollständige Liste aller angereicherten Proteine sind in Wedler *et al.* (2023), *supplementary table* TS12 zu finden [272]. **(D)** C2 Reactom GSEA Analysen der signifikant an- (links) und abgereicherten (rechts) Proteine aus (C) wurden als Anreicherungsplot dargestellt. Gen Sets und resultierende NES sind induziert. \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Die Proben wurden nach einem modifizierten FASP (*filter-aided sample preparation*) Protokoll nach Wisniewski *et al.* (2009) vorbereitet [235]. Peptide wurden via LFQ (*label-free quantification*) quantifiziert und einer quantilen Normalisierung unterzogen, um eine Anreicherung durch RAVER1 zu identifizieren. Es konnten dabei 118 signifikant ( $p < 0,05$ ) mit RAVER1 angereicherte Proteine festgestellt werden. Zur Identifikation von RAVER1-assozierten Spleißfaktoren wurde eine Vergleichsanalyse mit Genen der MSigDB

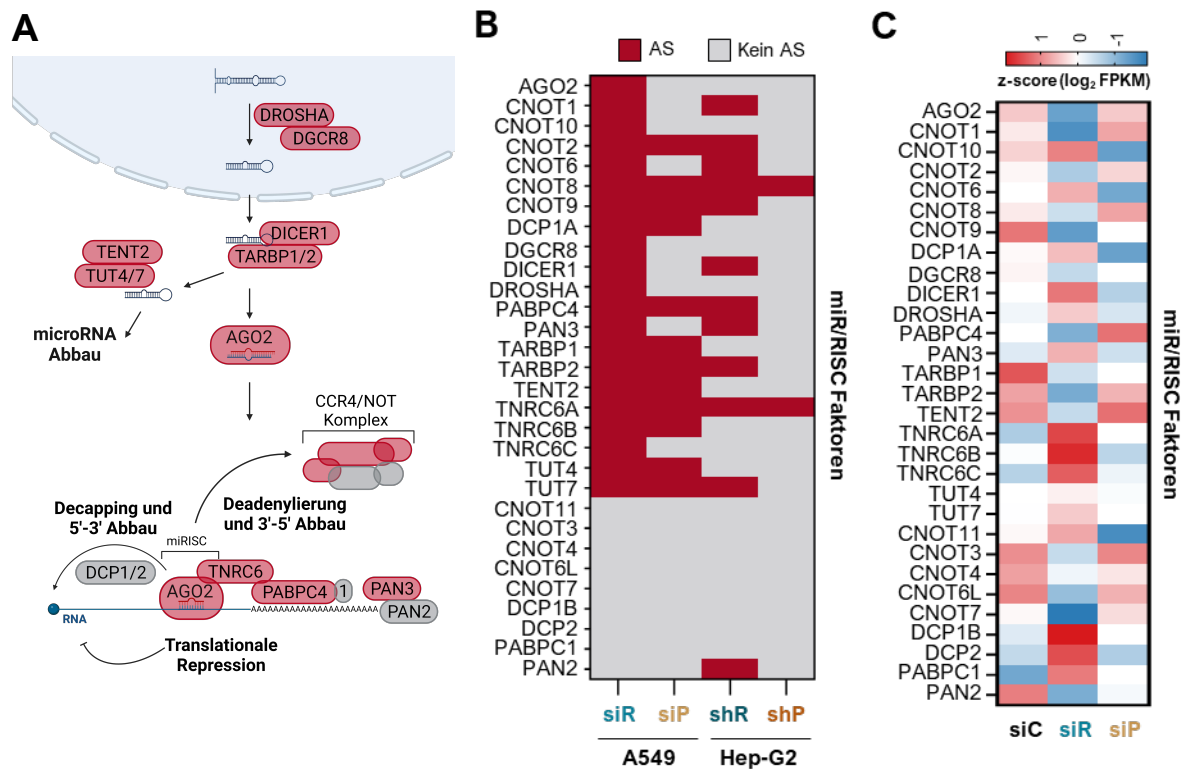
C2-Reactome Kollektion (REACTOME\_MRNA\_SPLICING; REACTOME\_PROCESSING\_OF\_CAPPED\_INTRON\_CONTAINING\_PRE\_MRNA) sowie mit Proteinen, die in der Datenbank *The Human Protein Atlas* ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org); Stand 25.09.2023) einer Funktion im Spleißen zugeordnet wurden, durchgeführt. Hierbei konnten neben der bereits bekannten Assoziation mit PTBP1, 43 weitere Spleißfaktoren, wie SRSF2 und PCBP1 (*Poly(RC) binding protein 1*) beobachtet werden (Abbildung 25C). GSEA Analysen der MSigDB C2-Reactome Kollektion der RAVER1 assoziierten Proteine zeigten zudem eine generelle Anreicherung innerhalb der pre-mRNA Prozessierung (NES = 2,0; FDR = 0,066) und des mRNA Spleißens (NES = 1,42; FDR = 0,392), während Proteine der rRNA Prozessierung (NES = -3,11; FDR < 0,001), wie zum Beispiel DDX21 (DEXD-Box Helikase 21), eher innerhalb der SBP-FLAG Kontrolle angereichert wurden (Abbildung 25D).

Aufgrund der Spleiß-Analysen wurde ein PTBP1-unabhängiges RAVER1-vermitteltes alternatives Spleißen vermutet, welches durch eine Assoziation mit anderen Spleißfaktoren weiter bekräftigt werden konnte.

### 3.7. Einfluss von RAVER1 und PTBP1 auf den miR/RISC Signalweg

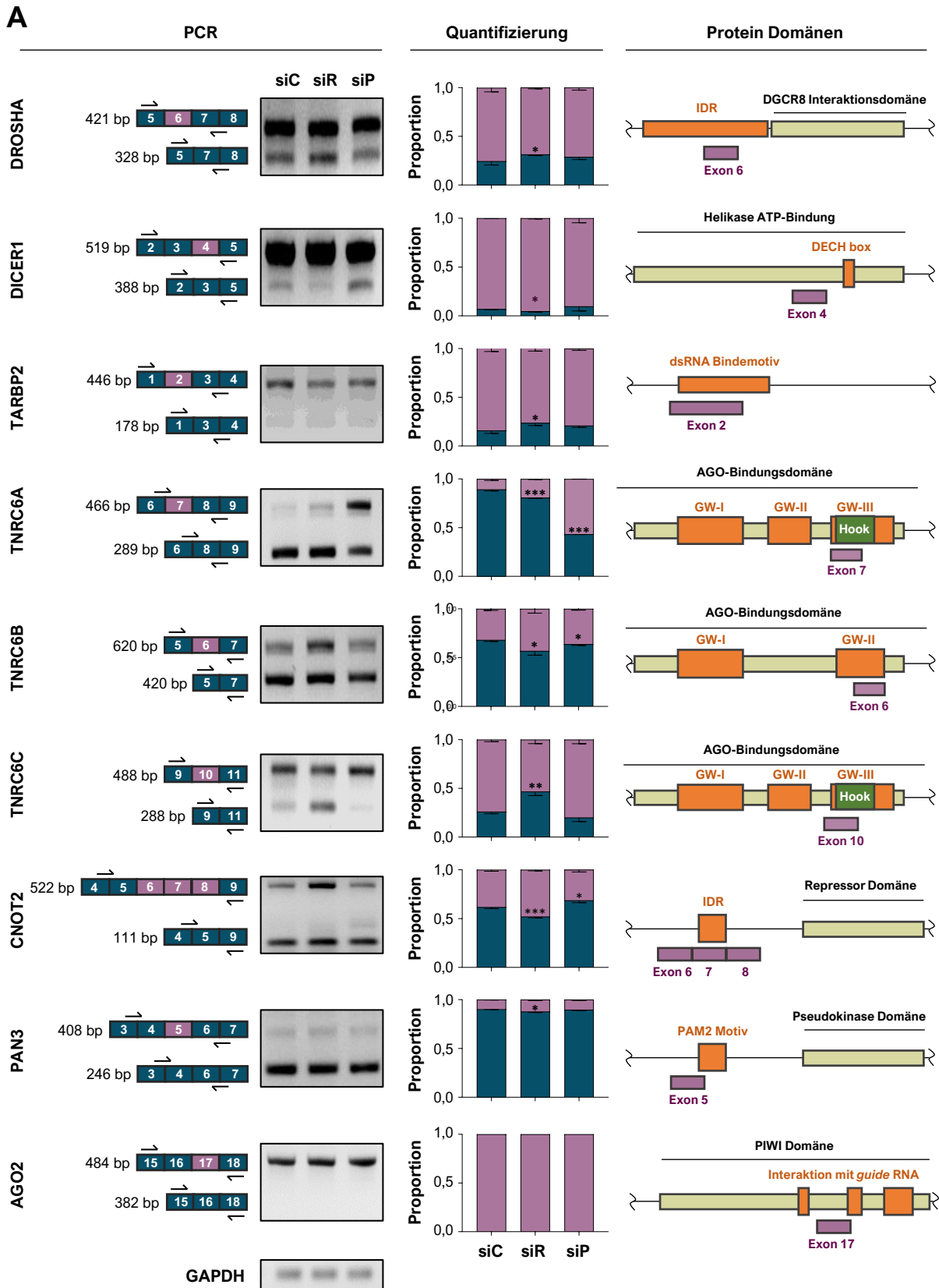
Aufgrund der stark angereicherten miR-Motiv enthaltenden Gen Sets unter RAVER1- und PTBP1-Depletion mit gleichzeitig unveränderter microRNA Expression (vgl. 3.4) sowie der hohen Anzahl an alternativ gespleißter RNAs (vgl. 3.5) wurde vermutet, dass beide Faktoren einen potenziellen Einfluss auf das Spleißen des miR/RISC Signalweges besitzen, wenn auch mit Unterschieden in den phänotypischen Auswirkungen.

Um diese Hypothese weitergehend zu untersuchen wurden 30 Faktoren, die Kernfaktoren in der miR-Biogenese, der miR/RISC-Aktivität oder des Abbaus von microRNAs darstellen (Abbildung 26A), hinsichtlich veränderter Spleiß-Ereignisse nach RAVER1- respektive PTBP1-Depletion analysiert. Es wurden signifikante Protein-kodierende in- bzw. exkludierte SE-Ereignisse der rMATS Analyse aus Kapitel 3.5 betrachtet (Abbildung 26B). RAVER1-depletierte A549 Zellen zeigten in 21 von 30 Faktoren SE-Ereignisse, wobei mittels hypergeometrischen Tests eine etwa 3,3-fache Anreicherung ( $p < 0,001$ ) der SE-Ereignissen beobachtet wurde. Eine Depletion von PTBP1 in A549 deutete lediglich auf 12 dieser Faktoren hin, welches laut hypergeometrischen Tests mit einer nur etwa 2-fachen Anreicherung ( $p < 0,001$ ) weniger stark ausgeprägt als die RAVER1-Depletion war. ENCODE bereitgestellte und analysierte Daten der Hep-G2 Depletionen konnten 12 (RAVER1) bzw. 2 (PTBP1) der 30 Faktoren als alternativ gespleißt beobachtet werden. Gleichzeitig konnte sowohl eine erhöhte als auch verringerte Abundanz dieser 30 mRNAs unter RAVER1- oder PTBP1 Depletion in A549 detektiert werden, wobei keine einheitliche Veränderung durch beide Faktoren festgestellt wurde (Abbildung 26C). Unter anderem wurde eine erhöhte RNA Abundanz der TNRC6 Familie und eine verringerte AGO2 Expression unter RAVER1-, nicht aber unter PTBP1-Depletion beobachtet.



**Abbildung 26: RAVER1 ist ein Regulator des alternativen Spleißens innerhalb des miR/RISC-Signalweges. (A, B)** Analyse alternativer Spleiß-Ereignisse von 30 Kernfaktoren der miR-Biogenese, miR/RISC-Aktivität und miR-Abbau unter RAVER1- (siR/shR) und PTBP1-Depletion (siP/shP) in A549 und Hep-G2. Schematische Darstellung (A) zeigt den Signalweg von miR-Prozessierung bis hin zur posttranskriptionellen Regulation. In Rot gekennzeichnet sind alternative Spleiß-Ereignisse, in Grau keine detektierten Ereignisse in RAVER1-depletierten A549. Heatmap (B) kennzeichnet ebenfalls in Rot signifikante ( $p < 0,05$ ) alternative Spleiß (AS) Ereignisse der Kategorie *skipped exons* (SE), Grau kein signifikantes AS innerhalb der brachteten Kondition. **(C)** RNA-Expression der 30 miR/RISC Kernfaktoren wurden als Heatmap entsprechend RNA-Sequenzierung von Kontroll- (siC), RAVER1- (siR) und PTBP1- (siP) depletierter A549 ( $n = 3$  pro Bedingung) als Median z-score dargestellt.

Zur weiteren Validierung dieser *in silico* Spleiß-Befunde wurden ergänzend semi-quantitative PCR-Analysen ausgewählter Transkripte unter RAVER1- und PTBP1-Depletion in A549 Zellen durchgeführt (Abbildung 26A). Hierfür wurden Gen-spezifische Oligonukleotide *up-* und *downstream* des putativ gespleißten Exons innerhalb einer PCR verwendet. Eine Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte durch densitometrische Bestimmung des Verhältnisses zwischen dem Exon-inkludierten und dem -exkludierten PCR-Produkt.

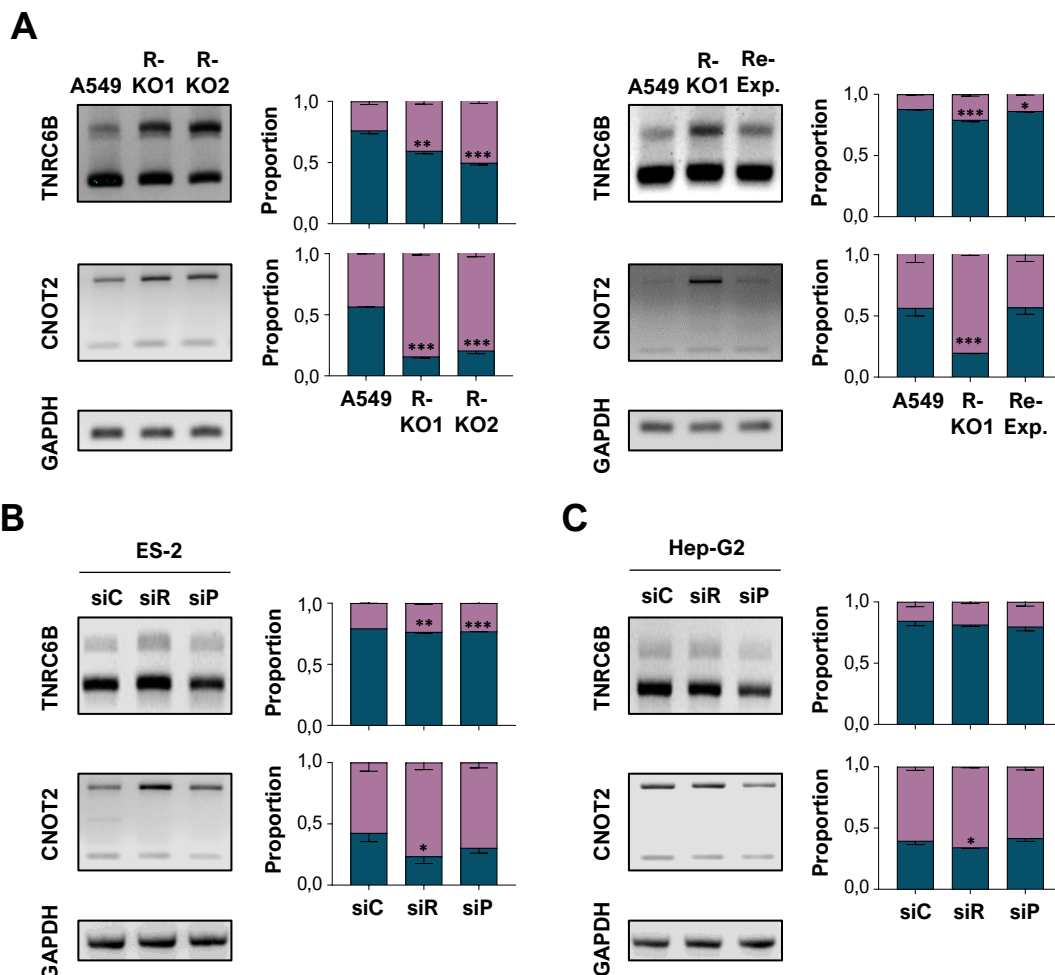


**Abbildung 27: RAVER1 reguliert miR/RISC Faktoren durch Exklusion von Exons in A549. (A)** Analyse des RAVER1- und PTBP1-vermittelten Spleißens von 9 miR/RISC Faktoren. Semi-quantitative PCR von Kontroll- (siC), RAVER1- (siR) und PTBP1- (siP) depletierten A549 wurde zur Validierung der rMATS Analysen verwendet. Schematische Darstellung (links) des putativ gespleißten Bereiches kennzeichnen Gen-spezifische Oligonukleotide, welche zur PCR-Analyse des putativ gespleißten Exone verwendet wurden.

-Fortsetzung auf nächster Seite-

Agarosegele wurden densitometrisch quantifiziert, indem das Verhältnis (Proportion) zwischen Exon-inkludierten (lila) und -exkludierten (petrol) PCR-Produkten bestimmt wurde. Zusätzlich erfolgte eine Normalisierung zur Ladekontrolle GAPDH. Aus je drei unabhängigen Experimenten ist die Standardabweichung dargestellt. Analyse einer statistischen Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test durchgeführt. Durch das alternative Spleißen betroffene Proteinregionen (rechts) wurden mithilfe der *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI; [www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)) annotierten Protein Domänen schematisch visualisiert. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Entsprechend der rMATS Analysen konnte auch hier ein Exkludieren der betreffenden Exone in RAVER1-depletierten A549 im Falle der RNAs DROSHA, TARBP2 und TNRC6C beziehungsweise eine Exon-Inklusion in DICER1, TNRC6A, TNRC6B, CNOT2 und PAN3 beobachtet werden. Eine Inklusion der betreffenden Exone von TNRC6A und TNRC6B und einem Exkludieren von CNOT2 wurde entsprechend der rMATS Analyse unter PTBP1-Depletion beobachtet. Das putative Spleiß-Ereignis von AGO2 konnte nicht in der semi-quantitativen PCR nachgewiesen werden, sodass eine ~ 90 %ige Validierungsrate der rMATS Analyse festgestellt wurde.



**Abbildung 28: RAVER1 reguliert miR/RISC Faktoren durch Exklusion von Exons. (A-C)** Semi-quantitative PCR-Analyse der gespleißten Exons von TNRC6B und CNOT2 entsprechend Abbildung 27A. Es wurden parentale A549, zwei Klone einer RAVER1-Deletion (R-KO) sowie einer Re-Expression (Re-Exp.) von SBP-FLAG-RAVER1 in RAVER1-Deletionsklon 1 analysiert (A). Ebenfalls wurden Kontroll- (siC), RAVER1- (siR) und PTBP1 (siP)-Depletionen in ES-2 Zellen (B) und Hep-G2 Zellen (C) analysiert. GAPDH diente der Ladungskontrolle. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Exemplarisch für die Gene TNRC6B und CNOT2 wurden zusätzlich RAVER1-Deletionen in A549 und Re-Expression mit SBP-FLAG-RAVER1 hinsichtlich des alternativen Spleißens analysiert. Auch hier konnte eine Inklusion der betreffenden Exone unter Deletion detektiert werden (Abbildung 28A, links). Eine Re-Expression von RAVER1 im R-KO1 zeigt zudem ein vermehrtes Exkludieren der Exone, die einer Wiederherstellung des parentalen Zustandes im Falle von TNRC6B nahe kommt und im Fall von CNOT2 sogar der parentalen Population quantitativ entspricht (Abbildung 28A, rechts). Des Weiteren wurden RAVER1- und PTBP1-Depletionen in ES-2 und Hep-G2 Zellen hinsichtlich eines alternativen Spleißens von TNRC6B und CNOT2 analysiert (Abbildung 28B, C). In ES-2 Zellen führte die Depletion von RAVER1 zu einer Exon-Inklusion in TNRC6B und CNOT2 und unter PTBP1-Depletion ebenfalls zu einer Inklusion des Exon 6 von TNRC6B (Abbildung 28B). In Hep-G2 Zellen konnte ebenfalls die Exon-Inklusion in CNOT2 unter RAVER1-Depletion beobachtet werden, jedoch kein verändertes Spleiß-Muster von TNRC6B (Abbildung 28C). Dies deutet auf ein konserviertes RAVER1-vermitteltes alternatives Spleißen im Fall von CNOT2 hin, wohingegen TNRC6B Zelllinien-spezifisch gespleißt wird.

Mittels *in silico* und semi-quantitativen Analysen konnte gezeigt werden, dass RAVER1, weniger aber PTBP1, einen Einfluss auf Kernfaktoren der miR-abhängigen posttranskriptionellen Regulation besitzt. Dabei wurden einzelne Spleiß-Ereignisse Zelllinien-übergreifend detektiert und zusätzlich eine Wiederherstellung von Spleiß-Ereignissen durch Re-Expression beobachtet. Die in großen Teilen wiederhergestellten Proliferationseffekte durch Re-Expression (siehe 3.1.2, Abbildung 14) könnten hier mutmaßlich auf RAVER1-spezifische Spleiß-Ereignisse innerhalb der miR/RISC Aktivität hindeuten, durch welche eine Proliferation gefördert wird.

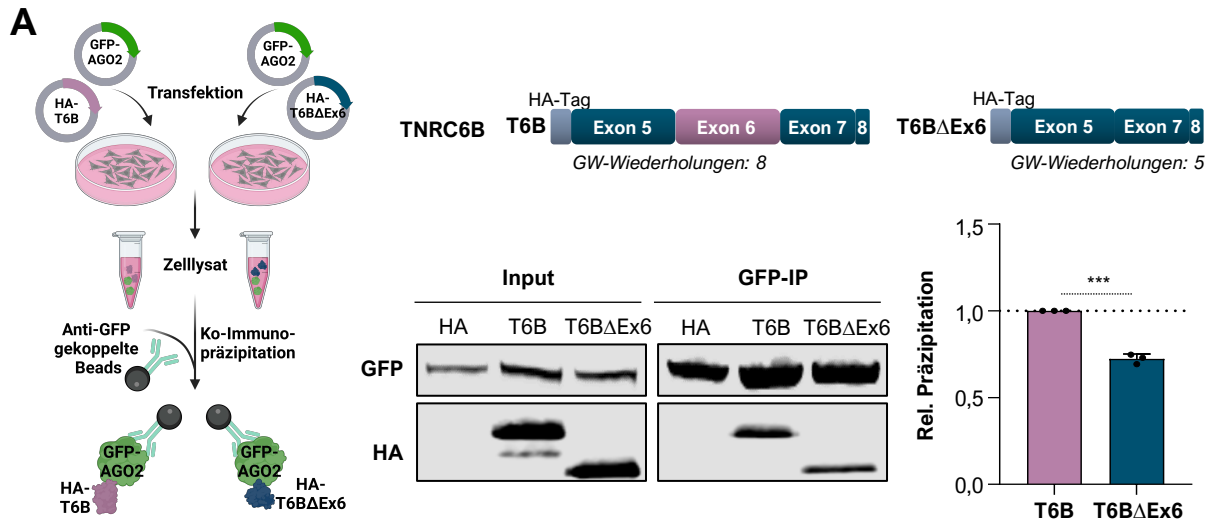
Ein Spleißen innerhalb einer pre-mRNA führt zu unterschiedlichen mRNA-Transkripten, was folglich zu verschiedenen Protein-Isoformen führt, wodurch eine höhere Protein Diversität erreicht wird. Dabei können unterschiedliche Isoformen verschiedene Funktionen des Proteins vermitteln, unter anderem durch Protein-Protein-Interaktionen. Yang *et al.* (2016) konnte interessanterweise zeigen, dass die meisten Protein-Isoformen weniger als 50 % ihrer Protein-Protein-Interaktionen teilen und sogar nur 21 % dasselbe Interaktionsprofil aufweisen [273]. Es wurde angenommen, dass ein RAVER1-vermitteltes alternatives Spleißen der miR/RISC Faktoren ebenfalls zu Änderungen innerhalb der Protein-Isoformen führt und es folglich zu Änderungen in dessen Funktionalität kommt, zum Beispiel durch eine modulierte Protein-Protein-Interaktion.

Wie in Abbildung 27A (rechts) dargestellt, liegen alternativ gespleißten Exone innerhalb unterschiedlicher Protein-Domänen oder Bereiche, die zum Teil eine bereits beschriebene Funktion des Proteins betreffen. Im Falle der Proteinfamilie TNRC6 werden Bereiche innerhalb

der AGO-Bindungsdomäne, im spezielleren Glycin-Tryptophan (GW)-reiche Sequenzen, unter RAVER1- und teilweise auch PTBP1-Depletion alternativ gespleißt. Dabei spielen GW-reiche Sequenzen eine essenzielle Rolle in der Proteinfamilie, welche aus drei Paralogen besteht: TNRC6A, auch bekannt als GW182, TNRC6B und TNRC6C. Alle drei Paraloge besitzen eine N-terminale Region (AGO-Bindungsdomäne), die durch GW- oder WG-Wiederholungen gekennzeichnet sind und durch die eine Interaktion mit einen oder mehreren AGO-Proteinen vermittelt wird [274]. Es wurde folglich vermutet, dass ein RAVER1- oder PTBP1-mediertes alternatives Spleißen der TNRC6-Familie zu einer veränderten Protein-Isoform mit einer modulierten AGO2 Bindung führt. Dabei wurde generell beobachtet, dass ein RAVER1-vermitteltes Spleißen von TNRC6A und TNRC6B zu einer Exklusion von Exonen mit GW-reichen Sequenzen führte und im Falle von TNRC6C ein Exon ohne GW-Wiederholungen bevorzugt inkludiert wurde. So hat TNRC6A fünf GW-Wiederholungen weniger, TNRC6B drei GW-Wiederholungen weniger, während TNRC6C 50 Aminosäuren durch die Inklusion mehr besitzt, aber die GW-Wiederholungen auf die Gesamtheit der Aminosäuren sinkt. RAVER1 mediiert somit die Reduktion der GW-Anreicherung pro Aminosäure, wodurch eine verringerte AGO2-Interaktion vermutet wird. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde ein Proteinkodierender Bereich von TNRC6B mit (T6B) und ohne Exon 6 (T6BΔEx6) mit GFP-AGO2 ko-transfiziert und anschließend mittels GFP-Immunopräzipitation (IP) und Western Blot analysiert (Abbildung 29A). Es wurde eine signifikant verringerte Anreicherung des Exon 6-deletierten Fragments festgestellt. Somit konnte zum einen gezeigt werden, dass eine erhöhte GW-Wiederholung eine vermehrte AGO2-Assoziation mit sich führt. Zum anderen unterstützt dies ebenfalls die Hypothese, dass RAVER1-vermitteltes alternative Spleißen zu veränderten TNRC6 Protein-Isoformen mit modulierten TNRC6-AGO-Interaktion führt, welches durch Yang *et al.* (2016) bereits postuliert wurde [273].

Die durchgeführten Studien deuten darauf hin, dass RAVER1, verglichen zu PTBP1, einen größeren Einfluss auf das alternative Spleißen von Faktoren innerhalb der miR-Biogenese, miR/RISC-Aktivität und des miR-Abbaus besitzt. Die beobachteten Veränderungen der miR-vermittelten Aktivität könnten ein Resultat aus modulierten Protein-Protein-Interaktionen aufgrund unterschiedlicher Protein-Isoformen sein. Ebenfalls wäre eine Änderung der RNA-Abundanz und somit der Protein-Abundanz möglich, falls alternative Isoformen zu einem NMD-vermittelten mRNA-Abbau führen [40, 41]. Ähnlich zu dem auto-regulierten Spleißen von PTBP1, bei dem die Exklusion des Exon 11 zu einer NMD-unterliegenden Isoform führt, könnten RAVER1 und PTBP1 ebenfalls das Spleißen von frühzeitigen Stop-Codons innerhalb der miR/RISC-Faktoren regulieren [175]. Dies kann jedoch anhand der durchgeführten RNA-Sequenzierung mit anschließender rMATS Analysen nur schwer festgestellt werden, da es sich hier um eine fragmentierte Analyse handelt. Hierfür wären Sequenzierungen von Vollängen-mRNAs notwendig, um übergreifend eine RAVER1- oder PTBP1-regulierte

alternativ gespleißten Isoform als Ganzes inklusive Verschiebungen im offenen Leseraster identifizieren zu können.



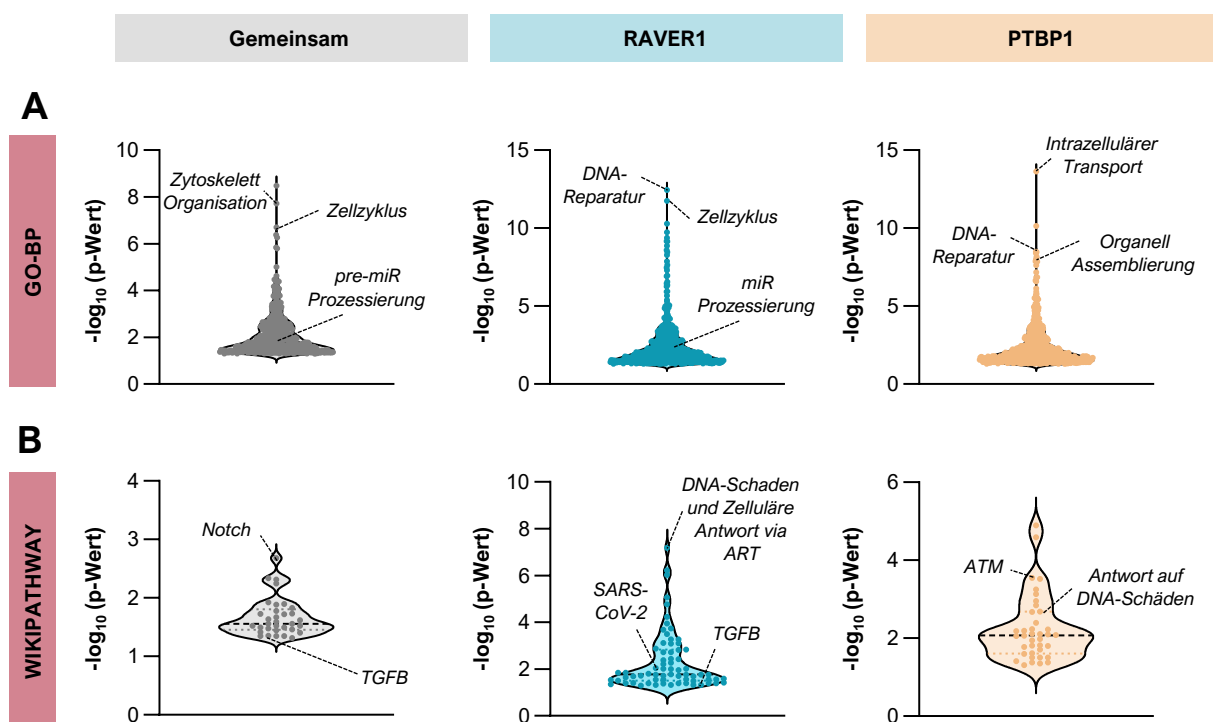
**Abbildung 29: GW-Wiederholungen vermitteln Interaktion mit AGO2. (A)** Analyse der Interaktion von TNRC6B und AGO2 in Abhängigkeit des gespleißten Exon 6. Eine schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes ist links dargestellt. HEK293T Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, welche GFP-AGO2, HA, HA-TNRC6B (T6B) oder HA-TNRC6BΔExon6 (T6BΔEx6) kodieren. Dabei umspannt der verwendete Bereich von T6B Exon 5 bis Exon 8 und enthält insgesamt 8 GW-Wiederholungen. Der verwendete Bereich von T6BΔEx6 umspannt den gleichen Bereich, jedoch mit fehlendem Exon 6, wodurch insgesamt nur 5 GW-Wiederholungen vorhanden sind. 72 Stunden nach Transfektion wurden Zelllysate einer Ko-Immunopräzipitation mit anti-GFP-gekoppelten *Beads* (GFP-IP) unterzogen und anschließend mittels Western Blot analysiert. Antikörper gegen GFP wurden zur Detektion von GFP-AGO2 verwendet, ein HA-spezifischer Antikörper zur Detektion der HA-Fragmente. Eine Analyse der relativen (rel.) Präzipitation erfolgte durch Quantifizierung der Ko-präzipitierten HA-Fragmente in Relation zum GFP-AGO2. Es wurde die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben. Eine Analyse der Signifikanz wurde mittels Student's *t*-Test durchgeführt. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 3.8. Zusammenhang zwischen dem alternativen Spleißen und modulierter Signalwege unter RAVER1- und PTBP1-Depletion

Spleiß-Analysen lieferten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen RAVER1-vermitteltem alternativem Spleißen und Veränderungen in der miR/RISC Aktivität (vgl. 3.6 und 3.7). Nichtsdestotrotz wurden bei gleichzeitig starken phänotypischen Effekten (vgl. 3.1.2, Abbildung 11-13) und stark an-/abgereicherten Gen-Sets der GSEA-Analysen (vgl. 3.3, Abbildung 18A) lediglich moderate Effekte der Luziferase-Reporter-Analysen beobachtet. Interessanterweise wurde jedoch beobachtet, dass die Deletion einer einzelnen miRNA, nämlich miR-21-5p, in A549 zum teilweise doppelten Anstieg der Luziferase-Aktivität von



3'UTR-Reportern führte, bei ähnlich ausgeprägten Veränderungen der Zell-Phänotypen und der RNA-Abundanz [268]. Die durchgeführten Analysen legen nahe, dass beobachtete Veränderungen auf phänotypischer und RNA-Ebene nicht allein durch modulierte miR/RISC-Aktivitäten erklärt werden können. Daher wurden Über-Repräsentations-Analysen (ORA; *over-representation analysis*) der gefilterter SE-Ereignisse unter RAVER1- und PTBP1-Depletion in A549 durchgeführt. Hierbei erfolgte eine statistische Analyse, ob Transkripte, die bestimmten Signalwegen (Gen-Sets) zugeordnet wurden, überrepräsentiert in der Spleiß-Analyse vorlagen. Zusätzlich wurden alternativ gespleißte Transkripte im Vorfeld nach gemeinsamen (grau), RAVER1-spezifischen (türkis) und PTBP1-spezifischen (apricot) Ereignissen selektiert (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Alternative Spleiß-Transkripte sind in unterschiedlichen biologischen Prozessen angehäuft.** (A, B) Über-Repräsentations-Analysen (ORA) wurden von Protein-kodierenden SE-Ereignissen ( $FDR < 0,05$ ;  $|\Delta PSI| > 0,05$ ) der RAVER1- und PTBP1-depletierten A549 Zellen durch Dr. Markus Glaß und Laura Schian durchgeführt. Es erfolgte eine Aufteilung der Spleiß-Ereignisse nach gemeinsamen (grau), RAVER1- (türkis), und PTBP1- (apricot) spezifisch gespleißten Transkripten. ORA-Analysen der MSigDB Kollektion C5: *Gene Ontology- Biological Process* (GO-BP, A) bzw. der MSigDB Kollektion C2: CP-WP (*Canonical Pathway – WikiPathway*) (B) sind als Violin-Plot dargestellt, wobei jeder Punkt ein signifikant ( $p < 0,05$ ) angereichertes Gen-Set widerspiegelt.

ORA-Analysen der MSigDB C5: GO-BP (*Gene Ontology – Biological Process*) Kollektion deuteten darauf hin, dass vor allem Transkripte aus den Zytoskelett- und Zellzyklus bezogenen Gen-Sets unter RAVER1- und PTBP1-Depletion als gemeinsame Ereignisse alternativ gespleißt wurden (Abbildung 30A, grau). Wie auch schon in Kapitel 3.6 festgestellt, konnte ebenfalls eine Anreicherung innerhalb der pre-miR-Prozessierung detektiert werden, welches ebenfalls eine miR/RISC Aktivität beeinflussen könnte. Analysiert man RAVER1-spezifische Spleiß Ereignisse, so beobachtet man auch hier eine Anreicherung von Transkripten innerhalb

der miR-Prozessierung, welches nicht in alternativ gespleißten Transkripten unter PTBP1-Depletion beobachtet wurde (Abbildung 30A, türkis). Interessanterweise wurden Transkripte überrepräsentiert unter RAVER1- oder PTBP1-Depletion alternativ gespleißt, die den Gen-Sets der DNA-Reparatur und des Zellzyklus angehören (Abbildung 30A, türkis/apricot). Transkripte, die nur unter PTBP1-Depletion alternativ gespleißt vorlagen, wurden häufig Gen-Sets zugeordnet, die im intrazellulären Transport oder der Organell Assemblierung involviert sind (Abbildung 30A, apricot). Gleiche oder ähnliche Gen-Sets konnten ebenfalls in den RAVER1-spezifischen und den gemeinsamen Ereignissen detektiert werden, wenn auch mit unterschiedlichen Spleiß Ereignissen. Daher scheinen RAVER1 und PTBP1, ob gemeinsam oder individuell, Auswirkungen auf das alternative Spleißen von Transkripten zu besitzen, die für die zelluläre Struktur, dem Zellzyklus oder der DNA-Reparatur relevant sind, obwohl hier nur einige dieser Prozesse hervorgehoben wurden. Ein Einfluss auf miR-bezogene Signalwege wurde ebenfalls beobachtet, wobei diese insbesondere von RAVER1 abhängig zu sein schienen.

Ferner wurden ORA-Analysen der MSigDB C2: CP-WP (*Canonical Pathway - WikiPathways*) Kollektion durchgeführt (Abbildung 30B). Unter RAVER1- und PTBP1-Depletion (grau) wurden Transkripte gemeinsam alternativ gespleißt, welche überrepräsentiert in Rezeptor-abhängigen Signalwegen, wie Notch oder WNT, aber interessanterweise auch TGF $\beta$ - und SARS-CoV-2 assoziierte Gen-Sets, vorlagen (Abbildung 30B). Betrachtet man RAVER1-spezifische Spleiß-Ereignisse (türkis), so wurden vor allem Transkripte der Gen-Sets zur Reparatur von DNA-Schäden, aber auch hier TGF $\beta$ -bezogene Gen-Sets detektiert (Abbildung 30B). Interessanterweise wurde auch ein Gen-Set festgestellt, welches Transkripte zusammenfasst, die unter SARS-CoV-2 Infektion hochreguliert werden. Ähnliche Gen-Sets bezüglich einer Expressionsänderung nach Infektionen wurden ebenfalls in den gemeinsamen (grau) bzw. PTBP1-spezifischen (apricot) Ereignissen detektiert (Abbildung 30B). Die Analyse der alternativ gespleißten Transkripte, welche nur unter PTBP1-Depletion zu detektieren waren, deuteten vor allem auf eine Anreicherung von Gen-Sets der DNA-Reparatur hin, wie unter anderem ATM-abhänge Signalwege (Abbildung 30B, apricot). Innerhalb der *WikiPathway* ORA-Analyse konnte beobachtet werden, dass RAVER1 und PTBP1 häufig ein alternatives Spleißen von Transkripten als Antwort auf DNA-Schäden vermittelten. Hierbei wurden jedoch unterschiedlich betroffene Transkripte innerhalb des gleichen Gen Sets beobachtet, oder unterschiedlichen Spleiß-Ereignisse innerhalb eines Transkriptes (Selektive Daten im Anhang, Tabelle 23). Unter anderem wurden LIG1 und LIG3 (DNA Ligase I/ III), die eine Ligation von DNA-Doppelstrangbrüche vermitteln [275], sowohl von RAVER1 als auch von PTBP1 alternativ gespleißt, jedoch waren jeweils verschiedene Exone betroffen. Einen ko-regulatorischen Einfluss beider Faktoren konnte auf Rezeptor-abhängige Signalwege, wie Notch und WNT, die zelluläre Kern-Prozesse wie Proliferation beeinflussen [276], festgestellt

werden. Interessanterweise wurde ein Einfluss auf TGF $\beta$ -abhängige Signalwege nur in Abhängigkeit einer RAVER1-Depletion beobachtet, nicht aber in PTBP1-spezifischen Spleiß-Ereignissen (vgl. Anhang, Tabelle 23). Eine ORA-Analyse der ENCODE-bezogenen Hep-G2 Sequenzierungen deuten auf ein ähnliches Muster hin (Daten nicht gezeigt).

Anhand der ORA-Analysen von alternativ gespleißten Transkripten konnte gezeigt werden, dass beide Spleißfaktoren einen Einfluss auf verschiedene biologische Prozesse besitzen. Allerdings konnten erneut Unterschiede zwischen RAVER1- und PTBP1-vermitteltem alternativen Spleißen hinsichtlich bevorzugter Prozesse und Signalwege festgestellt werden, welche eine mögliche Erklärung für die verschiedenen phänotypischen Effekte liefern könnten. Insbesondere die Unterschiede in der Modulation des alternativen Spleißens innerhalb des TGF $\beta$ -Signalweges könnten Aufschlüsse über die verschiedenen TGF $\beta$ -Signalweiterleitungen und Induktion einer EMT liefern.

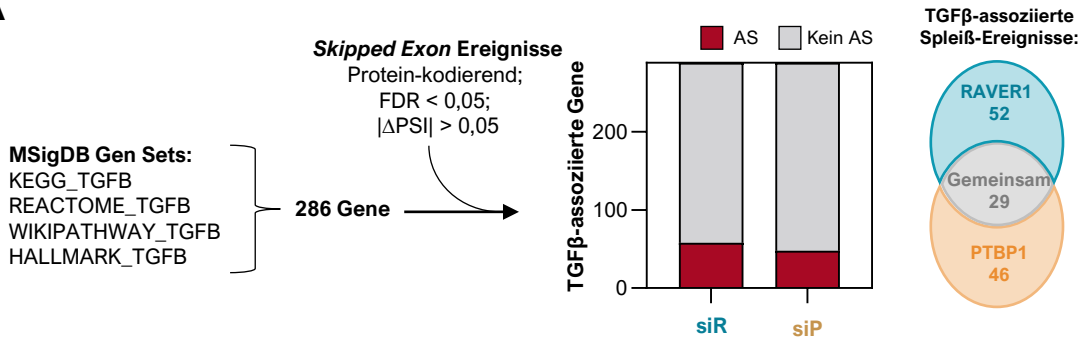
### **3.8.1. *In Silico* Analyse des alternativen Spleißens des TGF $\beta$ -Signalweges**

Wie in Abbildung 30B dargestellt, konnte ein RAVER1-vermitteltes alternatives Spleißen überrepräsentativ innerhalb TGF $\beta$ -assoziierter Gene beobachtet werden. Gleichzeitig wurde eine generell erhöhte Expression von Genen innerhalb des Hallmark Gen-Sets TGF $\beta$  (vgl. 3.3, Abbildung 18), zusammen mit ausgeprägten proliferativen Effekten (vgl. 3.1.2, Abbildung 11) durch eine RAVER1-Depletion vermittelt. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen moduliertem Spleißen, Folgen in der RNA-Abundanz und daraus resultierenden phänotypischen Änderungen des bedeutenden biologischen TGF $\beta$ -Signalweges hin.

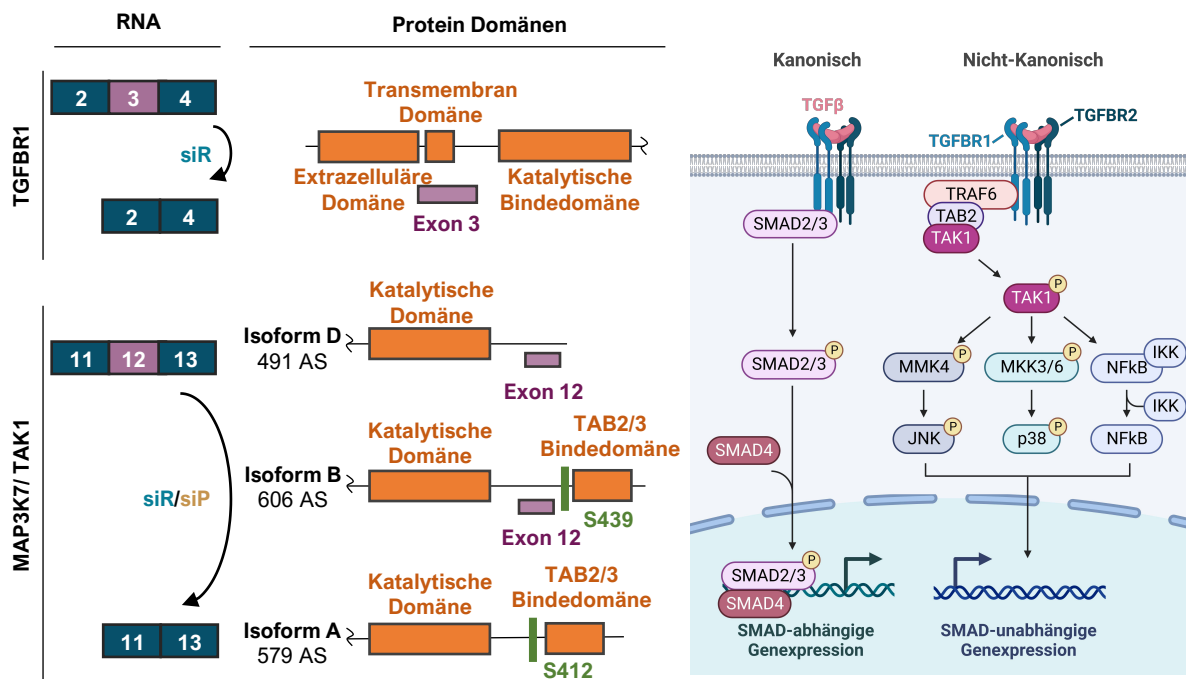
Analysiert man das RAVER1- und PTBP1-vermittelte Spleißen innerhalb des TGF $\beta$ -Signalweges tiefer, so werden ~ 20 % der betrachteten TGF $\beta$ -bezogenen Gene durch beide Spleißfaktoren alternativ gespleißt vorgefunden (Abbildung 21A). Hierfür wurden alle TGF $\beta$ -assozierten Gene aus unterschiedlichen MSigDB Gen-Sets zusammengefasst und somit 286 Gene mit selektierten in/exkludierten Ereignissen verglichen. Insgesamt konnten 58 Gene (insgesamt 81 Spleiß-Ereignisse) unter RAVER1-Depletion bzw. 49 Gene (75 Spleiß-Ereignisse) unter PTBP1-Depletion in A549 innerhalb des neu generierten TGF $\beta$  Gen-Sets festgestellt werden. Hiervon waren 52 Ereignisse RAVER1-spezifisch, 46 Ereignisse PTBP1-spezifisch und insgesamt 29 Ereignisse unter beiden Depletionen feststellbar. Betrachtet man einzelne Spleiß-Ereignisse genauer, lässt sich vermuten, dass der TGF $\beta$ -Signalweg aufgrund einer Dysbalance der Isoformen moduliert wird. Dies könnte zu einer generellen Hochregulierung dieses Signalweges unter RAVER1- und PTBP1-Depletion führen. Unter anderem wurde ein RAVER1-spezifisches Ereignis in A549 Zellen beobachtet, bei dem das Exon 3 von TGFBR1 unter Depletion vermehrt exkludiert wird (Abbildung 31B, links).

Interessanterweise kodiert das Exon 3 ein Teil der Transmembrandomäne [277], sodass eine veränderte Signalweiterleitung des TGF $\beta$ -Signalweges vermutet wird (Abbildung 31B, mitte). Der TGF $\beta$ -Signalweg umfasst dabei eine kanonische und eine nicht-kanonische Signalweiterleitung.

A



B



**Abbildung 31: RAVER1 und PTBP1 vermitteln alternatives Spleißen TGF $\beta$ -assoziierter Transkripte.** (A) Analyse der Protein-kodierenden SE-Ereignisse (FDR < 0,05;  $|\Delta\text{PSI}| > 0,05$ ) von RAVER1- (siR) und PTBP1- (siP) Depletionen in A549 innerhalb TGF $\beta$ -assoziierter Gene. Hierfür wurden Gen-Sets der MSigDB Kollektionen KEGG, REACTOME, WIKIPATHWAY und HALLMARK kombiniert (siehe Anhang, Tabelle 24). Die Anzahl der von alternativen Spleiß-Ereignissen (AS) betroffenen Gene sind im Balkendiagramm in Rot, nicht-detektierbare AS-Ereignisse in Grau dargestellt. Der Vergleich der detektierten TGF $\beta$ -assozierten Spleiß-Ereignisse zeigen RAVER1- (türkis), PTBP1- (apricot) spezifische und gemeinsame (grau) Spleiß-Ereignissen als Venn-Diagramm (rechts). (B) Schematische Darstellung der Spleiß-Analyse zweier TGF $\beta$ -assoziierter Gene. Links sind Bereiche des putativ betroffenen Exons dargestellt, in der Mitte die umliegenden Protein Domänen, welche mittels der in NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)) bereitgestellten Annotationen erstellt wurden. Schemata des kanonischen und nicht-kanonischen TGF $\beta$ -Signalweg (rechts) wurden nach Kim und Choi (2012) und Rodari *et al.* (2022) erstellt [159,160].

IKK: *I*κB *k*inase; JNK: *c-Jun N-terminal k*inase; MKK: *Mitogen-activated protein k*inase *k*inase; NFκB: *Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells*; TAB: *TAK1-binding protein* TAK: *TGFβ activated k*inase; TGFBR: *TGFβ receptor*; TRAF: *TNF receptor associated factor*

In beiden Fällen bindet aktives TGF $\beta$  an ein TGFBR2-Dimer, welches ein TGFBR1-Dimer rekrutiert und eine Autophosphorylierung des TGFBR1 auslöst. Als *downstream* Effekt wird entweder eine kanonische Signalkaskade via SMADs oder eine nicht-kanonische Kaskade unter anderem via TAK1 ausgelöst (Abbildung 31B, rechts) [159, 160, 278].

Es wird vermutet, dass ein RAVER1-mediiertes alternatives Spleißen innerhalb der Transmembrandomäne zu einer Unterbrechung und Modulierung dieser Kaskaden führt. Ein Einfluss der Transmembrandomäne wurde bereits in der Studie von Chen *et al.* (2007) beobachtet, bei der ein TGFBR1 Transkript mit fehlender Transmembrandomäne zu einer reduzierten transkriptionellen Aktivierung unter TGF $\beta$ -Stimulus führte [279].

Ebenfalls wurde MAP3K7 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7*) auch bekannt als TAK1 (*TGF $\beta$  activated kinase 1*) durch RAVER1 und PTBP1 sowohl in A549, aber auch in Hep-G2 alternativ gespleißt, sodass es unter Depletion zu einem vermehrten Exkludieren des Exon 12 kam (Abbildung 31B, links). Dies könnte Folgen für die TAB2/3 (*TAK1-binding protein 2/3*) Bindedomäne haben, unter anderem durch eine verkürzte Protein-Isoform mit fehlender TAB2/3 Bindedomäne [280], worauf durch einen Vergleich der NCBI annotierten Protein-Isoformen A und D zu schließen ist. Isoform B enthält sowohl Exon 12 als auch eine TAB2/3 Bindedomäne, zusätzlich ist das Exon 12 in unmittelbarer Nähe zur Aminosäure S439, welche bei Phosphorylierung zu einer Aktivierung der katalytischen Aktivität führen kann [281]. Innerhalb des nicht-kanonischen Signalweges ist TAK1 mit dem Rezeptor TGFBR1 über einen Komplex aus TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) und TAB2 assoziiert. Ein TGF $\beta$ -Stimuli führt zu einer Heterotetramerisierung der Rezeptoren, wodurch eine TAK1-abhängige *downstream* Kaskade initiiert wird, welche eine Aktivierung von JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), p38 und NF $\kappa$ B zur Folge hat (Abbildung 31B, rechts) [159]. Ein funktioneller Vergleich der Isoformen A und B konnte bereits zeigen, dass Isoform A (exkludiertes Exon), sowohl JNK und p38 aktivieren konnte, als auch eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges mit resultierender Induktion einer EMT zur Folge hatte [282]. Isoform B (inkludiertes Exon) zeigte jedoch nur eine Aktivierung der JNK- und p38-MAPK, nicht aber eine NF $\kappa$ B Aktivierung, sodass ein inhibitorisches Motiv innerhalb des Exons vermutet wurde. Eine Exklusion des Exon 12 unter RAVER1-Depletion könnte somit in Zusammenhang mit der Induktion einer EMT stehen.

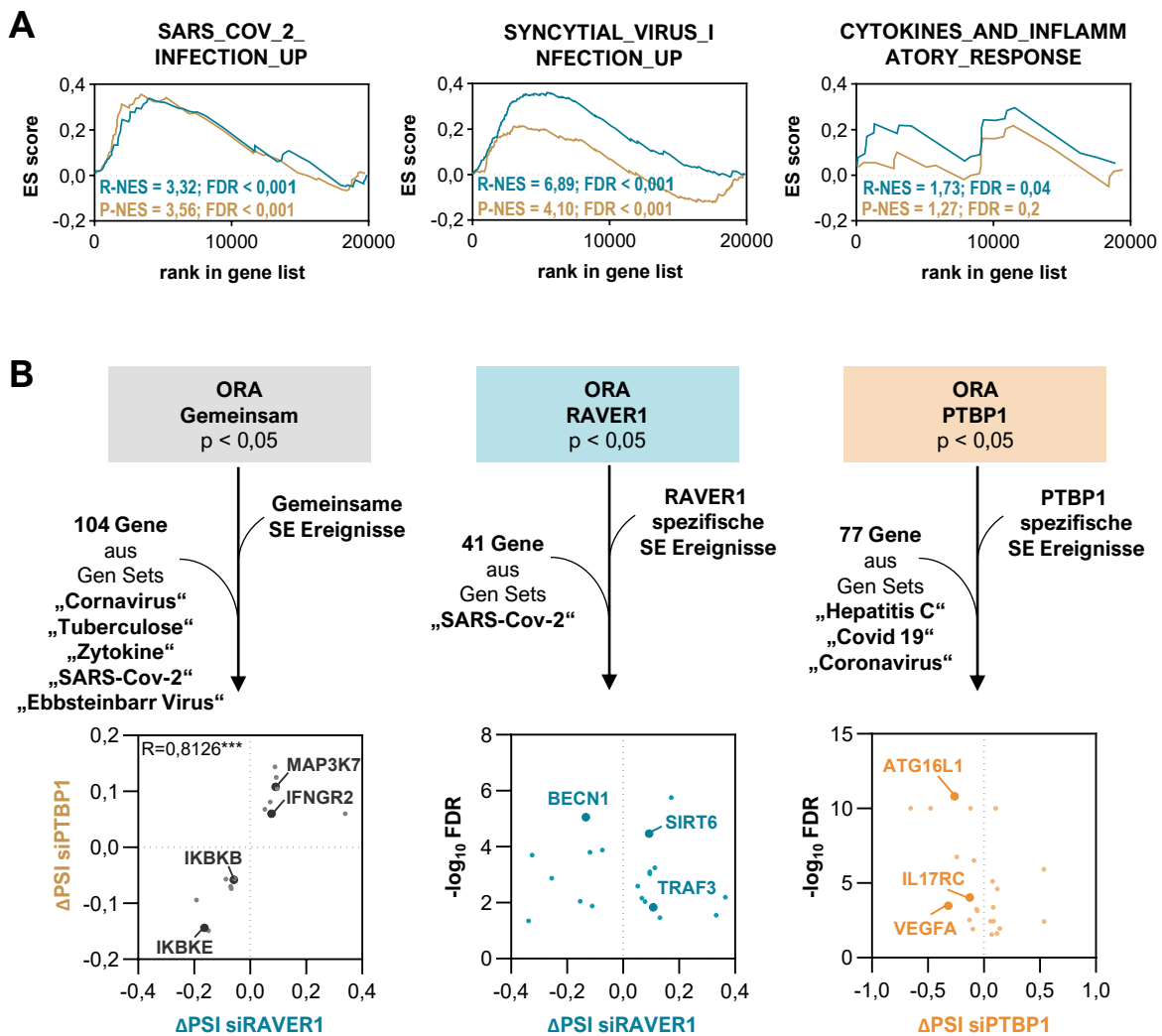
In RAVER1-depletierten A549 konnte eine Anreicherung der TGF $\beta$  und EMT Gen-Sets und damit einhergehender Induktion einer letalen EMT beobachtet werden. Unter PTBP1-Depletion wurde zwar ebenfalls eine Anreicherung beider Gen-Sets festgestellt, jedoch konnten keine morphologischen Auswirkungen einer EMT beobachtet werden. Beide Depletionen zeigen zudem eine Anreicherung alternativer Spleiß-Ereignisse innerhalb von TGF $\beta$ -assoziierten Gen-Sets. Interessanterweise konnten jedoch keine signifikant angereicherten Spleiß-Ereignisse in EMT-assoziierten Gen-Sets beobachtet werden, welches

auf eine Induktion der EMT durch den vermehrt betroffenen TGF $\beta$ -Signalweg schließen lässt. Unterschiede hinsichtlich einer TGF $\beta$  induzierten EMT unter RAVER1- und PTBP1-Depletion könnten ein Resultat aus verschiedenen alternativ gespleißten TGF $\beta$ -assoziierten Genen sein. So wurde eine ko-regulatorische Funktion von RAVER1 und PTBP1 auf das Spleiß-Transkript von MAP3K7/TAK1 anhand der *in silico* Spleiß-Analysen beobachtet, wohin gegen TGFBR1 als RAVER1-spezifisches Spleiß-Transkript festgestellt wurde. Gleichzeitig wurde ein Einfluss auf die RNA-Abundanz der Rezeptoren TGFBR1 und TGFBR2 durch RAVER1, nicht aber durch PTBP1 beobachtet. Dies lässt vermuten, dass RAVER1 einen stärkeren Einfluss auf die zelluläre Signalübertragung, unter anderem durch eine modulierte Rezeptor-Aktivität, besitzt, welches sich auf biologische Prozesse, einschließlich Proliferation und EMT, auswirken kann. Dahingegen weist PTBP1 zwar Einflüsse auf das alternative Spleißen von Transkripten und die RNA-Abundanz des TGF $\beta$ -Signalweges auf, jedoch vermutlich mit geringfügiger Wirkung auf die Signalweiterleitung und damit einhergehender phänotypischer Auswirkung.

### **3.8.2. *In Silico* Analyse des Einflusses von RAVER1 und PTBP1 in der Immunantwort**

Wie bereits beschrieben, ist der TGF $\beta$ -Signalweg ein zweiseitiges Schwert. In frühen Stadien kann es als Tumorsuppressor fungieren, während in späteren Stadien eine Tumorprogression durch zelluläre Transformation, EMT und Metastasierung gefördert werden kann [158, 283]. Eine Infiltration von immunregulatorischen T-Zellen führt zur Sekretion von TGF $\beta$ , welches zu einer SMAD-abhängigen Signalweiterleitung und Expression pro-apoptotischer Gene und somit zur Initiierung einer Apoptose der Tumorzelle führt [165]. Andererseits kann TGF $\beta$  ebenfalls zu einer inhibierten Entzündungsreaktion führen, indem es die Produktion immun-inhibierender Chemokine und Wachstumsfaktoren bei gleichzeitiger Repression immun-fördernder Faktoren vermittelt, wodurch die Tumorgenese positiv beeinflusst wird. Ebenfalls wurde eine immunregulatorische Funktion bereits für RAVER1 vermutet. So konnte eine Interaktion zwischen RAVER1 und MDA5 beobachtet werden, wodurch RAVER1 als Ko-Aktivator einer MDA5-medierten Immunantwort fungierte [210]. Des Weiteren wurden RAVER1 und SARS-CoV-2 mit dem Einfluss auf eine COVID-19 Erkrankung bereits in Verbindung gebracht [223]. RAVER1 und PTBP1 konnten jüngst als alternative Spleißregulatoren der RIPK1 RNA nachgewiesen werden, wodurch ein RIPK1-mediierter inflammatorischer Zelltod gefördert wurde [224]. Es schien naheliegend, dass RAVER1 und PTBP1 durch ihre Funktion als alternative Spleißregulatoren eine Rolle sowohl in der Tumor-assoziierten Immunantwort, aber auch in der Infektions-bedingten Immunreaktion besitzen. Daher war es nicht überraschend, dass unter RAVER1- und PTBP1-Depletion sowohl eine Anreicherung alternativ gespleißter Transkripte innerhalb TGF $\beta$ -assoziiierter Gen-Sets (vgl. 3.8 Abbildung 30-31), aber auch innerhalb Inflammations-bezogener Gen-Sets beobachtet wurde (vgl. 3.8 Abbildung 30B). So konnte unter anderem eine Anreicherung von

alternativ gespleißten Transkripten innerhalb eines Gen Sets identifiziert werden, welches Gene umfasst, die als Immunreaktion nach Infektion mit SARS-CoV-2 detektiert wurden [284]. Zur Analyse dieser Hypothese wurden GSEA-Analysen der MSigDB C2: *Currated* Gen-Sets durchgeführt. Hierbei konnten jeweils unter RAVER1-, als auch PTBP1-Depletion in A549 und Hep-G2 eine Anreicherung von Gen-Sets detektiert werden, die durch eine virale Infektion reguliert werden (Daten nicht gezeigt). Eine selektive Betrachtung dreier dieser Gen-Sets zeigte eine positive Anreicherung des Gen Set SARS\_COV\_2\_INFECTION\_UP (Abbildung 32A links, Tabelle 25 im Anhang) [284]



**Abbildung 32: RAVER1 und PTBP1 vermitteln alternatives Spleißen Infektions-assoziiertes Transkripte.** (A) GSEA-Analysen der MSigDB C2 Kollektion auf Basis der RNA-Sequenzierung von Kontroll-, RAVER1- und PTBP1-depletierten A549 Zellen ( $n = 3$  pro Bedingung). Anreicherungsplots der indizierten Gen Sets zeigen deregulierte Gene unter RAVER1- (türkis) und PTBP1-Depletion (apricot). (B) Signifikant ( $p < 0,05$ ) angereicherte Immunregulatorisch-assoziierte Gen Sets wurden entsprechend der ORA-Analyse aus 3.8 (Abbildung 30) extrahiert und zur weiteren Betrachtung von RAVER1- und PTBP1- Depletionen in A549 verwendet. Es erfolgte eine Einteilung nach gemeinsamen (grau), RAVER1- (türkis) und PTBP1- (apricot) spezifischen Protein-kodierenden SE-Ereignissen ( $FDR < 0,05$ ;  $|\Delta PSI| > 0,05$ ) und anschließender Analyse der kombinierten Gen Sets (siehe Anhang, Tabelle 26). Gemeinsame SE-Ereignisse sind als XY-Präsentation der  $\Delta PSI$  mit Pearson R Korrelation dargestellt (links). RAVER1- (mitte) bzw. PTBP1- (rechts) spezifische SE-Ereignisse wurden als XY-Diagramm mit entsprechendem  $\Delta PSI$  in Abhängigkeit des FDRs dargestellt.

Dabei konnte sowohl in RAVER1- und PTBP1-depletierten A549 Zellen als auch in Hep-G2 Zellen eine positive Anreicherung des Gen-Sets, welches erhöht exprimierte Transkripte nach einer SARS-CoV-2 Infektion von A549 Zellen umfasst, beobachtet werden. Die Analyse des Gen-Set SYNCYTIAL\_VIRUS\_INFECTION\_UP [284] zeigt ebenfalls eine Anreicherung in A549 RAVER1- und PTBP1-Depletion, sowie in Hep-G2 (Abbildung 32A mitte, Tabelle 25 im Anhang). Hierbei beinhaltet das Gen-Set Transkripte, welche nach einer RSV (*respiratory syncytial virus*) Infektion in A549 Zellen ebenfalls hochreguliert vorlagen.

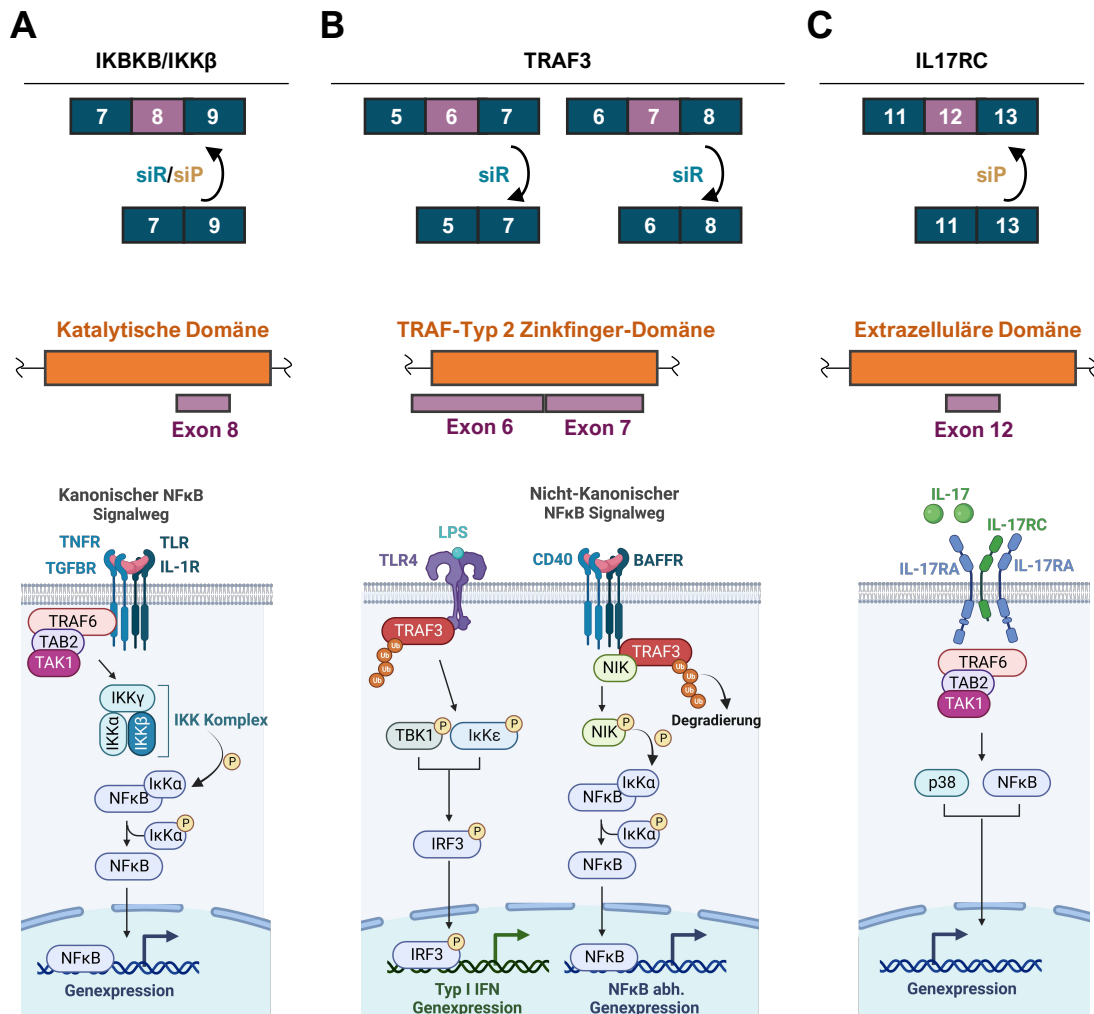
Interessanterweise konnte auch das Gen-Sets CYTOKINES\_AND\_INFLAMMATORY\_RESPONSE, welches für eine Immunantwort benötigte Zytokine und andere Faktoren umfasst, als moderat angereichert detektiert werden (Abbildung 32A rechts; Tabelle 25 im Anhang).

Aufgrund der beobachteten Anreicherung von Transkripten, die nach viraler Infektion hochreguliert wurden, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei, ähnlich zum TGF $\beta$ -Signalweg, um RAVER1- und PTBP1-vermittelte alternative Spleiß-Ereignisse handeln könnte. Dies könnte zu einer modulierten immunregulatorischen Funktion führen.

Um diese Hypothese tiefer zu analysieren, wurden selektierte Protein-kodierende SE-Ereignisse nach gemeinsamen, RAVER1- und PTBP1-spezifischen Ereignissen in A549 separiert. Anschließend erfolgte eine Vergleichsanalyse der Ereignisse mit den signifikant angereicherten antiviralen Gen-Sets der C2 ORA-Analyse aus Kapitel 3.8 (siehe Anhang Tabelle 26). Dabei wurden unter gemeinsam gespleißten Transkripten (grau) erneut die RNA MAP3K7/TAK1 identifiziert (vgl. 1.8.1). Interessanterweise konnte zwischen den gemeinsamen Ereignissen unter RAVER1- und PTBP1-Depletion eine stark positive Pearson-Korrelation ( $R = 0,8126$ ;  $p < 0,05$ ) identifiziert werden. Hierbei wurden die betroffenen Exone jeweils dem gleichen Spleiß-Ereignis unterzogen, entweder der Exklusion oder der Inklusion, welches auf eine ko-regulatorische Funktion hindeutet. Des Weiteren konnte die RNA IKBKB (*Inhibitor of nuclear factor  $\kappa$  B kinase subunit B*), auch bekannt als IKK $\beta$ , identifiziert werden. IKBKB zeigte dabei sowohl unter RAVER1-, als auch PTBP1-Depletion in A549 eine vermehrte Inklusion des Exon 8 (Abbildung 33A). Das Exon 8 ist hierbei innerhalb der katalytischen Domäne lokalisiert und spielt eine entscheidene Rolle in der kanonischen Signalweiterleitung von NF $\kappa$ B [285]. Dabei führt eine Stimulation verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine, wie TGF $\beta$  und TNF $\alpha$ , zur Aktivierung des IKK-Komplexes, wodurch IKK $\beta$  die Phosphorylierung des inhibitorischen Faktors IKK $\alpha$  mithilfe seiner katalytischen Domäne reguliert (Abbildung 33A). Phosphoryliertes IKK $\alpha$  führt zur Dissoziation von NF $\kappa$ B, sodass das aktivierte NF $\kappa$ B in den Zellkern lokalisieren und dort als Transkriptionsfaktor fungieren kann [286, 287]. Dabei kann NF $\kappa$ B die Expression von inflammatorischen Genen sowohl inhibieren als auch fördern. Alternativ gespleißte Transkripte von IKK $\beta$  sind bisher funktionell nicht weiter beschrieben, jedoch konnte gezeigt werden, dass



eine Mutation innerhalb der katalytischen Domäne, im spezielleren in Exon 8, zu einer erhöhten NF $\kappa$ B Signalweiterleitung führt [288].



**Abbildung 33: RAVER1 und PTBP1 vermitteln alternatives Spleißen von Schlüsselfaktoren immunregulatorischer Signalwege.** (A) Schematische Darstellung der Spleiß-Analyse dreier immunregulatorischer Gene in RAVER1- (siR) und PTBP1- (siP) depletierter A549. Oben sind Bereiche des putativ betroffenen Exons dargestellt, in der Mitte die Exon-enthaltenden Protein Domänen, welche mittels der in NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein)) bereitgestellten Annotationen erstellt wurden. Schemata des kanonischen NF $\kappa$ B Signalwegs wurden nach Constanza *et al.* (2017) und Concetti und Wilson (2018) angefertigt [278,287]. TRAF3-abhängige Signalwege wurden entsprechend Häcker *et al.* (2011) dargestellt [290]. Die Visualisierung der IL-17-vermittelten Signalweiterleitung wurde nach Gaffen *et al.* (2009) erstellt [298].

BAFFR: *B-cell activating factor receptor*; IL: *Interleukin*; IL-1R: *IL-1 receptor*; IL-17R: *IL-17 receptor*; IRF: *interferon regulatory factor*; IKK: *I $\kappa$ B kinase*; LPS: *Lipopolysaccharide*; NF $\kappa$ B: *Nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells*; NIK: *NF $\kappa$ B induced kinase*; TAB: *TAK1-binding protein*; TAK: *transforming growth factor (TGF)  $\beta$  activated kinase*; TBK: *TANK-binding kinase*; TGFBR: *TGF $\beta$  receptor*; TLR: *toll-like receptor*; TNFR: *Tumor nekrose factor (TNF) receptor*; TRAF: *TNF receptor associated factor*.

Es ist zu vermuten, dass eine ko-regulatorische Exklusion durch RAVER1 und PTBP1 somit zu einer veränderten katalytischen Aktivität von IKK $\beta$  mit vermutlich reduzierter NF $\kappa$ B Signalweiterleitung führt. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung einer vermehrten Expression von NF $\kappa$ B-regulierten Genen, wie im Hallmark Gen-Set

TNFA\_SIGNALING\_VIA\_NFKB, unter RAVER1- und PTBP1-Depletion (siehe Anhang Tabelle 14) und gleichzeitiger Induktion einer Apoptose [287].

RAVER1-spezifische Spleiß-Ereignisse (türkis) innerhalb der analysierten Gen Sets identifizierten unter anderem TRAF3 (*TNF receptor-associated factor 3*) (Abbildung 32B). Hierbei konnten zwei verschiedene Ereignisse unter RAVER1-Depletion festgestellt werden, der vermehrten Exklusion von Exon 6 sowie einer Exklusion von Exon 7, welche sich innerhalb der TRAF-Typ 2 Zinkfinger-Domäne befinden (Abbildung 33B) [289]. TRAF3 ist dabei unter anderem essenziell für eine positive Regulation von IFN Typ I Genen sowie einer negativen Regulation des nicht-kanonischen NFκB Signalweges (Abbildung 33B). TRAF Proteine agieren dabei als E3 Ubiquitin Ligase, wodurch eine Aktivierung von *downstream* Signalen gewährleistet wird [290]. Im Fall von TRAF3 führt ein LPS (*Lipopolysaccharid*) Stimulus zur Aktivierung des TLR4 (*Toll-like receptor 4*), einhergehend mit einer Polyubiquitinierung von TRAF3. Dies hat eine Aktivierung von TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) und IKKε zur Folge, welches durch Phosphorylierung IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) aktiviert, mit Folge der Typ I IFN Genexpression [291, 292]. Einen inhibitorischen Effekt besitzt TRAF3 hingegen innerhalb des nicht-kanonischen NFκB Signalweges, bei dem TRAF3 einen Komplex mit NIK (*NFκB inducing kinase*) bildet und so eine Signalweiterleitung verhindert. Erst unter CD40 oder BAFF (*B cell activating factor*) Stimulus führt eine Polyubiquitinierung zur Degradation von TRAF3 und somit zu einem freien NIK. Diese kontrolliert eine IKKα Aktivierung und somit eine nicht-kanonische NFκB Signalweiterleitung [290, 293]. Interessanterweise konnte keine Aktivierung des NFκB Signalweges durch Überexpression von TRAF3 mit voller Länge (Exon 1-12) beobachtet werden, jedoch eine Aktivierung des Signalweges bei Exklusion des Exon 6, des Exon 7 oder bei Exklusion beider Exone [289, 294]. Dies lässt vermuten, dass RAVER1-vermitteltes alternatives Spleißen von essenziellen Faktoren innerhalb Zytokin-abhängiger Signalwege eine wichtige Rolle in der Modulation der Aktivität dieser Faktoren spielt.

Als PTBP1-spezifisches Spleiß-Transkript (apricot) konnte unter anderem IL17RC (*Interleukin 17 receptor C*) identifiziert werden (Abbildung 32B). Hierbei wurde unter PTBP1-Depletion eine vermehrte Inklusion des Exon 12 beobachtet (Abbildung 33C), welches innerhalb der extrazellulären Domäne lokalisiert ist [295]. IL17RC spielt dabei als Teil des IL17-Rezeptor-Komplexes eine Rolle innerhalb der IL-17 vermittelten pro-inflammatorischen Signalweiterleitung (Abbildung 33C) [296]. Der IL-17-Rezeptor-Komplex, bestehend aus IL17RA und IL17RC, kann dabei die Zytokine IL-17A und IL-17B binden [297]. Da der Rezeptor-Komplex selbst keine katalytische Aktivität besitzt, erfolgt eine Aktivierung von *downstream* Signalwegen durch eine Rekrutierung von z.B TRAF6-TABP2-TAK1 Komplexen, die wiederum eine Aktivierung von p38 und NFκB auslösen [296, 298]. Unterschiedliche Protein-Isoformen des Rezeptor-Proteins IL17RC wurden bereits von Kuestner *et al.* (2007)

identifiziert, unter anderem auch eine Isoform mit exkludiertem Exon 12. Diese Spleiß-Variante fehlt interessanterweise die Fähigkeit an IL-17A/F zu binden [297]. Es ist zu vermuten, dass eine vermehrte Exklusion durch PTBP1 zu einer verringerten Signalweiterleitung führt und PTBP1 so eine Funktion innerhalb der Immunevasion von Tumorzellen vermitteln kann.

Zusammenfassend wurde anhand von *in silico* Spleiß-Analysen ein Einfluss von RAVER1 und PTBP1 auf eine Zytokin-induzierte und NFκB-vermittelte Signalübertragung des Immunsystems in der LUAD-abgeleiteten A549 Tumorzelllinie identifiziert, welche erneut durch eine Anreicherung von alternativ gespleißten Transkripten gekennzeichnet war. Ähnliches wurde auch für die LHC-abgeleitete Tumorzelllinie Hep-G2 beobachtet, wenn auch mit Unterschieden im Spleißen der Transkripte (Daten nicht gezeigt). So deutet ein alternatives Spleißen von Rezeptoren, Kinasen oder Zytokin-abhängigen Transkriptionsfaktoren auf eine Signal-übergreifende Funktion von RAVER1 und PTBP1 hin. Dies könnte einen Einfluss sowohl auf TGFβ-induzierte als auch auf weitere Zytokin-induzierte Immunreaktionen, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, zur Folge haben.

## 4. Diskussion

Die Tumorentstehung erfordert multiple Mechanismen, insbesondere eine veränderte Genexpression, die sich auf die Signalweiterleitung auswirkt und letztlich zu einer aberranten Zellproliferation führt [88]. Alternatives Spleißen ist dabei ein wichtiger Schritt innerhalb der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression. Hierbei können aus einem einzelnen Gen verschiedene RNA Isoformen entstehen, die zu diversen Protein-Isoformen mit unterschiedlichen Funktionen führen können. Auf diese Weise kann eine Zelle steuern, welche RNA-Isoform zu welchem Zeitpunkt benötigt wird. Tumorzellen nutzen diesen Prozess, um Isoformen zu generieren, welche zur Zellproliferation oder Migration beitragen und so eine Tumorentstehung und Progression fördern. Dabei spielen alternative Spleißfaktoren eine entscheidende Rolle [32, 69]. Mutationen innerhalb von Spleißfaktoren, wie beispielsweise SRSF2, können zu einer erhöhten Tumorprogressionen führen [64]. Darüber hinaus können auch Veränderungen der Spleißfaktor-Expression, wie SRSF1 und SRSF6, dazu führen, dass die pro-onkogene Faktoren pro-onkogene Spleißvarianten fördern oder tumorsuppressive Isoformen verhindern [66, 67]. Mitglieder der hnRNP-Familie, darunter auch PTBP1 (hnRNP-I), waren ebenfalls in verschiedenen malignen Tumoren vermehrt überexprimiert und werden mit einem erhöhten Tumorwachstum in Verbindung gebracht [203].

Eine Funktion in der Tumorprogression des hnRNP-ähnlichen Proteins RAVER1 war bisher nicht untersucht. So waren zu Beginn dieser Arbeit die Funktion als Ko-Regulator des PTBP1-abhängigen alternativen Spleißens lediglich von TPM1 bekannt [180], jedoch fehlten weitere Indikationen für die Regulation des alternativen Spleißens. Aus diesem Grund wurde neben der funktionellen Analyse von RAVER1 ebenfalls PTBP1 mit betrachtet, da beide Proteine der gleichen Proteinfamilie entstammen, eine Interaktion und Ko-Lokalisierung beschrieben war und zudem PTBP1 mehrfach als alternativer Spleißfaktor beschrieben war und somit als Positivkontrolle diente [167, 172].

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass RAVER1 pro-onkogene Eigenschaften aufweist und eine Tumorprogression fördert. Als alternativer Spleißfaktor konnte RAVER1 unter anderem die miR/RISC Aktivität modulieren, aber auch ein Einfluss auf den TGF $\beta$ -Signalweg mit resultierender Epithelialer-Mesenchymaler-Transition (EMT) konnten festgestellt werden.

### 4.1. Molekularbiologische Funktion von RAVER1 in PNCs

Erstmals identifiziert wurde das Maus-Ortholog Raver1 in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System als Ligand der zytoplasmatischen Proteine Vinculin, Metavinculin und  $\alpha$ -Actinin [172]. Gleichzeitig wurde eine kernständige Interaktion mit zwei hnRNP-Proteinen, Ptpb1 und Rod1 (Ptpb3), festgestellt. Es wurde vermutet, dass Raver1 zusammen mit Ptpb1 in der

mRNA-Prozessierung im Rahmen des alternativen Spleißens beteiligt ist. Dabei wurde angenommen, dass Ptbp1 und Raver1 im Anschluss einen Export-Komplex bilden, um einen Transport der reifen mRNA in das Zytoplasma zu vermitteln. Dies könnte zu einer Förderung der Translation von Adhäsionskontakt-spezifischen Proteinen wie Metavinculin führen [172, 208, 209]. Dabei schien die Interaktion zwischen Ptbp1 und Raver1 als Schlüssel für eine molekulare Funktion zu dienen.

Beide Proteine wurden neben einer kernständigen Ko-Lokalisierung ebenfalls in perinukleolären Kompartimenten (PNCs) angereichert vorgefunden [172]. Innerhalb dieser membranlosen Kondensate wurden ebenfalls Proteine wie Cug-bp, Ksrp und Raver2 oder RNA Pol III Transkripte wie ALU und SRP ko-lokalisiert vorgefunden [299-302]. Obwohl eine Funktion dieser Kondensate noch nicht abschließend geklärt ist, wurden sie in verschiedenen Zelltypen, wie primären, normalen, immortalisierten und kanzerogenen Zellen vorgefunden, jedoch mit stark erhöhter Prävalenz in Tumorzelllinien [260, 303]. Aus diesen Befunden und basierend auf Assoziationsbefunden wurde geschlossen, dass PNCs die Tumorprogression begünstigen. Innerhalb dieser Arbeit wurde ebenfalls eine PNC-Anreicherung sowie Interaktion von PTBP1 und RAVER1 in der LUAD-abgeleiteten Tumorzelllinie A549 festgestellt. Eine Ko-Lokalisierung und Ko-Immunopräzipitation wurde jedoch durch Mutationen in den vier vorhandenen PTBP1-RAVER1-Interaktionsmotive (PRI) aufgelöst. Dabei weisen PRI1 und PRI3 eine höhere Affinität zu PTBP1, im Vergleich zu PRI2 und PRI4, auf [216]. Eine Deletion der RNA-Erkennungsmotive (RRMs) von RAVER1 führte zwar zu einer verbleibenden Kernlokalisierung, jedoch kann abschließend keine Aussage bezüglich einer Anreicherung in PNCs, trotz verbleibender PTBP1-Interaktion, getroffen werden. Interessanterweise führte eine Deletion der intrinsisch ungeordneten Region (IDR) zur Auflösung einer RAVER1-PTBP1 Interaktion, jedoch konnten vereinzelte Anreicherungen beider Proteine innerhalb eines PNCs beobachtet werden. Vermutlich konnte eine Interaktion zwischen PTBP1 und RAVER1 mit verbliebener PRI1 des IDR-Deletionsfragmentes unterhalb der Detektionsgrenze stattfinden, wofür die vereinzelt schwachen Ko-Lokalisierungen sprechen. Hier bedarf es einer verbesserten Untersuchung mit niedrigerer Detektionsgrenze, beispielsweise durch Verwendung des *Proximity Ligastion Assays* (PLA), wie BioID oder APEX (*ascorbate peroxidase*). Bei dieser Methode erfolgt die *in situ* Biotinylierung von benachbarten Proteinen und anschließende Affinitätsaufreinigung mit massenspektrometrischer Analyse, sodass auch schwache und transiente Protein-Interaktionen identifiziert werden [304, 305]. Durch PLA-basierte Ko-Lokalisierungsstudien, als auch FRET (Fluoreszenz Resonanz Energietransfer) könnten diese Interaktionen *in situ* hinsichtlich der subzellulären Lokalisation der entsprechenden Protein-Komplexe charakterisiert werden.

Die Deletion der IDR von RAVER1 führt zu einer vermehrten Lokalisierung innerhalb des Zytoplasmas. Dabei scheint die IDR eine zentrale Rolle in der Lokalisierung und vermutlich auch bei der Funktion von RAVER1 zu spielen. IDRs sind essenziell für eine Phasen-Separation, ein Prozess, der zur Bildung von unter anderem PNCs führt, aber auch bei der Regulation einer Lokalisation [12, 306]. Insbesondere dienen IDRs aber als flexible Plattform für zahlreiche Interaktionen. Sie zeichnen sich durch eine geringe Sequenz-Komplexität aus und sind vorrangig durch repetitive Sequenzen sowie Anreicherungen von positiv- oder negativ-geladenen Aminosäuren gekennzeichnet, die für eine RNA- oder Protein-Interaktion von großer Bedeutung sind [12, 225]. Ein interessantes Beispiel ist die Interaktion zwischen dem vollständig ungeordneten TNRC6B und AGO2. TNRC6B bindet über seine GW-reiche Regionen an AGO2, wodurch eine Phasen-Separation und Bildung von *P-Bodies* herbeigeführt wird [16]. Dabei sind sowohl die AGO-Bindungsdomäne als auch die Glutamin-reiche Sequenz innerhalb der TNRC6-Proteinfamilie für die Phasen-Separation essenziell [274]. Durch die Inkorporation weiterer miRISC- und Deadenylierungs-Faktoren führt die Phasen-Separation zu einer Anreicherung der Ziel-mRNA und Faktoren des mRNA-Abbaus, wodurch eine erhöhte miRISC-Aktivität gewährleistet werden kann. Dabei vermittelt erneut TNRC6 weitere Interaktion mit dem CCR4/NOT Komplex, PABP oder PNA2/3 durch unterschiedliche repetitive Sequenzen [16, 51] und dient somit als flexibles Gerüst für multiple Interaktionen zur post-transkriptionellen Regulation. Ähnliches könnte bei RAVER1 der Fall sein, wobei die IDR eine Interaktion mit PTBP1 sowie für eine PNC- und Nukleus-Lokalisierung notwendig ist. Interessanterweise ist eine Assoziation zwischen einer erhöhten PNC-Prävalenz und einer verschlechterten Prognose für Brust- und Darmkrebs-Patienten beschrieben, ebenso wie ein erhöhtes Invasions- und Metastasierungspotential verschiedener Tumore [84-86, 303]. Es wurde vermutet, dass RAVER1 einen Einfluss auf eine Tumorprogression in Abhängigkeit seiner PNC-Anreicherung hat. Allerdings konnte unter RAVER1-Depletion und -Deletion kein Unterschied hinsichtlich der Größe oder der Anzahl der PTBP1-enthaltenen PNCs beobachtet werden, sodass eine PNC-Homöostase RAVER1-unabhängig scheint.

Kopp und Huang spekulierten, dass PNCs möglicherweise als Lager für neu synthetisierte RNA Pol III Transkripte und Proteine dienen und eine Funktion außerhalb dieser Strukturen stattfinden kann [307]. Dies legt nahe, dass eine Funktion von RAVER1, insbesondere im Zusammenhang mit einer bereits beschriebenen ko-regulatorischen Spleiß-Funktion, außerhalb der PNCs stattfindet [180]. Dabei gab es zu Beginn dieser Arbeit nur vereinzelte Hinweise auf eine Funktion von RAVER1 innerhalb des alternativen Spleißens. Neben der Strukturhomologie zu bereits bekannten Spleißfaktoren der hnRNP-Proteinfamilie, war lediglich eine ko-regulatorische Funktion mit PTBP1 innerhalb des alternativen Spleißens von TPM1 bekannt [172, 180]. NGS-Analysen von RAVER1- und PTBP1-depletierten

LUAD-abgeleiteter A549 Zellen, identifizierten 5000 alternativ gespleißte Transkripte. Im Laufe dieser Arbeit wurde zudem im Rahmen des ENCODE Phase 3 Projekts eine Studie veröffentlicht, bei der 356 RNA-bindende Proteine hinsichtlich ihrer differentiellen Genexpression und alternativ gespleißter Transkripte analysiert wurden [262]. Mit über 4000 alternativ gespleißten Transkripten in LHC-abgeleiteten Zelllinie Hep-G2, deuteten Nostrands *et al.* Analysen erneut darauf hin, dass RAVER1 im alternativen Spleißen involviert ist. Beide Analysen zeigen, dass RAVER1, ähnlich wie PTBP1, hauptsächlich in der Spleiß-Kategorie *Skipped Exons* involviert ist, welches sowohl das Inkludieren als auch das Exkludieren von Exonen beschreibt. Dabei wurde kein Unterschied hinsichtlich einer Präferenz zum In- oder Exkludieren eines Exons oder einer bevorzugten Exon Länge festgestellt. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass RAVER1 in Synergie mit PTBP1 die Regulation des alternativen Spleißens von etwa 20% der detektierten Transkripte vermittelt. Ebenfalls konnten CU-reiche Hexamer Motive innerhalb gespleißter Bereiche sowohl unter RAVER1-, als auch PTBP1-Depletion detektiert werden. Dabei bindet PTBP1 bevorzugt an CU-reiche Bereiche zur Regulierung des alternativen Spleißens, welches erneut auf eine ko-regulatorische Funktion beider Faktoren schließen lässt [176, 177, 271]. Es konnte jedoch ein größerer Anteil des RAVER1-vermittelten Spleißens identifiziert werden, der unabhängig von PTBP1 war. Zusätzlich wurden Motive innerhalb der alternativ gespleißten Exone identifiziert, die bekannte Motive weiterer RBPs, wie SRSF6, aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass RAVER1 mit weiteren Spleißfaktoren interagiert. Mithilfe von Affinitätspräzipitation und anschließender LC-MS/MS Analyse konnte eine Anreicherung von Spleißfaktoren in RAVER1-assoziierten Proteinen identifiziert werden. Interaktionen zwischen verschiedenen Spleißfaktoren sind nicht unüblich, wie bereits die Interaktion zwischen PTBP1 und RAVER1 andeutete. Eine Ko-Regulation des alternativen Spleißens wurde ebenfalls sowohl in humanen Zellen, wie bei hnRNP-M und ESPR1, als auch im Modellorganismus *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*) nachgewiesen [308]. Dabei vermitteln Protein-Komplexe, sei es durch Oligomerisierung (z.B. PTBP1) oder durch Interaktionen verschiedener alternativer Spleißfaktoren, einen effektiven und komplexen Spleiß-Mechanismus zur Generierung eines vielfältigen Proteoms [167, 308]. Insbesondere intrinsisch ungeordnete Proteine spielen dabei eine entscheidende Rolle, um flexible Interaktion zu ermöglichen. Die Mehrheit der in nukleären Speckles enthaltenen Spleißfaktoren, darunter auch die SRSF-Familie, sind intrinsisch ungeordnet [17]. Ebenfalls wird vermutet, dass die flexible C-terminale Region von RAVER1 dazu führt, dass PTBP1 an Chromatin-assoziierten RNA Pol II Transkripten binden kann und das ko-transkriptionelle Spleißen vermittelt. [183]. Es ist nicht auszuschließen, dass RAVER1 sowohl ein ko- als auch post-transkriptionelles Spleißen durch multiple Interaktionen mit verschiedenen Spleißfaktoren und/oder RNAs reguliert. Eine umfassende Analyse dieser Interaktionen erfordert jedoch weitere Untersuchungen. Unter anderem könnte hier erneut *Proximity Labeling* von Vorteil

sein, da diese eine *in situ* Protein-Protein Interaktion sowie der Position dieser Interaktion identifizieren könnten [304, 305]. Zusätzlich könnten hierbei *in situ* RNA-RAVER1 Interaktionen analysiert werden, wobei bereits *in vitro* Studien mit RNA-Fragmenten auf eine RNA-Bindung von RAVER1 hindeutete [211]. Initiale Analysen zur RAVER1-RNA Interaktion wurden mittels STAMP (*surveying targets by APOBEC-mediated profiling*) durchgeführt, lieferten jedoch keine ausreichenden Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Eine Optimierung dieser Methodik könnte effizient eine RBP-RNA Interaktion nachweisen, wobei durch eine APOBEC-vermittelte RNA-Mutationen (C zu U) nicht nur eine Ziel-RNA detektiert wird, sondern auch die exakte Bindestelle identifiziert werden kann.

Das intrinsisch ungeordnete Protein RAVER1 konnte in der LUAD-abgeleiteten Zelllinie A549 vorwiegend im Nukleus mit Anreicherungen in PNCs identifiziert werden. Ebenfalls wurde eine Interaktion und Ko-Lokalisierung mit PTBP1 bestätigt. Eine PNC-Homöostase war nicht durch RAVER1 beeinträchtigt, jedoch scheint die IDR essenziell für Lokalisierung und PTBP1-Interaktionen von RAVER1 in PNCs zu sein. Eine übergreifende Spleiß-Analyse bestätigte zudem erstmals eine tragende Funktion von RAVER1 im Rahmen des alternativen Spleißens. Bemerkenswert hieran ist, dass diese Regulation sowohl PTBP1-abhängig (ca. 20 % aller als signifikant identifizierten Spleiß-Ereignisse) aber im Wesentlichen PTBP1-unabhängig vermittelt wurde. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurden in der Arbeit erstmals weitere Interaktionen mit anderen Spleißfaktoren identifiziert. Diese Befunde legen nahe, in Anlehnung an die für PTBP1-RAVER identifizierten Funktionen im Spleißen, dass die IDRs von RAVER1 als eine versatile, flexible Plattform für funktionelle Interaktionen mit Spleißregulatoren dienen. Diese könnten zu einer dreidimensionalen Re-organisation der pre-mRNAs führen und dadurch diverse alternative Spleißvorgänge modulieren.

#### **4.2. RAVER1 als pro-onkogener Faktor in der LUAD-Tumorprogression**

In dieser Arbeit konnte erstmals das ubiquitär exprimierte Protein RAVER1 als pro-onkogener Faktor identifiziert werden. In einer Pan-Tumor-umfassenden Analyse war eine verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit mit erhöhter Expression von RAVER1 assoziiert, insbesondere im Fall von Lungenadenokarzinomen (LUAD). Ebenfalls wies der gut charakterisierte Spleißfaktor PTBP1 ähnliche Zusammenhänge einer verringerten Überlebenswahrscheinlichkeit auf, welches gleichzeitig mit einer RAVER1 Expression korrelierte. Während eine erhöhte Expression von PTBP1 bereits in diversen Tumorarten beschrieben war [200-202], wurde dies für RAVER1 erstmals im LUAD beobachtet. Eine dysregulierte Expression von Spleißfaktoren wurde bereits mehrfach beschrieben. Neben erhöhter Expression (z.B. SRSF3 [309]) oder verringerter Expression, wie bei RBFOX2 [310], können auch Mutation (z.B. bei SRSF2 [64]) das Tumorstadium fördern [32, 311].



Depletions- und Deletionsstudien zeigten, dass RAVER1 die Proliferation in 2D und 3D-Zellkulturmodellen sowie die Anoikis Resistenz in Zelllinien unterschiedlichster Tumorherkunft fördert. Im Gegensatz dazu zeigte eine PTBP1-Depletion moderat geringe Effekte bis hin zu keinen Effekten auf die Proliferation. *In vivo* Maus-Xenotransplantationen der RAVER1-deletierten A549 Zellen identifizierten ebenfalls einen pro-proliferativen Einfluss von RAVER1 auf das Tumorstadium und das Tumorgewicht. Interessanterweise wiesen Raver1-defiziente Mäuse keine Beeinträchtigung in ihrer Entwicklung, ihrer Anatomie oder ihrem Verhalten auf, jedoch wurde eine reduzierte Synapsen-Plastizität am Hippocampus beobachtet [219]. Des Weiteren ergaben Hochdurchsatz Screenings des IMPC (*The International Mouse Phenotyping Consortium*), dass Raver1-Knockout Mäuse ein reduziertes Milzgewicht, eine verringerte Knochenmineraldichte und interessanterweise auch Veränderungen im Immun- bzw. hämatopoetischen System aufwiesen (vgl. [www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1919016](http://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1919016); Stand: 25.09.2023) [312]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass RAVER1 im Normalgewebe geringere Auswirkungen hat, wie die Veränderung der Synapsen-Plastizität oder des hämatopoetischen System, während es in Karzinomen jedoch vermehrt exprimiert wird und die Proliferation fördert.

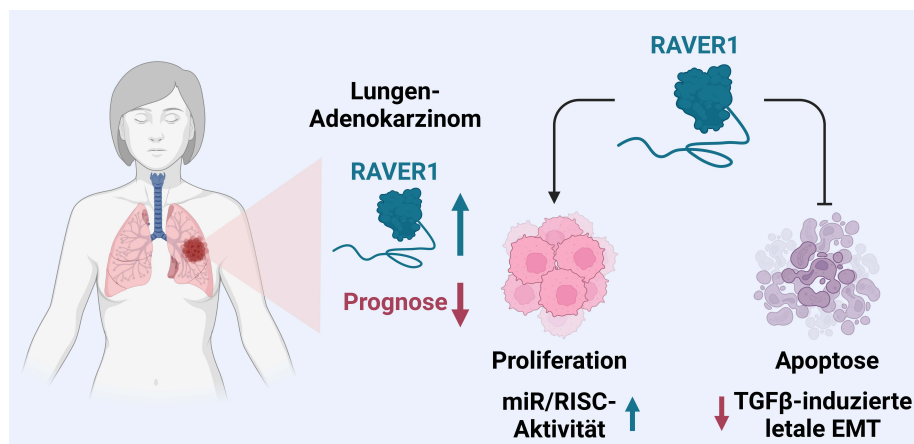
Analysen zur intrinsischen Apoptose deuteten zudem darauf hin, dass RAVER1 durch eine verringerte Caspase 3/7 Aktivität das Wachstum begünstigt. Caspasen, wie Caspase 3 und 7, spielen nicht nur eine entscheidende Rolle in der Induktion einer Apoptose, sondern auch in der Zellproliferation [313, 314]. Gleichzeitig wurde eine verminderte Proliferation auch mit einem konsistenten G1-Arrest unter RAVER1-Depletion in Verbindung gebracht [315]. Effekte auf die Apoptose oder den Zellzyklus durch eine PTBP1-Depletion konnte nicht oder nur marginal beobachtet werden, welches die moderaten proliferativen Effekten erklärt. Obwohl eine Überexpression von RAVER1 nicht den erwarteten erhöhten Zellproliferationseffekt zeigte, führte eine Re-Expression von RAVER1 in RAVER1-deletierten Zellen zu einer moderaten Wiederherstellung der Proliferation, weshalb auf einen RAVER1-vermittelten Effekt auf die Proliferation ausgegangen werden kann.

Anhand der *in vitro* und *in vivo* Analysen zeigte sich, dass RAVER1 eine pro-onkogene Rolle auf verschiedene Tumor-abgeleiteten Zelllinien besitzt. Dies äußerte sich in Auswirkungen auf die Proliferation, Apoptose und Zellzyklus, wobei RAVER1 im Vergleich zu PTBP1 stärkere Effekte aufwies. GSEA-Analysen basierend auf Genexpressionsänderungen bestätigten die beobachteten phänotypischen Auswirkungen, unter anderem durch stark reduzierte proliferative Signalwege wie E2F und MYC [316, 317]. Überraschenderweise wurden auch Anreicherungen der Gen-Sets TGF $\beta$ -Signalweg und EMT unter Depletion detektiert. Ein konservierter Effekt auf die Genexpression wurde mithilfe der Sequenzierungsdaten des ENCODE Projekts [262] beobachtet. Neben Änderungen in der RNA-Abundanz TGF $\beta$ - und EMT-assoziiierter Gene, wurden zusätzlich morphologische Veränderungen der

RAVER1-depletierten A549 in Richtung eines mesenchymalen Zellcharakters festgestellt [131, 264]. Obwohl der TGF $\beta$ -Signalweg und EMT als proliferationsfördernd beschrieben waren, woraus auch der Name des *transforming growth factor* resultierte [318], wurde unter RAVER1-Depletion und -Deletion die Induktion einer letalen EMT unter TGF $\beta$ -Stimulus festgestellt [265, 266]. Eine Induktion der Apoptose konnte dabei einer erhöhten Expression von letalen EMT Markern wie SMAD4, SOX4, BIM und BMF und gleichzeitiger Repression von KLF5 zugeordnet werden. Dabei führt eine TGF $\beta$ -vermittelte Signalweiterleitung zu einer Kooperation der Transkriptionsfaktoren KLF5 und SOX4, wodurch eine Tumorprogression gefördert wird [265, 267]. In SMAD4-exprimierenden Zellen des KRAS-mutierten duktales Pankreas-Adenokarzinoms (PDAC) führte jedoch eine TGF $\beta$ -vermittelte Expression des Transkriptionsfaktors SNAIL zur Repression von KLF5, während SOX4 eine Expression der pro-apoptischen Faktoren BIM und BMF förderte (vgl. Abbildung 20A). RAVER1-depletierte A549, welche ebenfalls eine KRAS (G12S) Mutation besitzen, wiesen Änderungen dieser letalen EMT-Marker sogar ohne TGF $\beta$ -Stimulus auf. Dies lässt vermuten, dass RAVER1 den TGF $\beta$ -Signalweg negativ beeinflusst, vermutlich durch eine Reduktion der TGF $\beta$ -Rezeptoren TGFBR1 und TGFBR2.

Die TGF $\beta$ -vermittelte Induktion einer EMT wird dabei durch Faktoren des TGF $\beta$ -Signalweges, wie TGFBR1 und TGFBR2, und daraus resultierender Genexpression von EMT-fördernden Transkriptionsfaktoren, wie der SNAI-Proteinfamilie, TWIST und ZEBs gefördert [131]. MicroRNAs, in diesem Fall vor allem die miR-200 Familie, können hingegen eine Repression der TGF $\beta$ -assoziierten Faktoren wie TGFBR1/2 regulieren [103, 134]. GSEA-Analysen RAVER1-depletierter A549 und Hep-G2 untermauerten dabei eine überwiegend angereicherte Expression von microRNA regulierten Transkripten, unter anderem auch von Ziel-mRNAs der miR-200 Familie. Allerdings wurde keine Veränderung der microRNA-Abundanz unter RAVER1-Depletion und -Deletion beobachtet. Reporteranalysen legen nahe, dass RAVER1 einen Einfluss auf die miR/RISC Aktivität, nicht aber auf die miR-Biogenese besitzt. Gleichzeitig wurde unter PTBP1-Depletion nur ein geringerer Trend auf die miR/RISC Aktivität beobachtet, welches die moderaten phänotypischen Effekte erklärt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass RAVER1 einen pro-onkogenen Einfluss auf die Tumorzellproliferation besitzt und gleichzeitig die Repression des TGF $\beta$ -Signalweges sowie der EMT bewirkt (Abbildung 34). Dies könnte durch eine Modulation der miR/RISC-abhängigen post-transkriptionellen Regulation vermittelt werden. Eine Funktion von RAVER1 innerhalb der Tumorzellproliferation scheint dabei nicht ausschließlich durch die PTBP1-Interaktion vermittelt zu werden



**Abbildung 34: Schematische Darstellung der pro-onkogenen Funktion von RAVER1.** Eine erhöhte Expression von RAVER1 im LUAD ist mit einer verringerten Prognose assoziiert. RAVER1 fördert die Tumorzellproliferation bei gleichzeitiger Inhibierung der Apoptose. Vermittelt wird dies durch eine erhöhte miR/RISC-Aktivität und reduzierte TGFβ-induzierte letale EMT.

#### 4.3. RAVER1 agiert als alternativer Spleißfaktor und beeinflusst die Tumorprogression

Eine Funktion von RAVER1 innerhalb der Spleiß-Regulation wurde auf Basis seiner Strukturhomologie zu der bereits beschriebenen und funktionell bekannten hnRNP-Proteinfamilie und seiner vereinzelt beschriebenen Funktion in der Ko-Regulation des alternativen Spleißens vermutet [172, 180]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine pro-onkogene Eigenschaft identifiziert, die initial einer übergreifenden Funktion innerhalb des alternativen Spleißens galt. Anhand der zuvor beobachteten Modulierung der miR/RISC Aktivität lag eine Regulation des alternativen Spleißens durch RAVER1 dieser Faktoren nahe. Insgesamt waren in der *in silico* Spleiß-Analysen 21 der 30 Hauptfaktoren des miR/RISC-Signalweges alternativ gespleißt durch RAVER1, weniger aber durch PTBP1, welches in einigen Fällen ebenfalls zu einer veränderten RNA-Abundanz, wie bei der TNRC6-Familie, führte. Eine Validierung per PCR von 9 der 30 Faktoren zeigte, dass in ~ 90 % der Fälle die Vorhersage der rMATS-Analyse mit einer semi-quantitativen PCR übereinstimmte. Eine konservierte Regulation einzelner Faktoren wurde zudem in Deletions- und Re-Expressionsstudien sowie Zelllinien-übergreifend festgestellt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass RAVER1, nicht aber PTBP1, sowohl an der Exklusion von GW-reichen Bereichen (TNRC6A, TNRC6B), als auch an der Inklusion GW-armer Exons (TNRC6C) der TNRC6-Familie beteiligt ist. Hierbei spielen GW-reiche Bereiche eine essenzielle Rolle in der Interaktion mit der AGO-Familie, wodurch weitere Faktoren, wie dem CCR4/NOT-Komplex, rekrutiert werden und eine post-transkriptionelle Regulation vermittelt wird [274, 319, 320]. Eine geringere Interaktions-Affinität von TNRC6B und AGO2 war zu beobachten, sobald das GW-reiche Exon 6 exkludiert wurde. Die Analyse der TNRC6B-AGO2-Interaktion verdeutlicht hierbei, dass alternativ gespleißte Transkripte zu

modulierten Protein-Isoformen führen, mit dem Resultat veränderter Interaktionen und somit auch weiterer *downstream* Funktionen [321]. Interessanterweise konnte Yang *et al.* bereits zeigen, dass nur etwa 21 % der alternativ gespleißten Transkripte dasselbe Protein-Interaktionsprofil aufweisen [273]. Die hier festgestellten verringerten Interaktionen zwischen GW-ärmeren TNRC6B und AGO2, vermittelt durch RAVER1-reguliertes alternative Spleißen, könnten ein Resultat einer verringerten Komplex-Assemblierung, einer schnelleren Disassemblierung oder einer geringeren Komplex-Stabilität sein. Ob dies mit einer Modulation der katalytischen Aktivität des miR/RISC in Zusammenhang steht, bleibt vorerst zu spekulieren. Denkbar wäre eine schnellere Dissoziation des Exon 6 exkludierten TNRC6B, sodass in kürzerer Zeit mehr mRNA-Zieltranskripte rekrutiert und reprimiert werden können. Jedoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass das alternative Spleißen eines einzelnen Faktors zu einer modulierten Aktivität eines komplexen Mechanismus' führt, sondern die Gesamtheit verschiedener Spleiß-Ereignisse mehrerer Komponenten in einem ineinandergreifenden Effekt resultiert [322, 323].

Es ist somit zu schließen, dass RAVER1 durch das alternative Spleißen die Funktionalität verschiedener Faktoren innerhalb des miR/RISC Komplexes, aber auch weiterer Faktoren, wie dem CCR4/NOT Komplex, moduliert. Zum einem könnte dies durch Änderung der RNA-Abundanz entstehen, falls alternative Isoformen zu einem Abbau des Spleiß-Produktes führen [324]. Zum anderen könnten veränderte Protein-Protein-Interaktion oder modulierten RNA-Protein-Interaktion durch alternatives Spleißen bedingt werden, mit dem Resultat einer durch RAVER1 geförderten miR/RISC Aktivität [273, 325]. Inwieweit alternativ gespleißte Transkripte jedoch Unterschiede in ihren Interaktionen aufweisen, sollte weiter analysiert werden. Die Betrachtung der TNRC6B-AGO2-Interaktion war hier nur eine initiale Analyse, die auf weitere Spleiß-Transkripte ausgeweitet werden sollte.

Zusätzlich zeigten LC-MS/MS Analysen eine Interaktion zwischen RAVER1 mit zytoplasmatischen sowie nukleären Komponenten des CCR4/NOT Komplexes, unter anderem CNOT1 (vgl. Wedler *et al.* (2023); *supplementary table 11* [272]) [326]. Inwieweit diese Interaktion eine post-transkriptionelle Regulation, im spezielleren eine Deadenylierung beeinflusst, bleibt bisher ungewiss [53]. Eine Analyse der Poly(A)-Längen selektiver Transkripte zeigte unter RAVER1-Depletion jedoch keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt). Da die Identifizierung der RAVER1-CNOT1-Interaktion auf nukleären Fraktionen basierte, ist eher davon auszugehen, dass eine Interaktion mit einer nukleären Funktion verbunden ist. Neben einer bereits beschriebenen post-transkriptionellen Regulation, interagiert CNOT1 unter anderem auch im Nukleus mit Transkriptionsfaktoren wie MYC und inhibiert eine Transkriptionsaktivierung [326, 327]. Es bedarf darüber hinausgehender funktioneller Untersuchungen hinsichtlich dieser und weiterer Interaktionen.

Allerdings kann der insgesamt moderate Effekt auf die miR/RISC Aktivität durch RAVER1 nicht die alleinige Erklärung der stark affizierten Signalwege, wie dem TGF $\beta$ -Signalweg und der EMT, sowie der damit einhergehenden phänotypischen Veränderungen sein. Die durchgeführten ORA-Analysen deuteten dabei nicht nur auf ein alternatives Spleißen innerhalb der miR Prozessierung, sondern auch innerhalb des Zellzyklus und der DNA Reparatur, wodurch eine Proliferation gefördert werden könnte [328, 329]. RAVER1 und PTBP1 scheinen ebenfalls gemeinsam Transkripte innerhalb der Zytoskelett Organisation alternativ zu spleißen. Dass ein Zusammenhang zwischen einer modulierten Zytoskeletten Organisation und einer Zellmotilität und somit einer Invasion und Metastasierung besteht, konnte unter anderem in Darmkrebs beobachtet werden [330, 331]. Ferner wurde auch eine Anreicherung alternativer Transkripte innerhalb der Signalwege wie Notch und WNT detektiert, die eine zentrale Rolle in zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung und Migration, spielen [276, 332]. Interessanterweise zeigten ORA-Analysen der alternativ gespleißten Transkripte aber auch eine Anreicherung innerhalb des TGF $\beta$ -Signalweges, nicht aber von EMT-assoziiierter Gen-Sets. Eine Analyse verschiedener TGF $\beta$ -assoziiierter Gen-Sets identifizierte hierbei, dass RAVER1, aber auch PTBP1 bei ~ 20 % der analysierten Gene eine Exon-Exklusion in A549 und Hep-G2 regulieren. Die hohe Anzahl an Spleiß-Ereignissen innerhalb TGF $\beta$ -assoziiierter Gene lässt auf eine Regulation der Signalweiterleitung durch alternatives Spleißen schließen [311]. Unter anderem identifizierten *in silico* Spleiß-Analysen das Transkript TAK1, welches sowohl von RAVER1 als auch PTBP1 alternativ gespleißt wurde. Dabei führt eine RAVER1- oder PTBP1-vermittelte Inklusion des Exon 12 vermutlich zu einer vermehrten TAB2/3 Bindung der Kinase. Eine Studie von Tripathi *et al.* stellte zudem einen Verlust der NF $\kappa$ B-Aktivierung durch TAK1 mit inkludiertem Exon 12 fest [282]. Als zusätzliches RAVER1-spezifisches Ereignis wurde zudem die Inklusion des Transmembrankodierenden Exon 3 von TGFBR1 beobachtet. Es wird ein Einfluss auf die TGF $\beta$ -Signalweiterleitung durch Beeinflussung der Rezeptorstruktur vermutet. Eine fehlende Transmembrandomäne führte dabei zu einer reduzierten TGF $\beta$ -initiierten Genexpression [279]. Dabei deutet die Literatur auf eine erhöhte TGF $\beta$ -vermittelte Signaltransduktion durch vermehrte Inklusion der betroffenen Exone von TAK1 und TGFBR1 [279, 282]. Dies steht teilweise in Kontrast zu den beobachteten erhöhten TGF $\beta$  und EMT Gen-Sets unter RAVER1-Depletion mit vermehrter Exklusion der betroffenen Exone. Die Studie um Tripathi *et al.* verdeutlicht hierbei aber, dass die Inklusion eines Exons nicht zu einem *On-Off Switch* in der Signalweiterleitung führt, sondern einzelne Aktivierungen der JNK und p38 Kaskade fortgeführt werden, während andere Kaskaden inhibiert werden [282]. Gleichzeitig konnte ein inhibitorischer Effekt von TAK1 auf eine SMAD-Aktivierung nach BMP (*bone morphogenetic proteins*) /TGF $\beta$ -Stimulus gezeigt werden [333]. Es bleibt vorerst nur zu spekulieren, ob ein RAVER1-vermitteltes Spleiß-Ereignis von TAK1 vermehrt zu einer Inhibition des

SMAD-abhängigen kanonischen TGF $\beta$ -Signalwegs führt. Genauso wie dies mit einer Phosphorylierungsstelle, welche in unmittelbarer Nähe zum inkludierten Exon liegt, in Zusammenhang steht [281]. Hierbei würden Reporter-Analysen unterschiedlicher MAPK sowie Re-Expressionsstudien bestimmter Spleiß-Transkripte Aufschluss über betroffene Signalkaskaden liefern. Insgesamt zeigt sich jedoch, dass vor allem RAVER1, aber auch PTBP1 durch alternatives Spleißen an der Modulation intrinsischer Signalkaskaden beteiligt sind.

Dabei ist die TGF $\beta$ -vermittelte Signalkaskade besonders komplex durch ihre tumorsuppressiven oder pro-onkogenen Eigenschaften, je nach zellulärem Kontext [162, 165, 334]. Auf der einen Seite induziert TGF $\beta$  eine EMT, welche zur Tumorprogression, Invasivität und Metastasierung führt [335, 336]. Auf der anderen Seite induziert der TGF $\beta$ -Signalweg einen SMAD-abhängigen Zellzyklus-Arrest [162, 334, 337]. In der frühen Tumorgenese wird vermutet, dass Zellen sensitiv auf TGF $\beta$  reagieren und eine tumorsuppressive Funktion vermittelt werden kann. Inaktivierende Mutationen, Deletion der Genexpressionsänderungen führen zu einer Unempfindlichkeit gegenüber TGF $\beta$ , wodurch Wachstums-inhibitorischen Effekte umgangen werden und alternative Signalkaskaden zur Induktion onkogener Genexpression verwendet werden [163, 165, 336]. Und obwohl eine TGF $\beta$ -induzierte EMT generell als Marker einer Tumorprogression mehrfach beschrieben wurde, so konnte ebenfalls eine pro-apoptotische Seite einer EMT in Adenokarzinomen des Pankreas festgestellt werden [265]. Dabei kann der Transkriptionsfaktor SOX4 von einer onkogenen zu einer pro-apoptotischen Funktion umschwenken, wie bereits in 4.2 beschrieben. Die vorliegenden Daten deuten dabei darauf hin, dass RAVER1 eine onkogene Funktion vermittelt, indem alternativ gespleißte Transkripte zu einer Repression der tumorsuppressiven TGF $\beta$ -Kaskade führen. Damit einhergehend kann durch RAVER1 ebenfalls eine letale EMT verhindert werden, wodurch insgesamt eine Tumorprogression sichergestellt werden kann.

Biologische Depletionsstudien mit anschließender RNA-Sequenzierung und *in silico* Spleiß-Analysen lassen schließen, dass RAVER1 als alternativer Spleißfaktor vermehrt einen Einfluss auf proliferationsfördernde Signalwege besitzt [336]. Hierbei kann jedoch nicht ein einzelnes Ereignis oder ein spezifischer Signalweg genannt werden, der durch den Einfluss des Spleißregulators RAVER1 die Tumorprogression allein reguliert. Insbesondere wenn unter anderem TGF $\beta$ -, TNF $\alpha$ - oder IL- stimulierte Signalwege miteinander vernetzt sind, mit Auswirkungen wie Proliferation und Immunreaktion [283, 287, 338]. Auch wenn in den vorliegenden GSEA-Analysen PTBP1 und RAVER1 einen ähnlichen Effekt auf die Genexpression besitzen, so wurden doch geringere Auswirkungen auf die Proliferation durch PTBP1 beobachtet. Insgesamt scheint PTBP1 als alternativer Spleißfaktor einen größeren Effekt auf assoziierte Gene des Zytoskeletts und der Organell-Assemblierung zu haben, teilweise auch auf proliferative Signalwege, welche aber insgesamt weniger ausgeprägt

waren. Es ist jedoch anzumerken, dass dies ein Zelllinien- abhängiger Effekt sein könnte, da bereits vermehrt ein pro-proliferativer Effekt von PTBP1 nachgewiesen wurde [70, 254]. Ebenfalls wären Kompensationseffekte der Paraloge nPTB/PTBP2 oder ROD1/ PTBP3 möglich. Eine PTBP1-Depletion in A549 zeigt keine Expressionsänderungen von PTBP3, jedoch einen PTBP2- $\log_2FC$  von 3. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass die Veränderung des absoluten FPKM von 0,9 (Kontroll-Population) auf 7,1 (PTBP1-Depletion) im Vergleich zur Abundanz von PTBP1 unter Normalbedingung (90 FPKM) relativ klein ist (vgl. Wedler *et al.* (2023), *supplementary table* TS6 [272]). Ähnliches wird auch durch Depletion in Hep-G2 Zellen (ENCODE-Datensatz) beobachtet. Daher wären zusätzliche Analysen, wie einer shRNA-medierten Depletion von Vorteil, um die beobachteten PTBP1-Effekte zu bestätigen und einen *Off-Target* Effekt oder Kompensationseffekte der verwendeten siRNAs auszuschließen. Ebenfalls könnte eine simultane Depletion aller drei PTBP-Paraloge verhelfen, um Kompensations-Reaktionen zu verhindern.

Zusammenfassend agiert RAVER1 als Spleißregulator und fördert eine Tumorzellproliferation. Alternativ gespleißte Transkripte modulieren eine miR/RISC Aktivität, welches zur verstärkten Repression tumorsuppressiver mRNAs führt. Ebenfalls inhibiert RAVER1 durch alternatives Spleißen (in der Regel) Tumor-inhibitorische Signalkaskaden und induzierter Genepression, wie dem TGF $\beta$ -Signalweg. Obwohl durch PTBP1 ebenfalls ähnliche Faktoren alternativ gespleißt wurden, so führten diese nur zu moderaten Veränderungen innerhalb der betroffenen Signalwege und somit nur zu einer sehr geringfügigen Förderung der Tumorzellproliferation.

#### 4.4. Regulation der zellulären Immunantwort durch RAVER1?

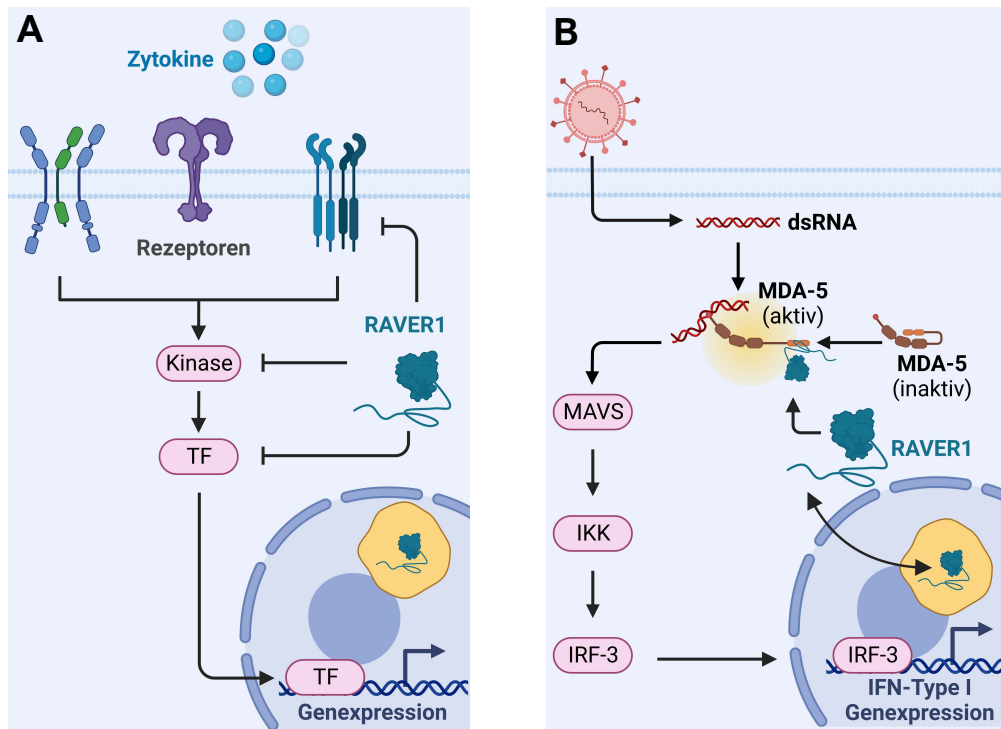
Neben einer Funktion als Regulator des alternativen Spleißens, wurde RAVER1 ebenfalls mit der Aktivierung der MDA5-medierte angeborenen Immunantwort in Verbindung gebracht [210]. Dabei bindet RAVER1 über seinen intrinsisch ungeordneten Bereich die CARD-Domäne (*caspase recruitment domain*) von MDA5, wodurch eine MDA5-vermittelte Induktion von antiviralen Genen gefördert wird. Dies betrifft unter anderem die Aktivierung von ISRE, NF $\kappa$ B und IFN-Promotoren. Gleichzeitig wurde RAVER1 eine potenzielle Rolle in der SARS-CoV-2-vermittelten COVID-19 Erkrankung zugeordnet [223]. Hierbei stand ein Einzelnukleotid-Polymorphismus in Assoziation mit einer schweren Covid19 Erkrankung. Diese Mutation befindet sich in der 3' UTR-Region von RAVER1, sodass vermutet wurde, dass ein schwerer Krankheitsverlauf mit einer verringerten RAVER1-vermittelten MDA5-Aktivierung und somit reduzierter Expression von antiviralen Genen zusammenhängt.

Im Rahmen der durchgeführten GSEA-Analysen konnten festgestellt, dass A549 Zellen unter RAVER1-Depletion ein ähnliches Expressionsmuster aufwiesen, wie A549 Zellen, die mit SARS-CoV-2 oder einem Respiratorisches-Synzytial-Virus infiziert wurden. Somit bildet eine

RAVER1-Depletion die Expressionsänderungen einer viralen Infektion ab, welches eine inhibitorische Funktion von RAVR1 auf immunregulatorische Signalwege nahelegt. Hallmark GSEA-Analysen deuten dabei auf eine RAVR1-vermittelte Regulation der Immunantwort via TNF $\alpha$ /NF $\kappa$ B-, IL2/STAT5- und IFN-Signalwege (vgl. Anhang, Tabelle 14) Dabei wurde vermutet, dass RAVR1 eine Modulation der Immunreaktion durch Regulation des alternativen Spleißens innerhalb verschiedener Signalkaskaden vermittelt. Depletionsstudien mit anschließender *in silico* Spleiß-Analysen detektierten dabei eine Anreicherung von alternativ gespleißten Transkripten innerhalb Infektions-assoziiierter Gen-Sets. Eine Ko-regulatorische Funktion von RAVR1 und PTBP1 konnte auch hier bei einigen Faktoren, die in der angeborenen Immunantwort eine Rolle spielen, festgestellt werden. Unter anderem wurde eine Exon-Exklusion der Kinase IKK $\beta$  durch RAVR1 und PTBP1 detektiert, sodass ein Einfluss auf die katalytische Aktivität mit Auswirkungen auf eine NF $\kappa$ B Signalweiterleitung vermutet wird [285, 286]. Ebenfalls ließen rMATS-Analysen eine RAVR1-spezifische Inklusion zweier Exone des Transkriptes TRAF3 beobachten, welches sowohl aktivierende als auch inhibitorische Funktionen innerhalb einer Zytokin-vermittelten Signalkaskade aufweist [291, 293]. Dabei wurde bereits eine Assoziation zwischen Inklusion dieser Exone und einer fehlgeschlagenen NF $\kappa$ B-Aktivierung festgestellt, jedoch führten Isoformen mit Exklusion eines oder beider Exone zu einer Aktivierung der Signalkaskade [289, 294]. Ebenfalls zeigte eine Überexpression von TRAF3 eine erhöhte Virus-induzierte IFN $\beta$ -Produktion und antivirale Antwort, während eine TRAF3-Depletion zu einer erhöhten Virus-Replikation führte [339]. Interessanterweise wird eine erhöhte TRAF3-Expression unter RAVR1-Depletion beobachtet (vgl. Wedler *et al.* (2023); *supplementary table* TS6 [272]), womöglich durch einen direkten Einfluss von alternativen Spleiß-Transkripten mit höherer mRNA-Stabilität oder durch Repression der miR/RISC-Aktivität und somit indirekt erhöhter RNA-Abundanz [340, 341]. PTBP1 spleißt in einem RAVR1-unabhängigen Mechanismus IL17RC, wodurch eine Interleukin-Bindung aufgrund der verkürzten extrazellulären Domäne wahrscheinlich beeinträchtigt ist [297]. Interessanterweise ist RAVR1 ebenfalls an der Regulation des Spleißens anderer Interleukin-Rezeptoren, wie IL6R, aber auch weiterführender Faktoren, wie IL6ST (IL-6 *signal transducer*) beteiligt (vgl. Wedler *et al.* (2023); *supplementary table* TS8 [272]). Jüngst konnten RAVR1 und PTBP1 ebenfalls als Ko-Regulatoren des alternativen Spleißens von RIPK1 in Makrophagen identifiziert werden [224]. Dabei spielt RIPK1 eine essenzielle Rolle in der zellulären Entscheidung zwischen überlebensfördernden und pro-apoptischen Stimuli [342]. In den hier analysierten A549 und Hep-G2 Zellen wurde ein alternatives Spleißen von RIPK1 nur marginal in A549 mit PTBP1-Depletion beobachtet (vgl. Wedler *et al.* (2023); *supplementary table* TS8 [272]), welches ein Makrophagen-spezifisches Spleißen des Transkriptes vermuten lässt.



Insgesamt deuten die durchgeführten Analysen auf ein RAVER1- und PTBP1-mediertes alternatives Spleißen von Rezeptoren oder katalytisch aktiven Kinasen, welche einen Einfluss auf Zytokin-vermittelte Signalweiterleitung zur Immunabwehr besitzen. RAVER1 agiert als Spleißfaktor Signalweg-übergreifend, welches neben TGF $\beta$ -induzierter Tumorzellproliferation auch Signalwege der Immunantwort involviert. Unter anderem betraf dies auch respiratorische Infektionen von Tumorzellen, sodass vermutet wird, dass RAVER1 ebenfalls eine immunregulatorische Funktion besitzt. Da RAVER1 ebenfalls ubiquitär in nahezu allen nicht-kancerogenen Geweben und diversen Zelltypen, darunter auch in hämatopoetischen Zellen, exprimiert wird, ist es naheliegend, dass RAVER1 ein Modulator des angeborenen Immunsystems ist. Besonders auffällig ist hierbei der Wechsel von einem pro-onkogenen Faktor hinzu zu einem tumorsuppressiven Faktor innerhalb von Hepatitis-infizierten Hepatozellulären Karzinomen (HCC, *Hepatocellular carcinoma*). Überlebensanalysen von HCC-Patienten zeigen eine gegensätzliche Überlebenswahrscheinlichkeit für RAVER1 und PTBP1, je nach Infektions-Status (siehe Abbildung 38 im Anhang). So wird für RAVER1 und PTBP1 jeweils eine erhöhte Expression mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit von Hepatitis-negativen Patienten assoziiert, während Patienten mit Hepatitis bei einer erhöhten Expression der Spleißfaktoren mit höherer Wahrscheinlichkeit länger überleben. Speziell der Umschwung von pro-onkogenen zu tumorsuppressiven Eigenschaften in Virus-infizierten Karzinomen deutet auf eine gegensätzliche Wirkungsweise der Spleißfaktoren RAVER1 und PTBP1, je nach Tumor-Mikroumgebung. In nicht-infizierten Tumorzellen fördern beide Proteine die Repression des TGF $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Signalweges und gleichzeitig die Induktion einer E2F- und MYC-regulierten Genexpression, mit dem Resultat einer erhöhten Tumorzellproliferation. Vermutlich wird dies durch alternatives Spleißen von Rezeptoren, Kinasen und weiteren signalübertragenden Faktoren innerhalb einer TGF $\beta$ -, NF $\kappa$ B- oder IL-induzierten Signalkaskade vermittelt, weshalb eine Immun-inhibitorische Funktion von RAVER1, aber auch PTBP1 zu vermuten ist (Abbildung 35A). Auf der anderen Seite fördert RAVER1 unter Infektion eine MDA5-vermittelte Aktivierung der Typ I IFN-Promotoren, wodurch eine angeborene Immunantwort ausgelöst wird (Abbildung 35B) [343]. Diese kann zu einer Inhibierung des Tumorwachstums führen [344]. Dabei könnte der Wechsel vom Onkogen zum Tumorsuppressor durch eine Veränderung der vermittelten Funktion vom nukleären alternativen Spleißregulator zur zytoplasmatischen MDA5-Aktivierung bedingt werden. In nicht-infizierten Tumorzellen deuten die hier erfolgten Analysen auf eine nukleäre Funktion innerhalb des alternativen Spleißens. Gleichzeitig kann RAVER1, wie auch PTBP1, aber auch im Zytoplasma lokalisiert vorkommen [171, 172]. Da RAVER1 ebenfalls in Zellkern-freien Zelltypen, wie Erythrozyten, exprimiert wird (Daten von *The Human Protein Atlas*), sind weitere zytoplasmatische Funktionen naheliegend.



**Abbildung 35: RAVER1 beeinflusst immunregulatorische Signalwege. (A, B)** In Tumorzellen beeinflusst RAVER1 durch alternatives Spleißen unterschiedliche Zytokin-vermittelte Signalwege und fördert hierdurch eine Immunevasion (A). In infizierten Zellen migriert RAVER1 ins Zytoplasma und fördert eine Immunantwort durch Aktivierung einer MDA5-vermittelten Signalkaskade (B).

Interessanterweise konnte in Zellen entstammend vom Seebarsch (*Lateolabrax japonicus*; Lj) beobachtet werden, dass LjRAVER1 primär im Nukleus lokalisiert ist, jedoch unter RGNNV-Infektion (*redspotted grouper nervous necrosis virus*) vollständig ins Zytoplasma migriert [345]. Ähnliches konnte in initialen, nicht repräsentativen Poly(I:C)-Infektionen von A549 Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In infizierten Zellen könnte RAVER1 durch einen Export in das Zytoplasma eine Funktion durch eine RAVER1-Protein-Interaktion, wie MDA5, oder durch eine RAVER1-RNA-Interaktion vermitteln. Interessanterweise wurde ebenfalls eine Interaktion zwischen RAVER1 und SARS-CoV-2 Proteinen, wie ORF8 und ORF14 festgestellt (vgl. Wedler *et al.* (2023), *supplementary table* TS11 [272]), wobei Proteine dieser Art essenziell für eine Virus-Replikation und der Wirts-Immunevasion sind [346]. Somit kann auch hier eine Regulation des angeborenen Immunsystems durch Protein-Interaktionen vermutet werden. Interessant wäre auch hier zu erfahren, ob diese Interaktion abhängig von der IDR von RAVER1 sind. Ähnlich zu der Hypothese der Orts-spezifischen Translation an Adhäsionskontakten [209], wäre ein RAVER1-vermittelter Export benötigter Transkripte an spezifische Organellen, die an einer Immunantwort beteiligt sind, ebenfalls denkbar.

PTBP1 konnte bereits mehrfach eine multifunktionale Regulation nachgewiesen werden. Im Nukleus fungiert PTBP1 als alternativer Spleißfaktor, kann eine Polyadenylierung regulieren [347] oder am mRNA Export [170] beteiligt sein. Im Zytoplasma ist PTBP1 an der Regulation der mRNA-Stabilität [190] und -Lokalisierung [217] beteiligt, ebenso wie an einer

IHRES-abhängigen Translation zellulärer und viraler mRNAs [192, 193]. So kann PTBP1 unter anderem eine Cap-unabhängige HCV-Translation durch Bindung an dessen IRES initiieren und eine Virus-Replikation fördern [192, 348]. Ob eine ähnlich breite Funktion ebenfalls für RAVER1 der Fall ist, bleibt vorerst nur zu spekulieren. Es bedarf weiterer tiefgehender Analysen vor allem unter verschiedener Zytokin-Stimulation sowie unter Infektionsbedingungen, um detailliertere Aufschlüsse über eine modulierte Signalweiterleitung zu erhalten. Nichtsdestotrotz kann für beide Proteine eine Funktion außerhalb des alternativen Spleißens hin zu einer viralen Regulation, sei es zur Förderung einer IRES-abhängigen viralen Replikation (PTBP1) oder einer MDA5-vermittelten Immunantwort nach Infektion (RAVER1), vermutet werden. Und obwohl dies gegenteilige Funktionen darstellen, so scheinen sie einen ähnlichen Mechanismus in Hepatitis-positiven Leberkarzinom-Patienten und einer verbesserten Überlebensprognose sowie der generellen Repression Immun-assoziiertes Signalwege in Tumorzellen zu teilen. Eine Aufklärung dieses Mechanismus könnte ein weiteres Puzzleteil zum Verständnis von inflammatorischen und kanzerogenen Erkrankungen beitragen, sowie neue therapeutische Ansätze zu entwickeln. Dabei wird ein Anstieg der Resistenz gegenüber üblichen Therapieformen wie Bestrahlung, Zytostatika oder Immuntherapien vermehrt beobachtet [349]. So konnten Resistenzen gegen Chemotherapeutika bereits auf eine abnormale Expression von Spleißfaktoren, wie SRSF1, oder alternativ gespleißte Transkripte (z.B. BIM) zurückgeführt werden [32, 39]. Aber auch die Tumor-Mikroumgebung und Mechanismen zur Tumorevasion während einer Tumorprogression und Metastasierung fördern eine Therapieresistenz [349]. Umso wichtiger wird das Verständnis der molekularen Mechanismen von bisher unbekannteren Proteinen. Eine Reduktion von RAVER1 selbst scheint für einen therapeutischen Ansatz eher ungeeignet, da eine Inhibierung des ubiquitär exprimierten Proteins ebenfalls zu einem überreagierenden Immunsystem oder einer vereinfachteren viralen Infektion in nicht-kanzerogenen Geweben führen könnte. Jedoch könnten Informationen über RAVER1-Protein-Interaktionen dafür genutzt werden, um chemische Komponenten zur Inhibierung dieser Interaktion zu entwerfen, ähnlich wie die Komponente BTYNB die Bindung von IGF2BP1 an die MYCN-mRNA inhibiert [76]. Ebenfalls könnten neu-identifizierte Transkripte, welche durch RAVER1 alternativ gespleißt werden, für neue therapeutische Ansätze genutzt werden. Sogenannte Spleiß-korrigierende *antisense* Oligonukleotide können dabei bestimmte Spleiß-Ereignisse verhindern, durch Bindung an definierte Spleißstellen oder BPS der mRNAs [350]. Hierfür sind jedoch weiterführende Analysen notwendig, um explizit onkogene Exone, welche durch RAVER1 inkludiert werden, oder tumorsuppressive Exone, welche durch RAVER1 exkludiert werden, zu identifizieren.

Zusammenfassend scheint RAVER1 im Normalgewebe eine Über-Reaktion des Immunsystems zu inhibieren, durch alternatives Spleißen von Rezeptoren und intrazellulären

signalweiterleitenden Faktoren. Eine vermehrte Expression von RAVER1 in Tumoren führt zur deutlichen Inhibierung immunregulatorischer Signalwege, wodurch eine Immunevasion infiltrierter zytotoxischer T-Zellen gewährleistet werden könnte. Viral infizierte Zellen führen zur Re-Lokalisierung von nukleärem RAVER1 ins Zytoplasma, von wo eine MDA5-Aktivierung durch RAVER1 vermittelt und eine veränderte Immunantwort ausgelöst werden könnte. In diesem Kontext ist jedoch zu berücksichtigen, dass RAVER1 neben Tumorzellen auch in einer Vielzahl hämatopoetischer Zellen identifiziert wurde, so dass weitere Untersuchungen zunächst klären müssen, inwieweit RAVER1 die Immunzellvitalität, respektive deren Aktivierung moduliert.

## 5. Zusammenfassung

Das hnRNP-ähnliche Protein RAVER1 war bisher nur geringfügig untersucht. Bekannt war eine Interaktion mit dem Spleißfaktor PTBP1, eine Ko-Lokalisierung in Perinukleolären Kompartimenten (PNCs) und eine ko-regulatorische Funktion des alternativen Spleißens von TPM1 [172, 180]. Auch eine zytoplasmatische Lokalisierung konnte mit einer MDA5-abhängigen Aktivierung des Immunsystems in Verbindung gebracht werden [210]. Dabei spielte jeweils die intrinsisch ungeordnete Region (IDR) von RAVER1 eine essenzielle Rolle in der Vermittlung von Interaktionen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals eine Funktion von RAVER1 in der Tumorzellproliferation beschrieben werden. Eine erhöhte Expression ist dabei mit einer verschlechterten Prognose assoziiert, speziell im Lungenadenokarzinom. RAVER1 fördert Zelllinien-übergreifend die Tumorzellproliferation bei gleichzeitiger Inhibierung der intrinsischen Apoptose. Tiefgehende Analysen mittels *next generation sequencing* (NGS) stellten dabei eine generelle Repression Wachstums-inhibitorischer Signalwege, bei gleichzeitiger Förderung von pro-proliferativen Signalwegen, fest. Unter anderem inhibiert RAVER1 eine Apoptose-induzierende letale Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT). Ebenfalls konnte eine Repression der miR/RISC-vermittelten post-transkriptionellen Regulation durch RAVER1 beobachtet werden.

Da eine erhöhte PNC-Prävalenz bereits mit einer verschlechterten Überlebensprognose und erhöhter Metastasierung assoziiert wird [84, 85, 226], wurde vermutet, dass RAVER1 die PNC-Homöostase beeinflusst. Dies konnte nicht bestätigt werden, jedoch wurde gezeigt, dass die IDR von RAVER1 entscheidend für dessen Lokalisierung und Interaktion mit PTBP1 ist.

Vermutungen lagen nahe, dass eine pro-onkogene Funktion von RAVER1 durch die Regulation des alternativen Spleißens vermittelt wird, welches mittels NGS-Analysen bestätigt wurde. So wurde festgestellt, dass RAVER1 an dem Spleiß-Prozess von Faktoren des miR/RISC sowie weiterer Faktoren beteiligt ist. Auch konnten mehrere Spleiß-Ereignisse von Rezeptoren, intrazelluläre Kinasen sowie weiterer Signalweiterleitenden Faktoren identifiziert werden. Ein RAVER1-vermitteltes alternatives Spleißen führt somit zu einer Modulation der miR/RISC-Aktivität, aber auch diverser Signalkaskaden, unter anderem des TGF $\beta$ -Signalweges. Dies hat neben einer Förderung der Proliferation auch Konsequenzen in der Immunevasion, sodass RAVER1 ebenfalls eine inhibitorische Funktion von immunregulierenden-zytotoxischen Signalwegen bewirkt. Dabei wird angenommen, dass die IDR von RAVER1 nicht nur eine Interaktion mit PTBP1, sondern auch mit weiteren Spleißfaktoren vermittelt und hierdurch einen komplexeren Spleiß-Mechanismus reguliert. Ebenfalls wird vermutet, dass RAVER1 eine differentielle Funktion im Zytoplasma vermittelt, wodurch eine Immunantwort ausgelöst werden kann.

## 6. Literaturverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden im Vorfeld als *PrePrint* auf bioRxiv.org veröffentlicht (Wedler *et al.*, 2023) und befinden sich zum Zeitpunkt der Einreichung unter Revision bei *Nucleic Acids Research* (NAR).

Folgende Figuren wurden modifiziert aus dem Manuskript entnommen: Abbildung 3, Abbildung 10-13, Abbildung 15, Abbildung 16C-D, Abbildung 17A-C/E-F, Abbildung 18A-B/D, Abbildung 19-22; Abbildung 23B-D, Abbildung 24, Abbildung 25B-D, Abbildung 26B-C, Abbildung 27, Abbildung 29A.

1. Moore, M.J., *From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs*. Science, 2005. **309**(5740): p. 1514-8.
2. Carroll, P.A., et al., *The MYC transcription factor network: balancing metabolism, proliferation and oncogenesis*. Frontiers of Medicine, 2018. **12**(4): p. 412-425.
3. Müller, H. and K. Helin, *The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2000. **1470**(1): p. M1-M12.
4. Levine, M. and R. Tjian, *Transcription regulation and animal diversity*. Nature, 2003. **424**(6945): p. 147-51.
5. Cooper, T.A., L. Wan, and G. Dreyfuss, *RNA and disease*. Cell, 2009. **136**(4): p. 777-93.
6. Orengo, J.P. and T.A. Cooper, *Alternative splicing in disease*. Adv Exp Med Biol, 2007. **623**: p. 212-23.
7. Hollams, E.M., et al., *mRNA Stability and the Control of Gene Expression: Implications for Human Disease*. Neurochemical Research, 2002. **27**(10): p. 957-980.
8. Pascale, A., et al., *Neuronal ELAV proteins enhance mRNA stability by a PKC $\alpha$ -dependent pathway*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(34): p. 12065-12070.
9. Bell, J.L., et al., *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression?* Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(15): p. 2657-75.
10. Casamassimi, A., et al., *Transcriptome Profiling in Human Diseases: New Advances and Perspectives*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(8).
11. Casamassimi, A. and A. Ciccociola, *Transcriptional Regulation: Molecules, Involved Mechanisms, and Misregulation*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(6).
12. Banani, S.F., et al., *Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2017. **18**(5): p. 285-298.
13. Pederson, T., *The nucleolus*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).
14. Lamond, A.I. and D.L. Spector, *Nuclear speckles: a model for nuclear organelles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(8): p. 605-12.
15. Decker, C.J. and R. Parker, *P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a012286.
16. Sheu-Gruttadauria, J. and I.J. MacRae, *Phase Transitions in the Assembly and Function of Human miRISC*. Cell, 2018. **173**(4): p. 946-957.e16.
17. Uversky, V.N., *Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder*. Current Opinion in Structural Biology, 2017. **44**: p. 18-30.
18. Wang, E.T., et al., *Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes*. Nature, 2008. **456**(7221): p. 470-476.

19. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 597-610.
20. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
21. Nurk, S., et al., *The complete sequence of a human genome*. Science, 2022. **376**(6588): p. 44-53.
22. Adams, M.D., et al., *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 2000. **287**(5461): p. 2185-95.
23. Han, J., et al., *Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(6): p. 336-43.
24. Rappsilber, J., et al., *Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome*. Genome Res, 2002. **12**(8): p. 1231-45.
25. Jurica, M.S. and M.J. Moore, *Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins*. Mol Cell, 2003. **12**(1): p. 5-14.
26. Bessa, C., et al., *Alternative Splicing: Expanding the Landscape of Cancer Biomarkers and Therapeutics*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(23): p. 9032.
27. Ren, P., et al., *Alternative Splicing: A New Cause and Potential Therapeutic Target in Autoimmune Disease*. Frontiers in Immunology, 2021. **12**.
28. Kornblihtt, A.R., et al., *Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2013. **14**(3): p. 153-165.
29. Roca, X., et al., *Widespread recognition of 5' splice sites by noncanonical base-pairing to U1 snRNA involving bulged nucleotides*. Genes Dev, 2012. **26**(10): p. 1098-109.
30. Matera, A.G. and Z. Wang, *A day in the life of the spliceosome*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**(2): p. 108-121.
31. Coltri, P.P., M.G.P. dos Santos, and G.H.G. da Silva, *Splicing and cancer: Challenges and opportunities*. WIREs RNA, 2019. **10**(3): p. e1527.
32. Urbanski, L.M., N. Leclair, and O. Anczuków, *Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018. **9**(4): p. e1476.
33. Fu, X.-D. and M. Ares, *Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins*. Nature Reviews Genetics, 2014. **15**(10): p. 689-701.
34. Graveley, B.R., *Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world*. Trends Genet, 2001. **17**(2): p. 100-7.
35. Chou, M.Y., et al., *hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 69-77.
36. Chen, C.D., R. Kobayashi, and D.M. Helfman, *Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene*. Genes Dev, 1999. **13**(5): p. 593-606.
37. Graveley, B.R., *Sorting out the complexity of SR protein functions*. Rna, 2000. **6**(9): p. 1197-211.
38. Wang, Y., et al., *A complex network of factors with overlapping affinities represses splicing through intronic elements*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(1): p. 36-45.
39. Liu, Q., L. Fang, and C. Wu, *Alternative Splicing and Isoforms: From Mechanisms to Diseases*. Genes, 2022. **13**(3): p. 401.
40. Wagner, E. and J. Lykke-Andersen, *mRNA surveillance: the perfect persist*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 15): p. 3033-8.
41. Lewis, B.P., R.E. Green, and S.E. Brenner, *Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 189-92.
42. Stamm, S., et al., *Function of alternative splicing*. Gene, 2005. **344**: p. 1-20.
43. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. Rna, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
44. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 231-235.

45. Lin, S. and R.I. Gregory, *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 321-33.
46. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
47. Flores-jasso, C.F., et al., *First step in pre-miRNAs processing by human Dicer*. Acta Pharmacologica Sinica, 2009. **30**(8): p. 1177-1185.
48. Matranga, C., et al., *Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes*. Cell, 2005. **123**(4): p. 607-620.
49. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
50. Baek, D., et al., *The impact of microRNAs on protein output*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 64-71.
51. Eulalio, A., F. Triteschler, and E. Izaurralde, *The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing*. Rna, 2009. **15**(8): p. 1433-42.
52. Jonas, S. and E. Izaurralde, *Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing*. Nat Rev Genet, 2015. **16**(7): p. 421-33.
53. Raisch, T., et al., *Reconstitution of recombinant human CCR4-NOT reveals molecular insights into regulated deadenylation*. Nature Communications, 2019. **10**(1): p. 3173.
54. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 789-99.
55. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
56. Rivlin, N., et al., *Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis*. Genes Cancer, 2011. **2**(4): p. 466-74.
57. Cho, Y., et al., *Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations*. Science, 1994. **265**(5170): p. 346-55.
58. Suzuki, A., et al., *Aberrant transcriptional regulations in cancers: genome, transcriptome and epigenome analysis of lung adenocarcinoma cell lines*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(22): p. 13557-72.
59. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(4): p. 259-69.
60. Cartegni, L., S.L. Chew, and A.R. Krainer, *Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing*. Nature Reviews Genetics, 2002. **3**(4): p. 285-298.
61. Faustino, N.A. and T.A. Cooper, *Pre-mRNA splicing and human disease*. Genes Dev, 2003. **17**(4): p. 419-37.
62. Dvinge, H., et al., *RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors*. Nature Reviews Cancer, 2016. **16**(7): p. 413-430.
63. Paronetto, M.P., I. Passacantilli, and C. Sette, *Alternative splicing and cell survival: from tissue homeostasis to disease*. Cell Death Differ, 2016. **23**(12): p. 1919-1929.
64. Zheng, X., et al., *Prognostic value of SRSF2 mutations in patients with de novo myelodysplastic syndromes: A meta-analysis*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0185053.
65. Yoshida, K., et al., *Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia*. Nature, 2011. **478**(7367): p. 64-9.
66. Karni, R., et al., *The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene*. Nature Structural & Molecular Biology, 2007. **14**(3): p. 185-193.
67. Cohen-Eliav, M., et al., *The splicing factor SRSF6 is amplified and is an oncoprotein in lung and colon cancers*. J Pathol, 2013. **229**(4): p. 630-9.
68. Liu, X., et al., *Knockdown of HNRNPA1 inhibits lung adenocarcinoma cell proliferation through cell cycle arrest at G0/G1 phase*. Gene, 2016. **576**(2 Pt 2): p. 791-7.
69. Sebestyen, E., et al., *Large-scale analysis of genome and transcriptome alterations in multiple tumors unveils novel cancer-relevant splicing networks*. Genome Res, 2016. **26**(6): p. 732-44.



70. Wang, C., et al., *Polypyrimidine Tract-binding Protein (PTB) Differentially Affects Malignancy in a Cell Line-dependent Manner\**. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**(29): p. 20277-20287.
71. He, X., et al., *Involvement of polypyrimidine tract-binding protein (PTBP1) in maintaining breast cancer cell growth and malignant properties*. Oncogenesis, 2014. **3**(1): p. e84-e84.
72. David, C.J., et al., *HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer*. Nature, 2010. **463**(7279): p. 364-8.
73. Urbanski, L., et al., *MYC regulates a pan-cancer network of co-expressed oncogenic splicing factors*. Cell Reports, 2022. **41**(8): p. 111704.
74. Verduci, L., et al., *MicroRNA (miRNA)-mediated interaction between leukemia/lymphoma-related factor (LRF) and alternative splicing factor/splicing factor 2 (ASF/SF2) affects mouse embryonic fibroblast senescence and apoptosis*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 39551-63.
75. Misiak, D., et al., *The MicroRNA Landscape of MYCN-Amplified Neuroblastoma*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 647737.
76. Hagemann, S., et al., *IGF2BP1 induces neuroblastoma via a druggable feedforward loop with MYCN promoting 17q oncogene expression*. Molecular Cancer, 2023. **22**(1): p. 88.
77. Bracken, C.P., et al., *A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 7846-54.
78. Busch, B., et al., *The oncogenic triangle of HMGA2, LIN28B and IGF2BP1 antagonizes tumor-suppressive actions of the let-7 family*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(8): p. 3845-64.
79. Wang, T., et al., *Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer*. Mol Cancer, 2015. **14**: p. 125.
80. Anglesio, M.S., et al., *Cancer-associated somatic DICER1 hotspot mutations cause defective miRNA processing and reverse-strand expression bias to predominantly mature 3p strands through loss of 5p strand cleavage*. J Pathol, 2013. **229**(3): p. 400-9.
81. Zaidi, S.K., et al., *Nuclear microenvironments in biological control and cancer*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 454-63.
82. Fischer, A.H., S. Bardarov, Jr., and Z. Jiang, *Molecular aspects of diagnostic nucleolar and nuclear envelope changes in prostate cancer*. J Cell Biochem, 2004. **91**(1): p. 170-84.
83. Montanaro, L., D. Treré, and M. Derenzini, *Nucleolus, ribosomes, and cancer*. Am J Pathol, 2008. **173**(2): p. 301-10.
84. Kamath, R.V., et al., *Perinucleolar compartment prevalence has an independent prognostic value for breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(1): p. 246-53.
85. Slusarczyk, A., et al., *Structure and function of the perinucleolar compartment in cancer cells*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2010. **75**: p. 599-605.
86. Gonzalez, E., et al., *Perinucleolar Compartment (PNC) Prevalence as an Independent Prognostic Factor in Pediatric Ewing Sarcoma: A Multi-Institutional Study*. Cancers (Basel), 2023. **15**(8).
87. Norton, J.T. and S. Huang, *The perinucleolar compartment: RNA metabolism and cancer*. Cancer Treat Res, 2013. **158**: p. 139-52.
88. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
89. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
90. Pagès, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-102.
91. Bremnes, R.M., et al., *The Role of Tumor-Infiltrating Immune Cells and Chronic Inflammation at the Tumor Site on Cancer Development, Progression, and Prognosis*:

- Emphasis on Non-small Cell Lung Cancer*. Journal of Thoracic Oncology, 2011. **6**(4): p. 824-833.
92. Li, H.-X., et al., *Relationship between Tumor Infiltrating Immune Cells and Tumor Metastasis and Its Prognostic Value in Cancer*. Cells, 2023. **12**(1): p. 64.
93. Compagni, A. and G. Christofori, *Recent advances in research on multistage tumorigenesis*. British Journal of Cancer, 2000. **83**(1): p. 1-5.
94. Sigismund, S., D. Avanzato, and L. Lanzetti, *Emerging functions of the EGFR in cancer*. Mol Oncol, 2018. **12**(1): p. 3-20.
95. Hobbs, G.A., C.J. Der, and K.L. Rossman, *RAS isoforms and mutations in cancer at a glance*. J Cell Sci, 2016. **129**(7): p. 1287-92.
96. Khan, A.Q., et al., *RAS-mediated oncogenic signaling pathways in human malignancies*. Semin Cancer Biol, 2019. **54**: p. 1-13.
97. Du, W. and J.S. Searle, *The rb pathway and cancer therapeutics*. Curr Drug Targets, 2009. **10**(7): p. 581-9.
98. Morris, E.J. and N.J. Dyson, *Retinoblastoma protein partners*. Adv Cancer Res, 2001. **82**: p. 1-54.
99. Dimova, D.K. and N.J. Dyson, *The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2810-26.
100. Kato, J., et al., *Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4*. Genes Dev, 1993. **7**(3): p. 331-42.
101. Laiho, M., et al., *Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation*. Cell, 1990. **62**(1): p. 175-85.
102. Kim, S.J., et al., *Molecular mechanisms of inactivation of TGF-beta receptors during carcinogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(1-2): p. 159-68.
103. Gregory, P.A., et al., *An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(10): p. 1686-98.
104. Betticher, D.C., et al., *Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript*. Oncogene, 1995. **11**(5): p. 1005-11.
105. Baldin, V., et al., *Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1*. Genes Dev, 1993. **7**(5): p. 812-21.
106. Augello, M.A., et al., *Convergence of oncogenic and hormone receptor pathways promotes metastatic phenotypes*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 493-508.
107. Polager, S. and D. Ginsberg, *p53 and E2f: partners in life and death*. Nature Reviews Cancer, 2009. **9**(10): p. 738-748.
108. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**(4): p. 817-25.
109. Miyashita, T. and J.C. Reed, *Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene*. Cell, 1995. **80**(2): p. 293-9.
110. Suda, T., et al., *Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1169-78.
111. Nagata, S. and P. Golstein, *The Fas death factor*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1449-56.
112. Strasser, A., P.J. Jost, and S. Nagata, *The many roles of FAS receptor signaling in the immune system*. Immunity, 2009. **30**(2): p. 180-92.
113. Boucher, D., et al., *Molecular determinants involved in activation of caspase 7*. Biosci Rep, 2011. **31**(4): p. 283-94.
114. Ivanov, V.N., et al., *FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(10): p. 3623-35.
115. Izquierdo, J.M., et al., *Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition*. Mol Cell, 2005. **19**(4): p. 475-84.
116. Bonnal, S., et al., *RBM5/Luca-15/H37 regulates Fas alternative splice site pairing after exon definition*. Mol Cell, 2008. **32**(1): p. 81-95.
117. Teitz, T., et al., *Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN*. Nat Med, 2000. **6**(5): p. 529-35.

118. Li, Z., et al., *Pro-apoptotic effects of splice-switching oligonucleotides targeting Bcl-x pre-mRNA in human glioma cell lines*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(2): p. 1013-9.
119. Robinson, N.J. and W.P. Schieman, *Telomerase in Cancer: Function, Regulation, and Clinical Translation*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(3).
120. Herbert, B., et al., *Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(25): p. 14276-81.
121. Warburg, O., *On the Origin of Cancer Cells*. *Science*, 1956. **123**(3191): p. 309-314.
122. Ancey, P.B., C. Contat, and E. Meylan, *Glucose transporters in cancer - from tumor cells to the tumor microenvironment*. *Febs j*, 2018. **285**(16): p. 2926-2943.
123. Noguchi, T., H. Inoue, and T. Tanaka, *The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(29): p. 13807-12.
124. Dayton, T.L., T. Jacks, and M.G. Vander Heiden, *PKM2, cancer metabolism, and the road ahead*. *EMBO Rep*, 2016. **17**(12): p. 1721-1730.
125. Nishida, N., et al., *Angiogenesis in cancer*. *Vasc Health Risk Manag*, 2006. **2**(3): p. 213-9.
126. Osawa, T., et al., *Hypoxia and low-nutrition double stress induces aggressiveness in a murine model of melanoma*. *Cancer Sci*, 2009. **100**(5): p. 844-51.
127. Testini, C., et al., *Myc-dependent endothelial proliferation is controlled by phosphotyrosine 1212 in VEGF receptor-2*. *EMBO Rep*, 2019. **20**(11): p. e47845.
128. Shibuya, M., *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies*. *Genes Cancer*, 2011. **2**(12): p. 1097-105.
129. Nowak, D.G., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(8): p. 5532-40.
130. Biselli-Chicote, P.M., et al., *Overexpression of Antiangiogenic Vascular Endothelial Growth Factor Isoform and Splicing Regulatory Factors in Oral, Laryngeal and Pharyngeal Squamous Cell Carcinomas*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017. **18**(8): p. 2171-2177.
131. Brabletz, S., et al., *Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression*. *EMBO J*, 2021. **40**(18): p. e108647.
132. Leggett, S.E., et al., *The epithelial-mesenchymal transition and the cytoskeleton in bioengineered systems*. *Cell Commun Signal*, 2021. **19**(1): p. 32.
133. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. *Signal Transduct Target Ther*, 2020. **5**(1): p. 28.
134. Braun, J., et al., *Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas*. *Oncogene*, 2010. **29**(29): p. 4237-44.
135. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2009. **28**(1): p. 15-33.
136. Brown, R.L., et al., *CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011. **121**(3): p. 1064-1074.
137. Loh, T.J., et al., *hnRNP L inhibits CD44 V10 exon splicing through interacting with its upstream intron*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1849**(6): p. 743-50.
138. Loh, T.J., et al., *SR proteins regulate V6 exon splicing of CD44 pre-mRNA*. *BMB Rep*, 2016. **49**(11): p. 612-616.
139. Pulendran, B., R. van Driel, and G.J. Nossal, *Immunological tolerance in germinal centres*. *Immunol Today*, 1997. **18**(1): p. 27-32.
140. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. *Cell*, 2001. **106**(3): p. 255-8.
141. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system*. *Science*, 2002. **296**(5566): p. 298-300.
142. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nature Immunology*, 2002. **3**(11): p. 991-998.

143. Natali, P.G., et al., *Heterogeneity in the expression of HLA and tumor-associated antigens by surgically removed and cultured breast carcinoma cells*. *Cancer Res*, 1983. **43**(2): p. 660-8.
144. Seliger, B., et al., *Down-regulation of the MHC class I antigen-processing machinery after oncogenic transformation of murine fibroblasts*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(1): p. 122-33.
145. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. *Nat Med*, 2002. **8**(8): p. 793-800.
146. O'Connell, J., *Fas ligand and the fate of antitumour cytotoxic T lymphocytes*. *Immunology*, 2002. **105**(3): p. 263-6.
147. Raimondo, S., et al., *Extracellular Vesicles and Tumor-Immune Escape: Biological Functions and Clinical Perspectives*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. **21**(7): p. 2286.
148. Dutta, S., et al., *Targets of Immune Escape Mechanisms in Cancer: Basis for Development and Evolution of Cancer Immune Checkpoint Inhibitors*. *Biology*, 2023. **12**(2): p. 218.
149. Li, C., et al., *Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma*. *Oncol Rep*, 2002. **9**(6): p. 1219-23.
150. Schaefer, C., et al., *Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer*. *Br J Cancer*, 2005. **92**(5): p. 913-20.
151. Filipazzi, P., V. Huber, and L. Rivoltini, *Phenotype, function and clinical implications of myeloid-derived suppressor cells in cancer patients*. *Cancer Immunol Immunother*, 2012. **61**(2): p. 255-263.
152. Kim, S.K. and S.W. Cho, *The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment*. *Front Pharmacol*, 2022. **13**: p. 868695.
153. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. *F1000Prime Rep*, 2014. **6**: p. 13.
154. Li, H., et al., *Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1*. *J Immunol*, 2009. **182**(1): p. 240-9.
155. Arina, A. and V. Bronte, *Myeloid-derived suppressor cell impact on endogenous and adoptively transferred T cells*. *Curr Opin Immunol*, 2015. **33**: p. 120-5.
156. Han, S., et al., *Turning the Tide Against Regulatory T Cells*. *Front Oncol*, 2019. **9**: p. 279.
157. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 99-146.
158. Ikushima, H. and K. Miyazono, *TGFβ signalling: a complex web in cancer progression*. *Nature Reviews Cancer*, 2010. **10**(6): p. 415-424.
159. Kim, S.I. and M.E. Choi, *TGF-β-activated kinase-1: New insights into the mechanism of TGF-β signaling and kidney disease*. *Kidney Research and Clinical Practice*, 2012. **31**(2): p. 94-105.
160. Rodari, M.M., N. Cerf-Bensussan, and M. Parlatto, *Dysregulation of the immune response in TGF-β signalopathies*. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 1066375.
161. Schuster, N. and K. Kriegelstein, *Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis*. *Cell Tissue Res*, 2002. **307**(1): p. 1-14.
162. Massagué, J., *G1 cell-cycle control and cancer*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 298-306.
163. Levy, L. and C.S. Hill, *Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006. **17**(1-2): p. 41-58.
164. Walker, R.A., S.J. Dearing, and B. Gallacher, *Relationship of transforming growth factor beta 1 to extracellular matrix and stromal infiltrates in invasive breast carcinoma*. *Br J Cancer*, 1994. **69**(6): p. 1160-5.
165. Pickup, M., S. Novitskiy, and H.L. Moses, *The roles of TGFβ in the tumour microenvironment*. *Nature Reviews Cancer*, 2013. **13**(11): p. 788-799.
166. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(5): p. 548-58.

167. Romanelli, M.G., E. Diani, and P.M. Lievens, *New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(11): p. 22906-32.
168. Romanelli, M.G., et al., *Sequence determinants for hnRNP I protein nuclear localization*. Exp Cell Res, 1997. **235**(1): p. 300-4.
169. Romanelli, M.G. and C. Morandi, *Importin alpha binds to an unusual bipartite nuclear localization signal in the heterogeneous ribonucleoprotein type I*. Eur J Biochem, 2002. **269**(11): p. 2727-34.
170. Li, B. and T.S. Yen, *Characterization of the nuclear export signal of polypyrimidine tract-binding protein*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10306-14.
171. Ghetti, A., et al., *hnRNP 1, the polyprimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs*. Nucleic Acids Research, 1992. **20**(14): p. 3671-3678.
172. Huttelmaier, S., et al., *Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins*. J Cell Biol, 2001. **155**(5): p. 775-86.
173. Hamilton, B.J., et al., *Delineation of a novel pathway that regulates CD154 (CD40 ligand) expression*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(2): p. 510-25.
174. Romanelli, M.G., E. Diani, and P.M.-J. Lievens, *New Insights into Functional Roles of the Polypyrimidine Tract-Binding Protein*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(11): p. 22906-22932.
175. Wollerton, M.C., et al., *Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay*. Mol Cell, 2004. **13**(1): p. 91-100.
176. Singh, R., J. Valcarcel, and M.R. Green, *Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins*. Science, 1995. **268**(5214): p. 1173-6.
177. Llorian, M., et al., *Position-dependent alternative splicing activity revealed by global profiling of alternative splicing events regulated by PTB*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(9): p. 1114-23.
178. Hu, J., et al., *PTB/nPTB: master regulators of neuronal fate in mammals*. Biophysics Reports, 2018. **4**(4): p. 204-214.
179. Southby, J., C. Gooding, and C.W. Smith, *Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(4): p. 2699-711.
180. Gromak, N., et al., *The PTB interacting protein raver1 regulates alpha-tropomyosin alternative splicing*. EMBO J, 2003. **22**(23): p. 6356-64.
181. Yap, K., et al., *Coordinated regulation of neuronal mRNA steady-state levels through developmentally controlled intron retention*. Genes Dev, 2012. **26**(11): p. 1209-23.
182. Mockenhaupt, S. and E.V. Makeyev, *Non-coding functions of alternative pre-mRNA splicing in development*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **47-48**: p. 32-9.
183. Iannone, C., et al., *PTBP1-activated co-transcriptional splicing controls epigenetic status of pluripotent stem cells*. Molecular Cell, 2023. **83**(2): p. 203-218.e9.
184. Ashiya, M. and P.J. Grabowski, *A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart*. Rna, 1997. **3**(9): p. 996-1015.
185. Yamamoto, H., et al., *Isolation of a mammalian homologue of a fission yeast differentiation regulator*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(5): p. 3829-41.
186. Dreyfuss, G., et al., *hnRNP PROTEINS AND THE BIOGENESIS OF mRNA*. Annual Review of Biochemistry, 1993. **62**(1): p. 289-321.
187. Black, D.L., *Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 291-336.
188. Boutz, P.L., et al., *A post-transcriptional regulatory switch in polypyrimidine tract-binding proteins reprograms alternative splicing in developing neurons*. Genes Dev, 2007. **21**(13): p. 1636-52.
189. Spellman, R., M. Llorian, and C.W. Smith, *Crossregulation and functional redundancy between the splicing regulator PTB and its paralogs nPTB and ROD1*. Mol Cell, 2007. **27**(3): p. 420-34.

190. Kosinski, P.A., et al., *A complex containing polypyrimidine tract-binding protein is involved in regulating the stability of CD40 ligand (CD154) mRNA*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 979-88.
191. Babic, I., S. Sharma, and D.L. Black, *A role for polypyrimidine tract binding protein in the establishment of focal adhesions*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(20): p. 5564-77.
192. Ali, N. and A. Siddiqui, *Interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA genome and its functional requirement in internal initiation of translation*. Journal of Virology, 1995. **69**(10): p. 6367-6375.
193. Pickering, B.M., et al., *Polypyrimidine tract binding protein and poly r(C) binding protein 1 interact with the BAG-1 IRES and stimulate its activity in vitro and in vivo*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): p. 639-46.
194. Chappell, S.A., G.M. Edelman, and V.P. Mauro, *A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1536-41.
195. Tsukiyama-Kohara, K., et al., *Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA*. J Virol, 1992. **66**(3): p. 1476-83.
196. Chang, K.S. and G. Luo, *The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is required for efficient replication of hepatitis C virus (HCV) RNA*. Virus Res, 2006. **115**(1): p. 1-8.
197. Bailey, D., et al., *Functional analysis of RNA structures present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral virulence*. J Virol, 2010. **84**(6): p. 2859-70.
198. Grover, R., P.S. Ray, and S. Das, *Polypyrimidine tract binding protein regulates IRES-mediated translation of p53 isoforms*. Cell Cycle, 2008. **7**(14): p. 2189-98.
199. Cobbold, L.C., et al., *Upregulated c-myc expression in multiple myeloma by internal ribosome entry results from increased interactions with and expression of PTB-1 and YB-1*. Oncogene, 2010. **29**(19): p. 2884-91.
200. Jin, W., et al., *Fibroblast growth factor receptor-1 alpha-exon exclusion and polypyrimidine tract-binding protein in glioblastoma multiforme tumors*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1221-4.
201. He, X., et al., *Knockdown of polypyrimidine tract-binding protein suppresses ovarian tumor cell growth and invasiveness in vitro*. Oncogene, 2007. **26**(34): p. 4961-4968.
202. Takahashi, H., et al., *Significance of Polypyrimidine Tract-Binding Protein 1 Expression in Colorectal Cancer*. Molecular Cancer Therapeutics, 2015. **14**(7): p. 1705-1716.
203. Dai, S., et al., *PTB: Not just a polypyrimidine tract-binding protein*. J Cell Physiol, 2022. **237**(5): p. 2357-2373.
204. Romanelli, M.G., et al., *Functional characterization of the ribonucleoprotein, PTB-binding 1/Raver1 promoter region*. Gene, 2007. **405**(1): p. 79-87.
205. Byrne, B.J., et al., *Chicken vinculin and meta-vinculin are derived from a single gene by alternative splicing of a 207-base pair exon unique to meta-vinculin*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 12845-50.
206. Lee, H.T., et al., *Vinculin and metavinculin exhibit distinct effects on focal adhesion properties, cell migration, and mechanotransduction*. PLOS ONE, 2019. **14**(9): p. e0221962.
207. Zieseniss, A., et al., *Raver1 is an integral component of muscle contractile elements*. Cell Tissue Res, 2007. **327**(3): p. 583-94.
208. Jockusch, B.M., S. Huttelmaier, and S. Illenberger, *From the nucleus toward the cell periphery: a guided tour for mRNAs*. News Physiol Sci, 2003. **18**: p. 7-11.
209. Madl, T. and M. Sattler, *Adhesion dance with raver*. Structure, 2009. **17**(6): p. 781-3.
210. Chen, H., et al., *RAVER1 is a coactivator of MDA5-mediated cellular antiviral response*. J Mol Cell Biol, 2013. **5**(2): p. 111-9.
211. Lee, J.H., et al., *Raver1 interactions with vinculin and RNA suggest a feed-forward pathway in directing mRNA to focal adhesions*. Structure, 2009. **17**(6): p. 833-42.
212. Rangarajan, E.S., J.H. Lee, and T. Izard, *Apo raver1 structure reveals distinct RRM domain orientations*. Protein Sci, 2011. **20**(8): p. 1464-70.

213. Lee, J.H., et al., *The metavinculin tail domain directs constitutive interactions with raver1 and vinculin RNA*. J Mol Biol, 2012. **422**(5): p. 697-704.
214. Maris, C., C. Dominguez, and F.H. Allain, *The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression*. Febs j, 2005. **272**(9): p. 2118-31.
215. Rideau, A.P., et al., *A peptide motif in Raver1 mediates splicing repression by interaction with the PTB RRM2 domain*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(9): p. 839-48.
216. Joshi, A., et al., *Crystallographic Analysis of Polypyrimidine Tract-Binding Protein-Raver1 Interactions Involved in Regulation of Alternative Splicing*. Structure, 2011. **19**(12): p. 1816-1825.
217. Cote, C.A., et al., *A Xenopus protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization*. Mol Cell, 1999. **4**(3): p. 431-7.
218. Zhang, H.L., et al., *Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility*. Neuron, 2001. **31**(2): p. 261-75.
219. Lahmann, I., et al., *The hnRNP and cytoskeletal protein raver1 contributes to synaptic plasticity*. Exp Cell Res, 2008. **314**(5): p. 1048-60.
220. Randall, R.E. and S. Goodbourn, *Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures*. Journal of General Virology, 2008. **89**(1): p. 1-47.
221. Hartmann, G., *Nucleic Acid Immunity*. Adv Immunol, 2017. **133**: p. 121-169.
222. Dias Junior, A.G., N.G. Sampaio, and J. Rehwinkel, *A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation*. Trends in Microbiology, 2019. **27**(1): p. 75-85.
223. Fink-Baldauf, I.M., et al., *CRISPRi links COVID-19 GWAS loci to LZTFL1 and RAVER1*. EBioMedicine, 2022. **75**: p. 103806.
224. Malireddi, R.K.S., et al., *Whole-genome CRISPR screen identifies RAVER1 as a key regulator of RIPK1-mediated inflammatory cell death, PANoptosis*. iScience, 2023. **26**(6).
225. Ottoz, D.S.M. and L.E. Berchowitz, *The role of disorder in RNA binding affinity and specificity*. Open Biol, 2020. **10**(12): p. 200328.
226. Gonzalez, E., et al., *Perinucleolar Compartment (PNC) Prevalence as an Independent Prognostic Factor in Pediatric Ewing Sarcoma: A Multi-Institutional Study*. Cancers (Basel), 2023. **15**(8).
227. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
228. Phelps, R.M., et al., *NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base*. J Cell Biochem Suppl, 1996. **24**: p. 32-91.
229. Lau, D.H., et al., *Multifactorial mechanisms associated with broad cross-resistance of ovarian carcinoma cells selected by cyanomorpholino doxorubicin*. Cancer Res, 1991. **51**(19): p. 5181-7.
230. Knowles, B.B., C.C. Howe, and D.P. Aden, *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*. Science, 1980. **209**(4455): p. 497-9.
231. Heldin, N.E., et al., *Aberrant expression of receptors for platelet-derived growth factor in an anaplastic thyroid carcinoma cell line*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(23): p. 9302-6.
232. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
233. Chou, M.Y., et al., *Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing*. Mol Cell, 2000. **5**(6): p. 949-57.
234. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
235. Wisniewski, J.R., et al., *Universal sample preparation method for proteome analysis*. Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 359-62.

236. Birgit Möller, M.G., Danny Misiak, Stefan Posch, *MiToBo - A Toolbox for Image Processing and Analysis*. Journal of open research software, 2016. **4**(1): p. e17.
237. Martin, M., *Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads*. EMBnet.journal, 2011. **17**: p. 10--12.
238. Kim, D., B. Langmead, and S.L. Salzberg, *HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements*. Nat Methods, 2015. **12**(4): p. 357-60.
239. Robinson, M.D., D.J. McCarthy, and G.K. Smyth, *edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data*. Bioinformatics, 2010. **26**(1): p. 139-40.
240. Shen, S., et al., *rMATS: robust and flexible detection of differential alternative splicing from replicate RNA-Seq data*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(51): p. E5593-601.
241. Frankish, A., et al., *Gencode 2021*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D916-D923.
242. Durinck, S., et al., *BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis*. Bioinformatics, 2005. **21**(16): p. 3439-40.
243. Quinlan, A.R. and I.M. Hall, *BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features*. Bioinformatics, 2010. **26**(6): p. 841-2.
244. Pagès H, A.P., Gentleman R, DebRoy S *Biostrings: Efficient manipulation of biological strings*. 2023.
245. Bailey, T.L., et al., *The MEME Suite*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(W1): p. W39-49.
246. Nystrom, S.L. and D.J. McKay, *Memes: A motif analysis environment in R using tools from the MEME Suite*. PLoS Comput Biol, 2021. **17**(9): p. e1008991.
247. Mootha, V.K., et al., *PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes*. Nat Genet, 2003. **34**(3): p. 267-73.
248. Subramanian, A., et al., *Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15545-50.
249. Yu, G., et al., *clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters*. OMICS, 2012. **16**(5): p. 284-7.
250. Jumper, J., et al., *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature, 2021. **596**(7873): p. 583-589.
251. Van Nostrand, E.L., et al., *A large-scale binding and functional map of human RNA-binding proteins*. Nature, 2020. **583**(7818): p. 711-719.
252. Patton, J.G., et al., *Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing*. Genes Dev, 1991. **5**(7): p. 1237-51.
253. Wagner, E.J. and M.A. Garcia-Blanco, *Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(10): p. 3281-8.
254. He, X., C. Yuan, and J. Yang, *Regulation and functional significance of CDC42 alternative splicing in ovarian cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(30): p. 29651-63.
255. Shan, H., et al., *PTBP1 knockdown in renal cell carcinoma inhibits cell migration, invasion and angiogenesis in vitro and metastasis in vivo via the hypoxia inducible factor-1alpha pathway*. Int J Oncol, 2018. **52**(5): p. 1613-1622.
256. Kimlin, L.C., G. Casagrande, and V.M. Virador, *In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update*. Mol Carcinog, 2013. **52**(3): p. 167-82.
257. Joussaume, A., et al., *A Comparative Study of Anoikis Resistance Assays for Tumor Cells*. Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 2020. **29**(2): p. 22255-22262.
258. Jinek, M., et al., *RNA-programmed genome editing in human cells*. Elife, 2013. **2**: p. e00471.
259. Varadi, M., et al., *AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models*. Nucleic Acids Res, 2022. **50**(D1): p. D439-D444.
260. Pollock, C. and S. Huang, *The perinucleolar compartment*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(2): p. a000679.



261. Norton, J.T., et al., *The perinucleolar compartment is directly associated with DNA*. J Biol Chem, 2009. **284**(7): p. 4090-101.
262. Van Nostrand, E.L., et al., *A large-scale binding and functional map of human RNA-binding proteins*. Nature, 2020. **583**(7818): p. 711-719.
263. Tian, M. and W.P. Schiemann, *The TGF-beta paradox in human cancer: an update*. Future Oncol, 2009. **5**(2): p. 259-71.
264. Dongre, A. and R.A. Weinberg, *New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019. **20**(2): p. 69-84.
265. David, Charles J., et al., *TGF-β Tumor Suppression through a Lethal EMT*. Cell, 2016. **164**(5): p. 1015-1030.
266. Ramjaun, A.R., et al., *Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGFβ-induced apoptosis*. Oncogene, 2007. **26**(7): p. 970-981.
267. Gupta, S. and A. Maitra, *EMT: Matter of Life or Death?* Cell, 2016. **164**(5): p. 840-842.
268. Muller, S., et al., *Synthetic circular miR-21 RNA decoys enhance tumor suppressor expression and impair tumor growth in mice*. NAR Cancer, 2020. **2**(3): p. zcaa014.
269. Wade, M., Y.C. Li, and G.M. Wahl, *MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(2): p. 83-96.
270. Wang, Q., et al., *The Roles of microRNAs in Regulating the Expression of PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).
271. Spellman, R., et al., *Regulation of alternative splicing by PTB and associated factors*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 3): p. 457-60.
272. Wedler, A., et al., *RAVER1 interconnects lethal EMT and miR/RISC activity by the control of alternative splicing*. bioRxiv, 2023: p. 2023.06.14.544976.
273. Yang, X., et al., *Widespread Expansion of Protein Interaction Capabilities by Alternative Splicing*. Cell, 2016. **164**(4): p. 805-17.
274. Lazzaretti, D., I. Tournier, and E. Izaurralde, *The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins*. RNA, 2009. **15**(6): p. 1059-1066.
275. Lu, G., et al., *Ligase I and ligase III mediate the DNA double-strand break ligation in alternative end-joining*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016. **113**(5): p. 1256-1260.
276. Kumar, V., et al., *The Role of Notch, Hedgehog, and Wnt Signaling Pathways in the Resistance of Tumors to Anticancer Therapies*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 650772.
277. Matyas, G., et al., *Identification and in silico analyses of novel TGFBR1 and TGFBR2 mutations in Marfan syndrome-related disorders*. Hum Mutat, 2006. **27**(8): p. 760-9.
278. Costanza, B., et al., *Stromal Modulators of TGF-β in Cancer*. J Clin Med, 2017. **6**(1).
279. Chen, K.-L., et al., *Characterization of novel transforming growth factor-beta type I receptors found in malignant pleural effusion tumor cells*. BMC Molecular Biology, 2007. **8**(1): p. 72.
280. Zhu, L., et al., *TAK1 signaling is a potential therapeutic target for pathological angiogenesis*. Angiogenesis, 2021. **24**(3): p. 453-470.
281. Sakurai, H., et al., *Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1*. FEBS Lett, 2000. **474**(2-3): p. 141-5.
282. Tripathi, V., et al., *TGF-β-induced alternative splicing of TAK1 promotes EMT and drug resistance*. Oncogene, 2019. **38**(17): p. 3185-3200.
283. Baba, A.B., et al., *Transforming Growth Factor-Beta (TGF-β) Signaling in Cancer-A Betrayal Within*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 791272.
284. Blanco-Melo, D., et al., *Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19*. Cell, 2020. **181**(5): p. 1036-1045 e9.
285. Schmid, J.A. and A. Birbach, *IκappaB kinase beta (IKKbeta/IKK2/IKBKB)--a key molecule in signaling to the transcription factor NF-kappaB*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(2): p. 157-65.
286. Leeman, J.R. and T.D. Gilmore, *Alternative splicing in the NF-kappaB signaling pathway*. Gene, 2008. **423**(2): p. 97-107.
287. Concetti, J. and C.L. Wilson, *NFKB1 and Cancer: Friend or Foe?* Cells, 2018. **7**(9).

288. Cardinez, C., et al., *Gain-of-function IKBKB mutation causes human combined immune deficiency*. J Exp Med, 2018. **215**(11): p. 2715-2724.
289. Gamper, C., et al., *Expression and function of TRAF-3 splice-variant isoforms in human lymphoma cell lines*. Human Immunology, 2001. **62**(10): p. 1167-1177.
290. Häcker, H., P.-H. Tseng, and M. Karin, *Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(7): p. 457-468.
291. Häcker, H. and M. Karin, *Regulation and Function of IKK and IKK-Related Kinases*. Science's STKE, 2006. **2006**(357): p. re13-re13.
292. Tseng, P.H., et al., *Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 70-5.
293. Xiao, G., A. Fong, and S.-C. Sun, *Induction of p100 Processing by NF- $\kappa$ B-inducing Kinase Involves Docking I $\kappa$ B Kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) to p100 and IKK $\alpha$ -mediated Phosphorylation\**. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(29): p. 30099-30105.
294. van Eindhoven, W.G., et al., *TRAF-3 mRNA splice-deletion variants encode isoforms that induce NF- $\kappa$ B activation*. Molecular Immunology, 1999. **36**(10): p. 647-658.
295. Haudenschild, D., et al., *Soluble and transmembrane isoforms of novel interleukin-17 receptor-like protein by RNA splicing and expression in prostate cancer*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 4309-16.
296. Ho, A.W. and S.L. Gaffen, *IL-17RC: a partner in IL-17 signaling and beyond*. Semin Immunopathol, 2010. **32**(1): p. 33-42.
297. Kuestner, R.E., et al., *Identification of the IL-17 Receptor Related Molecule IL-17RC as the Receptor for IL-17F*. The Journal of Immunology, 2007. **179**(8): p. 5462-5473.
298. Gaffen, S.L., *Structure and signalling in the IL-17 receptor family*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(8): p. 556-567.
299. Timchenko, L.T., et al., *Identification of a (CUG) $n$  triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(22): p. 4407-14.
300. Hall, M.P., S. Huang, and D.L. Black, *Differentiation-induced colocalization of the KH-type splicing regulatory protein with polypyrimidine tract binding protein and the c-src pre-mRNA*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 774-86.
301. Kleinhenz, B., et al., *Raver2, a new member of the hnRNP family*. FEBS Lett, 2005. **579**(20): p. 4254-8.
302. Wang, C., et al., *RNA polymerase III transcripts and the PTB protein are essential for the integrity of the perinucleolar compartment*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(6): p. 2425-35.
303. Norton, J.T., et al., *Perinucleolar compartment prevalence is a phenotypic pancancer marker of malignancy*. Cancer, 2008. **113**(4): p. 861-9.
304. Roux, K.J., et al., *A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells*. J Cell Biol, 2012. **196**(6): p. 801-10.
305. Rhee, H.W., et al., *Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging*. Science, 2013. **339**(6125): p. 1328-1331.
306. Meyer, K., et al., *Mutations in Disordered Regions Can Cause Disease by Creating Dileucine Motifs*. Cell, 2018. **175**(1): p. 239-253.e17.
307. Kopp, K. and S. Huang, *Perinucleolar compartment and transformation*. J Cell Biochem, 2005. **95**(2): p. 217-25.
308. Harvey, S.E., et al., *Coregulation of alternative splicing by hnRNPM and ESRP1 during EMT*. Rna, 2018. **24**(10): p. 1326-1338.
309. Jia, R., et al., *SRp20 is a proto-oncogene critical for cell proliferation and tumor induction and maintenance*. Int J Biol Sci, 2010. **6**(7): p. 806-26.
310. Venables, J.P., et al., *Cancer-associated regulation of alternative splicing*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(6): p. 670-6.
311. Anczuków, O. and A.R. Krainer, *Splicing-factor alterations in cancers*. Rna, 2016. **22**(9): p. 1285-301.
312. Groza, T., et al., *The International Mouse Phenotyping Consortium: comprehensive knockout phenotyping underpinning the study of human disease*. Nucleic Acids Research, 2022. **51**(D1): p. D1038-D1045.

313. Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann, *Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 383-424.
314. Hashimoto, T., U. Kikkawa, and S. Kamada, *Contribution of caspase(s) to the cell cycle regulation at mitotic phase*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e18449.
315. Foster, D.A., et al., *Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s)*. Genes Cancer, 2010. **1**(11): p. 1124-31.
316. Gabay, M., Y. Li, and D.W. Felsher, *MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014. **4**(6).
317. Kent, L.N. and G. Leone, *The broken cycle: E2F dysfunction in cancer*. Nature Reviews Cancer, 2019. **19**(6): p. 326-338.
318. Huang, L., et al., *Cancer-associated fibroblasts in digestive tumors*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(47): p. 17804-18.
319. Pfaff, J., et al., *Structural features of Argonaute-GW182 protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(40): p. E3770-9.
320. Treiber, T., N. Treiber, and G. Meister, *Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(1): p. 5-20.
321. Elkayam, E., et al., *Multivalent Recruitment of Human Argonaute by GW182*. Mol Cell, 2017. **67**(4): p. 646-658.e3.
322. Wang, Z., et al., *Computational analysis and experimental validation of tumor-associated alternative RNA splicing in human cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(3): p. 655-7.
323. Climente-González, H., et al., *The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer*. Cell Rep, 2017. **20**(9): p. 2215-2226.
324. Lejeune, F. and L.E. Maquat, *Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(3): p. 309-15.
325. Briskin, D., P.Y. Wang, and D.P. Bartel, *The biochemical basis for the cooperative action of microRNAs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(30): p. 17764-17774.
326. Collart, M.A., *The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016. **7**(4): p. 438-54.
327. Haas, M., et al., *c-Myb protein interacts with Rcd-1, a component of the CCR4 transcription mediator complex*. Biochemistry, 2004. **43**(25): p. 8152-9.
328. Rahmutulla, B., K. Matsushita, and F. Nomura, *Alternative splicing of DNA damage response genes and gastrointestinal cancers*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(46): p. 17305-13.
329. Dominguez, D., et al., *An extensive program of periodic alternative splicing linked to cell cycle progression*. Elife, 2016. **5**.
330. Gardina, P.J., et al., *Alternative splicing and differential gene expression in colon cancer detected by a whole genome exon array*. BMC Genomics, 2006. **7**(1): p. 325.
331. De la Fuente, I.M. and J.I. Lopez, *Cell Motility and Cancer*. Cancers (Basel), 2020. **12**(8).
332. Collu, G.M., A. Hidalgo-Sastre, and K. Brennan, *Wnt-Notch signalling crosstalk in development and disease*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(18): p. 3553-67.
333. Hoffmann, A., et al., *Transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1), a MAP3K, interacts with Smad proteins and interferes with osteogenesis in murine mesenchymal progenitors*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27271-83.
334. Gorsch, S.M., et al., *Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer*. Cancer Res, 1992. **52**(24): p. 6949-52.
335. Miettinen, P.J., et al., *TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors*. J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 2): p. 2021-36.
336. Siegel, P.M. and J. Massagué, *Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer*. Nature Reviews Cancer, 2003. **3**(11): p. 807-820.

337. Hasegawa, Y., et al., *Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma*. *Cancer*, 2001. **91**(5): p. 964-71.
338. Ren, L.-L., et al., *Transforming growth factor- $\beta$  signaling: From tissue fibrosis to therapeutic opportunities*. *Chemico-Biological Interactions*, 2023. **369**: p. 110289.
339. Chen, C., et al., *PTBPs: An immunomodulatory-related prognostic biomarker in pancreatic cancer*. *Front Mol Biosci*, 2022. **9**: p. 968458.
340. Liu, Y., et al., *Impact of Alternative Splicing on the Human Proteome*. *Cell Rep*, 2017. **20**(5): p. 1229-1241.
341. Wang, Y., et al., *MicroRNA-29b-3p promotes intestinal permeability in IBS-D via targeting TRAF3 to regulate the NF- $\kappa$ B-MLCK signaling pathway*. *PLOS ONE*, 2023. **18**(7): p. e0287597.
342. Ofengeim, D. and J. Yuan, *Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(11): p. 727-36.
343. McNab, F., et al., *Type I interferons in infectious disease*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(2): p. 87-103.
344. Yu, R., B. Zhu, and D. Chen, *Type I interferon-mediated tumor immunity and its role in immunotherapy*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022. **79**(3): p. 191.
345. Jia, P., et al., *Identification of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) ribonucleoprotein PTB-Binding 1 involved in antiviral immune response against RGNNV*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017. **60**: p. 119-128.
346. Yadav, R., et al., *Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19*. *Cells*, 2021. **10**(4).
347. Le Sommer, C., et al., *PTB Regulates the Processing of a 3'-Terminal Exon by Repressing both Splicing and Polyadenylation*. *Molecular and Cellular Biology*, 2005. **25**(21): p. 9595-9607.
348. Chung, R.T. and L.M. Kaplan, *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein I (hnRNP-I/PTB) Selectively Binds the Conserved 3' Terminus of Hepatitis C Viral RNA*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **254**(2): p. 351-362.
349. Vasan, N., J. Baselga, and D.M. Hyman, *A view on drug resistance in cancer*. *Nature*, 2019. **575**(7782): p. 299-309.
350. Havens, M.A. and M.L. Hastings, *Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(14): p. 6549-63.
351. Liberzon, A., et al., *The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection*. *Cell Syst*, 2015. **1**(6): p. 417-425.

## 7. Anhang

### 7.1. Publikationsliste

**Wedler A**, Bley N, Glaß M, Müller S, Schian L, Obika K-B, Lederer M, Misiak C, Fuchs T, Köhn M, Jacob R, Gutschner T, Ihling C, Sinz A, Hüttelmaier S. RAVER1 interconnects lethal EMT and miR/RISC activity by the control of alternative splicing. (2023) bioRxiv 2023.06.14.544976; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.06.14.544976>

Das Manuskript wurde am 15.06.2023 bei *Nucleic Acids Research* (NAR) eingereicht und befindet sich seit dem 03.07.2023 unter Revision.

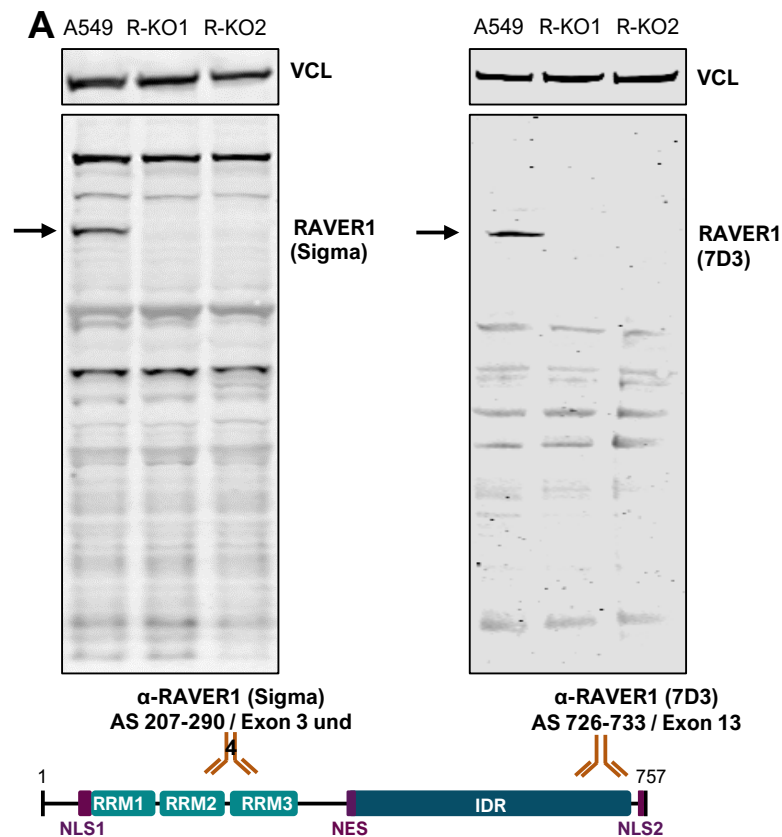
Müller S\*, **Wedler A\***, Breuer J\*, Glaß M, Bley N, Lederer M, Haase J, Misiak C, Fuchs T, Ottmann A, Schmachtel T, Shalamova L, Ewe A, Aigner A, Rossbach O, Hüttelmaier S. Synthetic circular miR-21 RNA decoys enhance tumor suppressor expression and impair tumor growth in mice. *NAR Cancer*. 2020 Jul 31;2(3):zcaa014. doi: 10.1093/narcan/zcaa014. PMID: 34316687; PMCID: PMC8210135.

\* Geteilte Erstautorenschaft

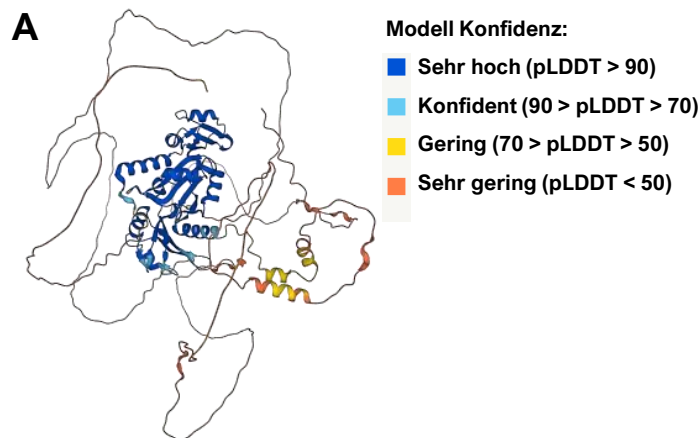
Piersimoni L, Abd El Malek M, Bhatia T, Bender J, Brankatschk C, Calvo Sánchez J, Dayhoff GW, Di Ianni A, Figueroa Parra JO, Garcia-Martinez D, Hesselbarth J, Köppen J, Lauth LM, Lippik L, Machner L, Sachan S, Schmidt L, Selle R, Skalidis I, Sorokin O, Ubbiali D, Voigt B, **Wedler A**, Wei AAJ, Zorn P, Dunker AK, Köhn M, Sinz A, Uversky VN. Lighting up Nobel Prize-winning studies with protein intrinsic disorder. *Cell Mol Life Sci*. 2022 Jul 26;79(8):449. doi: 10.1007/s00018-022-04468-y. PMID: 35882686.

Müller S, Bley N, Busch B, Glaß M, Lederer M, Misiak C, Fuchs T, **Wedler A**, Haase J, Bertoldo JB, Michl P, Hüttelmaier S. The oncofetal RNA-binding protein IGF2BP1 is a druggable, post-transcriptional super-enhancer of E2F-driven gene expression in cancer. *Nucleic Acids Res*. 2020 Sep 4;48(15):8576-8590. doi: 10.1093/nar/gkaa653. PMID: 32761127; PMCID: PMC7470957.

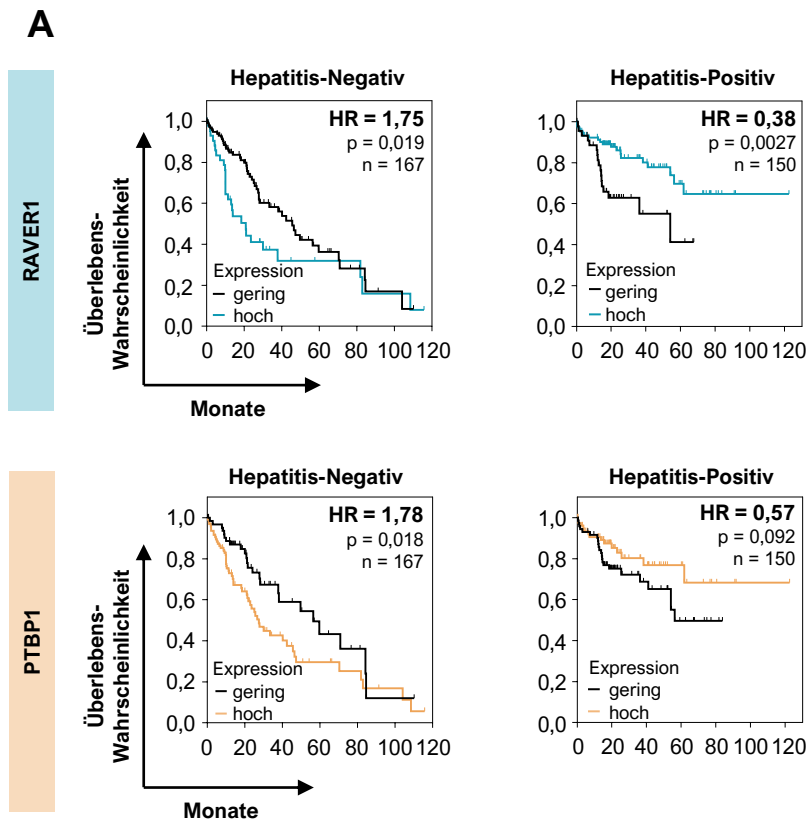
## 7.2. Zusätzliche Daten



**Abbildung 36: CRISPR/Cas9-vermittelte RAVER1-Deletion in A549.** (A) Western Blot Analysen parentaler A549 und RAVER1-deletierter A549 Einzelzellklone (R-KO1/R-KO2) wurden mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen RAVER1 durchgeführt. Anti-RAVER1 der Firma Sigma ist gegen die Aminosäuren (AS) 207-290 gerichtet, welche sich innerhalb der Exone 3 und 4 befinden. Anti-RAVER1 Klon 7D3 bindet innerhalb der AS 726-733, welche innerhalb des Exon 13 lokalisiert sind [207]. Eine entsprechende Bande des endogenen RAVER1 wurde gekennzeichnet. Western Blot Analysen wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt mit VCL als interner Kontrolle.



**Abbildung 37: Strukturvorhersage von RAVER1 zeigt intrinsisch ungeordnete Bereiche.** (A) Analyse der Proteinstruktur von RAVER1 (E9PAU2) wurden mittels AlphaFold durchgeführt. Bereiche der errechneten Konfidenzen pro Aminosäure (pLDDT) sind in einem Farbcode dargestellt.



**Abbildung 38: RAVER1 und PTBP1 besitzen sowohl pro-onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften in HCC. (A)** Überlebensanalysen der RAVER1- (oben) und PTBP1-Expression (unten) bei Patienten mit Hepatozellärem Karzinom (HCC) wurden nach Kaplan-Meier (KM) mittels KM Plotter ([www.kmplot.com](http://www.kmplot.com)) erstellt. Es erfolgte eine Aufteilung der Kohorte nach Hepatitis-negativen (links) und Hepatitis-positiven (rechts) Patienten. HCC: *Hepatocellular carcinoma*; HR: *Hazard Ratio*.

**Tabelle 14: GSEA-Analysen der MSigDB Hallmark Kollektion.** Analysen wurden auf Basis der RNA-Sequenzierung von RAVER1- und PTBP1-Depletion in A549 (diese Arbeit, n=3) und der RAVER1-Depletion in Hep-G2 (ENCODE-bezogene Daten, n=2) durchgeführt. Differentiell exprimierte protein-kodierende Gene wurden absteigend ihres  $\log_2FC$  gereiht und mittels GSEA Software analysiert. Daten der A549 Depletionen wurden bereits in Wedler *et al.* (2023) veröffentlicht [272]. FDR: *false discovery rate*; NES: *normalized enrichment score*.

GSEA: Hallmark (HM)	A549 siRAVER1		A549 siPTBP1		Hep-G2 shRAVER1	
	NES	FDR	NES	FDR	NES	FDR
EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	4.507	0.000	5.093	0.000	3.850	0.000
UV_RESPONSE_DN	3.190	0.000	3.661	0.000	3.334	0.000
P53_PATHWAY	2.550	0.001	2.064	0.009	2.689	0.000
HYPOXIA	2.550	0.001	2.204	0.007	-1.607	0.056
OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	2.519	0.001	-3.338	0.000	-2.946	0.000
TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	2.355	0.003	1.868	0.016	6.910	0.000
INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	2.209	0.007	-5.188	0.000	1.392	0.117
GLYCOLYSIS	2.160	0.008	-2.037	0.008	-3.390	0.000
TGF_BETA_SIGNALING	1.984	0.019	2.032	0.009	3.229	0.000

COAGULATION	1.893	0.028	-1.545	0.080	-3.058	0.000
MYOGENESIS	1.863	0.030	2.131	0.008	2.036	0.008
KRAS_SIGNALING_UP	1.835	0.032	1.901	0.015	3.748	0.000
COMPLEMENT	1.826	0.031	-2.039	0.008	1.922	0.012
IL2_STAT5_SIGNALING	1.808	0.031	2.022	0.008	2.975	0.000
PROTEIN_SECRETION	1.800	0.030	1.896	0.014	1.929	0.012
ALLOGRAFT_REJECTION	1.773	0.033	-1.052	0.420	2.738	0.000
APOPTOSIS	1.764	0.032	-2.092	0.007	3.099	0.000
HEDGEHOG_SIGNALING	1.668	0.052	1.283	0.208	-0.934	0.605
APICAL_JUNCTION	1.592	0.068	2.226	0.008	1.534	0.065
INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	1.526	0.089	-4.739	0.000	1.658	0.039
PANCREAS_BETA_CELLS	1.322	0.202	0.714	0.830	1.203	0.227
HEME_METABOLISM	1.310	0.202	-1.062	0.424	2.047	0.008
PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING	1.302	0.199	-1.013	0.435	1.216	0.225
ANGIOGENESIS	1.287	0.202	0.957	0.541	2.565	0.000
APICAL_SURFACE	1.269	0.208	-0.876	0.605	-0.838	0.692
FATTY_ACID_METABOLISM	1.235	0.225	-2.181	0.004	-3.520	0.000
BILE_ACID_METABOLISM	1.189	0.257	-1.438	0.123	-2.419	0.001
IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	1.094	0.341	-1.020	0.444	2.156	0.005
PEROXISOME	1.046	0.383	1.248	0.224	-1.449	0.107
SPERMATOGENESIS	-0.852	0.638	0.778	0.781	-0.870	0.676
NOTCH_SIGNALING	-1.004	0.450	-1.822	0.027	-0.665	0.889
WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING	-1.194	0.257	-1.665	0.050	-1.216	0.260
XENOBIOTIC_METABOLISM	-1.203	0.264	-3.300	0.000	-2.449	0.001
INFLAMMATORY_RESPONSE	-1.305	0.191	1.529	0.082	3.780	0.000
KRAS_SIGNALING_DN	-1.419	0.127	-1.724	0.042	-1.880	0.015
UV_RESPONSE_UP	-1.461	0.114	1.905	0.016	1.753	0.025
ADIPOGENESIS	-1.930	0.013	-2.842	0.000	-2.634	0.000
REACTIVE_OXYGEN_SPECIES_PATHWAY	-1.955	0.012	-1.398	0.139	1.851	0.016
CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	-2.064	0.008	-1.277	0.214	-2.894	0.000
UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE	-2.249	0.002	-1.735	0.042	-1.892	0.015
ANDROGEN_RESPONSE	-2.356	0.001	1.830	0.018	1.968	0.011
DNA_REPAIR	-2.659	0.000	-3.501	0.000	-2.820	0.000
ESTROGEN_RESPONSE_LATE	-2.761	0.000	-1.708	0.043	1.883	0.014



ESTROGEN_RESPONSE_EARLY	-2.814	0.000	2.050	0.009	2.261	0.002
MYC_TARGETS_V2	-2.958	0.000	1.450	0.112	-1.912	0.014
MITOTIC_SPINDLE	-3.670	0.000	2.852	0.000	-2.246	0.002
MTORC1_SIGNALING	-4.466	0.000	1.929	0.014	2.219	0.003
MYC_TARGETS_V1	-6.200	0.000	-2.663	0.000	-2.418	0.001
G2M_CHECKPOINT	-6.444	0.000	-2.894	0.000	-4.558	0.000
E2F_TARGETS	-7.326	0.000	-4.601	0.000	-6.528	0.000

**Tabelle 15: GSEA-Analysen der MSigDB C2 Kollektion gefiltert nach TGFB\_UP.** Analysen wurden auf Basis der RNA-Sequenzierung von RAVR1- und PTBP1-Depletion in A549 (diese Arbeit, n=3) und Hep-G2 (ENCODE-bezogene Daten, n=2) durchgeführt. Differentiell exprimierte protein-kodierende Gene wurden absteigend ihres log<sub>2</sub>FC gereiht und mittels GSEA Software analysiert. Daten der A549 Depletionen wurden bereits in Wedler *et al.* (2023) veröffentlicht [272].

GSEA filtriert TGFB_UP	C2: CGP nach	A549 siRAVER1		A549 siPTBP1		Hep-G2 shRAVER1		Hep-G2 shPTBP1	
		NES	FDR	NES	FDR	NES	FDR	NES	FDR
FOROUTAN_PRODR ANK_TGFB_EMT_UP		6.770	0.000	7.826	0.000	4.165	0.000	4.504	0.000
FOROUTAN_TGFB_E MT_UP		6.759	0.000	7.757	0.000	4.303	0.000	4.728	0.000
FOROUTAN_INTEGR ATED_TGFB_EMT_U P		5.990	0.000	5.819	0.000	3.622	0.000	4.440	0.000
PLASARI_TGFB1_TA RGETS_10HR_UP		2.952	0.000	3.684	0.000	4.926	0.000	3.063	0.000
COULOUARN_TEMP ORAL_TGFB1_SIGNA TURE_UP		2.841	0.000	2.304	0.003	2.990	0.000	1.565	0.088
MCBRYAN_PUBERT AL_TGFB1_TARGET S_UP		2.605	0.000	4.024	0.000	1.964	0.010	-1.647	0.072
VERRECCHIA_RESP ONSE_TO_TGFB1_C 4		2.089	0.011	1.427	0.155	0.876	0.602	1.081	0.457
VERRECCHIA_DELA YED_RESPONSE_TO _TGFB1		2.041	0.015	2.417	0.001	-0.992	0.893	0.703	0.846
VERRECCHIA_RESP ONSE_TO_TGFB1_C 5		1.821	0.038	1.933	0.021	-0.916	0.548	0.824	0.782
RAMJAUN_APOPTOS IS_BY_TGFB1_VIA_M APK1_UP		1.737	0.054	-1.500	0.137	0.916	0.535	0.810	0.702
VERRECCHIA_EARL Y_RESPONSE_TO_T GFB1		1.618	0.085	2.765	0.000	2.682	0.000	2.669	0.001
RAMJAUN_APOPTOS IS_BY_TGFB1_VIA_S MAD4_UP		1.574	0.100	-1.739	0.056	1.519	0.089	-1.181	0.245
PLASARI_TGFB1_SI GNALING_VIA_NFIC_ 1HR_UP		1.420	0.166	1.875	0.028	1.705	0.040	1.764	0.041

KARAKAS_TGFB1_SI GNALING	1.347	0.210	2.222	0.005	1.075	0.367	0.815	0.746
VERRECCHIA_RESP ONSE_TO_TGFB1_C 1	1.330	0.219	1.613	0.082	1.253	0.214	-1.316	0.199
JAZAG_TGFB1_SIGN ALING_UP	1.309	0.232	1.694	0.059	1.382	0.150	0.994	0.546
PLASARI_TGFB1_SI GNALING_VIA_NFIC_ 10HR_UP	1.089	0.416	1.453	0.143	2.279	0.001	1.303	0.226
VERRECCHIA_RESP ONSE_TO_TGFB1_C 3	0.912	0.618	2.422	0.001	2.747	0.000	2.236	0.003
VERRECCHIA_RESP ONSE_TO_TGFB1_C 6	-0.798	1.000	0.959	0.545	-0.669	0.893	-0.713	0.822
VERRECCHIA_RESP ONSE_TO_TGFB1_C 2	-1.069	0.000	1.354	0.195	1.377	0.142	1.665	0.062
PLASARI_TGFB1_TA RGETS_1HR_UP	-1.917	0.000	1.441	0.148	3.220	0.000	1.348	0.209
KARLSSON_TGFB1_ TARGETS_UP	-2.691	0.000	4.777	0.000	3.566	0.000	-2.753	0.000

**Tabelle 16: rMATS Analysen auf Basis der ENCODE-basierten RNA-Sequenzierung RAVER1- und PTBP1-depletierter Hep-G2.** Analysen wurden freundlicherweise von Dr. Markus Glaß durchgeführt. Tabelle beinhaltet die Anzahl signifikant gespleißter Protein-kodierender Transkripte (FDR < 0,05;  $|\Delta\text{PSI}| > 0,05$ ) je nach Klassifizierung des Spleiß-Ereignisses. RI: intron retention; MXE: mutually exclusive exon; A3SS/A5SS: alternative 3'/5' Spleißstelle; SE: skipped exon.

Spleiß-Ereignis	Hep-G2 shRAVER1	Hep-G2 shPTBP1
RI	448	569
MXE	222	223
A3SS	320	313
A5SS	298	252
SE	2716	2414

**Tabelle 17: Vergleich der signifikanten Protein-kodierenden skipped exon (SE) Ereignissen in RAVER1- und PTBP1- depletierter Hep-G2.** Analyse entsprechend der rMATS Analyse aus Tabelle 16.

Hep-G2 SE Events (Protein-kodierend; FDR < 0,05; $ \Delta\text{PSI}  > 0,05$ )	Anzahl Ereignisse
RAVER1-Spezifisch	2269
PTBP1-Spezifisch	1967
Gemeinsam	447

**Tabelle 18: Vergleich der gemeinsamen signifikanten Protein-kodierenden skipped exon (SE) Ereignisse in RAVER1- und PTBP1- depletierter Hep-G2.** Gemeinsame Ereignisse entsprechend Tabelle 17 wurden mit der rMATS Analyse aus Tabelle 16 verglichen. Tabelle zeigt Anzahl der gemeinsamen Ereignisse aufgeteilt nach  $\Delta\text{PSI}$  ( $\Delta$  percent spliced-in) der RAVER1- (shR) und PTBP1- Depletion (shP).

	$\Delta\text{PSI}$ (shP)>0,05; $\Delta\text{PSI}$ (shR)< 0,05	$\Delta\text{PSI}$ (shP)<0,05; $\Delta\text{PSI}$ (shR)<0,05	$\Delta\text{PSI}$ (shP)>0,05; $\Delta\text{PSI}$ (shR)>0,05	$\Delta\text{PSI}$ (shP)<0,05; $\Delta\text{PSI}$ (shR)>0,05
Anzahl SE Ereignisse	56	204	113	74

**Tabelle 19: Analyse der Anreicherung von RBP-Bindungsstellenmotiven RAVER1-depletierter A549.** Analysen innerhalb signifikant alternativ gespleißter Exone (FDR < 0,05) wurden von Dr. Markus Glaß durchgeführt und bereits in Wedler *et al.* (2023) veröffentlicht [272]. Konsensus-Sequenzen wurden entsprechend einem positiven bzw. negativen  $\Delta$ PSI ( $\Delta$  *percent spliced-in*) aufgeteilt.

	<b>Motiv</b>	<b>Konsensus</b>	<b>P Wert</b>	<b>Adj. P Wert</b>
<b>A549 siRAVER1</b> $\Delta$ PSI < -0,05	SRSF9	GGRWGGA	4.91E-09	7.55E-06
	SRSF2	AGGAGWDR	4.15E-08	5.23E-05
	RBMS1	TATATAS	2.42E-07	7.10E-05
	RBM6	MATCCAR	2.80E-07	0.000243
	SRSF1	GGAGGAG	4.35E-07	0.000625
	SAMD4A	GCTGGMC	9.74E-07	0.0011
	RBMS3	ATATATM	5.74E-06	0.00176
	LIN28A	HGGAGAA	2.75E-06	0.00291
	SRSF1	GGAGGAM	3.48E-06	0.00393
	RBM45	GACGACM	8.43E-06	0.00485
	SRSF1	GGAGGAN	5.02E-06	0.00516
	SRSF1	MAGGACAV	1.00E-05	0.0113
	G3BP2	AGGATRA	1.68E-05	0.0121
	LIN28A	CGGAGGR	1.25E-05	0.0149
	RBMS3	TATATAB	5.44E-05	0.0182
	SRSF1	GGAGGRV	3.04E-05	0.0269
	KHDRBS3	GATAAACV	7.78E-05	0.0294
	YBX1	AACATCA	5.43E-05	0.0295
	SRSF1	GGAGGRV	3.47E-05	0.0307
	YBX2	AACAWCD	4.99E-05	0.0385
YBX1	AACATCA	8.57E-05	0.0474	
SRSF9	AGGAGCA	2.94E-05	0.0484	
<b>A549 siRAVER1</b> $\Delta$ PSI > 0,05	LIN28A	HGGAGAA	1.30E-08	1.54E-05
	SAMD4A	GCTGGMC	5.91E-08	7.50E-05
	SRSF1	GGAGGAG	5.30E-08	8.77E-05
	RBM45	GACGACM	1.92E-07	0.00013
	SRSF1	GGAGGAN	4.45E-07	0.000545
	SRSF1	GGAGGAM	6.46E-07	0.000874
	SRSF9	AGGAGCA	1.12E-06	0.00215
	LIN28A	CGGAGGR	2.53E-06	0.00334
	SRSF9	GGRWGGA	2.73E-06	0.00472
	RBM28	GWGTAGW	1.92E-05	0.00962
	PABPN1	AGAAGAN	9.95E-06	0.0121
	SRSF1	GGAGGRV	3.66E-05	0.038
	SRSF1	MAGGACAV	3.06E-05	0.0391
	SRSF1	GGAGGRV	4.02E-05	0.0414
	YBX1	AACATCA	0.000105	0.0638

**Tabelle 20: Analyse der Anreicherung von RBP-Bindungsstellenmotiven PTBP1-depletierter A549.** Analysen innerhalb signifikant alternativ gespleißter Exone (FDR < 0,05) wurden von Dr. Markus Glaß durchgeführt und bereits in Wedler *et al.* (2023) veröffentlicht [272]. Konsensus-Sequenzen wurden entsprechend einem positiven bzw. negativen  $\Delta$ PSI aufgeteilt.

	<b>Motiv</b>	<b>Konsensus</b>	<b>P Wert</b>	<b>Adj. P Wert</b>
<b>A549 siPTBP1</b> $\Delta$ PSI < -0,05	SRSF1	GGAGGAG	1.32E-10	2.03E-07
	SRSF9	AGGAGCA	1.28E-09	2.29E-06
	SRSF1	GGAGGAM	3.44E-09	4.23E-06
	SRSF1	GGAGGAN	5.62E-09	6.27E-06
	LIN28A	CGGAGGR	2.89E-07	0.000365
	SRSF9	GGRWGGA	2.38E-07	0.000388
	LIN28A	HGGAGAA	5.85E-07	0.000668

	SRSF2	AGGAGWDR	5.10E-07	0.000693
	SAMD4A	GCTGGMC	1.78E-06	0.00201
	SRSF1	MAGGACAV	2.69E-06	0.00319
	YBX1	AACATCA	1.56E-05	0.00766
	PABPC5	AGAAAAT	1.88E-05	0.0223
	SRSF1	GGAGGRV	5.11E-05	0.0481
	SRSF1	GGAGGRV	7.08E-05	0.0661
	RBM5	GAAGGAA	6.63E-05	0.077
<b>A549 siPTBP1</b>	YBX1	AACATCA	1.07E-09	6.18E-07
<b>ΔPSI &gt; 0,05</b>	SAMD4A	GCTGGMC	5.72E-10	6.87E-07
	YBX1	AACATCA	1.54E-09	8.88E-07
	SRSF9	GGRWGGA	1.81E-08	2.77E-05
	LIN28A	HGGAGAA	2.80E-08	2.92E-05
	YBX2	AACAWCD	4.82E-06	0.00413
	RBMS1	TATATAS	1.82E-05	0.00511
	RBM5	GAAGGAA	4.97E-06	0.00544
	SRSF1	GGAGGRV	1.05E-05	0.00934
	LIN28A	CGGAGGR	2.33E-05	0.0267
	SRSF1	GGAGGAN	2.68E-05	0.0275
	PABPN1	AGAAGAN	2.68E-05	0.0297
	SRSF1	GGAGGAG	2.08E-05	0.0297
	SRSF2	AGGAGWDR	3.10E-05	0.0398
	SRSF1	GGAGGAM	3.87E-05	0.0427
	SRSF1	GGAGGRV	5.01E-05	0.0437
	G3BP2	AGGATRA	0.000144	0.0946

**Tabelle 21: Analyse der Anreicherung von RBP-Bindungsstellenmotiven RAVER1-depletierter Hep-G2.** Analysen innerhalb signifikant alternativ gespleißter Exone (FDR < 0,05) von RAVER1-depletierter Hep-G2 (ENCODE-bezogene Daten) wurden von Laura Schian durchgeführt. Konsensus-Sequenzen wurden entsprechend einem positiven bzw. negativen ΔPSI aufgeteilt.

	Motiv	Konsensus	P Wert	Adj. P Wert
<b>Hep-G2</b>	SAMD4A	GCTGGMC	3.06E-08	0.0000217
<b>shRAVER1</b>	SRSF1	GGAGGAG	0.0000316	0.0287
<b>ΔPSI &lt; -0,05</b>	SRSF2	AGGAGWDR	0.0000796	0.0681
<b>Hep-G2</b>	SRSF9	GGRWGGA	9.05E-10	0.00000134
<b>shRAVER1</b>	SRSF1	GGAGGAM	5.27E-09	0.0000059
<b>ΔPSI &gt; 0,05</b>	G3BP2	AGGATRA	1.29E-08	0.00000836
	LIN28A	HGGAGAA	1.07E-08	0.0000107
	SRSF1	GGAGGAG	1.64E-08	0.0000228
	SRSF1	GGAGGAN	2.05E-07	0.000209
	YBX1	AACATCA	5.83E-07	0.000266
	SRSF9	AGGAGCA	0.0000007	0.0011
	YBX1	AACATCA	4.36E-06	0.0019
	SRSF1	GGAGGRV	8.03E-06	0.00723
	SRSF1	GGAGGRV	0.0000106	0.00949
	PABPN1	AGAAGAN	0.0000183	0.0162
	KHDRBS3	GATAAACV	0.000125	0.0363
	SAMD4A	GCTGGMC	0.0000675	0.0719

**Tabelle 22: Analyse der Anreicherung von RBP-Bindungsstellenmotiven PTBP1-depletierter Hep-G2.** Analysen innerhalb signifikant alternativ gespleißter Exone (FDR < 0,05) von RAVER1-depletierter Hep-G2 (ENCODE-bezogene Daten) wurden von Laura Schian durchgeführt. Konsensus-Sequenzen wurden entsprechend einem positiven bzw. negativen ΔPSI aufgeteilt.

	Motiv	Konsensus	P Wert	Adj. P Wert
<b>Hep-G2 siPTBP1</b>	LIN28A	HGGAGAA	3.92E-09	0.0000038
<b>ΔPSI &lt; -0,05</b>	SRSF9	GGRWGGA	2.26E-08	0.0000277

	LIN28A	CGGAGGR	0.000000213	0.000216
	SAMD4A	GCTGGMC	0.00000201	0.00179
	SRSF1	GGAGGAM	0.00000209	0.002
	RBM5	GAAGGAA	0.0000022	0.00207
	SRSF1	GGAGGAG	0.00000381	0.00464
	SRSF1	GGAGGAN	0.00000672	0.00574
	G3BP2	AGGATRA	0.0000468	0.0272
	SFPQ	GTRGTKT	0.000061	0.0516
<b>Hep-G2 siPTBP1 ΔPSI &gt; 0,05</b>	SRSF9	GGRWGGA	5.46E-08	0.0000729
	RBM45	GACGACM	0.000000262	0.000129
	SRSF1	GGAGGAG	0.000000188	0.000243
	KHDRBS3	GATAACV	0.00000234	0.000895
	SAMD4A	GCTGGMC	0.00000254	0.00236
	LIN28A	HGGAGAA	0.00000269	0.00258
	LIN28A	CGGAGGR	0.00000412	0.00438
	SRSF1	GGAGGAN	0.00000707	0.0066
	SRSF1	GGAGGAM	0.0000098	0.0101
	KHDRBS1	ATAAAR	0.0000206	0.0104
	KHDRBS2	RATAAAM	0.0000156	0.0104
	RBM6	MATCCAR	0.0000339	0.0264
	SRSF1	GGAGGRV	0.0000328	0.0269

**Tabelle 23: Über-Repräsentations-Analysen (ORA) der MSigDB C2 Kollektion.** ORA C2: CP-WP (Canonical Pathway – WikiPathway) wurden auf Basis der rMATS Analyse durch Dr. Markus Glaß und Laura Schian durchgeführt. Hierfür wurde Protein-kodierenden SE-Ereignissen (FDR < 0,05; |ΔPSI| > 0,05) der RAVR1- und PTBP1-depletierten A549 Zellen verwendet. Es erfolgte eine Aufteilung der Spleiß-Ereignisse nach gemeinsamen, RAVR1-, und PTBP1-spezifisch gespleißten Transkripten. Dargestellt sind selektive Daten der ORA.

<i>Skipped Exon</i>	Signalweg	Gen Set	Alternativ gespleißtes Gen	Anzahl AS Gene/ Anzahl Gene	p-Wert
	Notch	WP_NOTCH_SIGNALING	CREBBP/APH1A/NUMB/NOTCH2/APH1B/RBPJ/CTBP2/NCOR2	8/45	2.1E-03
	WNT	WP_INFLUENCE_OF_LAMINOPATHIES_ON_WNT_SIGNALING	ICMT/SPP1/TARBP2/TCF7L2/FNTA	5/37	3.4E-02
	TGFβ	WP_TGFBETA_SIGNALING_PATHWAY	CREBBP/NEDD4L/ITGB4/MAP3K7/APP/ITGB1/DAB2/BTRC/SIN3A/PTK2/TFDP1/DCP1A	12/132	4.4E-02
<b>Gemeinsam</b>	Inflammation/ Immunantwort	WP_CYTOKINES_AND_INFLAMMATORY_RESPONSE	IL11/IL15/CSF1/PDGFA	4/26	4.5E-02
		WP_SARS_COV2_MITOCHONDRIAL_CHRONIC_OXIDATIVE_STRESS_AND_ENDOTHELIAL_DYSFUNCTION	BCS1L/SIRT6/NFKB1/NDUFA1	4/27	4.5E-02

<b>RAVER1-Spezifisch</b>	DNA Reparatur	WP_DNA_IRD AMAGE_AND _CELLULAR_ RESPONSE_ VIA_ATR	RECQL/TDP1/POLB/MLH1/ PALB2/UIBC1/RBBP8/NBN/ CEP164/FOXM1/RAD1/CDK 2/SMARCAL1/SMARCC2/FA NCI/FANCD2/ATM/RAD17/C DC25C/RECQL4/ABRAXAS 1/WRN/RFWD3/CDK1/TOP3 A/CHEK2	26/81	6.7E-08
		WP_DNA_RE PAIR_PATHW AYS_FULL_N ETWORK	LIG3/ERCC1/MNAT1/PNKP/ POLB/MLH1/PALB2/POLE2/ NBN/ERCC2/LIG1/RFC5/OG G1/FANCL/POLK/SMUG1/M UTYH/DDB2/REV1/TDG/FA NCI/FANCD2/ATM/DCLRE1 C/FANCC/WRN/POLL/CENP X/FAAP100	29/120	8.6E-06
	TGFβ	WP_TGFBET A_SIGNALING _PATHWAY	TNC/MAPK9/MEF2A/TGFBR 1/SMURF2/MAP2K6/PRKAR 2A/FN1/SOS1/ATF2/SUMO1 /NUP153/THBS1/AKT1/RNF 111/PTK2/CDK1/SMAD2/TGI F1/TFDP1	20/132	5.0E-02
	Inflammation/ Immunantwort	WP_SARSCO V2_REPLICAT ION_ORGANE LLE_FORMAT ION	PIK3C3/AMBRA1/BECN1	3/6	1.7E-02
		WP_HIJACK_ OF_UBIQUITI NATION_BY_ SARSCO2	CUL2/ELOC/NAE1	3/8	4.1E-02
<b>PTBP1-Spezifisch</b>	DNA Reparatur	WP_ATM_SIG NALING_PAT HWAY	BRCA1/BID/CCNE1/CASP2/ MDM2/RIPK1/FANCD2/ATM/ CDC25C/CDC25A/CHEK2/T LK1	12/40	2.8E-04
		WP_DNA_RE PAIR_PATHW AYS_FULL_N ETWORK	LIG3/BRCA1/ERCC1/POLD1 /POLB/MLH1/POLE2/POLI/E RCC2/LIG1/NEIL3/FANCE/O GG1/MUTYH/BRIP1/FANCI/ FANCD2/ATM/DCLRE1C/FA NCC/POLL/EXO1/CENPS	23/120	1.1E-03
		WP_DNA_DA MAGE_RESP ONSE	BRCA1/BID/BAX/CCNE1/CD K6/APAF1/MDM2/FANCD2/ ATM/CDC25C/CDC25A/ATR IP/CHEK2/TLK1	14/69	5.9E-03
	Inflammation/ Immunantwort	WP_HOSTPA THOGEN_INT ERACTION_O F_HUMAN_C ORONAVIRU SES_AUTOP HAGY	RB1CC1/WIP1/PIK3C3/ATG 16L1/MAP1LC3A/ATG10/AT G13	7/19	1.4E-03
		WP_HEPATITI S_C_AND_HE PATOCELLUL AR_CARCINO MA	BRCA1/BIRC3/CD44/CTTN/ MAPK3/VEGFA/PODXL/MY OF/UCHL1/VAV2/CASP7	11/56	6.4E-03

	WP_COVID19 _AND_ENDO THELIAL_CEL L_SENESCEN CE	IL17RC/ANO6/IL17RA	3/5	7.9E-03
TGFβ				Nicht signifika nt

**Tabelle 24: Auflistung der verwendeten MSigDB Gen-Sets zur Analyse verschiedener TGFβ-assoziierter Gene.**

Gen-Set	Quelle
KEGG_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	hsa04350
REACTOME_SIGNALING_BY_TGF_BETA_RECEPTOR_COMPLEX	R-HSA-170834
REACTOME_SIGNALING_BY_TGF_BETA_RECEPTOR_COMPLEX_IN_CANCER	R-HSA-3304351
REACTOME_SIGNALING_BY_TGFB_FAMILY_MEMBERS	R-HSA-9006936
REACTOME_TGF_BETA_RECEPTOR_SIGNALING_ACTIVATES_SMADS	R-HSA-2173789
REACTOME_TGF_BETA_RECEPTOR_SIGNALING_IN_EMT_EPITHELIAL_TO_MESENCHYMAL_TRANSITION	R-HSA-2173791
WP_TGFBETA_RECEPTOR_SIGNALING	WP560
WP_TGFBETA_SIGNALING_PATHWAY	WP366
WP_CANONICAL_AND_NONCANONICAL_TGFB_SIGNALING	WP3874
HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING	Liberzon <i>et al.</i> (2015) [351]

**Tabelle 25: Selektive GSEA-Analysen der MSigDB C2 Kollektion.** Analysen wurden auf Basis der RNA-Sequenzierung der RAVER1- und PTBP1-depletierten A549 (diese Arbeit; n=3) und Hep-G2 (ENCODE-bezogene Daten, n=2) durchgeführt. Differenziell exprimierte protein-kodierende Gene wurden absteigend ihres log<sub>2</sub>FC gereiht und mittels GSEA Software analysiert.

C2: Curated Gen-Set	A549 siRAVER1		A549 siPTBP1		Hep-G2 shRAVER1		Hep-G2 shPTBP1	
	NES	FDR	NES	FDR	NES	FDR	NES	FDR
	BLANCO_MELO_RESPIRATORY_SYNCYTIAL_VIRUS_INFECTION_A594_CELLS_UP	6.891	0.000	4.097	0.000	6.561	0.000	5.404
BLANCO_MELO_COVID19_SARS_COV_2_INFECTED_A594_CELLS_UP	3.321	0.000	3.556	0.000	3.169	0.000	2.150	0.004
WP_CYTOKINES_AND_INFLAMMATORY_RESPONSE	1.727	0.035	1.274	0.215	1.921	0.008	1.679	0.040

**Tabelle 26: Verwendete Gen-Sets für weiterführende ORA entsprechend Abbildung 32.**

rMATS ORA	Gen-Set	Quelle MSigDB
Gemeinsam	WP_HOSTPATHOGEN_INTERACTION_OF_HUMAN_CORONAVIRUSES_INTERFERON_INDUCTION	WP4880
	WP_IMMUNE_RESPONSE_TO_TUBERCULOSIS	WP4197

	WP_CYTOKINES_AND_INFLAMMATORY_RESPONSE	WP530
	WP_SARSCOV2_MITOCHONDRIAL_CHRONIC_OXIDATIVE_S TRESS_AND_ENDOTHELIAL_DYSFUNCTION	WP5183
	WP_EBSTEINBARR_VIRUS_LMP1_SIGNALING	WP262
	WP_SARSCOV2_REPLICATION_ORGANELLE_FORMATION	WP5156
<b>RAVER1- Spezifisch</b>	WP_HIJACK_OF_UBIQUITINATION_BY_SARSCOV2	WP4860
	WP_SARSCOV2_MITOCHONDRIAL_CHRONIC_OXIDATIVE_S TRESS_AND_ENDOTHELIAL_DYSFUNCTION	WP5183
	WP_HEPATITIS_C_AND_HEPATOCELLULAR_CARCINOMA	WP3646
<b>PTBP1- Spezifisch</b>	WP_COVID19_AND_ENDOTHELIAL_CELL_SENESCENCE	WP5256
	WP_HOSTPATHOGEN_INTERACTION_OF_HUMAN_CORONA VIRUSES_AUTOPHAGY	WP4863



### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtprozent
ΔIDR	Deletion der IDR
ΔRRM	Deletion der RRM
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
A3SS	alternative 3' Spleißstellen
A5SS	alternative 5' Spleißstellen
AGO	Argonaut-Protein
AI	<i>artificial intelligence</i>
AJ	<i>adhesion junction</i> ; Adhäsionsverbindung
AP	Affinitätspräzipitation
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASE	Anzahl <i>skipped exons</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BAX	BCL2-assoziiert X
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BIM	<i>Bcl2-interacting mediator of cell death</i>
BIN1	<i>bridging interactor 1</i>
BMF	<i>Bcl-2 modifying factor</i>
bp	Basenpaare
BPS	<i>Branchpoint</i> -Stellen
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
Cap	7-Methylguanosin
CARD	Caspase Aktivierungs- und Rekrutierungs-Domäne
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> ; Cyklin-abhängige Kinase
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CPM	<i>counts per million</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CRISPRi	CRISPR Interferenz
CUG-BP	CUG-bindendes Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCP1/2	<i>Decapping Protein 1/2</i>
DDX21	DEXD-Box Helikase 21
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DIS3L2	<i>DIS3-like exonuclease 2</i>
DMEM	<i>Dublecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELAV	<i>emryonic lethal abnormal vision</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
ES	<i>enrichment score</i>
ESE	Exonischer Spleiß <i>Enhancer</i>
ESRP1	Epithelialer Spleiß-regulatorisches Protein 1
ESS	Exonischer Spleiß <i>Silencer</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
Ex	Exon
FADD	<i>FAS associated death domain</i>
FASL	FAS-Ligand
FASP	<i>filter-aided sample preparation</i>
FASR	FAS-Rezeptor
FC	<i>foldchanges</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FFL	<i>Firefly</i> Luziferase
FOXP	<i>forkhead</i> Box Protein
FPKM	<i>fragments per kilobase milion</i>
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energietransfer
g	Erdbeschleunigung
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLUT1/3	Glukosetransporter 1/3
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysen</i>
GW	Glycin-Tryptophan
HCV	Hepatitis C Virus
HM	Hallmark
HMGA2	<i>high mobility group A2</i>
hnRNP	heterogenes Ribonukleoprotein
HR	Hazard Ration
IDR	<i>intrinsic disordered region</i> ; Intrinsisch ungeordnete Region
IFN	Interferon
IFN	Interferon
IGF2BP	<i>insulin-like growth factor 2 binding protein</i>
IKBKB; IKK $\beta$	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit B</i>
IL	Interleukin
IL17RC	<i>Interleukin 17 receptor C</i>
IL6ST	<i>Interleukin 6 signal transducer</i>
IP	Immunopräzipitation
IRES	interne Ribosom-Eintrittsstelle
IRF	IFN regulatory factor
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
iRFP	<i>near infrared fluorescent protein</i>
ISE	Intronischer Spleiß <i>Enhancer</i>
ISRE	<i>IFN sensitive response elements</i>
ISS	Intronischer Spleiß <i>Silencer</i>

ITAF	<i>initiation of translation accessory factors</i> ; initiale Translations-Faktoren
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
KLF5	KLF Transkriptionsfaktor 5
KM	Kaplan-Meier
KO	<i>Knockout</i>
KSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>
LB	Luria Bertani
LC-MS/MS	Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LFQ	<i>label-free quantification</i>
LGP2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
LIG1/3	DNA Ligase I/III
LIHC	<i>liver hepatocellular carcinoma</i>
LIN28	Lin-28 Homolog
Lj	<i>Lateolabrax japonicus</i> ; Seebarsch
LPS	Lipopolysaccharid
LUAD	Lungenadenokarzinom
Luz.	Luziferase
MAP3K7	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAVS	mitochondriales antivirales Signalprotein
MCS	multiple cloning site
MDA5	Melanom Differenzierungs-assoziiertes Protein 5
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cells</i>
MET	Mesenchymale-Epitheliale-Transition
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA; miR	microRNA
Mirtron	miRNA-kodierendes Intron
MKK3/4/6	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 3/4/6</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSigDB	The Molecular Signatures Database
MVCL	Metavinculin
MXE	<i>mutually exclusive exon</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
MYCN	<i>MYC neuroblastoma derived homolog</i>
n	number, Anzahl
n.s.	nicht signifikant
ncRNA	non-coding RNA; nicht-kodierende RNA
NES	<i>nuclear export sequence</i> ; Kernexportsequenz
NES	<i>normalized enrichment score</i>
NFκB	<i>nuclear factor 'κ-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

ng	Nanogramm
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NIK	<i>NFκB inducing kinase</i>
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
NLD	Nukleus Lokalisierungs-Determinante
NLS	<i>nuclear localization signal</i> ; Kernlokalisierungssignalen
NM	<i>non-muscle</i>
nm	Nanometer
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
NOVA	Neuro-onkologisches ventrales Antigene
nt	Nukleotid
nTPM	<i>normalized transcripts per kilobase million</i>
Oligo	Oligonukleotid
ORA	<i>over-representation analysis</i> ; Über-Repräsentations-Analysen
ORF	<i>open reading frame</i>
p	p-Wert; Wahrscheinlichkeitswert
PABP	Poly-Adenin bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
P-Bodies	<i>Processing-Bodies</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCBP1	<i>Poly(RC) binding protein 1</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDL1	<i>programmed cell death protein 1 ligand 1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PKM1/2	Pyruvat Kinase M
PLA	<i>proximity ligation assay</i>
PNC	<i>perinucleolar compartment</i> ; Perinukleoläres Kompartiment
Pol	Polymerase
Poly(A)	Poly-Adenin
Poly(I:C)	Poly-Inosinsäure/-Cytidinsäure
Poly(U)	Poly-Uracil
Poly(Y)	Polypyrimidin
pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i> ; Vorläufer miRNA
pre-mRNA	<i>precursor mRNA</i> ; Vorläufer mRNA
PRI	PTBP1-RAVER1-Interaktionsmotiv
pri-miRNA	primäre Vorläufer-miRNA
PRI <sub>mut</sub>	mutierte PRI Motive
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> ; Mustererkennung-Rezeptor
PSI	Percent Spliced-In
PTBP, PTB	Polypyrimidin-Track Bindendes Protein
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
R	Pearson R Korrelationskoeffizient
R6	random-Hexamere
RAS	Ratten-Sarkom
RB	Retinoblastom
RBM5	RNA-Bindemotiv Protein 5
RBOX2	<i>RNA Binding Fox-1 Homolog 2</i>

RBP	RNA-bindendes Protein
rel.	relativ
rel.	relativ
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RGNNV	<i>redspotted grouper nervous necrosis virus</i>
RI	<i>Intron retention</i>
RIG-I	Retinsäure-induzierbares Gen I
RIPK1	Rezeptor-interagierende Serin/ Threonin-Proteinkinase 1
R-KO	<i>RAVER1-Knockout</i>
RL	<i>Renilla</i> Luziferase
RLR	<i>RIG-I like receptor</i>
rmp	<i>revolutions per minute</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i> ; RNA-Erkennungsmotiv Domäne
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
SBP	<i>streptavidin binding protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SE	<i>skipped exon</i>
SEM	standard error of mean
SF1	Spleißfaktor 1
SF3B1	Spleißfaktor 3B Untereinheit 1
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
siC	siControl
siP	siPTBP1
siR	siRAVER1
SM	<i>smooth muscle</i>
SMAD4	<i>small MAD-Homolog 4</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein</i> ; kleines nukläres Ribonukleoprotein
SOX4	SRY-Box Transkriptionsfaktor 4
sq-PCR	semquantitative PCR
SRE	Spleiß-regulatorische Elemente
SRSF	Serine/Arginin-reicher Spleißfaktor
SS	Spleißstellen
ssRNA	<i>single-stranded RNA</i> ; Einzelsträngige RNA
T6B	TNRC6B
T6B $\Delta$ Ex6	TNRC6B mit Exon 6 Deletion
TAB2/3	<i>TAK1-binding protein 2/3</i>
TAK1	<i>TGFB activated kinase 1</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCGA	<i>the cancer genome atlas</i>
TF; TFT	Transkriptionsfaktor
TGFBR1/2	TGF $\beta$ -Rezeptor 1/2
TGF $\alpha$ / $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\alpha/\beta</math></i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TMM	<i>trimmed mean of M-values</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

---

TNRC6	<i>trinucleotide repeat-containing gene 6</i>
TP53	Tumorsuppressor Protein 53
TPM	<i>transcripts per kilobase million</i>
TPM1	$\alpha$ -Tropomyosin
TRAF3/6	<i>TNF receptor associated factor 3/6</i>
TRBP	Transaktivierung-reagierenden RNA-bindendes Protein
T <sub>reg</sub>	regulatorischer T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUT4/7	terminale Uridyl-Transferase 4/7
U2AF1/2	<i>U2 snRNP auxiliary factor 1/2; U2 snRNP-Hilfsfaktor 1/2</i>
UTR	<i>untranslated region</i> ; untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
VCL	Vinculin
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R	VEGF-Rezeptor
vgl.	vergleiche
V <sub>H</sub>	<i>Vinculin Head</i>
V <sub>T</sub>	<i>Vinculin Tail</i>
WT	Wildtyp
XRN1	Exoribonuklease 1
z.B.	zum Beispiel
ZEB1/2	Zinkfinger-E-Box-bindendes Homöobox 1/2

## 7.4. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Spleißosom-Assemblierung und katalytische Schritte des Spleißens..</b>	<b>3</b>
<b>Abbildung 2: Komplexe Interaktion zwischen cis- und trans-agierenden Faktoren zur Regulation des alternativen Spleißens. ....</b>	<b>5</b>
<b>Abbildung 3: miRNA Biogenese und Funktion.....</b>	<b>7</b>
<b>Abbildung 4: Schematische Darstellung pro-proliferativer Mechanismen in Karzinomen.....</b>	<b>15</b>
<b>Abbildung 5: Epitheliale-Mesenchymale-Transition führt zur Invasion und Metastasierung.....</b>	<b>17</b>
<b>Abbildung 6: Schematische Darstellung verschiedener PTBP1-Funktionen.....</b>	<b>22</b>
<b>Abbildung 7: Schematische Darstellung des RAVER1 Proteins.....</b>	<b>24</b>
<b>Abbildung 8: Mögliche multifunktionale Regulation durch RAVER1.....</b>	<b>25</b>
<b>Abbildung 9: Ubiquitäre Expression von RAVER1 und PTBP1 korrelieren miteinander. ....</b>	<b>55</b>
<b>Abbildung 10: RAVER1 und PTBP1 besitzen pro-onkogene Eigenschaften.....</b>	<b>56</b>
<b>Abbildung 11: Depletion von RAVER1 führt zur Reduktion der Proliferation. ....</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 12: RAVER1-Depletion resultiert in erhöhter Apoptose und G1/S Zell-Arrest. ....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 13: CRISPR/Cas9-vermittelte RAVER1-Deletion führt zur reduzierten Zellproliferation. ....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 14: Re-Expression von RAVER1 fördert die Zellproliferation. ....</b>	<b>62</b>
<b>Abbildung 15: RAVER1 hat einen pro-onkogenen Einfluss <i>in vivo</i>. ....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 16: Intrinsisch ungeordnetes RAVER1 interagiert mit PTBP1. ....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 17: RAVER1 ist entbehrlich für eine PNC Homöostase.....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 18: RAVER1- und PTBP1-Depletionen haben einen Einfluss auf proliferative Signalwege. ....</b>	<b>69</b>
<b>Abbildung 19: RAVER1-Depletion führt zur Induktion einer EMT.....</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 20: Induktion einer letalen EMT durch RAVER1-Depletion. ....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 21: RAVER1 und PTBP1 haben einen Einfluss auf die posttranskriptionelle Regulation.....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 22: RAVER1 beeinflusst die miR/RISC Aktivität. ....</b>	<b>77</b>
<b>Abbildung 23: Analyse des RAVER1- und PTBP1-vermittelten alternativen Spleißens mittels rMATS. ....</b>	<b>79</b>

---

<b>Abbildung 24: RAVER1 und PTBP1 sind Ko-Regulatoren.....</b>	<b>81</b>
<b>Abbildung 25: RAVER1 interagiert mit PTBP1 und anderen Spleißfaktoren.....</b>	<b>83</b>
<b>Abbildung 26: RAVER1 ist ein Regulator des alternativen Spleißens innerhalb des miR/RISC-Signalweges. ....</b>	<b>85</b>
<b>Abbildung 27: RAVER1 reguliert miR/RISC Faktoren durch Exklusion von Exons in A549. ....</b>	<b>86</b>
<b>Abbildung 28: RAVER1 reguliert miR/RISC Faktoren durch Exklusion von Exons.....</b>	<b>87</b>
<b>Abbildung 29: GW-Wiederholungen vermitteln Interaktion mit AGO2. ....</b>	<b>90</b>
<b>Abbildung 30: Alternative Spleiß-Transkripte sind in unterschiedlichen biologischen Prozessen angehäuft. ....</b>	<b>91</b>
<b>Abbildung 31: RAVER1 und PTBP1 vermitteln alternatives Spleißen TGF<math>\beta</math>-assoziierter Transkripte.....</b>	<b>94</b>
<b>Abbildung 32: RAVER1 und PTBP1 vermitteln alternatives Spleißen Infektions-assoziierter Transkripte. ....</b>	<b>97</b>
<b>Abbildung 33: RAVER1 und PTBP1 vermitteln alternatives Spleißen von Schlüsselfaktoren immunregulatorischer Signalwege.....</b>	<b>99</b>
<b>Abbildung 34: Schematische Darstellung der pro-onkogenen Funktion von RAVER1. ....</b>	<b>109</b>
<b>Abbildung 35: RAVER1 beeinflusst immunregulatorische Signalwege. ....</b>	<b>116</b>
<b>Abbildung 36: CRISPR/Cas9-vermittelte RAVER1-Deletion in A549.....</b>	<b>136</b>
<b>Abbildung 37: Strukturvorhersage von RAVER1 zeigt intrinsisch ungeordnete Bereiche. ....</b>	<b>136</b>
<b>Abbildung 38: RAVER1 und PTBP1 besitzen sowohl pro-onkogene als auch tumorsuppressive Eigenschaften in HCC.....</b>	<b>137</b>



## 7.5. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Verwendeter Bakterienstamm</b> .....	29
<b>Tabelle 2: Verwendete parentale Zelllinien</b> .....	29
<b>Tabelle 3: Generierte Zelllinien</b> .....	30
<b>Tabelle 4: Verwendete primäre Antikörper</b> .....	30
<b>Tabelle 5: Verwendete sekundäre Antikörper</b> .....	30
<b>Tabelle 6: Kommerzielle Plasmide</b> .....	31
<b>Tabelle 7: generierte Plasmide</b> .....	31
<b>Tabelle 8: Oligonukleotide zur Klonierung</b> .....	33
<b>Tabelle 9: Oligonukleotide für semi-quantitative-PCR</b> .....	33
<b>Tabelle 10: Oligonukleotide für qRT-PCR</b> .....	34
<b>Tabelle 11: siRNAs</b> .....	34
<b>Tabelle 12: Northern Blot Hybridisierungssonden</b> .....	34
<b>Tabelle 13: RAVER1 interagiert mit RNA-bindenden Proteinen</b> .....	82
<b>Tabelle 14: GSEA-Analysen der MSigDB Hallmark Kollektion</b> .....	137
<b>Tabelle 15: GSEA-Analysen der MSigDB C2 Kollektion gefiltert nach TGFB_UP</b> .....	139
<b>Tabelle 16: rMATS Analysen auf Basis der ENCODE-basierten RNA-Sequenzierung RAVER1- und PTBP1-depletierter Hep-G2</b> .....	140
<b>Tabelle 17: Vergleich der signifikanten Protein-kodierenden skipped exon (SE) Ereignissen in RAVER1- und PTBP1- depletierter Hep-G2</b> .....	140
<b>Tabelle 18: Vergleich der gemeinsamen signifikanten Protein-kodierenden skipped exon (SE) Ereignisse in RAVER1- und PTBP1-depletierter Hep-G2</b> .....	140
<b>Tabelle 19: Analyse der Anreicherung von RBP-Bindungsstellenmotiven RAVER1-depletierter A549</b> .....	141
<b>Tabelle 20: Analyse der Anreicherung von RBP-Bindungsstellenmotiven PTBP1-depletierter A549</b> .....	141
<b>Tabelle 21: Analyse der Anreicherung von RBP-Bindungsstellenmotiven RAVER1-depletierter Hep-G2</b> .....	142
<b>Tabelle 22: Analyse der Anreicherung von RBP-Bindungsstellenmotiven PTBP1-depletierter Hep-G2</b> .....	142
<b>Tabelle 23: Über-Repräsentations-Analysen (ORA) der MSigDB C2 Kollektion</b> .....	143
<b>Tabelle 24: Auflistung der verwendeten MSigDB Gen-Sets zur Analyse verschiedener TGFB-assoziierter Gene</b> .....	145
<b>Tabelle 25: Selektive GSEA-Analysen der MSigDB C2 Kollektion</b> .....	145
<b>Tabelle 26: Verwendete Gen-Sets für weiterführende ORA entsprechend Abbildung 32</b> .....	145

## Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, der mir nicht nur ermöglichte meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, sondern mich immer motivierte, mich unterstützte und mich mit stets neuen Ideen und Feedback weiter voranbrachte. Danke für deinen unentwegten Enthusiasmus, auch bei fast schon erfolglos geglaubten Projekten.

Dr. Nadine Bley möchte ich für ihre fachliche, aber auch mentale Unterstützung danken. Dein Antrieb, Einsatz und scharfsinniger Durchblick haben mir gezeigt, was man alles erreichen kann.

Allen Mitgliedern des RTG2476, sowie besonders meinem *Thesis Advisory Committee* bestehend aus Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Prof. Dr. Christian Eckmann, Dr. Marcel Köhn und Janett Köppen möchte ich für die vielen guten Diskussionen und Anregungen danken.

Dr. Markus Glaß und Laura Schian möchte ich für die vielen bioinformatischen Analysen und Hilfestellungen danken. Dr. Marcell Lederer, Dr. Nadine Bley, Alexander Rausch und Claudia Misiak möchte ich für die Unterstützung im Labor während der Revision bedanken.

Jedem einzelnen aus dem Hüttelmaier-Lab sowie dem Köhn-Lab möchte ich für die vielen Stunden der Zusammenarbeit und der Unterstützung danken. Danke für diese unvergessliche Zeit, die ohne euch sehr tristlos gewesen wäre. Ebenfalls danke ich Claudia Misiak, die irgendwann zu meiner linken Hand wurde. Ganz besonders gilt hier mein Dank Jana Lange, Sven Hagemann und Laura Schian, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, mich aus jedem Tief wieder herausgeholt haben und immer für ausreichend Kuchen gesorgt haben.

Natürlich möchte ich auch meiner Familie danken. Ihr habt es mir ermöglicht zu studieren, meinen eigenen Weg zu finden, mich bei jedem Schritt unterstützt und nie an mir gezweifelt.

Ganz zum Schluss möchte ich mich bei der für mich wichtigsten Person bedanken, meinem Verlobten Florian. Keine Worte der Welt können beschreiben, wie sehr du mich in all der Zeit bedingungslos unterstützt hat, mich gelehrt hast, an mich selbst zu glauben und niemals aufzugeben. Ohne dich wäre ich heute nicht an diesem Punkt. Danke!

---

## Curriculum Vitae

### Schulischer und Akademischer Werdegang

- 2004-2012            Gymnasium Gaußschule am Löwenwall, Braunschweig, Abschluss:  
Allgemeine Hochschulreife
- 2013-2017            Bachelorstudium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg, Abschluss: Bachelor of Science  
2016: Anfertigung der Bachelorarbeit unter Dr. Thomas Greither,  
Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie,  
Universitätsklinikum Halle  
Titel: Zellbiologische Effekte von zwei Hypoxieassoziierten  
microRNAs unter Azidose in Mundhöhlen- und  
Prostatakarzinomzelllinien
- 2017-2019            Masterstudium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg, Abschluss: Master of Science  
2018-2019: Anfertigung der Masterarbeit unter Prof. Dr. Stefan  
Hüttelmaier, Institut für Molekulare Medizin, Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
Titel: Die Inhibition onkogener microRNAs vermindert die Proliferation  
und Invasivität von Tumorzellen
- Seit 2019            Promotionsstudentin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan  
Hüttelmaier, Medizinische Fakultät, Institut für Molekulare Medizin,  
Abteilung Molekulare Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg
- Seit 2019            Promotionsstudentin des RTG2467 (DFG) „Intrinsically Disordered  
Proteins – Molecular Principles, Cellular Functions, and Diseases”

Halle (Saale),  
Alice Wedler

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale),

Alice Wedler