

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Posttranskriptionelle Regulation desmosomaler mRNA
durch RNA-bindende Proteine**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jonas Alexander Häde.

Betreuerin: Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld

Gutachter: Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Halle (Saale)
Prof. Dr. Manfred Kunz, Leipzig

Datum der Verteidigung: 11.10.2023

factori visibilium omnium et invisibilium

Referat

Desmosomen vermitteln als Interzellularkontakte einen festen Zellzusammenhalt in Geweben, die hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind (z.B. Haut, Herzmuskel, Magen-Darm-Schleimhaut). Als Multiproteinkomplex zeigen sie dabei einen gewebspezifischen Aufbau und unterliegen gleichzeitig einer dynamischen Zusammensetzung unter dem Einfluss von Zelldifferenzierung und extrazellulären Signalen. Dieses präzise Zusammenspiel von bis zu zwölf desmosomalen Proteinen unterliegt vielfältiger Regulation. Über die Regulation der Transkription desmosomaler Gene und über posttranslationale Modifizierungen desmosomaler Proteine ist bereits einiges bekannt. Relativ unbekannt hingegen sind Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation der mRNA desmosomaler Gene. Hieran sind neben regulatorischen Nukleinsäuren auch RNA bindende Proteine (RBP) beteiligt. Ziel dieser Arbeit ist es, einen systematischen Einstieg in die posttranskriptionelle Regulation der Expression desmosomaler Proteine durch RNA-bindende Proteine zu ermöglichen. Dabei dienten Analysen der 3'-UTR desmosomaler mRNA sowie Datenbankenanalysen dazu, Hinweise auf eine mögliche Regulation dieser Transkripte durch RBP zu sammeln. In ersten Pilotexperimenten wurden diese Hinweise weiter analysiert und Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen aufgezeigt. Die Untersuchungen der 3'-UTR der desmosomalen mRNAs auf das Vorhandensein bekannter regulatorischer Elemente ergaben zahlreiche Hinweise auf eine mögliche posttranskriptionelle Regulation. Und durch eine Analyse der Ergebnisse von Hochdurchsatzverfahren konnten potenzielle Regulatoren desmosomaler Transkripte ermittelt werden. Für einige dieser wurden Pilotexperimente in zwei Zelllinien mit ausgeprägten Desmosomen, humanen Keratinozyten (HaCaT) und einer Mammakarzinomzelllinie (MCF7), durchgeführt, um mögliche Effekte auf die Desmosomen zu identifizieren. Mittels siRNA (*small interfering RNA*) wurde die Expression der RBP ELAVL, G3BP1 und TIAL1 reduziert. Anschließend wurde via qRT-PCR bzw. SDS-PAGE und *Western Blot* untersucht, ob der Verlust des jeweiligen RBP einen Einfluss auf die Menge desmosomaler mRNA bzw. Proteine hatte. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurden mögliche Effekte auf die Struktur der Desmosomen und Lokalisation desmosomaler Proteine untersucht. Hierbei ergaben sich Hinweise auf eine Bindung an bzw. Regulation von DSC2 - 3, DSG2 und PKP2 durch ELAVL1, von DSC3, DSG2 und PKP1 - 2 durch G3BP1 sowie von DSC3, DSG2 und PKP1 - 3 durch TIAL1. In einem Immunpräzipitat dieser RBPs konnten Transkripte von DSC3, DSG2 und PKP2 nachweisen werden. Die Untersuchung eines Einflusses der RBP auf die Stabilität eines Zellverbandes bekräftigte Hinweise auf einen stärkenden Einfluss von ELAVL1 auf die Zelladhäsion. Zusammengefasst unterstützen diese Experimente eine mögliche Rolle von RBP in der Regulation von Desmosomen und liefern somit eine Basis für eine Validierung sowie weiterführende Untersuchungen.

Häde, Jonas: Posttranskriptionelle Regulation desmosomaler mRNA durch RNA-bindende Proteine, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 90 Seiten, 2023.

I Inhaltsverzeichnis

II Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Desmosomen.....	1
1.1.1	Struktur und Aufbau der Haut und der Desmosomen.....	1
1.1.2	Bedeutung der Desmosomen.....	4
1.1.3	Regulation der Expression desmosomaler Proteine.....	7
1.2	Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression.....	7
1.2.1	RNA-bindende Proteine.....	9
1.2.2	Regulatorische Nukleinsäuren.....	12
1.2.3	Regulatorische Elemente in der 3'-UTR der mRNA.....	13
2	Zielstellung.....	17
3	Materialien und Methoden.....	18
3.1	Materialien.....	18
3.1.1	Chemikalien und generelle Verbrauchsmaterialien.....	18
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	18
3.1.3	Zelllinien.....	18
3.1.4	siRNA.....	18
3.1.5	Antikörper.....	19
3.1.6	qRT-PCR-Primer.....	19
3.1.7	Plasmide.....	19
3.1.8	Geräte.....	19
3.1.9	Software.....	19
3.2	Methoden.....	19
3.2.1	Allgemeine Anmerkungen.....	19
3.2.2	Untersuchungen der 3'-UTR desmosomaler Transkripte.....	20
3.2.3	Datenbankenanalysen.....	20
3.3	Zellbiologische Methoden.....	22
3.3.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	22
3.3.2	Transfektion eukaryoter Zellen.....	23
3.3.3	Untersuchung zum Einfluss mechanischer Belastung auf die Stabilität eines Zellverbandes – <i>Dispase Assay</i>	24
3.3.4	Immunfluoreszenz.....	24
3.4	Biochemische Methoden.....	27
3.4.1	Herstellen eines Zelllysats.....	27
3.4.2	Bestimmung der Proteinmenge in einem Zelllysats.....	27

3.4.3	SDS-PAGE.....	28
3.4.4	Western Blot.....	28
3.4.5	Färben von Nitrozellulosemembranen	29
3.4.6	Ermittlung der relativen Proteinmenge	29
3.4.7	RNA-Isolation.....	30
3.4.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
3.4.9	Herstellen von cDNA mittels reverser Transkription.....	31
3.4.10	Quantitative Bestimmung von Transkripten mittels qRT-PCR.....	32
3.4.11	Ermittlung der relativen mRNA-Menge.....	32
3.4.12	Separieren von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese	33
3.4.13	Ko-Immunpräzipitation von Proteinen und RNA	33
3.5	Statistische Methoden	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Desmosomale Transkripte haben eine überdurchschnittlich lange 3'-UTR und HWZ..	36
4.2	Die 3'-UTRs desmosomaler mRNA enthalten eine Vielzahl regulatorischer Elemente	38
4.3	Desmosomale mRNAs interagieren mit einer Vielzahl an RBPs	42
4.4	Der Einfluss von RBP auf Desmosomen	46
4.4.1	Der Einfluss von ELAVL1 auf die Expression desmosomaler Transkripte und Proteine	47
4.4.2	Der Einfluss von G3BP1 auf die Expression desmosomaler Transkripte und Proteine.	51
4.4.3	Der Einfluss von TIAL1 auf die Expression desmosomaler Transkripte und Proteine .	55
4.4.4	Binden ELAVL1, G3BP1 und TIAL1 direkt an desmosomale mRNA?	58
4.4.5	Der Einfluss von G3BP1 und ELAVL1 auf die Stabilität eines Zellverbandes.....	62
5	Diskussion	64
5.1	Die Eigenschaften desmosomaler Transkripte liefern Indizien für deren posttranskriptionelle Regulation	64
5.1.1	Transkripte desmosomaler Gene haben eine lange 3'-UTR.....	64
5.1.2	Transkripte desmosomaler Gene haben eine lange HWZ	64
5.1.3	Transkripte desmosomaler Gene bergen zahlreiche regulatorische Sequenzen.....	65
5.2	Desmosomale Transkripte interagieren mit einer Vielzahl an RBP.....	66
5.3	Experimentelle Untersuchungen offenbaren weitere Hinweise auf eine Regulation desmosomaler Transkripte durch RBP	67
5.3.1	ELAVL1 als möglicher Regulator desmosomaler Transkripte	69
5.3.2	G3BP1 als möglicher Regulator desmosomaler Transkripte	70
5.4	TIAL1 als möglicher Regulator desmosomaler Transkripte	71
6	Zusammenfassung.....	73

7	Literaturverzeichnis.....	74
8	Thesen.....	90
III	Anhang	
i	Bedeutung der Desmosomen	
ii	Regulation der Expression desmosomaler Proteine	
iii	Chemikalien	
iv	Geräte und Software	
v	Regulatorische Elemente in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte	
vi	Potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA laut Datenbankenanalyse	
vii	Relative mRNA- und Proteinmengen nach RBP-KD	
viii	Tabellenverzeichnis	
ix	Abbildungsverzeichnis	
x	Erklärungen	
xi	Danksagung	

II Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AKT	Proteinkinase B
APA	Alternative Polyadenylierungsstelle
ARE	AU-reiches Element
ATP5F1B	<i>ATP synthase subunit beta</i>
ATTRACT	<i>A database of RNA-binding proteins and associated motifs</i>
AURA	<i>Atlas of UTR Regulatory Activity</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CDH1	Cadherin 1
CLIP	<i>cross-linking immunoprecipitation</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ct	<i>cycle threshold</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	destabilisierendes Element
DG	Deckgläschen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Desmocollin
DSG	Desmoglein
DSP	Desmoplakin
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELAVL1	ELAV-like protein 1
ENCORI	<i>The encyclopedia of RNA interactomes</i>
F	<i>forward</i>
FCS	fetales Kälberserum
FMRP	<i>Synaptic functional regulator FMRI</i>
FXR1	<i>Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1</i>
G	Guanin
G3BP1	<i>Ras GTPase-activating protein-binding protein 1</i>
GQS	G-Quadruplex Struktur
Hela	Humane Zervixkarzinomzellen
HWZ	Halbwertszeit
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
JUP	Plakoglobin
kDa	Kilodalton
mAk	monoklonaler Antikörper
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MT	<i>micro trace</i>
MYC	<i>Myc proto-oncogene protein</i>
nt	Nukleotide
p	Fehlerwahrscheinlichkeit
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBSE	<i>phosphate buffered saline with EDTA</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKP	Plakophilin

POSTAR2	<i>A resource of post-transcriptional regulation coordinated by RNA-binding proteins</i>
qRT-PCR	quantitative Echtzeit- Polymerasekettenreaktion
R	<i>reverse</i>
RBD	RNA-bindende Domäne
RBP	RNA-bindendes Protein
RBPDB	<i>The database of RNA-binding protein specificities</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	stabilisierendes Element
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TIA1	<i>Cytotoxic granule associated RNA binding protein TIA1</i>
TIAL1	<i>Nucleolysin TIAR</i>
U	Uridin
UTR	untranslatierte Region
UTRdb	<i>UTR database</i>
WB	<i>Western Blot</i>

1 Einleitung

1.1 Desmosomen

Die Multiproteinkomplexe der Desmosomen vermitteln als Zellkontakte eine starke interzelluläre Adhäsion, um unter mechanischem Stress den Zusammenhalt des Gewebes zu gewährleisten. Dabei finden sich Desmosomen in Zellen mechanisch stark beanspruchter Gewebe wie den Keratinozyten der Haut, den Epithelzellen gastrointestinaler und urogenitaler Schleimhaut sowie den Kardiomyozyten des Herzens (Nuber et al. 1995; Schmidt et al. 1997; Franke et al. 2006; Schlegel et al. 2021).

1.1.1 Struktur und Aufbau der Haut und der Desmosomen

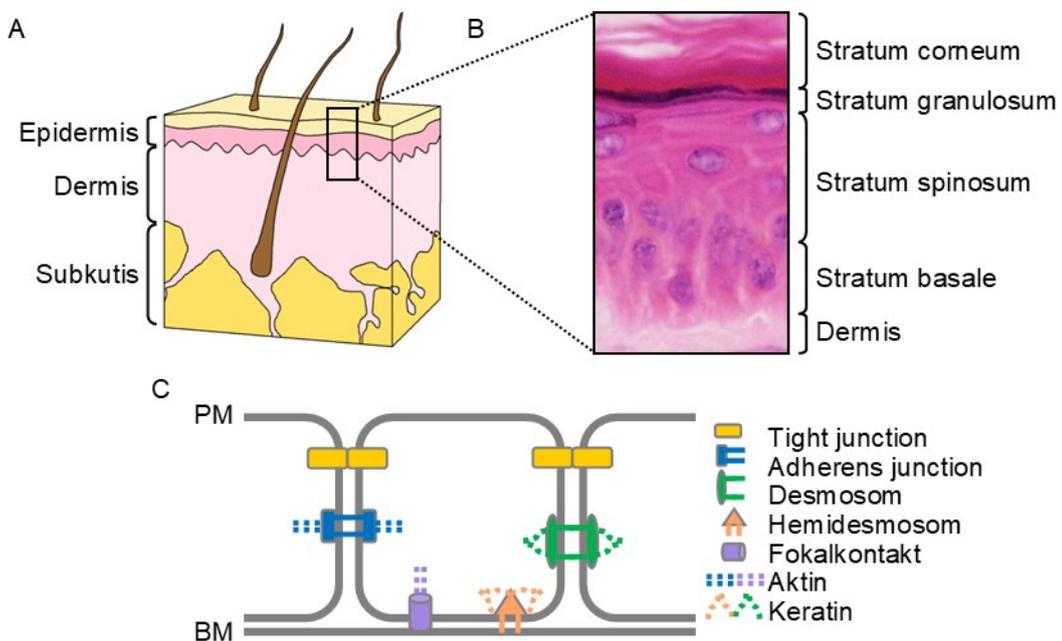


Abb. 1 | Aufbau der Haut und Adhärenzkontakte der Keratinozyten. A) Aufbau humaner Haut aus drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis (Watson, Katryn (2018) The layers of the skin. Healthline. <https://www.healthline.com/health/layers-of-skin>. Abgerufen am 10.08.2020.) **B)** Aufbau der Epidermis aus vier Schichten entsprechend des Differenzierungsgrades der Keratinozyten (Slomianka, Lutz. Blue Histology. <https://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/>, abgerufen am 10.08.2020. Färbung: Hämatoxylin - Eosin, 40-fache Vergrößerung). **C)** Zell-Zell-Kontakte und Verankerung an der Basalmembran der Keratinozyten. Selbst erstellt. **Abkürzungen:** PM, Plasmamembran; BM, Basalmembran.

Aufbau der menschlichen Haut

Die menschliche Haut besteht aus drei Schichten: Epidermis, Dermis, Subkutis (Abb. 1A) (Fritsch und Schwarz 2018, S. 1ff.). Die äußerste Schicht, die Epidermis bildet als mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel eine wirksame Barriere zwischen Körper und Umwelt. Darunter liegt die Dermis, eine elastisch- stabile Schicht aus Kollagen- und elastischen Fasern, in der neben Blutgefäßen und Nervenfasern auch zahlreiche Hautanhangsgebilde wie Haare, Talg- und Schweißdrüsen liegen. Das Fettgewebe der Subkutis bildet den Abschluss gegenüber tieferliegenden Strukturen wie beispielsweise Muskeln, Sehnen und Knochen. Es ist involviert in die Nährstoffversorgung der Haut, deren Beweglichkeit, in den Schutz vor mechanischer Belastung, die

Regulierung des Wärme- und Energiehaushaltes sowie in zahlreiche metabolische und endokrine Prozesse. Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten. Sie vermittelt als Grenzschiicht des Körpers Schutz vor Umwelteinflüssen wie mechanischem Stress, Einstrahlung von UV-Strahlung oder dem Eindringen von Mikroorganismen und verhindert durch einen wasserdichten Abschluss unregulierten Wasserverlust. Zudem beherbergt die Epidermis einen Teil des Immunsystems und spezialisierte Zellen für die Wahrnehmung von Berührungen (Tab. 1).

Tab. 1 | Zelltypen der Epidermis. Die verschiedenen Zellen der Epidermis übernehmen spezielle Aufgaben.

Zellen in der Epidermis	Funktion
Keratinozyten	Barriere, Schutz
Langerhanszellen	Phagozytose, Antigenpräsentation
Melanozyten	Schutz vor UV-Strahlung
Merkel-Zellen	Berührungssensibilität
Lymphozyten	Pathogenabwehr

Die Keratinozyten liegen in vier Schichten übereinander (Abb. 1B) und migrieren mit zunehmender Differenzierung von innen nach außen, bevor sie als tote Keratinozyten die äußerste Barriere der Haut bilden (ebd.). Den unteren Abschluss zur Dermis bildet eine Basalmembran. Hierauf liegen im einlagigen Stratum basale die zylindrischen Stammzellen der Keratinozyten. Diese durchlaufen den Zellzyklus und migrieren aktiv nach mitotischer Teilung zur Differenzierung in das 2 - 5 Zelllagen dicke Stratum spinosum. Im Stratum granulosum flachen die Zellen weiter ab, verlieren Zellkern und Zellorganellen, bilden ein belastbares intrazelluläres Keratinnetz und füllen den Interzellularraum mit einer zementartigen Lipidsubstanz aus, um schließlich in einem starren Verband fixiert zu werden. Das Stratum corneum bildet schließlich eine widerstandsfähige Barriere gegenüber physikalischen und chemischen Noxen (ebd.).

Zellkontakte in der Epidermis

Der Zusammenhalt der Keratinozyten der Epidermis wird über fünf verschiedene Proteinkomplexe vermittelt (Fritsch und Schwarz 2018, S. 8ff.): Desmosomen, *Adherens junctions*, Hemidesmosomen, Fokalkontakte und *Tight junctions* (Abb. 1C). Desmosomen und *Adherens junctions* verbinden das Zytoskelett einer Zelle mit dem der Nachbarzelle und vermitteln einen starken Gewebezusammenhalt. Hemidesmosomen und Fokalkontakte verankern die Basalzellen an der Basalmembran. *Tight junctions* bewirken im Stratum granulosum einen wasserdichten Verschluss des Interzellularraumes und verhindern einerseits das Eindringen von Fremdstoffen und zum anderen einen unkontrollierten Flüssigkeitsverlust. Die Expression von Zellkontaktproteinen ist abhängig von der Lokalisation der Zelle in der Epidermis sowie von eigenen bzw. benachbarten Migrationsaktivitäten und unterliegt damit während der Differenzierung der Keratinozyten einer

notwendigen Dynamik (Nekrasova und Green 2013). Auch das Reagieren auf Zustände außerhalb der Homöostase, wie etwa während der Wundheilung nach Verletzungen setzen die Fähigkeit zur Umstrukturierung der Zellkontakte voraus (Garrod et al. 2005; Tariq et al. 2015).

Desmosomen und Adherens junctions haben einen ähnlichen Aufbau (Tab. 2). Die Zellkontakte bestehen je aus einem Transmembranprotein, welches homo- bzw. heterotypisch mit dem Zellkontakt der Nachbarzelle interagiert (Abb. 2A). Intrazellulär sind die Transmembranproteine über Linker-Proteine untereinander vernetzt und mit Adapterproteinen verbunden. Letztere verbinden den Zellkontakt mit dem Zytoskelett.

Tab. 2 | Bestandteile der Desmosomen und Adherens junctions. Ein Transmembranprotein interagiert homo- bzw. heterotypisch mit dem Zellkontakt der Nachbarzelle. Über *Linker*-Proteine sind diese innerhalb der Zelle untereinander vernetzt und mit Adapterproteinen verbunden, die den Zellkontakt an dem Zytoskelett verankern (Hartsock und Nelson 2008; Nekrasova und Green 2013; Fritsch und Schwarz 2018, S. 8ff.).

	Desmosomen	Adherens junctions
Transmembranprotein	Desmocollin 1 - 3 (DSC 1 - 3) Desmoglein 1 - 4 (DSG 1- 4)	Cadherin 1 (CDH1, E-Cadherin) und andere Cadherine
<i>Linker</i> -protein	Plakoglobin (JUP, <i>junction plakoglobin</i>) Plakophilin 1 - 3 (PKP 1 - 3)	Plakoglobin (JUP) P120-Catenin, Plakophilin 4
Adapterprotein	Desmoplakin 1 - 2 (DSP)	Catenin alpha und beta
Zytoskelett	Intermediärfilamente (z.B. Keratin)	Aktin

Die Zusammensetzung der Desmosomen ändert sich mit dem Grad der Differenzierung der Keratinozyten (Abb. 2B) (Siehe hierzu den Übersichtsartikel von Kottke et al. 2006). DSP, JUP und PKP3 finden sich in allen Schichten der Epidermis (Arnemann et al. 1993; Bonn  et al. 1999). DSC2 und DSG2 sind hauptsächlich in den Zellen des Stratum basale exprimiert (ebd.). DSG3 und DSC3 finden sich zudem auch in abnehmender Konzentration in darüber liegenden Schichten (ebd.). DSG1 und DSC1 sind in hohem Maße im Stratum granulare und Stratum corneum exprimiert (Ishida-Yamamoto und Igawa 2015). DSG4 findet sich suprabasal, aber vor allem in Haarfollikeln (Garrod et al. 2002; Kljuic et al. 2003; Kottke et al. 2006). PKP1 ist vorwiegend in suprabasalen (Moll et al. 1997; Schmidt et al. 1997) und PKP2 bevorzugt in basalen Zellen exprimiert (Mertens et al. 1996). Neben den Unterschieden in der Verteilung innerhalb der Schichten der Epidermis, zeigt sich bei den Plakophilinen auch eine differenzierte Verteilung an den Zellgrenzen. PKP1 findet sich nahezu ausschließlich an bizellul ren (lateralen) Kontakten, während PKP3 an trizellul ren Kontakten akkumuliert (Keil et al. 2016; Rietscher et al. 2018). Letztere Regionen sind besonderen mechanischen Belastungen ausgesetzt (Bosveld et al. 2016).

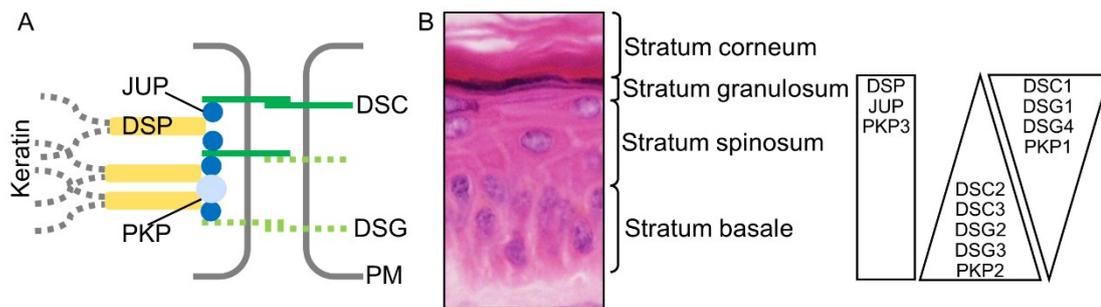


Abb. 2 | Struktur der Desmosomen und Verteilung desmosomaler Proteine in der Epidermis. **A)** Die desmosomalen Cadherine Desmocolline (DSC) und Desmogleine (DSG) binden homo- bzw. heterogen an solche der Nachbarzelle. Intrazellulär sind sie über Plakoglobin (JUP) und Plakophiline (PKP) untereinander vernetzt und mit dem Adapterprotein Desmoplakin (DSP) verbunden, welches den Zellkontakt am Zytoskelett verankert. **B)** Die Zusammensetzung der Desmosomen variiert mit der Wanderung des Keratinozyten durch die Schichten der Epidermis. Modifiziert nach (Kottke et al. 2006). **Abkürzungen:** PM, Plasmamembran.

1.1.2 Bedeutung der Desmosomen

Die Beteiligung desmosomaler Proteine an intrazellulären Prozessen

Neben der Vermittlung eines starken Gewebezusammenhaltes sind desmosomale Proteine an zahlreichen intrazellulären Prozessen beteiligt. Tab. 22 zeigt eine Übersicht über solche Funktionen. Für einen ausführlichen Überblick siehe z.B. Dusek et al. 2007; Hatzfeld 2007; Müller et al. 2021; Hegazy et al. 2022. So beeinflussen sie über die Beteiligung an intrazellulären Signalwegen Differenzierung und Proliferation von Zellen über einen Einfluss auf Transkription, Translation oder posttranslationale Modifizierungen (ebd.).

Desmosomale Proteine in Dermatosen und Kardiomyopathien

Die bedeutende Funktion der Desmosomen wird vor allem dann deutlich, wenn physiologische Prozesse gestört sind. Veränderungen der Funktion oder Struktur desmosomaler Proteine durch Mutationen, zelluläre oder extrazelluläre Einflüsse sind assoziiert mit einer Vielzahl von Hauterkrankungen (Dermatosen), Erkrankungen des Herzmuskelgewebes (Kardiomyopathie) und der Entstehung von Tumoren. Tab. 24 zeigt eine Übersicht über Krankheiten, die mit einer Veränderung desmosomaler Proteine assoziiert sind. Siehe hierzu ausführlich (Garrod et al. 2002; Delva et al. 2009; Hatzfeld et al. 2014; Fritsch und Schwarz 2018, S. 501ff.; Najor 2018).

Eine Beeinträchtigung desmosomaler Adhäsion führt zum Lösen der Keratinozyten voneinander, der Akantholyse (Melchionda und Harman 2019). Dies ist u.a. bei den Autoimmunkrankheiten Pemphigus vulgaris und Pemphigus foliaceus zu beobachten. Charakteristisch für Pemphigus vulgaris sind Autoantikörper gegen DSG1 und DSG3 (ebd.). Die betroffenen Patienten leiden an suprabasaler Akantholyse, sehr schmerzhaften Schleimhauterosionen und intraepidermaler Blasenbildung mit schlaffen, kurzlebigen Blasen. Die Autoantikörper bei Pemphigus foliaceus sind gegen DSG1 und DSG4 gerichtet (Kljuic et al. 2003; Melchionda und Harman 2019). Die resultierende subkorneale Akantholyse zeigt sich bei den Patienten in Erythemen, Erosionen, Krusten

und Schuppung. Wegen der sehr oberflächlichen Lage der betroffenen Zellen ist eine Blasenbildung nur selten zu beobachten. Schleimhäute sind bei Pemphigus foliaceus nicht betroffen (Fritsch und Schwarz 2018, S. 501ff.). In den unterschiedlichen Symptomen der beiden Erkrankungen zeigt sich erneut die unterschiedliche Zusammensetzung der Desmosomen innerhalb der Epidermis sowie in verschiedenen Geweben.

Eine gewebespezifische Symptomatik zeigt sich bei der Arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC). Diese angeborene Erkrankung, bei der es durch einen fibrös-fettigen Umbau des Herzmuskels zu einer Insuffizienz des rechten Ventrikels, Arrhythmien oder zum plötzlichen Herztod kommen kann, steht in Zusammenhang mit Mutationen von DSC2, DSG2, JUP und PKP2. In einigen Fällen zeigt sich zudem klinisch eine Trias aus ARVC, palmoplantarer Keratose und Wollhaar – das Naxos-Syndrom (Simpson et al. 2009; Fritsch und Schwarz 2018, 659; Christensen et al. 2019).

Mutationen des *PKP1*-Gens können zu einer abnormen mechanischen Verletzlichkeit der Haut führen (Jonkman et al. 2005; Fritsch und Schwarz 2018, S. 672). Patienten mit diesem *Skin-fragility*-Syndrom zeigen neben generalisierten oberflächlichen Erosionen der Haut auch Erosionen oraler und gastrointestinaler Schleimhäute, welche im weiteren Krankheitsverlauf zu Obstipationen und intestinalen Strikturen führen können. Der Maximalform des *Skin-fragility*-Syndroms, der letalen akantholytischen Epidermolysis bullosa simplex, liegen Mutationen der *DSP*- und *JUP*- Gene zugrunde (Datenbankeintrag für *Epidermolysis bullosa, akantholytische lethale* im *Portal für seltene Krankheiten und Orphan Drugs*; https://www.orpha.net/consor4.01/www/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=DE&Expert=158687; Abgerufen am 27.08.2020.). Diese sehr seltene Erkrankung ist charakterisiert durch ausgeprägte Erosionen von Haut und Schleimhäuten, fehlende Nägel, eine universelle Alopezie und neonatalen Zähnen. Die Patienten versterben meist in den ersten Lebensmonaten aufgrund des hohen Flüssigkeitsverlustes über die geschädigte Haut bzw. einer insuffizienten Atmung, bei Befall der respiratorischen Schleimhäute (ebd.).

Assoziation desmosomaler Proteine mit Tumoren

Eine Veränderung der Zelladhäsion ist auch in Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren zu beobachten. Die entscheidende Rolle der *Adherens junctions* darin ist schon seit Langem bekannt. Der Verlust von CDH1 zählt zu den Schlüsselereignissen der Entstehung epithelialer Tumoren, den *hallmarks of cancer* (Hanahan und Weinberg 2000; 2011). Eine gestörte Funktion von CDH1 korreliert positiv mit dem Verlust der Differenzierung sowie einer gesteigerten Infiltration und Metastasierung von Tumoren (Christofori und Semb 1999). Das Adapterprotein Catenin beta 1 der *Adherens junctions*, das homologe Protein zu JUP in Desmosomen, wird während dieses Prozesses von den Zellkontakten in den Nukleus verlagert und führt dort über die

Interaktion mit Transkriptionsfaktoren zu einer Steigerung der Proliferation (Behrens et al. 1996). Da auch desmosomale Proteine Einfluss auf Proliferation und Differenzierung üben (Tab. 22) könnten Veränderungen dieser ebenfalls an der Tumorgenese beteiligt sein. Eine veränderte Expression desmosomaler Proteine in einer Vielzahl epithelialer und nichtepithelialer Tumoren bestätigt diese Annahme (Tab. 23) (Müller et al. 2021). Einige Studien zeigten einen positiven Zusammenhang zwischen der Reduktion desmosomaler Proteine und der Invasivität und Metastasierung verschiedener Tumore sowie einer schlechten Prognose (Wong et al. 2008; Dusek und Attardi 2011; Hatzfeld et al. 2014). Auch eine vermehrte Expression von DSG2 im Mausmodell führte zu gesteigerter Proliferation von Keratinozyten und epidermaler Tumorinduktion (Brennan et al. 2007; Brennan-Crispi et al. 2019). Auch in anderen Tumoren wurde eine vermehrte Expression desmosomaler Proteine beobachtet (Hatzfeld et al. 2014; Najor 2018). Dass dies kein Widerspruch sein muss, zeigen Colaprico et al. (2020). Sie beschreiben zahlreiche Gene, die je nach biologischem Kontext onkogene oder tumorsuppressive Eigenschaften aufweisen. Solche bezeichnen sie als „*dual role cancer driver genes*“ (ebd.). Für die desmosomalen Proteine wurde gezeigt, dass PKP1 die Adhäsion einerseits erheblich verstärken kann und damit als Tumorsuppressor wirkt, andererseits aber im Zytoplasma über eine Steigerung der Proteinbiosynthese die Proliferation steigert und damit potenziell onkogen wirkt (Wolf et al. 2010).

Phänotypen nach *knockout* desmosomaler Gene im Mausmodell

Um die Funktion und Bedeutung der einzelnen desmosomalen Proteine zu untersuchen, wurden zahlreiche Mausmodelle etabliert, welche die Auswirkungen des globalen oder gewebsspezifischen Verlustes einzelner Gene demonstrieren. Tab. 25 zeigt eine Zusammenstellung solcher Untersuchungen. Eine ausführliche Darstellung findet sich bei Rietscher et al. 2016 und Müller et al. 2021. Dabei zeigen sich einige Gene desmosomaler Proteine als entscheidend für das Überleben eines Embryos (Dsc3, Dsg2, Dsp, Jup) bzw. der Neugeborenen (Dsg1, Pkp1). Nahezu alle Modelle verdeutlichen die ausgeprägte Bedeutung adäquater desmosomaler Adhäsion für die mechanische Belastbarkeit der Haut (Dsc1, Dsc3, Dsg1, Dsg3, Dsg4, Dsp, Jup, Pkp1, Pkp3), intestinaler Schleimhaut (Dsc2, Dsg2) und des Myokards (Dsc2, Jup, Pkp2). Das Fehlen einiger Proteine resultiert in einer gestörten Haarentwicklung (Dsc3, Dsg3, Dsg4, Pkp3).

Desmosomen während der Wundheilung

Die Wundheilung ist ein äußerst komplexer Prozess, bei dem mehrere Zell- und Gewebearten involviert sind und verschiedene Vorgänge koordiniert und interagierend ablaufen (Fritsch und Schwarz 2018, S. 67ff.). Verschiedene Zellen gelangen nach einer Verletzung in die Wunde und produzieren, wie auch die Keratinozyten selbst, eine Vielzahl an Signalmolekülen (Singer und Clark 1999; Garrod et al. 2005; Gurtner et al. 2008; Thomason et al. 2012; Fritsch und Schwarz 2018, S. 67ff.). Diese fördern über eine Aktivierung von Keratinozyten und Fibroblasten die

Reepithelialisierung und Bildung von kollagenreichem Granulationsgewebe (ebd.). Der Reepithelialisierung liegen dabei zwei Mechanismen zu Grunde: Migration und Mitose der Keratinozyten (Fritsch und Schwarz 2018, S. 67ff.; Garcia et al. 2018). Eine starke Zelladhäsion, wie sie durch Desmosomen vermittelt wird, würde diese Mechanismen hemmen. Schon lange ist bekannt, dass die Zahl der Desmosomen am Wundrand deutlich reduziert ist (Croft und Tarin 1970; Okada et al. 2001), was auf vermehrter Internalisierung am Wundrand beruht (McHarg et al. 2014). Auch die Zusammensetzung der Desmosomen ändert sich während der Wundheilung (Moll et al. 1999). Die vor allem basal zu findenden Cadherine DSG2 und DSG3 werden während der Regeneration in nahezu allen Zellen exprimiert, während die typischen Marker für differenzierte Keratinozyten DSC1 und DSG1 erst später wieder gebildet werden (ebd.). Dabei zeigte sich bei gesteigerter DSG2- Expression eine Zunahme der Migration der Keratinozyten (Cooper et al. 2018) und ein Verlust von DSG3 resultierte in einer Verzögerung der Wundheilung (Rötzer et al. 2016).

1.1.3 Regulation der Expression desmosomaler Proteine

Eine vom Grad der Differenzierung abhängige Zusammensetzung der Desmosomen in der Epidermis, Aufgaben an Zellkontakten sowie im Zytoplasma, die Anpassung desmosomaler Funktion während der Wundheilung - all dies ist nur durch eine exakt kontrollierte Expression und Regulation der einzelnen Komponenten möglich.

Die Expression eines Gens kann auf verschiedenen Ebenen an den jeweiligen Bedarf der Zelle angepasst werden (Abb. 3). Ein Ablesen der DNA (Desoxyribonukleinsäure) wird über die Kontrolle der Transkription gebahnt oder verhindert. Das entstandene Transkript kann in Form und Funktion verändert und dessen Übersetzung in ein Protein gesteuert werden. Die Funktion des fertigen Proteins kann anschließend durch Modifizierungen beeinflusst werden. Tab. 26 zeigt beispielhaft bekannte Mechanismen zur Steuerung von Expression und Funktion desmosomaler Gene. Eine ausführliche Darstellung findet sich u.a. bei Müller et al. 2021. Über die Kontrolle der Transkription desmosomaler Gene wie auch über posttranslationale Modifizierungen desmosomaler Proteine ist bereits viel bekannt, über die Regulation der *messenger-RNA* (mRNA; RNA, Ribonukleinsäure) desmosomaler Gene bisher allerdings wenig.

1.2 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression

Die posttranskriptionelle Regulation umfasst hierbei alle Modifikationen und Regulationen der mRNA vom Beginn ihrer Synthese bis zum Beginn der Translation (Alberts et al. 2007, S. 413ff.). Dies umfasst die in Abb. 3 dargestellten Mechanismen sowie die Kontrolle der Translationsinitiation.

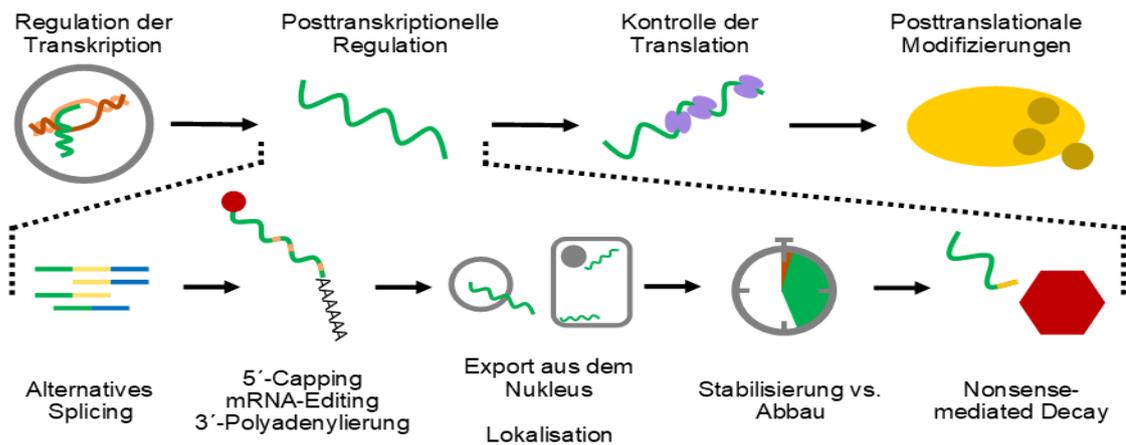


Abb. 3 | Kontrolle der Genexpression. Die Kontrolle der Genexpression erfolgt auf der Ebene der Transkription und Translation sowie durch die Modifizierungen von mRNA und dem eigentlichen Protein. Die posttranskriptionelle Regulation geschieht durch ein vorzeitiges Beenden der Transkription (nicht dargestellt), alternatives Splicing, die Modifizierung von 5' und 3'-Ende durch *capping* bzw. Polyadenylierung, mRNA-Editing, einem kontrollierten Export der mRNA aus dem Nukleus sowie deren Transport innerhalb des Zytoplasmas, die Stabilisierung der mRNA bzw. deren beschleunigter Abbau, durch *nonsense-mediated decay* sowie ein Fördern bzw. Hemmen der Translationsinitiation (nicht dargestellt).

Die meisten dieser Prozesse erfordern das Erkennen spezieller Sequenzen bzw. Strukturen der zu regulierenden mRNA. Diese Aufgabe übernehmen RNA-bindende Proteine oder regulatorische RNA-Moleküle (ebd.). Die fertige mRNA besteht aus 5 funktionellen Elementen (ebd.):

- 5'-Cap
- 5'-UTR
- codierende Region
- 3'-UTR
- Poly-A-Schwanz

5'-Cap und Poly-A-Schwanz schützen die mRNA vor vorzeitigem Abbau und spielen eine entscheidende Rolle in der Initiation der Translation. Die codierende Region reicht vom Start- zum Stopcodon und trägt den Code für das zukünftige Protein. Die 5'-UTR (zwischen 5'-Cap und Startcodon) sowie die 3'-UTR (zwischen Stopcodon und Polyadenylierungsstelle) werden bei der Translation nicht in eine Aminosäuresequenz übersetzt (UTR, untranslatierte Region). Sie dienen vor allem der Regulation der Genexpression. Aufgrund der Beobachtung eines positiven exponentiellen Zusammenhangs der Komplexität eines Organismus und der Länge der 3'-UTR wird diesem Abschnitt der mRNA eine besondere regulatorische Rolle zugeschrieben (Chen et al. 2012; Mayr 2017). Für die 5'-UTR und die codierende Region ließ sich ein solcher Zusammenhang nicht zeigen. Lee et al. (2010) konnten zeigen, dass ein regulatorisches Element die HWZ einer mRNA signifikant beeinflusst, wenn es in deren 3'-UTR lokalisiert ist. Befindet sich dasselbe Element in der codierenden Region oder in der 5'-UTR ist dieser Effekt deutlich geringer bzw. nicht vorhanden. Eine lange 3'-UTR bietet hierbei viele Möglichkeiten der Regulation. Über verschiedene Polyadenylierungsstellen können z.B. unterschiedlich lange 3'-UTR entstehen, über die eine individuelle Regulation möglich ist (Chen et al. 2012; Mayr 2019).

1.2.1 RNA-bindende Proteine

An jedem Schritt der mRNA-Regulation sind RNA-bindende Proteine (RBP) beteiligt (Hentze et al. 2018). So wundert es nicht, dass bisher über 1300 RBP bekannt sind (ebd.). Sie binden an spezielle RNA-Sequenzen bzw. Sekundärstrukturen und vermitteln selbst regulatorische Effekte oder rekrutieren weitere Effektorproteine (Mayr 2019). Um diese Bindung zu realisieren, besitzen die modular aufgebauten RBP meist mehrere RNA-bindende Domänen (RBD) derselben oder verschiedener Art (Glisovic et al. 2008). Neben bekannten RBD, wie z.B. dem *RNA-recognition motif* (RRM), der *K-homology domain* (KH) oder den *Zinc finger* Domänen (Znf), gibt es noch eine Vielzahl bisher nicht weiter charakterisierter Domänen (Castello et al. 2016). Eine Kombination mehrerer RBD bestimmt die funktionellen Möglichkeiten der RBP (Lunde et al. 2007). Ein RBP kann mehrere mRNAs binden und eine Nukleotidsequenz kann von verschiedenen RBP erkannt werden, wobei das gebundene RBP letztendlich die Regulation der mRNA bestimmt (ebd.).

In Reaktion auf extra- und intrazelluläre Stressreize wie Hitze, oxidativen Stress, Nährstoffmangel oder Virusinfektionen formen sich im Zytoplasma aus RBP und mRNA sogenannte *stress granules* (Buchan und Parker 2009), in denen untranslatierte mRNA akkumuliert. Auf diese Weise geschützt vor einem vorzeitigen Abbau, steht die mRNA nach Abklingen des Reizes der Proteinsynthese umgehend zur Verfügung. Elementare Bestandteile dieser membranlosen Zellorganellen sind u.a. die RBP EIF4E (Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E), ELAVL1 (*ELAV-like protein 1*), FMR1 (*Synaptic functional regulator FMRI*), G3BP1 (*Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*), TIA1 (*Cytotoxic granule associated RNA binding protein TIA1*), TIAL1 (Nucleolysin TIAR) (Anderson und Kedersha 2002; Alberts et al. 2007, S. 427; Decker und Parker 2012). Sie rekrutieren eine Vielzahl unterschiedlicher mRNAs, deren Proteinprodukte unter Stressbedingungen nicht gebraucht werden. Dies schließt u.a. Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und Protoonkogene ein (Namkoong et al. 2018). Dabei konnte bisher unter den in *stress granules* angesammelten mRNAs keine einheitliche Nukleotidsequenz als „Adresse“ für *stress granules* ausgemacht werden (Abdelmohsen et al. 2008). Auffällig ist jedoch die Anreicherung von mRNA mit einem ausgeprägten Anteil an AU-reichen Elementen (ARE) sowie Isoformen mit längeren 3'-UTR (Namkoong et al. 2018).

Eine effektive Methode, an RNA *in vivo* gebundene Proteine systematisch zu analysieren, ist die *cross-linking immunoprecipitation* (CLIP) (König et al. 2012; Zhang et al. 2015). Eine UV-C-Bestrahlung lebender Zellen bewirkt eine kovalente Quervernetzung von RNA mit in direkter Nachbarschaft (wenige Ångström entfernt) befindlichen Proteinen (Licatalosi und Darnell 2010). Die entstandenen Ribonukleoproteinkomplexe werden mittels eines Antikörpers gegen das zu

untersuchende Protein präzipitiert und die kopräzipitierte RNA anschließend isoliert und analysiert. Mehrere Schritte zur Reinigung des Präzipitats sollen unspezifische Bindungen zwischen dem RNA-Molekül und dem Protein beseitigen und falsch positive Ergebnisse vermeiden. Erweiterungen dieser Methoden wie HITS-CLIP bzw. CLIP-seq (*high-throughput sequencing of CLIP cDNA library* bzw. *CLIP followed by sequencing*) kombinieren die CLIP mit Hochdurchsatzanalysen der gebundenen Nukleinsäure (König et al. 2012; Gillen et al. 2016). PAR-CLIP (*UV-A photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation*) und iCLIP (*individual nucleotide resolution CLIP*) erweiterten die Möglichkeiten um eine exakte Bestimmung der Bindungsstelle eines RBP (Hafner et al. 2010; König et al. 2010). eCLIP (*enhanced CLIP*) postuliert eine genauere Differenzierung zwischen echten Bindungen und zufälligen Quervernetzungen (van Nostrand et al. 2016). Limitiert werden die CLIP und ihre verwandten Methoden durch den geringen quantitativen Charakter ihrer Ergebnisse. Die qualitative Aussage, welche RNAs ein bestimmtes RBP bindet, oder welche RBPs die gleiche RNA adressieren, lässt sich mit allen Varianten treffen. Die Frage nach der Affinität eines RBP zu seinem *target* lässt sich mit dieser Methode bisher hingegen nur unzureichend beantworten (Zhang et al. 2015; König et al. 2012). Onlinedatenbanken versuchen, die zunehmende Fülle an Informationen über Protein-RNA-Interaktion zugänglich zu machen. Tab. 3 zeigt die für diese Arbeit ausgewerteten Datenbanken.

Tab. 3 | Übersicht über Datenbanken, die für die Analysen in dieser Arbeit ausgewertet wurden.

Datenbank	Eigenschaften	Referenz
ATTRACT	<i>A database of RNA-binding proteins and associated motifs</i> Experimentell validierte Angaben zu mRNA-Motiven, die durch RBP erkannt wurden, > 1200 Motive https://attract.cnice.es	Giudice et al. 2016
AURA	<i>Atlas of UTR Regulatory Activity</i> Angaben zu RBP und regulatorischen Sequenzen in der 3'-UTR humaner mRNA, > 110000 3'-UTRs, > 250 RBP http://aura.science.unitn.it	Dassi et al. 2014
ENCORI	<i>The encyclopedia of RNA interactomes</i> Angaben über Interaktion von RNA mit miRNA, RBP und RNA >700 CLIP-seq Datensets, > 1,2 Mio. RBP-mRNA-Interaktionen https://starbase.sysu.edu.cn/index.php	Li et al. 2014
POSTAR2	2014: CLIPdb - 2016: POSTAR - 2019: POSTAR2 - 2021: POSTAR3 <i>"A resource of post-transcriptional regulation coordinated by RNA-binding proteins"</i> , CLIP-seq Daten, > 40 Mio. RBP-Bindungsstellen http://111.198.139.65 (Version POSTAR3)	Yang et al. 2015; Hu et al. 2017; Zhu et al. 2019; Zhao et al. 2022
RBPDB	<i>The database of RNA-binding protein specificities</i> Angaben zu RNA-Bindungsdomänen von > 400 humanen RBP http://rbpdb.ccb.utoronto.ca	Cook et al. 2011
UTRdb	<i>UTR database</i> Angaben zu experimentell ermittelten funktionellen Motiven innerhalb der 5' bzw. 3'-UTR eukaryoter mRNA http://utrdb.ba.itb.cnr.it	Pesole 2002

Da die zu Beginn durchgeführten *in-silico*-Analysen auf eine mögliche Rolle von ELAVL1 (*ELAV like RNA-binding protein 1*), G3BP1 (*Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*) und TIAL1 (*Nucleolysin TIALR*) in der posttranskriptionellen Regulation desmosomaler mRNA hinwiesen, wurden diese RBPs für erste Pilotexperimente ausgewählt.

ELAVL1

ELAVL1 ist das einzige Protein innerhalb der *ELAV*-Genfamilie, das ubiquitär in allen menschlichen Geweben exprimiert wird, wohingegen die verwandten Gene ELAVL2 - 4 in Neuronen zu finden sind (Hinman und Lou 2008; Schultz et al. 2020). Es ist bekannt für die Stabilisierung und Förderung der Translation seiner *targets* über eine Bindung an AU-reiche Elemente (ARE) in einer U-reichen Umgebung (Ma et al. 1996; Wang et al. 2013; Schultz et al. 2020). So bindet es die *MYC*-mRNA (*Myc protooncogene protein*) in Bereichen der 3'-UTR mit vielen ARE und beeinflusst deren Translation ohne die Menge des Transkripts zu verändern (Liu et al. 2009). Einen Einfluss auf Zelladhäsion übt ELAVL1 über die direkte Interaktion mit der 3'-UTR der *CDHI*-mRNA aus, deren Translation durch ELAVL1 gefördert wird, was einen positiven Einfluss auf die Barrierefunktion eines Epithels hatte (Yu et al. 2016). *ELAVL1*-defiziente Embryonen versterben intrauterin aufgrund einer fehlerhaften Plazentafunktion (Katsanou et al. 2009) und postnatale *ELAVL1*-Depletion in Mäusen resultierte u.a. in Störungen der intestinalen Epithelfunktion, Kachexie und Versterben innerhalb weniger Tage (Ghosh et al. 2009). In intestinalen Epithelien finden sich vor allem DSG2, DSC2, DSP, JUP und Plakophiline (Schlegel et al. 2021). ELAVL1 könnte an der Regulation dieser beteiligt sein.

G3BP1

G3BP1 übernimmt vielfältige Aufgaben in der mRNA-Regulation (Irvine et al. 2004). Ursprünglich als Endonuklease in Zusammenhang mit mRNA-Degradierung beschrieben, zeigte es sich als essenziell für die Ausbildung von *stress granules* und damit für die Stabilisierung von Transkripten im Zusammenhang mit Zellstress sowie als Vermittler einer Translationsinhibition (Gallouzi et al. 1998; Tourrière et al. 2001; 2003; Ortega et al. 2010). G3BP1 degradiert die *MYC*-mRNA (Tourrière et al. 2001; Irvine et al. 2004) und inhibiert die Translation der *ATP5F1B*-mRNA (*ATP synthase subunit beta*) (Ortega et al. 2010). Tourrière et al. (2001) beschrieben für die Bindung in der 3'-UTR der *MYC*-mRNA die Zielsequenz 5'-ACCCAUACGCAG-3'. Für weitere *targets* konnte diese allerdings nicht nachgewiesen werden (Irvine et al. 2004). Zudem gilt die Annahme, dass viele weitere Transkripte von G3BP1 nicht über deren Primärstruktur erkannt werden (ebd.). Fischer et al. (2020) beschrieben die Vermittlung des Abbaus hoch strukturierter RNAs u.a. durch G3BP1. Eine RNA-abhängige Interaktion wurde zwischen G3BP1 und

PKP1 sowie PKP3 beschrieben (Hofmann et al. 2006; Fischer-Kešo et al. 2014). Da diese Komplexe auch *DSP*- und *PKP2*-mRNA enthielten, besteht die Möglichkeit, dass G3BP1 an der Regulation dieser mRNAs beteiligt sein könnte (Fischer-Kešo et al. 2014).

TIAL1

TIAL1 und das eng verwandte RBP TIA1 (*cytotoxic granule associated RNA binding protein 1*) binden u.a. ARE in der 3'-UTR ihrer *targets* und destabilisieren gebundene mRNA bzw. inhibieren deren Translation oder regulieren alternatives *splicing* (Le Guiner et al. 2001; Meyer et al. 2018). Beide Proteine weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf (Übereinstimmung in Primärsequenz etwa 76 %), teilen zahlreiche Funktionen und hemmen die Translation der eigenen und jeweils anderen mRNA (Sánchez-Jiménez und Izquierdo 2015; Meyer et al. 2018). Auswirkungen einer Funktionsstörung zeigen sich zum Teil erst bei einer Störung oder einem Fehlen beider Proteine (Meyer et al. 2018). Sie sind ebenso wie G3BP1 an der Ausbildung von *stress granules* beteiligt (Anderson und Kedersha 2002; Meyer et al. 2018). Bei homozygot *Tial1*-defizienten Mäusen zeigen sich eine erhöhte intrauterine und perinatale Letalität sowie ein reduziertes Körpergewicht und Sterilität (Beck et al. 1998). Ein gleichzeitiges Fehlen von TIAL1 und TIA1 in HEK293-Zellen lassen deren essenzielle Bedeutung für Überleben und Proliferation einer Zelle erkennen (Meyer et al. 2018).

1.2.2 Regulatorische Nukleinsäuren

Neben Proteinen interagieren auch nichtkodierende RNA-Moleküle mit der mRNA und üben regulatorischen Einfluss auf diese aus. Tab. 4 zeigt eine Auswahl solcher nicht-translatierten RNAs mit regulatorischer Funktion. Diese unterscheiden sich nicht nur in ihrer Länge, sondern vor allem in ihrer spezifischen Funktion (Matera et al. 2007; Schmitz et al. 2016; Boivin et al. 2019).

Tab. 4 | Auswahl regulatorischer Nukleinsäuren. Die Tabelle zeigt eine Auswahl regulatorischer Nukleinsäuren. Nicht weiter genannt sind u.a. *Piwi-interacting RNA*, *small nuclear RNA* und *small nucleolar RNA*. **Abkürzungen:** nt, Nukleotide. **Referenz:** Matera et al. 2007; Schmitz et al. 2016; Boivin et al. 2019.

RNA	Name	Länge (nt)	Funktion (Auswahl)
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>	20-25	Exogen Beteiligung an Degradierung spezifischer mRNA
miRNA	<i>Micro-RNA</i>	20-30	Endogen Repression von Translation Beteiligung an Degradierung spezifischer mRNA
lncRNA	<i>Long noncoding RNA</i>	>200	Vielfältige Regulation von Gen-Aktivität

siRNA und miRNA reprimieren die Expression einzelner Gene durch die Bindung einer komplementären mRNA-Sequenz (Agrawal et al. 2003). Um in eine Zelle internalisierte exogene siRNA- bzw. endogene miRNA-Moleküle herum lagern sich verschiedene Proteine zum *RNA-induced*

silencing complex (RISC) an (Kawamata und Tomari 2010). Nachdem von dem RNA-Doppelstrang ein Strang abgespalten wurde, lagert sich der übrig gebliebene RNA-Leitstrang an einen komplementären Abschnitt einer einzelsträngigen mRNA. Die Proteine des RISC vermitteln anschließend eine Degradierung der gebundenen mRNA und wirken somit einer Produktion des entsprechenden Gens entgegen (Abb. 4). Dieser Mechanismus, der zuerst in Zusammenhang mit Virusinfektionen in Pflanzenzellen beobachtet wurde, ist heute ein effektives Werkzeug zur gezielten Steuerung der Genexpression für die Erforschung zellulärer Prozesse und zunehmend auch in der Entwicklung gezielter Therapeutika in der Behandlung von Hautkrankheiten und Tumoren (Carthew und Sontheimer 2009; Abel und Rederstorff 2015; Rosa et al. 2018; Singh et al. 2018; Mahmoodi Chalbatani et al. 2019). Chen et al. (2012) zeigten durch Analyse von miRNA-Datenbanken eine positive Korrelation zwischen der morphologischen Komplexität eines Organismus und der Anzahl an miRNAs und betonten damit den hohen Stellenwert der miRNA in der Regulation der Genexpression. Der Einfluss endogener miRNA auf die posttranskriptionelle Regulation der Expression desmosomaler Proteine wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Aktuelle Daten wurden von Müller et al. (2021) zusammengefasst. Sie zeigen, dass miRNA zunehmend als Regulatoren desmosomaler Transkripte beschrieben werden.

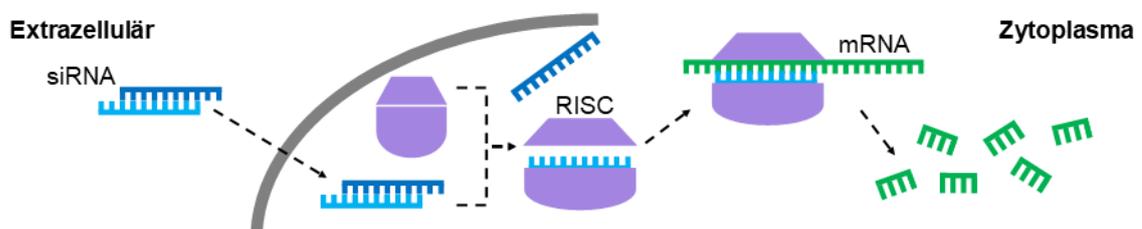


Abb. 4 | siRNA vermittelt sequenzspezifischen mRNA-Abbau. In die Zelle aufgenommene künstliche siRNA und endogene miRNA (nicht abgebildet) bilden mit diversen Proteinen den RISC (*RNA-induced silencing complex*). Der siRNA-Leitstrang innerhalb des RISC bindet eine komplementäre mRNA und vermittelt deren Degradierung. Abbildung in Analogie zu Rosa et al. 2018.

1.2.3 Regulatorische Elemente in der 3'-UTR der mRNA

Regulatorische Elemente, also RNA-Sequenzen oder Sekundärstrukturen, die durch RBP und/ oder miRNA erkannt werden können, beeinflussen das Schicksal eines RNA-Moleküls. Bekannte Vertreter sind u.a. alternative Polyadenylierungsstellen (APA), AU-reiche Elemente (ARE), Alu-Elemente und G-quadruplex Strukturen (GQS).

Alternative Polyadenylierungsstellen

Die Polyadenylierung des 3'-Endes einer mRNA während ihrer Synthese stabilisiert das RNA-Molekül und schützt es vor einem vorzeitigen Abbau. In den meisten Genen finden sich dabei

mehrere APA (Alberts et al. 2007). Über eine alternative Polyadenylierung können mRNA-Isformen entstehen, die sich entweder in der codierenden Region oder der 3'-UTR unterscheiden, wodurch das entstehende RNA-Molekül oder das spätere Protein reguliert werden können (Elkon et al. 2013). Über die Expression verschieden langer Transkripte desmosomaler Gene ist bisher insgesamt wenig bekannt und eine systematische Analyse der Expression eventueller alternativer Transkripte desmosomaler Gene wurde bisher nicht durchgeführt. *Northern Blot* Analysen der *PKP1*-mRNA zeigten zwei Transkripte unterschiedlicher Länge (Hatzfeld et al. 1994). Da das kurze Transkript das Protein vollständig codiert, vermuteten die Autoren Unterschiede in der 3'-UTR. Die Bedeutung dieser unterschiedlich langen 3'-UTR ist bis heute nicht weiter geklärt.

AU-reiche Elemente

Schon lange sind ARE als Determinante einer kurzen Halbwertszeit eines Transkripts beschrieben (Lagnado et al. 1994; Barreau et al. 2005). Als klassisches Motiv dieser Adenin- (A) und Uridin- (U) reichen mRNA-Sequenzen gilt das Pentamer *AUUUA* in einer uridinreichen Umgebung, wobei schon früh festgestellt wurde, dass dieses Motiv nicht allein für die beobachteten Effekte verantwortlich ist (ebd.). Doch auch die später als mindestens notwendig beschriebene Sequenz *UUUUAUUUA(U/A)(U/A)* ist vor allem dann mit einer deutlichen Destabilisierung einer mRNA assoziiert, wenn mindestens zwei dieser Motive vorliegen (Barreau et al. 2005; Lai et al. 2005). Bisher konnte für die ARE allerdings noch keine einheitliche Konsensussequenz definiert werden (Barreau et al. 2005). Basierend auf der Anzahl und Verteilung des Pentamers *AUUUA* erfolgte die Einteilung der ARE in drei Klassen (Tab. 5). Diese Einteilung berücksichtigte initial zwar keine biologischen Zusammenhänge, doch zeigen die eingruppierten Transkripte in den einzelnen Klassen zu großen Teilen verwandte Funktionen (ebd.). Neben dem Einfluss auf die Stabilität üben ARE-bindende Proteine auch negativen oder positiven Einfluss auf die Translation einiger *targets* aus und stehen sowohl mit einer verminderten als auch mit einer gesteigerten Proteinexpression in Zusammenhang (ebd.).

Tab. 5 | Klassifizierung der ARE. Klasse I AREs enthalten mehrere *AUUUA*-Pentamere. Hier finden sich z.B. Transkriptionsfaktoren. Klasse II AREs definieren sich über mindestens 2 überlappende *UUUUAUUUA(U/A)(U/A)*-Nonamere. Entsprechende Transkripte codieren vor allem für Zykline. Die AREs der Klasse III sind reich an Uridin, enthalten aber kein klassisches ARE-Motiv. Die aufgeführten Transkripte und RBP gelten jeweils beispielhaft und stellen keine vollständige Übersicht dar. Tabelle in Anlehnung an Barreau et al. 2005. **Abkürzungen:** MYC, *Myc proto-oncogene protein*; FOS, Protein c-fos; TNF, Tumornekrosefaktor; IL2, Interleukin 2; IL3, Interleukin 3; JUN, Transkriptionsfaktor Jun; p53, *Cellular tumor antigen p53*; HNRNPD, *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0*.

Klasse	Motiv	Bekannte Transkripte	Bekannte RBP
I	AUUUA	MYC, FOS	ELAVL1, HNRNPD
II	UUUUAUUUA(U/A)(U/A)	TNF, IL2, IL3	ELAVL1, HNRNPD, TIAL1
III	UUUUUU	JUN, p53	ELAVL1

Alu-Elemente

Alu-Elemente sind kurze, etwa 300 bp (Basenpaare) lange repetitive DNA-Sequenzen, die mit Hilfe spezieller *transacting factors* an eine andere Stelle des Genoms kopiert werden können. Sie machen etwa 10 % des menschlichen Genoms aus und führen fortwährend zu einer interindividuellen genetischen Vielfalt (Siehe hierzu die Übersichtsarbeiten von Batzer und Deininger 2002; Häsler und Strub 2006; Deininger 2011). Alu-Elemente werden am 5'- und 3'-Ende flankiert von einer wenige bp langen, sich wiederholenden Sequenz und bestehen aus zwei Hälften, getrennt durch eine zentrale A-reiche Region (Batzer und Deininger 2002). In der 5'-Hälfte befinden sich zwei Promotorregionen für die Transkription durch die RNA-Polymerase III. Die 3'-Hälfte endet meist mit einer A-reichen Region. Über die Methylierung innerhalb der Alu-Elemente sowie die Bindung durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren sind sie an der Regulation der Genexpression beteiligt (Häsler und Strub 2006; Polak und Domany 2006). Alu-Elemente oder Teile dieser sind auch in mRNAs zu finden, wo ihnen eine Beteiligung an der posttranskriptionellen Regulation des entsprechenden Transkripts zugeschrieben wird (Nekrutenko und Li 2001; Häsler und Strub 2006; Deininger 2011). Hierbei stehen vor allem in Alu-Elementen enthaltene alternative Polyadenylierungsstellen oder alternative *splicing sites* sowie ein durch sie ermöglichtes RNA-*editing* im Fokus der Forschung (Roy-Engel et al. 2005; Levanon et al. 2004; Deininger 2011). Alu-Elemente können darüber hinaus auch von RBP oder miRNA erkannt und Transkripte hierüber reguliert werden (Deininger 2011; Shen et al. 2011; Kelley et al. 2014). Bekannte Alu-bindende Proteine sind u.a. ELAVL1, HNRNPC (*Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2*) und TARDBP (*TAR DNA-binding protein 43*) (Kelley et al. 2014).

G-quadruplex Strukturen

Als Guanin-quadruplex-Strukturen (G-quadruplex-Strukturen, GQS) werden dreidimensionale DNA- bzw. RNA-Sekundärstrukturen innerhalb Guanin- (G) reicher Regionen bezeichnet (Kharel et al. 2020). Diese zeigen sich dabei nicht starr, sondern dynamisch in Abhängigkeit der Konzentration einzelner Kationen (Largy et al. 2016; Kharel et al. 2020). Zahlreiche Studien lassen dabei die Bedeutung von GQS in der DNA für die Regulation von Replikation und Transkription erkennen (Maizels und Gray 2013; Lerner und Sale 2019; Kharel et al. 2020). In mRNAs finden sich solche Strukturen vorwiegend in der 5'- und 3'-UTR und es wird ihnen analog zu ihrem regulatorischen Einfluss auf die DNA ein solcher auf die posttranskriptionelle Regulation zugeschrieben (Fay et al. 2017; Kharel et al. 2020). Es konnten zahlreichen RBP identifiziert werden, die GQS binden, darunter die verwandten Proteine FMRP (*Synaptic functional regulator FMR1*) und FXR1 (*Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1*) (Bensaid et al. 2009; Nolze et al. 2013; Kharel et al. 2020). FMRP hemmt die Translation der PKP4-mRNA (Nolze et al. 2013). Es bindet dabei in einem Bereich der 3'-UTR, der potenzielle GQS enthält, weshalb die Autoren eine Regulation über diese vermuteten (ebd.).

Weitere Regulatorische Elemente

Lee et al. (2010) untersuchten die 3'UTR verschiedener Transkripte in murinen C2C12-Zellen (Zelllinie aus Skelettmuskelzellen, McMahon et al. 1994) systematisch auf einen Zusammenhang zwischen deren Nukleotidsequenz und Halbwertszeit. Sie beschrieben destabilisierende (DE) und stabilisierende Elemente (SE). Neben den bekannten AU-reichen Elementen zeigten auch GU-reiche Motive eine Anreicherung in Transkripten mit einer kurzen Halbwertszeit (HWZ < 1,6 h). Transkripte mit einer langen Halbwertszeit (HWZ > 5,0 h) beinhalteten vor allem CU-, CA-, und GA-reiche Elemente (C, Cytosin) (Lee et al. 2010).

2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, einen systematischen Einstieg für weiterführende Untersuchungen der posttranskriptionellen Regulation der Expression desmosomaler Proteine zu ermöglichen. Über die transkriptionelle Regulation desmosomaler Gene und posttranslationale Modifizierungen desmosomaler Proteine ist bereits einiges bekannt (Müller et al. 2021). Dagegen fehlen bisher systematische Untersuchungen zu einer möglichen posttranskriptionellen Regulation durch RBP. Diese Arbeit möchte daher der Frage nachgehen, ob desmosomale Transkripte posttranskriptionell durch RBP reguliert werden können. Um der Antwort näher zu kommen, wurden in einem ersten Schritt Indizien für eine mögliche Regulation zusammengestellt. Hierfür wurden die Transkripte desmosomaler Gene, insbesondere deren 3'-UTR *in silico* hinsichtlich ihrer Länge, HWZ und dem Vorhandensein von bekannten regulatorischen Sequenzen untersucht. Ein systematischer Überblick über die Ergebnisse zahlreicher Hochdurchsatzstudien wurde mittels Datenbankenanalyse erstellt, um Hinweise auf eine mögliche Regulation desmosomaler Transkripte durch RBP zu erhalten sowie potenzielle Regulatoren zu eruieren. Durch Pilotexperimente wurde anschließend ersten Hinweisen auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen RBP und desmosomalen Transkripten und Proteinen nachgegangen. Diese sollten Ansatzpunkte für nachfolgende Untersuchungen aufzeigen. Hierbei wurde ein Einfluss ausgewählter RBP auf die Menge desmosomaler mRNA und Proteine sowie auf die Lokalisation desmosomaler Proteine innerhalb der Zelle untersucht. Auch ein möglicher Einfluss der RBP auf die Stabilität eines Zellverbandes wurde analysiert. Abschließend wurde der Frage nachgegangen werden, ob ausgewählte RBP mit einzelnen desmosomalen Transkripten direkt interagieren.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und generelle Verbrauchsmaterialien

Sofern an entsprechender Stelle nicht ausgewiesen, wurden alle Chemikalien von den Firmen Applichem (Darmstadt, Deutschland), Biochrom (Cambridge, UK), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Basel, Schweiz), Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen. Das Zellkulturmedium stammt von Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Kunststoffverbrauchsmaterialien wie sterile Zellkulturschalen, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen und Einfrierröhrchen wurden von VWR (West Chester, Pennsylvania, USA), BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, New Jersey USA), TPP (Trasadingen, Schweiz), and Corning (Tewksbury, Massachusetts, USA) bezogen. Objektträger und Deckgläschen stammten von den Glaswarenfabriken Karl Hecht (Sondheim, Deutschland) und Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland).

3.1.2 Puffer und Lösungen

Übersichten der eingesetzten Puffer und Lösungen, Kits und Fertigreagenzien sowie die Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele sind in Tab. 27- 31 gezeigt. Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht explizit angegeben, in der Arbeitsgruppe selbst hergestellt.

3.1.3 Zelllinien

Für die Experimente in dieser Arbeit wurden die Zelllinien HaCaT, HeLa und MCF7 verwendet (Tab. 6).

Tab. 6 | Übersicht über verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HaCaT	Spontan transformierte humane Keratinozyten	Boukamp et al. 1988
HeLa	Humane Zervixkarzinomzellen	Gey et al. 1952
MCF7	Humane Mammaadenokarzinomzellen	Brooks et al. 1973

3.1.4 siRNA

Es wurden siRNA-Pools (gegen *ELAVL1*, *G3BP1*, *TIAL1*) von siTools Biotech (München - Martinsried, Deutschland) eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Pool unspezifischer siRNAs von siTools Biotech. siRNA-Pools bestehen aus 30 siRNAs, was unspezifische Effekte einer einzelnen siRNA minimiert und die Eliminierung der gewünschten *target*-RNA präzisiert (Hannus et al. 2014).

3.1.5 Antikörper

Die in Tab. 30 und Tab. 31 genannten monoklonalen (mAk) und polyklonalen (pAk) Antikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen für *Western Blot*- (WB) und Immunfluoreszenzanalysen (IF) eingesetzt. Für WB-Analysen wurden die Antikörper in 3 % (m/v) Milchpulver in TBST (*Tris-buffered saline with Tween20*) verdünnt, für IF-Färbungen in 1 % (m/v) BSA (Bovines Serumalbumin) in PBS (*phosphate-buffered saline*). PKP1-Antikörper wurden für IF-Färbungen in 1 % (m/v) Milchpulver in PBS verdünnt. Für die IP eingesetzte Antikörper sind in Tab. 32 genannt.

3.1.6 qRT-PCR-Primer

Für die Analyse von Nukleinsäuren via quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurden die in Tab. 33 genannten *Primer* eingesetzt. Je Primerpaar wurde eine Arbeitslösung mit je 10 μM *forward* (F) und *reverse* (R) *primer* erstellt

3.1.7 Plasmide

Zur Überexpression von G3BP1 in HeLa-Zellen wurde ein Vektor eingesetzt, durch den das Konjugatprotein G3BP1 - EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) exprimiert wurde. Als Kontrolle diente ein Vektor, der für das Protein EGFP kodierte (Tab. 34).

3.1.8 Geräte

Eine Übersicht der verwendeten Geräte gibt Tab. 35

3.1.9 Software

Die Datenverarbeitung erfolgte mit Microsoft Office Excel (Redmond, Washington, USA). Abbildungen wurden mit Microsoft Office Excel, Word und Publisher erstellt (Redmond, Washington, USA). Bildverarbeitung erfolgte mit ImageJ (Bethesda, Maryland, USA). Anpassungen von Helligkeit und Kontrast wurden stets gleichsam am gesamten Bild vorgenommen. Eine Übersicht über sonstige verwendete Software gibt Tab. 36.

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Anmerkungen

Die Benennung der Proteine orientierte sich an den Einträgen in der Datenbank *Universal Protein Resource* (UniProt, <https://beta.uniprot.org>, letzter Aufruf 30.05.2022, The UniProt Consortium 2021), die Symbole nach dem *HUGO Gene Nomenclature Comitee* (HGNC, <https://www.genenames.org>, letzter Aufruf 30.05.2022, Bruford et al. 2020). Um Irritationen aufgrund verschiedener

Bezeichnungen zu vermeiden, wird in der gesamten Arbeit für Gen und Protein jeweils das gleiche Symbol verwendet. Hierbei findet sich die Bezeichnung des *Gen* kursiv und der Proteinname recte.

Gene, die Bestandteile der Desmosomen codieren (*DSCI - 3, DSG1 - 4, DSP, JUP, PKP1 - 3*) werden zwecks einer besseren Lesbarkeit als *desmosomale Gene* bezeichnet. Dieser Begriff soll dabei keine Unterscheidung zu nukleären oder mitochondrialen Genen vornehmen, sondern die genannten zwölf Gene funktionell gruppieren. Die mRNAs der entsprechenden Gene werden analog als *Transkripte desmosomaler Gene, desmosomale Transkripte* bzw. *desmosomale mRNA* bezeichnet.

3.2.2 Untersuchungen der 3'-UTR desmosomaler Transkripte

Um erste Indizien für eine mögliche Regulation der Transkripte desmosomaler Gene zu erhalten, wurden HWZ und Länge der 3'-UTR der jeweils längsten mRNA nach den Angaben in der Datenbank AURA mit experimentell ermittelten Durchschnittswerten verglichen. Im Weiteren wurden die in der genannten Datenbank aufgeführten 3'-UTR-Sequenzen auf das Vorhandensein verschiedener regulatorischer Sequenzen untersucht (ARE, Alu-Elemente, GQS, DE, SE) (S. XIX ff.). Bei sich überschneidenden regulatorischen Sequenzen wurde jeweils die erste vollständige Sequenz gezählt. Zum Einschätzen der räumlichen Häufung einzelner regulatorischer Abschnitte erfolgte hier ein Hervorheben von ARE und (de)stabilisierender Elemente nach Lee et al (2010).

3.2.3 Datenbankenanalysen

Von Juni bis August 2020 wurden die Datenbanken AURA, ENCORI und das CLIPdb-Modul der Datenbank POSTAR2 manuell auf mögliche Interaktionen zwischen Transkripten desmosomaler Gene und RBP untersucht. Die Befragung des AURA konnte hierbei auf die 3'-UTR der jeweiligen mRNA beschränkt werden. Zudem erfolgte eine Befragung der Datenbank ATTRACT. Hierzu wurden unter der Funktion *Sequence Scan* die Sequenzen der 3'-UTR desmosomaler mRNA (Kapitel 3.2.2) eingefügt und die Suche auf den Organismus *Homo sapiens* und die Motivlänge auf 1 bis 12 Nukleotide eingegrenzt (In der Datenbank waren zu diesem Zeitpunkt keine Motive mit einer Länge von 1 - 3 Nukleotiden vorhanden).

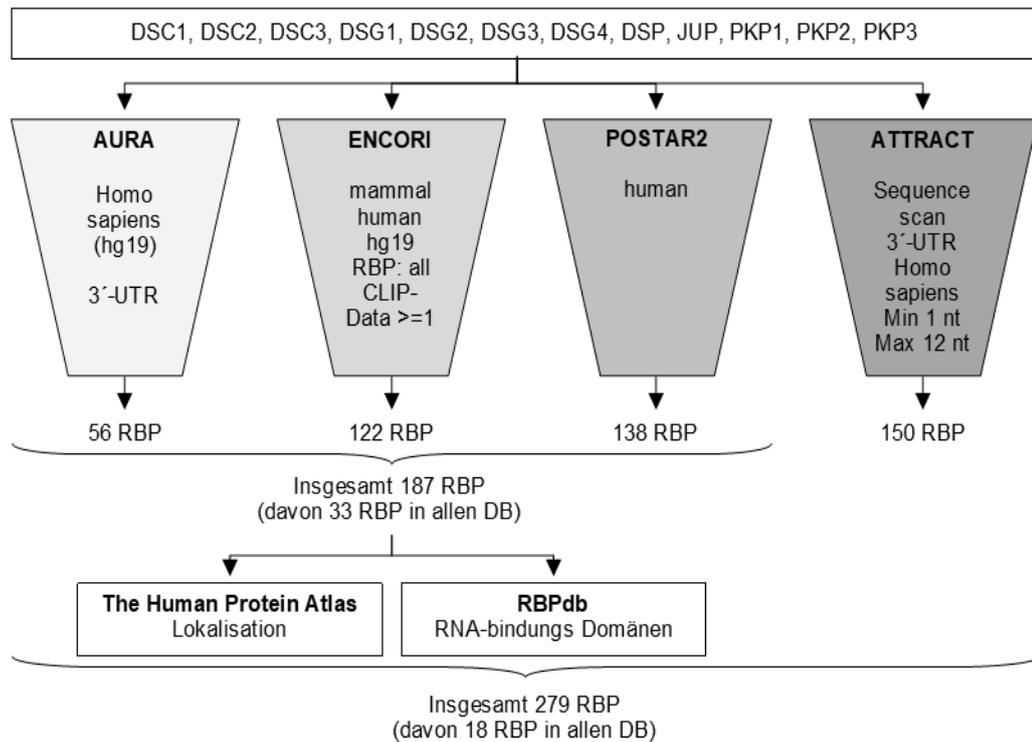


Abb. 5 | Ablauf der Datenbankenanalyse. Die Datenbanken AURA, ENCORI, POSTAR2 und ATTRACT wurden unter Einstellung der angegebenen Parameter auf Angaben zu möglichen Interaktionen von RBP mit desmosomalen Transkripten untersucht. Dabei gab es sich überschneidende und individuelle Angaben. Abkürzungen: DB, Datenbanken; hg19, *human genome version 19*.

Angaben zu beschriebenen RBD einzelner RBP wurden der Datenbank RBPdb entnommen. Angaben zur Lokalisation einzelner RBP innerhalb der Zelle aus *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org>; letzter Aufruf 30.08.2020; Thul et al. 2017). Letztere Daten basieren auf Immunfluoreszenzfärbungen. Je nach Intensität des Farbsignals wird in Haupt- und Nebenlokalisation unterschieden, wobei mehrere Lokalisationen in derselben Kategorie möglich sind. Die Angaben zur Lokalisation in der Datenbank wurden in vier Kategorien zusammengefasst (Tab. 7).

Tab. 7 | Angaben zur Lokalisation eines Proteins in The Human Protein Atlas. Die Angaben zur Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle laut *The human Protein Atlas* wurden in vier Kategorien zusammengefasst.

Kategorie	Angaben in Datenbank
Nukleus	<i>nucleoplasm, nucleoli, nucleoli fibrillar center, nuclear speckles, nuclear bodies, nuclear membrane</i>
Zytoplasma	<i>cytosol, vesicles, cytokinetic bridge, microtubules, cytoplasmic bodies, actin filaments, centriolar satellite, golgi apparatus, endoplasmic reticulum</i>
Mitochondrien	<i>mitochondrium</i>
Zellmembran	<i>plasma membrane, cell junctions</i>

Die Auswahl von RBP, deren potenzieller Einfluss auf desmosomale Transkripte in ersten Pilotexperimenten systematisch näher untersucht werden sollte, geschah auf Grundlage einer vor Beginn dieser Promotion innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführten Datenbankenanalyse.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die im Rahmen der Experimente für diese Arbeit verwendeten Zelllinien HaCaT, MCF7 und HeLa werden in Tab. 6 beschrieben. Kultiviert wurden sie jeweils in unbeschichteten 10 cm-Kulturschalen in 10 ml DMEM-Kulturmedium (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, dem 10% (v/v) fetales Kälberserum [FCS] zugefügt wurde) bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Alle zwei bis drei Tage, je nach Konfluenz der Zellen, wurden diese umgesetzt. Hierfür wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen anschließend zweimal mit 10 ml PBSE gewaschen. Zum Ablösen der Zellen von der Kulturschale wurden diese mit 1 ml 2,5 % (w/v) Trypsin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) inkubiert (10 - 12 min; 37 °C). Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 10 ml vorgewärmtem DMEM gestoppt, die abgelösten Zellen in diesem zunächst resuspendiert, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 3 min bei 1500 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Hettich Universal 16) Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium (37 °C) resuspendiert und in gewünschter Zellzahl auf neue Kulturschalen verteilt. Anschließend wurden das Volumen des Kulturmediums in der neuen Kulturschale auf 10 ml ergänzt und 10 µg/ml Ciprofloxacin zugesetzt. Für Experimente wurden Zellen ohne Antibiotikum kultiviert.

Zum Einfrieren wurden die von der Kulturschale abgelösten Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 3 ml DMEM mit 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde in 2 ml Einfrierröhrchen in Einfrierboxen mit einer Abkühlrate von 1 °C / h eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen kurz in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt und der Inhalt nach vollständigem Auftauen rasch in 9 ml DMEM überführt, um die Zellen möglichst kurz dem toxischen DMSO auszusetzen. Nach dem Zentrifugieren (3 min; 1500 rpm; RT) wurde das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und wie oben beschrieben kultiviert.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die von der Kulturschale abgelösten Zellen, zentrifugiert und anschließend in 1 ml DMEM gelöst. Eine 1:40 Verdünnung dieser Zellsuspension wurde hergestellt. 10 µl dieser verdünnten Zellsuspension wurden anschließend mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt. Je Zählfeld wurden vier Quadranten ausgezählt. Die gezählte Zellzahl wurde durch die Anzahl der ausgezählten Quadranten dividiert, um einen Mittelwert zu erhalten. Das Volumen eines Quadranten beträgt 0,1 µl. Daraus ergibt sich die Formel zur Berechnung der eigentlichen Zellzahl pro ml Medium:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl/Quadrant} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10000$$

3.3.2 Transfektion eukaryoter Zellen

Mittels Transfektion lassen sich exogene Nukleinsäuren in kultivierte Zellen einbringen. In der vorliegenden Arbeit wurden siRNA und Plasmid-DNA mit Hilfe chemischer Methoden eingebracht.

Transfektion von siRNA

Die benötigten Zellen wurden abgelöst, zentrifugiert und anschließend in einem Zentrifugenröhrchen eine Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl erstellt (Kapitel 3.3.1). Je cm² der später eingesetzten Kulturschalen wurden 200 µl Kulturmedium verwendet. Aus dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine*TM RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und der siRNA bzw. dem siRNA-Pool in DMEM ohne zugesetztes FCS ein Transfektionsansatz erstellt und inkubiert (20 min; RT). Je cm² der später eingesetzten Kulturschalen wurde ein Transfektionsansatz aus 50 µl DMEM mit 1,5 µl RNAiMAX und 0,5 pmol siRNA angesetzt. Nach der Inkubation wurde dieser zu den Zellen gegeben und die Zellen mit einer Dichte von 0,5 x 10⁵ Zellen / cm² aus die Kulturschale ausgesät. Die Kultivierung erfolgte anschließend bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Nach 24 h wurde das Kulturmedium-Transfektionsansatz-Gemisch durch frisches DMEM-Kulturmedium ersetzt und die Zellen weitere 24 h bis 48 h kultiviert.

Transfektion von Plasmid-DNA

Die Transfektion eines G3BP1-EGFP-Vektors (Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA) erfolgte unter Verwendung des *Xfect*TM Transfektionsreagenz (Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA) in enger Anlehnung an das vom Hersteller empfohlene Vorgehen (Protokoll PT5003-2, <http://www.clontech.com>, 29.06.2017). Die benötigten HeLa-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 0,5 x 10⁵ Zellen / cm² ausgesät und unter denselben Bedingungen wie zuvor weiter kultiviert (Kapitel 3.3.1). Nach 24 h wurde das Kulturmedium durch den Transfektionsansatz ersetzt (Tab. 8). Alle Bestandteile wurden gemeinsam in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß inkubiert (10 min; RT) und anschließend vollständig auf die kultivierten Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h erfolgte ein erneuter Mediumwechsel und die Zellen wurden in frischem Kulturmedium bis zum Experiment weiterkultiviert. Als Kontrolle diente ein EGFP-Vektor. Die Expression beider Proteine konnte anhand der Fluoreszenz des EGFP geprüft werden (*EVOS FL Cell Imaging System*).

Tab. 8 | Transfektionsansatz zur Transfektion von Plasmid-DNA.

Kulturschale	Kulturmedium	DNA	Volumen nach Zugabe von Xfect reaction buffer	Volumen Xfect polymer
24-well-Platte	250 µl	0,75 µg	25 µl	0,3 µl je 1 µg DNA
12-well-Platte	500 µl	1,5 µg	50 µl	

3.3.3 Untersuchung zum Einfluss mechanischer Belastung auf die Stabilität eines Zellverbandes – *Dispase Assay*

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses einzelner RBP auf die Stabilität eines Zellverbandes, wurden HaCaT in 6- bzw. 12-*well*-Platten kultiviert und mit siRNA transfiziert (Kapitel 3.3.1). 72 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium verworfen und je 12-*well* 1 ml DMEM mit 10 % FCS (v/v) und 5 mg Dispase (1 U / mg, Roche, Basel, Schweiz) auf die Zellen gegeben. Durch den Einsatz der Kollagenase Dispase ist, im Unterschied zu Trypsin, ein selektives Ablösen der adhärenen HaCaT von der Kulturschale möglich, ohne, dass diese sich voneinander separieren (Sinclair et al. 2013). Nach vollständigem Ablösen des Monolayers (etwa 15 min) wurden die Monolayer in der Kulturschale auf einem Lichttisch in einem immer gleichen Abstand fotografiert (Lumix DMC-FZ45, Panasonic, Kadoma, Japan) und anschließend einer mechanischen Belastung ausgesetzt. Die Kulturplatten wurden verschlossen, auf einen Reagenzglasschüttler montiert und die Zellen durch das Rührschütteln mit 550 rpm einer mechanischen Belastung ausgesetzt. Nach 2 min und 10 min wurde der Zerfall des Monolayers durch eine Fotografie auf dem Lichttisch dokumentiert. Die Anzahl der Fragmente in einem *well* wurde im Anschluss anhand der Fotografien unter Verwendung der Software *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, USA) bestimmt. Der pH-Wert des Kulturmediums wird unter anderem durch Hydrogencarbonationen stabilisiert. Durch die CO₂-Abhängigkeit dieses Puffersystems kann es unter Raumlufbedingungen (CO₂-Volumenanteil Raumluf < 0,5 % vs. Inkubator 5 %) zu einer Alkalisierung des Mediums kommen. Um den pH-Wert des Mediums während des Experiments zu stabilisieren, wurde diesem nach dem vollständigen Ablösen des Monolayers 50 mM HEPES hinzugegeben.

3.3.4 Immunfluoreszenz Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Vorbereitung der folgenden Färbung von Proteinen in Zellen, wurden diese auf Deckgläschen (DG) kultiviert. Letztere wurden hierfür in die leeren *wells* der Kulturschale gelegt und mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) beschichtet (10 min; RT). Die Lösung wurde abgenommen und die DG zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Zelldichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen / cm² ausgesät und mit siRNA transfiziert (Kapitel 0). 48 h bzw. 72 h nach der Transfektion wurden die DG in einen Ständer überführt und in TBS mit 2 mM CaCl₂ gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in Methanol fixiert (10 min; -20 °C) und in MT-Puffer permeabilisiert (15 min; RT). Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1 % BSA in PBS (m/v) blockiert (30 min; RT). Ausschließlich für die Färbung von PKP1 wurde eine Blocklösung aus 1% Milchpulver in PBS (m/v) (Milupa, Friedrichsdorf, Deutschland) verwendet. Um das gewünschte Protein dem Primäantikörper zugänglicher zu machen, wurden die Zellen zum Teil vor der Fixierung in Methanol einer Vorextraktion unterzogen. Hierzu wurden die DG nach

dem Waschen in TBS mit 2 mM CaCl² in 0,2 % Triton X-100 in PBS (v/v) inkubiert (5 min; auf Eis) und die Zellen anschließend direkt in Methanol fixiert.

Die Primärantikörper wurden in der jeweiligen Blocklösung entsprechend verdünnt (Tab. 30) und je DG ein Tropfen von 20 µl auf einen Parafilm® (Bemis, Neenah, Wisconsin, USA) in einer feuchten Kammer gegeben. Die DG wurden mit den Zellen nach unten auf diesen Tropfen gelegt und in der feuchten Kammer inkubiert (über Nacht; 4 °C). Nicht gebundene Antikörper wurden im Anschluss mit dreimaligem Waschen mit PBS entfernt (5 min; RT) und die DG erneut in der entsprechenden Blocklösung inkubiert (5 min; RT). Die Sekundärantikörper wurden in der jeweiligen Blocklösung entsprechend verdünnt (Tab. 31) und wie oben beschrieben auf einen Parafilm in einer feuchten Kammer gegeben. Zur Darstellung des Zellkerns wurde der DNA-Farbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in der Verdünnung 1:1000 zu der Sekundärantikörperlösung gegeben. Die DG wurden auf diese Tropfen gelegt und inkubiert (1 h; RT). Die eingesetzten sekundären Antikörper binden jeweils Antikörper einer bestimmten Spezies. Wurden mehrere Proteine simultan angefärbt, wurde streng darauf geachtet, dass die eingesetzten Primärantikörper unterschiedlichen Spezies entstammten. Ungebundene Antikörper wurden mit dreimaligem Waschen in PBS entfernt (jeweils 5 min; RT). Salze wurden durch ein kurzes Waschen in doppelt destilliertem Wasser entfernt. Zum Entwässern wurden die DG kurz in 95 %igen Ethanol getaucht und auf Filterpapier abgedeckt im Dunkeln getrocknet (15 min; RT). Abschließend wurden die DG mit Mowiol auf einem Objektträger eingebettet und dunkel bei 4 °C gelagert.

Ein an den Sekundärantikörper gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff emittiert nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge Licht einer anderen Wellenlänge. Mit einem Fluoreszenzmikroskop lässt sich so die Position des angefärbten Proteins erkennen.

Ermittlung der relativen Intensität der Fluoreszenz im Bereich der Zellkerne

Die Ermittlung der relativen Fluoreszenz kann einen Hinweis über die Verteilung eines Proteins innerhalb der Zellen geben. Das Ziel war es zu untersuchen, ob G3BP1 die Menge an PKP1 im Zellkern beeinflusst. Eine qualitative Auswertung der Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen ergab für die Färbungen 72 h nach G3BP1-KD den Verdacht auf eine vermehrte Lokalisierung von PKP1 im Zellkern. Um diesen subjektiven Eindruck zu objektivieren, wurde mit dem Programm ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) eine Auswertung der unbearbeiteten Aufnahmen durchgeführt. Die mit Hilfe der Belichtungsautomatik erstellten Aufnahmen wurden durch das mit dem Mikroskop (Zeiss Axio Observer, Carl, Zeiss, Jena, Deutschland) assoziierten Programm (AxioVision, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) in dem Dateiformat ZVI gespeichert. Zunächst wurde innerhalb einer Aufnahme der PKP1-Färbung die *mittlere Intensität des gesamten*

Bildes ermittelt und mit der Größe des Bildes (*Anzahl der Pixel*) zur integrierten Intensität des gesamten Bildes (*Iges*) multipliziert. Um die Position der Zellkerne zu definieren, wurden in der zugehörigen Aufnahme der DAPI-Färbung die Zellkerne selektiert und markiert (Abb. 6). Hierbei wurden nur solche Sektionen markiert, die eine Größe von 100 Pixeln oder mehr hatten und nicht in Kontakt zur Außenseite des Bildes standen, also vollständig aufgenommen worden sind. Hierdurch sollten unspezifische Artefakte aus der Messung ausgeschlossen werden. Die gesetzten Markierungen wurden in die Aufnahme der PKP1-Färbung übertragen und Größe sowie mittlere Intensität der einzelnen Sektionen (Zellkerne) bestimmt. Die *Intensität eines Zellkerns* wurde anschließend mit seiner *Größe* zur integrierten Intensität (*Ikn*) multipliziert. Die Summe aller *Ikn* wurde von *Iges* subtrahiert und somit näherungsweise die integrierte mittlere Intensität des Hintergrunds (*Ih*) berechnet (Hintergrund = nicht als Zellkern markiert). Jede einzelne *Ikn* wurde abschließend mit *Ih* in Relation gesetzt. Diese bildinterne Relation machte es möglich, die Ergebnisse verschiedener Aufnahmen trotz unterschiedlicher Belichtungszeiten zu Vergleichen. Die Ergebnisse wurden jeweils als *box-plot*-Diagramm dargestellt. Hierbei sind 1. Quartil, Median, Mittelwert, 3. Quartil sowie Minimal- und Maximalwert innerhalb der Ausreißergrenzen dargestellt. Als Ausreißer wurden alle Werte $< 1. \text{ Quartil} - (1,5 \times \text{Interquartilsabstand})$ bzw. $> 3. \text{ Quartil} + (1,5 \times \text{Interquartilsabstand})$ definiert. Diese wurden, um eine bessere Darstellbarkeit zu erreichen, nicht in den Diagrammen abgebildet.

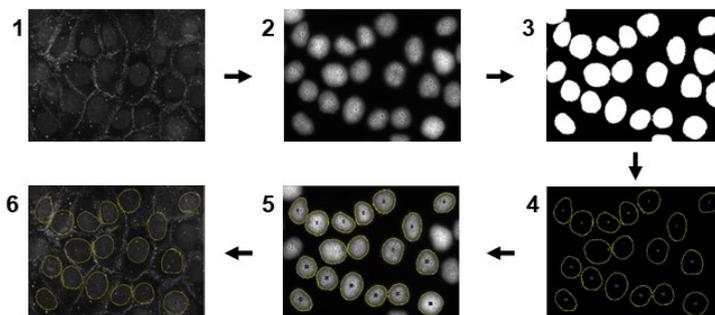


Abb. 6 | Definieren der Zellkerne. Zur Ermittlung der mittleren Intensität und Größe der Zellkerne in einer PKP1-Immunfluoreszenzfärbung (1), wurden mit Hilfe des Programms ImageJ in der zugehörigen DAPI-Färbung (2) Zellkerne selektiert (3) und markiert (4 + 5). Diese Markierung wurde anschließend auf das ursprüngliche Bild übertragen (6).

Abb. 7 zeigt an selbst erstellten Beispielbildern, dass die errechneten Werte der relativen Intensität der Färbung im Bereich der Zellkerne abnehmen, wenn die Intensität in diesem Bereich bei gleichbleibendem Hintergrund zunimmt (A - C und D - F) oder die Intensität der Färbung des Hintergrundes bei gleichbleibender Färbung der Zellkerne abnimmt (G - I und K - M). Position und Größe der Zellkerne sind dabei stets identisch. Ein schwarzer Pixel hat in dem hier verwendeten 8-bit-Format den Wert 0, ein weißer Pixel 255. Bei einer vermehrten Lokalisierung von PKP1 im Bereich der Zellkerne, bzw. einer verminderten Lokalisierung im Zytoplasma oder den Zellgrenzen nach RBP-KD wären hier folglich geringere Werte als in der Kontrolle zu erwarten.

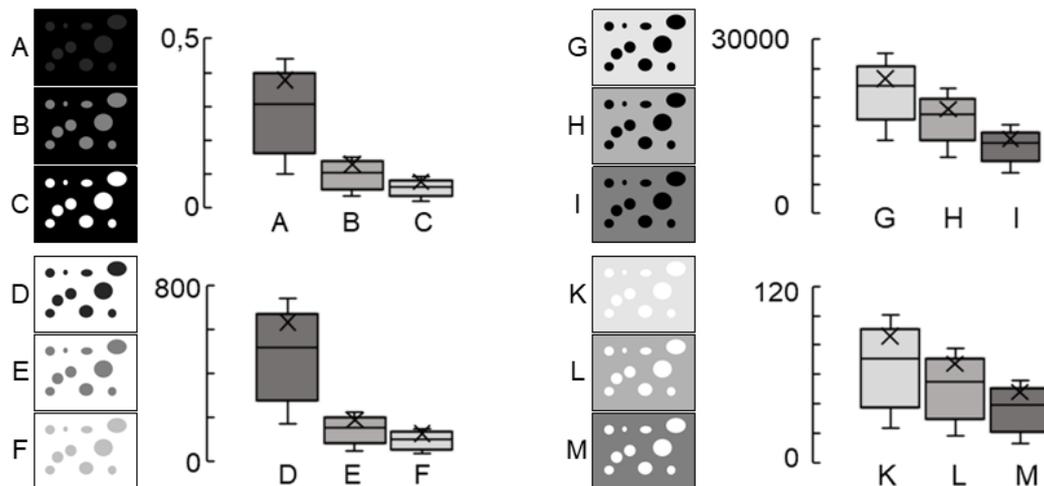


Abb. 7 | Beispielrechnung zur Einordnung der relativen Intensität einer Fluoreszenzfärbung im Bereich der Zellkerne. An selbst erstellten Bildern wurden die Zellkerne durch verschiedene rundliche Formen dargestellt und die relative Intensität in diesen Bereichen berechnet.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Herstellen eines Zelllysats

Zur Herstellung eines Zelllysats wurde zunächst das Kulturmedium verworfen (Kapitel 3.3.1) und die Zellen zwei Mal mit eiskaltem TBS gewaschen. Zum Lysieren der Zellen wurden diese in SDS-Lysepuffer (Natriumdodecylsulfat) mit Benzonase (5 U / ml) verwendet (300 μ l SDS-Lysepuffer + 1,5 μ l Benzonase je *well* einer 12-*well*-Platte) inkubiert (5 min; RT). Das Zelllysats wurde mit einer Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt, die Proteine unter Hitze weiter denaturiert (5 min; 95 °C) und anschließend wieder auf RT abgekühlt. Durch Zentrifugieren (3 min; 13000 rpm; RT) wurden lösliche Bestandteile vom Zelllysats getrennt und das Zelllysats in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nicht direkt eingesetztes Zelllysats wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Bestimmung der Proteinmenge in einem Zelllysats

Die Quantifizierung der in dem Zelllysats enthaltenen Menge an Gesamtprotein erfolgte mit dem *MicroBC Assay - protein quantification kit* (Uptima, Pittsburgh, Pennsylvania, USA). Hierfür wurde zunächst eine BSA-Standardreihe (Bovines Serumalbumin) pipettiert (Konzentrationen der Standardansätze in mg/ml: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 0). Aus einem Zelllysats (Kapitel 3.4.1) wurde mit destilliertem Wasser eine 1:100 und eine 1:200 (v/v) Verdünnung hergestellt. Das *Micro BC Assay* Reagenz wurde nach Herstellerangaben aus den im *kit* enthaltenen Lösungen hergestellt. Zu je 100 μ l der Standardansätze und der Verdünnungen wurden 100 μ l *Micro BC Assay* Reagenz gegeben und die Mischung anschließend stehend inkubiert (1 h; 37 °C). Durch

den alkalischen pH-Wert des *MicroBC Assay* Reagenz werden Cu^{2+} -Ionen durch Proteine zu einwertigen Kupferkationen reduziert. Diese werden durch die in dem Reagenz enthaltene Bicinchoninsäure (BCA) gebunden und die Mischung färbt sich violett. Die Absorption des entstandenen BCA-Kupferionen-Komplexes von Licht der Wellenlänge 562 nm verhält sich streng linear proportional zur Proteinkonzentration des Lysats. Nach Abkühlen der inkubierten Lösungen wurde die Absorption der einzelnen Proben bei 562 nm in einer Quarzküvette gemessen (*GeneQuantTM* 1300, Biochrom, Cambridge, UK). Aus den gemessenen Absorptionen der Standardansätze wurde eine Eichgerade erstellt und durch diese die Proteinkonzentration im Zelllysate ermittelt.

3.4.3 SDS-PAGE

Von einem Zelllysate (Kapitel 3.4.1) wurden nach vorheriger Proteinmengenbestimmung 20 µg Protein mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht und mit 7 µl SDS-Probenpuffer inkubiert (5min; 95 °C). 25 µl dieser Lösung wurden in die Taschen des Gels geladen. Wurde für die Experimente die gleiche Zellzahl ausgesät, wurde auf eine exakte Bestimmung der Proteinmenge verzichtet und 20 µl des entstandenen Zelllysats mit 7 µl 4-fach-SDS-Probenpuffer inkubiert (5 min; 95 °C). 25 µl dieser Lösung wurden anschließend in die Taschen des Gels geladen. Als Indikator für die Proteingröße wurden 5µl des Markers *Page RulerTM Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) eingesetzt. Die Proben wurden bei 75 V im Sammelgel bis zum Übertritt in das Trenngel gesammelt. Die Auftrennung erfolgte bei 105 V bis zur gewünschten Auftrennung - zu beobachten an den farbigen Markierungen des Markers.

3.4.4 Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine erfolgte ein Transfer dieser auf eine Nitrozellulosemembran. Hierzu wurden in eine *Semi-Dry-Blot-Kammer* (PeqLab, Erlangen, Deutschland) Filterpapiere (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), Gel und Membran (Whatman, Kent, UK) nach folgendem Schema geschichtet:

Anode

- 3 Blatt Filterpapier, getränkt in Blot-Puffer 1
- 3 Blatt Filterpapier, getränkt in Blot-Puffer 2
- Nitrozellulosemembran, angefeuchtet in Blot-Puffer 2
- SDS-PAGE-Gel
- 3 Blatt Filterpapier, getränkt in Blot-Puffer 3

Kathode

Der Übergang der Proteine auf die Membran erfolgte mit 100 mA für 40 min gefolgt von 150 mA für 30 min. Im Anschluss wurde die Membran kurz in gereinigtem Wasser gewaschen und für 2 min mit Ponceau-Rot gefärbt. Der Farbstoff bindet reversibel an positiv geladenen Aminogruppen der in der Membran gebundenen Proteine. Der überschüssige Farbstoff wurde mit Wasser abgewaschen, bis sich die Proteinbanden kontrastreich vor einem möglichst hellen Hintergrund abzeichneten. Nach dem Scannen der Membran wurde der Farbstoff wieder vollständig mit TBST ausgewaschen. Sollten in den weiteren Schritten auf einer Membran mehrere Proteine unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden, wurden diese vor dem Waschen mit TBST geteilt.

3.4.5 Färben von Nitrozellulosemembranen

Einzelne Proteine wurden nach SDS-PAGE und *Western Blot* unter Verwendung spezifischer Antikörper auf der Nitrozellulosemembran dargestellt. Diese wurde dafür zunächst einmal kurz mit TBST gewaschen und anschließend mit 3 % Milchpulver in TBST (m/v) leicht schüttelnd inkubiert (30 min; RT), um unspezifische Bindungsstellen für die spätere Antikörperfärbung zu blockieren. Die Membran wurde in eine Folie eingeschweißt. Der primäre Antikörper wurde in 1 ml der Blocklösung verdünnt und vor dem vollständigen Verschluss der Folie auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte bei ständiger Rotation über Nacht (4 °C; 30 rpm). Nach dem Herauslösen der Membran aus der Folie wurden ungebundene primäre Antikörper zunächst durch zweimaliges kurzes und zweimaliges zehnmütiges Waschen in TBST entfernt. Ein gegen den primären Antikörper gerichteter sekundärer Antikörper wurde in 15 ml der Blocklösung verdünnt und die Membran in dieser leicht schüttelnd inkubiert (1 h; RT). Durch dreimaliges Waschen in TBST (15 min; RT) wurden ungebundene sekundäre Antikörper entfernt. Abschließend wurde die Membran in TBS gebadet (5 min; RT). Frisch angesetzte ECL-Lösung (ECL-Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 (v/v); *enhanced chemiluminescence*) wurde gleichmäßig auf die Membran gegeben. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert hierbei die Reaktion von Luminol unter Emission von Licht. Diese wurde zur späteren Verarbeitung aufgenommen (Fusion-SL 3500.WL, Peqlab, Erlangen, Deutschland). Die Membran wurden im Anschluss zunächst mit TBS und abschließend mit Wasser gewaschen (jeweils 5 min; RT), getrocknet und dunkel gelagert. Zum Teil wurden Primär- und Sekundärantikörper von der Membran entfernt. Hierzu wurde sie in Wasser gewaschen (5 min; RT) und in Stripping-Puffer inkubiert (20 min; RT). Nach dreimaligem Waschen in TBST (5 min; RT) wurde die Membran durch Baden in Blocklösung wie oben beschrieben auf eine erneute Immunfärbung vorbereitet.

3.4.6 Ermittlung der relativen Proteinmenge

Zur Ermittlung der Menge eines Zielproteins nach einer Behandlung in Relation zu diesem in der Kontrolle wurden die Intensitäten der Färbungen in den einzelnen Aufnahmen verglichen. Mit

ImageJ wurde zunächst in den Aufnahmen der Ponceau-Färbung die mittlere Intensität jeder einzelnen *lane* nach Abzug des Hintergrundsignals ermittelt. Sie gibt Auskunft über die insgesamt enthaltene Menge an Proteinen. Das Verhältnis der Intensität einer *lane* zu der Intensität der Kontroll-*lane* auf derselben Membran ergibt die relative Intensität [r] einer *lane*. Dabei ergibt sich für die Kontroll-*lane* immer eine relative Intensität [r] von 1. Für die übrigen *lanes* lassen sich generelle Unterschiede der enthaltenen Proteinmenge erkennen.

$$\text{Relative Intensität einer lane } [r] = \frac{\text{Intensität einer lane}}{\text{Intensität der Kontroll-lane}}$$

In den Aufnahmen der Chemilumineszenz wurde zunächst mit ImageJ die Intensität einer einzelnen Bande unter Abzug des Hintergrundsignals ermittelt und der Anteil dieser Intensität an der Summe der Intensitäten aller in einer Aufnahme abgebildeten Banden bestimmt. Das Verhältnis dieser anteiligen Intensität einer Bande zur anteiligen Intensität der Kontroll-Bande entspricht der relativen Intensität der Bande [R] und gibt Auskunft über die Expressionsunterschiede des Zielproteins. Für die Kontrolle errechnet sich hierbei immer eine relative Intensität [R] von 1.

$$\text{Relative Intensität einer Bande } [R] = \frac{\text{Anteilige Intensität einer Bande}}{\text{Anteilige Intensität der Kontroll-Bande}}$$

Die relative Proteinmenge wurde abschließend durch das Verhältnis von R zu r ermittelt. Dieses bezieht zusätzlich Unterschiede der Gesamtmenge der geplotteten Proteine je *lane* in die Beurteilung der Menge eines Zielproteins ein. Für die Kontrolle errechnet sich hieraus stets eine relative Proteinmenge von 1. Eine Reduktion des Zielproteins durch die Behandlung würde durch eine relative Intensität < 1 und ein Anstieg mit durch eine relative Intensität > 1 abgebildet.

$$\text{Relative Proteinmenge} = \frac{\text{Relative Intensität einer Bande } [R]}{\text{Relative Intensität der entsprechenden lane } [r]}$$

3.4.7 RNA-Isolation

Zur Vorbeugung gesundheitlicher Schäden wurde die Isolation von Nukleinsäuren vorwiegend unter einem Abzug durchgeführt. Das Kulturmedium der Zellen (Kapitel 3.3.1) wurde verworfen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Je *well* einer 6- bzw. 12-*well* Platte wurden 1,5 ml Trizol-Reagenz mit 15 µl beta-Mercaptoethanol zur Lyse der Zellen eingesetzt und das Lysat anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. An diesem Punkt konnten die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert werden. Um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden, wurden Arbeitsgeräte und -flächen vor den weiteren Arbeitsschritten mit *RNase Away*TM (Molecular Bio-Products, Inc., San Diego, Kalifornien, USA) behandelt, RNase-freie 2-ml-Reaktionsgefäße und gestopfte Pipetten verwendet. Zum Schutz der Nukleinsäuren wurden alle Arbeitsschritte, wenn nicht anders angegeben auf Eis durchgeführt.

Nach dem Auftauen wurde die Probe zentrifugiert (15 min; 12.000 rpm; 4 °C; Kühlzentrifuge: Hettich Mikro 220R), um Zellreste am Boden des Reaktionsgefäßes abzutrennen. Nach dem Zentrifugieren wurden 1,4 ml des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für die Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren mit 280 µl Chloroform versetzt, 15 s kräftig per Hand geschüttelt und inkubiert (3min; RT). Durch Zentrifugieren (15 min; 12.000 rpm; 4 °C) wurden drei Phasen aufgrund ihrer Dichte getrennt. In der unteren Phase fanden sich, in Phenol-Chloroform gelöst, Proteine und Lipide. DNA wurde als milchiges Interphasenband sichtbar. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA. 600 µl der oberen Phase wurden vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Reinheit der isolierten RNA zu erhöhen, wurde eine zweite Phasentrennung durchgeführt. Hierzu wurden zu den 600 µl der oberen Phase 300 µl Trizol und 180 µl Chloroform gegeben, kräftig geschüttelt und inkubiert (3 min; RT). Nach Zentrifugieren (15 min; 12.000 rpm; 4°C) wurden 600 µl der oberen Phase in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben. Zur Präzipitation der RNA wurden 1 µl Glycogen und 600 µl Isopropanol hinzugegeben, das Gemisch gerührschüttelt und inkubiert (über Nacht; -20 °C). Durch Zentrifugieren (10 min; 12.000 rpm; 4 °C) wurde die RNA am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet drei Mal mit 1 ml eiskaltem 75%igem Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde jeweils durch Zentrifugieren (5 min; 7.500 rpm; 4°C) wieder gesammelt. Nach dem Waschen wurde die RNA im Reaktionsgefäß luftgetrocknet, in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C eingefroren.

3.4.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA (Kapitel 3.4.7) erfolgte photometrisch (Nanodrop Spectrophotometer ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht hierbei einer RNA-Konzentration von 40 ng / µl. Mögliche Verunreinigungen durch Proteine zeigen sich durch eine hohe optische Dichte bei 280 nm. Ein Verhältnis der optischen Dichte bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm von größer als 2 wurde hier entsprechend den Herstellerangaben als Qualitätskriterium für die Reinheit der isolierten RNA gewertet. Eine weitere Prüfung der Reinheit des RNA-Isolats wurde durch Auftrennung desselben *per* Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.4.12) vorgenommen.

3.4.9 Herstellen von cDNA mittels reverser Transkription

Zum Schutz der RNA wurden alle Arbeitsgeräte und -flächen vor Beginn mit *RNase Away*TM (Molecular Bio-Products, Inc., San Diego, Kalifornien, USA) behandelt und alle Arbeitsschritte, sofern nicht anders erwähnt, auf Eis durchgeführt. Zur Analyse mittels qRT-PCR wurde aus der isolierten RNA (Kapitel 3.4.7) cDNA synthetisiert. Hierzu wurden in ein 0,5-ml-Reaktionsgefäß 1 µl *random primer* (Roche, Mannheim, Deutschland), 1 µl dNTP-Mix (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) sowie 2 µg RNA gegeben und das Volumen mit RNase-

freiem Wasser auf 12 µl ergänzt. Die Lösung wurde inkubiert (5 min; 65 °C), zügig auf Eis gekühlt und abschließend zentrifugiert (5 s; 13.000 rpm; Heraeus Pico 17, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland). Aus 4 µl 5-fach-First-Strand-Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNase-freiem Wasser wurde zu Beginn ein Mastermix entsprechend der insgesamt benötigten Menge hergestellt. 7 µl dieses Mastermix wurden nach dem Zentrifugieren direkt in zu der RNA gegeben. Nach kurzer Inkubation (2 min; 25 °C) wurde mit 1 µl (200 Einheiten) *SuperScript™ II* Reverser Transkriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) die reverse Transkription gestartet und RNA in cDNA umgeschrieben (zunächst 10 min; 25 °C, anschließend 50 min; 42 °C). Durch Erhitzen (15 min; 70 °C) wurde die Reaktion gestoppt und die synthetisierte cDNA bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.4.10 Quantitative Bestimmung von Transkripten mittels qRT-PCR

Mit Hilfe der PCR und eines Fluoreszenzfarbstoffs, der doppelsträngige DNA bindet, lässt sich eine gezielte quantitative Analyse von ausgewählten DNA-Abschnitten vornehmen. Hierzu wurde zunächst ein *mastermix* aus 7,5 µl SYBR™ Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 0,5 µl des benötigten Primerpaares (je 10 µM *forward* und *reverse primer*) und 2 µl DNase-freiem Wasser erstellt. Die synthetisierte cDNA (Kapitel 3.4.9) wurde im Verhältnis 1:10 mit DNase-freiem Wasser verdünnt und 5 µl dieser Verdünnung gemeinsam mit 10 µl des *mastermix* in ein *well* einer 96-well-Platte gegeben. In wiederkehrenden Zyklen von Erwärmen und Abkühlen (Tab. 9) bilden sich aus der Einzelstrang-cDNA doppelsträngige DNA, in die sich der Farbstoff einlagert. Dieser absorbiert blaues und emittiert grünes Licht. Diese Emission lässt sich messen. Sie steht in direktem Verhältnis zur Menge der entstandenen Doppelstränge. Der *ct*-Wert (*cycle threshold*) beschreibt dabei den Zyklus, in dem die gemessene Fluoreszenz der entstandenen DNA einen definierten Schwellenwert (Hintergrundsignal) übersteigt. Alle Proben sowie deren Kontrollen wurden mindestens als Doppelbestimmung im selben Experiment analysiert. Zur Beurteilung der PCR-Effizienz diente bei jeder Analyse eine cDNA-Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, ohne cDNA) pro eingesetztem Primerpaar.

Tab. 9 | Schritte der qRT-PCR. Angegeben sind Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte der qRT-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	15 s
<i>Annealing</i>	60 °C	15 s
Elongation	70 °C	30 s
Schmelzkurvenanalyse	60 - 95 °C	15 s

3.4.11 Ermittlung der relativen mRNA-Menge

Die Berechnung eines relativen Expressionsunterschiedes eines Gens in zwei Proben erfolgte mittels *delta-delta-ct*-Methode nach Livak und Schmittgen (2001). Aus den ermittelten *ct*-Werten

wurde jeweils ein Mittelwert gebildet [\bar{ct}]. Dieser wurde durch Subtraktion des \bar{ct} eines Referenzgens normalisiert [$\Delta ct = \bar{ct}(\text{Zielgen}) - \bar{ct}(\text{Referenzgen})$] und Δct der Kontrolle von Δct der Behandlungsgruppe subtrahiert [$\Delta\Delta ct = \Delta ct(\text{Behandlung}) - \Delta ct(\text{Kontrolle})$]. Der relative Expressionsunterschied [R] zwischen der Behandlungsgruppe und der Kontrolle errechneten sich wegen des exponentiellen Zusammenhangs zwischen DNA-Menge und Intensität des Farbstoffs nach der Formel $R = 2^{-\Delta\Delta ct}$. Die Menge des Zielgens in der Kontrolle ergab nach dieser Rechnung stets den Wert 1. Eine Reduktion des Zielgens wurde durch einen Wert < 1 angezeigt, ein Anstieg durch einen Wert > 1 .

3.4.12 Separieren von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese

Die Qualität der nach isolierten RNA (Kapitel 3.4.7) wurde mittels Elektrophorese unter Verwendung eines 1%igen (w/v) Agarosegels geprüft. Für das Gel wurden 1 g Agarose in 100 ml TBE (TRIS-Borat-EDTA) unter Wärmezufuhr gelöst und unter ständigem Rühren mit 5 μl Ethidiumbromid versetzt. Letzteres interkaliert mit der durch das Gel wandernden Nukleinsäure und kann im Anschluss über UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht werden. Über Art und Position der entstandenen Bande lassen sich Rückschlüsse auf Größe und Menge der jeweiligen Nukleinsäure ziehen.

Zur Qualitätskontrolle der isolierten RNA wurden 1 μl des Isolats mit 4 μl RNase-freiem Wasser sowie 5 μl 2-fach *RNA-LoadingDye* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) inkubiert (10 min; 70 °C), auf Eis abgekühlt (3 min) und in die Taschen des Agarosegels gefüllt. Die Auftrennung erfolgte in einer mit TBE gefüllten Elektrophoresekammer für etwa 20 min bei 120 V. Zur Beurteilung der Qualität der RNA wurde anschließend eine Aufnahme der Fluoreszenz erstellt (Fusion-SL 3500.WL, Peqlab, Erlangen, Deutschland) und nach untenstehenden Kriterien bewertet. Trafen beide Kriterien zu, war von einer intakt isolierten RNA auszugehen.

- (1) Zwei gut sichtbare, scharfe Banden, welche die ribosomale RNA darstellen und aufgrund ihrer großen Menge als einzige RNA in der Fluoreszenzaufnahme zu sehen sind.
- (2) Keine genomische DNA, angezeigt durch Fluoreszenz im oberen Gelbereich, erkennbar.

3.4.13 Ko-Immunpräzipitation von Proteinen und RNA

Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden aus einem Zellysate gezielt Proteine präzipitiert und im Anschluss kopräzipitierte RNA mittels qRT-PCR analysiert. Zum Schutz der RNA wurden Arbeitsflächen und Geräte vor Beginn des Experiments mit *RNaseAwayTM* (Molecular Bio-Products, Inc., San Diego, Kalifornien, USA) gereinigt, spezielle Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet sowie alle Arbeitsschritte, sofern nicht anders erwähnt, auf Eis durchgeführt. Je Immun-

präzipitation (IP) wurden 15 µl Protein A Agarose mit 500 µl IP-Lysepuffer gewaschen. Die Protein A Agarose wurde durch Zentrifugieren (1 min; 4000 rpm; 4 °C; Hettich Mikro 220R) am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt, der IP-Lysepuffer verworfen und die Waschschriffe zwei Mal wiederholt. Im Anschluss wurden jeweils 2 µg eines Antikörpers (Tab. 32) mit 15 µl Protein A Agarose in 500 µl IP-Lysepuffer inkubiert (15 min; rotierend; RT). Die Antikörper binden an der Oberfläche der Protein A Agarose. Durch Zentrifugieren (1 min; 4000 rpm; 4 °C) wurde die Protein A Agarose erneut am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt, der Überstand wurde verworfen.

Unbehandelte HaCaT wurden in 10 cm-Kulturschalen kultiviert, bis diese vollständig mit Zellen bedeckt waren. Das Kulturmedium wurde verworfen und die Zellen einmal mit eiskaltem TBS gewaschen, die Zellen in 500 µl IP-Lysepuffer lysiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und inkubiert (10 min; auf Eis). Durch das anschließende Zentrifugieren (10 min; 13000 rpm; 4 °C; Hettich Mikro 220R) wurden lösliche von unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Jeweils 100 µl von dem löslichen Überstand (*Input*) wurde zur späteren Protein- bzw. RNA-Extraktion zurückgehalten.

Der verbleibende Überstand (*Input*) wurde zu gleichen Teilen auf die vorbereitete Protein A Agarose gegeben und inkubiert (30 min; rotierend; RT). Durch Zentrifugieren (1 min; 4000 rpm; 4 °C) wurden die Protein A Agarose-Antikörper-Antigen-Komplexe am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt. Vom Überstand wurden je IP 20 µl für die spätere SDS-PAGE mit anschließendem *Western Blot* zurückgehalten (*Überstand*) der verbleibende Überstand wurde verworfen und die Protein A Agarose dreimal in je 1 ml IP-Lysepuffer gewaschen und jeweils durch Zentrifugieren gesammelt (1 min; 4000 rpm; 4 °C). Zur Lyse der Präzipitate wurde je 200 µl 0,2%iger SDS-Puffer ohne beta-Mercaptoethanol auf die Protein A Agarose gegeben (*Eluat*). Je IP wurden 20 µl dieses Eluats für die spätere SDS-PAGE zurückgehalten.

Aus dem übrigen *Eluat* sowie aus dem zu Beginn zurückgehaltenem *Input*, wurde die RNA extrahiert. Hierzu wurde zu den Lösungen jeweils das dreifache Volumen Trizol gegeben und die Lösung bis zum Fortsetzen bei - 80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die Lösung in 1/5-Volumen Chloroform nach kräftigem Schütteln inkubiert (3 min; RT). Nach Zentrifugieren (15 min; 12000 rpm; 4 °C) wurde die obere Phase vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und darin durch Zugabe von 1 ml Isopropanol und 1 µg Glycogen die RNA gefällt (über Nacht; 4 °C). Nach erneutem Zentrifugieren (15 min; 12000 rpm; 4 °C) zeigte sich am Boden des Reaktionsgefäßes ein Pellet, welches nach Verwerfen des Überstandes dreimal mit je 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen wurde. Das Sammeln des Pellets erfolgte jeweils durch Zentrifugieren (5 min; 7500 rpm; 4 °C). Das RNA-Pellet wurde in 10 µl RNase-freiem Wasser gelöst

und vollständig der cDNA-Synthese zugeführt (Kapitel 3.4.9). Zur Bestimmung der enthaltenen Menge einzelner Transkripte wurde eine qRT-PCR durchgeführt (Kapitel 3.4.10).

Zur Überprüfung der Präzipitation wurden eine SDS-PAGE mit anschließendem *Western Blot* und Immunfärbungen durchgeführt (Kapitel 3.4.3 – 3.4.5). Jeweils 20 µl des zu Beginn zurückgehaltenen *Inputs* sowie der Überstände und Eluate wurden mit 5 µl 4-fach-SDS-Puffer ohne beta-Mercaptoethanol versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt.

3.5 Statistische Methoden

Für Messwerte mit $n \geq 3$ wird eine Standarddeviation angegeben. Zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede zweier unabhängiger Proben wurde ein *two-tailed Student's t-test* durchgeführt. Die Fehlerwahrscheinlichkeiten (p) wurden hierbei wie folgt angegeben: * $p \leq 0,10$, ** $p \leq 0,05$ und *** $p \leq 0,01$. Im Rahmen der Analyse der Intensität einer Immunfluoreszenzfärbung im Bereich der Zellkerne (Kapitel 3.3.4) erfolgte die Ermittlung des statistischen Unterschieds durch eine ANOVA (*analysis of variance*) (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD; Vasavada, Navendu [2016]).

4 Ergebnisse

4.1 Desmosomale Transkripte haben eine überdurchschnittlich lange 3'-UTR und HWZ

Zu Beginn der Untersuchungen stellte sich die Frage nach der Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen RBP und desmosomaler mRNA. Aufgrund der Annahme, dass eine lange 3'-UTR mehr Raum für eine Interaktion mit RBP bietet, wurden zunächst die Länge der 3'-UTRs desmosomaler Transkripte laut Angaben in der Datenbank AURA (<http://aura.science.unitn.it/>, letzter Abruf 05.08.2020) mit der durchschnittlichen Länge einer humanen 3'-UTR verglichen (Abb. 8A). Pesole et al. (2001) geben diesen Durchschnitt mit etwa 1000 nt an, wobei die Längen der untersuchten 3'-UTRs zwischen 21 nt und über 8500 nt lag. Die Durchschnittliche Länge einer 3'-UTR der zwölf untersuchten humanen desmosomalen Transkripte beträgt 1825 nt mit einem Median von 1879 nt. Acht dieser 3'-UTRs sind deutlich länger als der Durchschnitt. Die überdurchschnittliche Länge der 3'-UTRs lässt darauf schließen, dass die 3'-UTR viel Raum zur Interaktion mit regulatorischen Proteinen bieten.

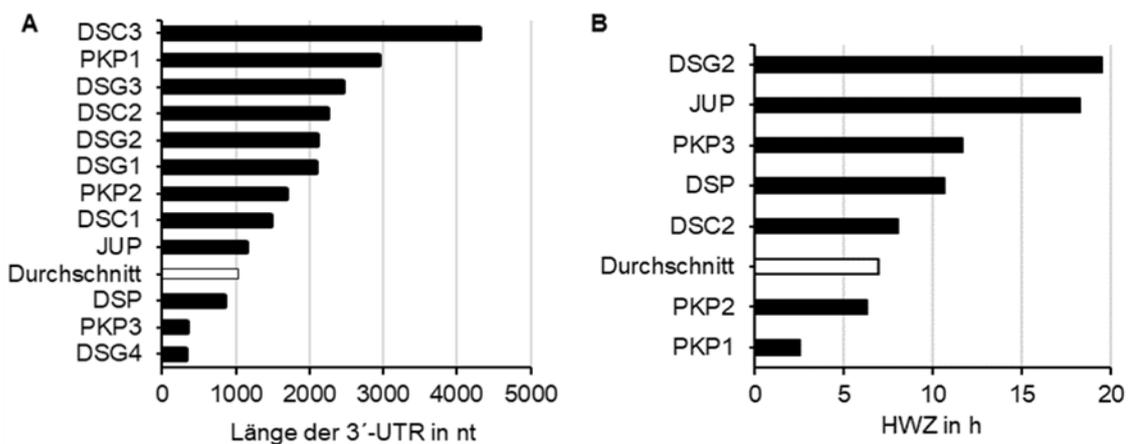


Abb. 8 | Länge der 3'-UTR und HWZ desmosomaler Transkripte. **A)** Die 3'-UTR der meisten desmosomalen Transkripte ist länger als eine durchschnittliche 3'-UTR von ca. 1000 Nucleotiden (weißer Balken) (<http://aura.science.unitn.it/>, letzter Abruf 05.08.2020; Pesole et al. 2001). Bei Genen mit mehreren Transkripten wurde zur Wahrung einer guten Übersichtlichkeit die jeweils längste Form abgebildet. **B)** Die meisten desmosomalen Transkripte haben eine längere HWZ als der Durchschnitt von etwa 7 h (Tani et al. 2012). Nicht dargestellte HWZ werden in der Datenbank AURA nicht angegeben. **Abkürzungen:** h, Stunde; HWZ, Halbwertszeit; nt, Nucleotide.

RBP können eine mRNA stabilisieren oder ihren vorzeitigen Abbau induzieren und somit ihre HWZ beeinflussen (Pesole et al. 2001; Lunde et al. 2007). Liegt die HWZ deutlich über bzw. unter dem Durchschnitt, lässt sich eine Dominanz einer Gruppe dieser Faktoren vermuten. Zum Vergleich einzelner HWZ wurde zunächst durch eine Literaturrecherche eine durchschnittliche HWZ einer mRNA ermittelt. Tab. 10 fasst die Ergebnisse dreier Untersuchungen zur Ermittlung dieser zusammen. Es lässt sich festhalten, dass die durchschnittliche HWZ einer mRNA in etwa 6,5 - 7 h beträgt, wobei ein Großteil der mRNAs eine deutlich kürzere HWZ zu haben scheint und die berechneten Durchschnittswerte durch wenige Transkripte mit übermäßig langer HWZ verschoben werden.

Tab. 10 | Mittlere mRNA-HWZ in verschiedenen Zelllinien. Tani et al. (2012) bestimmen die HWZ von 11052 mRNAs in HeLa - Zellen. Die kürzeste HWZ wird bei ihnen mit 1,28 h, die längste mit > 24 h angegeben. Ihre Berechnungen ergeben eine durchschnittliche HWZ von 6,93 h bei einem Median von 3,40 h. Einen ähnlichen Wert zeigen die Analysen von Friedel et al. (2009). Sie ermittelten aus den HWZ von 8342 Transkripten in humanen B-Zellen eine durchschnittliche HWZ von 6,47 h, bei einer minimalen HWZ von 7,9 min, einer maximalen HWZ von 78 h und einem Median von 5,25 h. Lee et al. (2010) analysierten 7398 Transkripte in C2C12-Zellen und berechneten eine mediane HWZ von 2,9 h. Dabei lagen 80 % der gemessenen HWZ zwischen 1,6 h und 5,0 h.

	Tani et al. 2012	Friedel et al. 2009	Lee et al. 2010
Zelllinie	HeLa	humane B-Lymphozyten	C2C12
Anzahl untersuchter Transkripte	11052	8342	7398
Max HWZ	> 24 h	78 h	
Mittlere HWZ	6,9 h	6,5 h	
Median HWZ	3,4 h	5,3 h	2,9 h
Min HWZ	1,3 h	8 min	

Für sieben desmosomale Transkripte finden sich in der Datenbank AURA Angaben zu deren HWZ, welche dort aus den Analysen von Tani et al. (2012) übernommen wurden (Abb. 8B). Die HWZ von vier dieser sieben desmosomalen mRNAs (*DSG2*, *DSP*, *JUP*, *PKP3*) liegen mehr als 25 % über der durchschnittlichen HWZ von 6,93 h. Lee et al. (2010) haben in ihren Untersuchungen Transkripte entsprechend ihrer HWZ in die Kategorien *langlebige mRNA* (HWZ > 4 h) oder *kurzlebige mRNA* (HWZ < 4 h) eingruppiert. Zu den *langlebigen mRNAs* lassen sich die mRNA von *DSC2*, *DSG2*, *DSP*, *JUP*, *PKP2* und *PKP3* einordnen. Diese sechs mRNAs haben eine längere HWZ als 80 % der von Tani et al. (2012) analysierten Transkripte und nur die HWZ der *PKP1*-mRNA (2,5 h) ist kürzer als die von ihnen berechnete mediane HWZ und lässt sich in die Gruppe der *kurzlebigen mRNAs* einordnen (HWZ ≤ 4 h, Lee et al. 2010). Es lässt sich festhalten, dass die aus Untersuchungen in HeLa-Zellen bekannten HWZ desmosomaler Transkripte deutlich über der durchschnittlichen HWZ der mRNAs dieser Zelllinie liegen, was eine Interaktion mit stabilisierenden RBP wahrscheinlich erscheinen lässt.

Die mRNAs von *PKP3* und *DSP* sowie von *JUP* mit relativ kurzen 3'-UTRs fallen durch ihre lange HWZ auf. Hingegen haben die mRNAs mit einer langen 3'-UTR von *PKP2* und *PKP1* eine HWZ unterhalb des Durchschnitts. Eine direkte Korrelation zwischen der Länge der 3'UTR und der Stabilität der entsprechenden mRNA lässt sich daher nicht ableiten.

Fazit

Die meist überdurchschnittliche Länge der 3'-UTR desmosomaler Transkripte lässt vermuten, dass diese Raum für eine Interaktion mit regulatorischen Proteinen bieten. Bekannte HWZ desmosomaler Transkripte liegen deutlich über einer durchschnittlichen HWZ. Dies deutet ebenfalls auf eine mögliche Regulation desmosomaler Transkripte durch RBP hin.

4.2 Die 3'-UTRs desmosomaler mRNA enthalten eine Vielzahl regulatorischer Elemente

Da für die Regulation einer mRNA über ihre 3'-UTR Interaktionen mit RBPs und/ oder regulatorischen RNA-Molekülen entscheidend sind, geschieht im Folgenden eine Analyse der 3'-UTRs desmosomaler mRNAs in Hinblick auf mögliche regulatorische Regionen.

Alternative Polyadenylierungsstellen

Für vier humane desmosomale mRNAs sind in der Datenbank AURA zusätzlich zu den in Abb. 8 dargestellten 3'-UTRs kürzere *splice*-Varianten aufgeführt: *JUP* (840 nt), *DSC1* (1261 nt), *DSC2* (2037 nt) und *DSC3* (4088 nt). Für die 3'-UTR der *DSG1*- und *DSG2*-mRNA finden sich dort Angaben zu alternativen Polyadenylierungsstellen (APA) (Tab. 11). Eine Regulierung der Genexpression über alternatives *splicing* oder alternative Polyadenylierung kann hier angenommen werden. Über die Expression verschieden langer Transkripte desmosomaler Gene ist bisher insgesamt wenig bekannt und eine systematische Analyse der Expression eventueller alternativer Transkripte desmosomaler Gene wurde bisher nicht durchgeführt. Die nachfolgenden Recherchen beziehen sich auf die jeweils längste Form der 3'-UTR.

Tab. 11 | Alternative Polyadenylierungsstellen der DSG1- und DSG2-mRNA. In der Datenbank AURA werden für die mRNA von DSG1 und DSG2 APA in deren 3'-UTR aufgeführt (aura.science.unitn.it/; letzter Abruf 10.07.2020).

Transkript	Position der APA in 3'-UTR
DSG1	456, 459, 1675, 1955
DSG2	286, 412, 419, 573, 2106

AU-reiche Elemente

Die ARE sind vor allem mit einer kurzen HWZ assoziiert und bekannte Zielsequenz zahlreicher RBP, welche entsprechende Transkripte abbauen oder stabilisieren (Kapitel 1.2.3). Hierbei lassen sich u.a. das klassische ARE-Motiv *AUUUA* und dessen Varianten mit mehr oder weniger *U* unterscheiden (Barreau et al. 2005). Die 3'-UTRs desmosomaler Transkripte wurden manuell auf solche Motive untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 dargestellt. Das klassische ARE-Motiv *AUUUA* findet sich insgesamt 53 Mal, Varianten mit weniger oder mehr *U* noch deutlich häufiger. Hierbei zeigte sich, dass die Anzahl der ARE einer 3'-UTR mit deren Länge positiv korreliert. Daher wurden die Anzahl der gezählten ARE mit der Zahl der Nukleotide der jeweiligen 3'-UTR ins Verhältnis gesetzt. Es zeigte sich, dass die *DSC2*-mRNA mit 1 ARE je 50 nt absolut und relativ die meisten Motive enthält. Der Anteil der Nukleotide der 3'-UTR, die solche Motive bilden, beträgt hier 10,02 %. Insgesamt finden sich in der 3'-UTR der Transkripte der desmosomalen Cadherine deutlich mehr ARE als in der 3'-UTR der Transkripte von *DSP*, *JUP* oder der Plakophiline. Die wenigsten ARE finden sich in der 3'-UTR der mRNA von *PKP3* und *JUP*. Insgesamt enthalten die 3'-UTR der Transkripte der Gene desmosomaler Cadherine mehr ARE

als die der Plakophiline. In der Gruppe der Plakophiline besitzt die 3'-UTR der *PKP2*-mRNA die meisten ARE.

Tab. 12 | ARE in 3'-UTR desmosomaler mRNA und Interleukinen. A) Anzahl verschiedener Varianten des klassischen ARE-Motivs in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte. B) Entsprechende Angaben zu den Motiven in der 3'-UTR der *IL2*- und *IL3*-mRNA. **Abkürzungen:** nt, Nukleotide; x, Anzahl.

	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3	Summe
AUUA	12	20	20	15	18	13	3	5	2	4	12	0	124
AUUUA	3	9	10	9	6	5	0	3	0	0	8	0	53
AUU(UUUUU)UUA	2	16	7	4	8	7	1	2	0	4	7	0	58
Summe ARE	17	45	37	28	32	25	4	10	2	8	27	0	235
1 ARE je x nt	86	50	116	74	66	98	81	84	569	368	62	0	
Anteil nt in ARE	5,79	10,02	4,30	6,72	7,59	5,12	6,21	5,99	0,88	1,36	8,05	0	

Da mRNAs von Entzündungsmediatoren wie *IL2* und *IL3* (Interleukin) über ARE reguliert werden (Barreau et al. 2005), wurde deren 3'UTR zum Vergleich herangezogen. In diesen 3'-UTR finden sich sieben bzw. sechs klassische ARE-Motive und zusätzlich vier bzw. drei Varianten dieses Motivs (Tab. 13). Bezogen auf die Länge der im Vergleich zu den desmosomalen mRNAs kurzen 3'-UTRs (*IL2*: 277 nt. *IL3*: 412 nt.) ergibt sich für *IL2* ein Anteil von 19,86 % und für *IL3* von 10,92 % Nukleotide, die an der Bildung von ARE beteiligt sind. Der Anteil von Nukleotiden der *DSC2*-mRNA, die ARE bilden, ist nur geringfügig niedriger als der Anteil in der *IL3*-mRNA, weshalb eine Regulation über solche Elemente möglich erscheint.

Tab. 13 | ARE in 3'-UTR ausgewählter Interleukine. Anzahl verschiedener Varianten des klassischen ARE-Motivs in der 3'-UTR der *IL2*- und *IL3*-mRNA. **Abkürzungen:** nt, Nukleotide; x, Anzahl.

	IL2	IL3
AUUA	3	1
AUUUA	7	6
AUU(UUUUU)UUA	1	2
Summe ARE	11	9
1 ARE je x nt	25	46
Anteil nt in ARE	19,86	10,92

Die ARE in den 3'-UTRs der genannten Interleukine liegen in ARE-Clustern nah beieinander. Eine Gruppierung von AREs in solchen Clustern macht eine Regulation über diese Elemente wahrscheinlicher (Lai et al. 2005). Zur Darstellung solcher Cluster in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte wurden das klassische ARE-Motiv und dessen Varianten in den jeweiligen Sequenzen hervorgehoben (S. XIX ff.). Dabei zeigten sich in der 3'-UTR der *DSG1*- und *DSC3*-mRNA Abschnitte mit einer der *IL3*-mRNA ähnlichen ARE-Dichte. Eine Regulation dieser Transkripte über solche Elemente erscheint daher möglich. Lagnado et al. (1994) identifizierten das Nonamer UUAUUUA(U/A)(U/A) als minimales ARE-Sequenzmotiv für eine Regulation. In der 3'-UTR der *IL2*- und *IL3*-mRNA ist dieses Nonamer ein- bzw. zweimal vollständig vorhanden. In den 3-UTRs desmosomaler Transkripte finden sich nur Teile dieser Sequenz. Hierbei kommt das Hexamer UUAUUU in der 3'-UTR der *DSC2*-mRNA sieben Mal vor.

Alu-Elemente

Die Datenbank AURA (<http://aura.science.unitn.it/>; letzter Abruf 10.07.2020) weist für drei desmosomale Transkripte entsprechende Elemente in deren 3'-UTR aus (Tab. 14).

Tab. 14 | Alu-Elemente in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte. Die Datenbank AURA führt für drei desmosomale Transkripte Alu-Elemente in deren 3'-UTR auf (<http://aura.science.unitn.it/>; letzter Abruf 10.07.2020).

Transkript	Position Alu Element in 3'-UTR
DSC3	1796 - 2088
DSG2	650 - 959
DSG3	416 - 726

G-quadruplex Strukturen

Die Primärstrukturen der 3'-UTR desmosomaler Transkripte wurden mit dem *online tool QGRS Mapper* (Kikin et al. 2006) in Hinblick auf Sequenzen untersucht, die solche GQS bilden können (Tab. 15). Insbesondere im 3'UTR von PKP1 finden sich zahlreiche potenzielle GQS.

Tab. 15 | G-quadruplex Strukturen in 3'-UTR desmosomaler Transkripte. Angegeben sind die Positionen einzelner GQS als Position des ersten Nukleotids der jeweiligen Sequenz innerhalb der 3'-UTR des entsprechenden Transkripts. Bei sich überlappenden Sequenzen wurde jeweils die erste vollständige Sequenz angegeben. Kikin et al. 2006; <https://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>; letzter Aufruf 10.07.2020.

Transkript	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3	
Position der GQS	83	83	632	611	657	418	-	-	179	62	1287	239	13
	126	140	808	1981	692	459			217	182	1831	956	86
	302	306	941		827	592			239	201	1867		141
	514	1370	1112		860	1709			332	503	2022		197
	827	2045	1264						614	571	2062		222
	1365		1548						770	636	2085		266
	1397		1664						959	716	2286		
			2015						1026	1001	2539		
			2183							1051	2715		
			2409							1129	2756		
			3428							1170	2779		
			3823										

Weitere regulatorische Elemente

Die Primärsequenz der 3'-UTRs desmosomaler Transkripte wurde in Hinblick auf die von Lee et al. (2010) beschriebenen stabilisierenden (SE) bzw. destabilisierenden Elemente (DE) untersucht. Bei den beschriebenen langen HWZ desmosomaler mRNAs besteht die Vermutung, in deren 3'-UTRs vor allem solche Elemente zu finden, die laut Lee et al. (ebd.) mit der Stabilisierung des Transkripts assoziiert sind. Tab. 16 zeigt das Ergebnis dieser Auszählung. Eine vollständige Übersicht zu den Angaben der einzelnen Motive zeigen Tab. 37 und Tab. 38.

Die Auszählung der stabilisierenden Elemente (SE) ergab insgesamt 158 SE. Dabei fanden sich in den 3'-UTRs mit unterdurchschnittlicher Länge (*DSG4*, *PKP3*, *DSP*) erwartungsgemäß wenig SE und in den beiden längsten 3'-UTRs (*PKP1*, *DSC3*) die meisten. In Relation zur Anzahl der Nukleotide besitzt die 3'-UTR der *DSCI*-mRNA mit einem SE je 490 nt die wenigsten und die

der *JUP*-mRNA mit einem SE je 63 nt die meisten dieser Elemente. Insgesamt wurden mehr als doppelt so viele destabilisierende Elemente (DE) wie SE gezählt (412 : 158). Bei sieben der zwölf ausgewerteten 3'-UTRs sind mehr als 10 % der Nukleotide der 3'-UTR an der Bildung solcher DE beteiligt. Zur Visualisierung der Verteilung der SE und DE innerhalb der einzelnen 3'-UTRs wurden diese ebenfalls farbig hervorgehoben (S. XIX ff.). SE zeigen sich eher vereinzelt. Abschnitte mit relativer Häufung von DE sind in der Primärstruktur der 3'-UTR der *DSC2*-, *DSC3*-, *DSG2*-mRNA zu finden.

Tab. 16 | Regulatorische Elemente nach Lee et al. (2010) in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte. Anzahl der Elemente, die nach Lee et al (2010) mit langer (SE; HWZ > 5 h) oder kurzer HWZ (DE; HWZ < 1,6 h) assoziiert sind innerhalb der 3'-UTr desmosomaler Transkripte sowie Durchschnittliche Zahl der Nukleotide die ein SE oder DE beinhalten und Anteile der Nukleotide einer 3'-UTR die solche Hexamere bilden. **Abkürzungen:** nt, Nukleotide; x, Anzahl.

	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3	Summe
SE	3	24	27	12	12	16	1	5	18	27	12	1	158
DE	29	74	84	35	40	37	2	21	16	31	42	1	412
1 SE je x nt	490	94	159	174	176	153	322	167	63	109	140	338	
Anteil nt in SE	1,23	6,41	3,77	3,46	3,42	3,93	1,86	3,59	9,50	5,50	4,30	1,78	
1 DE je x nt	51	30	51	59	53	66	161	40	71	95	40	338	
Anteil nt in DE	11,84	19,78	11,72	10,09	11,39	9,10	3,73	15,09	8,44	6,31	15,04	1,78	

Auch wenn eine einfache lineare Regression eine Korrelation zwischen der HWZ einer mRNA mit der Menge an SE bzw. DE nicht sicher zeigen konnte (Abb. 25), kann festgehalten werden, dass sich in der Primärstruktur der meisten 3'-UTRs desmosomaler Transkripte zahlreiche Elemente wiederfinden, denen Lee et al. (2010) regulatorischen Einfluss zuschreiben.

Fazit

Insgesamt unterstützt die Analyse die initiale Annahme, eine lange 3'-UTR besäße mehr regulatorische Elemente als eine kurze. Eine Regulierung der Expression einiger Gene über alternatives *splicing* oder alternative Polyadenylierung kann angenommen werden. Ebenso kann eine Regulation desmosomaler mRNA über ARE für einzelne Transkripte aufgrund der großen Anzahl (*DSC2*, *PKP2*) bzw. aufgrund deren Verteilung (*DSG1*, *DSC3*) vermutet werden. Alu-Elemente finden sich dagegen weniger zahlreich, was einen regulatorischen Einfluss nicht sicher ausschließt. Putative *G-quadruplex* Strukturen kommen in nahezu allen untersuchten 3'-UTRs vor. Dabei sind sie in der 3'-UTR der *DSC3*-, *JUP*- und *PKP1*-mRNA besonders häufig, was einen regulatorischen Einfluss wahrscheinlich macht. Von den durch Lee et al. (2010) beschriebenen regulatorischen Sequenzen finden sich zahlreiche auch in den 3'-UTR desmosomaler Transkripte. Welche funktionelle Bedeutung diese hier einnehmen, ist bisher nicht bekannt.

4.3 Desmosomale mRNAs interagieren mit einer Vielzahl an RBPs

Da die Primärsequenzen sowie die Halbwertszeiten der Transkripte desmosomaler Gene eine Interaktion mit bzw. eine Regulation durch RNA-bindende Proteine wahrscheinlich erscheinen lassen, wurden im Weiteren Datenbanken in Hinblick auf beschriebene Interaktionen dieser Transkripte mit RBP durchsucht, um mögliche Regulatoren zu eruieren.

In den Datenbanken AURA, ENCORI und POSTAR2 wird für insgesamt 187 verschiedene RBP eine Interaktion mit einer oder mehreren desmosomalen mRNAs angegeben (Abb. 9A). 33 RBP sind in allen drei Datenbanken beschrieben (Abb. 9B) aufgeführt, 66 RBP in jeweils zwei und 88 RBP jeweils nur in einer Datenbank. Zur näheren Charakterisierung der RBP wurden weitere Datenbanken befragt. 81 der 187 RBP sind mit ihren RBD in der Datenbank RBPdb aufgeführt. Für 24 RBP ist dort nur eine RBD angegeben, für 54 mindestens zwei RBD. Drei RBP sind in der RBPdb ohne Angabe einer RBD gelistet. Mehr als die Hälfte der hier aufgeführten RBP (60,5 %) besitzt ein oder mehrere *RNA recognition motifs* (RRM), 17,3 % eine *K homology domain* (KH) und 11,1 % ein *CCCH zinc finger-Motif* (Abb. 9C). *The Human Protein Atlas* führt für 172 der 187 RBP deren Lokalisation innerhalb der Zelle auf. Der größte Teil dieser 172 RBP (131 RBP, 76,2 %) lokalisiert im Zellkern, etwa die Hälfte (85 RBP, 49,4 %) im Zytoplasma. 8 RBP (4,7 %) wurden in Mitochondrien nachgewiesen und 6 RBP (3,5 %) an der Zellmembran. Dass ein Großteil der RBP im Zellkern lokalisiert, ist gut vereinbar mit dem Beginn der posttranskriptionellen Regulation einer mRNA direkt nach Beginn ihrer Synthese. Insgesamt und auch für jede einzelne desmosomale mRNA führt AURA die wenigsten RBP auf (Abb. 9D), was mit der Spezifizierung der Suche auf die 3'-UTR zu begründen ist. Im Durchschnitt finden sich hier 12 RBP je mRNA. Bei der Suche in ENCORI und POSTAR2 konnte diese Einstellung nicht vorgenommen werden, hier fanden sich durchschnittlich 55 bzw. 40 RP je mRNA. Dabei fanden sich in jeder Datenbank für die mRNA von *DSC1*, *DSG1*, *DSG3* und *DSG4* die wenigsten Angaben, was mit der sehr geringen bzw. fehlenden Expression dieser Transkripte in den analysierten Zelllinien (vorwiegend HeLa und HEK293, *human embryonic kidney*) zusammenhängen dürfte. Für die mRNA von *DSC2*, *DSC3*, *DSG2*, *DSP*, *JUP*, *PKP2* und *PKP3* werden in den Datenbanken zahlreiche potenzielle Interaktionspartner aufgeführt.

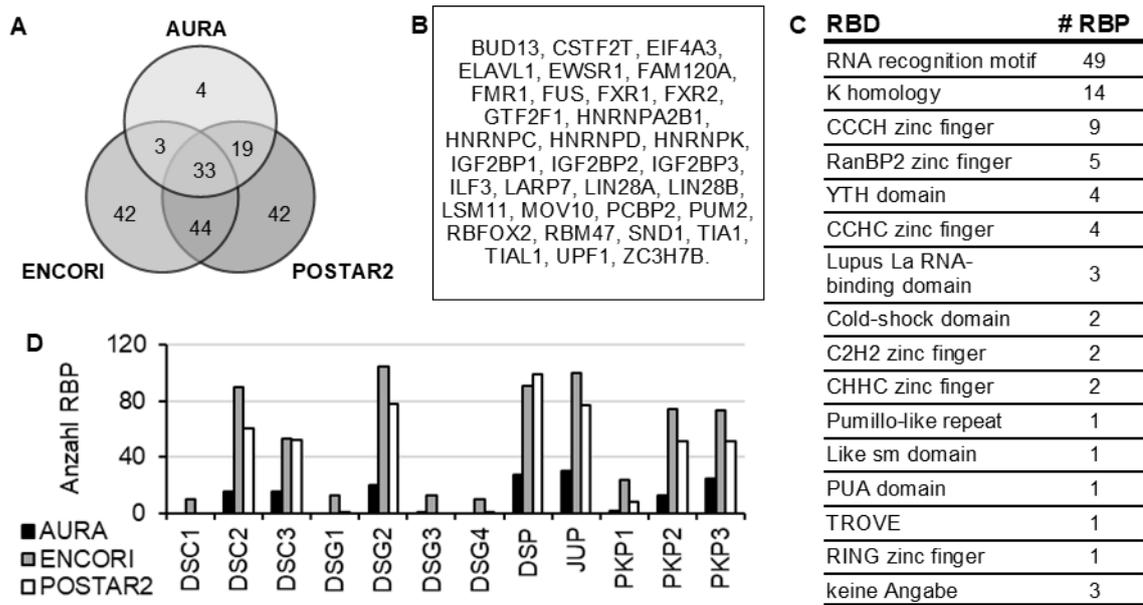


Abb. 9 | RBP in Datenbanken. A) In den Datenbanken AURA, ENCORI und POSTAR2 werden für insgesamt 187 verschiedene RBP-Interaktionen mit der mRNA desmosomaler Proteine aufgeführt. Die Zahlen geben die Anzahl der RBP an, die in den jeweiligen Datenbanken beschrieben sind. Sich überschneidende Flächen repräsentieren RBP die in mehreren Datenbanken gefunden wurden. B) Für diese 33 RBP wird in allen drei Datenbanken eine Interaktion mit desmosomaler mRNA aufgeführt. C) 81 der 187 RBP sind mit ihren RNA-Bindungsdomänen (RBD) in der Datenbank RBPdb aufgeführt. D) Für jede untersuchte mRNA ist die Anzahl der in der jeweiligen Datenbank gefundenen RBP angegeben. **Abkürzungen:** PUA, pseudouridine synthase and archaeosine transglycosylase; RanBP2, Ran-binding protein 2; TROVE, Telomerase, Ro and Vault module; #, Anzahl.

Ein Vergleich der in den Datenbanken für die einzelnen desmosomalen mRNAs angegebenen interagierenden RBP zeigt einige Überschneidungen. Abb. 10 gibt die Anzahl der für ein Transkript in den einzelnen Datenbanken aufgeführten RBP an. Sich überschneidende Flächen repräsentieren RBP, die in mehreren Datenbanken aufgeführt werden

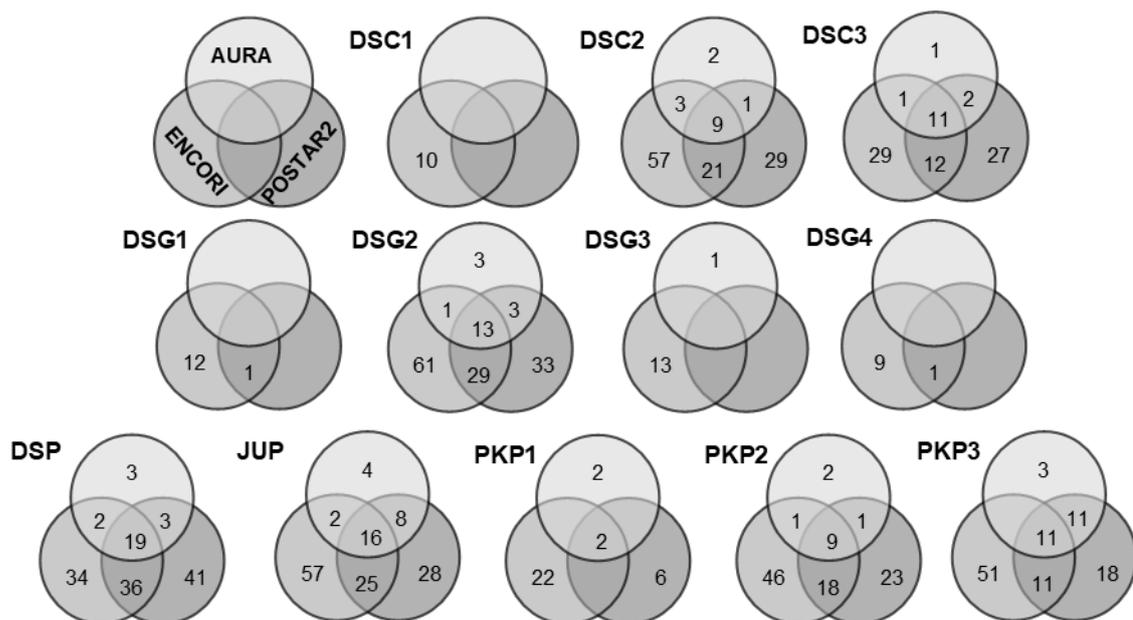


Abb. 10 | RBP einzelner mRNAs. In den Datenbanken finden sich für die einzelnen desmosomalen mRNAs zum Teil gleiche Angaben zu möglichen Bindungspartnern.

Innerhalb der Familien desmosomaler Gene (Desmocolline, Desmogleine, Plakophiline) wurden die Angaben der in den Datenbanken für das jeweilige Transkript gefundenen RBP verglichen. Es zeigten sich für die Desmocolline neun RBP, die für alle Vertreter dieser Familie als mögliche Interakteure mit deren mRNA aufgeführt waren (Abb. 11A) und für die Desmogleine vier (Abb. 11B). Für die Plakophiline fanden sich 13 RBP, für die eine Interaktion mit allen drei Transkripten beschrieben ist (Abb. 11C). Hier sind ELAVL1 und FXR2 als Interaktionspartner für jeweils zwei Plakophiline beschrieben.

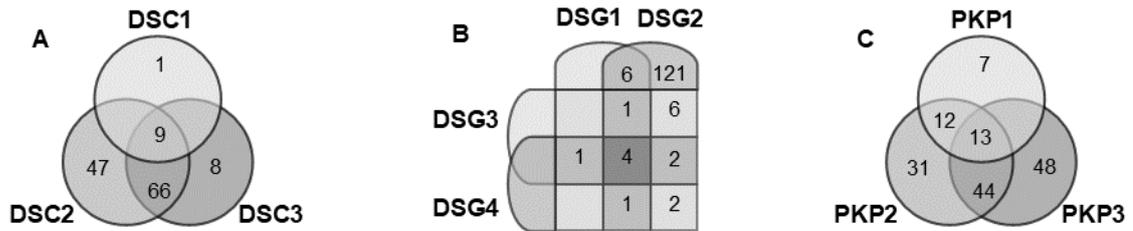


Abb. 11 | Vergleich der RBP innerhalb von Genfamilien. Innerhalb der einzelnen Familien desmosomaler Gene zeigen sich Überschneidungen der in den Datenbanken AURA, ENCORI und POSTAR2 als mögliche Interakteure mit desmosomaler mRNA beschriebenen RBP.

Da die einzelnen Vertreter der DSC-, DSG- und PKP-Genfamilien differenzierungsabhängig und damit in verschiedenen Schichten der Epidermis exprimiert werden (Kapitel 1.1.1), wurden diese auf der Basis ihres Expressionsmusters in funktionelle Gruppen eingeteilt. Ein Vergleich der in den Datenbanken gefundenen RBP innerhalb dieser funktionellen Gruppen konnte zeigen, dass Transkripte der Gene, die sowohl basal als auch suprabasal exprimiert werden (*DSP*, *JUP*, *PKP3*), eine hohe Übereinstimmung der beschriebenen potenziellen Bindungspartner aufweisen (Abb. 12A). Für Transkripte basal exprimierter Gene (*DSC2*, *DSC3*, *DSG2*, *DSG3*, *PKP2*; Abb. 12B und C) zeigte sich ebenfalls eine große Übereinstimmung möglicher Bindungsproteine. Für die Transkripte vorwiegend suprabasal exprimierter Gene (*DSC1*, *DSG1*, *DSG4*, *PKP1*) fanden sich in den Datenbanken insgesamt wenig Angaben, da diese in den untersuchten Zellen kaum exprimiert werden. Vier dieser RBP fanden sich bei allen vier dieser Transkripte (Abb. 12D).

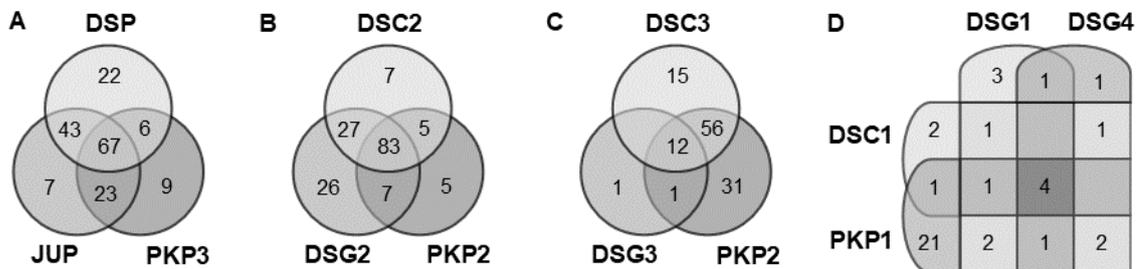


Abb. 12 | Vergleich der RBP innerhalb funktioneller Gruppen. Der Vergleich der in den Datenbanken AURA, ENCORI und POSTAR2 für jede einzelne mRNA aufgeführten möglichen Interaktionspartnern innerhalb funktioneller Gruppen

AURA, ENCORI und POSTAR2 führen experimentell ermittelte Daten zu Interaktionen zwischen Transkripten und RBP auf. Die Datenbank ATTRACT enthält Angaben zu experimentell ermittelten Bindungssequenzen von RBP. Die Sequenzen der 3'-UTR desmosomaler Transkripte wurden hierin auf mögliche Bindungspartner untersucht. Es fanden sich insgesamt 150 verschiedene RBP. 18 dieser RBPs fanden sich ebenfalls in den drei zuvor untersuchten Datenbanken (Tab. 17). Tab. 39 zeigt alle 279 RBP, für die in den Datenbanken eine Interaktion mit desmosomalen Transkripten angegeben war.

Tab. 17 | Potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA. Diese 18 RBP wurden in allen vier Datenbanken als potenzielle Interakteure desmosomaler mRNA aufgeführt.

Gen	Protein
EIF4A3	<i>Eukaryotic initiation factor 4A-III</i>
ELAVL1	<i>ELAV-like RNA binding protein 1</i>
FMR1	<i>Synaptic functional regulator FMR1</i>
FUS	<i>FUS RNA-binding protein</i>
FXR1, -2	<i>Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1, -2</i>
HNRNP -A2B1, -C, -D, -K	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1, C, D, K</i>
IGF2BP2, -3	<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2, -3</i>
LIN28A	<i>Protein lin-28 homolog A</i>
PCBP2	<i>Poly(rC)-binding protein 2</i>
PUM2	<i>Pumilio homolog 2</i>
RBFOX2	<i>RNA binding protein fox-1 homolog 2</i>
TIA1	<i>Cytotoxic granule associated RNA binding protein TIA1</i>
TIAL1	<i>Nucleolysin TIAR</i>

Fazit

In vier Datenbanken fanden sich insgesamt 279 verschiedene RBP, für die in Hochdurchsatzverfahren eine Bindung an mindestens eine desmosomale mRNA ermittelt oder *in silico* vorhergesagt wurde. Für 18 der insgesamt 279 RBP fanden sich Angaben in allen vier Datenbanken. Für die mRNA von *DSC2*, *DSC3*, *DSG2*, *DSP*, *JUP*, *PKP2* und *PKP3* werden in den Datenbanken AURA, ENCORI und POSTAR2 zahlreiche potenzielle Interakteure aufgeführt. Eine Regulation dieser Transkripte durch RBP scheint bei der großen Zahl möglicher Interaktionspartner sehr wahrscheinlich. Die wenigen Angaben zu in der Epidermis vorwiegend suprabasal exprimierten Transkripten dürften auf die Unterrepräsentation dieser Transkripte in den untersuchten Zelllinien zurückzuführen sein. Ein Vergleich der laut den Datenbanken möglichen Interakteure innerhalb funktioneller Gruppen desmosomaler Gene offenbarte Gemeinsamkeiten. Dies unterstützt die Annahme einer ähnlichen Regulation der einzelnen Transkripte innerhalb dieser Gruppen.

4.4 Der Einfluss von RBP auf Desmosomen

Von den 18 RBP, die als potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA identifiziert wurden (Tab. 17), wurden ELAVL1 und TIAL1 für anschließende experimentelle Untersuchungen zum Einfluss auf Desmosomen ausgewählt. Zusätzlich wurde G3BP1 in die Experimente mit einbezogen. Fischer-Kešo et al. (2014) demonstrierten eine RNA-abhängige Interaktion zwischen G3BP1 und PKP1 sowie PKP3. Darüber hinaus zeigten sie einen Einfluss auf die Expression der mRNA von PKP2 und DSP. Eine mögliche Beteiligung von G3BP1 an dieser Regulation wurde dabei von den Autoren nicht ausgeschlossen.

Die folgenden Experimente sollen als Pilotexperimente einer systematischen Untersuchung der posttranskriptionellen Regulation der Expression desmosomaler Proteine verstanden werden und einen ersten Einblick in diese Thematik sowie Anhaltspunkte für weiterführende Analysen geben.

Als Modellsystem wurden die Zelllinien HaCaT und MCF7 aufgrund ihrer zahlreichen Desmosomen ausgewählt. Diese Zelllinien zeigen eine epitheliale Morphologie mit ausgeprägten Adhärenzkontakten. Entsprechend ihrer Herkunft (mehrschichtiges vs. einschichtiges Epithel) unterscheiden sich die Desmosomen der Zelllinien in ihrer Zusammensetzung, d.h. sie exprimieren unterschiedliche Isotypen der Desmogleine, Desmocolline und der Plakophilin-Familie. Für eine Überexpression von G3BP1 wurden aufgrund der guten Transfizierbarkeit HeLa-Zellen verwendet.

Einige desmosomale Proteine wurden in HaCaT und MCF7 via indirekter Immunfluoreszenz sichtbar gemacht (Abb. 13). DSC2 zeigte sich hierbei überwiegend an den Zellgrenzen sowie im Zytoplasma, hier vor allem zellkernnah, was möglicherweise dem Golgi-Apparat entspricht. DSP fand sich hauptsächlich an den Zellgrenzen sowie punktuell in der Nähe der Zellkerne, vermutlich perizentrosomal. Ähnliches wurde für PKP1 beobachtet, wobei sich PKP1 zusätzlich über den Zellkern verteilt fand. In MCF7 ist PKP1 nicht exprimiert. PKP3 war fast ausschließlich an den Zellgrenzen sowie diffus im Zytoplasma und nahezu nicht im Zellkern lokalisiert.

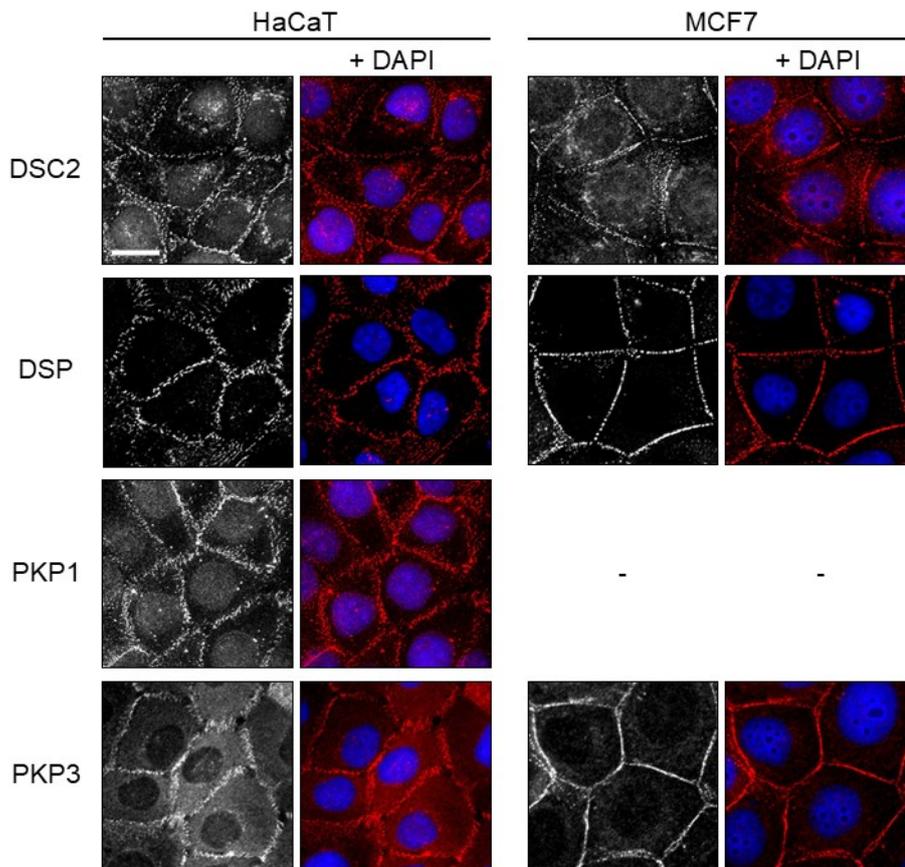


Abb. 13 | Immunfluoreszenzfärbung desmosomaler Proteine in HaCaT und MCF7. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener desmosomaler Proteine in HaCaT und MCF7. In der Spalte „+DAPI“ ist jeweils zusätzlich zu der Färbung des entsprechenden desmosomalen Proteins (**rot**) die Färbung der DNA (**blau**) dargestellt. **Färbungen:** Für die Anfärbung von DSC2, DSP und PKP3 wurden die Zellen in Methanol fixiert, für die Darstellung von PKP1 wurden die Zellen vor der Methanolfixierung in 0,2 % Triton X-100 in PBS extrahiert. Die folgenden **Antikörper** wurden verwendet: DSC2: Kaninchen-anti-DSC2-AK (Progen), DSP: Kaninchen-anti-DSP Serum (616, M. Hatzfeld), PKP3: Maus-anti PKP3-AK (Santa Cruz BT). PKP1: Kaninchen anti-PKP1 Serum (667, M. Hatzfeld). Färbung DNA: DAPI (Invitrogen). **Maßstabsbalken:** 20 µm, für alle Aufnahmen. **Abkürzungen:** -, Keine Färbung erfolgt.

4.4.1 Der Einfluss von ELAVL1 auf die Expression desmosomaler Transkripte und Proteine

ELAVL1 ist bekannt für die Regulation der Stabilität und Translation einer mRNA über AU-reiche Elemente (Ma et al. 1996; Wang et al. 2013). Dabei wurde bereits eine direkte Interaktion mit der 3'-UTR der *CDHI*-mRNA beschrieben, deren Translation ELAVL1 fördert (Yu et al. 2016).

In der 3'-UTR der Transkripte desmosomaler Desmocolline und Desmogleine sowie *DSP* und *PKP2* fanden sich zahlreiche ARE, sodass eine potenzielle Regulation durch das RBP möglich erschien (Kapitel 4.2). Das lediglich vereinzelte Vorkommen weniger ARE in der 3'-UTR der *JUP*- und *PKP1*-mRNA lässt eine Regulation über dieselben unwahrscheinlich erscheinen.

Analysen der Datenbanken AURA, ENCORI, POSTAR2 sowie ATTRACT (Kapitel 4.3) deuten zudem darauf hin, dass ELAVL1 an die mRNA nahezu aller desmosomalen Gene binden könnte, mit Ausnahme von PKP3 (Tab. 18). Daher sollte ein möglicher Einfluss von ELAVL1 auf die Expression desmosomaler Gene näher untersucht werden.

Tab. 18 | ELAVL1 in Datenbanken. In den Datenbanken AURA, ENCORI, POSTAR2 und ATTRACT wird ELAVL1 als potenzieller Interaktionspartner mehrerer desmosomaler Transkripte aufgeführt (x). **Abkürzungen:** x, ELAVL1 wird in der Datenbank genannt; -, ELAVL1 wird nicht als potenzieller Interaktionspartner beschrieben; leeres Feld, für die entsprechende mRNA sind in der Datenbank keine RBP gefunden worden.

	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3
AURA		-	-		-			x	x		x	-
ENCORI	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-
POSTAR2		x	x	x	x		-	x	x	x	x	-
ATTRACT	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	-

Es wurden Experimente in den Zelllinien HaCaT und MCF7 durchgeführt. Im Western Blot konnte ELAVL1 in beiden Zelllinien in etwa gleichem Maß nachgewiesen werden (Abb. 14A). Da bekannt ist, dass ELAVL1 sowohl die Stabilität einer mRNA als auch deren Translation beeinflussen kann (Myer et al. 1997), wurde sowohl ein Einfluss auf die Menge der desmosomalen mRNAs, als auch auf die Menge und Lokalisation desmosomaler Proteine untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit einem gegen die ELAVL1-mRNA gerichteten siRNA-Pool (siELAVL1, siE) transfiziert (Kapitel 3.3.2). Dies führte im Vergleich zu Zellen, die mit einem unspezifischen Kontroll-siRNA-Pool (siC) transfiziert wurden, nach 72 h zu einer Reduktion der ELAVL1-mRNA um mehr als 80 % und in MCF7 um etwa 60 % (Abb. 14C + D). Das ELAVL1-Protein zeigte in beiden Zelllinien eine Reduktion um etwa zwei Drittel (Abb. 14C + D). Zunächst wurde der mögliche Einfluss eines ELAVL1-KD auf die Menge desmosomaler mRNA analysiert. Hierzu wurde nach einer qPCR die relative Menge der jeweiligen mRNA ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14C und D in Relation zur Kontrolle dargestellt, welche den Wert 1,0 hat.

ELAVL1 kann durch die Bindung an ARE entsprechende Transkripte stabilisieren (Brennan und Steitz 2001). Die Menge einer in dieser Weise regulierten mRNA könnte nach einem ELAVL1-KD folglich reduziert sein. Eine Reduktion der relativen mRNA-Menge deutete sich in HaCaT für *DSC2*, *DSC3*, *JUP*, *PKP3* an. Für die mRNA von *DSG2* und *DSP* zeigte sich hingegen ein Anstieg nach ELAVL1-KD. In MCF7 deutet sich für die mRNA von *DSP*, *JUP* und *PKP3* eine Reduktion an. Für die mRNA von *DSC2* ließ sich ein diskreter Anstieg vermuten. Die Mengen der *PKP1*- und *PKP2*-mRNA zeigten sich unverändert.

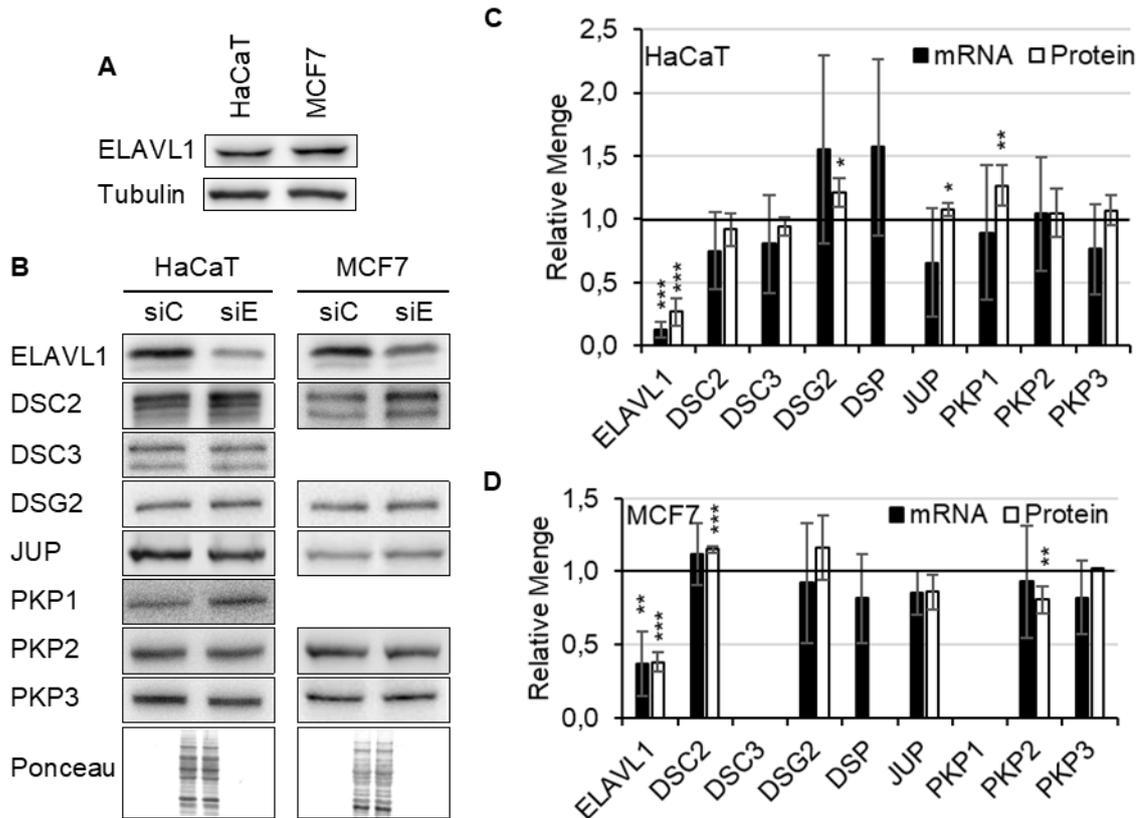


Abb. 14 | Desmosomale Proteine und mRNA nach ELAVL1-KD. **A)** ELAVL1 ist in HaCaT und MCF7 in etwa gleichem Maß exprimiert. **B)** 72 h nach Transfektion von siE bzw. siC in HaCaT und MCF7 erfolgte die Proteinisolierung mit anschließender SDS-PAGE und WB. **C) + D)** Die relativen mRNA- bzw. Proteinmengen wurden im Vergleich zur Kontrolle bestimmt, welche den Wert 1,0 hat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 - 6 Experimenten. Für Ergebnisse mit $n \geq 3$ werden jeweils die Standardabweichung und Fehlerwahrscheinlichkeit (* $p \leq 0,10$; ** $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,01$) gezeigt.

In einem nächsten Schritt wurde ein möglicher Einfluss von ELAVL1 auf die Menge desmosomaler Proteine untersucht. Abb. 14B zeigt repräsentative Western Blots nach Anfärbung des jeweiligen desmosomalen Proteins nach ELAVL1-KD in HaCaT und MCF7 jeweils im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Anhand der Western Blots wurde die relative Menge des jeweiligen Proteins ermittelt. Diese sind in Abb. 14C und D in Bezug zur Kontrolle dargestellt, welche den Wert 1,0 hat. 72 h nach Transfektion von siELAVL1 zeigte sich in HaCaT ein diskreter, aber reproduzierbarer Anstieg der Menge von DSG2 und PKP1. DSC2 und DSC3 zeigten sich eher unbeeinflusst. Auch für JUP, PKP2 und PKP3 ließen sich keine Änderungen erkennen. Die Veränderungen in HaCaT konnten teilweise in MCF7 reproduziert werden. Hier zeigte sich ein leichter Anstieg von DSG2 und DSC2. Für JUP und PKP2 zeigte sich hingegen eine leichte Reduktion der relativen Proteinmenge. Nur in Einzelfällen zeigte sich hierbei eine Signifikanz von $p < 0,05$. Die beschriebenen Veränderungen werden als Hinweise auf bzw. Tendenzen einer möglichen Regulation desmosomaler Proteine durch ELAVL1 verstanden.

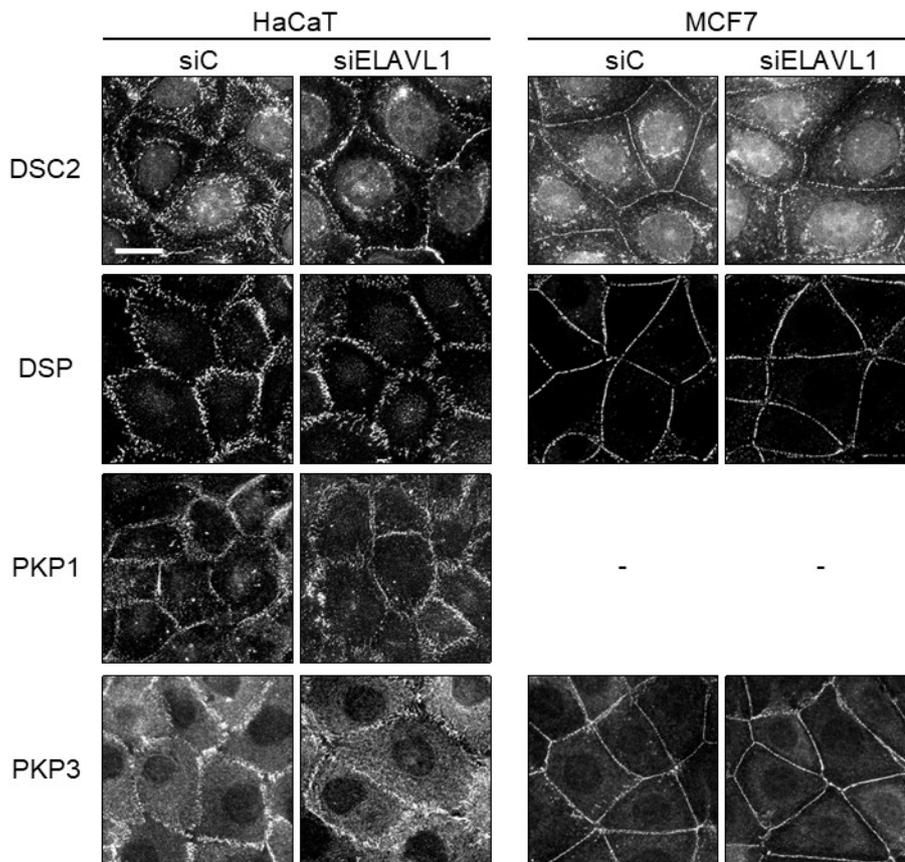


Abb. 15 | Desmosomale Proteine in HaCaT nach ELAVL1-KD. 72 h nach Transfektion von siELAVL1 bzw. Kontroll-siRNA in HaCaT und MCF7 erfolgten die Fixierung der Zellen sowie das Anfärben desmosomaler Proteine (DSC2, DSP, PKP1, PKP3). In der Lokalisation der angefärbten Proteine sowie der Desmosomen zeigten sich nach ELAVL1-KD keine Unterschiede zur Kontrolle. **Färbung DSC2, DSP und PKP3:** Methanolfixierung, Kaninchen-anti-DSC2-AK (Progen), Kaninchen-anti-DSP-Serum (616, M. Hatzfeld) für Färbung von HaCaT, Maus-anti-DSP-AK (Progen) für Färbung von MCF7, Maus-anti-PKP3-AK (Santa Cruz BT). **Färbung PKP1:** Triton-Vorextraktion, Methanolfixierung, Kaninchen-anti-PKP1-Serum (667, M. Hatzfeld). **Maßstabsbalken:** 20 µm, für alle Aufnahmen. **Abkürzungen:** -, Keine Färbung erfolgt.

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde untersucht, ob ein ELAVL1-KD Veränderungen der Desmosomenorganisation oder der Lokalisation desmosomaler Proteine induziert. In HaCaT und MCF7 ergab sich hierauf 72 h nach Transfektion der siRNA-Pools kein Hinweis (Abb. 15). DSC2 lokalisierte in HaCaT wie auch in MCF7 an den Zellgrenzen, im Zellkern wie auch diffus im Zytoplasma, hier vor allem zellkernnah. DSP fand sich vorwiegend an den Zellgrenzen. PKP1 ließ sich an den Zellgrenzen und im Zellkern anfärben, wohingegen PKP3 im Zytoplasma und an den Zellgrenzen darzustellen war. Unterschiede zur Kontrolle konnten durch einen ELAVL1-KD nicht festgestellt werden, sodass auf weiterführende Untersuchungen verzichtet wurde.

Fazit

Eine Datenbank gestützte Analyse regulatorischer Elemente in den 3'-UTR der desmosomalen Transkripte ließ eine Interaktion des RBP ELAVL1 mit nahezu allen desmosomalen Transkripten vermuten. Darauf wies auch das Vorhandensein von ARE in den 3'-UTR der *DSC2*-, *DSG2* und

PKP2-mRNAs hin. Nach siRNA-vermitteltem ELAVL1-KD in HaCaT- und MCF7-Zellen deuteten sich leichte Veränderungen der Transkript- und Proteinmengen an, die aber statistisch nur teilweise signifikant waren. Ausgeprägtere Veränderungen in den ARE-haltigen Transkripten wurden nicht beobachtet. Hinweise auf Veränderungen der Struktur oder Zahl der Desmosomen bzw. der Lokalisation desmosomaler Proteine ergaben sich aus Immunfluoreszenzfärbungen nicht. Diese Pilot-Experimente konnten Hinweise auf eine Regulation desmosomaler Transkripte durch ELAVL sammeln, diese aber nicht bestätigen oder widerlegen.

4.4.2 Der Einfluss von G3BP1 auf die Expression desmosomaler Transkripte und Proteine

G3BP1 ist auf vielfältige Weise an der Stabilisierung von Transkripten sowie an der Translationsinhibition beteiligt (Irvine et al. 2004; Ortega et al. 2010). Publierte Daten zeigen eine Interaktion mit PKP1 und PKP3 und lassen eine Regulation der DSP- und PKP2-mRNA vermuten (Hofmann et al. 2006; Fischer-Kešo et al. 2014). Es besteht die Annahme, G3BP1 erkenne viele seiner *targets* über deren Sekundärstruktur (Irvine et al. 2004; Fischer et al. 2020). Aufgrund der überdurchschnittlichen Länge der 3'-UTR desmosomaler Transkripte (Kapitel 4.1) könnten diese zahlreiche Sekundärstrukturen ausbilden (Mayr 2019) und hierüber von G3BP1 gebunden werden.

In den Datenbanken AURA, ENCORI, POSTAR2 und ATTRACT fand sich keine desmosomale mRNA als Interaktionspartner von G3BP1. Die Datenbank ATTRACT führte eine Bindung des verwandten Proteins G3BP2 an die *DSC3*-, *DSG1*- und *DSG3*-mRNA auf. Trotz fehlender Hinweise in den Datenbanken auf einen möglichen Einfluss von G3BP1 auf Desmosomen, wurde das RBP aufgrund der erwähnten experimentellen Indizien für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Um den Einfluss von G3BP1 auf die Expression desmosomaler Proteine zu untersuchen, wurden Experimente in den Zelllinien HaCaT, MCF7 und HeLa durchgeführt. G3BP1 wird in jeder dieser Zelllinien in einem etwa gleichen Maß exprimiert (Abb. 16A). Zunächst wurden HaCaT und MCF7 mit einem gegen die *G3BP1*-mRNA gerichteten siRNA-Pool (siG3BP1, siG) transfiziert (Kapitel 3.3.2). Hierdurch konnte die *G3BP1*-mRNA im Vergleich zur Transfektion eines unspezifischen Kontroll-siRNA-Pools (siC) nach 72 h in HaCaT um mehr als 90 % und in MCF7 um mehr als 70 % reduziert werden (Abb. 16C + D). Das G3BP1-Protein zeigte eine Reduktion um etwa zwei Drittel.

Zunächst wurde ein möglicher Einfluss des G3BP1-KD auf die Menge desmosomaler mRNA untersucht. 72 h nach Transfektion von siG3BP1 in HaCaT war eine deutliche Tendenz zu einer gesteigerten Expression der *PKP1*-mRNA festzustellen. Eine Reduktion deutete sich für die *DSC3*-, *DSP*-, *PKP2*- und *PKP3*-mRNA an. Die relative Menge der *DSC2*-, *DSG2*- und *JUP*-mRNA schwankte mit hoher Standardabweichung um den Wert der Kontrolle. In MCF7 zeigte sich die *DSP*-mRNA unverändert. Für die übrigen Transkripte deutete sich eine Reduktion an. Eine Veränderung der *PKP1*-mRNA konnte in MCF7 bei zu geringer Expression nicht untersucht werden.

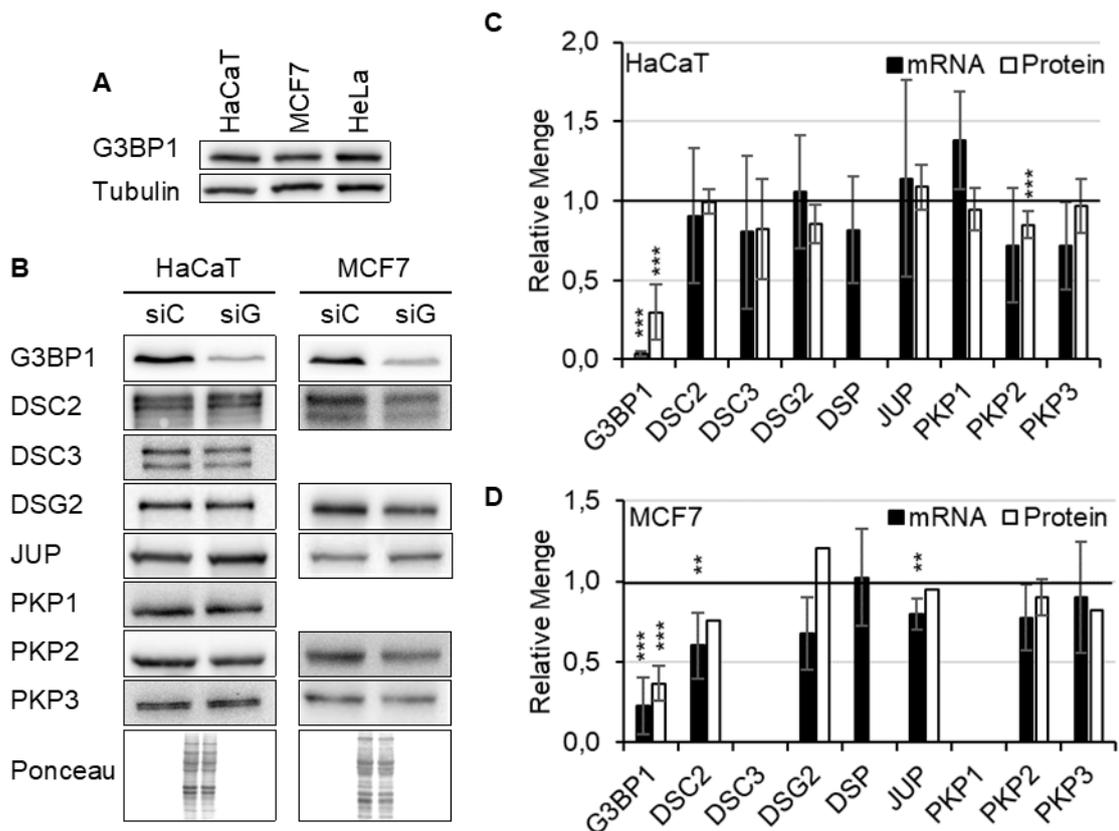


Abb. 16 | Desmosomale Proteine und mRNA nach G3BP1-KD. **A)** G3BP1 ist in HaCaT, MCF7 und HeLa in etwa gleichem Maß exprimiert. **B)** 72 h nach Transfektion von siG bzw. siC in HaCaT und MCF7 erfolgten die Proteinisolierung mit anschließender SDS-PAGE und WB. **C) + D)** Die relativen mRNA- bzw. Proteinmengen wurden im Vergleich zur Kontrolle bestimmt, welche den Wert 1,0 hat. Für Ergebnisse mit $n \geq 3$ werden jeweils die Standardabweichung und Fehlerwahrscheinlichkeit (* $p \leq 0,10$; ** $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,01$) gezeigt.

Um die angedeuteten Veränderungen der mRNA-Menge weiter zu untersuchen, wurde G3BP1 in HeLa-Zellen via Plasmidtransfektion exprimiert. Hierzu wurden ein Vektor, der für ein *G3BP1*-GFP Fusionsprotein codiert, transfiziert, sowie als Kontrolle ein GFP-Vektor. Über die Fluoreszenz des GFP konnten transfizierte Zellen detektiert werden (Abb. 17A). Durch die Transfektion konnte die Menge der *G3BP1*-mRNA im Vergleich zur Kontrolle etwa 10-fach gesteigert werden (Abb. 17B). Für die Transkripte von *DSC2*, *DSG2* und *PKP2* konnte ebenfalls eine Steigerung

um das 9- bis 17-fache beobachtet werden. Da diese Veränderungen denen nach G3BP1-KD entgegen gerichtet sind, wird die Annahme eines Einflusses von G3BP1 auf desmosomale mRNA unterstützt.

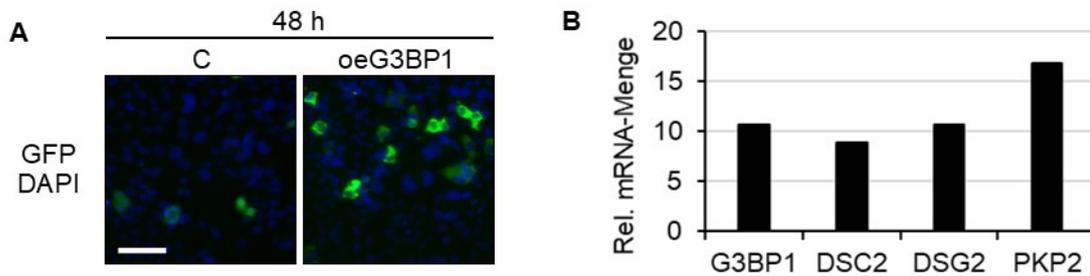


Abb. 17 | Überexpression von G3BP1 in HeLa. Es erfolgte die Transfektion eines GFP-Vektors (C) bzw. eines G3BP1-GFP-Vektors (oeG3BP1) in HeLa-Zellen. 48 h nach Transfektion wurde ein Teil der Zellen **A**) in Methanol fixiert und mit DAPI (Invitrogen) gefärbt. Die Abbildung zeigt die Aufnahme der Fluoreszenz des über den Vektor exprimierten GFP (**grün**) und des DAPI-Farbstoffes (**blau**). **B**) Aus einem weiteren Teil der transfizierten Zellen wurde die RNA isoliert und die Menge einiger Transkripte relativ zur Kontrolle (C = 1) ermittelt. Es zeigte sich eine Überexpression der G3BP1-mRNA um etwa das 10-fache, sowie in Anstieg der Expression der DSC2-, DSG2- und PKP2-mRNA um das 9- bis 17-fache. **Maßstabsbalken:** 65 µm, für alle Aufnahmen. **Abkürzungen:** Rel., Relative.

In einem nächsten Schritt wurde ein möglicher Einfluss von G3BP1 auf die Menge desmosomaler Proteine untersucht. Abb. 16B zeigt repräsentative *Western Blots* nach Anfärbung des jeweiligen desmosomalen Proteins nach G3BP1-KD in HaCaT und MCF7 jeweils im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Anhand der *Western Blots* wurde die relative Menge des jeweiligen Proteins ermittelt. Diese sind in Abb. 16C und D in Bezug zur Kontrolle dargestellt, welche den Wert 1,0 hat. In HaCaT zeigte sich 72 h nach Transfektion von siG3BP1 eine dezente, aber reproduzierbare Reduktion von PKP2 sowie angedeutet auch von DSC3 und DSG2. Für DSC2, JUP, PKP1 und PKP3 ergab sich kein Hinweis auf eine Veränderung der Proteinmenge. Auch in MCF7 zeigte sich für PKP2 tendenziell eine Reduktion. DSC2 war etwas vermindert exprimiert. Für DSG2 zeigt sich bei Reduktion der mRNA-Menge ein tendenzieller Anstieg der Proteinmenge. Ob G3BP1 hier Einfluss auf die Translation der mRNA nimmt oder diese gegensätzliche Veränderung mit experimentellen Schwankungen zu begründen ist, bleibt unklar.

Um zu prüfen, ob die Menge an G3BP1 die Anzahl oder Organisation der Desmosomen bzw. die Verteilung desmosomaler Proteine innerhalb der Zelle beeinflusst, erfolgten 72 h nach Transfektion von HaCaT und MCF7 mit entsprechenden siRNAs Immunfluoreszenzfärbungen desmosomaler Proteine (DSC2, DSP, PKP1, PKP3) (Abb. 18). Bei einer ersten qualitativen Begutachtung der Färbungen ergab sich der Verdacht, PKP1 würde nach G3BP1-KD in HaCaT vermehrt im Bereich des Zellkerns lokalisieren. Für DSC2, DSP und PKP3 ergab sich in beiden Zelllinien weder ein Anhalt für eine Änderung der Desmosomenzahl oder -struktur noch für eine veränderte Lokalisierung nach G3BP1-KD.

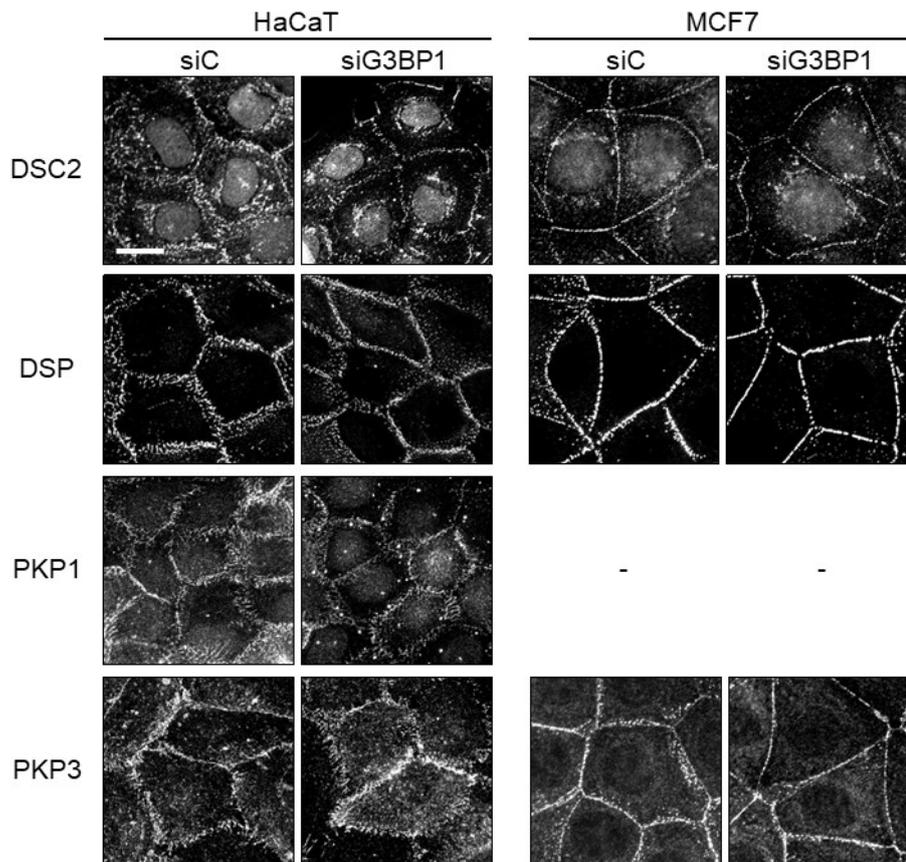


Abb. 18 | Desmosomale Proteine in HaCaT nach G3BP1-KD. 72 h nach Transfektion von HaCaT bzw. MCF7 mit siG3BP1 bzw. Kontroll-si-RNA (siC) wurden die Zellen fixiert und desmosomale Proteine angefärbt (DSC2, DSP, PKP1, PKP3). In HaCaT ließ sich nach G3BP1-KD eine vermehrte Lokalisation von PKP1 im Zellkern vermuten. Für DSC, DSP und PKP3 zeigte sich in beiden Zelllinien kein Unterschied zur Kontrolle. **Färbung DSC2, DSP und PKP3:** Methanolfixierung, Kaninchen-anti-DSC2-AK (Progen), Kaninchen-anti-DSP-Serum (616, M. Hatzfeld) für Färbung von HaCaT, Maus-anti-DSP-AK (Progen) für Färbung von MCF7, Maus-antiPKP3-AK (Santa Cruz BT). **Färbung PKP1:** Triton-Vorextraktion, Methanolfixierung, Kaninchen-anti-PKP1-Serum (667, M. Hatzfeld). **Maßstabsbalken:** 20 µm, für alle Aufnahmen. **Abkürzungen:** -, Keine Färbung erfolgt.

Um die angedeutete Änderung der Lokalisation von PKP1 zu objektivieren, wurde die mittlere Intensität der Fluoreszenz im Bereich der Zellkerne bezogen auf deren Größe mit der mittleren Intensität der übrigen Bildbereiche (Zytoplasma, Zellgrenzen, Interzellularraum) in Relation gesetzt (Kapitel 3.3.4). Insgesamt wurden 257 (Kontrolle) bzw. 239 (G3BP1-KD) Zellkerne ausgewertet (Abb. 19). 72 h nach Transfektion der siRNA zeigen sich Minimalwert und 1. Quartil der Kontrolle und nach G3BP1-KD nahezu identisch. Median, 3. Quartil sowie Maximalwert der relativen Fluoreszenz der Kontrollzellen liegen hingegen deutlich über den Werten nach G3BP1-KD. Dies entspricht den eingangs formulierten Erwartungen bei zunehmender Lokalisation von PKP1 nach G3BP1-KD im Zellkern. Durch eine einfaktorielle ANOVA wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ ermittelt, was die Annahme eines relevanten Unterschieds unterstützt. Insgesamt könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass PKP1 72 h nach G3BP1-KD vermehrt im Zellkern oder weniger im Zytoplasma und an den Zellgrenzen lokalisiert.

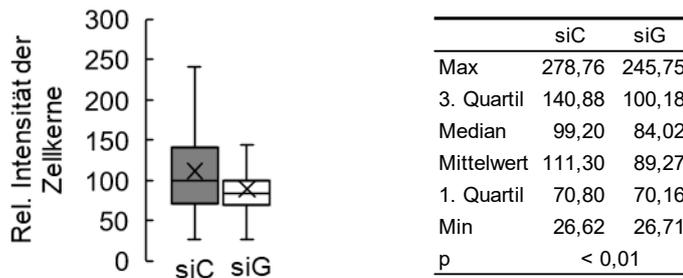


Abb. 19 | Relative Intensität der Fluoreszenz im Bereich der Zellkerne. Die mittlere Intensität der Fluoreszenz der PKP1-Färbung im Bereich eines Zellkerns wurde mit der mittleren Intensität der übrigen Bildfläche (Zytoplasma, Zellgrenzen, Interzellularräum) ins Verhältnis gesetzt. Im *Box-Plot*-Diagramm dargestellt sind 1. Quartil, Median, Mittelwert (x), 3. Quartil sowie Minimal- und Maximalwert innerhalb der Ausreißergrenzen (1. bzw. 3. Quartil \pm 1,5-facher Interquartilsabstand). Ausreißer sind nicht abgebildet. In der nebenstehenden Tabelle sind die jeweiligen Werte aufgeführt. **Abkürzungen:** Max, Maximalwert; Min, Minimalwert.

Fazit

Auch, wenn Datenbankenanalysen keine Hinweise auf eine Interaktion zwischen G3BP1 und desmosomalen Transkripten ergaben, legen experimentelle Indizien und bereits bekannte Funktionen des RBP eine Beteiligung an deren Regulation nahe. In HaCaT und MCF7 ergab sich der Hinweis auf eine Reduktion sowohl der *PKP2*-mRNA, als auch des *PKP2*-Proteins nach G3BP1-KD. Nach Überexpression des RBP in HeLa-Zellen deutete sich ein Anstieg der *PKP2*-mRNA an. Dies lässt sich gut mit den o.g. bereits publizierten Ergebnissen vereinbaren, in denen Komplexe aus G3BP1 und Plakophilinen beschrieben wurden, die die *PKP2*-mRNA enthielten (Fischer-Kešo et al. 2014). Ähnliches wurde auch für *DSC3* beobachtet. Die übrigen desmosomalen Transkripte und Proteine zeigten in HaCaT und MCF7 teilweise gegenläufige Veränderungen, sodass hier keine Vermutungen formuliert werden können. Eine Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen von HaCaT nach G3BP1-KD ergab den Verdacht, dass die Lokalisation von *PKP1* durch das RBP beeinflusst sein könnte. Es deutete sich 72 h nach Transfektion der siRNA eine gesteigerte Lokalisierung im Zellkern an.

4.4.3 Der Einfluss von TIAL1 auf die Expression desmosomaler Transkripte und Proteine

TIAL1 bindet u.a. an ARE in der 3'-UTR seiner *targets* und destabilisiert gebundene mRNA bzw. inhibiert deren Translation oder reguliert alternatives *splicing* (Le Guiner et al. 2001; Meyer et al. 2018). Diese Bindung von TIAL1 an ARE lässt eine Regulation der mRNA von *DSC2*, *DSG2* und *PKP2* vermuten (Kapitel 4.2) und die Betrachtung bekannter alternativer *splicing*-Stellen lässt eine Regulation von *JUP*, *DSC1*, *DSC2*, *DSC3* sowie *PKP1* (Kapitel 4.2) möglich erscheinen. Die Auswertung der Datenbanken AURA, ENCORI und POSTAR2 lassen TIAL1 als potenziellen Interaktionspartner der mRNA von *DSC2*, *DSC3*, *DSG2*, *DSP*, *JUP*, *PKP1* und *PKP2* vermuten und in der Datenbank ATTRACT fanden sich alle 12 desmosomalen Transkripte als mögliches *targets* des RBP (Tab. 19).

Tab. 19 | TIAL1 in Datenbanken. In den Datenbanken AURA, ENCORI, POSTAR2 und ATTRACT wird TIAL1 als potenzieller Interaktionspartner mehrerer desmosomaler Transkripte aufgeführt (x). **Abkürzungen:** x, TIAL1 wird in der Datenbank genannt; -, TIAL1 wird nicht als potenzieller Interaktionspartner beschrieben; leeres Kästchen, für die entsprechende mRNA sind in der Datenbank keine RBP gefunden worden.

	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3
AURA		x	x		x	-		x	x	-	x	-
ENCORI	-	x	x	-	x	-	-	x	x	x	x	-
POSTAR2		x	x	-	x		-	x	x	-	-	-
ATTRACT	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Um den Einfluss von TIAL1 auf die Expression desmosomaler Gene zu untersuchen, wurden Experimente in HaCaT und MCF7 durchgeführt. In beiden Zelllinien zeigte sich das RBP im Western Blot in etwa gleicher Menge exprimiert (Abb. 20A). Der eingesetzte Antikörper erkennt zwei Isoformen des RBP (42 kDa und 50 kDa). In einem siRNA-vermittelten KD in HaCaT gelang die Reduktion der *TIAL1*-mRNA sowie des entsprechenden Proteins um etwa die Hälfte (Abb. 20C + D). In MCF7 zeigte sich der KD jeweils weniger effizient.

Zunächst wurde ein Einfluss des TIAL1-KD auf die Menge desmosomaler mRNA untersucht. Es deutete sich eine Zunahme der Menge der *DSG2*-, *PKP1*-, *PKP2*- und *PKP3*-mRNA an, was mit bereits bekannten Funktionen von TIAL1 als negativer Regulator seiner *targets* vereinbar ist. Die Ergebnisse könnten daher einen Einfluss von TIAL1 auf die Stabilität dieser vier Transkripte in HaCaT andeuten. Die relative Menge der *DSC2*, *DSC3*, *DSP* und *JUP*-mRNA zeigte einen deutlich geringeren Anstieg. Experimentelle Schwankungen scheinen hier wahrscheinlicher zu sein als ein tatsächlicher Einfluss des RBP. Eine Reduktion der mRNA-Menge deutete sich für keines der desmosomalen Transkripte an. In MCF7 deutete sich eine geringe Zunahme der *DSC2*- und *PKP2*-mRNA an, was die Beobachtungen in HaCaT unterstützt, sowie eine geringe Reduktion der *DSP*-mRNA. Die geringe KD-Effizienz in beiden Zelllinien schränkt dabei die Interpretation der angedeuteten Veränderungen ein. Ob TIAL1 alternatives *splicing* desmosomaler Transkripte reguliert wurde hierbei nicht untersucht. In einem nächsten Schritt wurde ein möglicher Einfluss von TIAL1 auf die Menge desmosomaler Proteine untersucht. Abb. 20B zeigt repräsentative *Western Blots* nach Anfärbung des jeweiligen desmosomalen Proteins nach TIAL1-KD in HaCaT und MCF7 jeweils im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen. Anhand der Western Blots wurde die relative Menge des jeweiligen Proteins ermittelt. Diese sind in Abb. 20C und D in Bezug zur Kontrolle dargestellt, welche den Wert 1,0 hat. In HaCaT zeigte sich nach TIAL1-KD eine Reduktion der relativen Menge des PKP1. Ebenfalls deutete sich in HaCaT eine diskrete Reduktion der *DSC2*, *DSC3* sowie *PKP3*-Menge an, welche auch in MCF7 vermutet werden konnte. Für *DSG2*, *JUP* und *PKP2* konnte in HaCaT keine Änderung der relativen Proteinmenge

gezeigt werden, wohingegen sich in MCF7 für die Menge von JUP sowie PKP2 eine diskrete Reduktion und für die Menge von DSG2 eine leichte Steigerung andeutete.

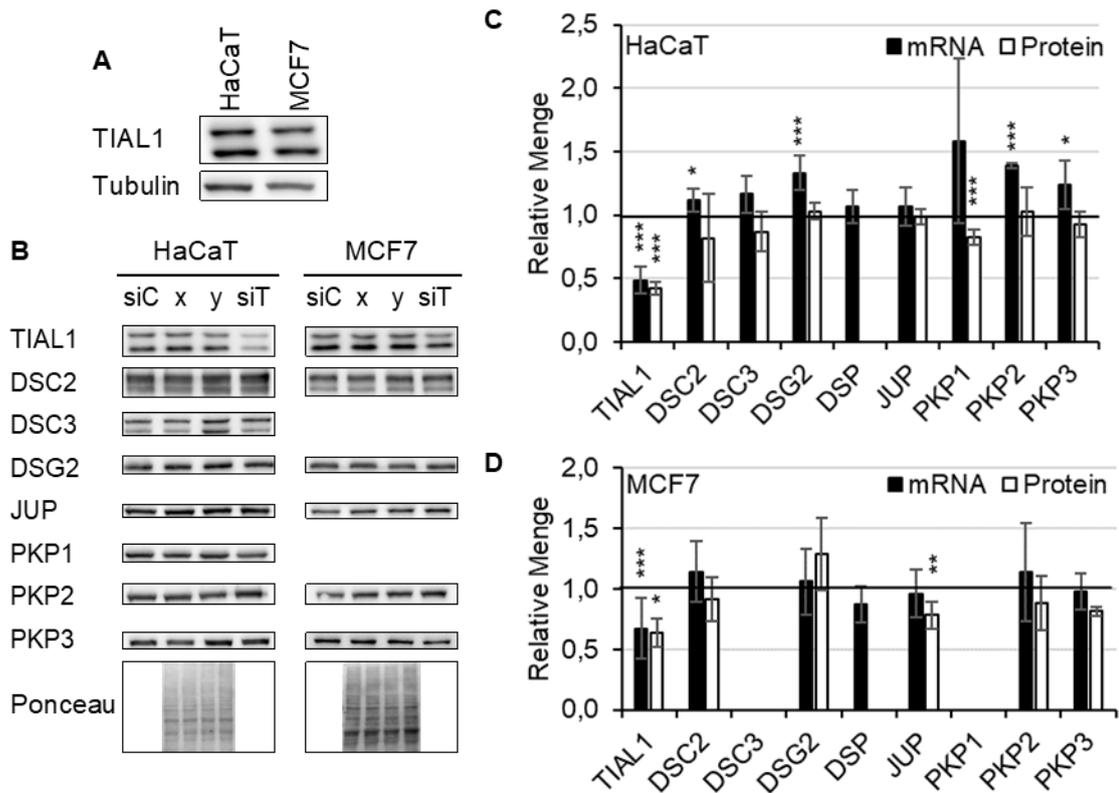


Abb. 20 | Desmosomale Proteine und mRNA nach TIAL1-KD. **A)** TIAL1 ist in HaCaT und MCF7 in etwa gleichem Maß exprimiert. **B)** 72 h nach Transfektion von siT bzw. siC in HaCaT und MCF7 erfolgte die Proteinisolierung mit anschließender SDS-PAGE und WB. **C) + D)** Die relativen mRNA- bzw. Proteinmengen wurden im Vergleich zur Kontrolle bestimmt, welche den Wert 1,0 hat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 - 6 Experimenten. gezeigtw werden jeweils die Standardabweichung und Fehlerwahrscheinlichkeit (* $p \leq 0,10$; ** $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,01$) gezeigt. **Abkürzungen:** C, Kontrolle; T, TIAL1; x, G3BP1; y, ELAVL1.

Immunfluoreszenzfärbungen sollten Aufschluss über eine mögliche Veränderung in der Organisation der Desmosomen oder Lokalisation desmosomaler Proteine nach TIAL1-KD geben. Sowohl 48 h als auch 72 h nach Transfektion von siTIAL1 in HaCaT konnte für DSP, PKP1 und PKP3 keine Änderung in der Lokalisation beobachtet werden (Abb. 21). DSP lokalisierte vorwiegend an den Zellgrenzen, PKP1 an den Zellgrenzen sowie im Nukleus und PKP3 an den Zellgrenzen und im Zytoplasma mit nahezu vollständiger Aussparung des Nukleus. 72 h nach Transfektion zeigte sich bei erhöhter Zelldichte eine für HaCaT typische „stachelige“ Konfiguration der Zellgrenzen.

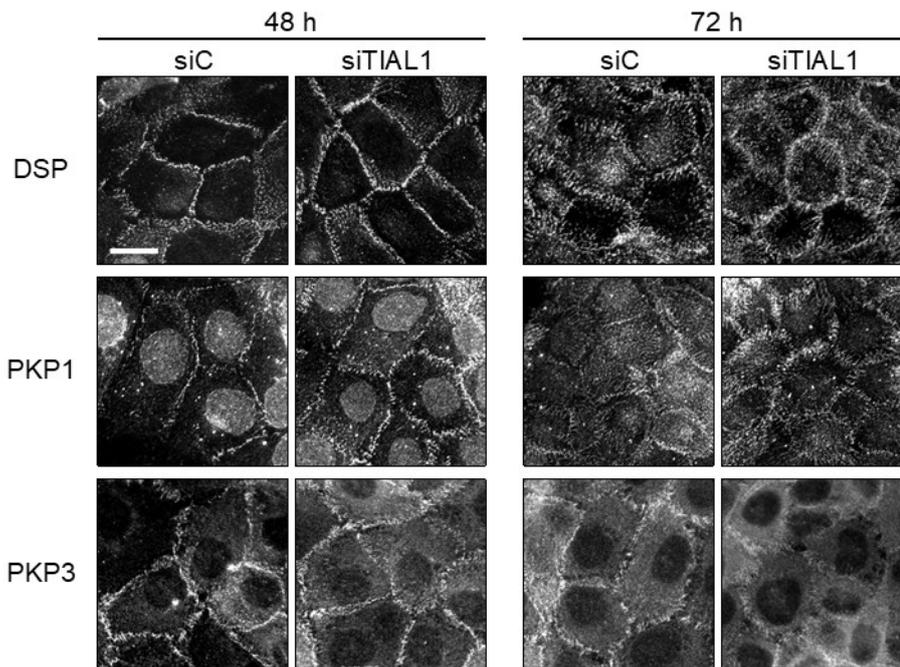


Abb. 21 | Desmosomale Proteine in HaCaT nach TIAL1-KD. 48 h bzw 72 h nach Transfektion von siRNA gegen TIAL1-mRNA erfolgten die Fixierung der Zellen sowie das Anfärben desmosomaler Proteine (DSP, PKP1, PKP3). In der Lokalisation der angefärbten Proteine zeigen sich nach TIAL1-KD keine Unterschiede zur Kontrolle. **Färbung DSP und PKP1:** Vorextraktion, Methanolfixierung, Kaninchen-anti-DSP-Serum (616, M. Hatzfeld), Kaninchen-anti-PKP1-Serum (667, M. Hatzfeld). **Färbung PKP3:** Methanolfixierung, Maus-anti-PKP3-AK (Santa Cruz BT). **Maßstabsbalken:** 20 µm, für alle Aufnahmen. **Abkürzungen:** h, Stunden.

Fazit

Aufgrund der Häufung von ARE und des Vorhandenseins alternativer *splicing sites* in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte sowie den Ergebnissen der Datenbankenanalyse waren zu Beginn der experimentellen Untersuchungen die mRNAs von *DSC1*, *DSC2*, *DSC3*, *DSG2*, *DSP*, *JUP*, *PKP1* und *PKP2* als mögliche TIAL1-*targets* vermutet worden. Ein siRNA vermittelter TIAL1-KD führte nur zu einer mäßigen Reduktion der *TIAL1*-mRNA und des Proteins, was die Interpretation der Beobachtungen einschränkt. Die Ergebnisse lassen die Annahme eines negativen Einflusses von TIAL1 auf die mRNA von *DSG2*, *PKP1*, *PKP2* und *PKP3* zu. Hinweise auf einen Einfluss von TIAL1 auf die Desmosomenstruktur oder Lokalisation desmosomaler Proteine innerhalb der Zelle ergaben sich nicht.

4.4.4 Binden ELAVL1, G3BP1 und TIAL1 direkt an desmosomale mRNA?

Die bisherigen Beobachtungen können eine Regulation der desmosomalen Transkripte durch ELAVL1, G3BP1 oder TIAL1 nicht beweisen, schließen eine solche aber auch nicht aus. Einerseits könnte die zum Teil geringe *knockdown*-Effizienz eine Regulation maskieren, andererseits könnte das Zeitfenster, in dem die Analysen durchgeführt wurden, nicht optimal sein. Deshalb wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz eine mögliche Assoziation dieser RBP mit desmosomaler mRNA untersucht. Dazu wurden Zelllysate aus HaCaT mit an Protein A Agarose

gekoppelten Antikörpern gegen das jeweilige RBP inkubiert und so die RBPs mit assoziierten Proteinen und RNAs immobilisiert (je RBP eine eigene IP). Diese Komplexe wurden eluiert und das präzipitierte RBP via *Western Blot* nachgewiesen (Abb. 22). Daneben wurden die Eluate mittels qPCR auf enthaltene mRNA untersucht (Tab. 20). Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem die Protein A Agarose mit einem Serum einer nicht spezifisch immunisierten Maus inkubiert wurde.

Abb. 22 zeigt die Ergebnisse eines *Western Blots* zur Kontrolle der Präzipitation. Für den *Input* zeigt sich in der Ponceau-Färbung (Abb. 22A) ein für das Zelllysate unbehandelter HaCaT typisches Bild. Daneben wurden die Eluate nach der jeweiligen IP aufgetragen. Die präzipitierte Proteinmenge im Eluat war gering. Im Eluat der Kontrolle konnte mittels Ponceau-Färbung keine Bande detektiert werden. Im Eluat der G3BP1-Präzipitation zeigte sich eine Bande bei etwa 70 kDa (Pfeilspitze), was der Größe von G3BP1 entspricht. In den Eluaten der ELAVL1- bzw. TIAL1-IP zeigte sich in der Ponceau-Färbung keine Bande. Daneben wurden die Überstände nach der jeweiligen Präzipitation aufgetragen. Hier sollte sich eine dem Input vergleichbare Färbung zeigen, was der Fall ist.

Abb. 22B zeigt dieselbe Membran wie in Abb. 22A nach simultaner Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen G3BP1, ELAVL1 und TIAL1. Es war zu erwarten, dass im Input und in den Eluaten der IPs das jeweils präzipitierte RBP sowie (denaturierte) Antikörper nachweisbar sind. Im zugehörigen Überstand sollte das präzipitierte RBP verringert sein. In *lane 1* wurde jedes dieser RBP spezifisch nachgewiesen (Pfeilspitze: G3BP1; Geschwungene Klammer: TIAL1; Pfeil: ELAVL1). Durch die Präzipitation mit dem Kontrollserum wurden diese RBP nicht angereichert. Gut zu erkennen sind in den Eluaten der Kontrolle sowie der IPs Banden bei etwa 150 kDa (Weißer Stern) sowie etwa 50 kDa und etwa 25 kDa (Schwarze Sterne). Diese entsprechen einem intakten Antikörper bzw. dessen schwerer und leichter Kette. Nach G3BP1-IP zeigt sich eine für die Präzipitation von G3BP1 zu erwartende Bande bei etwa 70 kDa (Pfeilspitze). Im zugehörigen Überstand ist die entsprechende Bande deutlich schwächer. Durch die Präzipitation ist es also gelungen, G3BP1 anzureichern. Nach ELAVL1-IP zeigt sich im Eluat eine Bande bei etwa 35 kDa (Pfeil), was ELAVL1 entspricht. Die entsprechende Bande im Überstand ist im Vergleich zur Kontrolle deutlich schwächer. Es wurde dementsprechend ein Großteil des ELAVL1 isoliert. Die für TIAL1 typische Doppelbande bei etwa 42 kDa und 50 kDa (geschwungene Klammer) zeigt sich im Eluat nach TIAL1-IP ebenso ausgeprägt wie im Input, im entsprechenden Überstand hingegen ist sie kaum zu erkennen. Die Präzipitation von TIAL1 war folglich erfolgreich.

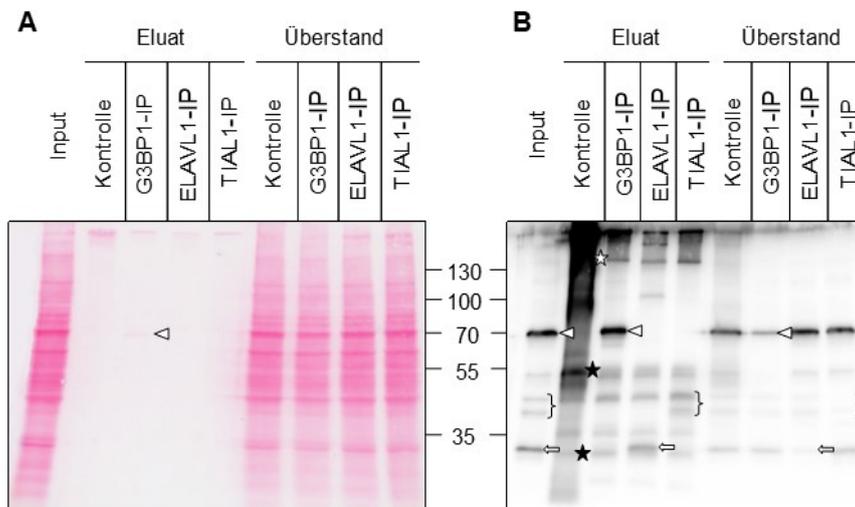


Abb. 22 | Immunpräzipitation von G3BP1, ELAVL1 und TIAL1. Mit Hilfe von an Protein A Agarose gekoppelter Antikörper gegen die entsprechenden RBP wurden diese aus einem Lysat naiver HaCaT-Zellen angereichert. Als Kontrolle diente eine unspezifische Präzipitation. Die in den einzelnen Proben enthaltenen Proteine wurden via SDS-PAGE und Western Blot analysiert. **A)** und **B)** zeigen Färbungen der gleichen Membran. **A)** Die Ponceaufärbung zeigt den Input, die Eluate sowie die Überständen nach der Präzipitation. **B)** Die Membran aus A) wurde zeitgleich mit Antikörpern gegen die drei RBP inkubiert: Maus-anti-G3BP1-AK (Santa Cruz BT), Maus-anti-ELAVL1-AK (Santa Cruz BT), Maus-anti-TIAL1-AK (Santa Cruz BT). Es konnten G3BP1 (68 kDa, **Pfeilspitze**), TIAL1 (42 kDa und 50 kDa, **Klammer**) und ELAVL1 (30 kDa, **Pfeil**) detektiert werden. Im Input wurden alle drei Proteine nachgewiesen. Die RBP zeigen sich in den jeweiligen Eluaten angereichert. Zusätzlich zeigen sich intakte Antikörper (150 kDa, **weißer Stern**) bzw. denaturierte Antikörper (etwa 25 kDa und 50 kDa, **schwarze Sterne**). Angegeben sind Molekulargewichte in kDa. **Abkürzungen:** IP, Immunpräzipitation; ◀, G3BP1; ←, ELAVL1; }, TIAL1; *, (denaturierte) Antikörper.

Aus den Eluaten (Kontrolle, G3BP-IP, ELAVL1-IP, TIAL1-IP) wurde jeweils RNA isoliert und zunächst auf das Vorhandensein bekannter assoziierter mRNAs für das jeweilige RNP untersucht. Tab. 20 stellt die ct-Werte der einzelnen IPs gegenüber. Die MYC-mRNA als ein bekanntes *target* aller drei RBP (Irvine et al. 2004; Liao et al. 2007; Perrone et al. 2012), war im Input als relativ häufige RNA nachweisbar, in der Kontrollpräzipitation aber nahezu nicht vorhanden. Im Eluat der jeweiligen RBP war sie im Vergleich zur Kontrollpräzipitation jedoch deutlich angereichert. Die stärkere Anreicherung in der G3BP1-IP hängt vermutlich mit der größeren Menge des präzipitierten Proteins zusammen (Abb. 22). Ebenso angereichert war die mRNA von *ATP5B* als beschriebenes Target für G3BP1 (Ortega et al. 2010) sowie die *CDH1*-mRNA als Target von ELAVL1 (Yu et al. 2016). Die *TNF*-mRNA ist als Target für TIAL1 beschrieben (Gueydan et al. 1999; Pieczyk et al. 2000). Trotz insgesamt niedriger Expression in HaCaT war sie in der TIAL-IP im Gegensatz zur Kontroll-IP nachweisbar, allerdings mit grenzwertig hohem ct-Wert. Es war also gelungen, bekannte Ziel-mRNAs der RBP durch die Präzipitation anzureichern. Deshalb wurde im Weiteren untersucht, ob dies auch für desmosomale mRNAs galt.

Im Input ließen sich alle getesteten desmosomalen mRNAs nachweisen. Die hohen ct-Werte in der Kontrollpräzipitation zeigten, dass die mRNAs nicht unspezifisch präzipitiert wurden. Nach

Präzipitation von G3BP1 zeigte sich eine deutliche Anreicherung der mRNA von *DSC3*, *DSG2* und *PKP2*, während die *PKP1*-mRNA nicht angereichert war. Etwas geringer war die Anreicherung desmosomaler mRNA nach Präzipitation von ELAVL1, was mit der geringeren Menge an präzipitiertem Protein korreliert (Abb. 22B). Die Anreicherung bewegte sich für die mRNA von *DSC3* und *DSG2* auf vergleichbarem Niveau wie die Anreicherung der *CDH1*-mRNA. In der TIAL1-IP wurden die *DSG2*- und *PKP2*-mRNA sowie in etwas geringerem Umfang auch die *DSC3*-mRNA angereichert. Die *PKP1*-mRNA ließ sich auch in den ELAVL1- und TIAL1-IPs nicht zuverlässig nachweisen.

Tab. 20 | ct-Werte nach Immunpräzipitation. Alle Proben wurden mittels qPCR auf das Vorhandensein verschiedener Transkripte untersucht. Bis auf die *TNF*- und *PKP1*-mRNA waren im Input alle Transkripte exprimiert. Im Eluat der spezifischen Präzipitationen ließen sich die jeweiligen Transkripte in deutlich höherer Konzentration nachweisen als in der Kontrolle. **Abkürzungen:** n.n., nicht nachweisbar; -, keine Daten vorhanden.

	MYC	ATP5B	CDH1	TNF	DSC3	DSG2	PKP1	PKP2
Input	18,26	16,03	16,87	27,41	18,06	16,94	28,52	19,03
Kontrolle	30,81	28,56	31,00	n.n.	33,32	32,71	n.n.	33,44
G3BP1-IP	23,21	19,02	-	-	24,98	22,36	35,00	25,24
ELAVL1-IP	24,37	-	26,85	-	27,80	27,70	34,52	28,09
TIAL1-IP	24,74	-	-	30,58	27,91	25,68	35,00	26,87

In einem weiteren Experiment wurde die Präzipitation von TIAL1 wiederholt. Abb. 23 zeigt einen *Western Blot* zur Kontrolle der Präzipitation. Die Ponceau-Färbung (Abb. 23A) zeigt, dass im Input vor dem Experiment reichlich Proteine vorhanden waren. TIAL1 ließ sich im Input nachweisen (Abb. 23B, geschwungene Klammer) und zeigte sich im Eluat der TIAL1-Präzipitation deutlich angereichert. Im Überstand war TIAL1 entsprechend reduziert. In der Kontroll-IP ergab sich der Verdacht auf eine Anreicherung der größeren TIAL1-Isoform, ohne dass sich hier die typische Doppelbande zeigte. In beiden Eluaten zeigten sich erneut leichte und schwere Ketten denaturierter Antikörper.

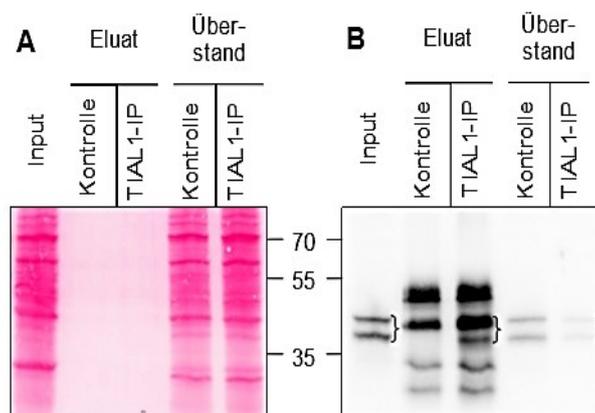


Abb. 23 | Immunpräzipitation von TIAL1. Mit Hilfe von an Protein A Agarose gekoppelter Antikörper wurde TIAL1 aus einem Lysat aus HaCaT-Zellen isoliert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Serum einer nicht immunisierten Maus. **A)** zeigt eine Ponceau-Färbung nach Western Blot. **B)** Auf der Membran aus A) wurde TIAL1 (**Klammer**) angefärbt: Maus-anti-TIAL1-AK (Santa Cruz BT). Angegeben sind Molekulargewichte in kDa. **Abkürzungen:** }, TIAL1.

Erneut wurden die Ansätze auf das Vorhandensein verschiedener mRNAs untersucht. Tab. 21 stellt die ct-Werte der qPCR gegenüber. Alle getesteten mRNAs ließen sich im Input nachweisen. In der TIAL1-IP wurden die mRNA von *MYC*, *DSG2* und *PKP3* angereichert, sowie in geringem Maß auch die *DSC3*-mRNA. Die Anreicherung der *DSC3*-mRNA war vergleichbar der Anreicherung des als *target* beschriebenen TNF. *PKP1*-mRNA konnte weder in der Kontrolle noch nach TIAL1-Präzipitation nachgewiesen werden. Somit wurde das Ergebnis der vorherigen Immunpräzipitation bestätigt.

Tab. 21 | ct-Werte nach TIAL1-Immunpräzipitation. Alle Proben wurden mittels qPCR auf das Vorhandensein verschiedener Transkripte untersucht. Solche von *MYC*, *DSG2* und *PKP2* zeigen sich im Input reichlich vorhanden. Transkripte von *TNF*, *DSC3* und *PKP1* sind deutlich geringer exprimiert. Durch TIAL1-Präzipitation konnten die einzelnen Transkripte im Vergleich zur Kontrolle angereichert werden. *PKP1*-mRNA konnte weder nach TIAL1-IP noch nach Kontroll-IP nachgewiesen werden. **Abkürzungen:** n.n., nicht nachweisbar.

	MYC	TNF	DSC3	DSG2	PKP1	PKP2
Input	17,66	26,43	26,20	16,06	28,07	18,20
Kontrolle	33,95	35,00	n.n	34,37	n.n.	33,92
TIAL1-IP	24,61	32,62	32,10	26,19	n.n.	28,21

Fazit

Eine Anreicherung der RBP G3BP1, ELAVL und TIAL1 durch Immunpräzipitation ermöglichte die Anreicherung bekannter mRNA-targets. In vergleichbarer Menge konnte durch die Präzipitation die mRNA von *DSC3*, *DSG2* sowie *PKP2* angereichert werden, was die Annahme einer direkten Interaktion der RBP mit diesen Transkripten unterstützt. Eine Anreicherung der *PKP1*-mRNA konnte bei geringer Expression nicht direkt nachgewiesen werden.

4.4.5 Der Einfluss von G3BP1 und ELAVL1 auf die Stabilität eines Zellverbandes

In den bisher beschriebenen Experimenten wurde der Einfluss von G3BP1, ELAVL1 und TIAL1 auf die Menge desmosomaler Transkripte und Proteine sowie auf die Desmosomenorganisation und die Lokalisation einiger desmosomaler Proteine analysiert. Die Stärke der Zell-Zell-Adhäsion kann aber nicht nur durch eine direkte Regulation desmosomaler Proteine moduliert werden, sondern auch indirekt beeinflusst werden, indem die RBP Proteine der *Adherens junctions* und/ oder *Tight junctions* beeinflussen oder Signalwege modulieren, die an der posttranslationalen Modifikation desmosomaler Proteine beteiligt sind. Daher wurde ein Pilotexperiment mit einem funktionellen Test durchgeführt, der die Stärke des Zusammenhalts eines Zellverbandes direkt untersucht. Untersucht wurden dabei die Auswirkungen des KD von G3BP1 und ELAVL1 auf die Stabilität des Zellverbandes von HaCaT-Zellen (Abb. 24; Kapitel 3.3.3). TIAL1 wurde aufgrund der geringen KD-Effizienz nicht berücksichtigt. Hierzu wurden siRNA-Pools transfiziert und die Zellen für insgesamt 72 h kultiviert (Abb. 24A). Durch Zugabe der Kollagenase Dispase konnte der intakte Zellverband von der Kulturschale gelöst werden. Die abgelösten *Monolayer* wurden

anschließend mechanischer Belastung durch Rütteln auf einer Rüttelplatte mit 550 rpm ausgesetzt, um die Stabilität zu überprüfen. Getestet wurden jeweils 3 *Monolayer* nach ELAVL1-KD, G3BP1-KD bzw. Transfektion des Kontroll-siRNA-Pools. Bereits nach dem Lösen des *Monolayers* zeigen sich neben einem intakten *Monolayer* vereinzelte kleine Fragmente (Abb. 24B). Durch Rütteln der Kulturschale mit 550 rpm wurden die *Monolayer* einer mechanischen Belastung ausgesetzt. Mit zunehmender Dauer der Belastung stieg die Anzahl der gezählten Fragmente an. Am deutlichsten war dies nach ELAVL1-KD zu beobachten. Es konnten deutlich mehr Fragmente gezählt werden als in der Kontrolle, nach G3BP1-KD waren es etwa nach zwei Minuten etwa so viele Fragmente wie in der Kontrolle, nach zehn Minuten etwas weniger. Festzuhalten ist daher die zu überprüfende Vermutung, dass ein KD von ELAVL1 einen schwächenden Effekt auf den Zusammenhalt eines Zellverbandes hat.

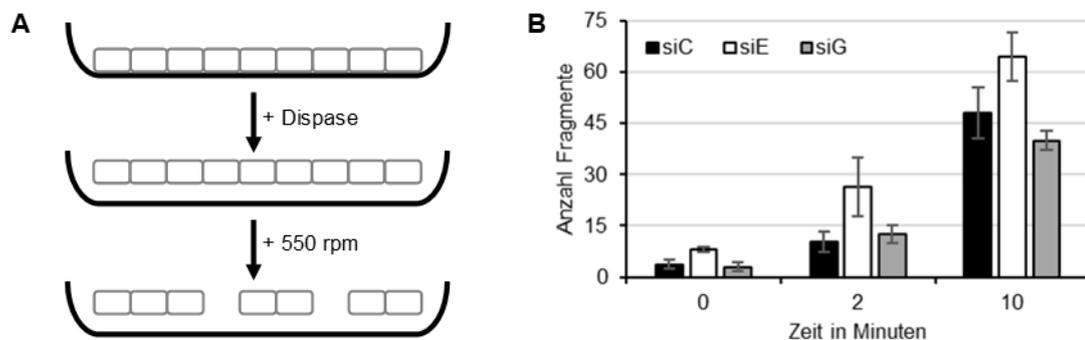


Abb. 24 | HaCaT unter mechanischer Belastung nach RBP-KD. **A)** In einer Kulturschale werden Keratinozyten kultiviert und anschließend durch die Zugabe des Enzyms Dispase als *Monolayer* von dieser gelöst. Unter mechanischer Belastung (Rütteln der Kulturschale auf Rüttelplatte bei 550 rpm) zerfällt dieser in kleinere Fragmente. **B)** Die Zahl dieser Fragmente steigt mit der Dauer der Belastung. Nach ELAVL1-KD zeigen sich zu allen Zeitpunkten mehr Fragmente als in der Kontrolle. Es ergibt sich die Vermutung einer Destabilisierung des Zellzusammenhaltes durch die Abwesenheit von ELAVL1. **Abkürzungen:** C, Kontrolle; E, ELAVL1; G, G3BP1.

5 Diskussion

5.1 Die Eigenschaften desmosomaler Transkripte liefern Indizien für deren posttranskriptionelle Regulation

5.1.1 Transkripte desmosomaler Gene haben eine lange 3'-UTR

Die Länge der 3'-UTR von neun der 12 untersuchten desmosomalen Transkripte ist größer als eine durchschnittliche humane 3'-UTR (Pesole et al. 2001), was eine Vielzahl von Zielsequenzen für mögliche Interaktionspartner erwarten lässt. Alleiniger Prädiktor der Regulation eines Transkripts scheint die Länge der 3'-UTR allerdings nicht zu sein (Pesole et al. 2001; Lee et al. 2010). Lee et al. (ebd.) stellten fest, dass die Länge einer 3'-UTR nur gering signifikant mit der Halbwertszeit der mRNA korreliert und schreiben speziellen Nukleotidsequenzen größere regulatorische Bedeutung zu. Mayr (2017) merkte an, dass mit zunehmender Länge einer 3'-UTR auch die Zahl intramolekularer Interaktionen zunehme und potentielle Bindungsstellen hierdurch nicht zugänglich seien. Sie verwies auf das Potential der Expression alternativer 3'-UTRs, wodurch unterschiedliche Bindungspartner Zugang zur mRNA erhielten (ebd.). Für die 3'-UTR der *JUP*-, *DSC1*-, *DSC2*- und *DSC3*-mRNA sind kürzere Varianten beschrieben. In der 3'-UTR der *DSG1*- und *DSG2*-mRNA finden sich mehrere putative APAs. Eine Regulation über alternatives *splicing* und alternative Polyadenylierung scheint hier eine Möglichkeit darzustellen. Schmidt et al. (1997) zeigten zwar, dass sich durch alternatives *splicing* im codierenden Bereich entstandene Isoformen des PKP1-Proteins in ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle unterscheiden (desmosomal vs. nukleär), was eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung nahelegt. Weiterhin wurden für PKP1 zwei Transkripte mit unterschiedlichen 3'-UTR nachgewiesen (Heid et al. 1994; Hatzfeld et al. 1994). Bisher sind allerdings weder die funktionelle Bedeutung noch Expressionsunterschiede systematisch untersucht worden. Eine systematische Analyse der Expression unterschiedlicher Transkripte in verschiedenen humanen Zelllinien oder eine differenzierungsabhängige Expression in der Epidermis könnten neue Erkenntnisse über die posttranskriptionelle Regulation desmosomaler Gene liefern und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.1.2 Transkripte desmosomaler Gene haben eine lange HWZ

Gezielte Untersuchungen zu den HWZ desmosomaler Transkripte fehlen bislang ebenfalls. Die aus der Datenbank AURA ermittelten HWZ, deuten für desmosomale Transkripte eine überdurchschnittlich lange HWZ an, was für eine Dominanz stabilisierender Faktoren sprechen könnte. Zum Vergleich dienten in verschiedenen Zelllinien ermittelte durchschnittliche mRNA-HWZ. Hierbei ist zu beachten, dass die Zellen eines epithelialen Tumors HeLa den Charakter eines phy-

siologischen Epithels verloren haben und B-Lymphozyten sowie C2C12-Myoblasten keine Desmosomen ausbilden, was die Information der in den zitierten Arbeiten ermittelten durchschnittlichen HWZ in Bezug auf die desmosomalen Transkripte einschränkt.

Die HWZ einer mRNA wird nicht ausschließlich über deren Länge bestimmt, sondern ist erheblich durch deren Bindungspartner wie z.B. RBP beeinflusst und damit abhängig vom Zelltyp, der Differenzierung einer Zelle, intra- und extrazellulären Stressfaktoren wie z.B. Nährstoffmangel, mechanischer Belastung oder Entzündungen (Pesole et al. 2001). Lee et al. (2010) stellten fest, dass sich die HWZ gleicher Transkripte in verschiedenen Zelllinien unterscheiden. So seien mRNAs, die mit *Adhäsion* assoziiert sind, in C2C12-Zellen stabiler als solche, die mit *Translation* assoziiert werden, wohingegen dieses Verhältnis in murinen pluripotenten embryonalen Stammzellen umgekehrt sei (ebd.). Keratinozyten durchlaufen auf ihrem Weg vom *Stratum basale* der Epidermis zum *Stratum corneum* eine Veränderung von einer adulten Stammzelle zu einem reifen Keratinozyten und auch die Zusammensetzung der Desmosomen unterliegt während dieser Wanderung mehreren Veränderungen (Kottke et al. 2006). Es ist daher anzunehmen, dass auch die HWZ desmosomaler Transkripte variiert. Dazu könnte einerseits die differentielle Expression von Transkripten mit unterschiedlichen 3'-UTR beitragen und andererseits auch die unterschiedliche Expression von RBPs.

5.1.3 Transkripte desmosomaler Gene bergen zahlreiche regulatorische Sequenzen

AU-reiche Elemente

Zu den bekannten regulatorischen Sequenzen in Transkripten gehören die ARE, welche sowohl mit dem verstärkten Abbau eines Transkripts assoziiert sein können als auch mit einem Einfluss auf dessen Translation und damit mit einer gesteigerten oder reduzierten Proteinexpression (Barreau et al. 2005). Die Transkripte der Interleukine sind bekannt für ihre Regulation über ARE (ebd.). Die in Phasen der Zellhomöostase kurzlebigen Transkripte werden unter Stressbedingungen durch zahlreiche RBP über ARE stabilisiert (ebd.). In der 3'-UTR der *IL2*- und *IL3*-mRNA finden sich zahlreiche, räumlich dicht beieinander gelegene Klasse-I-ARE. Eine ähnliche Häufung konnte in der 3'-UTR der *DSC2*-mRNA gezeigt werden und deutete sich in der 3'-UTR der *DSG2*- und *PKP2*-mRNA an. Eine Regulation dieser drei Transkripte ist daher anzunehmen. Die geringe Zahl an ARE in der 3'-UTR der *JUP*- und *PKP1*-mRNA lässt eine Regulation über diese sehr unwahrscheinlich erscheinen.

G-Quadruplex Strukturen

Nukleotidsequenzen, die sich zu dreidimensionalen GQS zusammenlagern könnten, finden sich in der 3'-UTR nahezu aller Transkripte desmosomaler Gene. Besonders gehäuft sind sie in der 3'-UTR der *DSC3*- und *PKP1*-mRNA. Welche Proteine mit den Transkripten desmosomaler

Gene über GQS interagieren und auf welche Weise diese dadurch reguliert werden, ist bisher noch nicht bekannt. Das den Plakophilinen 1 - 3 verwandte Protein Plakophilin 4 ist u.a. an der Ausbildung von *Adherens junctions* und der Regulation der Aktivität der GTPase RHOA (*Ras homolog family member A*) beteiligt (Wolf et al. 2006). Die Translation der *PKP4*-mRNA wird durch FMRP inhibiert, wobei das RBP an einen G-reichen Abschnitt in der 3'-UTR der *PKP4*-mRNA bindet, welcher auch potenzielle GQS enthält (Nolze et al. 2013). Da FMRP solche Strukturen mit hoher Affinität binden kann, vermuteten die Autoren eine Interaktion des RBP mit der *PKP4*-mRNA über eben diese (Nolze et al. 2013; Kharel et al. 2020). Auch das dem FMRP verwandte FXR1 bindet GQS (Bensaid et al. 2009; Kharel et al. 2020). Auch eine Regulation der Transkripte desmosomaler Gene durch die Bindung von RBP an GQS ist denkbar. So konnte eine Stabilisierung der *PKP2*-mRNA durch FXR1 nachgewiesen werden (Hofmann et al. 2006; Fischer-Kešo et al. 2014). Zwar ist der genaue Mechanismus hierfür noch nicht bekannt, in der 3'-UTR der *PKP2*-mRNA finden sich allerdings auch mögliche GQS. Ebenso wird vermutet, G3BP1 erkenne seine *targets* strukturabhängig (Irvine et al. 2004) und es wurde gezeigt, dass es den Abbau hoch strukturierter RNAs vermittelt (Fischer et al. 2020).

Weitere regulatorische Elemente

In der 3'-UTR dreier desmosomaler Transkripte fanden sich Alu-Elemente. Durch welche RBP diese gebunden werden und welche funktionellen Konsequenzen sich aus möglichen Interaktionen ergeben ist bisher ungeklärt. Lee et al. (2010) beschrieben Nukleotidsequenzen, die mit einer langen bzw. kurzen HWZ assoziiert waren. Trotz der überdurchschnittlich langen HWZ der meisten Transkripte desmosomaler Gene, fanden sich in deren 3'-UTR deutlich mehr destabilisierende als stabilisierende Elemente. Vor allem die Transkripte der desmosomalen Cadherine, *DSP* und *PKP2* wiesen dabei eine ähnlich große Anzahl destabilisierender Elemente auf, wie die ARE in der 3'-UTR der *IL2*- und *IL3*-mRNA. Eine regulatorische Relevanz ist daher denkbar, es bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen, um diese zu bestätigen oder näher zu beschreiben.

5.2 Desmosomale Transkripte interagieren mit einer Vielzahl an RBP

Überdurchschnittlich lange 3'-UTR, überdurchschnittlich lange HWZ sowie zahlreiche regulatorische Elemente legen eine Regulation desmosomaler Transkripte nahe. Um einen ersten Eindruck zu erlangen, wie viele und welche RBP potenziell mit desmosomalen Transkripten interagieren, wurden die Datenbanken AURA, EONCORI, POSTAR2 und ATTRACT nach Angaben zu entsprechenden Interaktionen durchsucht. Für eine Interaktion mit desmosomalen Transkripten konnten zahlreiche RBP als potenzielle Interaktionspartner eruiert werden. Dass die Datenbanken ENCORI und POSTAR2 dabei eine deutlich größere Anzahl an RBP als die Datenbank AURA aufführen, liegt zum einen in dem deutlich größeren Datenvolumen von ENCORI und POSTAR gegenüber AURA begründet, zum anderen konnte die Befragung von AURA jeweils

auf die 3'-UTR begrenzt werden, die Ergebnisse aus ENCORI und POSTAR2 können sich auf Interaktionen innerhalb der gesamten mRNA beziehen. Für die Transkripte von *DSCI*, *DSGI*, *DSG3* und *DSG4* fanden sich in allen Datenbanken kaum Angaben. Die in den Referenzen der einzelnen Datenbanken angegebenen Untersuchungen wurden meist in HeLa- oder HEK293-Zellen durchgeführt, welche die genannten desmosomalen Cadherine nicht exprimieren (<https://www.proteinatlas.org>; letzter Abruf 30.08.2020). Entsprechend kann aus dem Fehlen von Interaktionsdaten nicht auf das Fehlen solcher Interaktionen oder einer Regulation geschlossen werden. Erwartungsgemäß fanden sich in den Datenbanken für die Transkripte mit einer langen 3'-UTR zahlreiche potenzielle Bindungspartner, allerdings ebenso für solche mit einer vergleichsweise kurzen 3'-UTR. Dass sich für die *PKP1*-mRNA trotz langer 3'-UTR kaum potenzielle Bindungspartner zeigten, könnte in der fehlenden Expression des Proteins in o.g. untersuchten Zelllinien begründet sein (ebd.). Beim Vergleich potenzieller Bindungspartner innerhalb der Genfamilien (Desmocolline, Desmogleine, Plakophiline) zeigten sich nur sehr wenige Übereinstimmungen. Aufgrund ihrer individuellen Expression innerhalb der Schichten der Epidermis und einzelnen Gewebearten, würde man allerdings auch keine gemeinsame Regulation erwarten. Derselbe Vergleich innerhalb funktioneller Gruppen (Zuordnung anhand der Expression in den verschiedenen Schichten der Epidermis) zeigte dagegen zahlreiche Gemeinsamkeiten. Eine ähnliche Regulation der Transkripte innerhalb einer solchen Gruppe scheint vor allen für die Keratinozyten naheliegend. Auf ihrem Weg durch die verschiedenen Schichten der Epidermis unterliegt die Zusammensetzung der Desmosomen mehreren Veränderungen (Kottke et al. 2006). Eine parallele Hemmung bzw. Förderung der Expression mehrerer desmosomaler Gene könnte posttranskriptionell über spezielle Gruppen von RBP reguliert sein. Trotz der fortwährenden Präzisierung der Hochdurchsatzverfahren, deren Informationen die Datenbanken sammeln, können falsch positive Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Gerade durch die Induktion von Bindungen zwischen Proteinen und benachbarten Nukleinsäuren können auch benachbarte Strukturen ohne Bindung unter physiologischen Bedingungen, assoziiert erscheinen (Ule et al. 2005; Zhang et al. 2015). Es ist allerdings essenziell, die funktionelle Bedeutung einer Interaktion zwischen den potenziellen Interaktionspartnern und einzelnen Transkripten zu validieren. Die hier vorgestellten Ergebnisse können als Anregung für eine solche systematische Untersuchung der Regulation desmosomaler Transkripte durch RBP verstanden werden.

5.3 Experimentelle Untersuchungen offenbaren weitere Hinweise auf eine Regulation desmosomaler Transkripte durch RBP

Auf der Grundlage einer zu Beginn der Arbeiten durchgeführten Datenbankenanalyse wurden für erste Pilotexperimente die RBP ELAVL1, und TIAL1 ausgewählt, um weitere Hinweise für die posttranskriptionelle Regulation desmosomaler Transkripte zu sammeln. Aufgrund publizierter Hinweise auf eine Regulation der DSP- und PKP2-mRNA (Fischer-Kešo et al. 2014) durch

G3BP1 wurde dieses RBP ebenfalls für die experimentellen Untersuchungen ausgewählt. Die angewandten Methoden ermöglichten eine Analyse des Einflusses der RBP auf die Menge desmosomaler Proteine bzw. die Menge der mRNA entsprechender Gene. Insgesamt sind die beobachteten Effekte gering und erlauben daher keine eindeutigen Schlussfolgerungen. Ein Grund könnte darin liegen, dass das Zeitfenster zwischen einer erheblichen Reduktion des RBP durch *knockdown* und Einfluss auf die Ziel-RNA aufgrund einer möglicherweise langen HWZ nicht ausreichend groß war. Zudem ist es möglich, dass verwandte Proteine mit überlappender Funktion (ELAVL1 und ELAVL2, TIAL1 und TIA1) sich gegenseitig ersetzen können und dadurch ein möglicher Effekt weiter verringert wird (Meyer et al. 2018). Regulatorische Einflüsse ohne Auswirkung auf die Menge des jeweiligen Transkripts bzw. des codierten Proteins entziehen sich zudem den Beobachtungen. Durch die Immunfluoreszenzfärbungen konnten Änderungen der Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle sowie eine Verteilung der Desmosomen beobachtet werden. Für die Beurteilung ultrastruktureller Veränderungen der Desmosomen wären z.B. elektronenmikroskopische Untersuchungen notwendig. Die Kulturbedingungen lieferten den Zellen stets ein homöostatisches Milieu, unter dem sie eine vorwiegend einschichtige Zellkultur bildeten. Da die Genregulation oft eine Reaktion auf intra- bzw. extrazelluläre Reize darstellt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Einflüsse eines RBP unter Stressbedingungen verstärkt bzw. abgeschwächt würden (Müller et al. 2021). Von den vorwiegend in suprabasalen Zellen mehrschichtiger Epithelien exprimierten desmosomalen Genen wurde in den beschriebenen Experimenten lediglich *PKP1* untersucht. Doch gerade die Variation der Zusammensetzung der Desmosomen in den einzelnen Schichten der Epidermis lässt die Komplexität der Regulation desmosomaler Gene erahnen. Grundsätzlich können humane Keratinozyten (allerdings nicht HaCaT) in einer 3D-Kultur vollständig differenzieren, während sie in einer wie hier verwendeten 2D-Kultur nur die ersten Differenzierungsschritte durchlaufen (Rikken et al. 2020). Dadurch lässt sich die mehrschichtige Epidermis nachbilden (ebd.). HaCaT-Zellen sind hierzu ungeeignet (Maas-Szabowski et al. 2003; Rikken et al. 2020). Eine solche 3D-Kultur benötigt einen feeder layer, eine Schicht aus bestrahlten Fibroblasten, um ein Anheften und Wachsen der Keratinozyten zu verbessern. Sie muss auf einer höhenverstellbaren Trägerplatte erfolgen, um die Differenzierung der Keratinozyten an einer Luft-Flüssigkeits-Grenze zu einem Hautmodell zu ermöglichen. In einem solchen Modell könnten differenzierungsabhängige Prozesse der posttranskriptionellen Regulation besser untersucht werden.

Eine Untersuchung der Auswirkungen der RBP-KD auf die Menge von DSP gelang durch die SDS-PAGE mit anschließendem *semidry western blotting* aufgrund der Größe des Proteins (332 kDa) trotz mehrfacher Modifikation des Protokolls nicht.

5.3.1 ELAVL1 als möglicher Regulator desmosomaler Transkripte

Eine Datenbank gestützte Analyse regulatorischer Elemente in den 3'-UTR desmosomaler Transkripte ließ eine Interaktion des RBP ELAVL1 mit nahezu allen desmosomalen Transkripten vermuten. Darauf wies auch das Vorhandensein von ARE in den 3'-UTR der *DSC2*-, *DSG2* und *PKP2*-mRNAs hin. Nach siRNA-vermitteltem ELAVL1-KD in HaCaT- und MCF7-Zellen deuteten sich leichte Veränderungen der Transkript- und Proteinmengen an, die aber statistisch nur teilweise signifikant waren. So könnten die gesteigerte Menge von *DSG2*-mRNA- und Protein nach KD eine Destabilisierung der *DSG2*-mRNA durch ELAVL1 andeuten. Neben den zahlreichen *targets*, die durch ELAVL1 stabilisiert werden (Schultz et al. 2020), sind auch solche beschrieben, die durch das RBP destabilisiert werden (Hu et al. 2020; Cammas et al. 2014). Ergebnisse der Datenbankenanalyse sowie Anzahl und räumliche Häufung von ARE in der 3'-UTR der *DSG2*-mRNA unterstützen eine mögliche Interaktion dieser mit ELAVL1. Eine tendenziell gesteigerte Menge des PKP1-Proteins bei minimal reduzierter mRNA-Menge könnte einerseits durch den Wegfall eines hemmenden Einflusses auf die Translation der *PKP1*-mRNA nach ELAVL1-KD erklärt werden, andererseits akkumuliert PKP1 in den Desmosomen der Keratinozyten und Schwankungen in der Ausbildung von Zellkontakten etwa durch ungleiche Zelldichte können sich in Schwankungen der Proteinmenge zeigen. ELAVL1 ist bekannt für die Bindung an ARE, doch in der 3'-UTR der *PKP1*-mRNA findet sich kein klassisches Klasse-I-ARE und auch die durchgeführte IP ergab keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion von ELAVL1 mit der *PKP1*-mRNA. Allerdings enthält die 3'-UTR zahlreiche nicht klassische AU-reiche Sequenzen, sowie das für eine ELAVL1-Bindung beschriebene U-Heptamer (Lebedeva et al. 2011). Da auch die Datenbanken ENCORI, POSTAR2 und ATTRACT die *PKP1*-mRNA als potenzielles ELAVL1-*target* aufführen, kann eine Regulation auf der Basis der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden.

Als einziges nicht als potenzielles ELAVL1-*target* aufgeführt wird in den Datenbanken die *PKP3*-mRNA. Die beobachtete leichte Reduktion dieser nach ELAVL1-KD bei gleichbleibender Proteinmenge war daher unerwartet und scheint daher eher auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen zu sein als auf eine tatsächliche Regulation. Zudem erscheint eine direkte Bindung durch das RBP unwahrscheinlich, da sich in der 3'-UTR der *PKP3*-mRNA keine ARE finden. Ein indirekter Einfluss z.B. über die Bindung an oder die Regulation durch ein weiteres Protein kann nicht ausgeschlossen werden.

Techasintana et al. (2015) identifizierten etwa 2000 indirekte ELAVL1-*targets* in murinen CD4⁺ TH2-Zellen (den CD4-Rezeptor exprimierende Typ-2-T-Helferzellen) durch Analysen der in einer ELAVL1-IP präzipitierten RNA. Unter den indirekten ELAVL1-*targets* finden sich *Pkp3* und *Dsp* (ebd.). Unter den 271 direkten in-vivo *targets* findet sich kein desmosomales Gen, was

am Ehesten durch den nichtepithelialen Charakter der Zellen und der fehlenden Desmosomenbildung zu erklären sei dürfte.

Um der Frage nachzugehen, ob einzelne Transkripte desmosomaler Gene direkt durch ELAVL1 reguliert werden, wurde das RBP aus einem HaCaT-Lysat präzipitiert. Dabei konnte eine Anreicherung der bekannten *targets* MYC und CDH1 im Eluat nachgewiesen werden. Die Copräzipitation der mRNAs von *DSC3*, *DSG2* und *PKP2* unterstützte die Annahme einer Regulierung dieser Transkripte durch ELAVL1. Für eine sichere Evidenz und eine statistische Auswertung der Anreicherung bedarf es allerdings einer mehrfachen Reproduktion dieser Ergebnisse.

Ein *Dispase-Assay* deutete einen positiven Einfluss von ELAVL1 auf die Stabilität eines Zellverbandes an. Die Limitierung dieses Experiments besteht in der exakten Bestimmung der aus dem *Monolayer* gelösten Fragmente. Diese ist bei der gewählten Aufnahmetechnik nur näherungsweise möglich. Unerkannt blieben kleinste Zellverbände oder einzelne Zellen, die sich unter der mechanischen Belastung ablösten. Nach ELAVL1-KD zeigte sich die Menge desmosomaler Proteine weitgehend nicht signifikant verändert, oder tendenziell gesteigert. In welchem Zusammenhang diese quantitativen Veränderungen desmosomaler Proteine zu den funktionellen Veränderungen stehen gilt es zu klären. Die Beobachtungen bedürfen daher einer weiteren Validierung. Sie werden jedoch gestützt durch die Untersuchungen von Yu et al. (2016), die eine herabgesetzte Barrierefunktion eines Epithels nach ELAVL1-KD beobachteten, welche sie auf die Regulation der *CDH1*-mRNA durch das RBP zurückführen konnten.

Es lässt sich festhalten, dass *in silico* Analysen nahezu alle desmosomalen Transkripte als potenzielle *targets* des RBP ELAVL1 beschreiben. Ein siRNA-vermittelter KD deutete Einflüsse auf desmosomale Transkripte an. Durch Co-Präzipitation des RBP mit der mRNA von *DSC3*, *DSC2* und *PKP2* konnte die vermutete Interaktion experimentell bekräftigt werden. Neben der bereits zuvor beschriebenen Bedeutung für die Barrierefunktion eines Epithels deutete sich in dieser Arbeit ein förderlicher Einfluss auf die Stabilität eines Zellverbandes an. ELAVL1 lokalisiert vorwiegend im Zellkern und wird in Phasen des Zellstress ins Zytoplasma verlagert, um dort entsprechende Zieltranskripte zu binden (Kim und Gorospe 2008; Grammatikakis et al. 2017). Ein Einfluss auf die posttranskriptionelle Regulation desmosomaler Transkripte in Keratinozyten könnte also auch durch Verletzungen oder inflammatorische Dermatosen verstärkt werden.

5.3.2 G3BP1 als möglicher Regulator desmosomaler Transkripte

Hohe Standardabweichungen sowie geringe Unterschiede der relativen Protein- bzw. RNA-Menge nach G3BP1-KD im Vergleich zu mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfizierten

Zellen erschweren eine Beurteilung der Beobachtungen. Dennoch soll versucht werden einige Hinweise auf eine Regulation desmosomaler Gene durch G3BP1 einzuordnen.

In HaCaT und MCF7 ergab sich nach G3BP1-KD der Anhalt für eine Reduktion sowohl der *PKP2*-mRNA als auch des PKP2-Proteins. Unterstützt wird die Annahme einer Regulation der PKP2-Expression durch einen Anstieg der *PKP2*-mRNA nach Überexpression des RBP in HeLa-Zellen sowie die Anreicherung der *PKP2*-mRNA in der G3BP1-IP. Die *PKP2*-mRNA scheint durch G3BP1 stabilisiert zu werden. In welchem Zusammenhang dies zu der bekannten Stabilisierung der *PKP2*-mRNA durch FXR1 und PKP3 steht, ist bisher ungeklärt (Hofmann et al. 2006; Fischer-Kešo et al. 2014). Auch die *DSG2*- und *DSC3*-mRNA konnten in der G3BP1-IP angereichert werden. In HaCaT zeigten sich *DSG2*-mRNA und Protein nach G3BP1-KD allerdings unverändert, während sich allerdings bei hohen Schwankungen eine leichte Reduktion der *DSC3*-mRNA anzudeuten schien. Letzteres könnte über eine direkte Bindung und Degradation des Transkripts erfolgen. Die 3'-UTR der *DSC3*-mRNA bietet hierzu aufgrund ihrer Länge zahlreiche Möglichkeiten.

Bei unveränderter Proteinmenge und geringem Anstieg der mRNA-Menge deutete sich nach G3BP1-KD in der Immunfluoreszenzfärbung eine Akkumulation von PKP1 im Zellkern an. Eine fehlende Anreicherung der *PKP1*-mRNA in der G3BP1-IP spricht gegen eine direkte Regulation des Transkripts. Stattdessen könnte der Einfluss von G3BP1 auf intrazelluläre Signalwege (Alam und Kennedy 2019) eine posttranslationale Modifizierung von PKP1 induzieren, welche die Lokalisation des Adhärenzproteins ändert. Eine mögliche Verbindung beider Proteine könnte über den PI3K/AKT-Signalweg bestehen (Phosphoinositid-3-Kinase, Proteinkinase B). Eine Phosphorylierung von Pkp1 durch Akt2 führt in Mauskeratinozyten zu einer Verlagerung des Pkp1 von der Zellmembran ins Zytoplasma, was mit einer Funktionsänderung einhergeht (Wolf et al. 2013; Müller et al. 2021). G3BP1 wurde als Aktivator der AKT in Magenkarzinomen beschrieben, in denen das RBP mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Min et al. 2015; Zhao et al. 2021; Ge et al. 2022).

5.4 TIAL1 als möglicher Regulator desmosomaler Transkripte

Aufgrund der relativen Häufung von ARE in der 3'-UTR der *DSC2*-, *DSG2* und *PKP2*-mRNA sowie dem Vorhandensein putativer alternativer *splicing sites* in der mRNA von *JUP*, *DSC1*, *DSC2*, *DSC3* und *PKP1* und APAs in der mRNA von *DSG1* und *DSG2*, können diese Transkripte als potenzielle TIAL1-*targets* angenommen werden. Die Datenbankenanalyse unterstützt diese Überlegungen und fügt *DSP* als mögliches *target* hinzu. Ein siRNA-vermittelter TIAL1-KD war nicht sehr effizient und führte nur zu einer mäßigen Reduktion von *TIAL1*-mRNA und Protein.

Es ist deshalb zu erwarten, dass Auswirkungen auf die Regulation eines potenziellen *targets* gering ausgeprägt sind oder sich einer Beobachtung gänzlich entziehen. Zudem weisen die verwandten Proteine TIAL1 und TIA1 nicht nur eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf (Übereinstimmung in Primärsequenz etwa 76 %), sie teilen auch zahlreiche Funktionen. Auswirkungen zeigten sich zum Teil erst bei einem Fehlen beider Proteine (Meyer et al. 2018). Mögliche funktionell relevante Interaktionen von TIAL1 mit Transkripten desmosomaler Gene könnten daher trotz TIAL1-KD durch Übernahme der Funktion durch TIA1 verschleiert werden. Die Expressionsanalysen weisen auf einen möglichen negativen Einfluss von TIAL1 auf die mRNA von *DSG2*, *PKP1*, *PKP2* und *PKP3* hin, allerdings bei unverändertem Proteinlevel. Zahlreiche ARE in der 3'-UTR sowie die Ergebnisse der Immunpräzipitation legen eine Interaktion von TIAL1 mit der *DSG2*- und *PKP2*-mRNA nahe. Ob die nach TIAL1-KD beobachtete Reduktion von *DSC2* und *DSC3* bei gleichbleibender mRNA-Menge etwa über einen Einfluss auf die Translation dieser Transkripte vermittelt wird (Kim et al. 2007), gilt es weiter zu prüfen. Datenbankenanalysen legen beide Transkripte als potenzielle *targets* von TIAL1 nahe und auch das Vorhandensein putativer alternativer *splicing sites* unterstützt diese Annahme. Es ergab sich zudem der Anhalt für eine direkte Interaktion des RBP mit der *DSC3*-mRNA.

6 Zusammenfassung

Desmosomen sind Multiproteinkomplexe, die Gewebestabilität und Zellintegrität vermitteln und deren Bestandteile darüber hinaus an zahlreichen intrazellulären Prozessen beteiligt sind. Dabei unterliegen sowohl die Zusammensetzung eines Desmosoms als auch die Expression seiner Bestandteile zahlreichen Regulierungen. Über die posttranskriptionelle Regulation der Expression desmosomaler Gene durch RBP ist bisher wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit liefert einen ersten systematischen Überblick über Indizien, die für eine posttranskriptionelle Regulation sprechen. Dazu wurden (1) die 3'-UTR desmosomaler Transkripte auf regulatorische Sequenzen hin untersucht, (2) Datenbanken nach RBPs als potenzielle Regulatoren desmosomaler Transkripte durchsucht und (3) erste Pilotexperimente für drei Kandidaten RBP durchgeführt. Dabei konnten Hinweise auf eine Regulation desmosomaler Transkripte durch die RBP ELAVL1, G3BP1 und TIAL1 gewonnen werden.

Die meist überdurchschnittlich langen 3'-UTR desmosomaler Transkripte enthalten zahlreiche potenziell regulatorische Sequenzen. Aufgrund der großen Länge lässt sich allerdings auch eine komplexe Sekundärstruktur vermuten, die solche Sequenzen unzugänglich machen, gleichzeitig aber auch weitere Bindungsmotive schaffen kann. Datenbankenanalysen offenbarten eine Vielzahl von möglichen Assoziationen von RBP mit Transkripten desmosomaler Gene. Ähnlichkeiten der beschriebenen potenziellen Interaktionspartner fanden sich vor allem innerhalb funktioneller Gruppen desmosomaler Gene, was die Annahme einer ähnlichen Regulation bei ähnlichen Expressionsmustern unterstützt. In Pilotexperimenten deuteten sich Hinweise auf eine Regulation desmosomaler Transkripte durch die RBP ELAVL1, G3BP1 und TIAL1 an. Aufgrund der geringen Zahl an Replikaten sowie hohen Standardabweichungen sind relevante Änderungen in der Transkript- oder Proteinmenge nicht abschließend zu bewerten. Die hier erhobenen Daten bedürfen einer weiteren Validierung und Optimierung der Protokolle. Eine Protein-RNA-Coimmunpräzipitation für die RBP ELAVL1, G3BP1 und TIAL1 lieferte weitere, unterstützende Hinweise. Für alle drei RBPs konnten bekannte Zieltranskripte im Immunpräzipitat nachgewiesen werden, während sie in einer Kontroll-Immunpräzipitation mit unspezifischem Antikörper nicht detektiert werden konnten. *DSC3*, *DSG2* und *PKP2*-Transkripte wurden mit allen drei RBPs assoziiert gefunden, während *PKP1*-Transkripte in keiner der IPs nachgewiesen wurden. Ein zuvor beschriebener stärkender Einfluss von ELAVL1 auf den Zusammenhalt eines Zellverbandes konnte nachvollzogen werden.

In Zusammenschau aller Ergebnisse ergeben sich aus dieser Arbeit zahlreiche Hinweise auf eine posttranskriptionelle Regulation desmosomaler Transkripte und damit Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen zur posttranskriptionellen Regulation der Expression von desmosomalen Transkripten bzw. Proteinen.

7 Literaturverzeichnis

- Abdelmohsen K, Kuwano Y, Kim HH, Gorospe M (2008) Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biological chemistry* 389:243–255. doi:10.1515/BC.2008.022
- Abel Y, Rederstorff M (2015) Gene Expression Knockdown by Transfection of siRNAs into Mammalian Cells. In: Rederstorff M (Hrsg) *Small Non-Coding RNAs*. Springer New York, New York, NY, S 199–202
- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK (2003) RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:657–685. doi:10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003
- Aigner K, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Dampier B, Bonn e S, van Roy F, Mikulits W, Schreiber M, Brabletz T, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A (2007) The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) represses Plakophilin 3 during human cancer progression. *FEBS letters* 581:1617–1624. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.026
- Alam U, Kennedy D (2019) Rasputin a decade on and more promiscuous than ever? A review of G3BPs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1866:360–370. doi:10.1016/j.bbamcr.2018.09.001
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K: *Molecular Biology of the Cell.*, 5th Taylor and Francis, London, 2007.
- Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR (1991) Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 67:869–877. doi:10.1016/0092-8674(91)90360-B
- Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, Andl C, Stanley JR (2000) Toxin in bullous impetigo and staphylococcal scalded-skin syndrome targets desmoglein 1. *Nat Med* 6:1275–1277. doi:10.1038/81385
- Amar LS, Shabana A-HM, Oboeuf M, Martin N, Forest N (1999) Involvement of Desmoplakin Phosphorylation in the Regulation of Desmosomes by Protein Kinase C, in HeLa Cells. *Cell Adhesion and Communication* 7:125–138. doi:10.3109/15419069909034396
- Anderson P, Kedersha N (2002) Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell stress & chaperones* 7:213–221. doi:10.1379/1466-1268(2002)007<0213:vstroe>2.0.co;2
- Aoyama Y, Owada MK, Kitajima Y (1999) A pathogenic autoantibody, pemphigus vulgaris-IgG, induces phosphorylation of desmoglein 3, and its dissociation from plakoglobin in cultured keratinocytes. *Eur. J. Immunol.* 29:2233–2240. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199907)29:07<2233::AID-IMMU2233>3.0.CO;2-4
- Armstrong DK, McKenna KE, Purkis PE, Green KJ, Eady RA, Leigh IM, Hughes AE (1999) Haploinsufficiency of desmoplakin causes a striate subtype of palmoplantar keratoderma. *Human molecular genetics* 8:143–148. doi:10.1093/hmg/8.1.143
- Arnemann J, Sullivan KH, Magee AI, King IA, Buxton RS (1993) Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis. *Journal of cell science* 104 (Pt 3):741–750. doi:10.1242/jcs.104.3.741
- Barreau C, Paillard L, Osborne HB (2005) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic acids research* 33:7138–7150. doi:10.1093/nar/gki1012
- Batzer MA, Deininger PL (2002) Alu repeats and human genomic diversity. *Nat Rev Genet* 3:370–379. doi:10.1038/nrg798

- Beck ARP, Miller IJ, Anderson P, Streuli M (1998) RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:2331–2336. doi:10.1073/pnas.95.5.2331
- Behrens J, Kries JP von, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996) Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382:638–642. doi:10.1038/382638a0
- Bensaid M, Melko M, Bechara EG, Davidovic L, Berretta A, Catania MV, Gecz J, Lalli E, Bardoni B (2009) FRAXE-associated mental retardation protein (FMR2) is an RNA-binding protein with high affinity for G-quartet RNA forming structure. *Nucleic acids research* 37:1269–1279. doi:10.1093/nar/gkn1058
- Bierkamp C, McLaughlin K, Schwarz H, Huber O, Kemler R (1996) Embryonic Heart and Skin Defects in Mice Lacking Plakoglobin. *Developmental Biology* 180:780–785. doi:10.1006/dbio.1996.0346
- Boivin V, Faucher-Giguère L, Scott M, Abou-Elela S (2019) The cellular landscape of mid-size noncoding RNA. *WIREs RNA* 10. doi:10.1002/wrna.1530
- Bonné S, van Hengel J, Nollet F, Kools P, van Roy F (1999) Plakophilin-3, a novel armadillo-like protein present in nuclei and desmosomes of epithelial cells. *Journal of cell science* 112 (Pt 14):2265–2276. doi:10.1242/jcs.112.14.2265
- Bosveld F, Markova O, Guirao B, Martin C, Wang Z, Pierre A, Balakireva M, Gaugue I, Ainslie A, Christophorou N, Lubensky DK, Minc N, Bellaïche Y (2016) Epithelial tricellular junctions act as interphase cell shape sensors to orient mitosis. *Nature* 530:495–498. doi:10.1038/nature16970
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761–771. doi:10.1083/jcb.106.3.761
- Bradley RS, Cowin P, Brown AM (1993) Expression of Wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion. *Journal of Cell Biology* 123:1857–1865. doi:10.1083/jcb.123.6.1857
- Brennan D, Hu Y, Joubeh S, Choi YW, Whitaker-Menezes D, O'Brien T, Uitto J, Rodeck U, Mahoney MG (2007) Suprabasal Dsg2 expression in transgenic mouse skin confers a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype to keratinocytes. *Journal of cell science* 120:758–771. doi:10.1242/jcs.03392
- Brennan CM, Steitz JA (2001) HuR and mRNA stability. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 58:266–277. doi:10.1007/PL00000854
- Brennan-Crispi DM, Overmiller AM, Tamayo-Orrego L, Marous MR, Sahu J, McGuinn KP, Cooper F, Georgiou IC, Frankfurter M, Salas-Alanis JC, Charron F, Millar SE, Mahoney MG, Riobo-Del Galdo NA (2019) Overexpression of Desmoglein 2 in a Mouse Model of Gorlin Syndrome Enhances Spontaneous Basal Cell Carcinoma Formation through STAT3-Mediated Gli1 Expression. *Journal of Investigative Dermatology* 139:300–307. doi:10.1016/j.jid.2018.09.009
- Brooks SC, Locke ER, Soule HD (1973) Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *The Journal of biological chemistry* 248:6251–6253
- Bruford EA, Braschi B, Denny P, Jones TEM, Seal RL, Tweedie S (2020) Guidelines for human gene nomenclature. *Nat Genet* 52:754–758. doi:10.1038/s41588-020-0669-3
- Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation. *Molecular cell* 36:932–941. doi:10.1016/j.molcel.2009.11.020
- Cabral RM, Liu L, Hogan C, Dopping-Hepenstal PJ, Winik BC, Asial RA, Dobson R, Mein CA, Baselaga PA, Mellerio JE, Nanda A, Del Boente MC, Kelsell DP, McGrath JA, South AP (2010)

- Homozygous Mutations in the 5' Region of the JUP Gene Result in Cutaneous Disease but Normal Heart Development in Children. *Journal of Investigative Dermatology* 130:1543–1550. doi:10.1038/jid.2010.7
- Cabral RM, Tattersall D, Patel V, McPhail GD, Hatzimasoura E, Abrams DJ, South AP, Kellsell DP (2012) The DSPII splice variant is crucial for desmosome-mediated adhesion in HaCaT keratinocytes. *Journal of cell science* 125:2853–2861. doi:10.1242/jcs.084152
- Cammas A, Sanchez BJ, Lian XJ, Dormoy-Raclet V, van der Giessen K, López de Silanes I, Ma J, Wilusz C, Richardson J, Gorospe M, Millevoi S, Giovarelli M, Gherzi R, Di Marco S, Gallouzi I (2014) Destabilization of nucleophosmin mRNA by the HuR/KSRP complex is required for muscle fibre formation. *Nature communications* 5:4190. doi:10.1038/ncomms5190
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642–655. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035
- Castello A, Fischer B, Frese CK, Horos R, Alleaume A-M, Foehr S, Curk T, Krijgsveld J, Hentze MW (2016) Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Molecular cell* 63:696–710. doi:10.1016/j.molcel.2016.06.029
- Charpentier E, Lavker RM, Acquista E, Cowin P (2000) Plakoglobin Suppresses Epithelial Proliferation and Hair Growth in Vivo. *Journal of Cell Biology* 149:503–520. doi:10.1083/jcb.149.2.503
- Chen X, Bonné S, Hatzfeld M, van Roy F, Green KJ (2002) Protein Binding and Functional Characterization of Plakophilin 2. *Journal of Biological Chemistry* 277:10512–10522. doi:10.1074/jbc.M108765200
- Chen J, Den Z, Koch PJ (2008) Loss of desmocollin 3 in mice leads to epidermal blistering. *Journal of cell science* 121:2844–2849. doi:10.1242/jcs.031518
- Chen C-Y, Chen S-T, Juan H-F, Huang H-C (2012) Lengthening of 3'UTR increases with morphological complexity in animal evolution. *Bioinformatics* 28:3178–3181. doi:10.1093/bioinformatics/bts623
- Chidgey M, Brakebusch C, Gustafsson E, Cruchley A, Hail C, Kirk S, Merritt A, North A, Tselipis C, Hewitt J, Byrne C, Fassler R, Garrod D (2001) Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *Journal of Cell Biology* 155:821–832. doi:10.1083/jcb.200105009
- Christensen AH, Andersen CB, Wassilew K, Svendsen JH, Bundgaard H, Brand S-M, Schmitz B (2019) Rare non-coding Desmoglein-2 variant contributes to Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 131:164–170. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.04.029
- Christofori G, Semb H (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends in Biochemical Sciences* 24:73–76. doi:10.1016/S0968-0004(98)01343-7
- Colaprico A, Olsen C, Bailey MH, Odom GJ, Terkelsen T, Silva TC, Olsen AV, Cantini L, Zinovyev A, Barillot E, Noushmehr H, Bertoli G, Castiglioni I, Cava C, Bontempi G, Chen XS, Papaleo E (2020) Interpreting pathways to discover cancer driver genes with Moonlight. *Nature communications* 11:69. doi:10.1038/s41467-019-13803-0
- Cook KB, Kazan H, Zuberi K, Morris Q, Hughes TR (2011) RBPDB: a database of RNA-binding specificities. *Nucleic acids research* 39:D301–D308. doi:10.1093/nar/gkq1069
- Cooper F, Overmiller AM, Loder A, Brennan-Crispi DM, McGuinn KP, Marous MR, Freeman TA, Riobo-Del Galdo NA, Siracusa LD, Wahl JK, Mahoney MG (2018) Enhancement of Cutaneous Wound Healing by Dsg2 Augmentation of uPAR Secretion. *Journal of Investigative Dermatology* 138:2470–2479. doi:10.1016/j.jid.2018.04.024

- Croft CB, Tarin D (1970) Ultrastructural studies of wound healing in mouse skin. I. Epithelial behaviour. *Journal of anatomy* 106:63–77
- Cui T, Chen Y, Yang L, Knösel T, Zöllner K, Huber O, Petersen I (2011) DSC3 expression is regulated by p53, and methylation of DSC3 DNA is a prognostic marker in human colorectal cancer. *British journal of cancer* 104:1013–1019. doi:10.1038/bjc.2011.28
- Cui T, Yang L, Ma Y, Petersen I, Chen Y (2019) Desmocollin 3 has a tumor suppressive activity through inhibition of AKT pathway in colorectal cancer. *Experimental cell research* 378:124–130. doi:10.1016/j.yexcr.2019.03.015
- Dassi E, Re A, Leo S, Tebaldi T, Pasini L, Peroni D, Quattrone A (2014) AURA 2: Empowering discovery of post-transcriptional networks. *Translation (Austin, Tex.)* 2:e27738. doi:10.4161/trla.27738
- Decker CJ, Parker R (2012) P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4:a012286-a012286. doi:10.1101/cshperspect.a012286
- Deininger P (2011) Alu elements: know the SINEs. *Genome biology* 12:236. doi:10.1186/gb-2011-12-12-236
- Delva E, Tucker DK, Kowalczyk AP (2009) The desmosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a002543. doi:10.1101/cshperspect.a002543
- Den Z, Cheng X, Merched-Sauvage M, Koch PJ (2006) Desmocollin 3 is required for pre-implantation development of the mouse embryo. *Journal of cell science* 119:482–489. doi:10.1242/jcs.02769
- Dusek RL, Attardi LD (2011) Desmosomes: new perpetrators in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 11:317–323. doi:10.1038/nrc3051
- Dusek RL, Godsel LM, Green KJ (2007) Discriminating roles of desmosomal cadherins: beyond desmosomal adhesion. *Journal of dermatological science* 45:7–21. doi:10.1016/j.jdermsci.2006.10.006
- Elkon R, Ugalde AP, Agami R (2013) Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nat Rev Genet* 14:496–506. doi:10.1038/nrg3482
- Eshkind L, Tian Q, Schmidt A, Franke WW, Windoffer R, Leube RE (2002) Loss of desmoglein 2 suggests essential functions for early embryonic development and proliferation of embryonal stem cells. *European Journal of Cell Biology* 81:592–598. doi:10.1078/0171-9335-00278
- Fay MM, Lyons SM, Ivanov P (2017) RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *Journal of molecular biology* 429:2127–2147. doi:10.1016/j.jmb.2017.05.017
- Ferone G, Mollo MR, Thomason HA, Antonini D, Zhou H, Ambrosio R, Rosa L de, Salvatore D, Getsios S, van Bokhoven H, Dixon J, Missero C (2013) p63 control of desmosome gene expression and adhesion is compromised in AEC syndrome. *Human molecular genetics* 22:531–543. doi:10.1093/hmg/dds464
- Fischer JW, Busa VF, Shao Y, Leung AKL (2020) Structure-Mediated RNA Decay by UPF1 and G3BP1. *Molecular cell* 78:70–84.e6. doi:10.1016/j.molcel.2020.01.021
- Fischer-Kešo R, Breuninger S, Hofmann S, Henn M, Röhrig T, Ströbel P, Stoecklin G, Hofmann I (2014) Plakophilins 1 and 3 bind to FXR1 and thereby influence the mRNA stability of desmosomal proteins. *Molecular and cellular biology* 34:4244–4256. doi:10.1128/MCB.00766-14
- Flemming S, Luissint A-C, Kusters DHM, Raya-Sandino A, Fan S, Zhou DW, Hasegawa M, Garcia-Hernandez V, García AJ, Parkos CA, Nusrat A (2020) Desmocollin-2 promotes intestinal mucosal repair by controlling integrin-dependent cell adhesion and migration. *MBoC* 31:407–418. doi:10.1091/mbc.E19-12-0692

- Franke WW, Borrmann CM, Grund C, Pieperhoff S (2006) The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins. *European Journal of Cell Biology* 85:69–82. doi:10.1016/j.ejcb.2005.11.003
- Friedel CC, Dölken L, Ruzsics Z, Koszinowski UH, Zimmer R (2009) Conserved principles of mammalian transcriptional regulation revealed by RNA half-life. *Nucleic acids research* 37:e115–e115. doi:10.1093/nar/gkp542
- Fritsch P, Schwarz T: *Dermatologie Venerologie; Grundlagen. Klinik. Atlas. 3. Aufl.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2018.
- Funakoshi S, Ezaki T, Kong J, Guo RJ, Lynch JP (2008) Repression of the Desmocollin 2 Gene Expression in Human Colon Cancer Cells Is Relieved by the Homeodomain Transcription Factors Cdx1 and Cdx2. *Mol Cancer Res* 6:1478–1490. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2161
- Gallicano GI, Kouklis P, Bauer C, Yin M, Vasioukhin V, Degenstein L, Fuchs E (1998) Desmoplakin Is Required Early in Development for Assembly of Desmosomes and Cytoskeletal Linkage. *Journal of Cell Biology* 143:2009–2022. doi:10.1083/jcb.143.7.2009
- Gallouzi I, Parker F, Chebli K, Maurier F, Labourier E, Barlat I, Capony J-P, Tocque B, Tazi J (1998) A Novel Phosphorylation-Dependent RNase Activity of GAP-SH3 Binding Protein: a Potential Link between Signal Transduction and RNA Stability. *Mol. Cell. Biol.* 18:3956–3965. doi:10.1128/MCB.18.7.3956
- Garcia MA, Nelson WJ, Chavez N (2018) Cell–Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10:a029181. doi:10.1101/cshperspect.a029181
- Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z (2002) Desmosomal cadherins. *Current opinion in cell biology* 14:537–545. doi:10.1016/S0955-0674(02)00366-6
- Garrod DR, Berika MY, Bardsley WF, Holmes D, Tabernero L (2005) Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *Journal of cell science* 118:5743–5754. doi:10.1242/jcs.02700
- Gaudry CA, Palka HL, Dusek RL, Huen AC, Khandekar MJ, Hudson LG, Green KJ (2001) Tyrosine-phosphorylated Plakoglobin Is Associated with Desmogleins but Not Desmoplakin after Epidermal Growth Factor Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry* 276:24871–24880. doi:10.1074/jbc.M102731200
- Ge Y, Jin J, Li J, Ye M, Jin X (2022) The roles of G3BP1 in human diseases (review). *Gene* 821:146294. doi:10.1016/j.gene.2022.146294
- Gerull B, Heuser A, Wichter T, Paul M, Basson CT, McDermott DA, Lerman BB, Markowitz SM, Ellinor PT, MacRae CA, Peters S, Grossmann KS, Michely B, Sasse-Klaassen S, Birchmeier W, Dietz R, Breithardt G, Schulze-Bahr E, Thierfelder L (2004) Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Nat Genet* 36:1162–1164. doi:10.1038/ng1461
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferation capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* 12:264–265
- Ghosh M, Aguila HL, Michaud J, Ai Y, Wu M-T, Hemmes A, Ristimaki A, Guo C, Furneaux H, Hla T (2009) Essential role of the RNA-binding protein HuR in progenitor cell survival in mice. *J. Clin. Invest.* 119:3530–3543. doi:10.1172/JCI38263
- Gillen AE, Yamamoto TM, Kline E, Hesselberth JR, Kabos P (2016) Improvements to the HITS-CLIP protocol eliminate widespread mispriming artifacts. *BMC genomics* 17. doi:10.1186/s12864-016-2675-5
- Giudice G, Sánchez-Cabo F, Torroja C, Lara-Pezzi E (2016) ATtRACT-a database of RNA-binding proteins and associated motifs. *Database : the journal of biological databases and curation* 2016. doi:10.1093/database/baw035

- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G (2008) RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS letters* 582:1977–1986. doi:10.1016/j.febslet.2008.03.004
- Grammatikakis I, Abdelmohsen K, Gorospe M (2017) Posttranslational control of HuR function. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 8. doi:10.1002/wrna.1372
- Gross A, Pack LAP, Schacht GM, Kant S, Ungewiss H, Meir M, Schlegel N, Preisinger C, Boor P, Guldiken N, Krusche CA, Sellge G, Trautwein C, Waschke J, Heuser A, Leube RE, Strnad P (2018) Desmoglein 2, but not desmocollin 2, protects intestinal epithelia from injury. *Mucosal Immunol* 11:1630–1639. doi:10.1038/s41385-018-0062-z
- Grossmann KS, Grund C, Huelsken J, Behrend M, Erdmann B, Franke WW, Birchmeier W (2004) Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation. *Journal of Cell Biology* 167:149–160. doi:10.1083/jcb.200402096
- Gueydan C, Droogmans L, Chalon P, Huez G, Caput D, Kruys V (1999) Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor alpha mRNA. *The Journal of biological chemistry* 274:2322–2326. doi:10.1074/jbc.274.4.2322
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453:314–321. doi:10.1038/nature07039
- Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M, Jungkamp A-C, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T (2010) Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell* 141:129–141. doi:10.1016/j.cell.2010.03.009
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hannus M, Beitzinger M, Engelmann JC, Weickert M-T, Spang R, Hannus S, Meister G (2014) siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects. *Nucleic acids research* 42:8049–8061. doi:10.1093/nar/gku480
- Harmon RM, Simpson CL, Johnson JL, Koetsier JL, Dubash AD, Najor NA, Sarig O, Sprecher E, Green KJ (2013) Desmoglein-1/Erbin interaction suppresses ERK activation to support epidermal differentiation. *J. Clin. Invest.* 123:1556–1570. doi:10.1172/JCI65220
- Hartsock A, Nelson WJ (2008) Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et biophysica acta* 1778:660–669. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.012
- Häsler J, Strub K (2006) Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res* 34:5491–5497. doi:10.1093/nar/gkl706
- Hatzfeld M, Kristjansson GI, Plessmann U, Weber K (1994) Band 6 protein, a major constituent of desmosomes from stratified epithelia, is a novel member of the armadillo multigene family. *Journal of cell science* 107 (Pt 8):2259–2270
- Hatzfeld M (2007) Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochimica et biophysica acta* 1773:69–77. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.04.009
- Hatzfeld M, Wolf A, Keil R (2014) Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling. *Cell communication & adhesion* 21:25–42. doi:10.3109/15419061.2013.876017
- Hegazy M, Perl AL, Svoboda SA, Green KJ (2022) Desmosomal Cadherins in Health and Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 17:47–72. doi:10.1146/annurev-pathol-042320-092912

- Heid HW, Schmidt A, Zimbelmann R, Schäfer S, Winter-Simanowski S, Stumpp S, Keith M, Figge U, Schnölzer M, Franke WW (1994) Cell type-specific desmosomal plaque proteins of the plakoglobin family: plakophilin 1 (band 6 protein). *Differentiation; research in biological diversity* 58:113–131. doi:10.1046/j.1432-0436.1995.5820113.x
- Hentze MW, Castello A, Schwarzl T, Preiss T (2018) A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:327–341. doi:10.1038/nrm.2017.130
- Hinck L, Nelson WJ, Papkoff J (1994) Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing beta-catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *Journal of Cell Biology* 124:729–741. doi:10.1083/jcb.124.5.729
- Hinman MN, Lou H (2008) Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65:3168–3181. doi:10.1007/s00018-008-8252-6
- Hofmann I, Casella M, Schnölzer M, Schlechter T, Spring H, Franke WW (2006) Identification of the junctional plaque protein plakophilin 3 in cytoplasmic particles containing RNA-binding proteins and the recruitment of plakophilins 1 and 3 to stress granules. *Molecular biology of the cell* 17:1388–1398. doi:10.1091/mbc.e05-08-0708
- Hu B, Yang Y-CT, Huang Y, Zhu Y, Lu ZJ (2017) POSTAR: a platform for exploring post-transcriptional regulation coordinated by RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* 45:D104-D114. doi:10.1093/nar/gkw888
- Hu H, Jiang M, Cao Y, Zhang Z, Jiang B, Tian F, Feng J, Dou Y, Gorospe M, Zheng M, Zheng L, Yang Z, Wang W (2020) HuR regulates phospholamban expression in isoproterenol-induced cardiac remodelling. *Cardiovascular research* 116:944–955. doi:10.1093/cvr/cvz205
- Hunt DM, Rickman L, Whittock NV, Eady RA, Simrak D, Dopping-Hepenstal PJ, Stevens HP, Armstrong DK, Hennies HC, Küster W, Hughes AE, Arnemann J, Leigh IM, McGrath JA, Kelsell DP, Buxton RS (2001) Spectrum of dominant mutations in the desmosomal cadherin desmoglein 1, causing the skin disease striate palmoplantar keratoderma. *European journal of human genetics: EJHG* 9:197–203. doi:10.1038/sj.ejhg.5200605
- Irvine K, Stirling R, Hume D, Kennedy D (2004) Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *The International journal of developmental biology* 48:1065–1077. doi:10.1387/ijdb.041893ki
- Ishida-Yamamoto A, Igawa S (2015) The biology and regulation of corneodesmosomes. *Cell Tissue Res* 360:477–482. doi:10.1007/s00441-014-2037-z
- Jiang F, Wu P (2020) Regulating DSC2 Expression Affects the Proliferation and Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *Cancer management and research* 12:11453–11462. doi:10.2147/CMAR.S273394
- Jonkman MF, Pasmooij AM, Pasmans SG, van den Berg MP, Horst HJ ter, Timmer A, Pas HH (2005) Loss of Desmoplakin Tail Causes Lethal Acantholytic Epidermolysis Bullosa*. *The American Journal of Human Genetics* 77:653–660. doi:10.1086/496901
- Kakuguchi W, Kitamura T, Kuroshima T, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F (2010) HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* 8:520–528. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0367
- Kamekura R, Kolegraff KN, Nava P, Hilgarth RS, Feng M, Parkos CA, Nusrat A (2014) Loss of the desmosomal cadherin desmoglein-2 suppresses colon cancer cell proliferation through EGFR signaling. *Oncogene* 33:4531–4536. doi:10.1038/onc.2013.442
- Katsanou V, Milatos S, Yiakouvaki A, Sgantzis N, Kotsoni A, Alexiou M, Harokopos V, Aidinis V, Hemberger M, Kontoyiannis DL (2009) The RNA-binding protein Elavl1/HuR is essential for placental branching morphogenesis and embryonic development. *Molecular and cellular biology* 29:2762–2776. doi:10.1128/MCB.01393-08

- Kawamata T, Tomari Y (2010) Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences* 35:368–376. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.009
- Kaz AM, Luo Y, Dzieciatkowski S, Chak A, Willis JE, Upton MP, Leidner RS, Grady WM (2012) Aberrantly methylated PKP1 in the progression of Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Genes Chromosom. Cancer* 51:384–393. doi:10.1002/gcc.21923
- Keil R, Rietscher K, Hatzfeld M (2016) Antagonistic Regulation of Intercellular Cohesion by Plakophilins 1 and 3. *The Journal of investigative dermatology* 136:2022–2029. doi:10.1016/j.jid.2016.05.124
- Kelley DR, Hendrickson DG, Tenen D, Rinn JL (2014) Transposable elements modulate human RNA abundance and splicing via specific RNA-protein interactions. *Genome biology* 15:537. doi:10.1186/s13059-014-0537-5
- Kharel P, Becker G, Tsvetkov V, Ivanov P (2020) Properties and biological impact of RNA G-quadruplexes: from order to turmoil and back. *Nucl. Acids Res.* 48:12534–12555. doi:10.1093/nar/gkaa1126
- Kikin O, D'Antonio L, Bagga PS (2006) QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research* 34:W676-82. doi:10.1093/nar/gkl253
- Kim W, Bennett EJ, Huttlin EL, Guo A, Li J, Possemato A, Sowa ME, Rad R, Rush J, Comb MJ, Harper JW, Gygi SP (2011) Systematic and Quantitative Assessment of the Ubiquitin-Modified Proteome. *Molecular cell* 44:325–340. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.025
- Kim HH, Gorospe M (2008) Phosphorylated HuR shuttles in cycles. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 7:3124–3126. doi:10.4161/cc.7.20.6884
- Kim JH, Kim S-E, Park HS, Lee S-H, Lee SE, Kim S-C (2019) A Homozygous Nonsense Mutation in the DSG3 Gene Causes Acantholytic Blisters in the Oral and Laryngeal Mucosa. *Journal of Investigative Dermatology* 139:1187–1190. doi:10.1016/j.jid.2018.09.038
- Kim HS, Kuwano Y, Zhan M, Pullmann R, Mazan-Mamczarz K, Li H, Kedersha N, Anderson P, Wilce MCJ, Gorospe M, Wilce JA (2007) Elucidation of a C-rich signature motif in target mRNAs of RNA-binding protein TIAR. *Molecular and cellular biology* 27:6806–6817. doi:10.1128/MCB.01036-07
- Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG, Levy M, Montagutelli X, Ahmad W, Aita VM, Gordon D, Uitto J, Whiting D, Ott J, Fischer S, Gilliam T, Jahoda CA, Morris RJ, Panteleyev AA, Nguyen VT, Christiano AM (2003) Desmoglein 4 in Hair Follicle Differentiation and Epidermal Adhesion. *Cell* 113:249–260. doi:10.1016/S0092-8674(03)00273-3
- Koch PJ, Mahoney MG, Ishikawa H, Pulkkinen L, Uitto J, Shultz L, Murphy GF, Whitaker-Menezes D, Stanley JR (1997) Targeted Disruption of the Pemphigus Vulgaris Antigen (Desmoglein 3) Gene in Mice Causes Loss of Keratinocyte Cell Adhesion with a Phenotype Similar to Pemphigus Vulgaris. *Journal of Cell Biology* 137:1091–1102. doi:10.1083/jcb.137.5.1091
- Koch PJ, Mahoney MG, Cotsarelis G, Rothenberger K, Lavker RM, Stanley JR (1998) Desmoglein 3 anchors telogen hair in the follicle. *Journal of cell science* 111 (Pt 17):2529–2537. doi:10.1242/jcs.111.17.2529
- Kolegraff K, Nava P, Helms MN, Parkos CA, Nusrat A (2011) Loss of desmocollin-2 confers a tumorigenic phenotype to colonic epithelial cells through activation of Akt/ β -catenin signaling. *MBoC* 22:1121–1134. doi:10.1091/mbc.e10-10-0845
- König J, Zarnack K, Rot G, Curk T, Kayikci M, Zupan B, Turner DJ, Luscombe NM, Ule J (2010) iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nat Struct Mol Biol* 17:909–915. doi:10.1038/nsmb.1838

- König J, Zarnack K, Luscombe NM, Ule J (2012) Protein–RNA interactions: new genomic technologies and perspectives. *Nat Rev Genet* 13:77–83. doi:10.1038/nrg3141
- Kottke MD, Delva E, Kowalczyk AP (2006) The desmosome: cell science lessons from human diseases. *Journal of cell science* 119:797–806. doi:10.1242/jcs.02888
- Kröger C, Loschke F, Schwarz N, Windoffer R, Leube RE, Magin TM (2013) Keratins control intercellular adhesion involving PKC- α -mediated desmoplakin phosphorylation. *Journal of Cell Biology* 201:681–692. doi:10.1083/jcb.201208162
- Kugelmann D, Radeva MY, Spindler V, Waschke J (2019) Desmoglein 1 Deficiency Causes Lethal Skin Blistering. *Journal of Investigative Dermatology* 139:1596-1599.e2. doi:10.1016/j.jid.2019.01.002
- Kume K, Haraguchi M, Hijioka H, Ishida T, Miyawaki A, Nakamura N, Ozawa M (2013) The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430:889–894. doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.060
- Kurinna S, Schäfer M, Ostano P, Karouzakis E, Chiorino G, Bloch W, Bachmann A, Gay S, Garrod D, Lefort K, Dotto G-P, Beer H-D, Werner S (2014) A novel Nrf2-miR-29-desmocollin-2 axis regulates desmosome function in keratinocytes. *Nature communications* 5:5099. doi:10.1038/ncomms6099
- Lagnado CA, Brown CY, Goodall GJ (1994) AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol. Cell. Biol.* 14:7984–7995. doi:10.1128/MCB.14.12.7984
- Lai WS, Carrick DM, Blackshear PJ (2005) Influence of Nonameric AU-rich Tristetraprolin-binding Sites on mRNA Deadenylation and Turnover. *Journal of Biological Chemistry* 280:34365–34377. doi:10.1074/jbc.M506757200
- Largy E, Mergny J-L, Gabelica V (2016) Role of Alkali Metal Ions in G-Quadruplex Nucleic Acid Structure and Stability. *Metal ions in life sciences* 16:203–258. doi:10.1007/978-3-319-21756-7_7
- Le Guiner C, Lejeune F, Galiana D, Kister L, Breathnach R, Stévenin J, Del Gatto-Konczak F (2001) TIA-1 and TIAR activate splicing of alternative exons with weak 5' splice sites followed by a U-rich stretch on their own pre-mRNAs. *The Journal of biological chemistry* 276:40638–40646. doi:10.1074/jbc.M105642200
- Lebedeva S, Jens M, Theil K, Schwanhäusser B, Selbach M, Landthaler M, Rajewsky N (2011) Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Molecular cell* 43:340–352. doi:10.1016/j.molcel.2011.06.008
- Lee P, Jiang S, Li Y, Yue J, Gou X, Chen S-Y, Zhao Y, Schober M, Tan M, Wu X (2017) Phosphorylation of Pkp1 by RIPK 4 regulates epidermal differentiation and skin tumorigenesis. *EMBO J* 36:1963–1980. doi:10.15252/emboj.201695679
- Lee JE, Lee JY, Wilusz J, Tian B, Wilusz CJ (2010) Systematic Analysis of Cis-Elements in Unstable mRNAs Demonstrates that CUGBP1 Is a Key Regulator of mRNA Decay in Muscle Cells. *PloS one* 5:e11201. doi:10.1371/journal.pone.0011201
- Leitner L, Shaposhnikov D, Mengel A, Descot A, Julien S, Hoffmann R, Posern G (2011) MAL/MRTF-A controls migration of non-invasive cells by upregulation of cytoskeleton-associated proteins. *Journal of cell science* 124:4318–4331. doi:10.1242/jcs.092791
- Lerner LK, Sale JE (2019) Replication of G Quadruplex DNA. *Genes* 10. doi:10.3390/genes10020095
- Levanon EY, Eisenberg E, Yelin R, Nemzer S, Hallegger M, Shemesh R, Fligelman ZY, Shoshan A, Pollock SR, Szytybel D, Olshansky M, Rechavi G, Jantsch MF (2004) Systematic identification

- of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nature biotechnology* 22:1001–1005. doi:10.1038/nbt996
- Li J-H, Liu S, Zhou H, Qu L-H, Yang J-H (2014) starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein–RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucl. Acids Res.* 42:D92–D97. doi:10.1093/nar/gkt1248
- Liao B, Hu Y, Brewer G (2007) Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nature structural & molecular biology* 14:511–518. doi:10.1038/nsmb1249
- Licatalosi DD, Darnell RB (2010) RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat Rev Genet* 11:75–87. doi:10.1038/nrg2673
- Liu L, Rao JN, Zou T, Xiao L, Wang P-Y, Turner DJ, Gorospe M, Wang J-Y (2009) Polyamines regulate c-Myc translation through Chk2-dependent HuR phosphorylation. *Molecular biology of the cell* 20:4885–4898. doi:10.1091/mbc.e09-07-0550
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lunde BM, Moore C, Varani G (2007) RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:479–490. doi:10.1038/nrm2178
- Ma W-J, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H (1996) Cloning and Characterization of HuR, a Ubiquitously Expressed Elav-like Protein. *J. Biol. Chem.* 271:8144–8151. doi:10.1074/jbc.271.14.8144
- Maas-Szabowski N, Stärker A, Fusenig NE (2003) Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF-alpha. *Journal of cell science* 116:2937–2948. doi:10.1242/jcs.00474
- Mahmoodi Chalbatani G, Dana H, Gharagouzloo E, Grijalvo S, Eritja R, Logsdon CD, Memari F, Miri SR, Rad MR, Marmari V (2019) Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach. *International journal of nanomedicine* 14:3111–3128. doi:10.2147/IJN.S200253
- Maizels N, Gray LT (2013) The G4 genome. *PLoS genetics* 9:e1003468. doi:10.1371/journal.pgen.1003468
- Mannan T, Jing S, Foroushania SH, Fortune F, Wan H (2011) RNAi-mediated inhibition of the desmosomal cadherin (desmoglein 3) impairs epithelial cell proliferation. *Cell proliferation* 44:301–310. doi:10.1111/j.1365-2184.2011.00765.x
- Mao X, Cho MJT, Ellebrecht CT, Mukherjee EM, Payne AS (2017) Stat3 regulates desmoglein 3 transcription in epithelial keratinocytes. *JCI insight* 2. doi:10.1172/jci.insight.92253
- Matera AG, Terns RM, Terns MP (2007) Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:209–220. doi:10.1038/nrm2124
- Maynadier M, Chambon M, Basile I, Gleizes M, Nirde P, Gary-Bobo M, Garcia M (2012) Estrogens promote cell–cell adhesion of normal and malignant mammary cells through increased desmosome formation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 364:126–133. doi:10.1016/j.mce.2012.08.016
- Mayr C (2017) Regulation by 3'-Untranslated Regions. *Annu. Rev. Genet.* 51:171–194. doi:10.1146/annurev-genet-120116-024704
- Mayr C (2019) What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 11. doi:10.1101/cshperspect.a034728
- McGrath JA, McMillan JR, Shemanko CS, Runswick SK, Leigh IM, Lane EB, Garrod DR, Eady RA (1997) Mutations in the plakophilin 1 gene result in ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome. *Nat Genet* 17:240–244. doi:10.1038/ng1097-240

- McHarg S, Hopkins G, Lim L, Garrod D (2014) Down-Regulation of Desmosomes in Cultured Cells: The Roles of PKC, Microtubules and Lysosomal/Proteasomal Degradation. *PLoS one* 9:e108570. doi:10.1371/journal.pone.0108570
- McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ (2000) Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *The Lancet* 355:2119–2124. doi:10.1016/S0140-6736(00)02379-5
- McMahon DK, Anderson PA, Nassar R, Bunting JB, Saba Z, Oakeley AE, Malouf NN (1994) C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties. *The American journal of physiology* 266:C1795-802. doi:10.1152/ajpcell.1994.266.6.C1795
- Melchionda V, Harman KE (2019) Pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus: an overview of the clinical presentation, investigations and management. *Clin Exp Dermatol* 44:740–746. doi:10.1111/ced.14041
- Mertens C, Kuhn C, Franke WW (1996) Plakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque. *Journal of Cell Biology* 135:1009–1025. doi:10.1083/jcb.135.4.1009
- Mertens C, Hofmann I, Wang Z, Teichmann M, Chong SS, Schnolzer M, Franke WW (2001) Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:7795–7800. doi:10.1073/pnas.141219498
- Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K-I (Hrsg) (2001) *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Meyer C, Garzia A, Mazzola M, Gerstberger S, Molina H, Tuschl T (2018) The TIA1 RNA-Binding Protein Family Regulates EIF2AK2-Mediated Stress Response and Cell Cycle Progression. *Molecular cell* 69:622-635.e6. doi:10.1016/j.molcel.2018.01.011
- Min L, Ruan Y, Shen Z, Jia D, Wang X, Zhao J, Sun Y, Gu J (2015) Overexpression of Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1 correlates with poor prognosis in gastric cancer patients. *Histopathology* 67:677–688. doi:10.1111/his.12695
- Miravet S, Piedra J, Castano J, Raurell I, Franci C, Dunach M, Garcia de Herreros A (2003) Tyrosine Phosphorylation of Plakoglobin Causes Contrary Effects on Its Association with Desmosomes and Adherens Junction Components and Modulates β -Catenin-Mediated Transcription. *Molecular and cellular biology* 23:7391–7402. doi:10.1128/MCB.23.20.7391-7402.2003
- Moll I, Kurzen H, Langbein L, Franke WW (1997) The Distribution of the Desmosomal Protein, Plakophilin 1, in Human Skin and Skin Tumors. *Journal of Investigative Dermatology* 108:139–146. doi:10.1111/1523-1747.ep12332388
- Moll I, Houdek P, Schäfer S, Nuber U, Moll R (1999) Diversity of desmosomal proteins in regenerating epidermis: immunohistochemical study using a human skin organ culture model. *Archives of Dermatological Research* 291:437–446. doi:10.1007/s004030050435
- Mühmer M, Ditthardt D, Jäkel J, Wischmann V, Moll R, Schmidt A (2014) An alternative promoter of the human plakophilin-3 gene controls the expression of the new isoform PKP3b. *Cell Tissue Res* 355:143–162. doi:10.1007/s00441-013-1736-1
- Muller J (2003) Functional analysis of C-TAK1 substrate binding and identification of PKP2 as a new C-TAK1 substrate. *The EMBO journal* 22:4431–4442. doi:10.1093/emboj/cdg426
- Müller L, Hatzfeld M, Keil R (2021) Desmosomes as Signaling Hubs in the Regulation of Cell Behavior. *Frontiers in cell and developmental biology* 9:745670. doi:10.3389/fcell.2021.745670
- Myer VE, Fan XC, Steitz JA (1997) Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *The EMBO journal* 16:2130–2139. doi:10.1093/emboj/16.8.2130

- Najor NA (2018) Desmosomes in Human Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 13:51–70. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-044030
- Namkoong S, Ho A, Woo YM, Kwak H, Lee JH (2018) Systematic Characterization of Stress-Induced RNA Granulation. *Molecular cell* 70:175–187.e8. doi:10.1016/j.molcel.2018.02.025
- Nekrasova O, Green KJ (2013) Desmosome assembly and dynamics. *Trends in cell biology* 23:537–546. doi:10.1016/j.tcb.2013.06.004
- Nekrutenko A, Li WH (2001) Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends in genetics : TIG* 17:619–621. doi:10.1016/s0168-9525(01)02445-3
- Neuber S, Jäger S, Meyer M, Wischmann V, Koch PJ, Moll R, Schmidt A (2015) c-Src mediated tyrosine phosphorylation of plakophilin 3 as a new mechanism to control desmosome composition in cells exposed to oxidative stress. *Cell and tissue research* 359:799–816. doi:10.1007/s00441-014-2063-x
- Nguyen VT, Arredondo J, Chernyavsky AI, Kitajima Y, Grando SA (2003) Keratinocyte acetylcholine receptors regulate cell adhesion. *Life Sciences* 72:2081–2085. doi:10.1016/S0024-3205(03)00087-0
- Nolze A, Schneider J, Keil R, Lederer M, Hüttelmaier S, Kessels MM, Qualmann B, Hatzfeld M (2013) FMRP regulates actin filament organization via the armadillo protein p0071. *RNA* 19:1483–1496. doi:10.1261/rna.037945.112
- Norgett EE (2000) Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Human molecular genetics* 9:2761–2766. doi:10.1093/hmg/9.18.2761
- Nuber UA, Schäfer S, Schmidt A, Koch PJ, Franke WW (1995) The widespread human desmocollin Dsc2 and tissue-specific patterns of synthesis of various desmocollin subtypes. *European Journal of Cell Biology* 66:69–74
- Okada Y, Saika S, Shirai K, Hashizume N, Yamanaka O, Ohnishi Y, Senba E (2001) Disappearance of Desmosomal Components in Rat Corneal Epithelium during Wound Healing. *Ophthalmologica* 215:61–65. doi:10.1159/000050828
- Onoufriadis A, Ahmed N, Bessar H, Guy A, Liu L, Marantzidis A, Kesidou E, Papanikolaou M, Simpson MA, Mellerio JE, Lee JY, McGrath JA (2020) Homozygous Nonsense Mutation in DSC3 Resulting in Skin Fragility and Hypotrichosis. *Journal of Investigative Dermatology* 140:1285–1288. doi:10.1016/j.jid.2019.10.015
- Ortega AD, Willers IM, Sala S, Cuezva JM (2010) Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Journal of cell science* 123:2685–2696. doi:10.1242/jcs.065920
- Overmiller AM, McGuinn KP, Roberts BJ, Cooper F, Brennan-Crispi DM, Deguchi T, Peltonen S, Wahl JK3, Mahoney MG (2016) c-Src/Cav1-dependent activation of the EGFR by Dsg2. *Oncotarget* 7:37536–37555. doi:10.18632/oncotarget.7675
- Perrone EE, Liu L, Turner DJ, Strauch ED (2012) Bile salts increase epithelial cell proliferation through HuR-induced c-Myc expression. *The Journal of surgical research* 178:155–164. doi:10.1016/j.jss.2012.02.029
- Pesole G (2002) UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002. *Nucleic acids research* 30:335–340. doi:10.1093/nar/30.1.335
- Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* 276:73–81. doi:10.1016/s0378-1119(01)00674-6

- Pieczyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Kruijs V, Streuli M, Anderson P (2000) TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- α . *The EMBO journal* 19:4154–4163. doi:10.1093/emboj/19.15.4154
- Pilichou K, Nava A, Basso C, Beffagna G, Bauce B, Lorenzon A, Frigo G, Vettori A, Valente M, Towbin J, Thiene G, Danieli GA, Rampazzo A (2006) Mutations in Desmoglein-2 Gene Are Associated With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation* 113:1171–1179. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583674
- Polak P, Domany E (2006) Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes. *BMC genomics* 7:133. doi:10.1186/1471-2164-7-133
- Qu J, Zhu L, Zhou Z, Chen P, Liu S, Locy ML, Thannickal VJ, Zhou Y (2018) Reversing Mechanoinductive DSP Expression by CRISPR/dCas9-mediated Epigenome Editing. *Am J Respir Crit Care Med* 198:599–609. doi:10.1164/rccm.201711-2242OC
- Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K-I (Hrsg) *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 21–34
- Rickman L (1999) N-terminal deletion in a desmosomal cadherin causes the autosomal dominant skin disease striate palmoplantar keratoderma. *Human molecular genetics* 8:971–976. doi:10.1093/hmg/8.6.971
- Rietscher K, Wolf A, Hause G, Rother A, Keil R, Magin TM, Glass M, Niessen CM, Hatzfeld M (2016) Growth Retardation, Loss of Desmosomal Adhesion, and Impaired Tight Junction Function Identify a Unique Role of Plakophilin 1 In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 136:1471–1478. doi:10.1016/j.jid.2016.03.021
- Rietscher K, Keil R, Jordan A, Hatzfeld M (2018) 14-3-3 proteins regulate desmosomal adhesion via plakophilins. *Journal of cell science* 131. doi:10.1242/jcs.212191
- Rikken G, Niehues H, van den Bogaard, Ellen H (2020) Organotypic 3D Skin Models: Human Epidermal Equivalent Cultures from Primary Keratinocytes and Immortalized Keratinocyte Cell Lines. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2154:45–61. doi:10.1007/978-1-0716-0648-3_5
- Rimpler U. 2014. Funktionelle Charakterisierung von Desmocollin 2 während der Embryonalentwicklung und im adulten Herzen in der Maus. Dissertation. Berlin: Humboldt-Universität.
- Roberts BJ, Reddy R, Wahl JK (2013) Stratifin (14-3-3 σ) Limits Plakophilin-3 Exchange with the Desmosomal Plaque. *PloS one* 8:e77012. doi:10.1371/journal.pone.0077012
- Roberts BJ, Johnson KE, McGuinn KP, Saowapa J, Svoboda RA, Mahoney MG, Johnson KR, Wahl JK (2014) Palmitoylation of plakophilin is required for desmosome assembly. *Journal of cell science* 127:3782–3793. doi:10.1242/jcs.149849
- Roberts BJ, Svoboda RA, Overmiller AM, Lewis JD, Kowalczyk AP, Mahoney MG, Johnson KR, Wahl JK (2016) Palmitoylation of Desmoglein 2 Is a Regulator of Assembly Dynamics and Protein Turnover. *The Journal of biological chemistry* 291:24857–24865. doi:10.1074/jbc.M116.739458
- Rosa J, Suzuki I, Kravicz M, Caron A, Pupo AV, Praça FG, Bentley MVLB (2018) Current Non-viral siRNA Delivery Systems as a Promising Treatment of Skin Diseases. *CPD* 24:2644–2663. doi:10.2174/1381612824666180807120017
- Rötzer V, Hartlieb E, Winkler J, Walter E, Schlipp A, Sardy M, Spindler V, Waschke J (2016) Desmoglein 3-Dependent Signaling Regulates Keratinocyte Migration and Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology* 136:301–310. doi:10.1038/JID.2015.380

- Roy-Engel AM, El-Sawy M, Farooq L, Odom GL, Perepelitsa-Belancio V, Bruch H, Oyeniran OO, Deininger PL (2005) Human retroelements may introduce intragenic polyadenylation signals. *Cytogenetic and genome research* 110:365–371. doi:10.1159/000084968
- Ruiz P, Brinkmann V, Ledermann B, Behrend M, Grund C, Thalhammer C, Vogel F, Birchmeier C, Günthert U, Franke WW, Birchmeier W (1996) Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *Journal of Cell Biology* 135:215–225. doi:10.1083/jcb.135.1.215
- Sánchez-Jiménez C, Izquierdo JM (2015) T-cell intracellular antigens in health and disease. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 14:2033–2043. doi:10.1080/15384101.2015.1053668
- Schlegel N, Boerner K, Waschke J (2021) Targeting desmosomal adhesion and signalling for intestinal barrier stabilization in inflammatory bowel diseases—Lessons from experimental models and patients. *Acta Physiol* 231. doi:10.1111/apha.13492
- Schmidt A, Langbein L, Rode M, Prätzel S, Zimbelmann R, Franke WW (1997) Plakophilins 1a and 1b: widespread nuclear proteins recruited in specific epithelial cells as desmosomal plaque components. *Cell and tissue research* 290:481–499. doi:10.1007/s004410050956
- Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG (2016) Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 73:2491–2509. doi:10.1007/s00018-016-2174-5
- Schultz CW, Preet R, Dhir T, Dixon DA, Brody JR (2020) Understanding and targeting the disease-related RNA binding protein human antigen R (HuR). *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 11:e1581. doi:10.1002/wrna.1581
- Shen S, Lin L, Cai JJ, Jiang P, Kenkel EJ, Stroik MR, Sato S, Davidson BL, Xing Y (2011) Widespread establishment and regulatory impact of Alu exons in human genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:2837–2842. doi:10.1073/pnas.1012834108
- Sherrill JD, KC K, Wu D, Djukic Z, Caldwell JM, Stucke EM, Kemme KA, Costello MS, Mingler MK, Blanchard C, Collins MH, Abonia JP, Putnam PE, Dellon ES, Orlando RC, Hogan SP, Rotenberg ME (2014) Desmoglein-1 regulates esophageal epithelial barrier function and immune responses in eosinophilic esophagitis. *Mucosal Immunol* 7:718–729. doi:10.1038/mi.2013.90
- Simpson MA, Mansour S, Ahnood D, Kalidas K, Patton MA, McKenna WJ, Behr ER, Crosby AH (2009) Homozygous Mutation of Desmocollin-2 in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy with Mild Palmoplantar Keratoderma and Woolly Hair. *Cardiology* 113:28–34. doi:10.1159/000165696
- Sinclair JA, Henderson C, Tetley JNA, Grant MH (2013) The influence of the choice of digestion enzyme used to prepare rat hepatocytes on xenobiotic uptake and efflux. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 27:451–457. doi:10.1016/j.tiv.2012.07.012
- Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med* 341:738–746. doi:10.1056/NEJM199909023411006
- Singh A, Trivedi P, Jain NK (2018) Advances in siRNA delivery in cancer therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46:274–283. doi:10.1080/21691401.2017.1307210
- Sklyarova T, Bonn  S, D'Hooge P, Denecker G, Goossens S, Rycke R de, Borgonie G, B sl M, van Roy F, van Hengel J (2008) Plakophilin-3-Deficient Mice Develop Hair Coat Abnormalities and Are Prone to Cutaneous Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology* 128:1375–1385. doi:10.1038/sj.jid.5701189
- Smith C, Zhu K, Merritt A, Picton R, Youngs D, Garrod D, Chidgey M (2004) Regulation of desmocollin gene expression in the epidermis: CCAAT/enhancer-binding proteins modulate early and late events in keratinocyte differentiation. *The Biochemical journal* 380:757–765. doi:10.1042/BJ20040077

- Spindler V, Meir M, Vigh B, Flemming S, Hütz K, Germer C-T, Waschke J, Schlegel N (2015) Loss of Desmoglein 2 Contributes to the Pathogenesis of Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*:1. doi:10.1097/MIB.0000000000000486
- Tani H, Mizutani R, Salam KA, Tano K, Ijiri K, Wakamatsu A, Isogai T, Suzuki Y, Akimitsu N (2012) Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res.* 22:947–956. doi:10.1101/gr.130559.111
- Tariq H, Bella J, Jowitt TA, Holmes DF, Rouhi M, Nie Z, Baldock C, Garrod D, Tabernero L (2015) Cadherin flexibility provides a key difference between desmosomes and adherens junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:5395–5400. doi:10.1073/pnas.1420508112
- Techasintana P, Davis JW, Gubin MM, Magee JD, Atasoy U (2015) Transcriptomic-Wide Discovery of Direct and Indirect HuR RNA Targets in Activated CD4+ T Cells. *PLoS one* 10:e0129321. doi:10.1371/journal.pone.0129321
- The UniProt Consortium (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucl. Acids Res.* 49:D480–D489. doi:10.1093/nar/gkaa1100
- Thomason HA, Cooper NH, Ansell DM, Chiu M, Merritt AJ, Hardman MJ, Garrod DR (2012) Direct evidence that PKC α positively regulates wound re-epithelialization: correlation with changes in desmosomal adhesiveness. *J. Pathol.* 227:346–356. doi:10.1002/path.4016
- Thul PJ, Åkesson L, Wiking M et al (2017) A subcellular map of the human proteome. *Science* 356. doi:10.1126/science.aal3321
- Tourrière H, Gallouzi I, Chebli K, Capony JP, Mouaikel J, van der Geer P, Tazi J (2001) RasGAP-Associated Endoribonuclease G3BP: Selective RNA Degradation and Phosphorylation-Dependent Localization. *Mol. Cell. Biol.* 21:7747–7760. doi:10.1128/MCB.21.22.7747-7760.2001
- Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *The Journal of Cell Biology* 160:823–831. doi:10.1083/jcb.200212128
- Tsang SM, Liu L, Teh M-T, Wheeler A, Grose R, Hart IR, Garrod DR, Fortune F, Wan H (2010) Desmoglein 3, via an interaction with E-cadherin, is associated with activation of Src. *PLoS one* 5:e14211. doi:10.1371/journal.pone.0014211
- Ule J, Jensen K, Mele A, Darnell RB (2005) CLIP: A method for identifying protein–RNA interaction sites in living cells. *Methods* 37:376–386. doi:10.1016/j.ymeth.2005.07.018
- Uttagomol J, Ahmad US, Rehman A, Huang Y, Laly AC, Kang A, Soetaert J, Chance R, Teh M-T, Connelly JT, Wan H (2019) Evidence for the Desmosomal Cadherin Desmoglein-3 in Regulating YAP and Phospho-YAP in Keratinocyte Responses to Mechanical Forces. *IJMS* 20:6221. doi:10.3390/ijms20246221
- Uzumcu A (2005) Loss of desmoplakin isoform I causes early onset cardiomyopathy and heart failure in a Naxos-like syndrome. *Journal of Medical Genetics* 43:e05-e05. doi:10.1136/jmg.2005.032904
- van Nostrand EL, Pratt GA, Shishkin AA, Gelboin-Burkhart C, Fang MY, Sundararaman B, Blue SM, Nguyen TB, Surka C, Elkins K, Stanton R, Rigo F, Guttman M, Yeo GW (2016) Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (e-CLIP). *Nat Methods* 13:508–514. doi:10.1038/nmeth.3810
- Vasioukhin V, Bowers E, Bauer C, Degenstein L, Fuchs E (2001) Desmoplakin is essential in epidermal sheet formation. *Nat Cell Biol* 3:1076–1085. doi:10.1038/ncb1201-1076
- Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Schölz C, Kelstrup CD, Young C, Nielsen ML, Olsen JV, Braekhus C, Choudhary C (2012) Proteomic Analyses Reveal Divergent Ubiquitylation Site Patterns in Murine Tissues. *Molecular & Cellular Proteomics* 11:1578–1585. doi:10.1074/mcp.M112.017905

- Wang J, Guo Y, Chu H, Guan Y, Bi J, Wang B (2013) Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis. *International journal of molecular sciences* 14:10015–10041. doi:10.3390/ijms140510015
- Whitman SA, Cover C, Yu L, Nelson DL, Zarnescu DC, Gregorio CC (2011) Desmoplakin and talin2 are novel mRNA targets of fragile X-related protein-1 in cardiac muscle. *Circulation research* 109:262–271. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.244244
- Wolf A, Hatzfeld M (2010) A role of plakophilins in the regulation of translation. *Cell Cycle* 9:3045–3050. doi:10.4161/cc.9.15.12446
- Wolf A, Keil R, Götzl O, Mun A, Schwarze K, Lederer M, Hüttelmaier S, Hatzfeld M (2006) The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol* 8:1432–1440. doi:10.1038/ncb1504
- Wolf A, Krause-Gruszczynska M, Birkenmeier O, Ostareck-Lederer A, Hüttelmaier S, Hatzfeld M (2010) Plakophilin 1 stimulates translation by promoting eIF4A1 activity. *J Cell Biol* 188:463–471. doi:10.1083/jcb.200908135
- Wolf A, Rietscher K, Glaß M, Hüttelmaier S, Schutkowski M, Ihling C, Sinz A, Wingenfeld A, Mun A, Hatzfeld M (2013) Insulin signaling via Akt2 switches plakophilin 1 function from stabilizing cell adhesion to promoting cell proliferation. *Journal of cell science* 126:1832–1844. doi:10.1242/jcs.118992
- Wong MP, Cheang M, Yorlida E, Coldman A, Gilks C, Huntsman D, Berean K (2008) Loss of desmoglein 1 expression associated with worse prognosis in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Pathology* 40:611–616. doi:10.1080/00313020802320614
- Yang Y-CT, Di C, Hu B, Zhou M, Liu Y, Song N, Li Y, Umetsu J, Lu ZJ (2015) CLIPdb: a CLIP-seq database for protein-RNA interactions. *BMC genomics* 16:51. doi:10.1186/s12864-015-1273-2
- Yu T-X, Gu B-L, Yan J-K, Zhu J, Yan W-H, Chen J, Qian L-X, Cai W (2016) CUGBP1 and HuR regulate E-cadherin translation by altering recruitment of E-cadherin mRNA to processing bodies and modulate epithelial barrier function. *American journal of physiology. Cell physiology* 310:C54-65. doi:10.1152/ajpcell.00112.2015
- Zhang Y, Xie S, Xu H, Qu L (2015) CLIP: viewing the RNA world from an RNA-protein interactome perspective. *Sci. China Life Sci.* 58:75–88. doi:10.1007/s11427-014-4764-5
- Zhao J, Fu X, Chen H, Min L, Sun J, Yin J, Guo J, Li H, Tang Z, Ruan Y, Wang X, Sun Y, Huang L (2021) G3BP1 interacts with YWHAZ to regulate chemoresistance and predict adjuvant chemotherapy benefit in gastric cancer. *British journal of cancer* 124:425–436. doi:10.1038/s41416-020-01067-1
- Zhao W, Zhang S, Zhu Y, Xi X, Bao P, Ma Z, Kapral TH, Chen S, Zagrovic B, Yang YT, Lu ZJ (2022) POSTAR3: an updated platform for exploring post-transcriptional regulation coordinated by RNA-binding proteins. *Nucleic acids research* 50:D287-D294. doi:10.1093/nar/gkab702
- Zhu Y, Xu G, Yang YT, Xu Z, Chen X, Shi B, Xie D, Lu ZJ, Wang P (2019) POSTAR2: deciphering the post-transcriptional regulatory logics. *Nucleic acids research* 47:D203-D211. doi:10.1093/nar/gky830

8 Thesen

- 1 - Die Expression desmosomaler Proteine unterliegt einer engen Regulation.
- 2 - Die Eigenschaften desmosomaler Transkripte liefern zahlreiche Indizien für deren posttranskriptionelle Regulation.
- 3 - Desmosomale Transkripte interagieren mit einer Vielzahl an RBP.
- 4 - ELAVL1, G3BP1 und TIAL1 assoziieren mit desmosomalen Transkripten.
- 5 - Desmosomale Gene werden posttranskriptionell durch mehrere RBPs reguliert.
- 6 - Die vorliegende Arbeit zeigt zahlreiche Ansatzpunkte für weiterführende systematische Untersuchungen der posttranskriptionellen Regulation desmosomaler Transkripte auf.

III Anhang

i Bedeutung der Desmosomen

Beteiligung desmosomaler Proteine an intrazellulären Prozessen

Tab. 22 zeigt eine Übersicht über intrazelluläre Funktionen desmosomaler Proteine abseits der Vermittlung eines Zellzusammenhaltes innerhalb der Desmosomen. Für einen ausführlichen Überblick siehe z.B. Dusek et al. 2007; Müller et al. 2021; Hegazy et al. 2022.

Tab. 22 | Auswahl an Funktionen desmosomaler Proteine abseits der Vermittlung von Adhäsion. Neben der Vermittlung eines stabilen Zellzusammenhalts sind desmosomale Proteine auch in zahlreichen regulatorischen Prozessen involviert.

Protein	Zellulärer Prozess	Referenz
DSC2	Hemmung der Proliferation	Kolegraff et al. 2011; Jiang und Wu 2020
DSC3	Hemmung der Proliferation	Cui et al. 2019
DSG1	Förderung der Keratinozytendifferenzierung	Harmon et al. 2013
DSG2	Positiver Einfluss auf Zellproliferation	Brennan et al. 2007; Kamekura et al. 2014; Overmiller et al. 2016
DSG3	Einfluss auf CDH1-Menge und Lokalisation	Tsang et al. 2010
	Mechanotransduktion	Uttagomol et al. 2019
	Positiver Einfluss auf Zellproliferation	Mannan et al. 2011
JUP	Hemmung der Proliferation	Charpentier et al. 2000
PKP1	Stimulation von Translation und Proliferation mRNA-Metabolismus	Wolf und Hatzfeld 2010; Wolf et al. 2013 Hofmann et al. 2006
PKP2	Transkription	Chen et al. 2002; Mertens et al. 2001
PKP3	mRNA-Metabolismus	Hofmann et al. 2006

Desmosomale Proteine in Zusammenhang mit Krankheiten und Tumoren

Veränderungen der Funktion oder Struktur desmosomaler Proteine durch Mutationen, zelluläre oder extrazelluläre Einflüsse sind assoziiert mit einer Vielzahl von Hauterkrankungen (Dermatosen) und der Entstehung von Tumoren (Tab. 23 - 26).

Tab. 23 | Beispiele von in Tumorgewebe beobachtete Veränderungen desmosomaler Proteine. Sowohl eine vermehrte Expression als auch eine Reduktion desmosomaler Proteine ist mit einer gesteigerten Invasivität und Metastasierung von Tumoren sowie einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert. **Symbole:** ↓, reduzierte Expression; ↑, gesteigerte Expression.

Protein	Expression	Tumorgewebe	Effekt	Referenz
DSC2 - 3 DSG1 - 3 DSP JUP PKP1 - 3	↓	Haut, oropharyngeale Mukosa, Magen, Kolon / Rektum, Harnblase, Prostata, Cervix, Endometrium, Mamma	↑ Invasivität ↑ Metastasierung ↓ Prognose	Wong et al. 2008; Dusek und Attardi 2011; Hatzfeld et al. 2014
DSG2 - 3 PKP1 - 3	↑	Lunge, oropharyngeale Mukosa, Haut, Magen, Kolon / Rektum, Mamma, Ösophagus, Prostata	↑ Invasivität ↑ Metastasierung ↓ Prognose	Hatzfeld et al. 2014; Najor 2018

Tab. 24 | Beispiele von Erkrankungen, die mit einer Veränderung desmosomaler Proteine assoziiert sind. Veränderungen desmosomaler Proteine durch Mutationen der entsprechenden Gene, Autoantikörper oder bakterielle Exotoxine verursachen Krankheiten mit übermäßiger Verhornung, Erosion oder Blasenbildung von Haut und Schleimhäuten sowie Kardiomyopathien. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Mb. Crohn sind mit einer Reduktion desmosomaler Cadherine assoziiert. **Abkürzungen:** ARVC, Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie; Mb., Morbus.

Betroffenes Protein	Prozess	Assoziierte Erkrankung	Referenz
DSC2	Mutation	ARVC	Simpson et al. 2009; Onoufriadis et al. 2020
	Reduziert	Mb. Crohn	Gross et al. 2018
DSG1	Mutation	Striäre palmoplantare Keratose	Rickman 1999; Hunt et al. 2001
	Antikörper	Pemphigus vulgaris Pemphigus foliaceus	Amagai et al. 1991; Melchionda und Harman 2019
	Exotoxin	Impetigo contagiosa <i>Staphylococcal scalded skin syndrome</i>	Amagai et al. 2000
DSG2	Mutation	ARVC	Pilichou et al. 2006; Christensen et al. 2019
	Reduziert	Mb. Crohn	Spindler et al. 2015; Gross et al. 2018
DSG3	Mutation	Orale suprabasale Akantholyse und Blasenbildung	Kim et al. 2019
	Antikörper	Pemphigus vulgaris	Melchionda und Harman 2019
DSG4	Mutation	Gestörte Entwicklung der Haarfollikel	Kljuic et al. 2003
DSP	Mutation	Kardiomyopathie	Uzumcu 2005
	Mutation	Palmoplantare Keratose	Armstrong et al. 1999
	Mutation	Letale akantholytische Epidermolysis bullosa simplex	Jonkman et al. 2005
	Mutation	Carvajal-Syndrom (Wollhaare, Palmoplantare Keratose, Kardiomyopathie)	Norgett 2000
JUP	Mutation	ARVC	McKoy et al. 2000
	Mutation	Naxos-Syndrom	Fritsch und Schwarz 2018, S. 659
	Mutation	Letale akantholytische Epidermolysis bullosa simplex	Cabral et al. 2010; Fritsch und Schwarz 2018, S. 672
PKP1	Mutation	<i>Skin-fragility</i> -Syndrom	McGrath et al. 1997; Fritsch und Schwarz 2018, S. 672
PKP2	Mutation	ARVC	Gerull et al. 2004

Desmosomen in *knockout*-Mäusen

Der vollständige Verlust desmosomaler Proteine hat zum Teil erhebliche Auswirkungen (Tab. 25). Diese reichen von belastungsinduzierter Herzinsuffizienz (Dsc2), über eine gestörte Entwicklung von Haut, Schleimhäuten und Haaren (Dsc1, Dsg3, Dsg4, Pkp3) bis hin zum Versterben der Embryos bzw. der Jungen (Dsc3, Dsg1, Dsg2, Dsp, Jup, Pkp1, Pkp2). Der gezielte *knockout* einzelner Gene in spezifischen Geweben zeigt die gestörte Funktion von Haut und intestinaler Schleimhaut durch den Verlust desmosomaler Adhäsion.

Tab. 25 | Beispiele von Phänotypen nach *knockout* desmosomaler Proteine in Mäusen.

Abkürzungen: h, Stunden; KO, *knockout*; -/-, homozygoter *knockout*.

Genotyp	Phänotyp	Referenz
Dsc1-/-	Epidermale Hyperproliferation Adhäsionsdefekte obere Epidermis Dermatitis, Überlebensfähig, fertil	Chidgey et al. 2001
Dsc2-/-	Keine pathologischen Veränderungen von Haut, Schleimhäuten, Haaren, Nägeln, Herz Herzinsuffizienz unter Belastung	Rimpler 2014
Dsc2-KO in intestinaler Mukosa	gestörte Erneuerung und Wundheilung der intestinalen Mukosa	Flemming et al. 2020
Dsc3-/-	Embryos versterben vor Implantation	Den et al. 2006
Dsc3-KO in Epidermis	intraepidermale Blasenbildung Haarverlust	Chen et al. 2008
Dsg1-/-	Versterben innerhalb von 24 h Wachstumsretardierung Fragile Haut	Kugelmann et al. 2019
Dsg2-/-	Embryos versterben vor Implantation	Eshkind et al. 2002
Dsg2-KO in intestinaler Mukosa	Gesteigerte intestinale Permeabilität	Gross et al. 2018
Dsg3-/-	Wachstumsretardierung Oropharyngeale Erosionen Suprabasale Akantholyse Haarverlust	Koch et al. 1997; Koch et al. 1998
Mutationen des Dsg4-Gen	<i>Lanceolate hair</i> (wenige, kurze, fragile Haare, verschwinden nach wenigen Monaten) Epidermale Hyperproliferation	Kljuic et al. 2003
Dsp-/-	Embryos Versterben Gewebe sehr anfällig gegen mechanischen Stress Lücken zwischen Zellen Fehlerhafte Inserierung von Keratin	Gallicano et al. 1998
Dsp-KO in Epidermis	interzelluläre Separation gestörte Keratin-verankerung	Vasioukhin et al. 2001
Jup-/-	Embryos versterben an Herzfehler Haut: Blasenbildung, subcorneale akantholyse Weniger Desmosomen und veränderte Struktur	Bierkamp et al. 1996; Ruiz et al. 1996
Pkp1-/-	Versterben innerhalb von 24 h Verlust desmosomaler Adhäsion Funktionsstörung der Tight junctions Fragile Haut	Rietscher et al. 2016
Pkp2-/-	Embryos versterben an Herzfehlern Normale Entwicklung der Epidermis	Grossmann et al. 2004
Pkp3-/-	Gestörte Haarentwicklung (verzögert, strubbelig, dünn) Gesteigerte inflammatorische Reaktionen der Haut (Akute Dermatitis, Pruritus, Haarverlust) Wachstumsretardierung	Sklyarova et al. 2008

ii Regulation der Expression desmosomaler Proteine

Über die Steuerung der Transkription desmosomaler Gene sowie posttranslationale Modifizierungen desmosomaler Proteine ist bereits einiges bekannt, über die Regulation der mRNA desmosomaler Gene bisher nur wenig. Tab. 26 zeigt beispielhaft verschiedene Mechanismen, durch die die Expression desmosomaler Gene reguliert wird.

Tab. 26 | Beispiele für Mechanismen zur Regulation von Desmosomen.

Regulierter Mechanismus	Gen / Protein	Referenz
Transkription	<i>DSC1</i>	Smith et al. 2004
	<i>DSC2</i>	Funakoshi et al. 2008; Kurinna et al. 2014
	<i>DSC3</i>	Cui et al. 2011; Ferone et al. 2013
	<i>DSG1</i>	Ferone et al. 2013; Sherrill et al. 2014
	<i>DSG2</i>	Kume et al. 2013
	<i>DSG3</i>	Mao et al. 2017
	<i>DSP</i>	Ferone et al. 2013; Qu et al. 2018
	<i>JUP</i>	Bradley et al. 1993; Hinck et al. 1994
	<i>PKP1</i>	Kaz et al. 2012
	<i>PKP2</i>	Leitner et al. 2011
Alternatives Splicing	<i>PKP3</i>	Aigner et al. 2007; Maynadier et al. 2012
	<i>DSP</i>	Cabral et al. 2012
	<i>PKP1</i>	Schmidt et al. 1997
	<i>PKP2</i>	Mertens et al. 1996
mRNA beeinflusst durch miRNA, lncRNA oder RBP	<i>PKP3</i>	Mühmer et al. 2014
	<i>DSP</i>	Whitman et al. 2011
Phosphorylierung	<i>PKP2</i>	Fischer-Kešo et al. 2014
	<i>DSG3</i>	Aoyama et al. 1999; Nguyen et al. 2003
	<i>DSP</i>	Amar et al. 1999; Kröger et al. 2013
	<i>JUP</i>	Gaudry et al. 2001; Miravet et al. 2003
	<i>PKP1</i>	Wolf et al. 2013; Lee et al. 2017
	<i>PKP2</i>	Muller 2003; Müller et al. 2021
Palmitoylierung	<i>PKP3</i>	Roberts et al. 2013; Neuber et al. 2015
	<i>DSC2</i>	
	<i>DSG2</i>	
	<i>DSG3</i>	Roberts et al. 2014; Roberts et al. 2016
	<i>JUP</i>	
Ubiquitinylierung	<i>PKP2</i>	
	<i>PKP3</i>	
	<i>DSP</i>	
	<i>JUP</i>	Kim et al. 2011; Wagner et al. 2012
	<i>PKP2</i>	

iii Chemikalien

Puffer und Lösungen

Tab. 27 | Übersicht eingesetzter Puffer und Lösungen.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
6-fach-DNA-Ladepuffer	0,25% (w/v) Bromophenolblau 40% (v/v) Glycerin 100 mM EDTA 0,1% (v/v) SDS
Blotpuffer 1	0,3 M Tris/HCl (pH 10,4) 20% (v/v) Methanol
Blotpuffer 2	25 mM Tris/HCl (pH 10,4) 20% (v/v) Methanol
Blotpuffer 3	25 mM Tris/HCl (pH 9,4) 40 mM ϵ -Aminocapronsäure 20% (v/v) Methanol
DMEM	4,5 g/l Glukose 1 mM Natriumpyruvat 1 mM L-Glutamin
ECL-Lösung 1	100 mM Tris/HCl (pH 8,5) 25 mM Luminol 0,4 mM Cumarsäure
ECL-Lösung 2	100 mM Tris/HCl (pH 8,5) 0,02% (v/v) H ₂ O ₂
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris/HCl 19,2 mM Glycin 0,1% (v/v) SDS
IP-Lysepuffer	10 mM Hepes 5 mM MgCl ₂ 0,5 % (v/v) NP-40 150 mM KCl pH 7,4
Mowiol	5% (w/v) Mowiol 30% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) 1,4-Dizabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)
MT-Puffer	100 mM Pipes (pH 6,9) 4 M Glycerin 2 mM EDTA 1 mM EGTA 0,5% (v/v) Triton X-100
PBS	135 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM Natriumhydrogenphosphat 1 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4
PBSE	135 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM Natriumhydrogenphosphat 1 mM Kaliumdihydrogenphosphat 0,5 mM EDTA pH 7,4
Ponceau-Lösung	2% (w/v) Ponceau S 30% (w/v) Trichloressigsäure 30% (w/v) Sulfosalicylsäure
SDS-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1% (w/v) SDS 10 μ g/ml Aprotinin 10 μ g/ml Leupeptin 1 mM Pefabloc SC® 5 mM NaF 1 mM NaVO ₃
SDS-Probenpuffer	250 mM TRIS/HCl (pH 6,8) 8 % (v/v) SDS 30 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
Stripping-Puffer	0.2 M Glyzerin-HCl (pH 2.5) 0.05% (v/v) Tween20
TBE	445 mM Tris 445 mM Boronsäure 10 mM EDTA

Fortsetzung Tab. 29 | Übersicht eingesetzter Puffer und Lösungen.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
TBS	100 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1 mM NaCl
TBST	100 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20
Trizol	0,8 M Guanidiniumthiocyanat 0,4 M Ammoniumthiocyanat 0,1 M Natriumacetat (pH 5,0) 5 % (v/v) Glycerin 48 % ROTI®-Aqua-Phenol
Trypsingebrauchslösung	0,25 % (v/v) Trypsin 0,2 % (w/v) EDTA in PBS

Kits und Fertigreagenzien

Tab. 28 | Übersicht eingesetzter Kits und Fertigreagenzien.

Kit / Fertigreagenz	Hersteller
MicroBC Assay - protein quantification kit	Uptima (Pittsburgh, USA)
Xfect™ Transfection Reagent	Clontech (Mountain View, Kalifornien, USA)
Lipofectamine™ RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele

Tab. 29 | Übersicht über die Zusammensetzung der eingesetzten SDS-PAGE-Gele.

Bestandteil	Sammelgel	Trenngel 8 %	Trenngel 10 %
(Bis-)Acrylamid (1:37,5)	3,9 % (v/v)	8 %	10 %
SDS	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)	0,1 % (v/v)
Tris-HCl	0,125 M (pH 6,5)	0,375 M (pH 8,8)	0,375 M (pH 8,8)
Tetramethylethyldiamin	0,025 - 0,1 % (v/v)	0,025 - 0,1 % (v/v)	0,025 - 0,1 % (v/v)
Ammoniumperoxidsulfat	0,025 - 0,2 % (v/v)	0,025 - 0,2 % (v/v)	0,025 - 0,2 % (v/v)

Primärantikörper

Tab. 30 | Übersicht der eingesetzten Primärantikörper für WB und IF-Analysen. Abkürzungen: mAk, monoklonaler Antikörper; pAk, polyklonaler Antikörper.

Antigen	Bezeichnung	Organismus, Typ	Hersteller	Verdünnung WB	Verdünnung IF
DSC2	Katalognummer: GP542	Meerschwein, pAk	Progen (Heidelberg, Deutschland)	1:1000	
DSC2	Katalognummer: 610120	Kaninchen, pAk	Progen (Heidelberg, Deutschland)	1:1000	
DSC3	U-114	Maus, mAk	Progen (Heidelberg, Deutschland)	1:50	
DSG1 + 2	DG3.10	Maus, mAk	Progen (Heidelberg, Deutschland)	1:500	
DSP1 + 2	Multiepitop 2.15,2.17,2.20	Maus, mAk	Progen (Heidelberg, Deutschland)		1:100
DSP	616	Kaninchen, Serum	M. Hatzfeld		1:4000
ELAVL1	3A2	Maus, mAk	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)	1:1000	
G3BP1	H-10	Maus, mAk	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)	1:1000	
JUP	15F11	Maus, mAk	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	1:250	
PKP1	10B2	Maus, mAk	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)	1:500	

Fortsetzung Tab. 32 | Übersicht der eingesetzten Primärantikörper für WB und IF-Analysen.

Antigen	Bezeichnung	Organismus, Typ	Hersteller	Verdünnung WB	Verdünnung IF
PKP1	2D6	Maus, mAk	Progen (Heidelberg, Deutschland)		1:25
PKP1	667	Kaninchen, Serum	M. Hatzfeld		1:500
PKP2a+b	PP2/62	Maus, mAk	Progen (Heidelberg, Deutschland)	1:200	
PKP3	23E3/4	Maus, mAk	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)		1:200
PKP3	Head-mix #2	Meerschwein, pAk	PSL Peptide Specialty Laboratories	1:500	
Tubulin	DM1A	Maus, mAk	Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)	1:1000	
TIAL1	610352	Maus, mAk	BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, New Jersey USA)	1:3000	

Sekundärantikörper

Tab. 31 | Übersicht der eingesetzten Sekundärantikörper für WB- und IF-Analysen. Die angegebenen Sekundärantikörper für die IF waren mit den angegebenen Farbstoffen und die Sekundärantikörper für den WB mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert. **Abkürzungen:** HRP, Meerrettich-Peroxidase; pAk, polyklonaler Antikörper.

Antikörper	Organismus, Typ	Hersteller	Verdünnung WB	Verdünnung IF
Anti-Guinea Pig-HRP			1:20000	
Anti-Guinea Pig-Alexa 488	Esel, pAk	Dianova (Hamburg, Deutschland)		1:250
Anti-Maus-HRP			1:20000	1:500
Anti-Maus-Cy3				
Anti-Rabbit-HRP			1:20000	
Anti-Rabbit-Alexa 488				1:250

IP-Antikörper

Tab. 32 | Übersicht der Antikörper für Ko-Immünpräzipitation von Proteinen und RNA. Als Kontrolle diente Das unspezifische Serum einer nichtimmunisierten Maus. **Abkürzungen:** mAk, monoklonaler Antikörper.

Antigen	AK-Bezeichnung	Organismus, Typ	Hersteller
Kontrolle		<i>unspezifisches Maus-IgG</i>	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
ELAVL1	3A2	Maus, mAk	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
G3BP1	H-10	Maus, mAk	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA)
TIAL1	610352	Maus, mAk	BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, New Jersey USA)

qRT-PCR-Primer

Unter Zuhilfenahme des frei zugänglichen *online-tools Primer-BLAST* des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) wurden für den Nachweis verschiedener Gene PCR-Primer designt. Dabei wurden folgende Änderungen zu den gegebenen Grundeinstellungen vorgenommen:

- Produktgröße 75 - 200 Basen
- Optimale Schmelztemperatur 60 °C
- Primerpaar muss durch ein Intron von mindestens 500 Basenpaaren getrennt sein
- Vorhergesagte Refseq Transkripte sollen nicht in die Suche einbezogen werden

- *Primer sollen mindestens 4 - 5 mismatches zu ungewollten targets haben und davon mindestens 3 - 4 innerhalb der letzten 5 Basenpaare am 3' - Ende*
- *Primer soll Splicevarianten amplifizieren können*
- *GC-Anteil 40 - 60 %*
- *Maximale Anzahl sich wiederholender Mononucleotide 3*

Aus den errechneten Resultaten wurden jeweils mehrere Primerpaare bei der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) bestellt.

Die bestellten Primer wurden nach kurzem Zentrifugieren (1 min; 13 000 rpm; Heraeus Pico 17) mit DNase-freiem Wasser im vom Hersteller angegebenen Verhältnis gelöst, auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt und leicht schüttelnd inkubiert (30 min; 37 °C). Anschließend wurde ebenfalls mit DNase-freiem Wasser eine Arbeitslösung mit einer Konzentration des *forward* und *reverse* Primers von jeweils 10 µM hergestellt. Die Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Überprüfung der Qualität der einzelnen Primerpaare wurde eine qRT-PCR durchgeführt (Kapitel 3.4.10) und im Anschluss drei Qualitätskontrollen durchgeführt. Hierzu wurde RNA aus unbehandelten HaCaT isoliert und je Primerpaar zwei Verdünnungsreihen (cDNA unverdünnt; 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, ohne cDNA) getestet. Zur Kontrolle des einzelnen Versuchs wurden je 96-well-Platte zwei Verdünnungsreihen mit einem bekannten Primerpaar für das Gen POLR2A (RNA polymerase II subunit A) getestet. Nur wenn folgende drei Qualitätsmerkmale erfüllt wurden, wurde ein Primerpaar für weitere Experimente verwendet.

(1) Im Anschluss an die qRT-PCR wurden die jeweiligen Schmelzkurven auf das Vorhandensein mehrerer Produkte analysiert. Für die spätere Verwendung durfte hier kein zweites Produkt vorhanden sein.

(2) Aus jeder Verdünnungsreihe wurden Proben mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Für die spätere Verwendung durfte hier nur ein Produkt in der erwarteten Größe klar erkennbar sein.

(3) Die ct-Werte der einzelnen Verdünnungsreihen wurden gegenüber der relativen DNA-Menge logarithmisch aufgetragen und aus dem Anstieg der entstandenen Gerade (m) die PCR-Effizienz ermittelt (Rasmussen 2001 in Meuer et al. 2001).

$$PCR - Effizienz [\%] = 10^{\left(\frac{-1}{m \cdot \ln 10}\right)}$$

Für eine gute Vergleichbarkeit der späteren Ergebnisse sollte die PCR-Effizienz möglichst 100 % betragen, was je Zyklus eine Verdopplung der DNA-Menge anzeigt. Toleriert wurden hierbei

90 % - 110 %, wobei jeweils das Primerpaar bevorzugt gewählt wurde, dessen Effizienz näher an 100 % lag. Eine von 100 % abweichende Effizienz bedeutet eine Vermehrung der DNA-Menge je PCR-Zyklus um < bzw. > 2.

Um nach der qRT-PCR die Größe des entstandenen PCR-Produktes zu prüfen, wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl 6-fach-DNA-LoadingDye über ein 1,5%iges Agarosegel aufgetrennt (20 min; 120 V). Als Größenvergleich diente der Marker *GeneRuler 100 bp DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Für die spätere Verwendung durfte anschließenden Fluoreszenzaufnahme (Fusion-SL 3500.WL, Peqlab, Erlangen, Deutschland) nur ein Produkt in der erwarteten Größe klar erkennbar sein.

Tab. 33 | Übersicht der verwendeten qRT-PCR-Primer. Aufgeführt sind die Sequenzen der *forward* (F) und *reverse* (R) Primer, die zur Analyse der entsprechenden Transkripte eingesetzt wurden.

Zielgen	Transkript	Richtung	Sequenz 5' → 3'
<i>ATP5B</i>	NM_001686.3	F	TTGGTCCTGAGACTTTGGGC
		R	AGGGAGCTAGCAGATCGACA
<i>DSC2</i>	NM_024422.4	F	CTTGGAAAGTGGGCCATCCT
		R	CCCACAGACCAGCGTAAACA
<i>DSC3</i>	NM_001941.4	F	CACTTACTCGGAGTGGCACA
		R	TGGCATGCGGTCTTCATTCT
<i>DSG2</i>	NM_001943.4	F	CCTGGATGGACACCCAAACA
		R	TTTGTTGCAGCAGCACACTG
<i>DSP</i>	NM_004415.3	F	CTAAGGAGCCAGCTGCAGATCA
		R	CAGAAGGCTCTCTTTCTCTGTA
<i>ELAVL1</i>	NM_001419.2	F	CAACTTGTACATCAGCGGGC
		R	AAACCGGATAAACGCAACCC
<i>CDH1</i>	NM_001317185.1	F	GCTGGACCGAGAGAGTTTCC
		R	CGACGTTAGCCTCGTTCTCA
<i>G3BP1</i>	NM_005754.2	F	GAGCTAGTTTCTCTCCAGCTC
		R	GCCTGGTTCAGCAGTGTGTAA
<i>JUP</i>	NM_021991.2	F	TCTTCAAGTCGGGTGGCATC
		R	CCTGGTACAGGAGCAGGTTG
<i>MYC</i>	NM_002467.4	F	TACAACACCCGAGCAAGGAC
		R	TTCTCCTCCTCGTCGCAGTA
<i>PKP1</i>	NM_000299.3	F	AAGGAGGAACTCATTGCCGAC
		R	CGGAACAAGAGCCAGAAGCTC
<i>PKP2</i>	NM_001005242.2	F	TCGCTGCTGAGGAATCTGTC
		R	GTCGCGTGCATTCTGGTAAAC
<i>PKP3</i>	NM_001303029.1	F	CACAAGTGCTACAGCGATGC
		R	CTTGTTGTCAGCGTTGTCGT
<i>PKP4</i>	NM_003628.4	F	GCAGAATCACCAAGCATCGC
		R	TCCCTCACTTTCATGGAGAGAT
<i>POLR2A</i>	NM_000937.4	F	TGCTGGTTTTGGTGACGACT
		R	TCTGTCTGTGGCAAGTGCAT
<i>TIAL1</i>	NM_022173.2	F	AGCAGTAGTACCGTTGTCAGC
		R	TTCTGGGCTGAGATCACCAAC
<i>TNF</i>	NM_000594.3	F	GCTGCACTTTGGAGTGATCG
		R	ACAACATGGGCTACAGGCTT

Plasmide

Tab. 34 | Übersicht über eingesetzte Vektoren.

Vektor	Exprimiertes Protein	Hersteller
pEGFP - G3BP1	G3BP1 - EGFP	AG. Prof. S. Hüttelmaier (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, Deutschland)
pEGFP	EGFP	Clontech (Mountain View, Kalifornien, USA)

iv Geräte und Software

Geräte

Tab. 35 | Übersicht über die verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller	Sitz
Axio Cam Mrm Rev3	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Axio Observer - Mikroskop	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Biometra® Standard Power Pack P25	Analytik Jena AG	Jena, Deutschland
Cyro 1°C Freezing Container	Nalgene Nunc International	Rochester, New York, USA
Digitalkamera Panasonic Lumix DMC-FZ45	Panasonic	Kadoma, Japan
Dry bath FB15103	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Eppendorf Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Epson Perfection V6000 Photo Scanner	Epson	Suwa, Japan
EVOS FL Cell Imaging System	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Fusion-SL 3500.WL	Peqlab	Erlangen, Deutschland
GeneQuant 1300 V1.6.1	GE Healthcare	München, Deutschland
Heidolph Duomax 1030 - Wippschüttler	Schütt Labortechnik	Göttingen, Deutschland
Hera Safe – Sterile Arbeitsbank	Kendro	Langensfeld, Deutschland
Heraeus Pico 17 – Zentrifuge	Heraeus Instruments	Hanau, Deutschland
Hettich Mikro 220R - Kühlzentrifuge	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Impuls Sealer	Burghardt GmbH	Stuttgart, Deutschland
Inkubatoren	Heraeus Instruments MMM Medcenter Einrichtungen GmbH	Hanau, Deutschland Planegg, Deutschland
Kühlschrank Profi Line	Liebherr	Bulle, Schweiz
Kühlschrank Comfort NoFrost	Liebherr	Bulle, Schweiz
Magnetrührer	IKA®	Staufen, Deutschland
Mini-PROTEAN-System - Elektrophoresekammer	Bio-Rad	München, Deutschland
Minischüttler MS2	IKA®	Staufen, Deutschland
Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Thermo Scientific	Bonn, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
Objektiv EC „Plan-Neofluar“ 40x/1.30 Oil DIC M27	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Objektiv „Plan-Apochromat“ 63x/1,40 Oil DIC M27	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
pH-Meter MultiCal pH 526	WTW	Weilheim, Deutschland
Power Supply Consort EV231	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Präzisionswaage SBC 51	Scaltec	Göttingen, Deutschland
RT-qPCR LightCycler® 480	Roche	Basel, Schweiz
SB3 Stuart - Drehrad	Dunn Labortechnik GmbH	Asbach, Deutschland
Scotsman AF103 Ice Flaker	Scotsman Ice Systems	Mailand, Italien
SemiDry Blotting System	PeqLab	Erlangen, Deutschland
ThermoCycler T3	Biometra	Göttingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Hettich Universal 16 - Zentrifuge	Hettich	Tuttlingen, Deutschland
UV-Tisch	bts Biotech GmbH	Kraichtal, Deutschland
Vortex Gene 2	Scientific Industries	Bohemia, New York, USA
VWR® Power Source	VWR	Radnor, Pennsylvania, USA
Wasserbad	Memmert	Shanghai, China

Software

Tab. 36 | Übersicht über verwendete Software.

Software	Entwickler	Sitz
AxioVision 4.8.1	Carl Zeiss	Jena, Deutschland
Citavi	QSR International	Melbourne, Australien
ImageJ Version 1.53a	National Institute of Health	Bethesda, Maryland, USA
MS Office 365 Word, Excel, PowerPoint, Publisher	Microsoft	Redmond, Washington, USA
PrimerBlast	National Center for Biotechnology Information National Institute of Health	Bethesda, Maryland, USA
Venn Diagrams	VIB / UGent Bioinformatics & Evolutionary	Gent, Belgien
G-quadruplex-Mapper	Bagga P, D'Antonio L, Bioinformatics, Ramapo College of New Jersey https://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php	
ANOVA online tool	Vasavada N https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD	

v Regulatorische Elemente in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte

Manuelle Auswertung regulatorischer Elemente

Die dargestellten Sequenzen im FASTA-Format sind den Angaben in der Datenbank AURA entlehnt (<http://aura.science.unitn.it/>, letzter Abruf 05.08.2020). Gekennzeichnet sind per Unterstreich Klasse-1-ARE und Varianten dieser mit mehr oder weniger U. **Grün** markiert sind stabilisierende Elemente nach Lee et al. (2010) und **rot**, destabilisierende Elemente.

DSC1

```
>uc002kwm.2_3UTR
1 ACAGUAAAAGAAGGUGUAUUUGUGUGGACAAGAUGAGGAGCAUAAACAUI
51 GUGAAGACUACGUUUGUUCGUUAUAACUAUGAAGGCAAAGGUUCUCUGGCC
101 GGCUCAGUAGGUUGCUGCAGCGAUCGGCAGGAAGAAGAGGGACUGGAGUU
151 UCUAGAUCACCUGGAACCCAAUUUAAGGACAUAGCAAGACAUGCAUCA
201 AGAAAUAUUUGUGCCUUUUAAUAGUGUAUAUCCACAGAUGCAUAAGUAG
251 GAUUUUUAUCUUGCAGAAUGUUAGCAGCAUCUGCUAAUGUUUUUGUUUA
301 UGGAGUAAAACUUUGUCAUGUAUAUGUAAGGUACUAUAAAUAUGAGAUU
351 CCCUACAUCUCCUUGUCUGGUUAACUUCUCCUUGUCUAGAAAUCA
401 GGUUUUUUUGUUAUUUCUUUUUAUAGCAUGUAUAUUUGCCUUUUC
451 ACGACUGUACUGUACACCUUCUUGCACCUUUUAUUGCAAACUGAUGUUA
501 CUUUUGUGCUGUGGAAGAGCAUUUGGAAAGCUGGGUUAUUAUGAGGCC
551 AAUGAAAGAUGAAUUUGCAUUGUAGAUGUACGAAUUAUUUAUGUUCUUA
601 AAUUCUUGGGGAGAAUUUGUUCUUAAGACAUAAGUUGGUGCCAGAUAAU
651 GCAUUCUCUGCACCCUGAGUGUUUAAAAGGACUUUUUAAGUAUUUCUAG
701 UGCAUUCUUCAGUUUGUGUAUAAGUUAUUUCUUUUACACUUUGUA
751 CUCCUGAGAGCAGUGCUCCAGCAUUUUUUUUUUUUCAGGAUCCUUCAGAG
801 CUCAGUCCUUGGACCUUGCCUUGUGGAUUUGUUGUAGGUCACUCCAA
851 CUUCUAGGGUUCUUGGAAAGAUAAAGGACCAGAACAAGCUCUAUGCAAUU
901 GAGGGGCAGAGAUUUUAUGAAGAUUAACAUGAGAAGAUUCCAUGAAAGAA
951 UUGCAGCCUUGAGGUCCAUGGGUUGACUUAUGCUCACAAUAUGUUUCGU
1001 UUGCUCACAUGGUUUACUACUAACUUUUUAUUUUUAUUUUUAUUUUUAGC
1051 AAAACAUAUCACUCUUGAGUUUGACAUAAGGCCUGCCUUUUCUGUGGUUC
1101 CACCUGCCAUCUCCAAGCAUUUGGACAACUAGCCUGAUGCAUUUAGGCUG
1151 CAACUCUGAUUAACAGAGACUAGCACCUUGAAUAUGCCAGAAUUUGAAUU
1201 ACCAUCUGUAUUUAUAACUUUAAGACUCAGCCUAAUUUUUACAGUUACUUUUA
1251 GAAAUAUGGCAGUCAGAAUUUAAGGACUAGAAUGUAUAUGAGAAACCCCA
1301 CUCUACUAAAAUAUAAGAAUUUAAGCCGACAUUGGUGGCGAAUGACUGUA
1351 AUCCAGCUACUCAGGAGGUGAGGAGGAGAAUUCGUUGAAUCCAGGAG
1401 GCGGAGGUUGCAGUGAGCCGAGAUUGCCACUGCACUCCAGCCUGGGCAAC
1451 AAGAGCGAAACUCCGUCUC
```

DSC2

```
>uc002kwk.3_3UTR
1 ACAAUAGAAAGUAGUUAUCUGUGUAAUCAAGAUGAAAUCACAGCAUG
51 CCCAAGACUAUUGCCUGACAUAUAACUAUGAAGGAAGAGGAUCGGUGGCU
```

101 GGGUCUGUAGGUUGUUGCAGUGAACGACAAGAAGAUGGGCUUGA **AUC**
 151 **UUUC** GAUAAUUUGGAGCCCAAUUUUAGGACACUAGCAGAAGCAUGCAUGA
 201 AGAGAUGA **GUGUGU** UCUAUAAGUCUCUGAAAGCCAGUGGCUUUUAUGACU
 251 UUUAAAAAAAUUACAAACCAAGA **AUUUUUUA** AAGCAGAAGAUUCUAUUU
 301 GUGGGG **SUUUUUCUCUC** AUUAUUUGGAUGGAAUCUUCUUUGGUCAAAUGCA
 351 CAUUUA **CAGAGAGA** CACUAUAAACAAGUACACAA **AUUUUU** CA **AUUUUUA** C
 401 AU **AUUUUUA** AAUUACUUA **UCUUCU** AUCCAAGGAGGUCUACAGAGAAUUUA
 451 AAGUCUGCCUUA **UUUGUU** ACAUUUGGGUUAUAUG **ACAACA** GCCA **AUUUAU**
 501 AGUGCAAUAAAUGUAUUAAUUCAGUCCUUAUUUAUAGACUAUUUGAAG
 551 CACAACCUAAUGGAAAAUUGUAGAGACCUUGCUUUAAAC **AUUU** UCUCAGU
 601 UAAUUAAAGUUAUGUUGGUGGUCUUGGAAACUG **UUUUUUU** CCUGAACAUUCU
 651 AAA **GUGUGU** AGACUGCAUUCUUGCU **AUUUA** **UUUAUU** CUUGUAAGUGGAC **C**
 701 UUUUCACUGUGCAAAGGGAGAUUUCUAGCCAGGCAUUGACUAUUACA AUU
 751 UCAUUUUGGUGGAGUUUAGUUUUAGGU **UUUAUUGUAUA** UAAAAUCCUGCA
 801 CUGAAUCUGUGU **UCCUCU** GUUACCUACUUUUGCCAGUGAAUUUAAGUU
 851 UUA AAAUACUUUCAGAAUGU **AUUUUUA** CUACUGCAA **SUUUUUG** GUCUUUA
 901 AAAUGUCAAGUAGCA **UCUCUCU** CUU **UCUCUCU** GUCUCUUUCUGUUU **UCUCU**
 951 **CUCCA** **SUUUUUUUUUUUUUUUU** AUUUCCAUAUGGGCUAAAGAAUCCAAA
 1001 UAUUUUA AAAAUUCUG **UCUCUCU** UU **UCUUCUCUCU** AUAAGUGAA **AUUUAUC** **C**
 1051 **SUUUUUUUGUUU** AUGUAAG **UGUAUA** UAUCUUA **SUUUUU** CUUGAAAUCA
 1101 UUGUAAGUUUAACUUUG **UUUUU** CAAAUAUCUUGGUGAUUGCUUCA **AUUUA**
 1151 **CUCUUAACA** AAAAAACCUUUAAUUUUGCCAUAUGAAACUGUAGAUAU
 1201 GCCAUGCU **UUUAUU** AGA **AGCAGU** GCUCUGUUU **AACAACA** GAAUGGUGU
 1251 **AUUUA** GAAUUGGGAUGUGGA **AUUUA** CUGUAUG **ACAACA** CAUUUA CAGUU
 1301 CUGUAAUGCAAGGAUGCAGUUUAAAAUUGAAGUAGUGAUG **SUUUUUGA**
 1351 AAUAAGCUUUAAAUAUAGGGAUCUUGAAGGCUCUUGGGGUAACU **AUUUU**
 1401 UAUAACUUAAGUAAAAUGGCUGACUAUUC **UGUGUGUUUGU** AAAGUU **AUU**
 1451 **SUUUUUA** AUUUUUUAAGAUUA CAUUUUUAACAAAUGUAGAAUAGGCCAAA
 1501 **CUAUUUA** AUUUUUAAAACAGUAAAACAAAUAAGAACUUAUAGCUCACAA
 1551 AAUUCAGUCCAUGUUUCAUGACUUAUUUUUA GUCAAUGAAUUUUUCU **AUUU**
 1601 **AUACU** AAACUAUUGGAC **AUUUUUA** AUGUGUUUCUAAU **AUUUUUC** **AUUUAUC**
 1651 UUAUAUGUGCCUGUCUUAUUCACAAGAUUGGUAUAACA **AUUUAUUUG**
 1701 CCAGAUUAACACUAGGGA **AUUUA** UUGAUAACCAGCUUAUCUUAUCAGUAG
 1751 U **UUUAUU** GUGUAUCAGGCAAAAUAUGUUUCCAAAGUU **AUUUUU** AUAAA
 1801 GUUAUAACAAAUCUUAUAU **AUUUA** CUAGUCAUGUAUAAAGUAA **AUUUAAGC**
 1851 A **SUUUUUA** AAACUUAGUGUGA **SUUUGUU** C **AUCACA** GGUCGUAUAGUGUU
 1901 UAAGGAUUUUCGCACUCCUGAAUCAGAGAAGUAAGACCCCUUCCUUA
 1951 UUCUGUUUAUC **AUUUUUA** AAAGUAGA **SUUUGUUUU** GGAGACAUUUUC
 2001 AGUGCAUUGUUUAUUGCCA **UAUUUAU** AUAUAUGACUAUUCUAAAGGCUGU
 2051 GAGGCCAUGGGGUAUUGGUUAAGUUGCUUUUGCUUUUGCUAAUUUC
 2101 AUC **AUUUUUA** AAAAUGGGGAUAAUAACAGA **ACUUGUUU** CCUAGGGCCAUG
 2151 UAAGUCACUUGAAUAAAAUAAGUUUUGAAGCAUGAGAGUCAUACAGAGC
 2201 GGUCCACUAAAAGGCACUCCUGAUAAUAUAAAUGAUUUUAAC

DSC3

>uc002kwi.3_3UUR

1 AAUUUAACUAAAAAGAAUUGCAUCGAUGUAUUCAGAAUGAAGACC GCA
 51 UGCCAUCCCAAGAUUAUGUCCUCACUUAUAACUAGAGGGAAGAGGAUCU
 101 CCAGCUGGUUCUGUGGGCUCGUCGACGUGAAAAGCAGGAAGAAGAUUGCCU
 151 UGAC **SUUUUUA** AAUAUUUGGAACCCAA **AUUUAUU** A CAUUA GCAGAAGCAU
 201 GCACAAGAGAUAAUGUCACAGUGCUACA **AUUU** AGGUCUUUGUCAGACAUU
 251 CUGGAGGUUUCCAAAAUAAUAUUGUAAAGUUCAAUUUCAACUUA **UGU**
 301 **AUAUGAUG** **AUUUUUU** UCUCAAUUUUGAAUUUUGCUACUCACCA **AUUUAUA**
 351 **SUUUUUA** AAGCAAGUUGUUGCUUAUCUUUCCAAAAAGUGAAAAUUGUUA
 401 AACAGACAACUGGUAUUAUCUCAAACUCCAGCACUGGA **AUUUA** AGGUCUCUA
 451 AAGCAUCUGCUC **SUUUUUUUUUUUA** CGGAU **AUUUUUA** GUAAUAAAUAUGCU
 501 GGUA AAAU **AUUUGUC** **CAACA** UAGCUAAGUUUAGCUAAU **AUCACA** UUAUU
 551 **UGUAUU** ACUUAUAGUGAUUUUAAAAUAAAACAAGAAUUAUUGAGU
 601 AUCACUAUGUGAAGAAGUUUUGGAAAAGAAACAUAAGACUGAA **AUUUA**
 651 **AUUUA** AAAAUGUUGCAGCUCUAAAAGAAUUGGGACUACCCCUACUGCACU
 701 ACCAAAUCAUUUGACUUUGGAGGCAAAAUGUGUUGAAGUGCCUUAUGAA
 751 GUAGCAUUUUUCUAUAGGAAUAUAGUUUGGAAAUAUA **UGUGUGU** G **UGUAUA**
 801 UUAUUUAUAUCAAUGCAA **UAUUUA** AAAUGAAAUGAGAACAAGAGGAAA
 851 AUGGUAAAAACUUGAAAUGAGGCUGGGGUUAUA **SUUUGU** CCUACA **AUAGAA**
 901 AAA **AGAGAGA** GCUUCCUAGGCCUGGGCUCUAAAUGCUGCAUUUAACUG
 951 AGUCUAUGAGGAAAUAGUUCUGUCCAAUUUGUGUAA **SUUUUUU** AAAAUU
 1001 GUAAAUAUUUAACUUUCUGGUUUUGUGGGAAGGAAUAGGGAAUCC
 1051 AAUGGAACAGUAGCUUUUGCUUUUGCAGUCUGUUUCAAGAUUUUCUGCAUCCA
 1101 CAAGUUAGUAGCAAACUGGGGAAUACUCGCGCAGCUGGGGUUCCUG **CU**
 1151 **SUUU** GGUAGCAAGGUCCAGAGAUGAGG **UGUUUUUU** UCGGGGGAUUA
 1201 ACAAAAAC **AUUUUUA** AAAACUUACCUUUACUGAAGUUAAA **UCCUCU** AUUGCU
 1251 GUUUCAU **UCUCUCU** UAUAUGUACCAACAUC **SUUUUUA** AUUUUAGAUCCAAA
 1301 UAACCAUG **UCCUCUCU** AGAGUUUAGAGGCUAGAGGGAGCUGAGGGGAGGAU
 1351 UUAACUGAAAGCACCCUGGGGAGAUUGAUUGUCCUUAACCUAAGCCCCA
 1401 CAAACUUGACACCUGAUCAGGUCUGGGAGCUACAAAUUUC **AUUUUUCUC**

1451 CUCACUGCCCUUCUUCU GAGUGGCAUUGGCCUGAAUCAAGGAAAGCCAGG
1501 CCUUGUGGGCCCCUUCUUCGGCUUUCUGCUAAAGCAACACCUCAGCA
1551 GAGAUCUCCUUAAGUGACUCCAGGUUUUCCACCAUCCUUCAGCGUGAAUU
1601 AUUUUUAUCAGUUUGCUUUCUCCAGAGAAUUUUUAAAUAUAGAA GA
1651 AAUAGAAUUUUUGAAUGUAUA AAAGAAAAAGAUCAAGUUGUCAUUUUAGA
1701 ACAGAGGGAACUUUGGGAGAAAAGCAGCCCAAGUAGGUUAUUUGUACAGUC
1751 AGAGGGCAACAGGAAGAUCAAGGCCUUCAAGGGCAAGGAGAGGCCACAAG
1801 GAAUAUGGGUGGGAGUAAAAGCAACAUCGUCUCGUUCAUACUUUUUCCUA
1851 GGCUUGGCACUGCCUUUCCUUUCUAGGC CAUUGG CAACUGCCAUUUUGA
1901 GUCCGGUGAGGGAUCAAGCCAAACUCUUCU CUAUGGCUCACCUUAAUUUGGA
1951 GUGAGAAAUCAAGGAGACAGAGCUGACUGCAUGAUGAGUCUGAAGGCAUU
2001 UGCAGGAUGAGCCUGAACUGGUUGUGCAGAACAAACAAGGCAUUCAUGGG
2051 AAUUGUUGUAUUCCUUCUGCAGC CCUCCU UCUGGGCACUAAGAAGGUCUA
2101 UGAUUAAUUGCCUAUCUAAAAUUCUG AUUUUUU CCUACAUUUUCUGUUU
2151 UCUAAUUUGACCCUAAAUCUAUG UGUUUU AGACUUAGAC UUUUUUUG GC
2201 CCCCCCCCCCCC UUUUUUUUUU AGACGGAGUCUCGUCUCUGAGCCACAG
2251 GCUGGAGUGCAGUGGCUCGUAUCUCUGCUCACUGAAAGCUCGCCUCCCCG
2301 GGUUCACGCCAUUCUCCUGCCUCAG CCUCCU GAGUAGCUGGGACUACAGG
2351 CGCCACCACCAGCCCGGCUA AUUUUUUGU AUUUUUUAUAGAGACGGGG
2401 UUUACUGUGUUAGCCAGGAUGGUCUGCAUCUCUGACCCUGGUAUCCGC
2451 CUGCCUCGGCCUCCCAAAGUGCUGGGAUUACAGGCAUGACCCACCGUCC
2501 CGGCC UUGUUUUU CCGUUUAAAGUCG UCUUCU UUUAAUGUAAUCAUUUUUGA
2551 ACA UUGUGU AAAGUUGAUCAUACGAAUUGGAUCAAUUUGAAAUAUCUAA
2601 CCAAAGACAGUCGAGAAGCCAGGGGGAGAAAGAACUCAGGGCACAAAUA
2651 AUUGGUCUGAGAAUGGAAUUCUCUGUAAGCCUAGUUGCUGAAAUUCCUG
2701 CUGUAUCCAGAAGCCAGUUUAUCUAACGGCUACUGAAACACCCACUG UC
2751 UUUU GCUCACUCCUUCACUCACCGAUCAAACCUGCU ACCUCC CCAAGAC
2801 UUUACUAGUGCCGAUAAACUUUCUCAAGAGCAACCAGUAUCACUUCCU
2851 GUUUUAAAACCCUUAACCAUCUC UUGUGU CUUUGAACAUGCUGAAAACC
2901 ACCUGGUCUGCAUGUAUGCCGAAUUUGUAAUUCUUU UCUCUC AAAUGAA
2951 AUUUUAAUUUUUAGGGAUUCUAUUUCUAUAAUUUUCACUAUUGUAGU AUUUUU
3001 AUUUCCUUUAUUGUGUAAGGUGAA AUUUUAU GUAUUUGAGUGUGCAAGAA
3051 AAUAU AUUUUAUAGCUUUUC AUUUUU CCCCAGUAAUGAUUUUAGA UUUU
3101 UUU AUUAAAUAUACAGAA UGUUUUUU CUUACUUUUUAUAGGAAGCAGCU
3151 GUCUAAAAGCAGUGGG UUUUUUUU GCAA UGUUUU AAACAGAGUUUUAG
3201 UAUUGCUAUUA AAAGAAUUAUUUGCUUUUAAAGAAACUUGGUCGUUA
3251 AAAUAGCAAAAUUUGGAUGCGUAAAGUAA AUUUUA CAGAUGGGGAGA
3301 UGUAAUAAAACAUAUUAACUUGGUUUC UUGUUUUUG CUG UAUUUU GAGA
3351 UUA AAUAUUUCUAAGAUGAUCACUUUGCAA AUUUUUGCUUUAUGGCGGCA
3401 UGGAA AUAGAA UUA AUUAUGUC UUGUUU GUUUUAUUGGGAAUUAUUUGG
3451 ACAAUGUUUC AUUAUCAAUUUGUCGACAUC AUUAUUAUUAUUGUAAUGU
3501 UGGGAAGAGAUACAUUUUGAAGCACAGCUUUACAGAUGAGUAUCUAUG
3551 AUACAUAU UGUAAUAUAAAUUUGAUUGGGU AUUUAAAGUAUUAAGAGGUG
3601 GUUAUAAUUGCAGAGUAUUCUUAUGAAUAGUACACUGACACAGGGUUUUUA
3651 CUUUGAGGACCAGUGUAGUCAGGGAAAACAUGAGUUA AAAAGAAAGCA
3701 GCGGAUUAUGCAGUCUUGAUUUCUGCCAUUACAGGAUAGAUAAACGCCUGA
3751 ACUUUAAUGACAAGAUGAUCCAACCAUAAAGGUGCUCUGUCUUCACAGU
3801 GAAUCUUUUCCCCAUGCAGGAGUGGUCUCCCCUACAAACGUUAAGACUGA
3851 UCAUUUCAAAAUCUAUUAGCUAUAUCAAAGCCUUAUUAUUUUUAUUAUG
3901 GUUGAACCAAAAUUUCAAUUCCAGUAACUUCUAUUGUAACCAUU AUUUUU
3951 UGUUAUGUCUUAAGAAUGUUCAUUGG AUUUUUUGUUUGU AAUAGUAAAAU
3001 ACCGGAUACAUUUCACGUGUCCUUCAGUAUUGAUUUUGGUUAAUUAUUGGG
3051 UCAUAAUGGUUGAGAAGCAUGGACACUAGACCCAGAAUGCUUGGAUUAUGA
3101 AUCCUGGACUGUCACUUAUCUUC UCUGUC ACCUUUGAAAGGCUACUUAUU
3151 UCCUCUCU UAGCUUUUCUAUUA AAAUCAUAGAACA AUGCCAGCCUCAUGG
3201 GGUUGUUGAAUG AUUUAAUAGUUACUAUACC UAAAGUAC AUAGAA CACU
3251 GCCUGCAUAGUAAAAGA AUUAU AAGUGUGAGGUAGUUGGUAUU AUUAU
3301 GU

DSG1

>uc002kwp.2_3UTR

1 UCAGGACCCAGCUCACUUUUCAUAGUCAUUGGGUUUAGAUCCAAUUC
51 CCACCACUAAAAAC CAACAA UGUG AUUUUA AACGCACAACUUCGUGCUC
101 AGGUCAUCUAGGAGCAAGGUGAGAA UUCACA AUGAGAAAAUAAAUGGAA
151 ACACCACUGCUAGGGGAGAGCUCUCCUUAGCAUUCUAUAAACUUUUCUCUU
201 AUUUUAGGACUAAGGAACUAAAACUUGAGGCAGAG UCUUCU UUGUGCCUG
251 AGUGCCUGUAGUCCAUUCUCCAGCAUGUAACUGGCCUUACGAUGGCAUU
301 GGCAUCAUUCUCCUUGCUC UGUUUU GCUUUUCCAUAUAGCUCGAGCAAAA
351 UUCAAAAAGAACUAAAUAUGCAAUAUUAUGUUAUUCUAUUGGGAAAAAUC
401 UAAAA UGUGUG CCAGAUGCCUGUUGGUUUUCACAGUAACAUAUAAAA
451 AUUCAACCACAG AUUUUA ACAAGGGUUAACC AUUUUUUUUA AGUUUGACU
501 ACAUAGUCAAGUCCACAAGCCAUAAGCACUCCUACCUUA AUUAUUGCAC
551 UAGAGAAAAUAAAUCCAA AUUA GGAAGUUUCCUAGGAGGAAAAUUC
601 AUU AGAGA UGGCAAUAGGAUGAGGUUUUCUUCAGGGUAAACUAGCAAUGC

651 CUGAGCCUGAACCUUAAUGUGGGGCCUCAGUAAAUCUCCUGUGGAGUCA
 701 AGGAUUCUUCUGAUUCUAGUGUGUUUUAGUGAUAGAUGUAGUCUUGACG
 751 AAUAUUGCUUUACUGGUGAGGUUGAGGAAUAUCACACUCGUCUUCCUUU
 801 ACCACUGUGGUUUUGACUUAAGAAAGCAAACUCACUAAGUUUACUUCUC
 851 GAAUUGAAGCAAGUGAGGCCUGACUUGGUUGUCAUCACUAGUGGCAAUUG
 901 ACCUCCAAGUAAGCAGAUGGGAAACUGAAUUGUGUUUUCAGGUUUUGUU
 951 UUUGUAGGUGAAUUAUUAUUCGUAUCCAGCUCUUUAUUACAUAGCUCUGAA
 1001 GUAAAAUGAUUUACAUAAGGCCGAGCUGUGGACAAAAAAGAGCAG
 1051 CAGCUUGUAGUAGCUUAAGCUUUGGGGAAUUUUUUUUUAGGGGAUCUA
 1101 AAAAAUGUUUUUGAACAUGUAAAUGUUUAAUGGUGAAAGUUGGAAAA
 1151 GAAUUCUUCUGUAAAGUAAUACCAUGCUAAUUUAUUCGCUUUUAGUAAGUA
 1201 AAGUAGUAGGUUUCUUUAGCAAACCUUGCUGCCAUUUUUGCAGGAUACAAC
 1251 CAGGAACCUUUAGCAGAAUUGACAAUUGGUGUUGAUAGCAUGAAUAA
 1301 UAAUAGAAACCUAUUCUGCUAGUUUUCUACCCUCUAAUUUUUCACACU
 1351 AGCAUAAAUUUUAAUUCUGAUUUUGAUUUUGCAAUAAGAUCUUGGCUUA
 1401 UAAUUGCUGAUUUAAGGUAGUGCCAAUUUAUUAUAGUAUAACAUAUUUU
 1451 UCUAGUUUCAAAAUUUAGUAAUGUCUAUUUAUGAUUAUCAUUUCUGUG
 1501 UGUUUGCUAUGUAGUAUUACCCAAUUAAAAUCUCUAAAAAGAAUUUAAG
 1551 CAUUCUAAGAAAAAGGUAAUUUACUAUGCAUGGUACAGAAAUUUUUC
 1601 UUUUUAAUACAAUUUACUAUAAGCUCACUAAAAUGAAACUCUUAUUG
 1651 ACAAUUAAAUUUAGAAAAAAUUUGCCUGGAGUUGUGAAUUUAUACA
 1701 ACUUUUAAAGAAAUUUACCCAAAUUUACUCAAUUUCCAGGAAAUUUACAAA
 1751 GCCAAAGAAUUAUCAACUUCCUCCACUGGUCAAAAGGGAUAGGAGUGAA
 1801 UUUCUGAACCUGAGCUAUUUUGCUCUGAACAACAGAUAAGGCUAUUAU
 1851 UUUAAAGCCACAGUAUACAUCUUCUUUUAACUCUGUAGAAUUGUAAAA
 1901 UUUUGAUAGUCUGUAGUAUGCUAAUUGCAGAAGUAUAAUAAAGUCAUUC
 1951 AAAGGGAGUCUUUUUUUUUCUGACACUUAGGGGGCCACAUAAGGAUUG
 2001 GAAUUCUUCCAGGAUAAAGUCAAAAGGUAUUUAUUAAGACUAUCUUGA
 2051 GUAUGCCUGGGUCCAGGAGUUUUAAAGGAUAG

DSG2

>uc002kwu.3_3UTR

1 ACAGCAGUCAGCCACAAACUGACCCAGAGUUAAUAGCAGUGACUAAUU
 51 UCAUGUUUCCAAUGUACCCAUUUUUCAUGAGCCUACAGACACACAGAG
 101 ACACAUAACAUAUGAUUUAAAAUUUUUCUCAGUCACUGAUUAGCAAAGG
 151 ACCACAGUCUCUGCUUCCAGGAGUUUUUUAGAAUUGUCCACAAUUUA
 201 CUGAAGACAUAAGAGAUGAUGCUGCUGCUUAGGUGCCUUUAGCAAGCUAU
 251 GCAAACAUCUGAUAAAACAAGAUACAAGAGAUCAAUUCUGGCUUCUG
 301 AGAAUUUCCAAGUGAACAGAGUACCUAGUUAUCAGCCGUCAGUAAAG
 351 CAACCAGGAACUGACUGGGUCUCUUGCCUACCGUAUUUAACAUUUAAC
 401 AUUGAUGUUCUGAUUUCUGUACUUUACUGCACCCAGCAGACUUCAACA
 451 CUCAUUGAUCCAAGAUACAUGCACAGUCUGAGCACCAGCUAUGGUGCUC
 501 AUAACUUCUUUAAAGACUUGAACCCUUUCAUUCUGUGUCAUUCAUUAAAA
 551 GGACCAUUGAUAGAUAAGAAUACAUAUGUUAUGUUAUUCUGGCACUAGACAC
 601 UGUGUGUGUGUGCACGUACAUAUCUGUAUAGUCUAAAAAAUAGCAUUUAUAC
 651 UGGCCAGGGUGGUGGCUAACGCCUGUAUCCAGCACUUUGGGAGGCCG
 701 AGGCGGGUGGAUCAACUGUGGUCAGGAGUUUGAGAUCAGCCAGGCCAAC
 751 UGGUGAAACCCGUCUCUACUAAAAUACAAAAAUUUAGCUGGGCGUGAUG
 801 GUGGGCGCCUGUAAUCCAGCUACUUGGGAGGCGUGAGGCAGGAGAAUAC
 851 UUGAACCCGGGAGGCGGAGGUUGCAGUGAGCCGAGAUCCGACCAUUGCAC
 901 UCCAGUCUGGGCAACAGAGUGAGAUUCCGUCUAAAAAAGAAAG
 951 GAAAAAUAUAGCAUUUAUACUCUUCUCUUGUCUCAACCGCAUGAAAAU
 1001 UCUGAACCCCAAUUCAGUUGAAUAAUCCAAAAAUUUAUAGUA
 1051 UAAAAUAAUUUUCUUCUUAUAGUAAUAGUAUACUUAAAAAGCCUCAGG
 1101 GUAUAUUUAUCUUCUAAACAGCUACAUAUCAGUCAGCUACAUUUAACCAAC
 1151 UAUUUCUCUAGUUGAGAACAACUAGGCCUAUUUCACUGCUGUGUAGCCU
 1201 CAGUGCCUAACAUGGGUGCCAAUAAUUAUUCGUAGAAUUUAACUGAAUU
 1251 GUAAAAACCAUUCGUUUUUGUUUACAAUUUUUGCCAAAAUUCAAAAAGGCC
 1301 UGUAUUUAUGUAAUUCUUUGAAAUUUAUUUUUUAUUUUGAUUUCUCAGUU
 1351 AUUGACUGGCCUGGGUGGACUUAGUACAUAAGUACUCAAAUUUAUAAAAA
 1401 CCUCAAAUAAUUGACUUGAAUUUUACACAACAUCCUCCUUUUUCAAG
 1451 UUAAUUUUUUUACAAAUCAUUUGGUUAUCUCCUAAAAUAGGUUAUAUUU
 1501 AUUGUUCUAGAAACAAGUUUCAAAUUAUUGUGCAUUUAUCAGUAAUAA
 1551 UUUUGUAUAAAUAAUUCACAACAUUUUCAUAAUUUCAAGACUAAUU
 1601 UCUUGACUGAAGAUUUUUGCUAGGGAAGUAAACUUAAAAUUUUGUAG
 1651 AUUUUAAAAAAUAAUUGUAGUAGGUGUCAUGCAAAGGAUUUAUAUAGUGU
 1701 GCUCCCAUAACUGUACAGAUACAGGACACAAUUUUUAGACAUCUAAAGUC
 1751 UGUAGCUUAAAUGGAGGUUAUCUUCUCAUCAUCUAGAAUGUUUUACUUAG
 1801 UAAUUGUGUUUUCUUUUAUUAUUUAUAGACUUACUAUCAGUUUUAUUUUGC
 1851 CAAGUAGCAAACAGGUAAUACACUAGUAUAUGAAAAUAGUAAUUAUCACUU
 1901 UGUACUCAAAACAAAGUUGGUCUUAAAGCUUCCACCUUGAGCAGCCUUGG
 1951 AAACCUAACCGCCUUCUUUAGCAUAAUCACAUUUUUCAAAUAGAUUUUCU
 2001 UUGUUCUGAAAAAGUGAUUUUGAUUAGUUUUACAUGUUUUUUUGAA
 2051 AUUUAUUUUGUAUAUGUAUCAUCAUAAAUAUUUAAAUAAAAAGUAUCUU
 2101 UAGAGUG

DSG3

>uc002kws.2_3UTR

1 CCAGAAUGAGCUGGAAUACACACUGACCAAUUCUGGAUCUUUGGACUAA
51 AGUAUUCAAUAUAGCAUAGCAAAGCUCACUGUAUUGGGCUAAUUAUUUGG
101 CACUUUUUAGCUUCUCUCUAUAAACUGAUCACGAUUAUAAUUUAAUGUUU
151 GGGUUCAUACCCCAAAGCAAUAUGUUGUCACUCCUAAUUCUCAAGUACU
201 AUUCAAAUUGUAGUAAAUCUAAAAGUUUUUCAAACCCUAAAUAUUAUU
251 CGCCAGGAAAUUUUCCUAAACAUAUCUUAAGCUUCUUAUUUUUCCCCUGCCA
301 AAGGAAGGUGUUUAUCAUUUUUAAAUGCAAUGUGAUUUUAGUGGAUUUAGC
351 AGGAGCGCUGGUUCUUGUCUCCAUUGCCUUUUUCUUAUAUCAUUGAUAAUG
401 AUGUAAGAUCACAGGGGGCCGGCGGGGUGGUCACGCCUGUAUCCCA
451 GCACUUUGGAGGCCGAGGCAGGUGGAUCAUGAGGUCAGGAGAUUCGAGAC
501 CAUCCUGGCUAACAAGGUGAAAACCCGUCUCUACUAAAAUAACAAAAAU
551 UAGCCGGGGCAGUGGGCGGGCGCCUGUAGUCCAGCUACUCGGGAGGCUG
601 AGGCAGGAGAAUGGCAUGAACCCGGGAAGCGGAGCUUGCAGUGAGCCGAG
651 AUUGCGCCAGUCAGUCCGACUCCGCGCCUGGGCGACAGAGCGAGACUCC
701 GUCUCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAUCACAGGUUUUUCUAAAAGCAU
751 UUUAGCUGCUUGGAAAAGGGAAGUAGUUGCAGUAGAGUUUCUCCAUUC
801 UUCUUGGUGCUGGGAAGCCAUUAUUGUGUCUUUUACUCAAGCUAAGGGGU
851 AUAAGCUUAUGUUGAAUUUGCUACAUCUAUUUUUACAUUUUCUACA
901 AUAAGCAUAUUUUGAAUAGAAUAUAUCUAAGAAUUAUUUAGAAAGUUUAG
951 UAUAAAUAUAUUUUUGUGUUUUUAUCCCUUUGAAGGGAUCUAUCCAAA
1001 GAAAAUUAUUUUUACACUGAGCUCCUCCUACAGCUCUACAGUAAACAGAUCCU
1051 GUGUUAUGUCUUUGAAAUAAGCUCUUAUUUUUUUAUUGCAGUGAGUAGAUGU
1101 AGCAUACAUAUGAUUGUAUUCUAAGACGUGUAUUUAGUUUAACAAGUCUGCAG
1151 AUUUUGUAGGAAUACAAAACAUUGGCCUUUUUUUAUAGCAAAAACGGGCCAA
1201 UGACUAGAAUAACAUAAGGCAAUCUGUGAAUAUGUAUUUAUAGCAGCA
1251 UCCAGAAAAGUAGUUGGUGAAAUAUUUCAAGUCAAAAAGGGAUAUGG
1301 AAAGGGAUUUAUGAGUAACCUCUUAUUUUUUUAGCCUUGCUUUUAAUUUA
1351 ACAGCUACAGCCAUUUUAGCCUUGAGGAUAAUAAGCUUGAGAGUAAUUA
1401 UGUUAGGUUAGCAAAGGUUUAGAUGUAUCACUUAUGCAUGCUACCAUGA
1451 UAGUAAUGCAGCUCUUCGAGUCAUUUCUGGUAUUCAAGAUUUUACCCU
1501 UUUGCCAUAGAAAGCACCCUACCUCACCUGCUUACUGACAUUGUCUUAG
1551 CUGAUCACAAGAUCAUUAUCAGCCUCCAUUUUUCUUUACUGUAUAUAAA
1601 UACAGAGUUUUUAUUUUUCCUUUCUUCUUUUUACCAUAUUUCAAACCU
1651 AAUUGUUUUUUCAGAUUGGAAUGCAAAGUAAUUCAGUUGUUUCUUUC
1701 ACCUAGAGGUGUGGUCCUGAAGGAAAGAGGUCCCUAAAUAUCCCCCA
1751 CCCCUGGUCUCCUCUCUCCUUGUACCCUAGCUACCAAGGAAGCAGGU
1801 GCUAGAGCAGCUGGAGAAGUGCAGGCAGCCUGUCUCCACAGAUGGGGG
1851 UGCUCUGCAACAAGGCUUUCAAUGUGCCAUUUUAGGUGGGGAGAAGCUA
1901 GAUCCUGUGCAGCAGCCUGGUAAGUCCUGAGGAGGUUCCAUGUCUCUUC
1951 UGCUGCUGCCUUUGCUUUCUACAACGGUGGCUUGCUCUACAGUCUAGAGCA
2001 CAUGCAGCUAUCUUGUCCUCUUGCAUGAGGGUUAAAUAACAAC
2051 CAUAACCUUCAUUUGAAGUUAAGGUGUAUUCAGGAUCCUCAAAGCAUU
2101 UUAACCUUGCCGUUAAAACCCAAUUUUACCGUGAAAUGGGAAUUUUGCUG
2151 CAUUGUAAAACUGUAGUGGAAACCAUGCUUAUAGUAAAUAAGGUUAUUA
2201 GAGAGAUAUUGAAAUAUAAUGUUGUUUUUAUUUCAAUAAAUAUCAAUC
2251 UUUAGGAUGACUAAAAAUUGAUUUUGCCAUGUAAAUGUAUUCUGCAUUUU
2301 UUAACAACAACUUGUUUAAGCAUAAAUUUUUAAAACUGUACUACUUGAU
2351 GUUUUAUACAUUUUUAGAACCAUAGUUAUUAAACCAUAAACAGUAAUUGUU
2401 GUUAUAAUAAAACAGGCAAUAAUUUUUAAAUAUAAAGCUG

DSG4

>uc002kwr.2_3UTR

1 GUGCUUUUUGGUCAGUAUUCUAUGUGGAGACCUUGCACCUGUUAUCAUC
51 AAUACAUCCACAAAAUAUUAUUAUGUACCAUAUUAUUUAUAGUCAACA
101 AAUACUCAGAUUUUCUAAAGGUCUAAUGCCAUUUUUUUAUUAUACCAUUUG
151 AGGGUGAAUAUGGCUAGGCACUUUAGAUAAAGCCUUUUUAUAAUUCUUUCU
201 GAUUUUUAAAUAUGCGUCAAAAAAUGUGCAGAAAAUGUAUUGCAUCCUU
251 GAUACUGUCUAAAGAAUAGCACAUAACUUAUUGGAAUCCUUAUGGGUC
301 UUGAGGCCUGUAGAACCAAUCU

DSP

>uc003mnp.1_3UTR

1 UAGUCAGUUGGGAGUGGUUGCUAUACCUUGACUUCUUUUUAUGAAUUUC
51 CACUUUAUUUAUAUAUAGAAUAAAGAAAUCGCGUGCUUGCAGUAGAGUGA
101 UAGGACAUUCUAGUCUUAACAGAAAUAUAGCCAUGAUUGAAAUCAAAUAG
151 UAAAGGCUGUUCUGGCUUUUUAUCUUCUUAAGCUCAUCUUAUUAAGCAGU
201 ACACUUGGAUGCAGUCGUCUGAAGUUCUUAUCAGUUGUAACAAUAGCAC

251 AAAUCGAACUAGGAUUUGUUUCUUCUCUUCUGUGUUUCGAUUUUUGAUC
 301 AAUUCUUUAAUUUUGGAAGCCUAUAAUACAGUUUUCUAUUCUUGGAGAU
 351 AAAUUUAAUUGGAUCAUGAUUUUUUAGUCAUUCUGUCUUCUCAUUAUAAU
 401 AUUUCCAUAUUCUGUAUUUAGGAGAAAUUUACCCUCCCAGCACCAGCCCC
 451 CUCUCAACCCCAACCCAAAACCAAGCAUUUUGGAAUGAGUCUCCUUUA
 501 GUUUCAGAGUGUGGAUUGUAUAACCAUAUAUCUUCGAUGUACUUUAGGUGU
 551 GGUUUGGAUUAAUUUGACUGUGCAUGACAGCGGCAUUCUUUUCUUUGGU
 601 CAAAGUUUUCUGUUUAUUUGCUUGUCAUAUUCGAUGUACUUUAGGUGU
 651 CUUUUAGAAUUUGCUAUUCUGGCAUAAACUUUUAGACUUUUGAAGUGU
 701 UUGUGUUUAUUUUAAUAUGUUUAUAGCAUGUAUAACAUUUAGCAUUA
 751 UUUUAUCAUAGGUCUAAAAUAUUUGUUUAUAAAUAACCUGUGAAGAAU
 801 ACCAUUAAAAAACUAUUUGGUUCUGAAUUCUACU

JUP

>uc002hxs.2_3UTR

1 GCGGCCUGGCCCCAGUACGGCCCCCUUUGCAGGCUUUUCCUCCUCUCU
 51 AGAAUCCUUCUGUUGGAGCCUCCCAUCUCCCGCUGAAACCUUGCGC
 101 UCCUUUUUGGGGGAUCCUUGCUGCUGAGCUUCCCAAGCAGGGUGUG
 151 CCCUGGCCUGCCUUCUUCUGUGUCUUUGGUGGGGAUGGGGAGCCUAUU
 201 CCUGCUGGCCCUUUCUGGGGUGGUGGGCAGGUGACACGGAGUGGCUGA
 251 GCUUCUGGGGAUGCAGGUCCACCGAGUCCUAGCCUUCUGUCCCGC
 301 UCCCCUAACAGGUGCGGUUCCUCAUCUGAGAGGCUUCUCCGUGCAGGCGAU
 351 GGGGCAAGACAGAAAAGUGCCUGAGCUGGGGAAGCCGGGGUGUAACUUC
 401 UGCUGCACCCUGCGCCUCCAGAGUCCUUGAGGGUCUUUCUUGGGAUA
 451 GUGUUCUGCUCUGCUUUUCUGUCCUGGGCAUAGGUCAGGGCCUGACAC
 501 CCCUCCCCGCCCCUGUGGCCUUGGCCACUAAAGCUUCAGACUCAAGUAC
 551 CCAUUCUGUUUCCCCCAGCAACGCCUCCAAACCUCCAGCCUCCUGU
 601 CUCACGUCUGCCUGGCCCGAAGGGCUUUGGUUCCUUCUUGGGCUGAU
 651 UUUUCACUGAACUCCACCGACCAACUGCCUUAAGCCCCAGGGCCUCCA
 701 GGGCCAGGUUCGAGACCCAAACCCCAAAUCCAAAACUUCUCUUGAAA
 751 AGUUCAGGGACCGUCCAGGGGAGUUGGGGAGGAGUAUUGGAGUGAGUC
 801 CUGCUCGAAAGAUCCAGCUUCUUCUCCAGGGUGCUUAGUUGGCUUUG
 851 CCCACCCUCACUCCCGAGGAGCUCUGGGGACAGCUUCCUACAACCCU
 901 GUCCACCCACACAGCUGCCUAGCUGACCCCGAGAAGUGCUUUGGCGU
 951 ACCCCUCUGUGUGUGUGAGGGGCUUUUCUUCUCCUUGUUUCAGA
 1001 ACCCCCAUUUCCGCACAUGGUGUGGGGGGUGGGGGAGGUCCAAACAG
 1051 AGUGUUUUAUUUAUUCGUUAUUGUUUUUGUUAUUGUUUUUUGUAU
 1101 AGACCAAAGCAAAGAAAUAUUUAUACACAGAUGCG

PKP1

>uc001gwe.2_3UTR

1 GAAGAGACUGCCAAGCAAGUUAGGCUUGCAGGAAGAUUAGCCACGCU
 51 AGAAGCCUCAGGCCUCGUGGAUGGGUUUUCUGUCCAUCUUAUGCAGU
 101 AUUUGGAAAGUUCACAAGAAACUGAGAAGAAACUAAAAACUUGGGAUA
 151 GUGGAAAGUUUUUAUAUUUUUUUUUUUUCUUGGGGAAACUGGCAGGCAU
 201 GGGGUUAGGGAGGUUGGGGCGGUGGGGCUUUCUUGAGUUAAGGGGCU
 251 UUAUUGUGAUGUCAUAUUUCUUCUUCUGAGAAAUGGUAUAUAUUGUGU
 301 AUAUGUAUUGUGUGCAUGCAUGUGCGCGUGCAUGUGUGUGUGUGUGAG
 351 UGUCUUAAGCAUAACCAACACAAACUGCAAAAAGCUAGGUUAAGCUAUAUUGU
 401 UGCAGCUCAUAAGGUGGUGAAAAGGACUCUCCUGUUGUUUCUUAUCUAUG
 451 GCAAGGACAACAUGUGUUGUUUGUGAGCUGCUCUAUAUUCUGAAAUGU
 501 GUGUGCCAGGGCAAGGGGCAUACUGCAGUCAGGCCUCCAGAGGAGU
 551 CCUGCAGGUUCCUACCAGUGGUCUCCAGGGGUGCAGGAGUAACUGGGG
 601 UGGGCCAGCCUCCCAUUAACAAGGUGCUUUCAGGAAGGAGGUCUGG
 651 UGUUUCUAUGGGGAAUUCUGGGGUGUCUGUAUUGUCACCCUCCAGCAG
 701 CGCCACAAGGACUGAGGUUGGUAUGGUGGGGUUCCAGAGGACAGCAGG
 751 ACACUCUGCAUACUUUGCCAAAUGAGGCCUGCUCAGAGGAGUAAGGAGCU
 801 GAAAGAUUGGUCUCCACCUCUUGGGUGUGUGCCCAUCAGAGCAGGC
 851 UCAGCCUGCAAGGCCUUGCAUUCAGAGGUUCUUGUAUUCUUCUUGCA
 901 GGAGAAAGAGGUAAAAAUGUUUUUUUUAAGAAAAGCUAUAUUUAUUGCA
 951 GCUCUUUCCCAAGAGCUGUUCUGGGAAUGGCUUGGUCUUAUAUUCAGU
 1001 GGAGAGGGGAAACAGUGGGGUGGGCAUAUACCUAUUCCGGCUUCUAGUG
 1051 GGAUGGAGUUGGGUUAUAGAAUAUACCAAGGAAGUUGUUCACCAAGCC
 1101 UGCUGAGUCAAUUGAGGGGUGUUGGUGCCAGGAGACUUGGACGG
 1151 GGGAGUUUGGGUAGACUAAGGAAAGGAAAGUGCCAUUACAGGGUAACCGGU
 1201 ACCGGAAGCUCACAUUCAGCCAGGGGCAUGCCCCACUUCCCCUACC
 1251 CCAGCUGUCUUGUCUCCACUCUGGAAACCCACAGGGGAUGUAUAAACA
 1301 GGGCUAUAAGGGUAUACAGCCAGUCGAGCCCCAGACUCUGUGCACUUC
 1351 AGACCAGCAGCAGCAGGAGGCUCCCGAGGGCCUUAUGAGAAAACCUUGG
 1401 UGGACAUCUUCUGGUGUACUAAGACAGAGCAGGCCAGCGCUCCCAA
 1451 GCCUUCUCCUUCUCCAGCUUCUCCUCCUUGCUAGCAUUGCUGGUGUUA
 1501 GAGGAUUUAACUUCUGGUCUGUGCCUUCUCUUAAGAAUAUAAGAUUG
 1551 UCCUCCUCUCACCCCUUCUCAGCCUCCUCCCAAGUCUUCUUCUUCGCA
 1601 CCACCCCGAGUCCAAACCCACCUUCUGCCCCAGCAUUCAGGCGGAAAA

1651 CACUGAUGUGGACUCAGUAUGAUAAACUGAGAUGGGGGACGCCAGACAUGU
 1701 GAGGACGCUGUCCUCGGAGAGGUGUCCCCGGCUGUUAGCCAGCUGUGCUG
 1751 UGUGCGGGGAGUGUCUAACCCUCCUUGCUUUCUGUUCACACUGGGAG
 1801 GCCCACUCCUGGCUCACCUCUCCUCUCAGGGACCCACGUGGGAGCCUGG
 1851 AUCCUUGGACUGUCCUGGGCAUAGGUUUCAGGGGCCUCCUUUGUUGUCAU
 1901 CAGAACCAGAGGAAUUCUUCUCCUAAAAAUACGUUAGGCAUACCAAUC
 1951 UGUGCGGGGAGUGUCCUAAGCACUAGACUACAUCAGGGAAGAACACAG
 2001 ACCCAUCCUUGUCUCAUGCGGCUUAUGUUUUCUGGAGGAAAGUGGAGA
 2051 CACAAGUCCUUGGCUUUAGGGCUCUCCCGGCGUGGGGGCUGGAGUCCGG
 2101 UCAGGGCGGGAGGGGAAUAGCACCGCUGCAUGUGAACCUUACCAGCCAG
 2151 GCGGAUGCCCUUCCCUUAGCACUACCCUGGCCUCCUGCAUCCUCCUGC
 2201 CUCAUGUUCCUCGCACCUCAAAGAAUGAAGAGCCCAUGGGCCAGCCC
 2251 CUGCCUCCUGGGAACCAGGCAGCCUUCAGACCUCAGGGGCUGAGGCAGACU
 2301 AUUAGGGCAGGGCUGACUUUGGUGACACUGCCAUUCCUCUCAGGCCAG
 2351 CUCAGGUCACCCGGGCCUCUGACCCAGGCCUGACUUUGAGAGGGGCAA
 2401 AACUGAGAGGGGCUUUUCCUAGAGAAAGAGAACAAGGAGCUUCCAGGCU
 2451 UCAUGUAGCCGACACACGUCUCAGGAUUUUUAAGUCCACAUUGGCCUCACA
 2501 CUACCAGGGCCAAUGGCCAAAAUAAGGAGUCCAAUUUGGGGCCAAUAGA
 2551 GGAAGGACACAGACUCUGCCUGGGAUCUCCUGUGCUAGCGGCCAAUAGC
 2601 AAUCCAGUCAUUGGCCACCAGCCACCUCUGCAGUGGGGACCACACUAGC
 2651 AGCCUGACUCCACAUCCUCCUGGGGACCAAGAGGCAGUUGCUGUC
 2701 UGCAUGUCCACCUUGGAAUCUGGCUGAACUGGCUGGACAGGACCAAGACUG
 2751 CGGCUUGGGUGGGCAGGGAAGGGAAGCCGGGGGCGUGCUGAGGGGAUCUU
 2801 GGAGCUUCCUGUAGCCACCUCUCCUUGCUUCAUGUUUGUAGAGGAAC
 2851 CUUGGCGGCCAGGCCAGUUUCCUUGUGUGAUACACUAAUGUAUUUGC
 2901 UUUUUUUGGAAAUAGAGAAAUCAUAAAUUGCUAGUGUUUCUUUG

PKP2

>uc001r1k.3_3UTR

1 GAAAAUGACAAAGUAUUCUCGGCUGCAAAAAUCCCCAAAGGAAAACACC
 51 UUUUUUUCUACUACCAGCCCAAGAAACCUCAAAGCAUGCCUUGUUUCU
 101 AUCCUUCUCUAUUUCCGUGGUCCCUUGAAUCCAGAAAACAAAUAGAACAU
 151 AAUUUUUAUGAGUCUUCAGAAAGACCUUUGCAAGUUUGCCACCAGUAGUA
 201 CCGGCCACAGGCUCGACAAUAGUGGUCUUGUUUAUUAGGGCUUAUGGUA
 251 CAUGGCUUCCUGGAAUCAAAAUGUGAAUUCUUGGGAAGGGACAUUUAUC
 301 CAAUAAUAAGGAAAGAAGCUGUUGCAUUUACUGGGAUUUUAAAAGUUUGA
 351 UUUACAUUUAAUUCUUUUUCUGGUUCCCAUGUUUUGUCACUCAUGUGCA
 401 CAUUGCUUCGCCAUUGGGCCUCCAGUGUAUUGUUCUGCAGUGUUGAAACA
 451 GAAUGGAAAUGACAAGAAUAUCUGCAGUUAUCCAGGAGAAAUAUAAUG
 501 GCAAAUUUAUUGGUUUUCUUUACUUUGGCUUGUUUUUAUCCCUUG
 551 GGUUGUUUUUCUCUGAUUUUUAAAUAAACUUAAGAAUUUAAGAUUUACAGA
 601 GUAUGCAUGACUGUAAGAAAAGAAAUGAGAGGAAGUGAUCUAGCAAA
 651 UUUAAGAAAGUCUUUUCCUCGCAGAACUUAAGUAAAUAUUUUUAAAUA
 701 AAUAAUAAAUUCUUUCCACAGAGAAAGGCAACUGUGAUGAUAAUUUU
 751 AAUGUCCCCCAAACACUGAGUCAUAGAGAUUUUUCUCAGGAGAUACUUU
 801 ACCUAUACACACGCCGUAAAUCCAAUUUCUUCAAACGAUGGCAUUCU
 851 AUGUAAUGCCUUUCCUGGACUUUUUUGGCCACUGCCUUGGACUAGUGAAA
 901 GAAUGGACUCUAUCUUUUCUGCAAGGAAACUAAGGCCUUCUCUCAGAC
 951 UGCCUGGCCAGCCUGGGGCACUGAAAUAACGGCUCUAGUUAAUGAGUUAC
 1001 AUUUAUCAGCCAGCCAGCCUUGCCACCAUUUAAGAAAAUCACAGAGCC
 1051 ACUAGAUUCUAUAGAUCUUCUUCAAGCCAUUUUUUUAACUCAAGAAAAC
 1101 UCUAGAGAAGAAAUGAGAAGGUAUGUUUGAAGAGAUGUAAGAAUGUG
 1151 UCAAGACCAUCCAGAAAUGUAUAGAGAAAUAUCUGAUUUUUUAAUUGGUUG
 1201 ACAUCAUCCAGCGAAAUGAAUCUACAUUUAAAUGUUGUUUUAACUGCGCUA
 1251 UGAUUUAAAACCAUUCUAUAGAGUUAGUCUUUACAACUACUUUUGUUUA
 1301 UUUUUUUUUUUAAUCUGACAACAUUUGUCCUAAGUAAGAAAGCAAAAAA
 1351 AUUCUUCAACUCCUUUUGGCAAGAAAACUGUAACAGAAAUAUUUUUGA
 1401 AUGUGUACUUAAGUCUUUAUUAUAUUUGAAGCAUUUUUUUUCAUUUUUA
 1451 AAAGCUGAAUGAAGACAACUUAGGUUGCUAACCUAGUUCAAUUUUUU
 1501 AUUUAGAAUACCAUUUUUUAAAUAUCUGCAGAGAAUUUAAUGUCUUUUUC
 1551 CAGAUUCUGAUGAUAGCAUUUGGAGUGCAUUUAUUCCUCGAGAUAAUA
 1601 AAUGUGUGUUCAGAACUUUUUGUGUUUUUAAGGCAUUUAAAUAAAGCCUUC
 1651 GAUAAUUUUAAAUACAAAUGAGACC

PKP3

>uc001lpc.2_3UTR

1 GUGAAGCCUUCUGGAGGAGAAGGUGACGUGGCCAGGUCUCCAGGGACAG
 51 ACUCAGCUCAGGCUGCUUGGCAGCCAGCCUGGAGGAGAAGGCUAAUGA
 101 CGGAGGGCCCCUCGCGUGGGGCCCUUGUGUGCAUCUUUGAGGGUCCUGGG
 151 CCACCAGGAGGGGAGGGUCUUAUAGCUGGGGACUUGGCUUCCGAGGGC
 201 AGGGGUGGGGAGGGCUAAGGCUGCUCUGGUGUAUUGGGUGGGUAGCCC
 251 AGUCACAUUGGCAGAGGGUGGGGUGGCUUGGCCUGGCAGUAUCUUGGG
 301 AUAGCCAGCACUGGGAUAAAGAUGGCAUGAACAGUC

Regulatorische Elemente nach Lee et al. (2010) in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte

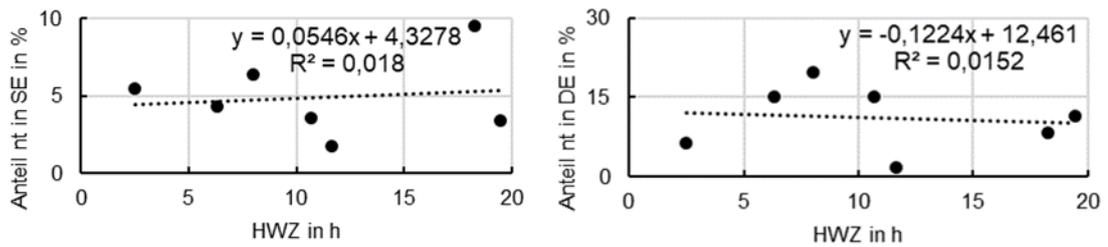


Abb. 25 | Korrelation der HWZ mit SE und DE nach Lee et al. (2010). Durch eine einfache lineare Regression konnte eine Korrelation des Anteils von Nukleotiden die SE bzw. DE bilden an der Gesamtzahl von Nukleotiden der jeweiligen 3'-UTR und der HWZ des entsprechenden Transkripts nicht eindeutig festgestellt werden. **Abkürzungen:** DE, Destabilisierende Elemente; h, Stunden; nt, Nukleotide; R², Korrelationskoeffizient; SE, Stabilisierende Elemente.

Tab. 37 | Stabilisierende Elemente nach Lee et al. (2010) in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte. Gezeigt ist die Anzahl der einzelnen stabilisierenden Elemente (SE) in der 3'-UTR des jeweiligen Transkripts. Bei sich überschneidenden Elementen wurde jeweils das erste vollständige Element, die Angaben in Klammern geben das Ergebnis der Zählung aller sich überschneidender Elemente an.

SE	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3	Summe	Motiv
CACACA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2
ACACAC	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
CUCCUC	1	1	1	0	0	1	0	0	1	3 (4)	0	0	0	8 (9)
UCCUCC	0	0	1	1	0	1	0	0	2	6 (7)	2	0	0	13 (14)
AGAGAG	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	5
CUCUCU	0	4	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	8
UCUCUC	1	5	2	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	11
GAGAGA	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	4
ACAACA	0	3	0	1	2	0	0	0	0	1	1	0	0	8
CCUCCU	0	0	3	0	0	0	0	0	2	6 (7)	0	0	0	11 (12)
CAAUUG	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
CUCUUC	0	1	1	0	2	2	0	2	1	1	1	0	0	11
CCCCUG	0	0	0	0	0	1	0	0	4	2	1	1	1	9
AACAAC	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	5
AUCACA	0	2	1	2	1	3	0	0	0	0	1	0	0	10
AUAGAA	0	0	5	1	0	3	0	1	0	1	1	0	0	12
CAACAA	1	2	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	9
UCUUCU	0	2	3	4	1	0	0	2	1	2	2	0	0	17
UCCUCU	0	1	2	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	6
ACCUUC	0	0	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	5
Summe Elemente	3	24	27	12	12	16	1	5	18	27 (30)	12	1	158 (161)	

Tab. 38 | Destabilisierende Elemente nach Lee et al. (2010) in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte. Gezeigt ist die Anzahl der einzelnen destabilisierenden Elemente (DE) in der 3'-UTR des jeweiligen Transkripts. Bei sich überschneidenden Elementen wurde jeweils das erste vollständige Element, die Angaben in Klammern geben das Ergebnis der Zählung aller sich überschneidender Elemente an.

DE	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3	Summe	Motiv
TTTTTT	0	6 (18)	8 (14)	3 (8)	2 (5)	4	0	0	2 (3)	3 (9)	4 (11)	0	0	32 (72)
TTGTTT	3	5	5	1	4	2	0	3	0	0	4	0	0	27
TTTGTT	4	5	5	1	2	1	0	2	0	1	1	0	0	22
TTTTTA	0	9	8	4	2	5	1	2	0	2	5	0	0	38
TTTTGT	5	1	2	1	2	2	0	0	1	1	2	0	0	17
TTTTTG	2	5	5	0	2	1	0	1	3	2	2	0	0	23
GTTTTT	1	6	3	2	2	4	0	0	2	0	3	0	0	23
GTGTGT	0	3	1	1	1 (5)	1	0	0	1	3 (8)	1	0	0	12 (21)
ATTTTT	0	10	11	4	4	3	0	2	0	3	6	0	0	43
TGTTTT	2	3	8	3	1	4	0	1	3	1	5	0	0	31
GTTTGT	2	3	3	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	11
ACTTGT	0	1	0	0	1	2	0	1	0	1	0	0	0	6
CTTTTT	1	2	7	2	0	1	1	1	1	2	3	0	0	21
AGCAGT	1	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	5
TGTTTG	1	1	1	1	0	2	0	1	0	2	0	0	0	9
TATTTA	0	3	3	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	10
TGTATA	3	2	4	0	3	2	0	2	1	1	0	0	0	18
TGTGTG	1	1	3 (5)	3	3 (5)	1	0	0	1	7 (8)	1	1	1	22 (27)
TTTATT	2	4	3	2	4	0	0	2	1	1	2	0	0	21
ATTTAT	1	3	4	5	3	1	0	1	0	0	3	0	0	21
Summe Elemente	29	74 (86)	84 (92)	35 (40)	40 (55)	37	2	21	16 (17)	31 (43)	42 (49)	1	412 (466)	

vi Potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA laut Datenbankenanalyse

Tab. 39 | Potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA laut Datenbankenanalyse. Die Datenbankenanalyse ermittelte für insgesamt 279 verschiedene RBP eine mögliche Interaktion mit bzw. Regulation von desmosomalen Transkripten. Die Ergebnisse der Auswertung der einzelnen Datenbankenbanken sind hier vergleichend dargestellt. Die in den Spalten 3 bis 14 angegebenen Abkürzungen verdeutlichen eine in der jeweiligen Datenbank angegebene mögliche Interaktion eines RBP mit dem jeweiligen Transkript. **Abkürzungen:** A, AURA; E, ENCORI; P, POSTAR2; T, AT-TRACT; #, laufende Nummer.

#	Gen-Symbol	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3
1	A1CF	T	T	T	T	T							
2	AARS		P			P				P			P
3	ACIN1					E			E	E			E
4	ACO1	T	T	T		T	T		T		T	T	
5	ADAR	E	E	E	T	E	E	T	E	E	T	E	T
6	ADAR1				A	A	A						
7	AGGF1								P				P
8	AGO1	T	A	A	T	A	T		A	T	A	A	T
9	AGO2				T	T	T		A	A		A	
10	AIFM1		E	E		E			E	E			
11	AKAP1			T				T			T		
12	AKAP8L												A
13	ALKBH5		P	P		P				E			P
14	ALYREF								E	E		E	
15	ATXN2	A	P	A	P	A	P		P	P		A	P
16	AUH		E			E			E	E		E	E
17	BCCIP		E			E			E	E		E	E
18	BUD13		E			E	P		E	P	A	E	P
19	CAPRIN1		P	P		E	P		E	P	P	E	P
20	CBX7								E	E			
21	CDC40								P				
22	CELF1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
23	CELF2	T	T	T	T	E	T	T	T	T	T	T	T
24	CELF4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
25	CELF5	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
26	CELF6	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
27	CMTR1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
28	CNBP		E	E		E			E	E		E	P
29	CNOT4			T				T		T	T	T	T
30	CPEB1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
31	CPEB2		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
32	CPEB4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
33	CPSF1		P	P		P			P	P		P	P
34	CPSF2		P	P		P			P	P		P	P
35	CPSF3		P	P		P			P	P		P	P
36	CPSF4		P	P		P			P	P		P	P
37	CPSF6		E	P		E	P		P	E	P	P	E
38	CPSF7		P	P		P			P	P		P	P
39	CSTF2		P	T		P		T	P	P		P	T
40	CSTF2T		E	P		E	P		E	P		E	P
41	DAZAP1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
42	DDX19B		T	T	T	T	T	T		T	T	T	T
43	DDX24									A	P		A
44	DDX3X		E	P		E	P		P	E	P	E	P
45	DDX42		E			E				E			E
46	DDX54		E			E			E	E		E	E
47	DDX55					P			A	P	A		A
48	DDX58	T		T		T		T			T		P
49	DDX59								P				P
50	DDX6		P			P			A	P	A	P	A
51	DGCR8		E	E	P	E	P	E	E	E	P	E	E
52	DHX30												P
53	DHX58							T				T	
54	DHX9			E	T	E	T	T		E	T	E	T
55	DICER1		E	E	P	E			E	P	E	E	T
56	DKC1			E		E		E	E	P	E	E	E
57	DROSHA		P						E	P			P
58	EFTUD2		P						P		P		P
59	EIF3A		P			P					P		P
60	EIF3B			P		P				P	P		
61	EIF3D					P			P	P			
62	EIF3G					P			P	P			
63	EIF3H					P			P			P	

Fortsetzung Tab. 41 | Potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA laut Datenbankenanalyse.

#	Gen-Symbol	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3
64	EIF4A3		E T	E T	E T	E T	T		EP	A E P T	E T	E T	A E P
65	EIF4B	T	T	T	T	T	T				T		
66	EIF4G1									E			E
67	EIF4G2					E				E			E
68	ELAVL1	E T	E P T	E P T	E P T	E P T	E T	E T	A E P T	A E P T	E P T	A E P T	
69	ELAVL2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
70	ELAVL3	T	E T	T	T	T	T	T	T	T	T	E T	
71	ELAVL4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
72	ENOX1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
73	ER11	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
74	ESRP1		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
75	ESRP2	T			T	T	T	T			T		T
76	EWSR1		E P	P	E	E P	E		A E P	E P		A E P	P
77	F2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78	FAM120A		E P			A E P			E	A E P		E P	A E P
79	FASTKD2		P						P				A P
80	FBL	E	E	E	E	E			E	E	E	E	E
81	FIP1L1		P	P		P			P	P	P	P	
82	FKBP4		E			E			E	E			E
83	FMR1	T	A E P T	A E P T	T	A E P T	T		A E P	A E P T	T	A E P T	E P T
84	FTO			E		P			E	E			
85	FUBP3		P			P			P				
86	FUS	E T	E P T	E P T	E T	E P T	E T	E T	A E P T	E P T	E T	E P T	E T
87	FXR1		E T	T	T	E P T	T		A E P T	E	T	E T	E T
88	FXR2	T	E P	E P T	T	A E P			A E P	E P T	T	A E P T	A E P T
89	G3BP2			T	T		T						
90	GEMIN5		P							P			P
91	GNL3					E				E P			E
92	GPKOW					P							P
93	GRSF1	T	T	T	T	P T	T	T	T	T	T	T	A P T
94	GRWD1								P				A
95	GTF2F1		E P			E P			E P	E		E	A E P
96	HNRNPA0	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
97	HNRNPA1	E T	E T	E P T	T	E P T	E T	T	E P T	E P T	T	E P T	E T
98	HNRNPA1L2	T	T	T						T	T	T	
99	HNRNPA2B1	T	E T	P T	T	A	T	T	T	E T	T	T	
100	HNRNPAB	T			T	T	T	T	T	T	T	T	
101	HNRNPC	T	E P T	E P T	E T	E P T	T	T	E P T	E P T	A	T	E P T
102	HNRNPCL1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
103	HNRNPD	T	A E P T	A E P T	T	E P T	T	T	P T	T	P T	T	T
104	HNRNPD L	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
105	HNRNPF	T	P T	P T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
106	HNRNPH1	T	T	T	T	P T	T	T	T	P T	T	T	T
107	HNRNPH2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	HNRNPH3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
109	HNRNPK	T	E T	E T	T	E T	T	T	A E T	A E P T	T	E T	E P T
110	HNRNPL	E T	T	T	E T	E T	E T	E T	E T	E T	E T	E T	E T
111	HNRNPLL	T		T		T					T		
112	HNRNPM		E T	T		E	T		E P	E		E	E
113	HNRNPU		E T	P T	T	E P T	T		E P	E T	T	E P T	E
114	HNRNPUL1		E			E			E P	E			E
115	IFIH1	T		T		T	T			T	T	T	T
116	IGF2BP1		A E P	A E P		A E P			A E P	A E P		A E P	E
117	IGF2BP2	E T	A E P T	A E P T	T	A E P T	E T	E T	A E P T	A E P T	T	A E P T	E
118	IGF2BP3	T	A E P T	A E P T	T	A E P T	T	T	A E P T	A E P T	T	A E P T	E T
119	IGHMBP2		T		T	T	T						T
120	ILF3					E				A E P			E
121	KHDRBS1	T	E T	E T	T	E T	T	T	E T	E T	T	E T	E
122	KHDRBS2		E T	E T	T	E T	T		E T	E T	T	E T	
123	KHDRBS3	T	E T	E T	T	E T	T	T	E T	E T	T	E T	T
124	KHSRP	T	E T	T	T	E T	T	T	T	E T	T	T	E T
125	LARP4								A P	A P			A P
126	LARP4B								A E	A E			
127	LARP7					E			E P	A E			A E P
128	LIN28		E	E		E			E	E		E	
129	LIN28A	T	E P	A E P		A E P T	T		A E P T	T	T	E P T	T
130	LIN28B		E P	A E P		A E P			A E P	A E P	P	E P	E
131	LSM11		E			E			A	E			A E P
132	MATR3	T		T			T		T	T	T	T	T
133	MBNL1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	E T
134	MBNL2		E			E			E				
135	METAP2									A P			A P

Fortsetzung Tab. 41 | Potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA laut Datenbankenanalyse.

#	Gen-Symbol	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3	
136	METTL14								E		E			
137	METTL3		E			E			EP	E	E			
138	MOV10		EP	EP		EP			AEP	EP		EP	E	
139	MSI1	T	A		T	E			E	E		E		
140	MSI2		E			E				E			E	
141	MTPAP												A	
142	NCBP2					P							P	
143	NCBP3			P					EP	P		P		
144	NKRF								P	P			P	
145	NOL12								P					
146	NONO	T	E	T	T	E	T	T		EPT	T	T	E	
147	NOP56		E			EP			E	E	E	E		
148	NOP58		E	E		EP			EP	E		EP		
149	NOVA1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
150	NOVA1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
151	NOVA2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
152	NPM1		E			E				E			E	
153	NUDT21	T	P	T	T	P	T	T	P	T	T	P	T	
154	NUMA1		E	E		E			E	E				
155	NXF1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
156	OAS1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
157	PABPC1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
158	PABPC3	T	T	T	T	T								
159	PABPC4		T	T	T	T								
160	PABPC5	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
161	PABPN1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
162	PCBP1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
163	PCBP2	T	E	P	T	T	E	P	T	T	A	E	P	T
164	PHAX	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			
165	PIWIL1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
166	PPIE	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
167	PPIG		P						P			P	A	
168	PPRC1					T		T					P	
169	PRPF8		E			E			EP	EP		E	EP	
170	PTBP1	T	E	P	T	E	P	T	E	T	E	P	T	
171	PTBP2		T	T										
172	PUM1	T	T	T		T								
173	PUM2	T	A	E	P	T	A	E	P	T	A	E	P	
174	QKI	T	E	P	T	E	P	T	E	P	T		T	
175	RALY		T	T	T	T	T							
176	RANGAP1		E	E		E			E	E				
177	RBFOX1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
178	RBFOX2	T	E	T	E	T	T	T	A	E	P	T	A	
179	RBM10		E	E		E			EP		E	E		
180	RBM15					P			P	A			P	
181	RBM15B		P	P		P			P	P		P		
182	RBM22					E			P	EP			E	
183	RBM24	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		
184	RBM27					E				E			EP	
185	RBM28		T	T										
186	RBM3	T	T			T			T					
187	RBM4		T			T				T				
188	RBM41	T	T	T	T	T	T				T	T		
189	RBM42													
190	RBM46	T	T	T	T	T	T		T		T	T		
191	RBM47		A	E		A	E	P	A	E	P	A	E	P
192	RBM5	T	T	E	T	E	T	T	T	P	T	T	E	T
193	RBM6	T	T	T	E	T	E	T	T	E	T	T	T	
194	RBM8A													
195	RBMS1	T	T		T	T								
196	RBMS3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
197	RBMX	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
198	RBMX1A1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
199	RC3H1	T	E	T	E	T	T	T	T	E	T	T	T	
200	RNASEL	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
201	RNF219		E	E		E			E	E				
202	RPS3					P			P	P		P	P	
203	RPS5								P	P				
204	RTCB		P	P		P			EP			EP		
205	SAFB2		E			E				E		E		E
206	SAMD4A			T				T		T	T			
207	SART3		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	

Fortsetzung Tab. 41 | Potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA laut Datenbankenanalyse.

#	Gen-Symbol	DSC1	DSC2	DSC3	DSG1	DSG2	DSG3	DSG4	DSP	JUP	PKP1	PKP2	PKP3								
208	SBDS									E			E								
209	SERBP1									P			P								
210	SF1	T	T	T	T	T	T			T	T	T									
211	SF3A3		E			E			EP	EP		E	EP								
212	SF3B1					P				P			P								
213	SF3B4		E			E			E	EP		E	EP								
214	SFPQ	T	T	T	T	T	T		PT	PT	T	T	T								
215	SLBP									E			E								
216	SLTM		E			E			EP	EP		E	E								
217	SMNDC1		E			E			E	E		E	EP								
218	SND1		EP			EP			AEP	AEP		E	E								
219	SNRNP70	T	T	T			T														
220	SNRPA		T	T	T	T	T			T		T									
221	SRP14	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T								
222	SRP19	T	T	T	T	T	T		T	T	T	T	T								
223	SRP54	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T								
224	SRP68	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T								
225	SRRM4		A	A	P	A	P														
226	SRSF1	T	EPT	EPT	T	EPT	E	T	T	EPT	EPT	T	EPT	E	T						
227	SRSF10	T	E	T	T	E	T	T		E	T	E	T								
228	SRSF11	T	T	T	T	T					T	T	T								
229	SRSF2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		T						
230	SRSF3	T	E	T	E	T	T	T	T	E	T	E	T	E	T	T					
231	SRSF4	T	T	T																	
232	SRSF5	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T					
233	SRSF6	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T					
234	SRSF7	T	E	T	E	T	T	T	EP	E	T	E	T	E	T	E	T				
235	SRSF9	T	E	T	T	T	E	T	T	EPT	E	T	E	T	E	T	E	T			
236	SSB	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T			
237	STAU1			P		P				A	P		P								
238	SUB1									P											
239	SUGP2		P										P								
240	SUPV3L1								P	PT											
241	SYNCRIP				T	T	T			T	T	T	T								
242	TAF15	E	E	E	E	EP	E	E	EP	EP	EP	E	E	E	E	E	E	E			
243	TARBP2																				
244	TARDBP	T	EPT	PT	T	EPT	E	T		EPT	EPT	T	EPT	E	T						
245	TBRG4					P				P											
246	TIA1	T	A	EPT	A	EPT	T	A	EPT	A	EPT	E	T	E	T	E	T	E	T		
247	TIAL1	T	A	EPT	A	EPT	T	A	EPT	A	EPT	E	T	A	E	T	E	T	E	T	
248	TNRC6A		E			E				E										EP	
249	TRA2A	T	E	T	T	E	T	T		EPT	E	T	T	E	T	E	T	E	T	E	
250	TRA2B	T	T	T	T	T	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
251	TROVE2		E	E		E			EP	P	E		E	EP						EP	
252	TUT1	T	T	T					T											T	
253	U2AF1		E			E				EP	E		E		E		E		E	E	
254	U2AF2	E	T	EPT	EPT	T	EPT	E	T	T	EPT	EPT	T	EPT	E					E	
255	UCL5		P							P											
256	UPF1	E	EP	EP	E	EP	E			EP	AEP		EP	AEP						AEP	
257	VIM					E				E											
258	WDR33		P	P		P				P			P								
259	WTAP									E		E									
260	XPO5	T	T	T	T	T	T	T		PT	PT	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
261	XRCC6									P										A	P
262	XRN2		E			E				P	EP									EP	
263	YBX1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
264	YBX2		T	T	T	T	T	T													
265	YBX3		P			A	P				A	P									P
266	YTHDC1	T	PT	PT	T	EPT	T	E	T	EPT	EPT	E	T	EPT	E	T	EPT	E	T	E	T
267	YTHDF1		P	P		EP				EP	EP			P						E	P
268	YTHDF2		P	P		P				P				P						P	P
269	YTHDF3					P								P						P	P
270	YWHAG					E					E										E
271	ZC3H10	T						T				T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
272	ZC3H7B		AEP	AEP		AEP				EP			AEP								
273	ZCRB1	T		T	T		T	T				T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
274	ZFP36	T	A	E	T	E	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
275	ZNF184		E	E		E				E	E		E								
276	ZNF346	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
277	ZNF622					P															
278	ZNF638	T	T	T	T	T	T	T													T
279	ZRANB2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A	T

vii Relative mRNA- und Proteinmengen nach RBP-KD

Tab. 40 | Relative Menge desmosomaler mRNA und Proteine nach ELAVL1-KD. Die Tabelle zeigt die Werte der in Abb. 14 dargestellten Daten. Genannt sind die Ergebnisse der Ermittlung der relativen mRNA- bzw. Protein-Menge in Relation zur Kontrolle, die den Wert 1,0 hat. Angegeben sind bei $n \geq 3$ zudem eine Standardabweichung sowie das Signifikanzniveau p , berechnet nach einem studentischen t-Test. **Abkürzungen:** -, keine Daten vorhanden.

	HaCaT		MCF7	
	Relative mRNA-Menge	Relative Proteinmenge	Relative mRNA-Menge	Relative Proteinmenge
ELAVL1	0,12 ± 0,06 $p < 0,01$	0,27 ± 0,11 $p < 0,01$	0,37 ± 0,22 $p = 0,02$	0,38 ± 0,07 $p < 0,01$
DSC2	0,75 ± 0,30 $p = 0,31$	0,92 ± 0,13 $p = 0,33$	1,12 ± 0,21 $p = 0,48$	1,15 ± 0,02 $p < 0,01$
DSC3	0,80 ± 0,38 $p = 0,51$	0,94 ± 0,07 $p = 0,32$	-	-
DSG2	1,55 ± 0,74 $p = 0,35$	1,21 ± 0,11 $p = 0,06$	0,92 ± 0,41 $p = 0,75$	1,16 ± 0,22 $p = 0,36$
DSP	1,57 ± 0,70 $p = 0,32$	-	0,82 ± 0,30 $p = 0,34$	-
JUP	0,65 ± 0,43 $p = 0,32$	1,08 ± 0,05 $p = 0,07$	0,86 ± 0,15 $p = 0,14$	0,86 ± 0,12 $p = 0,16$
PKP1	0,90 ± 0,53 $p = 0,79$	1,27 ± 0,16 $p = 0,03$	-	-
PKP2	1,04 ± 0,45 $p = 0,90$	1,05 ± 0,19 $p = 0,57$	0,97 ± 0,32 $p = 0,89$	0,81 ± 0,09 $p = 0,04$
PKP3	0,76 ± 0,36 $p = 0,40$	1,07 ± 0,12 $p = 0,24$	0,88 ± 0,24 $p = 0,43$	1,02 $n = 2$

Tab. 41 | Relative Menge desmosomaler mRNA und Proteine nach G3BP1-KD. Die Tabelle zeigt die Werte der in Abb. 16 dargestellten Daten. Genannt sind die Ergebnisse der Ermittlung der relativen mRNA- bzw. Protein-Menge in Relation zur Kontrolle, die den Wert 1,0 hat. Angegeben sind bei $n \geq 3$ zudem eine Standardabweichung sowie das Signifikanzniveau p , berechnet nach einem studentischen t-Test. **Abkürzungen:** -, keine Daten vorhanden.

	HaCaT		MCF7	
	Relative mRNA-Menge	Relative Proteinmenge	Relative mRNA-Menge	Relative Proteinmenge
G3BP1	0,04 ± 0,02 $p < 0,01$	0,30 ± 0,17 $p < 0,01$	0,23 ± 0,18 $p < 0,01$	0,37 ± 0,11 $p < 0,01$
DSC2	0,91 ± 0,43 $p = 0,72$	1,00 ± 0,08 $p = 0,94$	0,60 ± 0,20 $p = 0,05$	0,76 $n = 2$
DSC3	0,81 ± 0,48 $p = 0,51$	0,82 ± 0,32 $p = 0,89$	-	-
DSG2	1,05 ± 0,36 $p = 0,80$	0,86 ± 0,12 $p = 0,16$	0,67 ± 0,22 $p = 0,11$	1,21 $n = 2$
DSP	0,82 ± 0,34 $p = 0,38$	-	1,02 ± 0,30 $p = 0,91$	-
JUP	1,14 ± 0,62 $p = 0,71$	1,09 ± 0,15 $p = 0,45$	0,80 ± 0,10 $p = 0,04$	0,95 $n = 1$
PKP1	1,38 ± 0,31 $p = 0,08$	0,95 ± 0,14 $p = 0,53$	-	-
PKP2	0,72 ± 0,36 $p = 0,23$	0,85 ± 0,09 $p < 0,01$	0,78 ± 0,20 $p = 0,19$	0,90 ± 0,11 $p = 0,18$
PKP3	0,72 ± 0,28 $p = 0,13$	0,97 ± 0,17 $p = 0,71$	0,90 ± 0,34 $p = 0,71$	0,82 $n = 1$

Tab. 42 | Relative Menge desmosomaler mRNA und Proteine nach TIAL1-KD. Die Tabelle zeigt die Werte der in Abb. 20 dargestellten Daten. Genannt sind die Ergebnisse der Ermittlung der relativen mRNA- bzw. Protein-Menge in Relation zur Kontrolle, die den Wert 1,0 hat. Angegeben sind bei $n \geq 3$ zudem eine Standardabweichung sowie das Signifikanzniveau p , berechnet nach einem studentischen t-Test. **Abkürzungen:** -, keine Daten vorhanden.

	HaCaT		MCF7	
	Relative mRNA-Menge	Relative Proteinmenge	Relative mRNA-Menge	Relative Proteinmenge
TIAL1	0,49 ± 0,10 $p < 0,01$	0,42 ± 0,05 $p < 0,01$	0,67 ± 0,25 $p = 0,06$	0,64 ± 0,12 $p < 0,01$
DSC2	1,11 ± 0,09 $p = 0,07$	0,82 ± 0,35 $p = 0,50$	1,14 ± 0,25 $p = 0,36$	0,91 ± 0,18 $p = 0,54$
DSC3	1,16 ± 0,15 $p = 0,11$	0,87 ± 0,16 $p = 0,15$	-	-
DSG2	1,33 ± 0,14 $p = 0,01$	1,03 ± 0,07 $p = 0,70$	1,06 ± 0,27 $p = 0,70$	1,29 ± 0,30 $p = 0,24$
DSP	1,07 ± 0,13 $p = 0,41$	-	0,87 ± 0,15 $p = 0,21$	-
JUP	1,07 ± 0,15 $p = 0,49$	0,98 ± 0,06 $p = 0,82$	0,96 ± 0,20 $p = 0,62$	0,78 ± 0,11 $p = 0,05$
PKP1	1,58 ± 0,65 $p = 0,17$	0,82 ± 0,06 $p = 0,01$	-	-
PKP2	1,39 ± 0,02 $p < 0,01$	1,02 ± 0,19 $p = 0,80$	1,14 ± 0,41 $p = 0,57$	0,89 ± 0,22 $p = 0,41$
PKP3	1,24 ± 0,19 $p = 0,07$	0,92 ± 0,10 $p = 0,18$	0,98 ± 0,15 $p = 0,84$	0,81 $n = 2$

viii Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Zelltypen der Epidermis.....	2
Tab. 2 Bestandteile der Desmosomen und Adherens junctions.	3
Tab. 3 Übersicht über Datenbanken, die für die Analysen in dieser Arbeit ausgewertet wurden.....	10
Tab. 4 Auswahl regulatorischer Nukleinsäuren.	12
Tab. 5 Klassifizierung der ARE.	14
Tab. 6 Übersicht über verwendete Zelllinien.	18
Tab. 7 Angaben zur Lokalisation eines Proteins in The Human Protein Atlas.	21
Tab. 8 Transfektionsansatz zur Transfektion von Plasmid-DNA.	23
Tab. 9 Schritte der qRT-PCR.	32
Tab. 10 Mittlere mRNA-HWZ in verschiedenen Zelllinien.	37
Tab. 11 Alternative Polyadenylierungsstellen der DSG1- und DSG2-mRNA.	38
Tab. 12 ARE in 3'-UTR desmosomaler mRNA und Interleukinen.	39
Tab. 13 ARE in 3'-UTR ausgewählter Interleukine.....	39
Tab. 14 Alu-Elemente in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte.	40
Tab. 15 G-quadruplex Strukturen in 3'-UTR desmosomaler Transkripte.....	40
Tab. 16 Regulatorische Elemente nach Lee et al. (2010) in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte.	41
Tab. 17 Potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA.....	45
Tab. 18 ELAVL1 in Datenbanken.	48
Tab. 19 TIAL1 in Datenbanken.	56
Tab. 20 ct-Werte nach Immunpräzipitation.	61
Tab. 21 ct-Werte nach TIAL1-Immunpräzipitation.	62
Tab. 22 Auswahl an Funktionen desmosomaler Proteine abseits der Vermittlung von Adhäsion.	IX
Tab. 23 Beispiele von in Tumorgeweben beobachtete Veränderungen desmosomaler Proteine	IX
Tab. 24 Beispiele von Erkrankungen, die mit einer Veränderung desmosomaler Proteine assoziiert sind.....	X
Tab. 25 Beispiele von Phänotypen nach knockout desmosomaler Proteine in Mäusen.	XI
Tab. 26 Beispiele für Mechanismen zur Regulation von Desmosomen.....	XII
Tab. 27 Übersicht eingesetzter Puffer und Lösungen.	XIII
Tab. 28 Übersicht eingesetzter Kits und Fertigreagenzien.....	XIV
Tab. 29 Übersicht über die Zusammensetzung der eingesetzten SDS-PAGE-Gele.....	XIV
Tab. 30 Übersicht der eingesetzten Primärantikörper für WB und IF-Analysen.	XIV
Tab. 31 Übersicht der eingesetzten Sekundärantikörper für WB- und IF-Analysen.....	XV

Tab. 32 Übersicht der Antikörper für Ko-Immunpräzipitation von Proteinen und RNA.	XV
Tab. 33 Übersicht der verwendeten qRT-PCR-Primer.....	XVII
Tab. 34 Übersicht über eingesetzte Vektoren.....	XVII
Tab. 35 Übersicht über die verwendeten Geräte.	XVIII
Tab. 36 Übersicht über verwendete Software.	XIX
Tab. 37 Stabilisierende Elemente nach Lee et al. (2010) in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte.	XXVI
Tab. 38 Destabilisierende Elemente nach Lee et al. (2010) in der 3'-UTR desmosomaler Transkripte.	XXVI
Tab. 39 Potenzielle Regulatoren desmosomaler mRNA laut Datenbankenanalyse.	XXVII
Tab. 40 Relative Menge desmosomaler mRNA und Proteine nach ELAVL1-KD.	XXXI
Tab. 41 Relative Menge desmosomaler mRNA und Proteine nach G3BP1-KD.	XXXI
Tab. 42 Relative Menge desmosomaler mRNA und Proteine nach TIAL1-KD.	XXXII

ix Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Aufbau der Haut und Zellkontakte der Keratinozyten. <i>Selbst erstellt</i>	1
Abb. 2 Struktur der Desmosomen und Verteilung desmosomaler Proteine in der Epidermis. <i>Modifiziert nach Kottke et al. 2006.</i>	4
Abb. 3 Kontrolle der Genexpression. <i>Selbst erstellt</i>	8
Abb. 4 siRNA-vermittelt sequenzspezifischen mRNA-Abbau. <i>Modifiziert nach Rosa et al. 2018.</i>	13
Abb. 5 Ablauf der Datenbankenanalyse. <i>Selbst erstellt</i>	21
Abb. 6 Definieren der Zellkerne. <i>Selbst erstellt</i>	26
Abb. 7 Beispielrechnung zur Einordnung der relativen Intensität einer Fluoreszenzfärbung im Bereich der Zellkerne. <i>Selbst erstellt</i>	27
Abb. 8 Länge der 3'-UTR und HWZ desmosomaler Transkripte. <i>Selbst erstellt</i>	36
Abb. 9 RBP in Datenbanken. <i>Selbst erstellt</i>	43
Abb. 10 RBP einzelner mRNAs. <i>Selbst erstellt</i>	43
Abb. 11 Vergleich der RBP innerhalb von Genfamilien. <i>Selbst erstellt</i>	44
Abb. 12 Vergleich der RBP innerhalb funktioneller Gruppen. <i>Selbst erstellt</i>	44
Abb. 13 Immunfluoreszenzfärbung desmosomaler Proteine in HaCaT und MCF7. <i>Selbst erstellt</i>	47
Abb. 14 Desmosomale Proteine und mRNA nach ELAVL1-KD. <i>Selbst erstellt</i>	49
Abb. 15 Desmosomale Proteine in HaCaT nach ELAVL1-KD. <i>Selbst erstellt</i>	50
Abb. 16 Desmosomale Proteine und mRNA nach G3BP1-KD. <i>Selbst erstellt</i>	52
Abb. 17 Überexpression von G3BP1 in HeLa. <i>Selbst erstellt</i>	53
Abb. 18 Desmosomale Proteine in HaCaT nach G3BP1-KD. <i>Selbst erstellt</i>	54

Abb. 19 Relative Intensität der Fluoreszenz im Bereich der Zellkerne. <i>Selbst erstellt</i>	55
Abb. 20 Desmosomale Proteine und mRNA nach TIAL1-KD. <i>Selbst erstellt</i>	57
Abb. 21 Desmosomale Proteine in HaCaT nach TIAL1-KD. <i>Selbst erstellt</i>	58
Abb. 22 Immunpräzipitation von G3BP1, ELAVL1 und TIAL1. <i>Selbst erstellt</i>	60
Abb. 23 Immunpräzipitation von TIAL1. <i>Selbst erstellt</i>	61
Abb. 24 HaCaT unter mechanischer Belastung nach RBP-KD. <i>Selbst erstellt</i>	63
Abb. 25 Korrelation der HWZ mit SE und DE nach Lee et al. (2010). <i>Selbst erstellt</i>	XXVI

x Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 12.10.2023

Jonas Alexander Häde

xi Danksagung

Eine Promotion parallel zu Studium, Beruf und Familienleben birgt zahlreiche besondere Herausforderungen. Mit großer Dankbarkeit blicke ich daher auf die vielen Unterstützer während dieser Zeit zurück und möchte mich besonders bedanken bei:

Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld für die Möglichkeit der Promotion in Ihrer Arbeitsgruppe, das Überlassen des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Dr. Rene Keil und Andrej Mun für die praktische Unterstützung im Labor.

Dem Graduiertenkolleg 1591 „*Posttranscriptional control of gene expression: mechanisms and role in pathogenesis*“ für die fachliche Förderung durch regelmäßige Fortbildungen und interdisziplinären Austausch sowie die finanzielle Unterstützung.

Meiner Ehefrau und meinen Kindern für ihre liebevolle Geduld, während der vielen Abende und freien Wochenenden, die ich mit meiner Dissertation zubringen durfte.

Danke.