

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Die Regulation der Proteinbiosynthese von Plakophilin 1
durch microRNAs**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Laura-Jane Wendler

geboren am 02.06.1988 in Karl-Marx-Stadt

Betreuerin: Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld

Gutachterin/Gutachter:

Frau Prof. M. Hatzfeld

Herr Prof. G. Posern

Herr Prof. M. Kunz (Leipzig)

07.05.2019

30.01.2020

Referat

Der Haut als größtes Organ des menschlichen Körpers kommt unter anderem die wichtige Aufgabe von Wachstum und Regeneration zu. Bei Ungleichgewicht der Homöostase kann es zur Ausbildung von malignen Tumoren kommen. Eine potentiell wichtige Rolle für die Funktionalität und Integrität der Haut kann Plakophilin 1 (PKP1) einnehmen. Es gehört zur Familie der Armadillo-Proteine. In den Zellen weist es einen desmosomalen und einen zytoplasmatischen Pool auf. Der desmosomale Anteil agiert in den Zell-Zell-Kontakten direkt als Strukturprotein und stärkt durch Rekrutierung weiterer desmosomaler Proteine den Zusammenhalt von Keratinozyten. Der zytoplasmatische Anteil ist durch die Interaktion mit dem Translationsfaktor eIF4A für die Proliferation der Zelle wichtig. PKP1 wirkt somit tumorsuppressiv, indem es die Integrität des Gewebes durch Desmosomen erhöht, die Motilität der einzelnen Zelle reduziert und damit eine potentielle Metastasierung verhindert. Auf der anderen Seite kann es bei gesteigerter Aktivität des zytoplasmatischen Pools als Onkogen wirken, indem durch unkontrollierte Translation und Proliferation die Tumorgenese gefördert wird.

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, die Regulation von PKP1 zu untersuchen. Dabei lag das Interesse auf der posttranskriptionellen Regulation durch microRNAs. Diese kleinen, einzelsträngigen RNAs sind als Feinregulatoren der Proteinbiosynthese bekannt, indem sie mit der 3'UTR von mRNAs interagieren.

Als Modellsystem dienten Mauskeratinozyten. Mithilfe von *in-silico*-Analysen wurden microRNAs mit potentiellen Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1 selektiert. Mittels qPCR konnte für die microRNAs let-7b und mir-34a eine hohe endogene Expression in Mauskeratinozyten aufgezeigt und nachfolgend mittels miR-TRAP eine spezifische Anreicherung über die 3'UTR von PKP1 detektiert werden. Im Luciferase-Assay führte eine Überexpression der let-7b und mir-34a jeweils zur Reduktion der Expression der 3'UTR von PKP1 und eine Repression jeweils zur Erhöhung. Für die mir-34a, jedoch nicht für die let-7b, konnte zusätzlich mittels Western Blot ein Effekt auf Proteinebene erzielt werden. Es ist anzunehmen, dass andere Mitglieder der umfassenden let-7-microRNA-Familie die isolierte Repression der let-7b kompensieren können.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist anzunehmen, dass PKP1 posttranskriptionell durch die microRNAs 34a und let-7b reguliert werden kann, welche beide als Tumorsuppressoren bekannt sind. Demnach käme ihnen eine Bedeutung für die Regulation des zytoplasmatischen Pools von PKP1 zu, indem sie eine übermäßige oder gar unkontrollierte Proliferation der Zelle verringern oder verhindern und somit gegen eine potentielle Tumorgenese wirken.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Plakophilin 1 – Vorkommen und klinische Relevanz.....	1
1.1.1 Die Haut des menschlichen Körpers – ein komplexes und umfassendes Organ... 1	
1.1.2 Der Aufbau von Desmosomen..... 2	
1.1.3 Das Protein Plakophilin 1 (PKP1) – Aufbau und Funktion in der Zelle 3	
1.1.4 Klinische Relevanz von PKP1 4	
1.2 MicroRNAs als potentielle Regulatoren der Proteinbiosynthese	7
1.2.1 Aufbau, Synthese und Funktion von microRNAs (miRNAs) in der Zelle..... 7	
1.2.2 MiRNAs als Feinregulatoren in der Epidermis 9	
1.2.3 Klinische Bedeutung der miRNAs in der Tumorgenese..... 10	
1.2.4 Die miRNA-Familie let-7 11	
1.2.5 Die miRNA 34a (mir-34a) 12	
1.2.6 Die miRNA 200-Familie 12	
2. Zielstellung der Arbeit.....	13
3. Material und Methodik.....	14
3.1 Zellbiologische Methoden.....	14
3.1.1 Zellkultur 14	
3.1.2 Transfektion muriner und humaner Zellen mit Lipofektion 15	
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	16
3.2.1 RNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion..... 16	
3.2.2 Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA durch Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) 17	
3.2.3 Amplifikation von cDNA durch PCR 18	
3.2.4 Quantitative <i>real-time</i> -PCR (qPCR)..... 19	
3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose- Gelelektrophorese 20	
3.2.6 Reinigung und Gelextraktion von Nukleinsäuren 21	
3.2.7 Klonierung von Expressionsplasmiden 21	
3.2.8 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren..... 22	
3.2.9 Ligation 22	
3.2.10 Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien 23	
3.2.11 Transformation von Plasmid-DNA..... 24	
3.2.12 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien..... 25	
3.2.13 Sequenzierung 26	
3.2.14 <i>in-vitro</i> -Transkription 26	
3.2.15 Elektrophoretische Auftrennung von einzelsträngigen Nukleinsäuren mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese 26	
3.3 Biochemische Methoden	27
3.3.1 Herstellung von Zelllysaten..... 27	
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration..... 27	
3.3.3 Fällung von Proteinen..... 28	
3.3.4 SDS-Page und Western Blot Analysen 28	
3.3.5 miR-TRAP..... 30	
3.3.6 Luciferase-Reportergen-Assay 32	
3.4 Statistische Auswertungen	33
4. Ergebnisse	34
4.1 Modellsystem „Mauskeratinozyten“ - human versus murin.....	34

4.2	Identifizierung und Charakterisierung potentieller miRNAs.....	35
4.2.1	<i>In-silico</i> -Analyse potentieller miRNA-Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1	35
4.2.2	Endogene Expression der miRNAs in MKZ.....	38
4.3	Evaluation der Expression des Ziel-Proteins PKP1 und der Ziel-miRNAs in MKZ in Abhängigkeit von der Differenzierung.....	40
4.3.1	Endogenes Level von PKP1 in MKZ.....	40
4.3.2	Stabilität von PKP1 in MKZ in Abhängigkeit von der Differenzierung	42
4.3.3	Expressionslevel der Ziel-miRNAs in MKZ in Abhängigkeit von der Differenzierung	44
4.4	miR-TRAP zur Validierung der vorhergesagten miRNA-Bindungsstellen	46
4.5	Funktionelle Analyse – Regulation der PKP1-3'UTR durch Überexpression und Repression spezifischer miRNAs	48
4.5.1	Luciferase-Reportergen-Assay nach Überexpression und Repression der miRNAs let-7b und mir-34a.....	48
4.5.2	Beeinflussung des Proteinlevels von PKP1 auf Zellebene durch Überexpression und Repression der miRNAs let-7b und mir-34a.....	53
4.6	Zusammenfassung des Ergebnisteils	58
5.	Diskussion.....	60
5.1	Human versus murin - die Mauskeratinozyten (MKZ) als Zelllinie.....	61
5.2	PKP1 – wichtig für die Stabilität der Zellen	62
5.3	Regulation der Proteinsynthese von PKP1 durch die miRNA 34a	63
5.4	Regulation der Proteinsynthese von PKP1 durch die miRNA let-7b.....	64
5.5	Die miRNA 200b – Relevanz für die humane Spezies	66
5.6	Klinische Relevanz – potentielle Bedeutung von PKP1 und miRNAs für die humane Spezies.....	67
5.7	Funktionsmodell - PKP1 und miRNAs im Rahmen der Tumorgenese.....	69
6.	Zusammenfassung.....	73
	Literaturverzeichnis.....	74
	Thesen.....	77
	Anlagen	79
	Verwendete Geräte.....	79
	Verwendete Antikörper.....	80
	Verwendete Kit-Systeme	80
	Verwendete microRNAs.....	81
	Selbstständigkeitserklärung	VIII
	Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	IX
	Danksagung.....	X

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

1. Einleitung	1
Abb. 1 Schematischer molekularer Aufbau eines Desmosoms.....	2
Abb. 2 Klinische Bilder des <i>Ectodermal dysplasia-skin fragility</i> –Syndroms.....	5
Abb. 3 Schematische Zusammenfassung der Lokalisation, Interaktionspartner und Funktion von Plakophilin 1.....	6
Abb. 4 Schematische Darstellung der miRNA-Synthese und der posttranskriptionellen Regulation der Ziel-mRNA.....	8
Abb. 5 Tabellarische Übersicht mit Auflistung stark exprimierter miRNAs in der Epidermis von Mäusen.....	10
4. Ergebnisse	34
Abb. 6 Vorhergesagte miRNA-Bindungsstellen in der 3'UTR von Plakophilin 1 in Mauszellen.....	37
Abb. 7 Endogenes Expressionslevel von miRNAs in undifferenzierten Mauskeratinozyten.....	39
Abb. 8 Endogenes Proteinlevel von Plakophilin 1 in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Mauskeratinozyten zu verschiedenen Zeitpunkten.....	41
Abb. 9 Western Blot - Endogenes Proteinlevel von Plakophilin 1 in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Mauskeratinozyten zu verschiedenen Zeitpunkten.....	41
Abb. 10 Western Blot - Proteinlevel von Plakophilin 1 über 24 Stunden in differenzierten Mauskeratinozyten nach Zugabe von Cycloheximid.....	43
Abb. 11 Western Blot - Proteinlevel von Plakophilin 1 über 24 Stunden in undifferenzierten Mauskeratinozyten nach Zugabe von Cycloheximid.....	43
Abb. 12 Relatives miRNA-Level in differenzierten Mauskeratinozyten in Referenz zum Expressionslevel in undifferenzierten Mauskeratinozyten.....	45
Abb. 13 Schematische Darstellung des Ablaufs des miR-TRAP.....	46
Abb. 14 miR-TRAP - Anreicherung der miRNAs let-7b, mir-34a und mir-200b im Verhältnis zum RNA-input verglichen mit den 4MS2-loops ohne Ziel-mRNA in Prozent.....	47
Abb. 15 Vereinfachte schematische Darstellung des pmir-Glo-Vektors für ein Luciferase-Reportergen-Assay.....	49
Abb. 16 Schematische Darstellung des Ablaufs eines Luciferase-Reportergen-Assays mit Beeinflussung durch Überexpression (<i>Mimics</i>) und Repression (<i>Inhibitors</i>) von miRNAs.....	50
Abb. 17 Luciferase-Reportergen-Assay - relative Aktivität der <i>Firefly</i> -Luciferase nach Überexpression der miRNAs let-7b und mir-34a in HEK-293-Zellen.....	51
Abb. 18 Luciferase-Reportergen-Assay - relative Aktivität der <i>Firefly</i> -Luciferase nach Repression der miRNAs let-7b und mir-34a in HEK-293-Zellen.....	52
Abb. 19 Expressionskontrolle - relatives miRNA-Level nach Transfektion von <i>Mimics</i> zur Überexpression der let-7b und mir-34a in undifferenzierten Mauskeratinozyten.....	54
Abb. 20 Expressionskontrolle - relatives miRNA-Level nach Transfektion von <i>Inhibitors</i> zur Repression der let-7b und mir-34a in undifferenzierten Mauskeratinozyten.....	54
Abb. 21 Western Blot - Proteinlevel von Plakophilin 1 nach Überexpression der miRNAs let-7b und 34a.....	55

Abb. 22	Relatives Proteinlevel von Plakophilin 1 nach Überexpression der miRNAs let-7b und 34a.....	55
Abb. 23	Western Blot – Proteinlevel von Plakophilin 1 nach Repression der miRNAs let-7b und 34a.....	57
Abb. 24	Relatives Proteinlevel von Plakophilin 1 nach Repression der miRNAs let-7b und 34a.....	57
5. Diskussion.....		59
Abb. 25	Funktionsmodell – Plakophilin 1 und miRNAs im Rahmen der Tumorgenese	70

Tabellen

4. Ergebnisse.....34

Tbl. 1	<i>in-silico</i> -Analyse - potentielle miRNA-Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1 für Mauszellen.....	36
Tbl. 2	<i>in-silico</i> -Analyse - potentielle miRNA-Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1 für humane Zellen.....	36
Tbl. 3	Zusammenhang zwischen CT-Wert und miRNA-Expression (schematische Darstellung).....	39

Anlagen.....78

Tbl. 4	Tabellarische Übersicht über verwendete Geräte.....	78
Tbl. 5	Tabellarische Übersicht über verwendete Primär-Antikörper.....	79
Tbl. 6	Tabellarische Übersicht über verwendete Sekundär-Antikörper.....	79
Tbl. 7	Tabellarische Übersicht über verwendete Kit-Systeme.....	79
Tbl. 8	Tabellarische Übersicht über verwendete microRNAs.....	80

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
xg	Erdbeschleunigung, Zentrifugalkraft
Abb.	Abbildung
ACTB	beta-Aktin
AGO	Argonaute-Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ARVCF	<i>Armadillo Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome</i>
bps	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhaditis elegans</i>
Ca ²⁺	Calcium
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDS	<i>coding sequence</i> (kodierende Sequenz)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT-Wert	<i>threshold cycle</i>
DMEM	<i>Dublecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDSF	<i>Ectodermal dysplasia-skin fragility</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epithelial growth factor</i>
eIF4A	eukaryotischer Initiationsfaktor 4A
et al.	et alii
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FFL	Firefly-Luciferase
g	Gramm
h	Stunde
HaCaT	humane Keratinozytenzelllinie
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
hsa	human
IDP	<i>inner dense plaque</i> (innere Plaque)

IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LBP	Lyse- und Bindepuffer
let-7	<i>lethal-7</i>
LIN28	<i>cell lineage abnormal 28</i>
M	molar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mA	Milliampere
MBP	Maltosebindeprotein
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MLB	<i>Mg²⁺ Lysis/Wash Buffer</i>
miRNA/miR/mir	<i>micro ribonucleic acid</i>
miRISC	<i>micro ribonucleic acid-induced-silencing complex</i>
miR-TRAP	<i>miRNA trapping of RNA in vitro affinity purification</i>
MKZ	Mauskeratinozyten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mmu	murin
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mV	Millivolt
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n	Anzahl
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	nanogramm
OD	Optische Dichte
ODP	<i>outer dense plaque</i> (äußeren Plaque)
o.g.	oben genannt
p	Signifikanz
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i> (für analytische Zwecke)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBSE	<i>phosphate buffered saline EDTA</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PG	Plakoglobin
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PKP	Plakophilin
PKP1	Plakophilin 1
pmol	Pikomol

pre-miRNA	<i>precursor micro ribonucleic acid</i>
pri-miR	<i>primary micro ribonucleic acid</i>
PV	Pemphigus vulgaris
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RAS	<i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RL	Renilla-Luciferase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SF-Medium	Serum-freies Medium
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
St.	Sankt
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tbl.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris buffered Saline-Tween 20</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
U	<i>Units</i>
USA	<i>United States of America</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/o	<i>without</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel
ZEB	<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox</i>

1. Einleitung

1.1 Plakophilin 1 – Vorkommen und klinische Relevanz

1.1.1 Die Haut des menschlichen Körpers – ein komplexes und umfassendes Organ

Die Haut als größtes Organ des menschlichen Körpers stellt nicht nur die erste Barriere gegenüber der Umwelt sondern auch ein System mit einer Vielzahl von komplexen neuronalen und immunologischen Funktionen dar. So gehören die mechanische Widerstandsfähigkeit, die Wahrnehmung von Reizen und die Regulation des Wärme- und Flüssigkeitshaushalts zu ihren wichtigsten Aufgaben.

Dabei wird die Haut in die Untereinheiten der gefäßfreien Epidermis (Ursprung Ektoderm), der dermo-epidermalen Junktionszone (Basalmembran) und der gefäßreichen Dermis und Subkutis (jeweils Ursprung Mesoderm) gegliedert.

Die Epidermis wiederum ist die äußerste Grenzschicht des Menschen gegenüber der Umwelt und besteht aus vier Schichten im Bereich der Felderhaut bzw. fünf Schichten im Bereich der Leistenhaut an Handinnenflächen und Fußsohlen. Der Aufbau umfasst in der Reihenfolge von „innen nach außen“ das Stratum basale (Basalzellschicht), das Stratum spinosum (Stachelzellschicht), das Stratum granulosum (Körnerzellschicht) und das Stratum corneum (Hornschicht) mit zunehmendem Differenzierungsgrad. In der Leistenhaut befindet sich zwischen dem Stratum granulosum und dem Stratum corneum noch das Stratum lucidum. Mit zunehmender Differenzierung entstehen auch zunehmend Zell-Zell-Kontakte, unter anderem die Desmosomen, welche vor allem die Aufgabe der mechanischen Widerstandsfähigkeit realisieren. Dabei dienen sie sowohl der Verankerung der Intermediärfilamente des Zytoskeletts als auch der Verknüpfung von benachbarten Zellen. Somit bedingen sie zum einen die Formstabilität der einzelnen Zelle und verleihen zum anderen dem Gewebe bzw. dem Zellverband Festigkeit und Stabilität. Folglich haben Desmosomen eine große Bedeutung für Gewebe bzw. Organe, die einer hohen mechanischen Belastung ausgesetzt sind.

1.1.2 Der Aufbau von Desmosomen

Desmosomen bestehen aus transmembranären Proteinen, den Cadherinen Desmoglein und Desmocollin, welche extrazellulär über ihren N-Terminus Calcium-abhängig mit anderen Zellen interagieren können. Der intrazelluläre Anteil dieser Proteine (C-Terminus) interagiert mit Plakoglobin und Plakophilin 1 (PKP1). Über den N-Terminus von PKP1 kann wiederum Desmoplakin gebunden werden, welches die Verankerung der Intermediärfilamente des Zytoskeletts herstellt. Zusätzlich wird die Verbindung zwischen PKP1 und Desmoplakin als Initiator zur Rekrutierung von Desmoplakin zu den Desmosomen angesehen (Kowalczyk et al. 1999).

Für diese Arbeit wurde das Augenmerk auf PKP1 gelegt, welches in den Desmosomen als Strukturprotein fungiert, aber durch die Rekrutierung von Desmoplakin auch die Organisation und damit die Größe der Desmosomen beeinflussen kann. So zeigt ein Defekt im PKP1-Gen z.B. durch eine Mutation (McGrath et al. 1997) oder durch eine Störung der Regulation eine verringerte Anzahl und Größe der Desmosomen (Mechthild Hatzfeld et al. 2000).

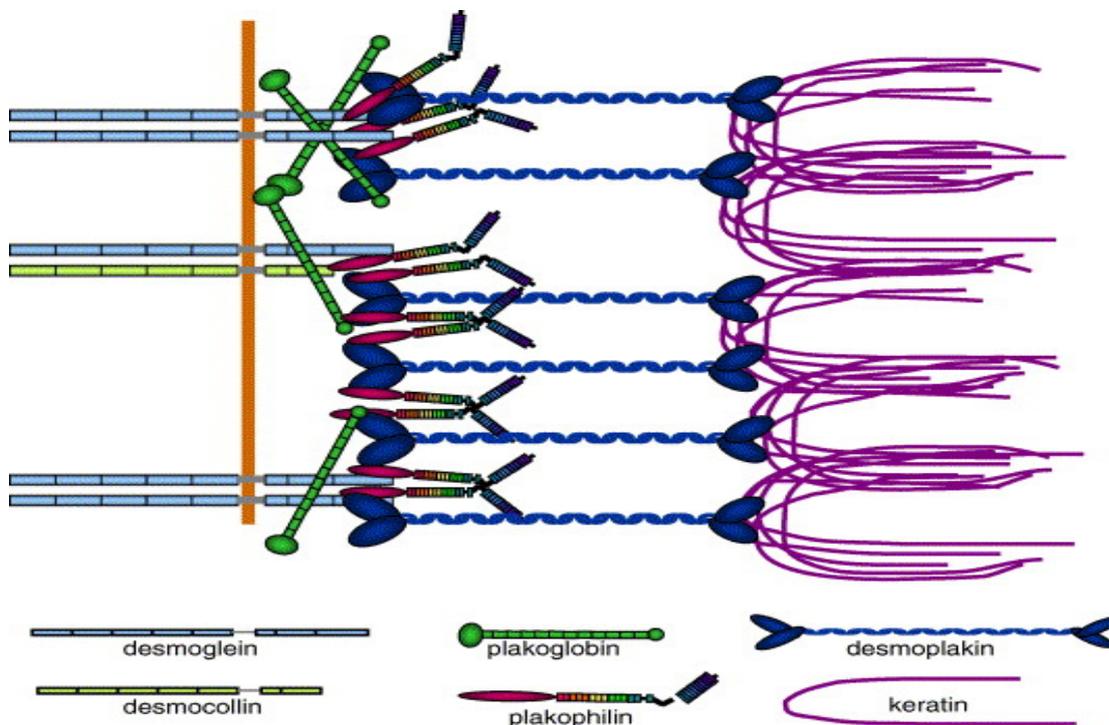


Abb. 1 Schematischer molekularer Aufbau eines Desmosoms wie im Fließtext beschrieben. (Quelle: (Mechthild Hatzfeld 2007))

1.1.3 Das Protein Plakophilin 1 (PKP1) – Aufbau und Funktion in der Zelle

PKP1 ist ein Protein aus der Armadillo-Arm-Proteinfamilie. Hierbei handelt es sich um Proteine, die als gemeinsames Strukturmerkmal ein sich wiederholendes Arm-Motiv besitzen, welches aus ca. 42 Aminosäuren besteht. PKP1 besitzt neun dieser Arm-Motive, wobei sich zwischen dem fünften und sechsten eine flexible Region von 28 Aminosäuren befindet. Durch die Interaktion dieser Arm-Motive entsteht eine superhelikale Struktur mit insgesamt positiver Oberflächenladung, welche wiederum die Grundlage für die Interaktion mit anderen Proteinen darstellt (Choi and Weis 2005). Die Armadillo-Proteinfamilie besteht aus drei Subfamilien, den klassischen Cateninen mit beta-Catenin und Plakoglobin, den p120-Cateninen mit p120^{ctn}, ARVCF, delta-Catenin und p0071 sowie den Plakophilinen mit Plakophilin 1, 2 und 3.

PKP1 ist dabei hauptsächlich in mehrschichtigen Epithelien, vor allem in den suprabasalen Schichten zu finden und gehört zu den desmosomalen Proteinen. Es stabilisiert die desmosomalen Cadherine an der Plasmamembran und rekrutiert, mithilfe seiner Kopfdomäne, Desmoplakin als Verbindungsprotein zu den Intermediärfilamenten, was eine größere Stabilität des Zell-Kontaktes bedingt (Kowalczyk et al. 1999). Zusätzlich konnte die direkte Bindung der PKP1-Kopfdomäne mit Desmoplakin (*in vivo*) gezeigt werden (Mechthild Hatzfeld et al. 2000). Durch die Rekrutierung desmosomaler Proteine kommt es zur Steigerung von Anzahl und Größe der Desmosomen. Ein Mangel an PKP1 führt demnach zur verminderten Stabilität der Desmosomen und zu einer erhöhten Zellmigration. Geht die Zelladhäsion verloren, ist dies ein Triggerfaktor für die Kanzerogenese, da es durch fehlende Kontaktinhibition zur Metastasierung und zur erhöhten Motilität kommen kann. Während jedoch für einige Tumoren das Fehlen von PKP1 beschrieben ist, konnte in anderen Tumoren eine Überexpression von PKP1 detektiert werden.

Diese zwei gegensätzlichen Fakten zeigen, dass PKP1 unterschiedliche Funktionen in der Zelle einnimmt. Zum einen, wie oben aufgeführt, als Strukturprotein in den Desmosomen und zum anderen als Signalprotein im Zytoplasma. PKP1 ist ein Bestandteil der sogenannten „Stressgranula“ im Zytoplasma, welche translationale Pre-Initiations-Komplexe und RNA-bindende Proteine enthält (Anderson and Kedersha 2006).

Dabei spielt PKP1 eine Rolle in der Regulation der Proteinsynthese durch eine direkte Interaktion mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor 4A1 (eIF4A1). PKP1 stimuliert die eIF4A1-abhängige Translation durch Rekrutierung von eIF4A1 zum *cap-binding*-Komplex an der mRNA und stimuliert somit Translation, Proliferation und Zellwachstum. Dabei wurde PKP1 als direkter Bindungspartner von eIF4A1 identifiziert. Außerdem steigert PKP1 die ATP-abhängige Helicase-Aktivität von eIF4A1 (Wolf et al. 2010; Wolf and Hatzfeld 2010).

Bei Kontrollverlust dieser Signalfunktion von PKP1 kann es somit durch gesteigerte Proliferation als Onkogen fungieren und zur Kanzerogenese beitragen.

1.1.4 Klinische Relevanz von PKP1

Die bisherigen Ausführungen zeigen, dass PKP1 zwei grundlegend verschiedene Funktionen besitzt. Auf der einen Seite kann es durch Rekrutierung desmosomaler Proteine die interzelluläre Adhäsion verstärken und auf der anderen Seite kann es die Proliferation durch Stimulation der Translation verschiedener Proteine initiieren.

Wie wichtig die Strukturfunktion von PKP1 ist, zeigt das Krankheitsbild des *Skin Fragility Syndrom* (EDSF = *Ectodermal dysplasia-skin fragility*). Bei dieser seltenen autosomal-rezessiv vererbten Krankheit kommt es zu einer *loss-of-function*-Mutation im PKP1-Gen, die zu einer mangelhaften Ausbildung von Desmosomen bezüglich Anzahl und Größe und daraus resultierend zu einer verminderten epidermalen Integrität führt. Die betroffenen Patienten weisen ein schweres klinisches Bild mit gesteigerter Fragilität der Haut auf, welche unter anderem mit Blasenbildung und der Ausbildung von Erosionen durch Bagatelltraumata einhergeht. Außerdem kommt es zur palmoplantaren Hyperkeratose mit schmerzhafter Rhagadenbildung sowie Haarveränderungen und Nageldystrophien. Histopathologisch sieht man eine Hyperparakeratose, Akanthose mit erweiterten Interzellularspalten und akantolytischen Keratinozyten. Während die eben genannten Veränderungen bei der Mehrzahl der Betroffenen auftreten, werden mentale Retardierungen, eine enorale oder kardiale Beteiligung und Zahnanomalien nur vereinzelt beschrieben. Es wird diskutiert, ob es sich bei dem EDSF-Syndrom um eine Sonderform des Krankheitsbildes *Epidermolysis bullosa* handelt.



Abb. 2 a-c: Klinische Bilder des EDSF-Syndroms (Haarveränderungen, Blasenbildung und Erosionen); d: Histologisches Bild mit Akanthose; e: Elektronenmikroskopisches Bild mit erweiterten Interzellularspalten (Pfeilmarkierungen) (Quelle: (Sprecher et al. 2004))

Zusätzlich kommt der Strukturfunktion eine Rolle in der Tumorsuppression zu, da die Tumorgenese bei Zellwachstum durch Kontaktinhibition gehemmt wird. Der Verlust von Zell-Zell-Kontakten ist eine bekannte Eigenschaft von Tumorzellen und ein Zeichen für aggressives Tumorwachstum.

Die Signalfunktion wiederum spielt bei der Kanzerogenese durch Stimulation von Zellwachstum und Proliferation eine Rolle. In einigen Tumoren, so z.B. in Spinozellulären Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches, in Lungen-Karzinomen oder dem Ewing Sarkom wurde eine Überexpression von PKP1 detektiert (Villaret et al. 2000). In aktinischen Keratosen und oralen spinozellulären Karzinomen konnte ebenfalls ein erhöhter zytoplasmatischer Pool von PKP1 nachgewiesen werden (Kurzen, Münzing, and Hartschuh 2003). Während normale Melanozyten normalerweise kein PKP1 exprimieren, konnte in einigen Melanom-Zellen die Expression von PKP1 nachgewiesen werden (Schmitt et al. 2007). Dies deutet darauf hin, dass PKP1 auch die Rolle eines Onkogens einnehmen kann.

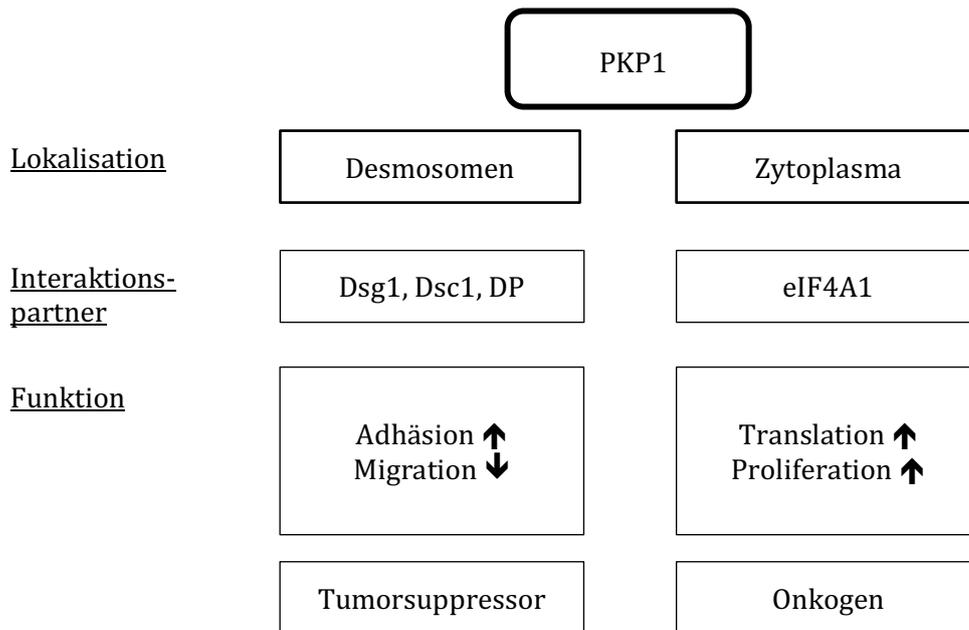


Abb. 3 Schematische Zusammenfassung der Lokalisation, Interaktionspartner und Funktion von PKP1. Modifiziert übernommen aus (Wolf and Hatzfeld, 2010).
 Dsg1 = Desmoglein 1; Dsc1 = Desmocollin 1; DP = Desmoplakin; eIF4A1 = eukaroytischer Initiationsfaktor 4A1

Jedoch sind Zellwachstum und Proliferation nicht nur im Rahmen der Tumorgenese von Bedeutung. Diese Vorgänge sind wichtig für physiologische Prozesse, wie z.B. Wundheilung nach Verletzungen und Homöostase der Haut im Sinne von Wachstum und Regeneration. Die entscheidende Frage ist also, wie PKP1 reguliert wird, um eine Balance zwischen Adhäsion, Stabilität und Zusammenhalt auf der einen Seite und Proliferation und Motilität auf der anderen Seite zu gewährleisten.

Dabei ist ein interessanter Aspekt, dass es beim Menschen zwei Isoformen der PKP1-mRNA gibt, welche sich in der Länge ihrer 3'UTR unterscheiden (komplettes Transkript mit 5'UTR und kodierender Sequenz: 5.3 kb und 2.6 kb). Dabei wurde in der Haut eine Co-Expression der beiden Isoformen in unterschiedlichen Verhältnissen aufgezeigt, während in kultivierten Keratinozyten nur die lange Variante der 3'UTR detektiert wurde (M. Hatzfeld et al. 1994; Heid et al. 1994). Via 3'UTR können Proteine posttranskriptionell z.B. durch microRNAs oder RNA-bindende Proteine reguliert werden.

1.2 MicroRNAs als potentielle Regulatoren der Proteinbiosynthese

1.2.1 Aufbau, Synthese und Funktion von microRNAs (miRNAs) in der Zelle

Bei miRNAs handelt es sich um evolutionär hochkonservierte, nicht-kodierende *small*-RNAs mit einer Länge von ungefähr 22 Nukleotiden. Die miRNAs werden im Allgemeinen in zwei Schritten prozessiert. Zunächst erfolgt die Transkription im Zellkern durch die RNA-Polymerase II. Dadurch entsteht die sogenannte *primary microRNA* (pri-miR). Noch im Zellkern wird durch den *Mikroprozessor complex* die *precursor microRNA* (pre-miRNA) mit einer charakteristischen *Stem-loop*-Struktur initiiert, welche in das Zytoplasma transportiert und dort durch die RNAsen Drosha und Dicer über mehrere Stufen zur reifen miRNA prozessiert wird (Bartel 2004). Dabei entstehen zunächst doppelsträngige miRNA-Moleküle mit einem sogenannten *guide strand* und *passenger strand*. Durch die Bindung mit einem von vier humanen Argonaute-Proteinen (AGO1-4) werden die beiden Stränge getrennt und es entsteht der *miRNA-induced-silencing complex* (miRISC), bestehend aus einem der vier AGO-Proteinen und dem *guide strand* der miRNA. (umfangreiche Beschreibung der miRNA-Biogenese siehe (Ameres and Zamore 2013; Ha and Kim 2014)). Dieser Komplex ist in der Lage, an die 3'UTR der jeweiligen Ziel-mRNA zu binden und deren Translation oder Stabilität zu beeinflussen. Dabei entsteht nur eine partielle komplementäre Basenpaarung zwischen der miRNA und der mRNA. Über die Rekrutierung weiterer Proteine kann es zu einer Deadenylierung der mRNA mit anschließender Degradierung kommen oder es wird eine translationelle Repression initiiert. Es wird vermutet, dass dies unter anderem durch Verdrängung der mRNA vom Initiationskomplex geschieht, wobei hierfür der genaue Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Den miRNAs kommt demnach eine posttranskriptionelle Regulationsfunktion zu, sie werden auch als Feinregulatoren der Proteinexpression bezeichnet (Krol, Loedige, and Filipowicz 2010).

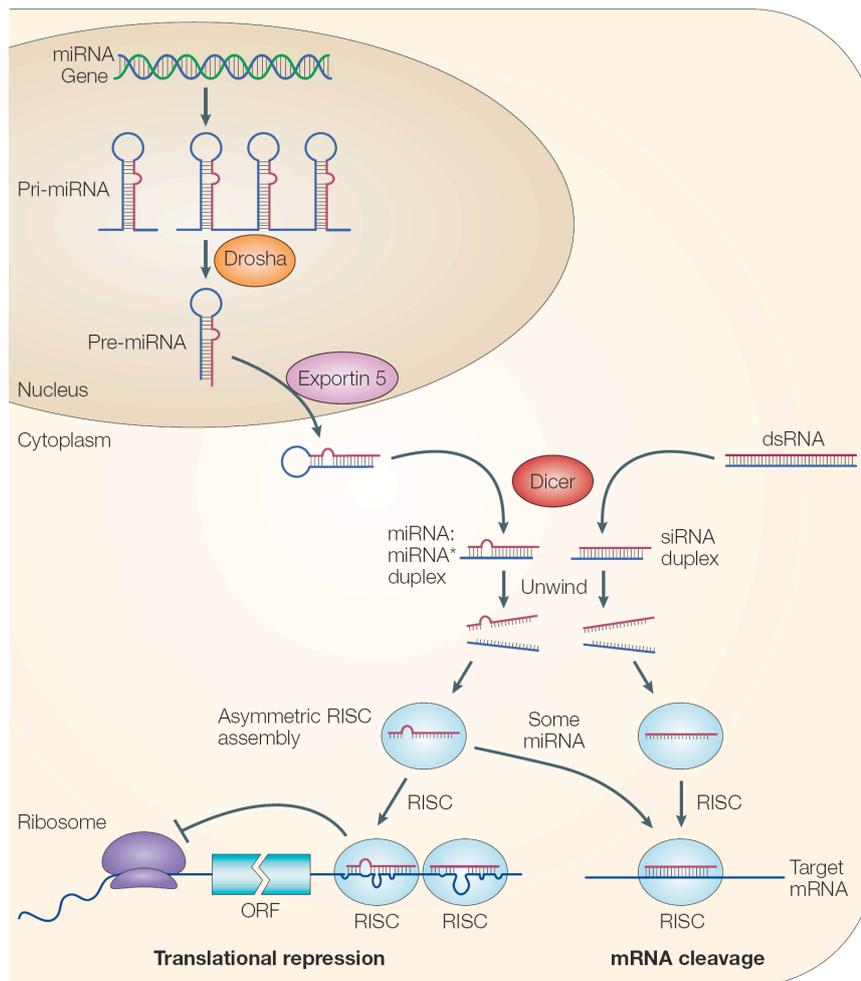


Abb. 4 Schematische Darstellung der miRNA-Synthese und der posttranskriptionellen Regulation der Ziel-mRNA. (Quelle: (He and Hannon 2004))

MiRNAs besitzen eine *Seed*-Sequenz im Bereich der Nukleotide 2-7 bzw. 2-8 ihres 5'-Endes. Diese *Seed*-Sequenz bindet vollständig komplementär, meist an der 3'UTR der mRNA. Eine Erhöhung der Bindungseffizienz kann durch zusätzliche Basenpaarung in der Nukleotidregion 13-16 der miRNA hervorgerufen werden. Die dazwischen liegenden Nukleotide bilden eine Ausstülpung (*bulge*), welche das miRNA-mRNA-Duplex unterbricht. Dabei gehören miRNAs mit identischen *Seed*-Sequenzen zu miRNA-*seed*-Familien, die überlappend dieselben Zielgene regulieren können. Diese miRNA-*seed*-Familien sind bei Säugetieren hoch konserviert (Ha and Kim 2014) und lassen somit Rückschlüsse auf die Wichtigkeit der miRNAs in der Regulation der Proteinexpression zu. Nicht selten kann die 3'UTR einer mRNA mehrere Bindungsstellen für dieselben miRNAs bzw. miRNA-*seed*-Familien aufweisen. Je nach Distanz zwischen den einzelnen Bindungsstellen kann es entweder zur unabhängigen Beeinflussung der mRNA und somit zu einer rein additiven Effektverstärkung kommen oder zur kooperativen Beeinflussung der miRNA-

Bindungsstellen, welche in unmittelbarer Nähe zueinander liegen. Hier wurde eine Effektverstärkung gesehen, die über den rein additiven Effekt hinausgeht (Grimson et al. 2007). Somit haben Gene mit einer langen 3'UTR, wie z.B. PKP1, eine entsprechend große Wahrscheinlichkeit eine Regulation der Expression durch miRNAs zu erfahren. Es lässt sich also für PKP1 eine posttranskriptionelle Regulation durch miRNAs vermuten. Diese Vermutung wird durch die Identifikation von einer Vielzahl von miRNAs in der Epidermis von Mäusen, welche dort eine hohe Expression aufweisen, verstärkt (Rui Yi et al. 2006).

1.2.2 MiRNAs als Feinregulatoren in der Epidermis

Die Haut als größtes Organ des menschlichen Körpers stellt ein komplexes System als äußerste Barriere unseres Körpers und zur Aufrechterhaltung unseres Wasserhaushalts dar. Sowohl zur Erfüllung dieser Aufgabe als auch im Prozess der Differenzierung während der Embryogenese ist eine Vielzahl von Mechanismen notwendig. In der Epidermis von Mäusen konnten zahlreiche miRNAs in hoher Konzentration nachgewiesen werden (Rui Yi et al. 2006). Dies lässt vermuten, dass miRNAs als Feinregulatoren der Proteinsynthese eine wichtige Rolle für das Gleichgewicht der Haut spielen.

Der Entwicklung der Epidermis geht ein einschichtiges Oberflächenepithel voraus. Mittels *Next-Generation-Sequencing* konnten verschiedene miRNA-Expressionsmuster für Epidermis gezeigt werden (Rui Yi et al. 2006; R Yi and Fuchs 2010).

Zur Bestätigung, dass die Abwesenheit der detektierten miRNAs einen Einfluss auf die Entwicklung von Mäusen hat, wurden *Knock-Out*-Mäuse mit einer hautspezifischen *Dicer-1 loss-of-function*-Mutation generiert. *Dicer-1* ist, wie bereits erwähnt, für die Prozessierung der miRNA-Vorstufen zur reifen miRNA notwendig. Die *Knock-Out*-Mäuse zeigten im Northern Blot keine reifen miRNAs. Klinisch erschienen die *Knock-Out*-Mäuse zur Geburt normal, doch innerhalb von ein bis zwei Tagen kam es zum Gewichtsverlust und zur Dehydratation bis hin zum Tod nach spätestens vier bis sechs Tagen (Rui Yi et al. 2006). Anhand dieses Experiments zeigt sich, dass miRNAs eine wichtige Rolle in der Funktionalität der Epidermis haben und es stellt sich die Frage, ob PKP1 als wichtiges Signal- und Strukturprotein der Epidermis ebenfalls durch miRNAs reguliert wird.

Count = Anzahl, wie oft eine bestimmte miRNA kloniert werden konnte; *Frequency* = *Count* im Bezug auf die gesamte miRNA

miRNA	Count	Frequency (%)
mmu-miR-34a	48	4,26
mmu-miR-200a	47	4,17
mmu-miR-200c	42	3,73
mmu-let-7c	38	3,37
mmu-miR-200b	23	2,04
mmu-let-7i	20	1,77
mmu-let-7b	18	1,60

Abb. 5 Tabellarische Übersicht mit Auflistung stark exprimierter und für diese Arbeit relevanter miRNAs in der Epidermis von Mäusen. (Quelle: (Rui Yi et al. 2006); Auszug aus Tbl. 1)

1.2.3 Klinische Bedeutung der miRNAs in der Tumorgenese

Bereits vor über 20 Jahren wurden von Lee et al. kleine RNAs entdeckt, welche in postembryonalen Entwicklungsschritten in der Nematode *Caenorhaditis elegans* (*C. elegans*) eine Rolle spielen. Im Laufe der Jahre wurden diese kleinen RNAs als miRNAs identifiziert und bezeichnet. Im Jahr 2002 konnte erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen miRNAs und malignen Tumoren beim Menschen gezeigt werden. Hierbei wurde detektiert, dass die Expression der mir-15 und mir-16 in ca. zwei Drittel der Fälle bei der chronischen B-Zell-Leukämie herunterreguliert, respektive der Genlokus der genannten miRNAs nicht vorhanden war (Calin et al. 2002). Zusammenfassend konnte in den nachfolgenden Jahren gezeigt werden, dass miRNAs zum einen eine zell- und gewebespezifische Expression aufweisen und dass sich zum anderen das Expressionsmuster zwischen normalen und malignen Zellen unterscheidet. Dabei können miRNAs sowohl als *oncomiRs* als auch als Tumorsuppressoren fungieren (Zhang et al. 2007).

1.2.4 Die miRNA-Familie let-7

Die let-7-Familie ist evolutionär hochkonserviert. Erstmals wurde die let-7-Familie in *C. elegans* beschrieben, wo eine Mutation im let-7-Gen zu einem nicht lebensfähigen Wurm geführt hat (Tennessen and Thummel 2008). Des Weiteren wurden die miRNAs der let-7-Familie als Tumorsuppressoren identifiziert. Bisher konnte in verschiedenen humanen Malignomen, wie zum Beispiel dem Bronchialkarzinom, gezeigt werden, dass eine verminderte Expression eben dieser Familie vorliegt, wohingegen eine Überexpression *in vitro* eine Hemmung des Tumorzellwachstums bewirken konnte (Takamizawa et al. 2004). Bisher konnten zwölf Mitglieder der let-7-Familie auf acht verschiedenen Chromosomen identifiziert werden. Auffällig in vielen Tumoren war, dass die pri-miRNA weiterhin transkribiert wird, es aber nicht zur Umwandlung in die reife let-7-miRNA kommt (Wulczyn et al. 2007). Es wurde eine posttranskriptionelle Repression der let-7-Familie durch die hochkonservierten RNA-bindenden Proteine LIN28A und LIN28B beschrieben. Diese Proteine zählen somit zu den Proto-Onkogenen, da sie die tumorsupprimierende Eigenschaft der let-7-Familie reduzieren und dadurch die onkogenen Zielproteine der let-7-Familie wie u.a. MYC und RAS dominieren können (Balzeau et al. 2017). In Zellen des Bronchialkarzinoms wurde eine erhöhte Expression des Onkogens RAS bei verminderter Expression der let-7 nachgewiesen. Diese umgekehrte Proportionalität konnte *in vitro* durch Überexpression bzw. Repression der miRNA let-7a mit nachfolgenden Immunfluoreszenz-Analysen und Reportergen-Assays bestätigt werden (Johnson et al. 2005).

Eine ähnliche Konstellation ist für Zellen des malignen Melanoms beschrieben. Eine Überexpression der miRNA let-7b führte *in vitro* zur Repression von wichtigen Proteinen des Zellzyklus' (Cyclin D1, D3 und A), wodurch sowohl der Zellzyklus als auch das Wachstum gehemmt wurden (Schultz et al. 2008).

Aus der Abbildung 5 geht hervor, dass verschiedene miRNAs der let-7-Familie in der Epidermis von Mäusen eine hohe Expression aufweisen, sodass ein Zusammenhang der Regulation der PKP1-Expression und der let-7-Familie geprüft werden sollte.

1.2.5 Die miRNA 34a (mir-34a)

Während für die let-7-Familie Zusammenhänge zu Onkogenen beschrieben sind, scheint die mir-34a bei p53, einem der wichtigsten Tumorsuppressorgene, eine Rolle zu spielen. Der Transkriptionsfaktor p53 wird bei zellulärem Stress verstärkt exprimiert, was schlussendlich Zellzyklus-Arrest, Apoptose, Hemmung der Angiogenese und erhöhte DNA-Reparaturmechanismen zur Folge hat (Giono and Manfredi 2006). Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen verstärkter p53-Expression und gleichzeitig erhöhter mir-34a-Expression gezeigt werden. Die mir-34a wiederum rekrutiert Proteine, welche für die oben beschriebenen tumorsupprimierenden Abläufe notwendig sind (Chang et al. 2007).

Sowohl für die miRNA-Familie let-7 als auch für die mir-34a zeigt die vorhandene Literatur essentielle Rollen für Zellzyklus und potentieller Malignombildung bei Störung dieser Funktionen. Zudem zeigt die let-7-Familie eine hohe evolutionäre Konservierung und beide miRNAs weisen ein hohes Expressionsmuster in der Epidermis von Mäusen auf, wo gerade die Haut als sich rasch regenerierendes Organ auf einen funktionierenden Ablauf der Zellzyklus-Mechanismen angewiesen ist.

1.2.6 Die miRNA 200-Familie

Der miR-200-Familie wird ebenfalls eine tumorsupprimierende Rolle zugeschrieben. So werden die miRNAs, darunter auch die mir-200b, als Regulatoren der Epithelial-Mesenchymalen-Transition angesehen, welche für invasives Wachstum und Metastasierung von Tumorzellen notwendig ist. Durch die Überexpression der miR-200-Familie können die Zielproteine (u.a. ZEB1, ZEB2 und TGF-beta) herunterreguliert werden und die Zelle behält ihre epithelialen Eigenschaften. Zusätzlich wird auch die Expression von E-Cadherin gesteigert (Mongroo and Rustgi 2010). Cadherine spielen als transmembranäre Adhäsionsproteine eine Rolle bei Zell-Zell-Kontakten, bei der Signaltransduktion und bei der Aufrechterhaltung der Zellpolarität.

Die Abbildung 5 zeigt für die mir-200b ebenfalls eine hohe Expression in der Epidermis von Mäusen.

2. Zielstellung der Arbeit

Aus der Einleitung geht hervor, dass die Homöostase der Haut ein sensibles Gleichgewicht darstellt und eine exakt kontrollierte Genexpression zu seiner Aufrechterhaltung benötigt. PKP1 spielt dabei in den Desmosomen eine Rolle als Stabilitätsfaktor, in dem es als Strukturprotein fungiert und durch die Rekrutierung anderer desmosomaler Proteine für die Organisation des Zytoskeletts sorgt. Eine Fehlregulation von PKP1 führt zu verheerenden klinischen Bildern.

Auf der anderen Seite kommt PKP1 die Aufgabe eines Signalproteins zu, in dem es durch Interaktion mit eIF4A die Translationsrate steigern und somit die Proliferation fördern kann.

Somit ergibt sich die Schlüsselfrage, wie PKP1 reguliert wird. Zur Klärung dieser Frage kommen die miRNAs als neue Dimension eines regulatorischen Netzwerks ins Spiel. PKP1 bietet mit seiner langen 3'UTR zahlreiche potentielle Bindungsstellen für miRNAs. Um die oben genannte Schlüsselfrage zu klären, war das Ziel dieser Arbeit potentielle Bindungsstellen von miRNAs an der 3'UTR von PKP1 zu identifizieren und nachfolgend deren Effekte auf PKP1 zu untersuchen.

3. Material und Methodik

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (München, Deutschland) in der Qualitätsstufe *p.a.* bezogen. Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) bezogen. Enzyme, dazugehörige Puffer sowie Protein- und DNA-Größenstandards wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

Materialien für die Kultivierung von Mauskeratinozyten (MKZ)

- Grundmedium 500ml DMEM/Ham's F-12 low Calcium (50 µM)
- Zusätze zum Grundmedium:
 - o 100ml FCS (fetal calf serum)
 - o 5ml Glutamax (100x)
 - o 5ml Natriumpyruvat
 - o 2ml Adenin
 - o 500µl Insulin
 - o 250µl Hydrocortison
 - o 500µl EGF
 - o 15µl Choleratoxin
- Trypsin (0,025% Trypsin in 0,02% EDTA)
 - o Trypsin-Gebrauchslösung (2,432ml PBS/EDTA+20,068ml PBS+ 0,45ml Trypsin)
- Kulturplatten von BD Falcon
 - o Beschichtung mit 500µl Stock von Kollagen I in 42,7ml 0,02N Essigsäure

Materialien für die Kultivierung von HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)

- Grundmedium 500ml DMEM/ DMEM high glucose 4,5 g/l
- Zusätze zum Grundmedium:
 - o 50ml FCS (fetal calf serum)
 - o 5ml Natriumpyruvat
- Kulturplatten von SPL

Umsetzen von Zellen

Für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden zwei verschiedene Zelllinien in Kultur gehalten, MKZ und HEK293-Zellen. Die MKZ benötigten 32°C, 5% CO₂-Gehalt und mit Kollagen beschichtete Kulturplatten von BD Falcon als optimale Wachstumsbedingungen während die HEK293-Zellen bei 37°C, ebenfalls 5% CO₂-Gehalt und unbeschichteten SPL Platten kultiviert wurden. Zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen von der Kulturschale wurde nach zweimaligem Waschen mit PBSE eine Trypsin-Gebrauchslösung (0,5% (v/v) Trypsin/PBSE) dazugegeben und bei 37°C je nach Zelllinie 2 bis 15 Minuten inkubiert. Nach Überführung der Zellen in ein 15ml-Greiner mit Kultivierungsmedium und der Zentrifugation (3 Minuten bei 1000xg) wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert, in gewünschter Verdünnung auf die jeweiligen Kulturplatten verteilt und mit frischem Medium versehen.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren und für späteren Bedarf vorrätig zu haben, erfolgte das Umsetzen der Zellen (s.o.) einschließlich der Zentrifugation von 3 Minuten bei 1000xg. Das entstandene Zellpellet wurde nachfolgend in 1ml FCS 10% (v/v) DMSO resuspendiert und in Kryo-Röhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig im Wasserbad erwärmt und anschließend in 5ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Nach 3minütiger Zentrifugation bei 1000xg konnte das Zellpellet in frischem Medium erneut resuspendiert und ausplattiert werden.

3.1.2 Transfektion muriner und humaner Zellen mit Lipofektion

Mithilfe der Transfektion kann man fremde Nukleinsäuren in eukaryontische Zellen einbringen. Für diese Arbeit wurde die nicht-virale Methode der Lipofektion angewendet, bei der kationische Lipide im wässrigen Milieu Mizellen (*monolayer*) oder Liposomen (*bilayer*) bilden können. Bei beiden Strukturen entsteht ein Komplex mit der zu transfizierenden Nukleinsäure, welcher per Endozytose in das Zytoplasma aufgenommen wird.

Materialien für die Transfektion mittels Lipofektion

- Lipofektionsreagenz ‚Lipofectamin 2000‘ (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- Serum-freies Medium (SF-Medium) für die jeweilige Zelllinie wie unter 3.1.1a und 3.1.1b beschrieben OHNE Zusatz von FCS
- Spezifische miRNA-*Mimics* und miRNA-*Inhibitors* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Luciferase-Reporter-Plasmid

Ablauf der Transfektion mittels Lipofektion

Die Transfektion wurde für die zugrunde liegende Arbeit für zwei Experimentenansätze genutzt.

Die MKZ wurden ausschließlich mit miRNAs bzw. den entsprechenden Kontrollen transfiziert, um nachfolgend die Wirkung auf das Ziel-Protein PKP1 auf Proteinebene zu analysieren. Dabei erfolgte die Transfektion von MKZ in Suspension und gemäß den Angaben des Herstellers von ‚Lipofectamin 2000‘.

Der zweite Experimentenansatz beinhaltete die Transfektion von HEK293-Zellen mit einem Luciferase-Reporter-Plasmid, ebenfalls stimulierenden und hemmenden miRNAs und deren Kontrollen mit nachfolgender Bestimmung der Luciferase-Aktivität (siehe Kapitel 3.3.6). Dabei wurden die HEK293-Zellen direkt in den Kulturschalen, ebenfalls mit ‚Lipofectamin 2000‘ laut Herstellerangaben transfiziert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Materialien für die RNA-Präparation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

- Phosphatpuffer (PBS); pH 7,3 (137mM NaCl; 2,6mM KCl; 8,1mM Na₂HPO₄; 1,5mM KH₂PO₄)
- Trizol (0,8M Guanidinthiocyanat; 0,4M Ammoniumthiocyanat; 0,1M Na-Acetat pH 5,0; 5% Glycerol (v/v); 38% Aqua-Roti-Phenol (v/v) auf 100ml H₂O)
- Chloroform
- Isopropanol
- Glykogen
- Ethanol 80%

Durchführung der RNA-Präparation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden die MKZ zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trizol versehen (bei Verwendung von *6-well*-Platten). Durch Repipettieren wurde das Gemisch homogenisiert und nachfolgend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem erneuten Auftauen wurden die Proben bei 4°C mit 12.000xg für 10 Minuten zentrifugiert und der lösliche Überstand anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde nun mit 200µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und bei Raumtemperatur für drei Minuten inkubiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation mit 12.000 × g für 15 Minuten bei 4°C kam es zur Phasentrennung und die wässrige, RNA-haltige Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden pro Reaktionsgefäß 500µl Isopropanol und 1µl Glykogen zugegeben und nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur für zehn Minuten mit 12000xg und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 80%igem kalten Ethanol gewaschen. Nach der jetzigen Zentrifugation für fünf Minuten bei 7.500xg und 4°C konnte der Überstand wieder verworfen werden und das verbliebene Pellet abschließend für 3-5 Minuten bei 55°C im Heizblock getrocknet werden, bevor es in RNase- und DNase-freiem Wasser aufgenommen und nochmals für 3 Minuten, nun im geschlossenen Reaktionsgefäß, im 55°C warmen Heizblock inkubiert wurde. Die Konzentration der RNA wurde anschließend photometrisch bestimmt. Die Lagerung der RNA bis zur Reversen Transkription erfolgte bei -80°C.

3.2.2 Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA durch Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Materialien für RT-PCR

- *Random Primer (random hexamers oder oligodTs)* (100µM)
- 5xRT-Puffer
- DTT (100mM)
- dNTPs (100mM)
- SuperScript II M-MLV Reverse Transkriptase (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA)

Ablauf der RT-PCR

Um die isolierte Gesamt-RNA zu analysieren, wurden quantitative RT-PCR-Experimente (qPCR, siehe Kapitel 3.2.3) durchgeführt. Diesen Analysen gingen die RT-PCR und die nachfolgende Amplifikation der cDNA mittels PCR (siehe Kapitel 3.2.3) voraus.

Für die RT wurden 2µg Gesamt-RNA mit 1µl *Random Primern* (*random hexamers* oder *oligoDTs*) und RNase- und DNase-freiem H₂O versetzt (Gesamtvolumen 11,5µl) und zuerst für 10 Minuten bei 65°C und nachfolgend für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der daraus resultierenden Denaturierung erfolgte die Zugabe von 4µl 5xRT-Puffer, 2µl DTT, 2µl dNTPs und 0,5µl SuperScript II M-MLV RT. Dieser Reaktionsansatz wurde erst für 10 Minuten bei 30°C und dann für 80 Minuten bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase war eine weitere Inkubation von 10 Minuten bei 70°C notwendig. Die hieraus resultierende cDNA wurde entweder unmittelbar amplifiziert und für die Analyse mittels qPCR genutzt oder bei -20°C gelagert.

3.2.3 Amplifikation von cDNA durch PCR

Für diese Arbeit wurde der ‚High Fidelity-PCR-Enzym-Mix‘ (Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland) zur Amplifikation der cDNA genutzt.

Materialien und Ansatz für die PCR mit ‚High Fidelity‘

- 1µl cDNA (*template*)
- 5µl High Fidelity Buffer
- 1µl dNTPs mix
- 1µl spezifischer Forward Primer
- 1µl spezifischer Reverse Primer
- 1µl High Fidelity Polymerase
- 40µl Wasser (bzw. Gesamtvolumen 50µl)

Ablauf der PCR mit ‚High Fidelity‘

Jeder Ansatz enthielt die oben aufgeführten Substanzen und wurde durch kurzes Vortexen und nachfolgendes Zentrifugieren gemischt. Nachfolgend erfolgte zur exponentiellen Vermehrung des entsprechenden DNA-Fragments ein zyklisch ablaufendes Programm im Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit den Schritten der *template*-Denaturierung (30s; 94°C), der Oligonukleotid-Anlagerung (50-65°C (je nach Primer); 30s) und der DNA-Synthese (60°C oder 72°C, 60s je 1kb Fragmentlänge).

3.2.4 Quantitative *real-time*-PCR (qPCR)

Mithilfe der qPCR kann der RNA-Gehalt von Zellen bzw. Veränderungen der Mengenverhältnisse bestimmter Transkripte quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die qPCR das TaqMan-System verwendet. Durch fluoreszenzbasierte Messungen können der Verlauf einer herkömmlichen PCR dokumentiert und daraus Rückschlüsse auf die RNA-Menge gezogen werden, da die gemessene Fluoreszenz proportional zum entstandenen PCR-Produkt ist.

Bei dem TaqMan-System werden Sonden eingesetzt, die komplementär zu einem Teil des entstehenden PCR-Produkts sind und somit eine hohe Spezifität aufweisen. Diese Methode erfolgte hauptsächlich zur Analyse von miRNAs mithilfe ‚TaqMan MicroRNA Assays‘ (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) und entsprechend deren Materialien.

Materialien der TaqMan-qPCR

- 5xRT-Puffer
- dNTPs
- RNaseOUT
- SuperScript II M-MLV RT
- RT-Oligonukleotid (Primer)
- 2xTaqMan Universal MasterMix
- Fluorescein
- miRNA-spezifische TaqMan-Sonde
- RNase- und DNase- freies H₂O

Ablauf der qPCR

In einem ersten Reaktionsansatz wurde eine spezielle RT-PCR durchgeführt, da die miRNAs nur eine Länge von ca. 21 Nukleotiden besitzen. Mithilfe einer spezifischen Multiplex-RT-Reaktion und speziellen *stem-loop*-Oligonukleotiden (3-4 überhängende Basen am 5'Ende) erfolgte eine Hybridisierung am 3'Ende der jeweiligen miRNA.

Hierfür wurden 4µl 5xRT-Puffer, 0,2µl dNTPs, 0,3µl RNaseOUT, 0,5µl SuperScript II M-MLV RT, 7µl RNase- und DNase-freies H₂O mit 1µg RNA und 2µl Primer pro miRNA (Gesamtvolumen 8µl, da Reaktion für bis zu vier miRNAs gleichzeitig möglich) zu einem Ansatz pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen durchlief der Ansatz im Thermocycler ein Programm mit 5 Minuten bei 4°C, 30 Minuten bei 16°C, nachfolgend 30 Minuten bei 42°C und abschließend 10 Minuten bei 70°C.

Der bisherige Ansatz von 20µl wurde mit 45µl RNase- und DNase- freiem H₂O versehen. Nachfolgend wurden davon 5µl (cDNA auf 1:3,25 verdünnt) pro *well* verwendet. Zusätzlich kamen pro *well* 10µl Mastermix, bestehend aus 7,5µl 2xTaqMan Universal MasterMix, 0,15µl Fluorescein, 0,75µl miRNA-spezifischer TaqMan-Sonde und 1,6µl RNase- und DNase-

freiem H₂O, dazu. Nun folgte im iQ5-Cycler eine zehnmütige Denaturierung bei 95°C und anschließend 50 Zyklen bestehend aus Denaturierung (15s bei 95°C) und gleichzeitiger Anlagerung und Elongation (60s bei 60°C).

Als Referenz für die Auswertung wurde die Anreicherung der U6 (kleine, nicht-kodierende RNA) genutzt. Folgende Rechnung (Livak and Schmittgen 2001) liegt der Auswertung zu Grunde:

$$R = 2^{-((ctA-ctB)_X - (ctA-ctB)_Y)}$$

R = miRNA-Verhältnis
ctA = ct-Wert Ziel-miRNA
ctB = ct-Wert Kontroll-miRNA
X = Population
Y = Kontrollpopulation

3.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Phosphatgruppen sind Nukleinsäuren negativ geladen und besitzen somit die Möglichkeit, im elektrischen Feld zu wandern. Dabei ist die Geschwindigkeit der Wanderung von Konformation und Größe der Nukleinsäuren abhängig. Agarose-Gele funktionieren hierbei als eine Art Sieb auf Molekularebene.

Materialien für die Elektrophorese mittels Agarose-Ethidiumbromid-Gel

- TBE-Puffer
 - o 445mM Tris
 - o 445mM Borsäure
 - o 10mM EDTA
- 6xDNA-Ladepuffer
 - o 0,25% (w/v) Bromphenolblau
 - o 40% (v/v) Glycerol
 - o 100mM EDTA
 - o 0,1% (v/v) SDS

Ablauf der Elektrophorese von Nukleinsäuren mittels Agarose-Ethidiumbromid-Gel

Zur Herstellung der Agarose-Ethidiumbromid-Gele wurden entweder 1g Agarose (1%ig) oder 2g Agarose (2%ig) mit 100ml TBE-Puffer vermischt und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich sämtliche Konkremete aufgelöst haben. Nach kurzer Abkühlung des Reagenzgefäßes unter fließendem Wasser erfolgte die Zugabe von 1µl Ethidiumbromid pro 100ml TBE. Diese Mischung wurde für ca. 30 Minuten zum Aushärten in eine Schale gegeben. Zur Erstellung der Ladetaschen wurden entsprechende Kämmе eingesetzt.

Nachfolgend wurden die DNA-Proben mit 6xDNA-Ladepuffer im Verhältnis 5:1 versetzt. Nach Befüllen der Taschen und Auffüllen der Kammern mit TBE-Puffer erfolgte die Elektrophorese für 30-60 Minuten bei 120mV.

Das Ethidiumbromid verursacht eine Interkalierung zwischen Nukleinsäure und Fluoreszenzfarbstoff. Die Fluoreszenz konnte abschließend im UV-Licht visualisiert werden.

3.2.6 Reinigung und Gelextraktion von Nukleinsäuren

Zur Reinigung der DNA-Extrakte aus dem unter 3.2.5 beschriebenen Agarose-Gel wurde das ‚NucleoSpin Gel and PCR Clean-up System‘ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet und nach Angaben des Herstellers umgesetzt. Dieses System kam auch bei der Aufreinigung von PCR-Produkten zum Einsatz.

3.2.7 Klonierung von Expressionsplasmiden

Für diese Arbeit wurden für Luciferase-Reportergen-Analysen (Kapitel 3.3.6) Expressionsplasmide kloniert. Hierfür wurde das entsprechende DNA-Fragment zunächst ausgehend von MKZ-cDNA unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide, welche die entsprechenden Restriktionsschnittstellen enthielten, amplifiziert. Die Amplifikation erfolgte wie unter 3.2.3 beschrieben mit dem ‚High Fidelity PCR-Enzym-Mix‘ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) gemäß Herstellerangaben.

Nachfolgend wurde das DNA-Fragment elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 3.2.5), entsprechend der Banden und zu erwartenden Größe ausgeschnitten und gereinigt (Kapitel 3.2.6).

Nach erfolgtem präparativen Restriktionsverdau (Kapitel 3.2.8) wurde das DNA-Fragment mittels Ligation (Kapitel 3.2.9) in die entsprechenden Plasmide subkloniert. Hier kamen entsprechende Restriktionsschnittstellen zur Verwendung. Der Erfolg der Klonierung wurde vor weiterer Verwendung mittels analytischem Restriktionsverdau (Kapitel 3.2.8) und Sequenzierung (Kapitel 3.2.13) überprüft.

3.2.8 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Mithilfe von bakteriellen Enzymen, den Restriktionsendonukleasen, können Phosphodiesterbindungen der DNA hydrolysiert werden. Dabei erfolgt die Hydrolyse im Bereich der entsprechenden Erkennungssequenz der Enzyme, welche vier, sechs oder acht Basenpaare umfasst. Man unterscheidet eine symmetrische und eine asymmetrische Hydrolyse, bei Ersterer entstehen doppelsträngige Enden, sogenannte *blunt ends* und bei Zweiterer kommt es zu einzelsträngigen Enden, sogenannten *sticky ends*. Wie unter 3.2.7 erwähnt wurden die Restriktionsendonukleasen zur Klonierung von DNA-Fragmenten und zur Identifizierung von Plasmiden genutzt.

Materialien des Restriktionsverdaus von Nukleinsäuren

- Plasmid-DNA (1µg/µl)
- Spezifische Restriktionsendonuklease (10U/µl)
- 10xPuffer (Herstellerangaben)
- RNase- und DNase-freies H₂O

Ablauf des Restriktionsverdaus von Nukleinsäuren

Zur Klonierung der Expressionsplasmide wurden das DNA-Fragment und der entsprechende Zielvektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelt, um identische Überhänge zu erzeugen.

Für einen präparativen Verdau wurden 2µl der Plasmid-DNA, 1µl 10xPuffer und 0,3µl der jeweiligen Restriktionsendonukleasen mit RNase- und DNase-freiem H₂O auf 10µl aufgefüllt, wohingegen für einen analytischen Verdau 10µl der Plasmid-DNA, 5µl 10xPuffer und 3µl der jeweiligen Restriktionsendonukleasen mit RNase- und DNase-freiem H₂O auf 50µl aufgefüllt wurden. Beide Ansätze wurden nachfolgend für 3h bei 37°C oder über Nacht inkubiert. Anschließend kamen erneut die Gel-Elektrophorese (Kapitel 3.2.5) und die Reinigung der DNA (Kapitel 3.2.6.) zum Einsatz.

3.2.9 Ligation

Die Ligation dient der kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten, welche durch Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen entstanden sind. Dies geschieht mithilfe des Enzyms Ligase. Für diese Arbeit wurde das Enzym T4 Ligase verwendet.

Materialien der Ligation

- DNA-Fragment und Zielvektor
- 5xLigase-Puffer
- T4 Ligase (1U/μl)
- RNase- und DNase-freies H₂O

Ablauf der Ligation

Das Mengenverhältnis zwischen DNA-Fragment und Zielvektor sollte zwischen 3:1 bis 5:1 liegen, sodass vor der Ligation eine elektrophoretische Auftrennung im Agarose-Gel (Kapitel 3.2.5) zur Abschätzung der Mengenverhältnisse sinnvoll ist und je nach Ergebnis z.B. 5μl DNA-Fragment (*insert*) mit 1μl Zielvektor, 2μl 5xLigase-Puffer und 1μl T4 Ligase mit RNase- und DNase-freiem H₂O auf 10μl aufgefüllt wurden. Der Ligationsansatz wurde nachfolgend für 2h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in chemokompetente Bakterien (*E. coli* JM109) transformiert. (Kapitel 3.2.11)

3.2.10 Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien

Um die Expressionsplasmide zu vervielfältigen wurde der *Escherichia coli*-Stamm JM109 (Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet.

Genotyp *E. coli* JM109: e14:(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1
 hsdR17(r_Km_K⁺) supE44 relA1 Δ(lac-proAB)
 [F'⁺traD36 proAB lacI^qZAM15]

Materialien zur Herstellung von Transformations-kompetenten Bakterien

- LB-Medium
 - o 1% (w/v) NaCl
 - o 1% (w/v) Trypton
 - o 5% (w/v) Hefeextrakt, pH 7,0
- LB-Agar
 - o LB-Medium
 - o 2% (w/v) Agar-Agar
- TSB-Puffer
 - o 1xLB-Medium (Stammlösung 2xLB-Medium, pH 6,1)
 - o 10% (v/v) PEG 4000
 - o 5% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)
 - o 10mM MgCl₂
 - o 10mM MgSO₄
- 10% Glycerol

Ablauf der Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien

Der Bakterien-Stamm wurde im komplexen Nährmedium *lysogeny broth* (LB-Medium) angezogen. Zum Ausplattieren wurde für den LB-Agar dem LB-Medium 2% (w/v) Agar-Agar zugegeben.

Um rekombinante Klone zu selektionieren, wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt, bei der 5ml LB-Medium mit je einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurden. Nachfolgend wurden 2ml dieser Vorkultur zum Animpfen einer Hauptkultur (200ml LB-Medium) verwendet. Die Hauptkultur wurde ebenfalls bei 37°C in einem Schüttelkolben bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Anschließend erfolgte die Abkühlung der Bakterien auf Eis sowie die Zentrifugation (5 Minuten, 4°C, 3000xg). Das entstandene Pellet konnte in 1/20 Volumen TSB-Puffer aufgenommen werden und wurde anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Nun erfolgte entweder die direkte Verwendung zur Transformation von Plasmid-DNA (Kapitel 3.2.11) oder die Zugabe von 10% Glycerol und Aliquotierung zu je 100µl mit nachfolgender Lagerung bei -80°C.

3.2.11 Transformation von Plasmid-DNA

Materialien für die Transformation von Plasmid-DNA

- LB-Agar
 - o LB-Medium
 - o 2% (w/v) Agar-Agar
 - o Ampicillin
- 5xKCM-Lösung
 - o 500mM KCl
 - o 150mM CaCl₂
 - o 250mM MgCl₂

Ablauf der Transformation von Plasmid-DNA

Für die Transformation von Plasmid-DNA kamen 100µl der unter 3.2.10 hergestellten chemokompetenten Bakterien zum Einsatz. Ihnen wurden 50ng Plasmid-DNA oder 10µl Ligationsansatz (Kapitel 3.2.9) sowie 2,5µl 5xKCM-Lösung hinzugefügt und nachfolgend für 20 Minuten auf Eis und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte bei 37°C ein einstündiges Schütteln, wonach die transformierten Bakterien mit 1ml LB-Medium auf LB-Platten ausplattiert werden konnten, welche ein Selektionsantibiotikum (Ampicillin) enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.12 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Materialien für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

- Lösung A
 - o 50mM Glucose
 - o 25mM Tris-HCl, pH 8,0
 - o 10mM EDTA
- Lösung B
 - o 0,2M NaOH
 - o 1% SDS
- LB-Medium (siehe 3.2.10a)
- 3M Natriumacetat
- Isopropanol
- 70% Ethanol
- RNaseA

Ablauf der Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Von den unter 3.2.11 beschriebenen Kulturplatten wurden die Kolonien in 3ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum aufgenommen und über Nacht kultiviert. Von der Übernachtskultur wurden 1,5ml in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 1 Minute bei Raumtemperatur und 13.000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100µl Lösung A (4°C) aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Lyse der Bakterien wurden nun 200µl von Lösung B zugegeben und das Ganze erneut für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte zur Präzipitation der gelösten Proteine und der genomischen DNA die Zugabe von 150µl 3M Natriumacetat. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten bei 13.000xg und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA durch Zugabe von 800µl Isopropanol und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur.

Die Plasmid-DNA wurde anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 13.000xg pelletiert und mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach Absaugen des Alkohols bei 60°C getrocknet.

Abschließend erfolgte das Lösen der DNA in 50µl destilliertem H₂O (Zugabe von 0,5ng RNaseA) unter Schütteln bei 37°C.

Vor der Weiterverwendung für die Transfektion humaner und/oder muriner Zellen erfolgte die Reinigung mithilfe des ‚NucleoBond Xtra EF Midi Purification System‘ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe von Restriktionsendonukleasen (Kapitel 3.2.8) und Sequenzierung (Kapitel 3.2.13).

3.2.13 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

3.2.14 *in-vitro*-Transkription

Für das Experiment des miR-TRAP (Kapitel 3.3.5) war die *in-vitro*-Transkription der mit 4xMS2-*loops* markierten PKP1-3'UTRs und der 4xMS2-*loops* als Negativkontrolle für die Co-Präzipitation von miRNAs notwendig. Dies fand mithilfe des ‚RiboMAX Large Scale RNA Production Systems‘ (Promega, Fichtburg, Wisconsin, USA) nach Angaben des Herstellers statt. Die anschließende Reinigung der synthetisierten RNA wurde mittels ‚MEGAclear Kit‘ (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) ebenfalls gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.15 Elektrophoretische Auftrennung von einzelsträngigen Nukleinsäuren mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese

Einzelsträngige DNA und RNA kann durch denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei verhindert der Harnstoff die Basenpaarung der Nukleinsäuren, sodass diese unabhängig ihrer Basenzusammensetzung und Sequenz durch das Gel laufen können.

Materialien für die Elektrophorese mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen

- denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoff-Gel
 - 13,25ml 30% Acrylamid/0,8%Bisacrylamid
 - 14,5ml destilliertes H₂O
 - 21g Harnstoff
 - 10ml 5xTBE
 - 200µl 10% APS
 - 25µl TEMED
- 2xFA-SB
 - 18mM EDTA
 - 0,25% (v/v) SDS
 - 2,5% (v/v) Bromphenolblau
 - 93,65% (v/v) Formamid

Ablauf der elektrophoretischen Auftrennung einzelsträngiger Nukleinsäuren mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese

Die Gele wurden gemäß den Angaben unter 3.2.15 hergestellt und ein zehnminütiges Vorlaufen des Gels in 1xTBE-Puffer gestartet. Währenddessen wurden die entsprechenden Nukleinsäuren mit 2xFA-SB versetzt und für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Auftragen der Nukleinsäuren lief das Gel bei 15mA für 10 bis 30 Minuten.

Die Nukleinsäuren konnten anschließend mittels GelGreen (Biotium, Hayward, Kalifornien, USA) gefärbt und sichtbar gemacht werden.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Materialien für die Herstellung von Zelllysaten

- 5xMLB-Lysepuffer
 - o 125 mM HEPES, pH 7,5
 - o 750mM NaCl
 - o 5% (v/v) NP-40
 - o 5mM EDTA
 - o 10% (v/v) Glycerol
- SDS-Lysepuffer
 - o 25mM Tris-HCL, pH 7,4
 - o 1% (v/v) SDS

Ablauf der Herstellung von Zelllysaten

Vor Auftragen des Lysepuffers (s.o.) wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen. Das Lösen der Zellen von der Schale erfolgte mit einem Zellschaber. Nachfolgend wurden die Zelllysate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach mit Handwärme schonend wieder aufgetaut. Gegebenenfalls war eine Homogenisierung mit 0,8mm- und 0,45mm-Kanülen (Sterican, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) notwendig.

3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration in einem Zelllysate zu bestimmen, wurde das ‚Coomassie Plus Protein Assay Reagent‘ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Dabei wurde das Lysat mit destilliertem H₂O auf 1:150 verdünnt und gemäß

Herstellerangaben mit einem Volumen ‚Coomassie Plus Protein Assay Reagent‘ versehen. Nachfolgend wurde der Ansatz geschüttelt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Absorption bei 595nm bestimmt. Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurden BSA-Lösungen (BSA: Bovines Serum Albumin) bekannter Konzentration (2,5-100µg/ml) verwendet.

3.3.3 Fällung von Proteinen

Um gelöste Proteine aus einer wässrigen Lösung zu konzentrieren, erfolgte die Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA). Dafür wurde die Proteinlösung mit 1/10 Volumen Natriumdeoxycholat und 1/5 Volumen kalter 10%iger TCA versetzt und nach kräftigem Mischen bei 4°C für 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (13.000xg, 10 Minuten, 4°C). Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei Mal mit je 500µl kaltem Aceton gewaschen und nachfolgend bei 95°C für 5 Minuten getrocknet. Das Proteinpellet wurde abschließend in 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.3.4 SDS-Page und Western Blot Analysen

Mithilfe der SDS-Page (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Durch die Zerstörung der Sekundär- und Quartärstruktur der Proteine durch das SDS und die anschließende Mizellenbildung wird die eigentliche Ladung der Proteine abgeschirmt.

Nachfolgend kamen Western Blot Analysen zum Einsatz, hierbei wurden die aufgetrennten Proteine per *semi-dry*-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Aufbau der Apparatur ist unter 3.3.4 mit aufgeführt.

Materialien für SDS-Page und Western Blot

SDS-Page:

- 4xSDS-Probenpuffer
 - o 0,25mM Tris-HCl, pH 6,8
 - o 8% (v/v) SDS
 - o 10% (v/v) beta-Mercaptoethanol
 - o 30% (v/v) Glycerol
 - o 0,2% (v/v) Bromphenolblau

- Elektrophoresepuffer
 - o 25mM Tris-HCl, pH 8,8
 - o 132mM Glycin
 - o 0,1% (v/v) SDS
- Sammelgelpuffer (0,5M Tris-HCl), pH 6,8
- Sammelgel-Zusammensetzung
 - o 2,5ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
 - o 7,5ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8
 - o 200µl 10% SDS
 - o 400µl APS
 - o 20µl TEMED
 - o 12ml destilliertes H₂O
- Trenngelpuffer (1,5M Tris-HCl, pH 8,8)
- Trenngel-Zusammensetzung (10%ig)
 - o 10ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
 - o 7,5ml 0,5M Tris-HCl, pH 8,8
 - o 300µl 10% SDS
 - o 200µl APS
 - o 20µl TEMED
 - o 12ml destilliertes H₂O

Western Blot Apparatur-Aufbau:

Anode (+)
 3x Whatmanpapier in Blotpuffer I
 3x Whatmanpapier in Blotpuffer II
 1x Nitrocellulose-Papier in Blotpuffer II
 1x SDS-Polyacrylamid-Gel
 3x Whatmanpapier in Blotpuffer III
 Kathode (-)

- Blotpuffer I
 - o 0,3M Tris-HCl, pH 10,4
 - o 20% (v/v) Methanol
- Blotpuffer II
 - o 25mM Tris-HCl, pH 10,4
 - o 20% (v/v) Methanol
- Blotpuffer III
 - o 25mM Tris-HCl, pH 9,4
 - o 20% (v/v) Methanol
 - o 40mM ε-Aminocaprinsäure
- 10xTBST
 - o 100mM Tris-HCl, pH7,6
 - o 1mM NaCl
 - o 1% (v/v) Tween-20
- 10xPonceau-S-Lösung
 - o 2% (w/v) Ponceau-S
 - o 30% (v/v) Sulfosalicylsäure
 - o 30% (v/v) Trichloressigsäure
- CL-Lösung
 - o 25mM Luminol
 - o 0,4mM Cumarinsäure
 - o 100mM Tris-HCl, pH 8,5
 - o 0,02% (v/v) H₂O₂

Ablauf von SDS-Page und Western Blot

Für die SDS-Page wurden 50 bis 75µg Protein mit 24µl SDS-Lysepuffer und 8µl 4xSDS-Probenpuffer versetzt und nachfolgend bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend wurden 20µl Proteinprobe und 5µl Proteinmarker („Unstained Protein Molecular Weight Marker“ bzw. „Prestained Protein Marker“) auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 90V für 120 bis 180 Minuten durchgeführt.

Danach erfolgte der Transfer auf die Nitrocellulosemembran in Abhängigkeit von der Proteingröße bei 1mA/cm² für 60 bis 180 Minuten. Die Transferkontrolle erfolgte mittels Färbung mit 1xPonceau-S-Lösung. Die Markerbanden wurden gekennzeichnet und die Membran anschließend zum Entfärben mit destilliertem H₂O und TBST mehrfach gewaschen.

Nach Entfärbung wurden unspezifische Antikörperbindstellen je nach Angaben des Antikörper-Herstellers mit 5% (w/v) Milch/TBST oder 5% (w/v) BSA/TBST für 60 Minuten geblockt. Nun konnte über Nacht bei 4°C die Inkubation mit dem primären Antikörper (siehe Anlagen, Tbl. 5) erfolgen, je nach Angaben des Herstellers mit 5% (w/v) Milch/TBST oder 5% (w/v) BSA/TBST. Vor und nach Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (siehe Anlagen, Tbl. 6) für 2 Stunden in 5% (w/v) Milch/TBST bei Raumtemperatur wurde die Membran jeweils dreimal mit TBST gewaschen. Durch das Waschen wurden ungebundene Antikörper entfernt.

Abschließend konnte die Peroxidase-Aktivität des gebundenen Sekundärantikörpers durch die Zugabe eines Substrats (Roti-Lumin oder CL-Lösung) und Auflegen eines Röntgenfilms (FujiFilm X-ray Film RX; Minato, Japan) visualisiert werden.

3.3.5 miR-TRAP

Der miR-TRAP dient als *in-vitro*-Methode zur Identifizierung von regulatorischen miRNAs einer bestimmten mRNA (Braun et al. 2014). Dabei werden die spezifisch gebundenen miRNAs isoliert und mittels TaqMan-q-PCR (Kapitel 3.2.4) analysiert.

Materialien des miR-TRAP

- Lyse- und Binde-Puffer (LBP)
 - o 20mM Tris-HCl, pH 7,5
 - o 150mM KCl
 - o 1,5mM MgCl₂
 - o 8,7% (v/v) Glycerol
 - o 0,05% (v/v) NP-40
- BSA (10mg/ml)
- Hefe-tRNA (10µg/µl)
- Heparin 11µg/ml
- 30U RNase OUT
- 1mM DTT
- 15mM Maltose
- Proteinase-K
- Ammoniumacetat
- Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
- 99% (v/v) Ethanol
- Glykogen
- 80% (v/v) Ethanol

Ablauf des miR-TRAP

Zu Beginn wurden 110µl Amylosekügelchen (New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland) dreimal mit LBP gewaschen und anschließend mit 400pmol rekombinant hergestelltem MS2BP-MBP für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der LBP wurde nun vollständig entfernt. Zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen wurden 950µl LBP mit 50µl BSA und 4µl Hefe-tRNA versehen, dem Ansatz zugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit LBP wurden die Amylosekügelchen in zwei exakt gleiche Ansätze aufgeteilt, der LBP vollständig entfernt und je Ansatz 1ml LBP mit 11µg/ml Heparin zugegeben.

Nun erfolgte bei einem Ansatz die Zugabe von 20pmol *in-vitro*-transkribierter, mit 4xMS2-*loops* markierter PKP1-3'UTR und bei dem anderen Ansatz die Zugabe von 20pmol *in-vitro*-transkribiertem 4xMS2-*loops* (Kapitel 3.2.14) und jeweils für eine Stunde die Inkubation bei Raumtemperatur unter Rotation.

In der Zwischenzeit wurden konfluent wachsende MKZ einer 15cm-Kulturschale mit PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber und 5ml PBS vorsichtig abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 2000xg) wurde das Pellet in 1,5ml LBP (+1:250 Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte erneut die Zentrifugation (10 Minuten, 4°C, 13.000xg).

Von dem entstandenen Überstand wurden 200µl mit 160µl RNase-freiem H₂O versetzt, dieser Ansatz dient als RNA-*input*.

Die nun fertig inkubierten Amylosekugelchen wurden einmal mit LBP (+11µg/ml Heparin) gewaschen und jeweils mit 500µl Zellysat und 500µl LBP mit 11µg/ml Heparin, 30U RNase OUT und 1mM DTT versetzt und für 30 Minuten unter Rotation bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte fünfmaliges Waschen der Amylosekugelchen mit 900µl LBP (+11µg/ml Heparin). Der LBP wurde im Anschluss komplett entfernt und der immobilisierte Komplex mithilfe von 150µl Maltose (zweimal für je 15 Minuten) von den Amylosekugelchen eluiert. Der RNA-*input* wurde mit 3µl Proteinase-K versehen und bei 55°C für 15 Minuten verdaut.

Um nun die präzipitierten miRNAs zu isolieren und die Bindung der Beute-RNA zu kontrollieren, wurden sowohl das Eluat als auch der *input* mit 80µl Ammoniumacetat, 80µl RNase-freiem H₂O und 400µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und für 15 Minuten bei 4°C mit 14.000xg zentrifugiert. Die nun entstandene obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA unter Zugabe von 1ml 99% Ethanol und 2µl Glykogen für eine Stunde bei -20°C gefällt und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 13.000xg zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen und nachfolgend getrocknet. Anschließend wurde der *input* in 30µl RNase- und DNase-freiem H₂O aufgenommen, das Eluat in 12µl.

Eine Hälfte des Eluats wurde mittels Polyacrylamid-Harnstoffgel analysiert (siehe Kapitel 3.2.15). Die andere Hälfte sowie der *input* wurden mittels TaqMan-q-PCR analysiert (siehe Kapitel 3.2.4).

Die miRNA-Anreicherungen in den miR-TRAP-Experimenten wurden mittels der ΔC_t -Methode bestimmt (Braun et al. 2014). Hierbei wurden die ΔC_t -Werte der miRNAs des miR-TRAP-Eluats und des *inputs* unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren miteinander verglichen. Die folgende Formel wurde für die ΔC_t -Berechnung verwendet:

$$R = 2^{-(ctA-ctB)}$$

R = miRNA-Anreicherung
ctA = ct-Wert miRNA im Eluat
ctB = ct-Wert miRNA im *input*

3.3.6 Luciferase-Reportergen-Assay

Das Luciferase-Reportergen-System wurde zur Bestimmung der Translationsaktivität genutzt. Dabei liegt der Analyse die simultane Expression und Messung von zwei individuellen Reporter-Enzymen zugrunde. Hierbei unterscheidet man einen „experimentellen Reporter“, der direkt mit dem Effekt der spezifischen experimentellen

Bedingungen korreliert und den co-transfizierten „Kontrollreporter“, dessen Aktivität als interne Kontrolle dient.

Für die vorliegende Arbeit wurden HEK293-Zellen in 6-well-Platten mit 0,2µg DNA (PKP1-3'UTR-pMirGlo (pMir-Glo = Luciferase-Reporter-Plasmid)) gemäß Kapitel 3.1.2 transfiziert, nachdem 48 Stunden vorher miRNA-*Mimics*, miRNA-*Inhibitors* und die entsprechenden Kontrollen transfiziert wurden.

Anschließend wurden nach 16 Stunden die Luciferase-Aktivitäten über das ‚Dual Glo Luciferase Assay System‘ (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) bestimmt. Dabei wurden die *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten auf die *Renilla reniformis*-Luciferase-Aktivitäten abgeglichen.

3.4 Statistische Auswertungen

In dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders vermerkt, Quantifizierungen anhand von mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Standardabweichungen wurden als Fehlerbalken in den Diagrammen dargestellt.

Der zweiseitige heteroskedastische Student's t-Test wurde zur Bestimmung der Signifikanz zwischen zwei Populationen genutzt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$; *** $p \leq 0,005$).

4. Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass miRNAs als Feinregulatoren der Proteinexpression angesehen werden. Da die miRNA-Bindungsstellen häufig im Bereich der 3'UTR einer mRNA liegen, weist PKP1 mit seiner langen 3'UTR (ca. 2300 Basenpaaren in Mauszellen und ca. 3000 Basenpaaren in humanen Zellen) eine große Wahrscheinlichkeit auf, durch miRNAs reguliert zu werden. Ziel dieser Arbeit war es, miRNAs zu identifizieren, welche an die 3'UTR von PKP1 binden und ihre potentiellen Auswirkungen auf die Proteinexpression zu analysieren.

4.1 Modellsystem „Mauskeratinozyten“ - human versus murin

Die Experimente dieser Arbeit wurden in spontan immortalisierten nicht-transformierten Mauskeratinozyten (MKZ) als Zelllinie durchgeführt. Die jeweiligen 3'UTR (human versus murin) von PKP1 sind weniger stark konserviert als die kodierenden Regionen. Die Bindungsstellen bzw. die *Seed*-Sequenzen für einige miRNAs sind jedoch zwischen den verschiedenen Spezies der Säugetiere konserviert (Ha and Kim 2014), sodass potentiell detektierte Bindungsstellen eine hohe Wahrscheinlichkeit aufweisen, sich vom murinen ins humane System übertragen zu lassen.

Die MKZ bilden im *low-calcium*-Medium keine Desmosomen aus und können sich aufgrund der fehlenden Kontaktinhibition uneingeschränkt teilen. Durch die Zugabe von CaCl₂ differenzieren die MKZ und bilden Desmosomen aus, verlieren aber auch ihre Teilungsfähigkeit. In undifferenzierten MKZ wird PKP1 synthetisiert und liegt zytoplasmatisch vor. Durch Initiation der Differenzierung resultiert eine Zunahme von PKP1, sodass der Verlauf von eventuell regulatorischen miRNAs analysiert werden kann. Da die MKZ in einem undifferenzierten Zustand kultiviert werden, lassen sie sich mit sehr hoher Effizienz transfizieren.

Dazu kommt, dass für die murine Spezies bisher nur eine Länge der 3'UTR von PKP1 beschrieben ist, wohingegen beim Menschen durch alternative Poly-A-Signale eine kurze und eine lange Form der 3'UTR detektiert werden konnten. Liegt nur eine Länge vor, kann man den Proteinpool von PKP1 und die potentiell hervorgerufenen Effekte zunächst für die gesamte Zelle betrachten.

Außerdem bezog sich die Literatur, in der eine hohe Expression von miRNAs in der Epidermis nachgewiesen wurde und anhand der für diese Arbeit potentiell zu untersuchende miRNAs herausgesucht wurden, ebenfalls auf die murine Spezies.

4.2 Identifizierung und Charakterisierung potentieller miRNAs

4.2.1 *In-silico*-Analyse potentieller miRNA-Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1

Das Programm von <http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/> dient dazu, potentielle miRNA-mRNA-Interaktionen an einer 3'UTR verschiedener Zielgene und verschiedener Spezies tabellarisch und zusammenfassend darzustellen. Dabei werden mehrere Datenbanken genutzt, die prognostizierten miRNA-Bindesequenzen addiert und in ihrer Summe dargestellt. Dieses Programm wurde als präexperimentelle Analyse für die 3'UTR von PKP1 in den Spezies Maus und Mensch angewendet, um einen ersten Eindruck von potentiell bindenden miRNAs zu bekommen.

Hierbei zeigte sich eine Vielzahl von möglichen miRNAs, sodass nach weiteren Kriterien selektiert werden musste. Dabei lag besonderes Augenmerk auf miRNAs, bei denen eine hohe Expression in der Epidermis von Mäusen beschrieben wurde (siehe Abb. 5, Kapitel 1.2.2). Weitere Kriterien zur Selektion waren eine Konservierung zwischen Maus und Mensch, wie es unter anderem für die let-7-Familie (siehe Kapitel 1.2.4) beschrieben ist und wo in der Literatur bereits mögliche Targets einer miRNA und entsprechend ein möglicher Zusammenhang zwischen Über- oder Unterexpression und dem Auftreten von Dysfunktionen im Organismus beschrieben wurden (siehe Kapitel 1.2.4 bis 1.2.6).

Nachfolgend sieht man, die eben genannten Kriterien bereits berücksichtigt, die selektierte tabellarische Übersicht dieser *in-silico*-Analyse. Die letzte Spalte gibt in Summe die positiven Berechnungen für die jeweilige miRNA an.

miRNA	miRanda	miRWalk	RNA22	Targetscan	gesamt
mmu-let-7b	1	1	1	1	4
mmu-let-7c-1	1	1	0	1	3
mmu-let-7c-2	1	1	0	1	3
mmu-mir-34a	1	0	1	1	3
mmu-mir-34b	1	0	0	1	2
mmu-mir-200b	1	0	0	0	1

Tbl. 1: *in-silico*-Analyse vom 05.12.2011 potentieller miRNA-Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1 für Mauseellen

Kopfzeile: Name der Datenbank; erste Spalte: jeweilige miRNA; grüne Zellen: prognostizierte potentielle Bindungsstelle, rote Zellen: keine vorhergesagte Bindungsstelle, letzte Spalte: positive Bindungsstellen in Summe;

(Tabelle modifiziert dargestellt; Quelle: <http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>)

miRNA	miRanda	miRWalk	RNA22	Targetscan	gesamt
hsa-let-7b	1	0	0	1	2
hsa-let-7c	0	1	0	1	2
hsa-mir-34a	1	0	0	1	2
mmu-mir-200b	1	0	0	1	2

Tbl. 2: *in-silico*-Analyse vom 05.12.2011 potentieller miRNA-Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1 für humane Zellen;

Kopfzeile: Name der Datenbank; erste Spalte: jeweilige miRNA; grüne Zellen: prognostizierte potentielle Bindungsstelle, rote Zellen: keine vorhergesagte Bindungsstelle, letzte Spalte: positive Bindungsstellen in Summe;

Für die Analyse in Mauseellen zeigten sich in drei bzw. allen der insgesamt vier verschiedenen Datenbanken prognostizierte Bindungsstellen bei den Vertretern der let-7-Familie an der 3'UTR von PKP1. Für die mir-34a bzw. mir-34b wurden ebenfalls putative Bindungssequenzen gefunden. Für die humanen Zellen fielen die in Summe dargestellten prognostizierten potentiellen Bindungsstellen generell niedriger aus, was sich auch bei den miRNAs aus der let-7-Familie und für die miRNAs mir-34a zeigte.

Die anhand der Literaturrecherche präferierten miRNAs zeigten in der *in-silico*-Analyse positive Ergebnisse, sodass die in Tabelle 1 und 2 gezeigten miRNAs für weitere Experimente genutzt wurden.

Die mir-200b, welche gemäß der Literatur in der Epidermis von Mäusen eine hohe Expression aufweist, zeigte im humanen System eine höhere Bindungswahrscheinlichkeit

(*in-silico*) an der 3'UTR von PKP1 als in der Maus. In vorangegangenen *in-silico*-Analysen (nicht abgebildet) wurde für die murine Spezies gar keine Bindungsstelle aufgeführt. Diese miRNA wurde aufgrund ihrer wichtigen tumorsuppressiven Funktion im Menschen bzw. zur Überprüfung der Vorhersagen in der Maus weiterhin mitgeführt.

Um eine weitere präexperimentelle Bestätigung zu erhalten, wurde die Datenbank von *microRNA.org* genutzt bei der mRNA-Sequenzen diverser Proteine sowie die Sequenzen vielzähliger miRNAs hinterlegt sind. In dieser Datenbank hat man die Möglichkeit, sich die potentiellen miRNA-Bindungsstellen am entsprechenden Zielprotein für verschiedene Spezies anzeigen zu lassen. In diesem Fall wurde die Analyse für die 3'UTR von PKP1 in der Spezies Maus durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Sequenz der miRNA inklusive *Seed*-Sequenz der zuvor ausgewählten miRNAs (let-7-Familie, mir-34a, mir-200b) mit der entsprechenden potentiellen Bindungsstelle an der 3'UTR von PKP1.

mmu-let-7b

```

      3' uuggUGUGUUGGAUGAUGGAGu 5' mmu-let-7b
           | : | : ||| |||||
1359:5' ugggAUUCUGCCUCCUACCUCa 3' Pkp1

```

mmu-let-7c

```

      3' uuggUAUGUUGGAUGAUGGAGu 5' mmu-let-7c
           || | : ||| |||||
1359:5' ugggAUUCUGCCUCCUACCUCa 3' Pkp1

```

mmu-miR-34a

```

      3' uguuggucgauucugUGACGGu 5' mmu-miR-34a
           |||||
884:5' ucucugugaaacaaaACUGCCu 3' Pkp1

```

mmu-miR-34b-5p

```

      3' uguuagucgauuaaugUGACGGa 5' mmu-miR-34b-5p
           |||||
883:5' gucucugugaaacaaaACUGCCu 3' Pkp1

```

mmu-miR-200b

```

      3' agUAGUAA--UGGUCCGUCAUAAu 5' mmu-miR-200b
           |||| | ||:| :|||
2254:5' aaAUCAAUAAACUA-CUAGUAUUu 3' Pkp1

```

Abb. 6 Vorhergesagte miRNA-Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1 in Mauszellen, Darstellung der jeweiligen miRNA-Sequenz inklusive *Seed*-Sequenz (obere Zeile) und Position an der 3'UTR von PKP1 (untere Zeile), hier: Sequenz ausschnittsweise dargestellt, *Seed*-Sequenz jeweils eingerahmt; *Quelle: Datenbank auf microRNA.org*

Trotz der niedrigen rechnerischen Wahrscheinlichkeit der mir-200b eine Bindungsstelle an der 3'UTR von murinem PKP1 aufzuweisen, wurde diese miRNA in der Datenbank von *microRNA.org* gesucht. Es konnte eine zur *Seed*-Sequenz passende Bindungsstelle an der 3'UTR von PKP1 gefunden werden, sodass es im Verlauf zu klären galt, ob diese Bindungsstelle validiert werden kann.

Zusammenfassend führten diese Analysen dazu, dass sich die let-7b, die let-7c, die mir-34a und die mir-200b als potentielle miRNAs für weiterführende Untersuchungen etablierten. Die mir-34b wurde aufgrund der gleichen *Seed*-Sequenz wie die der mir-34a und dementsprechend ähnlicher Bindungswahrscheinlichkeit an der 3'UTR von PKP1 in Mauszellen zunächst ebenfalls in die Gruppe der selektierten miRNAs eingeschlossen.

4.2.2 Endogene Expression der miRNAs in MKZ

Bevor eine potentielle Bindung der selektierten miRNAs an der 3'UTR von PKP1 untersucht wurde, sollte deren endogene Expression in dem verwendeten Modellsystem der MKZ analysiert werden. Um einen Eindruck über das entsprechende miRNA-Level im unbeeinflussten Zustand zu erhalten, wurde das Experiment in undifferenzierten MKZ unter Verwendung von TaqMan-Sonden® für die jeweiligen miRNAs und qPCR-Analysen durchgeführt. Als Ergebnisse dienten die absoluten CT-Werte in Referenz zu der TaqMan-Sonde® U6 (=smallRNA; ca. 100 Nukleotide, keine *Seed*-Sequenz). Dabei gilt, dass die endogene Expression umso höher ist, je niedriger der absolute CT-Wert ausfällt. Das folgende Diagramm zeigt auf der Y-Achse die absoluten CT-Werte mit Standardabweichung aus drei Experimenten für die miRNAs let-7b, let-7c, mir-34a, mir-34b und mir-200b sowie für die Kontroll-Sonde U6, welche sich auf der X-Achse darstellen.

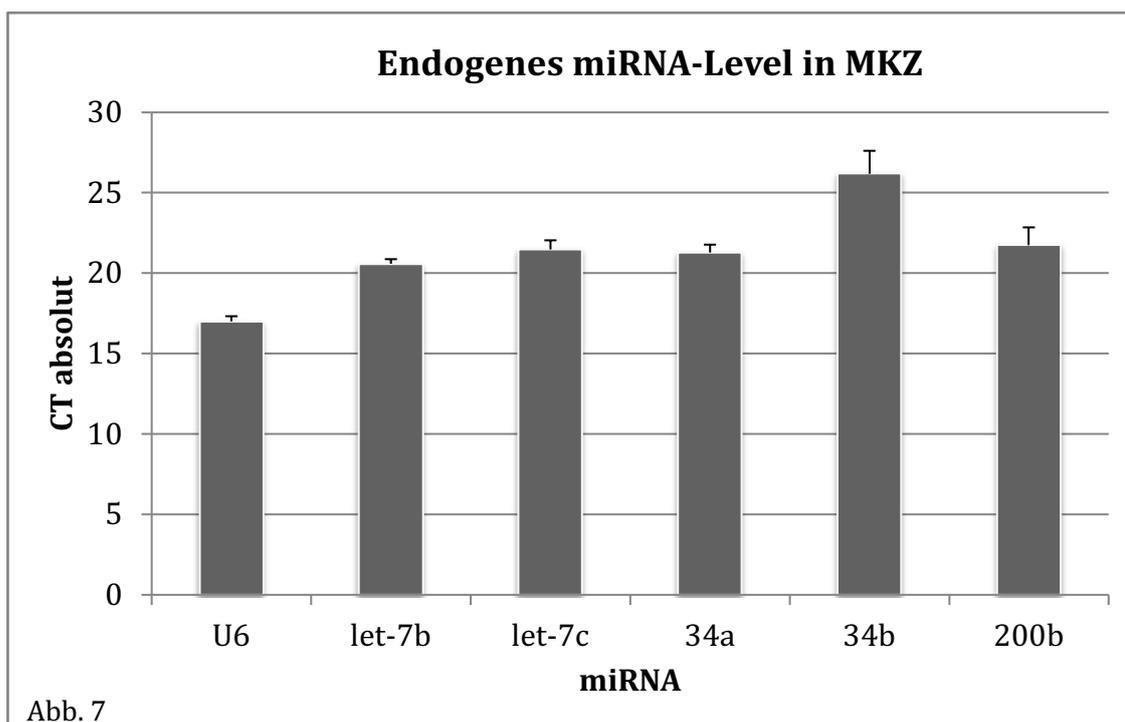


Abb. 7 qPCR, endogenes Expressionslevel von miRNAs in undifferenzierten MKZ, TaqMan-Sonde U6® als Referenz, Darstellung der absoluten CT-Werte mit Standardabweichung, n=3

Absoluter CT-Wert	miRNA-Expression
↑	↓
↓	↑

Tbl. 3

Tbl. 3 Schematische Darstellung: Zusammenhang zwischen CT-Wert und miRNA-Expression

Die Abbildung 7 zeigt wie erwartet eine hohe Vervielfältigung der Kontroll-TaqMan-Sonde® U6 mit einem absoluten CT-Wert von 17. Im Vergleich dazu weisen die miRNAs let-7b mit einem CT-Wert von 20,6, die let-7c mit einem Wert von 21,5, die mir-34a mit 21,3 und die mir-200b mit einem absoluten CT-Wert von 21,7 eine hohe endogene Expression in undifferenzierten MKZ auf. Die Werte korrelieren dabei mit den Ergebnissen der Expressionsanalysen in der murinen Epidermis von Yi et al. 2006 (siehe Abb. 5). Die endogene Expression der mir-34b fällt bei einem absoluten CT-Wert von 26,1 deutlich niedriger aus, sodass diese miRNA auch aufgrund der vorangegangenen *in-silico*-Analysen für weitere Experimente nicht berücksichtigt wurde. Außerdem fiel die Entscheidung, zunächst nur mit einem Vertreter der let-7-Familie zu arbeiten, sodass letztendlich die miRNAs let-7b, mir-34a und mir-200b für weitere Analysen ausgewählt wurden.

4.3 Evaluation der Expression des Ziel-Proteins PKP1 und der Ziel-miRNAs in MKZ in Abhängigkeit von der Differenzierung

PKP1 ist ein wichtiger Bestandteil der Desmosomen. Im Rahmen der Differenzierung der Epidermis kommt es zu einer Steigerung der Desmosomenanzahl sowie zu einer erhöhten mechanischen Widerstandsfähigkeit durch stabileren Zusammenhalt benachbarter Zellen im Gewebe.

Um einen Eindruck über die Menge und Stabilität von PKP1 in MKZ zu erhalten, ergaben sich die folgenden Grundlagenexperimente.

4.3.1 Endogenes Level von PKP1 in MKZ

Die Zelllinie der MKZ kann im undifferenzierten Zustand kultiviert werden. Durch die Zugabe von 1.2 mmol CaCl₂ kommt es im Rahmen der Differenzierung zur Ausbildung von Adherens Junctions und Desmosomen und zum Verlust der Teilungsfähigkeit.

Für die Darstellung der Korrelation zwischen Differenzierungsgrad bzw. Zunahme der Desmosomen und der Proteinmenge an PKP1 wurde eine Zeitreihe durchgeführt, bei der aus ein und derselben Kulturschale zunächst zum Zeitpunkt Null die Menge an PKP1 in undifferenzierten MKZ mittels Western Blot bestimmt wurde und der restliche Bestand der Zellen anschließend mit 1.2 mmol CaCl₂ versetzt und in verschiedene Kulturschalen aufgeteilt wurde, um zu verschiedenen Zeitpunkten erneut die Menge an PKP1 messen zu können. Dabei wurden die Zeitpunkte zwei, fünf und zwölf Stunden sowie 24, 48, und 72 Stunden gewählt. Nachfolgend werden die Quantifizierung im Diagramm (Abb. 8) sowie ein repräsentativer Western Blot (Abb. 9) dargestellt. In dem Diagramm (Abb. 8) sieht man auf der X-Achse die Zeiteinheiten in Stunden und auf der Y-Achse das relative Proteinlevel von PKP1 in Referenz zu beta-Aktin. Dabei gilt der Zeitpunkt Null als 100% Proteinmenge von PKP1 (100%=1,0). Beta-Aktin als Protein des Zellgerüsts ist in den MKZ ebenfalls in gut nachweisbarer Menge vorhanden und gemäß des Western Blots (Abb. 9) fand keine Veränderung der Proteinmenge durch die Initiation der Differenzierung statt. Demnach wurde beta-Aktin als Referenzprotein genutzt.

Abb. 8

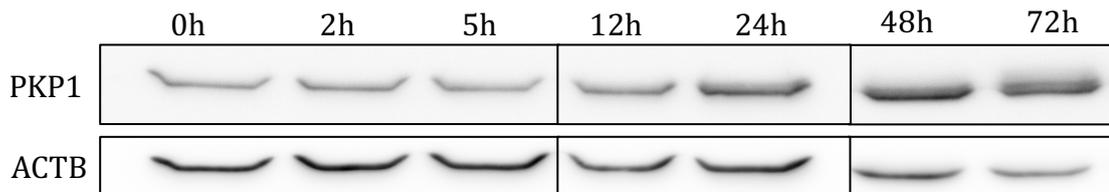
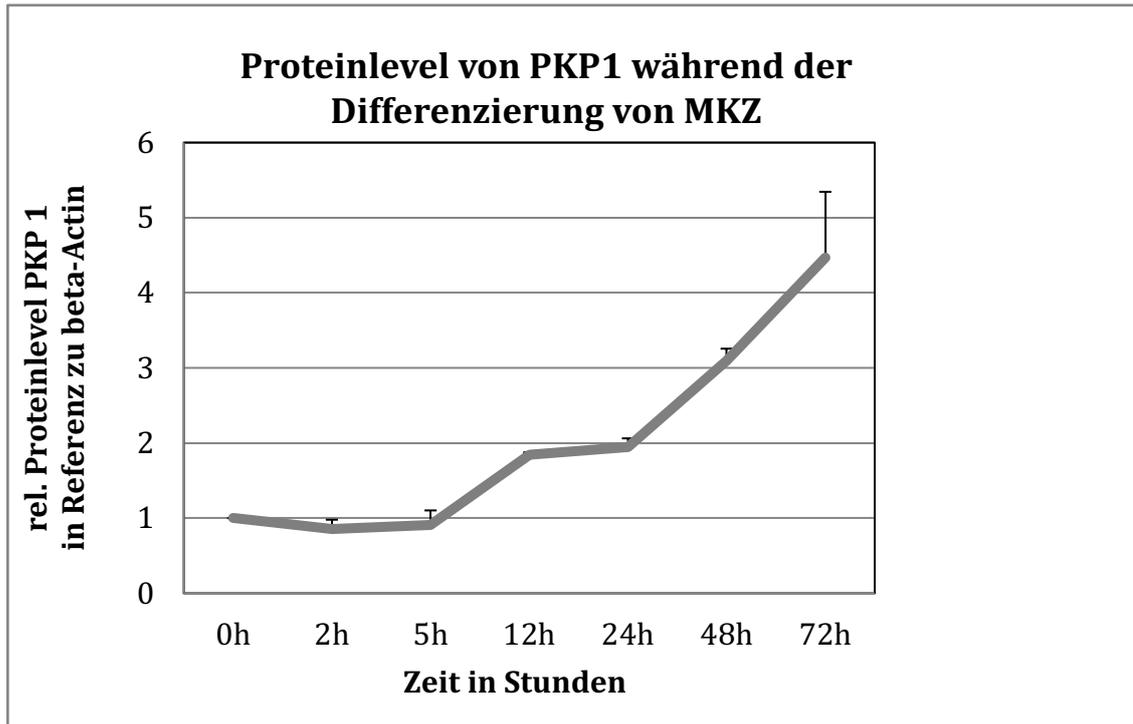


Abb. 9

Abb. 8 Endogenes Proteinlevel von PKP1 (Referenzprotein beta-Aktin) in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der MKZ zu verschiedenen Zeitpunkten über 72 Stunden (X-Achse), Differenzierung durch die Zugabe von 1.2 mmol CaCl_2 ;

Y-Achse: Relatives Proteinlevel von PKP1 bezogen auf den Null-Stundenwert (0h=100%=1,0) mit Standardabweichung, bei n=3, X-Achse Zeiteinheiten in Stunden;

Abb. 9 Endogenes Proteinlevel von PKP1 (Referenzprotein beta-Aktin) in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der MKZ zu verschiedenen Zeitpunkten über 72 Stunden, Differenzierung durch die Zugabe von 1.2 mmol CaCl_2 ;

Western Blot mit denselben Zeitpunkten wie in Abb. 8 sichtbar, obere Reihe zeigt PKP1, die unteren Reihe das Referenzprotein beta-Aktin (ACTB)

Sowohl im Western Blot als auch in der Quantifizierung lässt sich eine deutliche Zunahme der PKP1-Proteinmenge während der Differenzierung von MKZ erkennen. Im Diagramm sieht man nach zwölf Stunden bereits eine Verdopplung der relativen Proteinmenge und nach 72 Stunden ist sie auf das Vierfache angestiegen. Somit wird ein Zusammenhang zwischen der Zunahme der Zell-Zell-Kontakte bei Differenzierung und dem Anstieg der Menge an PKP1 gezeigt.

4.3.2 Stabilität von PKP1 in MKZ in Abhängigkeit von der Differenzierung

Zur Zunahme von PKP1 auf Proteinebene können eine Steigerung der Transkription, der RNA-Stabilität, der Translation sowie posttranslationelle Mechanismen, die die Proteinstabilität erhöhen, beitragen.

Anhand der starken Zunahme des Proteinlevels von PKP1 im Rahmen der Differenzierung stellt sich die Frage, ob neben der Quantität von PKP1 auch die Qualität im Sinne der Proteinstabilität und verlängerter Halbwertszeit beeinflusst wird. Die Bestimmung der Stabilität wurde durchgeführt um zu sehen, nach welchem Zeitraum man mit einer veränderten Proteinmenge rechnen kann. Eine veränderte Proteinmenge könnte durch eine reduzierte Synthese durch Beeinflussung durch miRNAs entstehen, was es im weiteren Verlauf zu analysieren gilt. Hierfür würde gelten, dass man umso länger mit der Analyse warten muss, je höher die Proteinstabilität ist.

Um die Proteinstabilität direkt zu untersuchen, wurden sowohl undifferenzierte als auch differenzierte MKZ mit Cycloheximid versetzt und somit die Proteinsynthese auf Translationsebene gehemmt. Hierbei wurden die differenzierten MKZ zunächst für insgesamt fünf Tage mit 1,2mmol CaCl₂ und erst anschließend mit Cycloheximid versehen, um eine ausreichende Differenzierung mit Ausbildung stabiler Zell-Zell-Kontakte zu initiieren. Die undifferenzierten MKZ wurden direkt mit Cycloheximid versetzt. Es wurde jeweils zu den Zeitpunkten null, zwei, fünf, acht, zwölf und 24 Stunden die Proteinmenge von PKP1 mittels Western Blot bestimmt. In der Abbildung 10 und 11 sieht man jeweils im oberen Bild die Darstellung des Gesamt-Proteins (Ponceau-Färbung) und im unteren Teil den Western Blot mit der Proteinmenge von PKP1 in differenzierten und undifferenzierten MKZ. Erneut diente beta-Aktin als Referenzprotein.

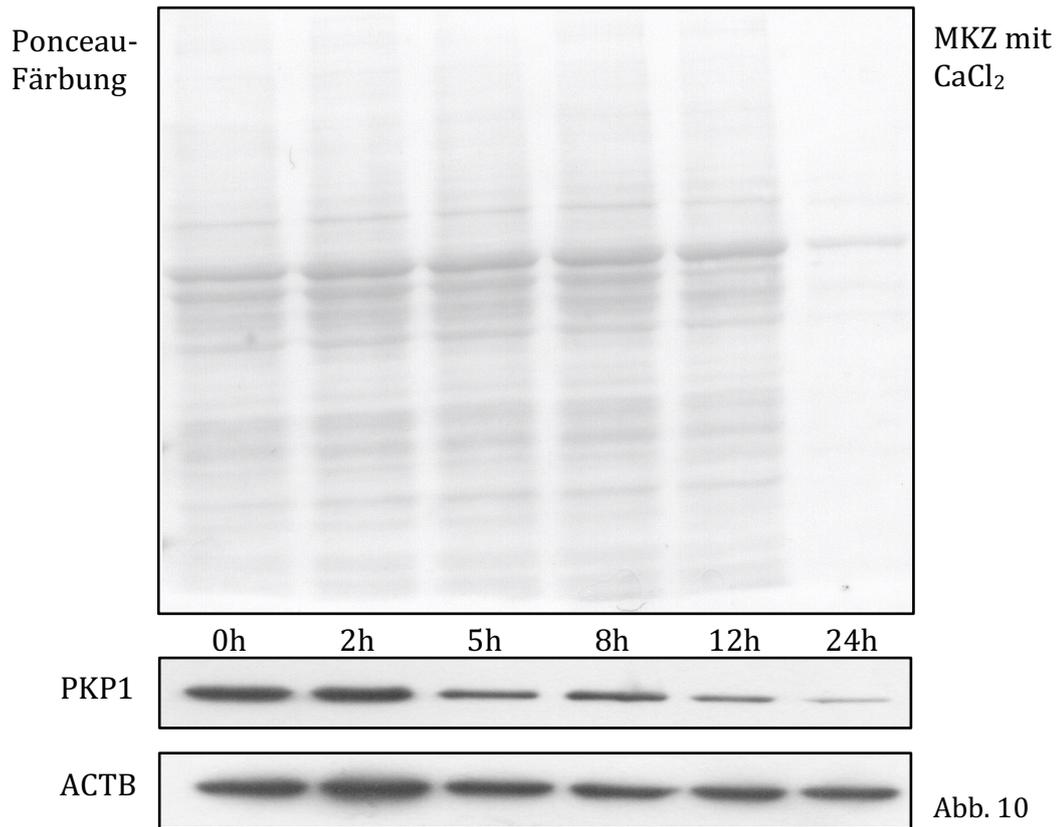


Abb. 10 Darstellung Gesamt-Protein (Ponceau-Färbung) und Western Blot: Proteinlevel von PKP1 über 24 Stunden in differenzierten MKZ nach Zugabe von Cycloheximid; beta-Aktin (ACTB) als Referenzprotein

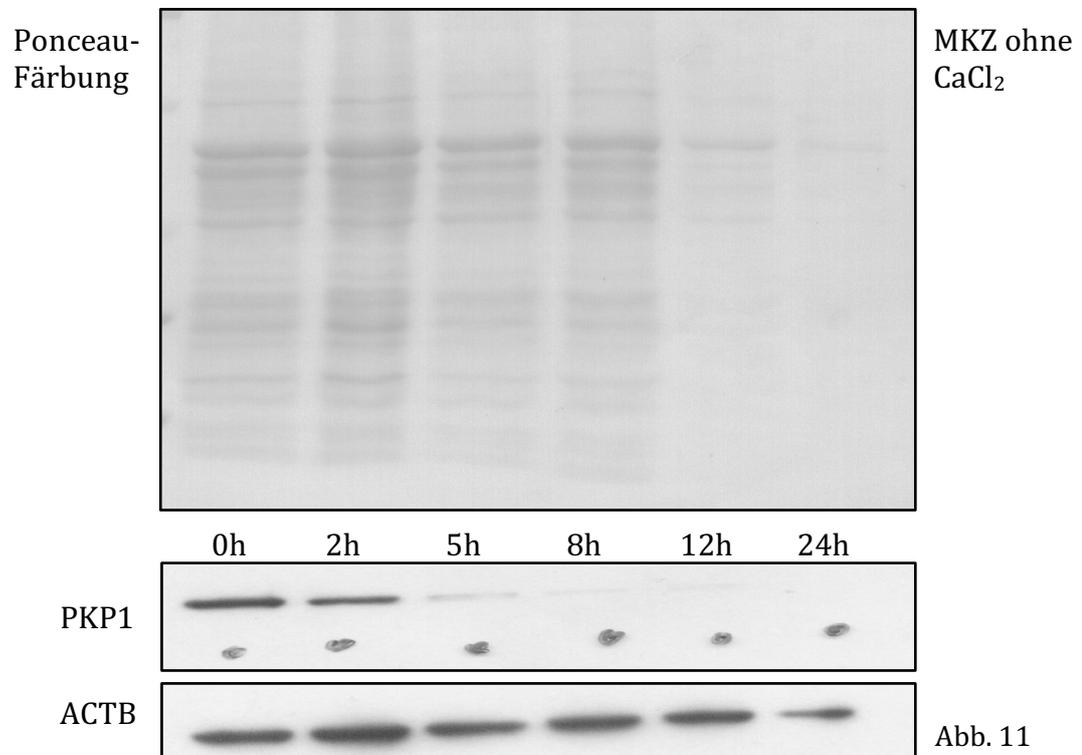


Abb. 11 Gesamt-Protein (Ponceau-Färbung) und Western Blot: Proteinlevel von PKP1 über 24 Stunden in undifferenzierten MKZ nach Zugabe von Cycloheximid; beta-Aktin (ACTB) als Referenzprotein; für PKP1 Punkte manuell gesetzt zur Markierung der Banden

Man erkennt, dass in undifferenzierten MKZ die Menge von PKP1 bereits nach fünf Stunden stark abgesunken und nach acht Stunden fast unter die Nachweisgrenze gefallen ist, während in den differenzierten MKZ auch noch nach 24 Stunden eine Restmenge von PKP1 im Western Blot gesehen werden konnte.

Anhand der Quantifizierung (Ergebnisse nicht dargestellt) zeigt sich ausgehend von der jeweiligen Ausgangsmenge an PKP1 für die undifferenzierten MKZ ein Abfall auf 50% der ursprünglichen Proteinmenge nach knapp zwei Stunden und für die differenzierten MKZ nach knapp fünf Stunden.

4.3.3 Expressionslevel der Ziel-miRNAs in MKZ in Abhängigkeit von der Differenzierung

In Anbetracht der bisher aufgezeigten Unterschiede zwischen undifferenzierten und differenzierten MKZ stand die Überlegung im Raum, mit welchem Differenzierungsgrad der MKZ weitergearbeitet wird. Da das Augenmerk allerdings nicht allein auf PKP1 lag, sondern viel mehr auf dessen Regulierung, speziell auf mRNA-Ebene durch potentielle miRNAs, wurde überprüft, ob die Expression der im Vorfeld selektierten miRNAs differenzierungsabhängig ist.

Hierfür lagen differenzierte MKZ zugrunde, in denen die endogene Expression der miRNAs mittels TaqMan-qPCR bestimmt wurde. In der Abbildung 12 ist das relative Expressionslevel der miRNAs let-7b, mir-34a und mir-200b im Verhältnis zum endogenen miRNA-Level in undifferenzierten MKZ zu sehen. Die X-Achse zeigt die jeweilige miRNA, jeweils der linke Balken stellt das endogene Level in undifferenzierten MKZ dar und wurde mit 100% (=1,0) gleichgesetzt. Der rechte Balken zeigt entsprechend das ins Verhältnis gesetzte Expressionslevel in differenzierten MKZ. Die Y-Achse stellt das relative miRNA-Level und die entsprechenden Veränderungen dar.

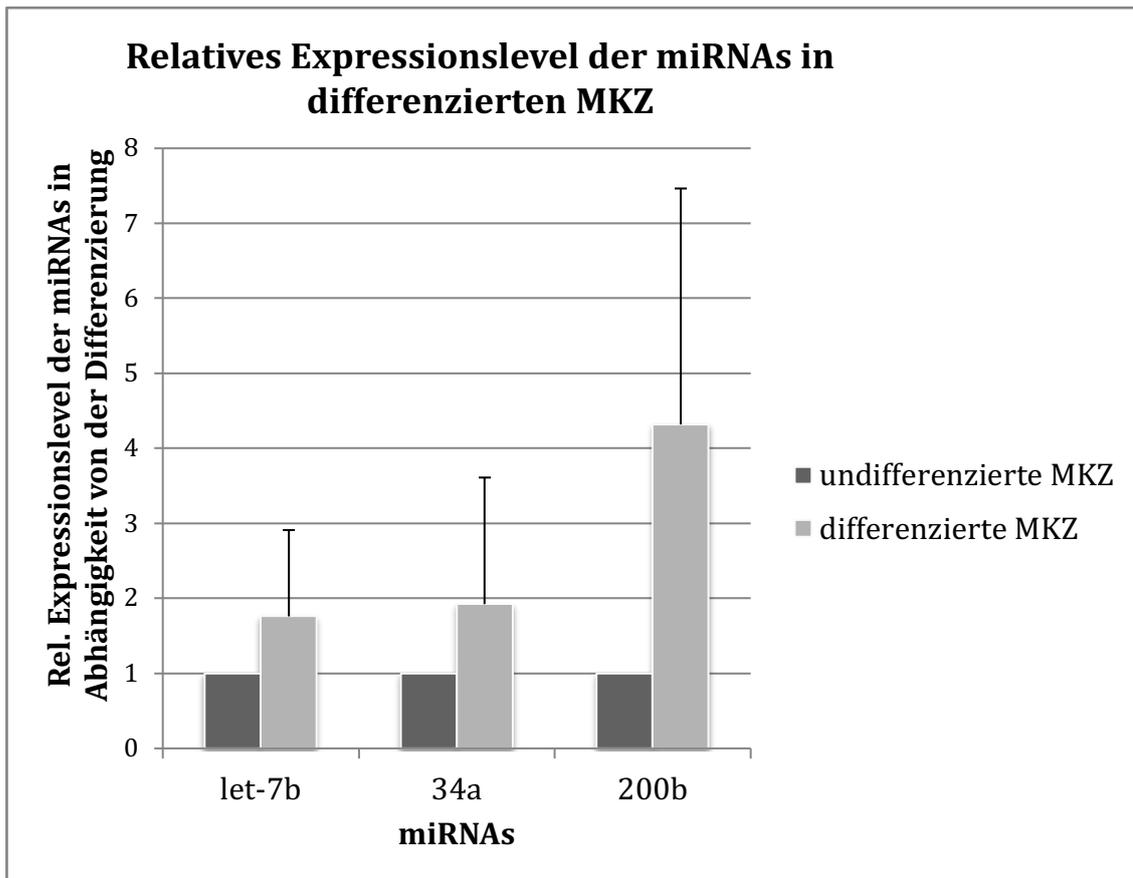


Abb. 12 qPCR zur Bestimmung des relativen miRNA-Niveaus in differenzierten MKZ in Referenz zum Expressionslevel in undifferenzierten MKZ mit Standardabweichung bei $n=3$, dabei ist das Expressionslevel in undifferenzierten Zellen (jeweils linker Balken) mit $100\%=1,0$ gleichgesetzt; keine relevante Signifikanz eruiert.

Das Diagramm (Abb. 12) zeigt unter Berücksichtigung der extrem hohen Standardabweichungen keinen relevanten Unterschied im Expressionslevel der ausgewählten miRNAs.

Zusammenfassend lässt sich aus den bisherigen Experimenten ableiten, dass die Differenzierung die Stabilität von PKP1 erhöht, sodass von einem längeren Zeitraum bis zur Beeinflussung des Proteinlevels durch miRNAs ausgegangen werden muss. Für die nachfolgenden Experimente wurden deshalb die MKZ, auch im Hinblick auf deren sehr gute Transfektionseffizienz, im undifferenzierten Zustand genutzt.

4.4 miR-TRAP zur Validierung der vorhergesagten miRNA-Bindungsstellen

Um die vorhergesagten miRNA-Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1 zu validieren, wurde das miR-TRAP-Verfahren genutzt (Kapitel 3.3.5) (Braun et al. 2014).

Die murine 3'UTR von PKP1 (*in vitro* transkribierte Ziel-RNA) wurde am 3'Ende mit zwei MS2-Aptameren (4MS2-loops) fusioniert. Über diese kann die Ziel-RNA mit dem rekombinant hergestellten Fusionsprotein MS2BP-MBP interagieren, welches aus einem MS2-Bindeprotein (MS2BP) und einem Maltose-Bindeprotein (MBP) besteht. Dieser Komplex wiederum kann an einer Amylosematrix immobilisiert werden.

Als Kontrolle dienten die 4MS2-loops ohne fusionierte RNA. Während der Inkubation mit dem Zelllysats, gewonnen aus undifferenzierten MKZ, konnten potentielle miRNAs an die 3'UTR von PKP1 binden und abschließend mit Maltose eluiert und durch TaqMan-qPCR analysiert werden (Abb. 13).

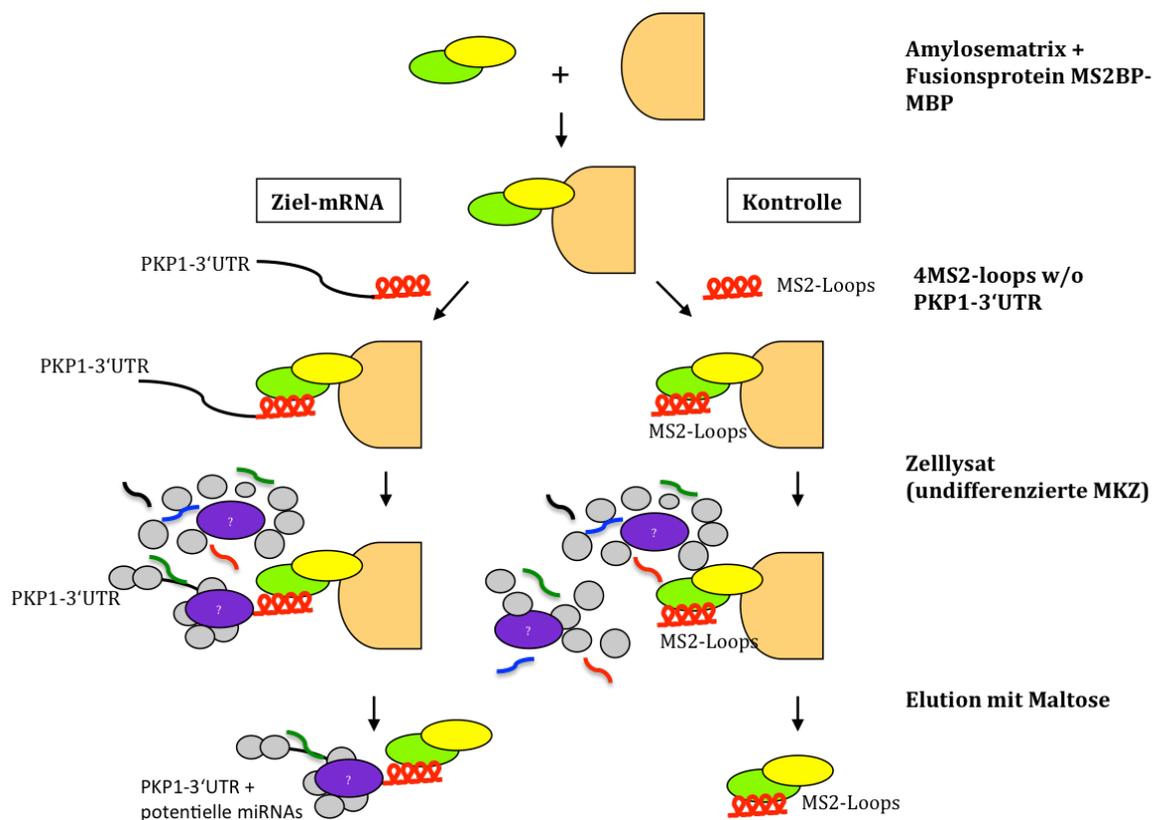
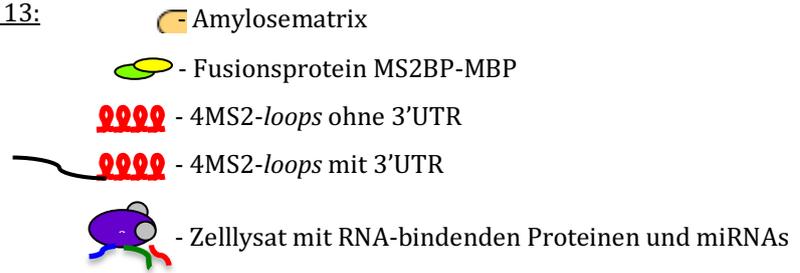


Abb. 13 Schematische Darstellung des Ablaufs des miR-TRAP. Nach der Elution mit Maltose: an die PKP1-3'UTR-4MS2-loops haben miRNAs gebunden, während bei den 4MS2-loops ohne Ziel-mRNA keine Bindung stattgefunden hat.

Zeichenerklärung zu Abb. 13:



Die Abbildung 14 zeigt, welche Menge an miRNAs durch die spezifische Bindung an die 3'UTR von PKP1 im Verhältnis zum RNA-input angereichert wurde (linker Balken). Der rechte Balken zeigt die Kontrolle (4MS2-loops ohne Ziel-mRNA), ebenfalls im Vergleich zum RNA-input. Auf der X-Achse sind die verschiedenen miRNAs dargestellt, auf der Y-Achse die Anreicherung in Prozent.

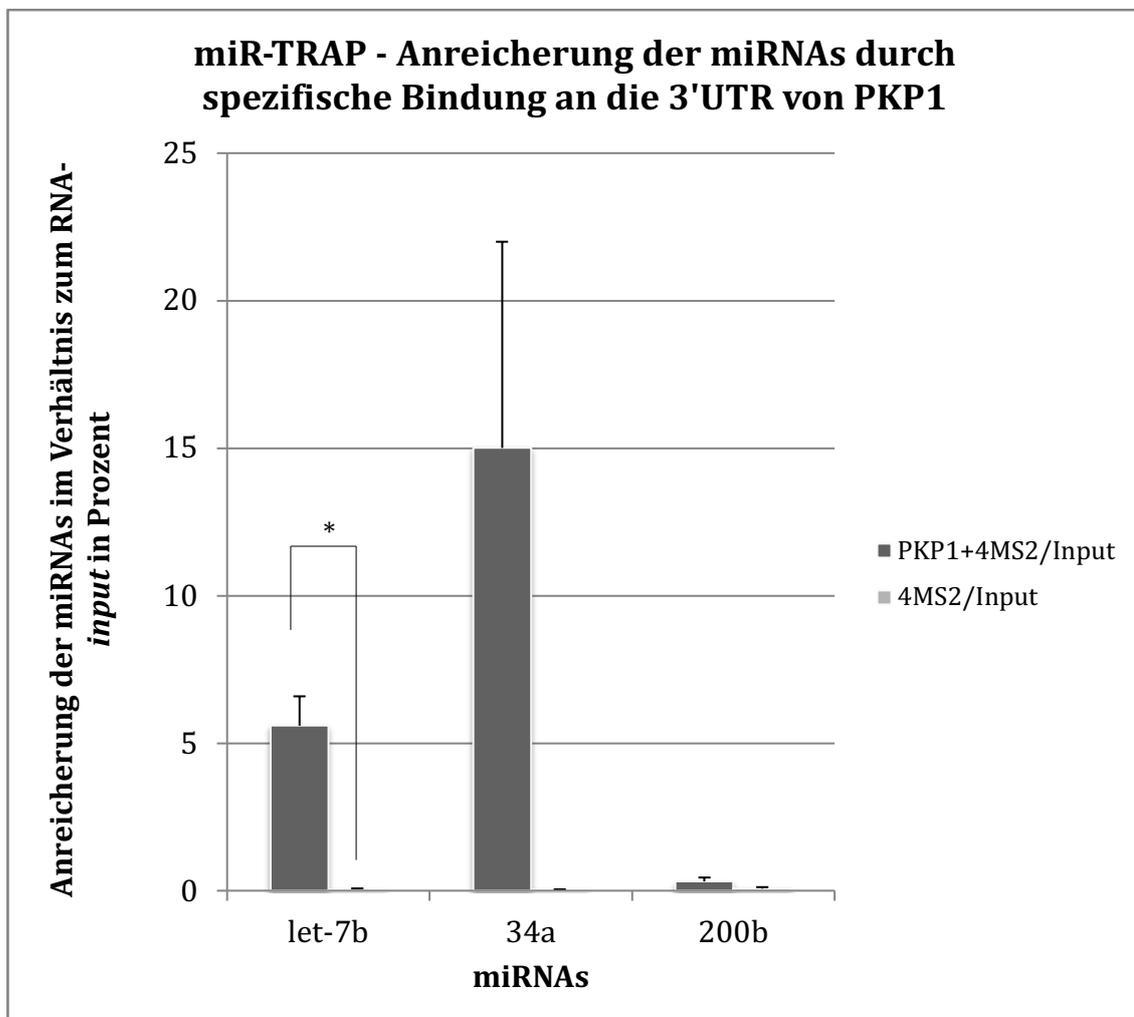


Abb. 14 TaqMan-qPCR nach miR-TRAP, Anreicherung der miRNAs let-7b, mir-34a und mir-200b im Verhältnis zum RNA-input verglichen mit den 4MS2-loops ohne Ziel-mRNA in Prozent, Standardabweichung bei n=4, Signifikanz mittels Student's T-Test: * p<0,05

Die Abbildung 14 zeigt, dass sowohl für die miRNA let-7b als auch für die miRNA mir-34a eine Anreicherung stattgefunden hat. Für die let-7b konnten im Mittel 5,6% der im *input* enthaltenen miRNA angereichert werden, für die mir-34a liegen die Werte im Mittel bei 15%. Für die miRNA mir-200b konnte dagegen keine Anreicherung detektiert werden. Für alle drei miRNAs gilt, dass bei der Kontrolle (4MS2-loops ohne zusätzliche 3'UTR) keine Anreicherung stattgefunden hat.

Für die mir-200b muss davon ausgegangen werden, dass keine spezifische Bindung an der 3'UTR von murinem PKP1 vorliegt und somit die experimentellen Daten mit den *in-silico*-Analysen korrelieren. Aufgrund dieser Tatsache erfolgten die weiteren Experimente, bei denen es sich um funktionelle Analysen handelt, nur noch für die let-7b und die mir-34a.

4.5 Funktionelle Analyse - Regulation der PKP1-3'UTR durch Überexpression und Repression spezifischer miRNAs

4.5.1 Luciferase-Reportergen-Assay nach Überexpression und Repression der miRNAs let-7b und mir-34a

Nachdem mithilfe des miR-TRAP eine spezifische Bindung an der 3'UTR von PKP1 für die miRNAs let-7b und mir-34a nachgewiesen werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob durch die Bindung der jeweiligen miRNAs die Expression von PKP1 auch tatsächlich beeinflusst wird. Für diese Fragestellung wurde zunächst ein Luciferase-Reportergen-Assay zur Bestimmung der Translationsaktivität genutzt (siehe Kapitel 3.3.6).

Dabei liegt der Analyse die simultane Expression und Messung von zwei individuellen Reporter-Enzymen zugrunde. Als primäres Reportergen diente die *Firefly*-Luciferase (FFL), an deren kodierende Sequenz die PKP1-3'UTR fusioniert ist. Durch Vergleich der FFL-Aktivität mit und ohne PKP1-3'UTR kann ein Einfluss der 3'UTR auf die Expression detektiert werden. Zusätzlich kodiert der Vektor die *Renilla*-Luciferase, welche unabhängig von der Ziel-RNA exprimiert wird und deren Aktivität somit zur internen Normalisierung auf Transfektionseffizienz eingesetzt werden kann.

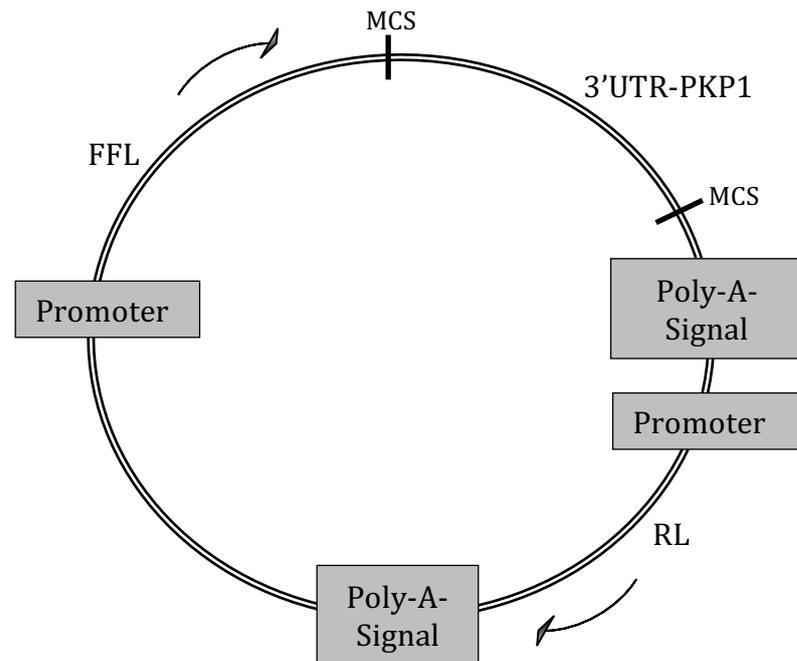


Abb. 15 Stark vereinfachte schematische Darstellung des pmir-Glo-Vektors (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA); Abbildung modifiziert übernommen (www.promega.de; Protokoll für: pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector)
 FFL = *Firefly*-Luciferase; MCS = *multi cloning site*; RL=Renilla-Luciferase

Die Überexpression und Repression der miRNAs let-7b und mir-34a erfolgte durch die Transfektion von *mirVana*TM miRNA-*Mimics* (*Mimics*) und miRNA-*Inhibitors* (*Inhibitors*) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Bei den *Mimics* handelt es sich um doppelsträngige, kleine RNA, welche die Funktion der endogenen miRNA imitieren und somit die miRNA-Aktivität erhöhen. Dahingegen sind die *Inhibitors* kleine einzelsträngige RNAs, welche an die endogenen miRNAs binden und diese dadurch funktionsunfähig machen. Die *Mimics* und *Inhibitors* waren spezifisch für die let-7b und die mir-34a. Als Kontrolle wurden die von ThermoFisher Scientific angebotenen Kontrollen genutzt, bei denen es sich um eine zufällige *smallRNA*-Sequenz handelt, welche im Vorfeld intensiv getestet wurde und keine identifizierbaren Effekte hervorgerufen hat.

Für dieses Experiment wurden HEK-293-Zellen genutzt. Diese Zellen besitzen sehr wenige Desmosomen, sodass endogene Faktoren zur Regulierung von PKP1 eine untergeordnete Rolle spielen und der erwartete Effekt ausgeprägter sein sollte.

Da die Bindung von miRNAs an die 3'UTR eines Proteins eine Degradierung der mRNA oder Inhibition der Translation und somit eine verminderte Proteinsynthese bewirkt, sollte die Repression der miRNAs einen Anstieg der Proteinmenge und in diesem Fall eine erhöhte Abgabe von Biolumineszenz durch die *Firefly*-Luciferase bedingen. Dagegen sollte eine erhöhte Expression der miRNAs entsprechend eine verminderte *Firefly*-Luciferase-Aktivität hervorrufen.

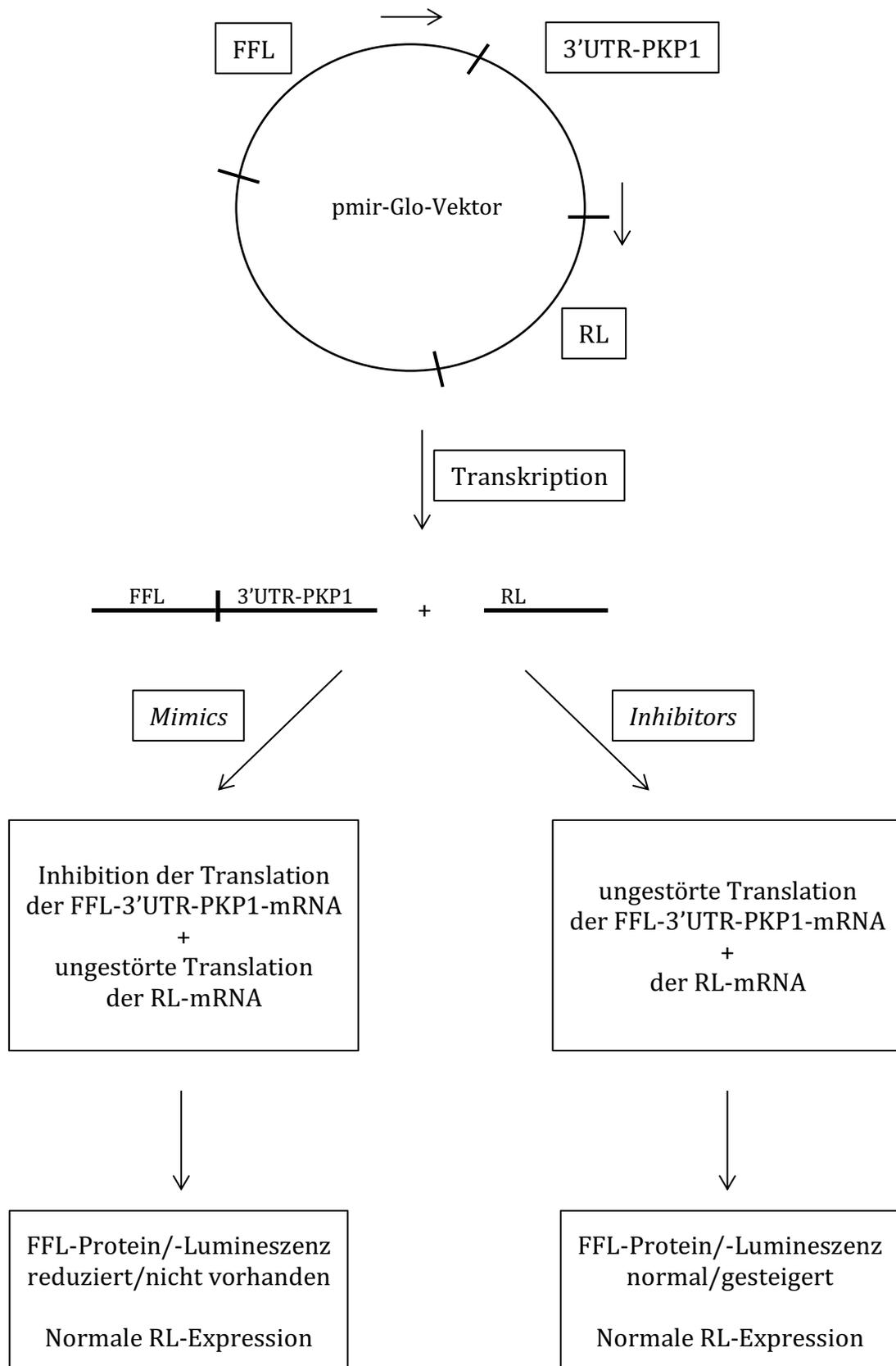


Abb. 16 Schematische Darstellung des Ablaufs eines Luciferase-Reportergen-Assays mit Beeinflussung durch Überexpression (*Mimics*) und Repression (*Inhibitors*) von miRNAs.

FFL = *Firefly*-Luciferase; RL = *Renilla*-Luciferase

In den folgenden Diagrammen sieht man die Aktivität der *Firefly*-Luciferase (FFL) im Verhältnis zur *Renilla*-Luciferase (RL) nach der Überexpression (Abb. 17) bzw. Repression (Abb. 18) der miRNAs let-7b und mir-34a. Die X-Achse zeigt die transfizierten *Mimics* bzw. *Inhibitors* sowie die Kontrolle und auf der Y-Achse ist die Aktivität der *Firefly*-Luciferase (FFL) im Verhältnis zur *Renilla*-Luciferase (RL) zu sehen. Die einzelnen miRNAs sind im Vergleich zur Kontrolle dargestellt.

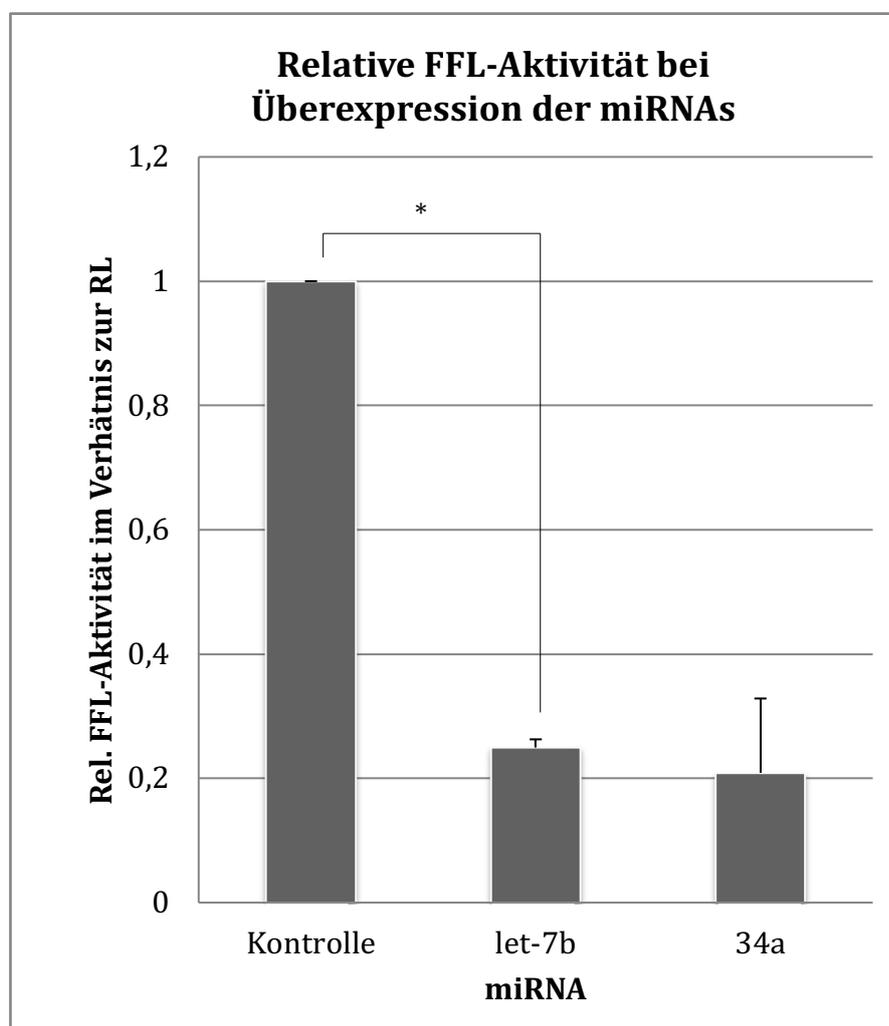


Abb. 17 Luciferase-Reportergen-Assay, relative Aktivität der *Firefly*-Luciferase (Referenz *Renilla*-Luciferase) nach Überexpression der miRNAs let-7b und mir-34a in HEK-293-Zellen mit Standardabweichung, Kontrolle entspricht 1=100%, überexprimierte miRNAs im Verhältnis zur Kontrolle dargestellt, n=3, Signifikanz mittels Student's T-Test: * P<0,05

Es ist zu erkennen, dass bei der Überexpression der miRNAs let-7b und mir-34a eine verringerte Aktivität der *Firefly*-Luciferase auftritt. Das bedeutet, dass eine Regulation an der 3'UTR von PKP1 stattgefunden haben muss, in diesem Fall eine Verminderung der Translation. Geht man in den Kontroll-Zellen von einer unbeeinflussten Expression der *Firefly*-Luciferase aus und setzt somit deren Aktivität auf 100% (=1), so tritt für die Interaktion der let-7b mit der 3'UTR von PKP1 eine Reduktion um 75% auf, bei der Interaktion mit der mir-34a eine Reduktion um bis zu 80%.

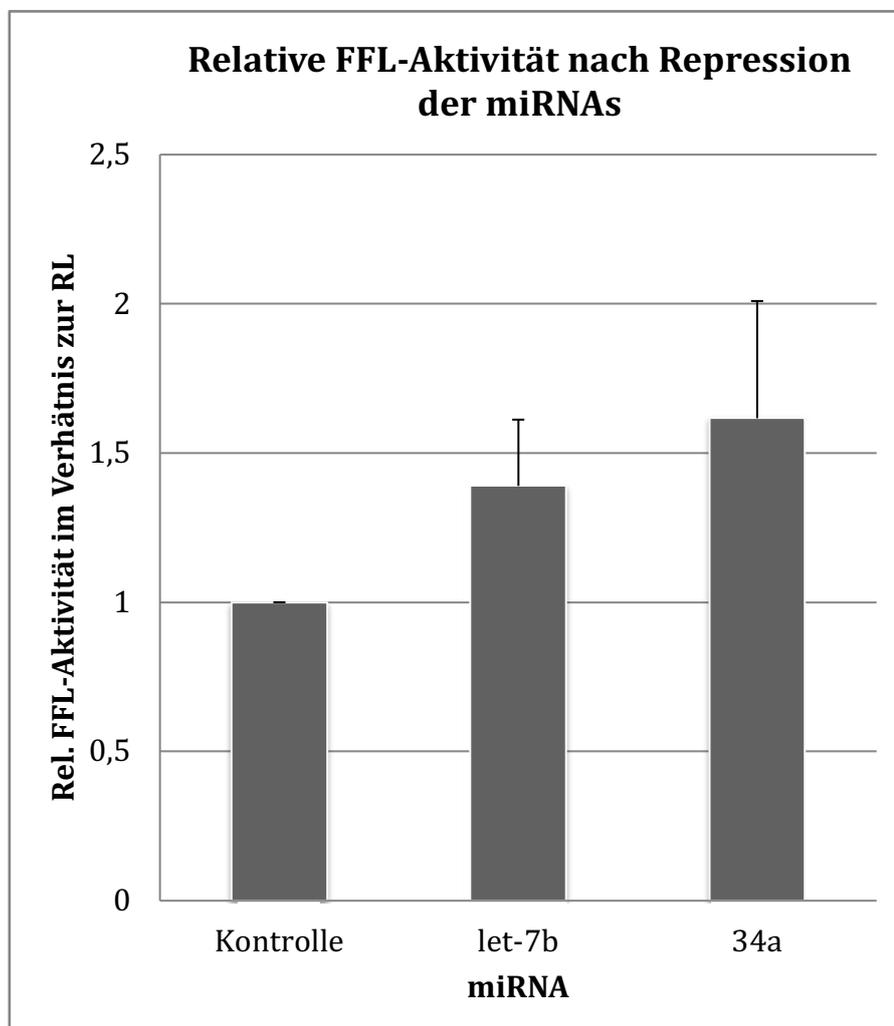


Abb. 18 Luciferase-Reportergen-Assay, relative Aktivität der Firefly-Luciferase (Referenz *Renilla*-Luciferase) nach Repression der miRNAs let-7b und mir-34a in HEK-293-Zellen mit Standardabweichung, Kontrolle entspricht 1=100%, inhibierte miRNAs im Verhältnis zur Kontrolle dargestellt, n=3

Nach der Repression der miRNAs let-7b und mir-34a kam es in beiden Fällen zum Anstieg der *Firefly*-Luciferase-Aktivität und dem zugrundeliegend zu einem Anstieg der Proteinsynthese der *Firefly*-Luciferase. Die Hemmung der mir-34a ruft einen stärkeren Effekt hervor, hierbei war ein Anstieg der *Firefly*-Luciferase-Aktivität um 60% zu verzeichnen, für die let-7b ist ein Anstieg von knapp 40% aufgetreten.

Anhand des Luciferase-Reportergen-Assays konnte somit gezeigt werden, dass die miRNAs let-7b und mir-34a die Translation der PKP1-3'UTR beeinflussen, was sich durch eine veränderte Proteinsynthese der *Firefly*-Luciferase äußerte.

4.5.2 Beeinflussung des Proteinlevels von PKP1 auf Zellebene durch Überexpression und Repression der miRNAs let-7b und mir-34a

Nachdem in den HEK-293-Zellen im Luciferase-Reportergen-Assay eine Beeinflussung der Translation der 3'UTR von PKP1 beobachtet wurde, war der nächste Schritt, herauszufinden, ob sich ein Effekt auf endogenes PKP1 in MKZ hervorrufen lässt.

Hierfür wurden die *Mimics* und *Inhibitors* in undifferenzierte MKZ transfiziert und nachfolgend das Proteinlevel von PKP1 mittels Western-Blot und Quantifizierung bestimmt.

Zunächst erfolgte eine Kontrolle der Transfektionseffizienz mithilfe einer TaqMan-qPCR-Analyse, wobei die TaqMan-Sonden® für die let-7b und mir-34a zum Einsatz kamen. Dabei sollte nach der Transfektion der *Mimics* ein, im Vergleich zum endogenen Level, deutlich höheres miRNA-Level vorliegen und entsprechend nach der Transfektion der *Inhibitors* ein geringeres miRNA-Level.

Nachfolgend sieht man zunächst die Kontrolle der Transfektionseffizienz, im linken Diagramm (Abb. 19) für die Transfektion der *Mimics* und im rechten Diagramm (Abb. 20) für die *Inhibitors*. Die X-Achse zeigt die verschiedenen miRNAs bzw. die Kontrolle, die Y-Achse zeigt das relative miRNA-Level im Verhältnis zum endogenen miRNA-Level, wobei die Kontrollzellen als Referenz gelten und mit 1 (=100%) gleichgesetzt wurden.

Bei der Kontrolle handelt es sich um eine Negativkontrolle (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bestehend aus doppelsträngigen Oligonukleotiden. Die Sequenz basiert auf einer miRNA, welche in *C. elegans* vorkommt und kaum Gemeinsamkeiten mit Sequenzen im humanen oder murinen System aufweist.

Abb. 19

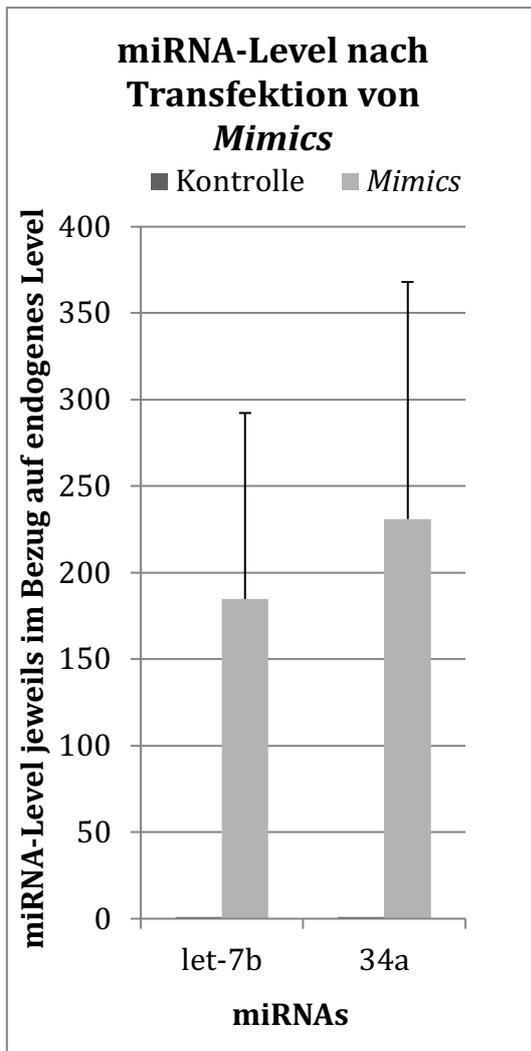


Abb. 20

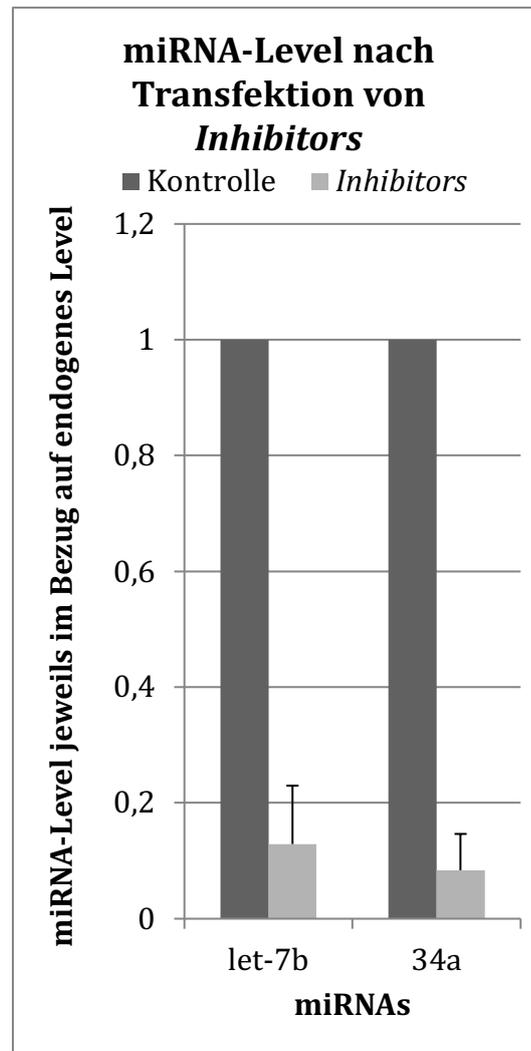


Abb. 19 Expressionskontrolle mittels TaqMan-qPCR nach Transfektion von *Mimics* zur Überexpression der miRNAs let-7b und mir-34a in undifferenzierten MKZ, relatives miRNA-Level im Bezug auf endogenes Level nach Transfektion der Negativkontrolle, n=3 mit Standardabweichung. Kontrolle für Patie

54

Abb. 20 Expressionskontrolle mittels TaqMan-qPCR nach Transfektion von *Inhibitors* zur Repression der miRNA-Expression der let-7b und mir-34a in undifferenzierten MKZ, relatives miRNA-Level im Bezug auf endogenes Level nach Transfektion der Negativkontrolle, n=3 mit

Sowohl für die *Mimics* als auch für die *Inhibitors* wurde eine gute Transfektionseffizienz erreicht. Bei der Transfektion der *Mimics* konnten die let-7b und die mir-34a in allen Experimenten > 100fach angereichert werden, wohingegen die Transfektion der *Inhibitors* eine Reduktion der beiden miRNAs auf ca. 10% des endogenen Levels hervorgerufen hat.

Die nachfolgenden Abbildungen 21 und 22 stellen das relative Proteinlevel von PKP1 nach der Transfektion von *Mimics* in undifferenzierten MKZ dar. Dabei wurde eine Abnahme des relativen Proteinlevels erwartet. Erneut wurden eine Kontrolle und die *Mimics* für die let-7b und mir-34a transfiziert und nach 48 Stunden für weitere Experimente geerntet. In der Abbildung 21 ist ein repräsentativer Western Blot zu sehen, wo zum einen die Ponceau-Färbung, d.h. das Gesamt-Protein und zum anderen die spezifischen Banden für PKP1 und beta-Aktin zur Darstellung kommen. In der Abbildung 22 ist die entsprechende Quantifizierung aufgezeigt, dabei sieht man auf der X-Achse die überexprimierten miRNAs bzw. die Kontrolle und auf der Y-Achse das relative Proteinlevel, wobei dies in Bezug auf das Gesamt-Protein (Ponceau-Färbung) dargestellt wurde. Dabei wird das Proteinlevel von PKP1 in der Kontrolle als unbeeinflusst und damit als 100% (=1) angesehen.

Abb. 21

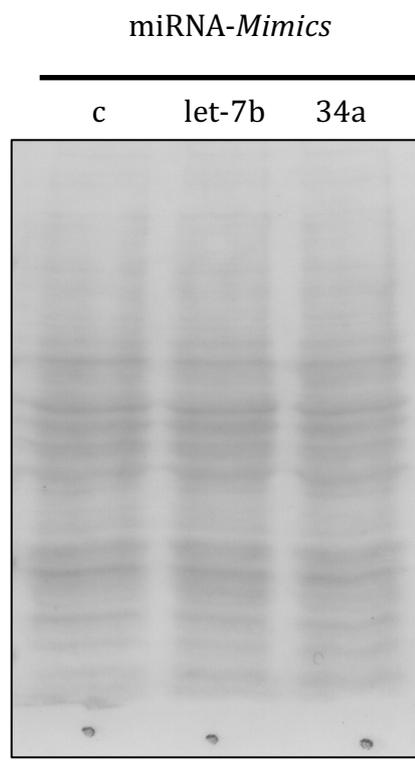


Abb. 22

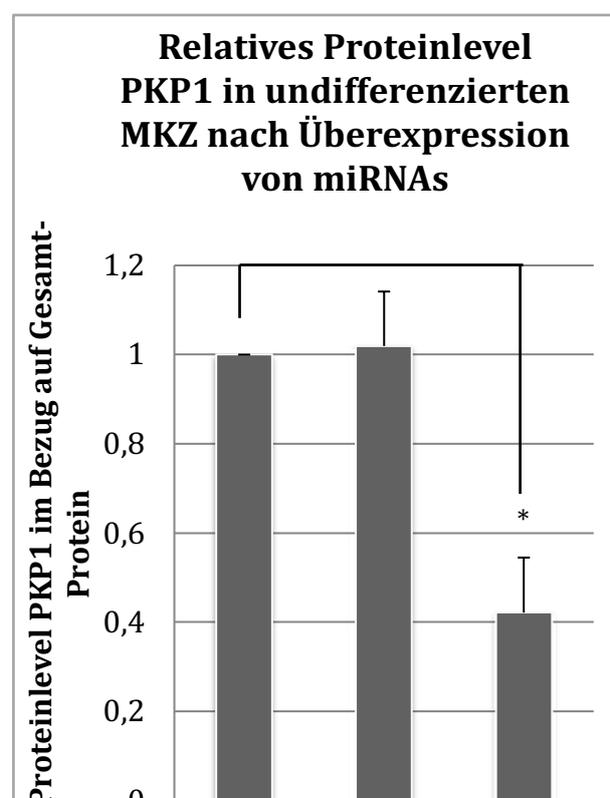


Abb. 21 WB nach Überexpression der let-7b und mir-34a (durch Transfektion der *Mimics*) in undifferenzierten MKZ, Gesamt-Protein als Referenz und spezifische Banden für PKP1 und beta-Aktin (=ACTB).

Abb. 22 Relatives Proteinlevel von PKP1 im Bezug auf Gesamt-Protein nach Überexpression der let-7b und mir-34a (durch Transfektion der *Mimics*), Kontrolle=100% PKP1=1, n=3, Signifikanz mittels Student's T-Test: * P<0,05

In abgebildeten Western Blot sieht man bei der Überexpression der mir-34a eine gegenüber der Kontrolle deutlich abgeschwächte Bande, wohingegen die Überexpression der let-7b eine ähnlich starke Bande wie in der Kontrolle zeigt.

Bei der Quantifizierung (Abb. 22) ist bei Überexpression der mir-34a eine deutliche Reduktion von PKP1 auf 42% (+/- 12%) zu sehen, während für die isolierte Überexpression der let-7b zunächst kein Unterschied im Proteinlevel von PKP1 nachweisbar ist.

Somit kann zunächst davon ausgegangen werden, dass die mir-34a nach Bindung an die 3'UTR von PKP1 einen Einfluss auf dessen mRNA und nachfolgend auf dessen Proteinbiosynthese hat.

Die gleichen Experimente wurden für die Repression der let-7b und der mir-34a durchgeführt. In diesem Fall wurden eine Kontrolle und die entsprechenden *Inhibitors* für 48 Stunden transfiziert. Hierbei stellte sich die Frage, ob eine Reduktion des miRNA-Levels entsprechend einen Anstieg des Proteinlevels von PKP1 initiieren wird.

Bei der Kontrolle handelt es sich um eine Negativkontrolle (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bestehend aus chemisch modifizierten Oligonukleotiden. Die Sequenz basiert auf einer miRNA, welche in *C. elegans* vorkommt und kaum Gemeinsamkeiten mit Sequenzen im humanen oder murinen System aufweist.

In der links stehenden Abbildung 23 ist ein repräsentativer Western Blot zu sehen, wo zum einen die Ponceau-Färbung, d.h. die jeweiligen Banden des Gesamt-Proteins und zum anderen die spezifischen Banden für PKP1 und beta-Aktin zur Darstellung kommen. In der Abbildung 24 ist die entsprechende Quantifizierung aufgezeigt, dabei sieht man auf der X-Achse die reprimierten miRNAs bzw. die Kontrolle und auf der Y-Achse das relative Proteinlevel, wobei dies in Bezug auf das Gesamt-Protein (Ponceau-Färbung) dargestellt wurde. Dabei wird das Proteinlevel von PKP1 in der Kontrolle als unbeeinflusst und damit als 100% (=1) angesehen.

Abb. 23

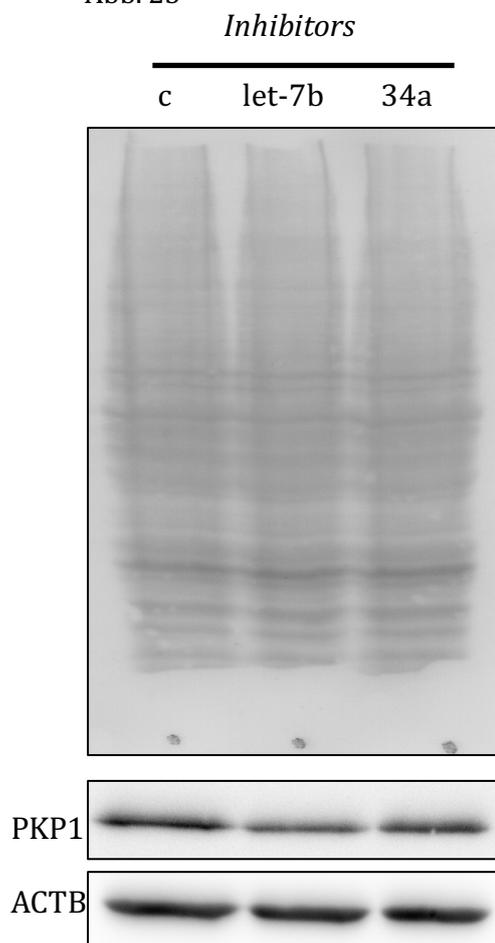


Abb. 23 WB nach Repression der let-7b und mir-34a (durch Transfektion der *Inhibitors*) in undifferenzierten MKZ, Gesamt-Protein als Referenz und spezifische Banden für PKP1 und beta-Aktin (=ACTB)

Abb. 24

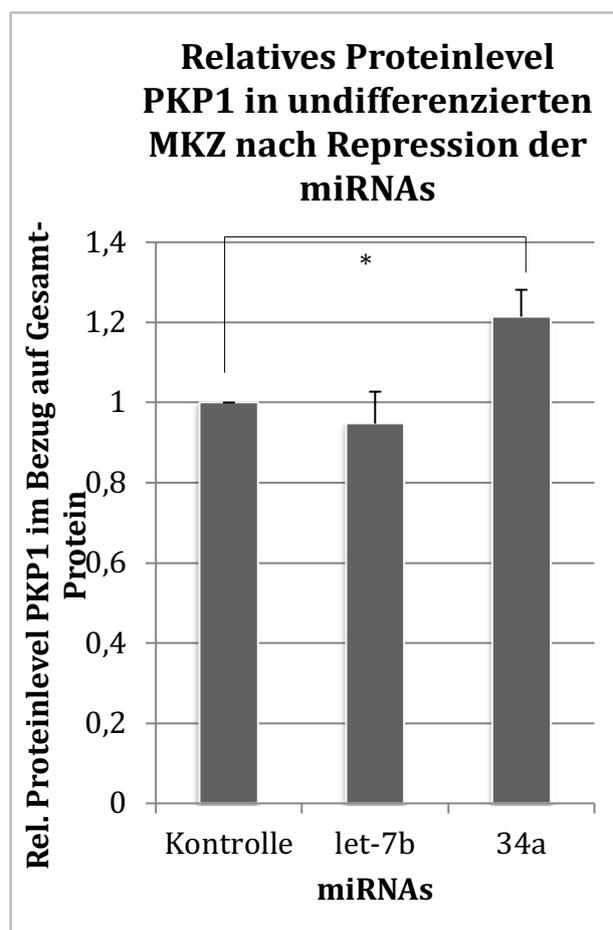


Abb. 24 Relatives Proteinlevel von PKP1 im Bezug auf Gesamt-Protein nach Repression der let-7b und mir-34a (durch Transfektion der *Inhibitors*), Kontrolle=100% PKP1=1, n=3, Signifikanz mittels Student's T-Test: * P<0,05

Die Abb. 24 zeigt, dass die Repression der mir-34a in der Quantifizierung eine Zunahme des relativen Proteinlevels von PKP1 um ca. 20% bewirkt, wohingegen die isolierte Repression der let-7b in der Quantifizierung zunächst keine Beeinflussung aufweist.

4.6 Zusammenfassung des Ergebnisteils

Im Rahmen der grundlegenden Experimente, welche im Kapitel 4.2 beschrieben wurden, konnten die miRNAs let-7b als Vertreter der let-7-Familie, die mir-34a und die mir-200b aufgrund eines hohen endogenen Expressionslevels in undifferenzierten MKZ zunächst als potentielle miRNAs für weitere Experimente selektiert werden.

Dabei deckten sich die Ergebnisse mit der vorhandenen Literatur und den *in-silico*-Analysen.

Im Kapitel 4.3 wurde die Proteinstabilität und Expression von PKP1 untersucht, um bei weiteren Analysen einen geeigneten Zeitpunkt für eine potentielle Beeinflussung durch miRNAs zu wählen. Zwar zeigte sich in differenzierten MKZ eine höheres Proteinlevel und eine höhere Stabilität von PKP1, aber auch eine längere Halbwertszeit, sodass potentielle Effekte durch miRNAs schwieriger bzw. später zu detektieren wären. Zusätzlich wurden die hohen Standardabweichungen bei der Evaluation des endogenen Levels, der vorher selektierten miRNAs als potentielle Probleme für weitere Analysen angesehen, sodass die Entscheidung zugunsten undifferenzierter MKZ ausfiel.

Mittels miR-TRAP (Kapitel 4.4) konnte die direkte oder indirekt Bindung der let-7b und der mir-34a an der murinen 3'UTR von PKP1 bestätigt werden, wohingegen eine Assoziation der mir-200b nicht detektiert wurde. Somit erfolgten die weiterführenden Experimente nur für die miRNAs let-7b und 34a.

Mithilfe eines Luciferase-Reportergen-Assay in HEK293-Zellen konnte ein Effekt der miRNAs auf die Translation der PKP1-3'UTR gesichert werden. Dabei führte die Überexpression beider miRNAs zu einer Reduktion der FFL-Aktivität und die Repression entsprechend zu einer Erhöhung.

Die Evaluation auf Zellebene (Kapitel 4.5.2) in undifferenzierten MKZ zeigte, dass die isolierte Repression und Überexpression der mir-34a das Proteinlevel von PKP1 beeinflusst

hat, wohingegen eine isolierte Repression oder Überexpression der let-7b keinen Einfluss auf das Proteinlevel von PKP1 hervorrufen konnte.

5. Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass PKP1 als wichtiger Bestandteil von Desmosomen im Zellverband agiert und die Desmosomen in Größe, Anzahl und Form beeinflussen kann. Dabei kommt PKP1 nicht nur eine Funktion als Strukturprotein innerhalb der Desmosomen zu, sondern auch als Initiator für die Rekrutierung weiterer desmosomaler Proteine, die für die volle Funktionsfähigkeit der Desmosomen von Bedeutung sind (Mechthild Hatzfeld et al. 2000).

Weiterhin war über PKP1 bekannt, dass es zusätzlich zum desmosomalen Vorkommen einen zytoplasmatischen Pool gibt. Hier agiert PKP1 als Signalprotein und kann via Interaktion mit eIF4A1 die Translation und damit Proliferation steigern.

Klinisch gesehen kommen PKP1 damit zwei gegensätzliche Aufgaben zu. Die Desmosomen sind essentiell für Gewebe mit hoher mechanischer Beanspruchung wie z.B. der Haut und dem Herzmuskelgewebe. Dem *Skin-Fragility-Syndrom* liegt eine *loss-of-function*-Mutation im PKP1-Gen zugrunde. Bei diesem schweren Krankheitsbild leiden die Patienten sehr unter einer gesteigerten Fragilität der Haut, welche durch eine verringerte Anzahl und deutlich kleineren Desmosomen bedingt ist (McGrath et al. 1997). Weiterhin wird die desmosomale Funktion als tumorsupprimierend angesehen, da durch Kontaktinhibition Zellwachstum und Motilität gehemmt werden.

Der zytoplasmatische Pool von PKP1 wiederum fördert Translation, Zellwachstum und Proliferation. Diese Funktionen sind essentiell für Regeneration und Homöostase für z.B. die Wundheilung oder Wachstum. Ist die Regulation dieser Funktion gestört, kann es zur unkontrollierten Proliferation kommen, was wiederum ein Triggerfaktor für die Tumorgenese sein kann. In diesem Fall nimmt PKP1 die Rolle eines Onkogens ein.

Anhand der aufgezeigten essentiellen Funktionen von PKP1 liegt dieser Arbeit die zentrale Fragestellung zugrunde, wie die Proteinbiosynthese von PKP1 reguliert wird, um das Gleichgewicht der zwei gegensätzlichen Aufgaben in der Zelle herzustellen.

Ein Ansatz, der auch in dieser Arbeit verfolgt wurde, stellte eine potentielle Regulation durch miRNAs dar, welche sich durch Interaktion mit der 3'UTR verschiedener mRNAs als Feinregulatoren in der Proteinbiosynthese etabliert haben (Krol, Loedige, and Filipowicz 2010). Dabei besitzt PKP1 sowohl in der murinen als auch in der humanen Spezies eine lange 3'UTR und bietet damit hohes Potential für eine Beeinflussung durch miRNAs.

Ein Hinweis, dass miRNAs für die Homöostase der Haut von Bedeutung sind, zeigt die Arbeit von Yi et al. (2006), in der eine Vielzahl von miRNAs mit hoher Expression in der Epidermis von Mäusen nachgewiesen werden konnten.

Demnach galt es, miRNAs zu identifizieren, die an die 3'UTR von PKP1 binden und deren Einfluss auf die Proteinbiosynthese zu untersuchen.

5.1 Human versus murin - die Mauskeratinozyten (MKZ) als Zelllinie

Generell fiel die Entscheidung, die Analysen zunächst in einer murinen Zelllinie, den MKZ, durchzuführen (siehe Kapitel 4.1 Modellsystem „Mauskeratinozyten“).

Ha and Kim (2014) konnten zeigen, dass vor allem für MiRNA-*seed*-Familien die Bindungsstellen zwischen verschiedenen Spezies der Säugetiere konserviert sind. Demnach bestand die Annahme, potentiell regulatorische miRNAs vom murinen ins humane System übertragen zu können.

Dazu kommt, dass sich die Literatur, in der eine hohe Expression von miRNAs in der Epidermis nachgewiesen wurde und anhand der für diese Arbeit potentiell zu untersuchende miRNAs ausgewählt wurden, ebenfalls auf die murine Spezies bezog.

Die *in-silico*-Analysen mithilfe www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk zeigten, außer für die mir-200b in der murinen Spezies, stets höhere Summen, was die Wahrscheinlichkeit einer Bindungsstelle an der 3'UTR von PKP1 anbelangt, als in der humanen Spezies (siehe Kapitel 4.2.1, Tbl. 1 und 2). Demnach wurden nachfolgend die *Seed*-Sequenzen der miRNAs mit der potentiellen Bindungssequenz an der 3'UTR nur für die murine Spezies dargestellt (siehe Kapitel 4.2.1, Abb. 6).

Zusätzlich fiel die Entscheidung zum Arbeiten mit undifferenzierten MKZ. Durch die Differenzierung erhöht sich zwar die Menge an PKP1 (siehe Kapitel 4.3.1, Abb. 8), aber dies bedeutet auch die Ausbildung von zusätzlichen Desmosomen und PKP1 weist in Desmosomen eine höhere Stabilität auf als im zytoplasmatischen Pool. Die miRNAs hingegen beeinflussen aber die Neusynthese von Proteinen und wirken nicht auf den bestehenden Proteinpool.

Ein weiterer Aspekt für die Verwendung der undifferenzierten MKZ zeigt sich in der Abbildung 12 (Kapitel 4.3.3). Bei der Bestimmung des endogenen miRNA-Levels in differenzierten MKZ zeigten sich starke Schwankungen (hohe Standardabweichung) und unter Berücksichtigung der Standardabweichung keine wesentliche Erhöhung des endogenen miRNA-Levels. Die hohe Standardabweichung lässt auf eine schwierige

Reproduzierbarkeit schließen. Um also potentielle Fehlerquellen für weitere Analysen zu vermeiden, wurden die MKZ im undifferenzierten Zustand genutzt.

5.2 PKP1 – wichtig für die Stabilität der Zellen

Für diese Arbeit wurden, wie unter 4.1 beschrieben, undifferenzierte MKZ für die Analysen zur potentiellen Beeinflussung der PKP1-Proteinsynthese durch miRNAs genutzt.

Im Kapitel 4.3.1 (Abb. 8/9) konnte ein enormer Anstieg von PKP1 nach Initiation der Differenzierung von MKZ durch die Zugabe von CaCl_2 gezeigt werden. Nach nur zwölf Stunden hat eine Verdopplung der Proteinmenge stattgefunden, nach 48 Stunden lag sogar die dreifache Menge an PKP1 vor. Keil und Kollegen konnten zeigen, dass während der Differenzierung von MKZ das Proteinlevel von PKP1 stärker ansteigt als dessen mRNA-Level. Dies lässt eine posttranskriptionelle und posttranslationelle Regulation vermuten (Keil, Rietscher, and Hatzfeld 2016). Anhand dieser Daten kommt der Frage der Regulierung der Proteinsynthese eine große Bedeutung zu.

Dass das erhöhte Proteinlevel von PKP1 auch eine erhöhte Stabilität mit sich bringt, bestätigte sich durch die Zugabe von Cycloheximid. In den differenzierten MKZ konnte noch nach 24 Stunden eine geringe Menge an PKP1 nachgewiesen werden, wohingegen bei den undifferenzierten bereits nach acht Stunden die Menge an PKP1 nahezu unter die Nachweisgrenze sank. Bezogen auf die Ausgangsmenge waren in den undifferenzierten MKZ nach ca. zwei Stunden und in den differenzierten MKZ nach ca. fünf Stunden noch 50% der ursprünglichen PKP1-Menge vorhanden. Somit besitzt das PKP1 in den differenzierten MKZ eine längere Halbwertszeit.

In den undifferenzierten MKZ liegt aufgrund der fehlenden Desmosomen ausschließlich der zytoplasmatische Pool von PKP1 vor, was darauf schließen lässt, dass diese Form des PKP1 eine kürzere Halbwertszeit besitzt.

Durch die Differenzierung muss zwangsläufig der desmosomale Pool von PKP1 zunehmen. Daraus lässt sich vermuten, dass die desmosomale Form nicht nur eine höhere Stabilität sondern auch eine längere HWZ aufweist. Demnach ist der zytoplasmatische Pool von größerer Bedeutung, wenn es um die Regulationsmechanismen von PKP1 geht.

5.3 Regulation der Proteinsynthese von PKP1 durch die miRNA 34a

Erste Hinweise, dass die mir-34a eine Rolle in der Regulation der PKP1-Proteinsynthese spielen könnte, ergaben sich durch die hohe Expression der mir-34a in der Epidermis von Mäusen (Rui Yi et al. 2006) sowie durch die *in-silico*-Analysen mittels *microRNA.org* und www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/, bei denen nicht nur potentielle Bindungsstellen in verschiedenen Datenbanken vorhergesagt wurden, sondern auch direkt potentielle Bindungsstellen an der 3'UTR von PKP1 anhand der *Seed*-Sequenz der miRNA aufgezeigt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine hohe endogene Expression der mir-34a in undifferenzierten MKZ gezeigt (siehe Kapitel 4.2.2, Abb. 7). Zusätzlich konnte die mir-34a mithilfe des miR-TRAP durch spezifische Bindung an die 3'UTR von PKP1 angereichert werden. Mithilfe der nachfolgenden funktionellen Analyse mittels Luciferase-Reportergen-Assay wurde ein spezifischer Einfluss der mir-34a auf die Translation der PKP1-3'UTR detektiert. Dabei ergab eine Repression der mir-34a eine erhöhte Translation, wohingegen die Überexpression der mir-34a eine deutliche Reduktion der Translation hervorrief. Im Luciferase-Reportergen-Assay spiegelte sich das anhand der Aktivität der *Firefly*-Luciferase wider. Dieser Effekt der mir-34a auf PKP1 konnte auch auf Zellebene in MKZ reproduziert werden, wo eine Überexpression der mir-34a zur Abnahme und eine Repression der mir-34a zur Zunahme des Proteinlevels von PKP1 geführt hat (siehe Kapitel 4.5.2, Abb. 21-24). Dabei war der Effekt der Abnahme des Proteinlevels durch Überexpression der mir-34a deutlich stärker ausgeprägt als bei der Repression, welche zur geringen Zunahme des Proteinlevels führte.

Dies lässt sich dadurch erklären, dass miRNAs viele Ziel-Proteine besitzen. PKP1 stellt nur eins der Zielproteine der mir-34a dar. Erhöht man die Menge der mir-34a, ergibt sich die Vorstellung, dass neben den anderen Zielproteinen auch die PKP1-mRNA deutlich mehr Interaktionen mit der mir-34a aufweist und somit ein stärkerer Effekt hervorgerufen wird. In der Annahme, dass PKP1 nur ein limitierter Teil der mir-34a zur Verfügung steht, erreicht eine Repression dieser auch nur einen kleinen Teil der PKP1-mRNA und der Effekt fällt entsprechend geringer aus. Außerdem besitzen die Mitglieder der *Seed*-Familie, zu der neben der mir-34a z.B. auch die mir-34b und -c gehören, gleiche *Seed*-Sequenzen, sodass bei Repression einer einzelnen Isoform die anderen miRNAs noch binden und den entsprechenden Effekt hervorrufen können. Um diese Annahme zu evaluieren, müsste man alle Mitglieder einer *Seed*-Familie zeitgleich ausschalten. Man würde dann entsprechend eine Zunahme des Proteinlevels von PKP1 erwarten.

Anhand der vorliegenden Experimente konnte allerdings nicht differenziert werden, ob eine direkte Bindung zwischen der 3'UTR von PKP1 und der *Seed*-Sequenz der mir-34a

stattfindet oder ob die Bindung durch RNA-bindende Proteine vermittelt wird. Dabei wird in der Literatur diskutiert, ob die posttranskriptionelle Regulation der Ziel-mRNA durch die Art und Weise der Bindung der jeweiligen miRNA an der 3'UTR beeinflusst wird. Hierbei stehen die verschiedenen Mechanismen der Deadenylierung oder der translationellen Repression durch direkten mRNA-Abbau zur Debatte (Jonas and Izaurralde 2015).

Um diesen Aspekt zu untersuchen, würde sich die Mutation der potentiellen Bindungsstelle an der 3'UTR von PKP1 im Bereich der *Seed*-Sequenz der mir-34a anbieten. Nachfolgend müssten erneut die oben aufgeführten funktionellen Analysen erfolgen, um zu schauen, ob die gleichen Effekte wie ohne Mutation hervorgerufen werden können. Sollte eine direkte Bindung zwischen der PKP1-3'UTR und der mir-34a stattfinden, würde man nach Mutation ein unverändertes Proteinlevel von PKP1 nach Überexpression der mir-34a auf Zellebene erwarten. Auch sollte die Luciferase-Aktivität unbeeinflusst bleiben. Findet die Interaktion über RNA-bindende Proteine statt und die mir-34a ist nicht auf die *Seed*-Sequenz von PKP1 angewiesen, sollten die Ergebnisse, wie in dieser Arbeit dargestellt, gleich bleiben, d.h. eine Abnahme des Proteinlevels und der Luciferase-Aktivität nach Überexpression der mir-34a. Die Differenzierung zwischen direkter Bindung oder Bindung über RNA-bindende Proteine könnte für die klinische Relevanz eine große Rolle spielen. Sollte man die Beeinflussung des miRNA-Levels therapeutisch nutzen wollen, wäre es von Bedeutung, ob man die miRNA direkt neutralisieren oder eine Blockade an RNA-bindenden Proteinen initiieren muss, um den Effekt der miRNA zu unterbinden. Dabei wäre in jedem Fall zu beachten, welche weiteren Zielproteine durch die jeweilige miRNA beeinflusst werden und ebenfalls ob es sich jeweils um direkte oder indirekte Effekte handelt.

5.4 Regulation der Proteinsynthese von PKP1 durch die miRNA let-7b

Wie auch für die mir-34a ergab sich für die let-7b in den *in-silico*-Analysen eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine potentielle Bindungsstelle an der 3'UTR von PKP1. Ebenfalls konnten Yi et al. (2006) eine hohe Expression in der Epidermis von Mäusen aufzeigen. Im Gegensatz allerdings zur mir-34a wurde für weitere Mitglieder der let-7-Familie ebenfalls eine hohe Expression aufgezeigt, so z.B. für die let-7c, -7g und -7i (siehe Kapitel 1.2.2, Abb. 5). Die let-7-Familie ist mit zwölf Mitgliedern eine der größten miRNA-Familien, die sich durch eine gemeinsame *Seed*-Sequenz auszeichnen (Balzeau et al. 2017; Ha and Kim 2014). Da für die let-7b in der Literatur eine wichtige Rolle in der Tumorgenese des malignen Melanoms beschrieben wurde (Kapitel 1.2.4; Schultz et al. 2008) und in der vorliegenden Arbeit das Organ Haut und die Zelllinie der MKZ im Vordergrund standen, lag auf dieser

miRNA als Vertreter der let-7-Familie das Augenmerk. Dennoch wurde anhand der endogenen Expression in undifferenzierten MKZ geprüft, ob die Expression der let-7c deutlich höher ausfällt als die der let-7b, da aus der Abbildung 5 (Kapitel 1.2.2) hervorgeht, dass die let-7c eine doppelt so hohe Expression in der Epidermis von Mäusen aufweist wie die let-7b (Rui Yi et al. 2006). Bei den TaqMan-Analysen zeigte sich jedoch eine höhere Expression für die let-7b als für die let-7c (siehe Kapitel 4.2.2, Abb. 7), sodass die let-7b für die weiteren Analysen genutzt wurde.

Mithilfe des miR-TRAP konnte die spezifische Anreicherung der let-7b über die 3'UTR von PKP1 nachgewiesen werden. Im Luciferase-Reporter-Gen-Assay wurde bei isolierter Repression und Überexpression der let-7b die Translation der PKP1-3'UTR beeinflusst, was sich bei Überexpression in einer deutlichen Abnahme der Aktivität der *Firefly*-Luciferase und damit korrelierend der Abnahme der Translation der PKP1-3'UTR zeigte. Dagegen führte eine Repression der let-7b jeweils zu einer Zunahme.

Bei dem Versuch, die Proteinsynthese von PKP1 auf Zellebene durch isolierte Repression und Überexpression der let-7b zu beeinflussen, konnte der Effekt des Luciferase-Reporter-Gen-Assays nicht bestätigt werden. Das Proteinlevel von PKP1 blieb weitestgehend unverändert.

Da HEK293-Zellen kaum Desmosomen besitzen, spielen endogene Regulationsmechanismen eine untergeordnete Rolle und der Effekt auf die Luciferase-Aktivität korreliert direkt mit der Translationsrate der PKP1-3'UTR. Bei dem Versuch, die Translation der PKP1-mRNA in MKZ zu beeinflussen, können aufgrund des natürlichen Vorkommens von PKP1 in diesen Zellen andere Regulationsmechanismen eine Rolle spielen und die Überexpression oder Repression einer einzelnen miRNA ausgleichen, sodass sich der Effekt der isolierten let-7b-Beeinflussung nicht durch Transfektion in MKZ hervorrufen lässt. Vergleicht man die endogenen Level der let-7b in HEK293-Zellen und MKZ (Ergebnisse nicht dargestellt), zeigt sich ein deutlich höheres Level für die MKZ. Daraus lässt sich ableiten, dass die Überexpression der let-7b im Rahmen des Luciferase-Assays in HEK293-Zellen einen stärkeren Effekt auf die PKP1-3'UTR hat als in den MKZ in denen sich von Grund auf bereits eine hohe Menge an let-7b befindet.

Zusätzlich umfasst die miRNA-Familie der let-7, wie oben beschrieben, viele Mitglieder, die auch eine hohe Expression in der Epidermis von Mäusen gezeigt haben. Es ist anzunehmen, dass andere Mitglieder der let-7-Familie aufgrund derselben *Seed*-Sequenz mit der 3'UTR von PKP1 interagieren und die isolierte iatrogene Beeinflussung der let-7b entsprechend kompensieren können. Die in dieser Arbeit experimentellen Analysen könnten mit einem miRNA-sponge wiederholt werden, womit man alle Mitglieder einer *Seed*-Familie gleichzeitig ausschalten kann. Dabei besteht die Annahme, einen Effekt auf das Proteinlevel von PKP1 bei Überexpression oder Repression zu detektieren.

Demnach kann anhand der vorliegenden Daten eine Beeinflussung der Proteinsynthese von PKP1 durch die let-7b nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse des Luciferase-Reporter-Gen-Assays und des miR-TRAPs weisen vielmehr daraufhin, dass auch für die let-7-Familie eine spezifische Interaktion mit der 3'UTR von PKP1 besteht.

Man könnte mittels miR-TRAP versuchen, alle Mitglieder der let-7-Familie zu identifizieren, die sich spezifisch über die 3'UTR von PKP1 anreichern lassen und nachfolgend die funktionellen Analysen durch Repression und Überexpression aller identifizierten miRNAs der let-7-Familie wiederholen.

Ein anderer Ansatz, den man verfolgen könnte, wäre in Abhängigkeit von der Differenzierung der MKZ das miRNA-Level der let-7b zu bestimmen und zu dem Zeitpunkt der größten Menge der let-7b eine Repression durch die Transfektion von spezifischen miRNA-*Inhibitors* zu initiieren, um damit gegebenenfalls den Effekt auf das Proteinlevel von PKP1 zu verstärken.

5.5 Die miRNA 200b – Relevanz für die humane Spezies

Für die mir-200b wurde eine wichtige Rolle in der Regulierung der Epithelial-Mesenchymalen-Transition beschrieben. Dabei verlieren Zellen durch die Repression der mir-200b ihre epithelialen Eigenschaften, unter anderem durch eine verminderte Expression von Cadherinen und können sich in Form von Metastasen absiedeln (Mongroo and Rustgi 2010). Eine wichtige epitheliale Eigenschaft stellen die Desmosomen dar, in denen PKP1 eine wichtige Rolle spielt (Mechthild Hatzfeld et al. 2000; Kowalczyk et al. 1999). Somit entstand die Frage, ob auch PKP1 durch die mir-200b reguliert wird und bei entsprechender Fehlfunktion eine Metastasierung begünstigt wird.

Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass für Spinozelluläre Karzinome der Haut eine verminderte Expression von PKP1 beschrieben wurde und die Expression von PKP1 dabei invers mit der Differenzierung und Invasivität der Tumore korreliert. Dies bedeutet, dass sich in gut bzw. moderat differenzierten Spinozellulären Karzinomen die Expression von PKP1 weitestgehend normal zeigt, wohingegen dessen Expression in entdifferenzierten Tumoren stark erniedrigt war (Moll et al. 1997; Narayana et al. 2010; Schwarz et al. 2006). Als Folge sind die Ausbildung der Desmosomen und Zelladhäsion gestört und die Migrationsfähigkeit der Zellen erhöht. Dadurch wird die Bildung von Metastasen begünstigt.

Um eine eventuelle Interaktion zwischen PKP1 und der mir-200b zu prüfen, wurden ebenfalls *in-silico*-Analysen durchgeführt. Dabei war die mir-200b die einzige miRNA, die in

der humanen Spezies eine höhere Wahrscheinlichkeit der Bindung an die jeweilige 3'UTR von PKP1 aufwies als in der murinen Spezies (siehe Kapitel 4.2.1; Tbl. 1/2). Es fiel die Entscheidung, die mir-200b, welche gemäß den *in-silico*-Analysen mehr für das humane System von Bedeutung zu sein schien, als Spezifitätskontrolle mitzuführen.

Zwar konnte mithilfe der Datenbank von *microrna.org* anhand der *Seed*-Sequenz der mir-200b eine mögliche Bindungsstelle an der 3'UTR von murinem PKP1 identifiziert und bei den experimentellen Analysen ein vergleichsweise hohes endogenes Expressionslevel in undifferenzierten MKZ gezeigt werden. Aber im miR-TRAP fand keine spezifische Anreicherung der mir-200b durch die Bindung an die murine 3'UTR von PKP1 statt. Weitere funktionelle Analysen im Mausmodell wurden nicht durchgeführt, da eine Beeinflussung der Proteinsynthese von PKP1 in der murinen Spezies bei fehlender Anreicherung als unwahrscheinlich angesehen wurde. Die vorliegenden Ergebnisse korrelierten dabei mit den *in-silico*-Analysen, wo eine Interaktion zwischen der humanen 3'UTR von PKP1 als wahrscheinlicher dargestellt wurde. Somit ist anhand der Ergebnisse nicht ausgeschlossen, dass die mir-200b mit der humanen 3'UTR von PKP1 interagiert. Um dies zu untersuchen, müsste der miR-TRAP mit der langen Form der 3'UTR von PKP1 und z.B. HaCaT-Zellen (humane Keratinozyten) als Zellsat durchgeführt werden.

Die hohe endogene Expression in undifferenzierten MKZ lässt vermuten, dass es andere Zielproteine für die mir-200b in der murinen Spezies gibt.

5.6 Klinische Relevanz – potentielle Bedeutung von PKP1 und miRNAs für die humane Spezies

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die miRNAs 34a und let-7b mithilfe der 3'UTR von murinem PKP1 anreichern lassen. Wie oben bereits erwähnt, kann man noch nicht differenzieren, ob eine direkte Bindung zwischen *Seed*-Sequenz der miRNA und der mRNA des Zielproteins stattfindet oder ob RNA-bindende Proteine die Verbindung vermitteln und den entsprechenden Effekt hervorrufen. Für die miR-34a konnte zusätzlich eine Beeinflussung des Proteinlevels von PKP1 durch Repression oder Überexpression auf Zellebene gezeigt werden, wohingegen für die let-7b ein Effekt nur bei isolierter Betrachtung im Luciferase-Reporter-Gen-Assay detektiert wurde.

Dabei stellt sich die Frage, ob die Beeinflussung des Proteinlevels von PKP1 durch die miRNAs mir-34a und let-7b auch eine Bedeutung für die Zelle und deren Desmosomen hat. Hierfür würde sich das Experiment eines Dispase-Assays anbieten. Dabei wird nach entsprechender Transfektion zur Repression oder Überexpression der jeweiligen miRNA

ein *Monolayer*, bestehend aus MKZ, mechanischem Stress ausgesetzt und die Stabilität anhand der entstehenden Fragmente geprüft. Ein ähnliches Verfahren wurde zum einen von Keil *et al.* (2016) und zum anderen von Tucker *et al.* (2014) angewendet.

Im Vergleich von Wildtyp-MKZ zu PKP1-*knock-out*-MKZ (PKP1-KO-MKZ) wurde für die PKP1-KO-MKZ eine ausgeprägte Fragmentierung des *Monolayers* im Dispase-Assay gezeigt. Die Expression von PKP1-GFP (PKP1-grün-fluoreszierendes-Protein) wiederum konnte in den PKP1-KO-MKZ die Fragmentierung verhindern (Keil, Rietscher, and Hatzfeld 2016).

Im Rahmen des Krankheitsbildes Pemphigus vulgaris führte die Überexpression von PKP1 zur Größenzunahme der Desmosomen in der Basalzellschicht und es zeigten sich mehr desmosomale Proteine in den Zell-Zell-Kontakten. Zusätzlich wies der *Monolayer* mit PKP1-Überexpression eine reduzierte Fragmentierung im Vergleich zur Kontrollpopulation auf. Für beide Populationen lagen Zellen zugrunde, die zuvor mit Pemphigus vulgaris IgG-Autoantikörpern versetzt wurden (Tucker, Stahley, and Kowalczyk 2014).

Sollte sich nun die Stabilität des Zellverbandes durch die Beeinflussung der mir-34a ändern, so könnte es von großer Bedeutung sein, die in dieser Arbeit durchgeführte Experimentenreihe auf das humane System zu übertragen und im weiteren Verlauf die mir-34a als diagnostischen oder therapeutischen Ansatz in der Klinik zu nutzen.

Aktuell werden miRNAs als gut geeignete Biomarker angesehen, da sie sowohl im frischen als auch in Formalin-fixiertem Gewebe eine chemische Stabilität aufweisen. Mittels miRNA-basierter Diagnostik soll ihnen eine Rolle in der frühen Krebserkennung zukommen, da diese bei vielen Tumoren noch ausbaufähig ist bzw. die aktuellen Methoden zu kostenintensiv oder mit negativen Nebeneffekten verbunden sind (z.B. eine hohe Strahlenbelastung bei Tumorscreening mittels Computertomographie). Durch hohe Zell- und Gewebespezifität ist man auch bei geringen Tumormengen, welche zu diagnostischen Zwecken gewonnen wurden, in der Lage, spezifische miRNAs zu identifizieren, wohingegen sich eine zu geringe Tumormenge der mikroskopischen Diagnostik entzieht. Demnach ist ein Hauptaugenmerk die Identifikation von Tumor-spezifischen miRNA-Expressionsmustern, um diese als diagnostischen Faktor nutzen zu können (Pichler and Calin 2015). Diese ersten Ansätze sind allerdings noch keine für den Klinikalltag relevanten oder validierten Methoden, da aktuell noch prospektive Studien auch bezüglich Kosteneffektivität und Umsetzbarkeit fehlen. Gleiches zählt für eine potentielle Vorhersage des individuellen Risikos bzw. des möglichen Progress' eines Tumors. Hier konnten Studien bereits zeigen, dass es ein unterschiedliches Expressionsmuster von miRNAs bei primären Tumoren und nachfolgend deren Metastasen gibt (Hur et al. 2015).

Eine weitere, aber auch wohl die am schwierigsten zu etablierende Relevanz von miRNAs bei malignen Tumoren ist der therapeutische Ansatz. Hierbei muss man auf der einen Seite die Wiederherstellung der tumorsuppressiven Eigenschaften bei *loss-of-function*

Situationen und auf der anderen Seite eine Hemmung der *gain-of-function* Situationen bei *oncomiRs* beachten. Dabei wird die größte Herausforderung sein, diese therapeutischen Konzepte organ- bzw. gewebespezifisch anzuwenden, ohne dabei andere unerwünschte Effekte in anderen Organen hervorzurufen (Pichler and Calin 2015).

Zusammenfassend kommt den miRNAs bereits jetzt eine potentiell hohe klinische Relevanz zu, welche positiv im Kampf gegen den Krebs genutzt werden könnte.

5.7 Funktionsmodell - PKP1 und miRNAs im Rahmen der Tumorgenese

Wie diese Arbeit zeigt, bestehen Interaktionen zwischen der 3'UTR von PKP1 und den miRNAs let-7b und 34a, welche das Proteinlevel von PKP1 reduzieren können. Beide miRNAs sind als tumorsupprimierende miRNAs beschrieben (siehe Kapitel 2.4 und 2.5). Sieht man auf der einen Seite die tumorsupprimierende Eigenschaft von PKP1 durch Stabilisierung und Organisation der Desmosomen und der damit verbundenen Einschränkung von Wachstum und Motilität durch Kontaktinhibition, scheint es zunächst widersprüchlich, dass eine Hemmung der Proteinsynthese von PKP1 durch u.a. die let-7b und die mir-34a ebenfalls tumorsupprimierend wirken soll. Hier rückt die Rolle des zytoplasmatischen Pools von PKP1 als Signalprotein in den Vordergrund.

Durch die Signalfunktion initiiert PKP1 die Rekrutierung von eIF4A1 zum *cap-binding*-Komplex und steigert außerdem durch direkte Interaktion mit eIF4A1 die ATP-abhängige Helicase-Aktivität von eIF4A1 (Wolf et al. 2010; Wolf and Hatzfeld 2010). Beides sind Schritte, welche die Translation und damit die Proteinsynthese stimulieren. Die Synthese von Proteinen ist eine Voraussetzung für Zellwachstum, was wiederum zur Zellteilung führt. Bei einer Störung dieses Signalwegs und daraus resultierender unkontrollierter Proliferation kann wiederum die Tumorgenese gefördert werden und PKP1 nimmt die Rolle eines Onkogens ein. In diesem Fall sind tumorsupprimierende Regulatoren von Bedeutung. Diese Aufgabe kommt den miRNAs let-7b und mir-34a zu.

Der zytoplasmatische Pool von PKP1 kann unter anderem durch den Insulin/IGF1 (*insulin like growth factor*)-Signalweg reguliert werden. Binden Insulin oder IGF an den Rezeptor einer Zelle, wird eine Kaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung von Akt2 (Serin-Threonin-Kinase) führt. Akt2 wiederum phosphoryliert PKP1, woraus eine verlängerte HWZ und eine zytoplasmatische Akkumulation resultiert (Wolf et al. 2013). Die unphosphorylierte Form von PKP1 bindet an Desmoglein 1 und Desmoplakin, fördert die Zelladhäsion durch Rekrutierung desmosomaler Proteine mit entsprechend erhöhter Zell-

Zell-Stabilität und wirkt somit tumorsuppressiv. Durch Phosphorylierung von PKP1 wird die Bindung zu Desmoglein 1 und Desmoplakin gestört und es kommt zur Degradierung des desmosomalen Pools mit nachfolgender Akkumulation im Zytoplasma.

Die Akkumulation im Zytoplasma führt zur gesteigerten Translation durch Stimulation von eIF4A1 und somit zum Zellwachstum und zur Zellteilung, sodass PKP1 bei entsprechender Entartung dieser Kaskade als Onkogen angesehen wird (Wolf et al. 2013). In vielen Tumoren ist eine unkontrollierte Aktivierung des Ak2-Signalwegs beschrieben (Cheng et al., 2008; Qiao et al., 2008).

Im nachfolgenden Fließschema ist eine Vorstellung über die Interaktion zwischen miRNAs und PKP1 mit entsprechender Rolle als potentielles Onkogen dargestellt.

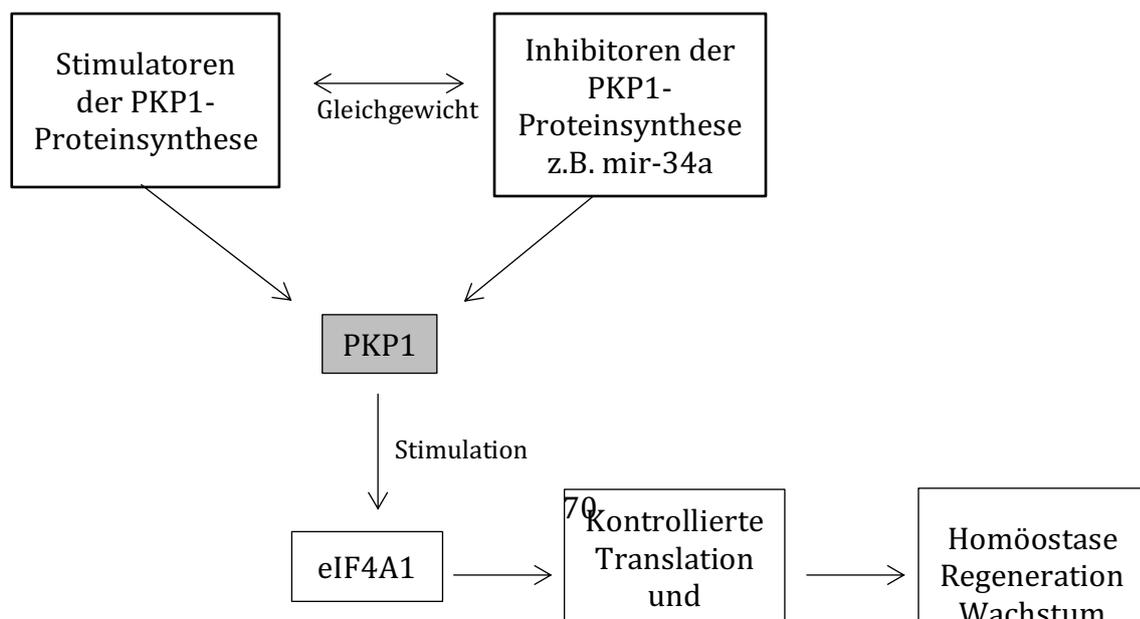




Abb. 25 Funktionsmodell: PKP1 und miRNAs im Rahmen der Tumorgenese
Oberes Fließschema: Gleichgewicht zwischen Stimulation und Inhibition der PKP1-Proteinsynthese; Resultat: Homöostase
Unteres Fließschema: Überwiegen der Stimulation der PKP1-Proteinsynthese; Resultat: Tumorgenese

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PKP1 als wichtiges Protein in der Tumorgenese angesehen wird und somit dessen Regulierung von großer klinischer Relevanz ist.

Potentielle Regulatoren stellen die miRNAs dar, welche die Proteinsynthese posttranskriptionell regulieren können. In dieser Arbeit konnte eine Interaktion zwischen der mir-34a und der 3'UTR des murinen PKP1 gezeigt werden. Weiterhin zeigen die experimentellen Analysen, dass die Regulation von PKP1 durch die let-7-Familie sehr wahrscheinlich ist.

Als weiterführendes Ziel ist die Übertragung der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen auf die humane Spezies von großer Bedeutung sowie die Eingliederung der miRNAs let-7

und 34a im Gesamtorganismus des Menschen, um potentielle therapeutische Ansätze im Kampf gegen die malignen Tumoren finden zu können.

6. Zusammenfassung

PKP1 ist ein Protein aus der Armadillo-Proteinfamilie. Es ist essentiell für die Stabilität von Desmosomen in der Epidermis und die Verbindung zwischen Desmosomen und Zytoskelett. Somit ist PKP1 wichtig für interzelluläre Kohäsion und die Integrität des Gewebes. Ein Verlust der Desmosomen könnte Zellmigration erleichtern und die Metastasierung von Tumorzellen begünstigen. Unter diesem Aspekt hat PKP1 eine tumorsupprimierende Funktion. Weiterhin interagiert PKP1 direkt mit dem Translationsfaktor eIF4A1 und stimuliert dessen Helicase-Aktivität und somit die Translation und Proliferation. Bei einer gesteigerten oder unkontrollierten Stimulation von eIF4A1 durch PKP1 kommt es zum Verlust der Homöostase und dem verankerungsabhängigen Wachstum, was die Tumorgenese begünstigen kann. In diesem Fall hat PKP1 eine onkogene Funktion. Diese zwei gegensätzlichen Funktionen von PKP1 müssen in einer Zelle im Gleichgewicht stehen und dennoch variabel sein, um sich Veränderungen anpassen zu können. Somit spielt die Regulation von PKP1 für die Homöostase der Zelle eine wichtige Rolle.

Neben der Regulation auf Transkriptionsebene rücken zunehmend posttranskriptionelle Mechanismen wie z.B. die Regulation durch miRNAs in den Vordergrund. Bei miRNAs handelt es sich um evolutionär hochkonservierte, nicht-kodierende *small*-RNAs mit einer Länge von ungefähr 22 Nukleotiden, welche direkt oder über RNA-bindende Proteine an die 3'UTR einer mRNA binden und deren Translation oder Stabilität beeinflussen können. Sie werden als Feinregulatoren der Proteinbiosynthese bezeichnet. PKP1 besitzt aufgrund seiner langen 3'UTR eine hohe Wahrscheinlichkeit, durch miRNAs reguliert zu werden.

Im Modell der MKZ konnte eine Anreicherung der miRNAs let-7b und 34a mithilfe der 3'UTR von PKP1 erfolgen, sodass auf eine direkte oder indirekte Bindung geschlossen werden kann. In der anschließenden funktionellen Analyse wurde durch die Überexpression und Repression der mir-34a ein Effekt auf das Proteinlevel von PKP1 in der Zelle detektiert. Somit wurde ein posttranskriptioneller Regulationsmechanismus von PKP1 aufgezeigt. Für die miRNA let-7b konnte zunächst nur im Luciferase-Reporter-Gen-Assay bei isolierter Repression und Überexpression der let-7b ein Effekt hervorgerufen werden. Dies zeigt, dass die Translation der PKP1-3'UTR durch die let-7b beeinflusst wird. Die aktuelle Literatur beschreibt tumorsupprimierende Eigenschaften der miRNAs 34a und let-7b, sodass diese beiden miRNAs bezogen auf PKP1 eine wichtige Rolle in der Homöostase von Geweben spielen könnten, indem sie die durch PKP1 stimulierte Proliferation regulieren können.

Literaturverzeichnis

- Ameres, Stefan L., and Phillip D. Zamore. 2013. "Diversifying microRNA Sequence and Function." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (8): 475–88. <https://doi.org/10.1038/nrm3611>.
- Anderson, Paul, and Nancy Kedersha. 2006. "RNA Granules." *The Journal of Cell Biology* 172 (6): 803–8. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512082>.
- Balzeau, Julien, Miriam R. Menezes, Siyu Cao, and John P. Hagan. 2017. "The LIN28/Let-7 Pathway in Cancer." *Frontiers in Genetics* 8: 31. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00031>.
- Bartel, David P. 2004. "MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function." *Cell* 116 (2): 281–97.
- Braun, Juliane, Danny Misiak, Bianca Busch, Knut Krohn, and Stefan Hüttelmaier. 2014. "Rapid Identification of Regulatory microRNAs by miTRAP (miRNA Trapping by RNA in Vitro Affinity Purification)." *Nucleic Acids Research* 42 (8): e66. <https://doi.org/10.1093/nar/gku127>.
- Calin, George Adrian, Calin Dan Dumitru, Masayoshi Shimizu, Roberta Bichi, Simona Zupo, Evan Noch, Hansjuerg Aldler, et al. 2002. "Frequent Deletions and down-Regulation of Micro- RNA Genes miR15 and miR16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24): 15524–29. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>.
- Chang, Tsung-Cheng, Erik A. Wentzel, Oliver A. Kent, Kalyani Ramachandran, Michael Mullendore, Kwang Hyuck Lee, Georg Feldmann, et al. 2007. "Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis." *Molecular Cell* 26 (5): 745–52. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.010>.
- Choi, Hee-Jung, and William I. Weis. 2005. "Structure of the Armadillo Repeat Domain of Plakophilin 1." *Journal of Molecular Biology* 346 (1): 367–76. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.048>.
- Giono, Luciana E., and James J. Manfredi. 2006. "The p53 Tumor Suppressor Participates in Multiple Cell Cycle Checkpoints." *Journal of Cellular Physiology* 209 (1): 13–20. <https://doi.org/10.1002/jcp.20689>.
- Grimson, Andrew, Kyle Kai-How Farh, Wendy K. Johnston, Philip Garrett-Engle, Lee P. Lim, and David P. Bartel. 2007. "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants Beyond Seed Pairing." *Molecular Cell* 27 (1): 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.017>.
- Ha, Minju, and V. Narry Kim. 2014. "Regulation of microRNA Biogenesis." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (8): 509–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- Hatzfeld, M., G. I. Kristjansson, U. Plessmann, and K. Weber. 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) (August): 2259–70.
- Hatzfeld, Mechthild, Christof Haffner, Katrin Schulze, and Ute Vinzens. 2000. "The Function of Plakophilin 1 in Desmosome Assembly and Actin Filament Organization." *The Journal of Cell Biology* 149 (1): 209–22.
- Heid, H. W., A. Schmidt, R. Zimbelmann, S. Schäfer, S. Winter-Simanowski, S. Stumpp, M. Keith, U. Figge, M. Schnölzer, and W. W. Franke. 1994. "Cell Type-Specific Desmosomal Plaque Proteins of the Plakoglobin Family: Plakophilin 1 (Band 6 Protein)." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 58 (2): 113–31.
- Hur, Keun, Yuji Toiyama, Aaron J. Schetter, Yoshinaga Okugawa, Curtis C. Harris, C. Richard Boland, and Ajay Goel. 2015. "Identification of a Metastasis-Specific MicroRNA Signature in Human Colorectal Cancer." *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 107 (3). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju492>.

- Johnson, Steven M., Helge Grosshans, Jaclyn Shingara, Mike Byrom, Rich Jarvis, Angie Cheng, Emmanuel Labourier, Kristy L. Reinert, David Brown, and Frank J. Slack. 2005. "RAS Is Regulated by the Let-7 microRNA Family." *Cell* 120 (5): 635–47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.014>.
- Jonas, Stefanie, and Elisa Izaurralde. 2015. "Towards a Molecular Understanding of microRNA-Mediated Gene Silencing." *Nature Reviews. Genetics* 16 (7): 421–33. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>.
- Keil, René, Katrin Rietscher, and Mechthild Hatzfeld. 2016. "Antagonistic Regulation of Intercellular Cohesion by Plakophilins 1 and 3." *The Journal of Investigative Dermatology* 136 (10): 2022–29. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.05.124>.
- Kowalczyk, A. P., M. Hatzfeld, E. A. Bornslaeger, D. S. Kopp, J. E. Borgwardt, C. M. Corcoran, A. Settler, and K. J. Green. 1999. "The Head Domain of Plakophilin-1 Binds to Desmoplakin and Enhances Its Recruitment to Desmosomes. Implications for Cutaneous Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (26): 18145–48.
- Krol, Jacek, Inga Loedige, and Witold Filipowicz. 2010. "The Widespread Regulation of microRNA Biogenesis, Function and Decay." *Nature Reviews. Genetics* 11 (9): 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>.
- Kurzen, Hjalmar, Ivonne Münzing, and Wolfgang Hartschuh. 2003. "Expression of Desmosomal Proteins in Squamous Cell Carcinomas of the Skin." *Journal of Cutaneous Pathology* 30 (10): 621–30.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- McGrath, John A., James R. McMillan, Carrie S. Shemanko, Sarah K. Runswick, Irene M. Leigh, E. Birgitte Lane, David R. Garrod, and Robin A. J. Eady. 1997. "Mutations in the Plakophilin 1 Gene Result in Ectodermal Dysplasia/Skin Fragility Syndrome." *Nature Genetics* 17 (2): 240–44. <https://doi.org/10.1038/ng1097-240>.
- Moll, I., H. Kurzen, L. Langbein, and W. W. Franke. 1997. "The Distribution of the Desmosomal Protein, Plakophilin 1, in Human Skin and Skin Tumors." *The Journal of Investigative Dermatology* 108 (2): 139–46.
- Mongroo, Perry S., and Anil K. Rustgi. 2010. "The Role of the miR-200 Family in Epithelial-Mesenchymal Transition." *Cancer Biology & Therapy* 10 (3): 219–22.
- Narayana, Nagamani, Julie Gist, Tyler Smith, Daniel Tylka, Gavin Trogdon, and James K. Wahl. 2010. "Desmosomal Component Expression in Normal, Dysplastic, and Oral Squamous Cell Carcinoma." Research article. *Dermatology Research and Practice*. 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/649731>.
- Pichler, M., and G A Calin. 2015. "MicroRNAs in Cancer: From Developmental Genes in Worms to Their Clinical Application in Patients." *British Journal of Cancer* 113 (4): 569–73. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.253>.
- Schmitt, Christian J., Werner W. Franke, Sergij Goerdts, Berit Falkowska-Hansen, Steffen Rickelt, and Wiebke K. Peitsch. 2007. "Homo- and Heterotypic Cell Contacts in Malignant Melanoma Cells and Desmoglein 2 as a Novel Solitary Surface Glycoprotein." *The Journal of Investigative Dermatology* 127 (9): 2191–2206. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700849>.
- Schultz, Julia, Peter Lorenz, Gerd Gross, Saleh Ibrahim, and Manfred Kunz. 2008. "MicroRNA Let-7b Targets Important Cell Cycle Molecules in Malignant Melanoma Cells and Interferes with Anchorage-Independent Growth." *Cell Research* 18 (5): 549–57. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.45>.
- Schwarz, Juliane, Amma Ayim, Ansgar Schmidt, Stephanie Jäger, Sabine Koch, Renate Baumann, Anja A. Dünne, and Roland Moll. 2006. "Differential Expression of Desmosomal Plakophilins in Various Types of Carcinomas: Correlation with Cell Type and Differentiation." *Human Pathology* 37 (5): 613–22. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.01.013>.
- Takamizawa, Junichi, Hiroyuki Konishi, Kiyoshi Yanagisawa, Shuta Tomida, Hirotaka Osada, Hideki Endoh, Tomoko Harano, et al. 2004. "Reduced Expression of the Let-7

- microRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival." *Cancer Research* 64 (11): 3753–56. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0637>.
- Tennessen, Jason M., and Carl S. Thummel. 2008. "Let-7: Developmental Timing Conserved through Evolution." *Current Biology: CB* 18 (16): R707–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.013>.
- Tucker, Dana K., Sara N. Stahley, and Andrew P. Kowalczyk. 2014. "Plakophilin-1 Protects Keratinocytes from Pemphigus Vulgaris IgG by Forming Calcium-Independent Desmosomes." *The Journal of Investigative Dermatology* 134 (4): 1033–43. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.401>.
- Villaret, D. B., T. Wang, D. Dillon, J. Xu, D. Sivam, M. A. Cheever, and S. G. Reed. 2000. "Identification of Genes Overexpressed in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Using a Combination of Complementary DNA Subtraction and Microarray Analysis." *The Laryngoscope* 110 (3 Pt 1): 374–81. <https://doi.org/10.1097/00005537-200003000-00008>.
- Wolf, Annika, and Mechthild Hatzfeld. 2010. "A Role of Plakophilins in the Regulation of Translation." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (15): 2973–78. <https://doi.org/10.4161/cc.9.15.12446>.
- Wolf, Annika, Malgorzata Krause-Gruszczynska, Olaf Birkenmeier, Antje Ostareck-Lederer, Stefan Hüttelmaier, and Mechthild Hatzfeld. 2010. "Plakophilin 1 Stimulates Translation by Promoting eIF4A1 Activity." *The Journal of Cell Biology* 188 (4): 463–71. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908135>.
- Wolf, Annika, Katrin Rietscher, Markus Glaß, Stefan Hüttelmaier, Mike Schutkowski, Christian Ihling, Andrea Sinz, Aileen Wingenfeld, Andrej Mun, and Mechthild Hatzfeld. 2013. "Insulin Signaling via Akt2 Switches Plakophilin 1 Function from Stabilizing Cell Adhesion to Promoting Cell Proliferation." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 8): 1832–44. <https://doi.org/10.1242/jcs.118992>.
- Wulczyn, F. Gregory, Lena Smirnova, Agnieszka Rybak, Christine Brandt, Erik Kwidzinski, Olaf Ninnemann, Michael Strehle, Andrea Seiler, Stefan Schumacher, and Robert Nitsch. 2007. "Post-Transcriptional Regulation of the Let-7 microRNA during Neural Cell Specification." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (2): 415–26. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6130com>.
- Yi, R., and E. Fuchs. 2010. "MicroRNA-Mediated Control in the Skin." *Cell Death and Differentiation* 17 (2): 229–35. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.92>.
- Yi, Rui, Dónal O'Carroll, Hilda A. Pasolli, Zhihong Zhang, Fred S. Dietrich, Alexander Tarakhovskiy, and Elaine Fuchs. 2006. "Morphogenesis in Skin Is Governed by Discrete Sets of Differentially Expressed microRNAs." *Nature Genetics* 38 (3): 356–62. <https://doi.org/10.1038/ng1744>.
- Zhang, Baohong, Xiaoping Pan, George P. Cobb, and Todd A. Anderson. 2007. "microRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors." *Developmental Biology* 302 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028>.

Thesen

1. Plakophilin 1 ist als desmosomales Protein bekannt, weist in den Zellen aber neben dem desmosomalen auch einen zytoplasmatischen Pool auf. Der desmosomale Anteil wirkt tumorsuppressiv durch Erhöhung der Integrität des Gewebes und daraus resultierender Reduktion der Motilität der einzelnen Zelle. Damit kann eine potentielle Metastasierung verhindert werden. Der zytoplasmatische Pool wiederum kann als Onkogen fungieren, da die Akkumulation von Plakophilin 1 im Zytoplasma zur vermehrten Interaktion mit dem Translationsfaktor eIF4A1 und zur Steigerung der Proteinsynthese führt und es bei Kontrollverlust zu Verankerungs-unabhängigem Wachstum kommt.
2. Folglich ist die Kontrolle der Plakophilin 1 Expression wichtig für die Gewebemöostase. Eine „Feinregulation“ der Expression auf posttranskriptioneller Ebene erlaubt eine schnellere Anpassung als die transkriptionelle Regulation.
3. Gemäß der *in-silico*-Analyse besitzt die lange 3'UTR von Plakophilin 1 eine große Anzahl von potentiellen Bindungsstellen für microRNAs zur posttranskriptionellen Regulation.
4. Die anhand der Literaturrecherche und der *in-silico*-Analyse selektierten microRNAs let-7b, die mir-34a und die mir-200b zeigten in Mauskeratinozyten ein hohes endogenes Expressionslevel.
5. In einem pull-down Experiment mit der 3'UTR von Plakophilin 1 wurden die microRNAs let-7b und 34a angereichert, während für die mir-200b keine Anreicherung erzielt wurde.
6. In einem Luciferase-Reportergen-Assay wurde ein Effekt auf die Expression der 3'UTR von Plakophilin 1 sowohl für die let-7b als auch für die mir-34a validiert. Dabei führte eine Überexpression der jeweiligen microRNA zur Reduktion der Reportergen-Expression und eine Repression jeweils zum Anstieg der Luciferase-Expression.
7. Western Blot Analysen zeigten, dass die mir-34a auch das Proteinlevel von Plakophilin 1 in Mauskeratinozyten beeinflusst. Dabei wurde durch Überexpression der microRNA eine Abnahme der Proteinmenge und durch Repression eine Zunahme erzielt. Bei isolierter Beeinflussung der let-7b wurde kein Effekt auf das Proteinlevel beobachtet.

8. Es ist anzunehmen, dass eine isolierte Beeinflussung der let-7b durch die Mitglieder der großen let-7-Familie kompensiert werden kann. Eine Interaktion zwischen der let-7b und Plakophilin 1 ist somit anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen.
9. Die microRNAs let-7b und 34a gelten in der Literatur als tumorsupprimierende microRNAs. Somit ist anzunehmen, dass sie die potentiell onkogene Funktion des Plakophilin 1 beeinflussen, indem sie dessen zytoplasmatischen Pool kontrollieren.

Anlagen

Verwendete Geräte

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Durchführung der gezeigten Experimente die in Tabelle 4 aufgelisteten Geräte verwendet.

Gerät	Vertrieb
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments, Bad Grund, Deutschland
Durchflusszytometer MACS Quant Analyser	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kühlzentrifuge Sigma 2-16PK	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikroplattenlesegerät Infinite M1000 PRO	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Photometer Genequant 1300	GE Healthcare, München, Deutschland
iQ5-Cycler	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
SDS-PAGE-System Mini-Protean	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments, Bad Grund, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Bad Grund, Deutschland

Tbl. 4 Tabellarische Übersicht über verwendete Geräte; linke Spalte Gerätename, rechte Spalte Vertrieb

Verwendete Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Durchführung der gezeigten Experimente die in Tabelle 5 aufgelisteten Primär-Antikörper und die in Tabelle 6 aufgelisteten Sekundär-Antikörper verwendet.

Antikörper	Spezies/Typ	Verdünnung	Vertrieb
anti-beta-Aktin	Maus/monoklonal	1:2000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
anti-Plakophilin 1	Maus/monoklonal	1:500	Santa Cruz, Santa Cruz, Kalifornien, USA

Tbl. 5 Tabellarische Übersicht über verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Spezies/Typ	Verdünnung	Vertrieb
anti-Maus HRP	Ziege/polyklonal	1:10 000	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tbl. 6 Tabellarische Übersicht über verwendete Sekundär-Antikörper

Verwendete Kit-Systeme

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Durchführung der gezeigten Experimente die in Tabelle 7 aufgelisteten Kit-Systeme verwendet.

Kit-System	Vertrieb
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up System	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond Xtra EF Midi Purification System	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
RiboMAX Large Scale RNA Production System	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
MEGAclear Kit	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Dual Glo Luciferase Assay System	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
TaqMan MicroRNA Assays	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

Tbl. 7 Tabellarische Übersicht über verwendete Kit-Systeme; linke Spalte Kit-System, rechte Spalte Vertrieb

Verwendete microRNAs

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Durchführung der gezeigten Experimente die in Tabelle 8 aufgelisteten microRNAs verwendet.

microRNA	Sequenz 3' - 5'
let-7b	UUGGUGUGUUGGAUGAUGGAGU
let-7c	UUGGUAUGUUGGAUGAUGGAGU
200b	AGUAGUAA--UGGUCCGUCAUAAU
34a	UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU
34b	UGUUAGUCGAUUAUGUGACGGA
Kontrolle U6	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATT GGAACGATACAGAGAAGATTAGCATGGCCCCTGCGCAAG GATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCATATTT

Tbl. 8 Tabellarische Übersicht über verwendete microRNAs; linke Spalte microRNA, rechte Sequenz in 3'-5'-Richtung

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich diese 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, Dezember 2018

Laura-Jane Wendler

Erklärung über frühere Promotionsversuche

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

Halle/Saale, Dezember 2018

Laura-Jane Wendler

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld für die Überlassung dieses spannendes Themas, der sehr guten Betreuung und vor allem der Geduld, die sie mir über mehrere Jahre hinweg entgegen gebracht hat.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Hatzfeld für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die jederzeit unkomplizierte Zusammenarbeit. Hier möchte ich besonders Herrn Dr. Alexander Nolze und Frau Dr. Christina Kießling erwähnen, die mir stets mit Wissen und Erklärungen zur Seite standen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier und dessen Arbeitsgruppe für die freundliche Atmosphäre und die Unterstützung bei der dortigen Durchführung von Experimenten bedanken. Im Besonderen danke ich Frau Dr. Bianca Busch für die konstruktive Kritik und für die Hilfe bei der Auswertung der miR-TRAP-Ergebnisse.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie inklusive meiner Schwiegereltern in spe für den Rückhalt, die Motivation und die Unterstützung und vor allem danke ich meinen Eltern, dass sie mir das Studium der Humanmedizin und damit die Voraussetzung für diese Promotion ermöglicht haben.