

Untersuchung der molekularen Funktion des Stammzellfaktors Trim71 in der Karzinogenese

-Dissertation-

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Karin Schneider
aus Simmern (Hunsrück)

Bonn, November 2014

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hoch

Tag der Promotion: 21.04.2015

Erscheinungsjahr: 2015

Konferenzbeiträge:

Karin Schneider, Sibylle Mitschka, Tobias Goller, Waldemar Kolanus (2011). Trim71, a required protein for embryonic development and cell differentiation.

Posterbeitrag zum Jahrestreffen des Bonner Forum Biomedizin (BFB) in Bonn 2011

Karin Schneider, Sibylle Mitschka, Tobias Goller, Waldemar Kolanus (2012). Role of a microRNA-regulating ubiquitin E3 ligase in the embryonic development of the mouse.

Vortrag und Posterbeitrag zum 11. Joint Symposium zwischen der Universität Bonn und der Waseda Universität in Tokio, Japan 2012

ausgezeichnet mit dem "Best Poster Award"

Sibylle Mitschka, Karin Schneider, Tobias Goller, Waldemar Kolanus (2012). Regulation of cell differentiation programming by Trim71 in mammalian development and in tumors.

Posterbeitrag zum internationalen Symposium des SFB 832 in Bad Neuenahr 2012

Karin Schneider, Tobias Bald, Waldemar Kolanus (2014). Role of the let-7 target Trim71 in tumor formation and tumor progression.

Posterbeitrag zum Jahrestreffen des Bonner Forum Biomedizin (BFB) in Bad Honnef 2014

Karin Schneider, Tobias Bald, Thomas Quast, Joachim Schultze, Waldemar Kolanus (2014). Cell autonomous, immunological reprogramming of a skin tumor microenvironment by the stem cell factor Trim71.

Posterbeitrag zur 44. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI) in Bonn 2014

Karin Schneider, Tobias Bald, Thomas Quast, Joachim Schultze, Waldemar Kolanus (2014). Cell autonomous, immunological reprogramming of a skin tumor microenvironment by the stem cell factor Trim71.

Vortrag zum 2. Science Day des Exzellenzcluster Immunosensation in Bonn 2014

ausgezeichnet mit dem Preis für eine hervorragende Präsentation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	RNA-Interferenz	1
1.2	Biogenese von miRNAs	1
1.3	Die miRNA let-7	3
1.4	Let-7 inhibiert Lin-41	4
1.5	Die Trim-Proteinfamilie	5
1.5.1	Die RING-Domäne	5
1.5.2	Die B-Box-Domäne	5
1.5.3	Die Coiled-Coil-Domäne	5
1.5.4	Die C-terminale Region	6
1.5.5	Die Trim-NHL-Proteinfamilie	6
1.6	Trim71 als Regulator der Embryonalentwicklung	7
1.7	Funktionelle und molekulare Wirkungsweise von Trim71 in der Zelle	7
1.8	Let-7 als Tumorsuppressor	10
1.9	Modelle der Tumorentstehung	11
1.10	Die Haut als Modellsystem zur Untersuchung von Krebs	12
1.10.1	Der Aufbau der Haut	12
1.10.2	Epidermale Stammzellen	13
1.10.3	Chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese	14
1.11	Ursachen der Krebsentstehung und Epigenese	15
2	Material und Methoden	18
2.1	Geräte	18
2.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.3	Chemikalien	20
2.4	Enzyme	22
2.5	Kommerzielle Reaktionssysteme (Kits)	22
2.6	Zellkulturmedien- und Zusätze	22
2.7	Längenstandards	23
2.8	Plasmide	23
2.9	Antikörper	24
2.9.1	primäre Antikörper	24
2.9.2	sekundäre Antikörper	25

2.10 Oligonukleotide	25
2.10.1 Klonierungsprimer	25
2.10.2 Genotypisierungsprimer	26
2.10.3 qPCR Primer	27
2.10.4 TaqMan-Sonden	28
2.11 Organismen	28
2.12 Molekularbiologische Methoden	28
2.12.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.12.2 Agarosegelelektrophorese	29
2.12.3 Fällung des PCR-Produktes und DNA-Aufreinigung	29
2.12.4 Restriktionsverdau von DNA	30
2.12.5 Ligation	30
2.12.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien	30
2.12.7 DNA-Minipräparation	30
2.12.8 DNA-Maxipräparation	31
2.12.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.12.10 Isolation von RNA aus Zellen	32
2.12.11 Isolation von RNA aus geringer Anzahl an Zellen ($<1 \times 10^6$)	32
2.12.12 DNaseI-Verdau isolierter RNA	33
2.12.13 cDNA-Synthese	33
2.12.14 cDNA Synthese zum Nachweis von miRNAs	33
2.12.15 quantitative Real-Time PCR (qPCR)	34
2.13 Zellbiologische Methoden	36
2.13.1 Auftauen, Passagieren und Einfrieren von Zellen	36
2.13.2 Bestimmung der Zellzahl	37
2.13.3 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat	37
2.13.4 Transiente Transfektion mittels Fugene HD	38
2.13.5 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung kultivierter Zellen	38
2.13.6 Stabile Transfektion	38
2.13.7 MTT-Proliferationstest	39
2.13.8 Zellsynchronisierung	39
2.13.9 Durchflusszytometrie (FACS)	40
2.13.10 Isolation und kurzzeitige Kultivierung primärer Keratinozyten aus neugeborenen Mäusen	41
2.13.11 Untersuchung der Proliferation mittels Ethynyldeoxyuridin (EdU)	41
2.13.12 Isolation primärer Keratinozyten aus adulter muriner Epidermis	42
2.13.13 Isolation epidermaler Stammzellen mittels magnetischer Zellsepara- tion (MACS)	42
2.13.14 Isolation und indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von <i>Whole-</i> <i>Mount</i> -Präparaten muriner Epidermis	43

2.14	Proteinbiochemische Methoden	43
2.14.1	Herstellung von Zellysaten	43
2.14.2	BCA-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung	44
2.14.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
2.14.4	Proteintransfer (Western-Blot)	45
2.14.5	Immundetektion einzelner Proteine	46
2.14.6	Blot-Regeneration	46
2.14.7	Coimmunpräzipitation	46
2.14.8	RNA-Immunopräzipitations-Microarray (RIP-Chip)	47
2.15	Histologische Methoden	50
2.15.1	Fixierung, Einbettung und Herstellung von Gewebeschnitten	50
2.15.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)	50
2.15.3	Untersuchung der Proliferation <i>in vivo</i> mittels Bromdesoxyuridin (BrdU)	50
2.16	Tierexperimentelle Methoden	51
2.16.1	Mausstämme, Zucht und Haltung	51
2.16.2	Alkalische DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen und Genotypi- sierung	51
2.16.3	Induktion epidermaler Hyperplasie mittels TPA	52
2.16.4	Chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese der murinen Epidermis	52
3	Ergebnisse	54
3.1	Trim71 interagiert mit dem RISC-Protein Argonaute 2 (Ago2)	54
3.2	Trim71 ist in P-Bodies lokalisiert	55
3.3	Überexpression von Trim71 in HEK293T-Zellen führt zur verminderten Ex- pression der miRNA let-7a	56
3.4	Identifizierung neuer Trim71-Zielgene mittels RIP-Chip	59
3.4.1	Generierung stabiler Zelllinien	59
3.4.2	RIP-Chip-Analyse	61
3.5	Die Expression von Trim71 und UBE2C korreliert in verschiedenen embryo- nalen Karzinomzelllinien	66
3.6	Überexpression von Trim71 führt zur Erhöhung der Proliferation in HEK293- Zellen	68
3.7	Überexpression von Trim71 führt zur Herunterregulierung des UBE2C-Zielgens Geminin	69
3.8	Trim71 interagiert nicht mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym UBE2C	71
3.9	Überexpression von Trim71 hat keinen Einfluss auf die Expression von c- Myc und p53 in HEK293-Zellen	73
3.10	Generierung einer adulten Trim71 Knockout-Maus	76
3.10.1	Generierung einer hautspezifischen Trim71 Knockout-Maus	76
3.10.2	Trim71 wird in CD34 ⁺ -Stammzellen der adulten Haut exprimiert	77

3.10.3	K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp	79
3.10.4	Die epidermale Stammzellnische bleibt durch den Knockout von Trim71 unverändert	80
3.11	Das Fehlen von Trim71 führt zur Reduktion TPA-induzierter Akanthose in der Haut	81
3.12	K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} -Mäuse sind partiell gegen DMBA/TPA-induzierte Kar- zinogenese geschützt	85
3.12.1	K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} -Mäuse zeigen einen verzögerten Beginn der Tu- morbildung nach DMBA/TPA-Behandlung	85
3.12.2	K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} -Mäuse zeigen eine reduzierte Anzahl an Papil- lomen nach DMBA/TPA-Behandlung	86
3.12.3	Das Fehlen von Trim71 führt zu einer Verminderung der Tumorgroße nach DMBA/TPA-Behandlung	87
3.12.4	Keratinozyten aus K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} -Papillomen zeigen eine ver- ringerte Proliferation	90
3.12.5	Trim71 wird in Papillomen von Trim71 ^{fl/fl} -Mäusen hochreguliert	91
3.12.6	Die Expression potentieller Trim71-Zielgene ist unverändert in Pa- pillomen von K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} -Mäusen	92
3.13	Trim71 reguliert das immunologische Mikromilieu der Haut	93
4	Diskussion	101
4.1	Trim71 als Regulator der miRNA-Prozessierung	101
4.1.1	Die Interaktion von Trim71 mit dem RISC-Protein Ago2	102
4.1.2	Trim71 als Regulator der miRNA let-7	102
4.2	Identifizierung neuer Trim71-Zielgene	104
4.2.1	UBE2C als neues Zielgen von Trim71	105
4.3	Einfluss von Trim71 auf die Zellproliferation	106
4.4	Die Rolle von Trim71 in der Krebsentstehung	106
4.4.1	Der epidermale Knockout von Trim71 zeigt keinen Phänotyp	107
4.4.2	Trim71 als Promotor der Karzinogenese	108
4.4.3	Stat3 als mögliches Trim71-Zielgen	110
4.5	Epigenetischer Einfluss von Trim71 auf die Genexpression in der Haut	112
4.6	Ausblick	113
4.7	Fazit	114
5	Zusammenfassung	115
	Abkürzungsverzeichnis	117
	Literaturverzeichnis	120
	Danksagung	139

Anhang	141
Liste der IP spezifisch herunterregulierten Gene	141
Liste der IP spezifisch hochregulierten Gene	142
Liste der regulierten Gene in epidermalen Zellen nach TPA-Behandlung	143

1 Einleitung

Im Jahr 2006 ging der Nobelpreis für Medizin an den Forscher Craig Mello von der Harvard-Universität in Boston und seinem Kollegen Andrew Fire vom MIT in Cambridge, für die Entdeckung eines neuen Mechanismus zur Stilllegung von Genen, die sogenannte RNA-Interferenz [42]. Zuerst aufmerksam wurde man auf dieses Phänomen in Pflanzen bei dem Versuch, die Blütenfarbe von Petunien zu intensivieren. Napoli und Kollegen versuchten dies, indem sie ein chimäres Enzym der Chalconsynthase in die Pflanzen integrierten und hofften so die Biogenese der Anthocyane anzuregen [124]. Das Gegenteil war jedoch der Fall. Die meisten der genetisch veränderten Pflanzen waren weniger stark gefärbt als unbehandelte. Einige Blüten bildeten gar keine Farbstoffe mehr und waren komplett weiß. Über den Mechanismus dieser “reversiblen Cosuppression” konnte zum damaligen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Erst die mit dem Nobelpreis ausgezeichnete Arbeit von Fire und Mello aus dem Jahr 1998 brachte Aufklärung [42]. Sie injizierten dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* verschiedene RNA-Varianten und entdeckten, dass bei höheren Organismen doppelsträngige RNA für den Inaktivierungseffekt sorgt. Ein System, das sie RNA-Interferenz nannten. Wie genau dieser Mechanismus funktioniert wird im Folgenden erläutert.

1.1 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher Mechanismus in Zellen, der dem sequenzspezifischen Abschalten von Genen dient [88]. Dieser sehr wirksame Prozess der posttranskriptionellen Inhibition der Genexpression (*posttranscriptional gene silencing* (PTGS)) ist in Eukaryoten evolutionär stark konserviert und stellt einen Schutzmechanismus der Zelle gegen zellfremde RNA (z. B. Virus-RNA) dar [131]. RNAi spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Entwicklung und in der Kontrolle der Zelldifferenzierung und -proliferation. Dabei binden sogenannte microRNAs (miRNAs) an die mRNA des Zielgens und führen so zu einem Abbau der mRNA oder zu einer Blockade der Translation, was schließlich zu einer verminderten Menge an Protein in der Zelle führt.

1.2 Biogenese von miRNAs

MiRNAs sind kurze (20-23 Nukleotide), nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs, die die Genexpression regulieren [6]. Ihre Biogenese (siehe Abbildung 1.1) beginnt im Zellkern, wo sie entweder von ihren eigenen Genen oder aus nicht-kodierenden Bereichen (Introns)

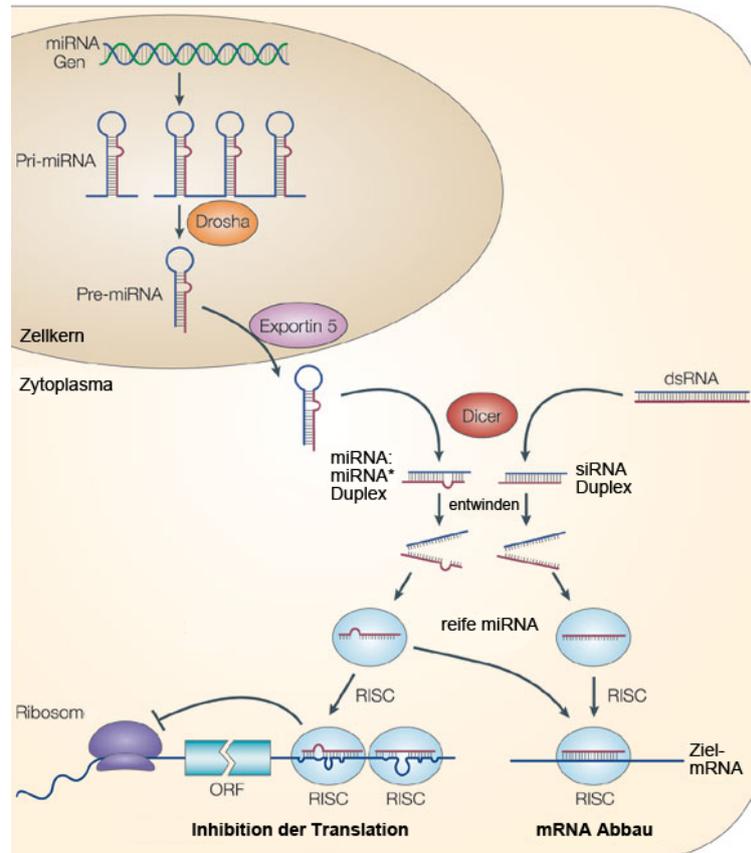


Abbildung 1.1: DIE BIOGENESE VON MIRNAS. Im Zellkern werden die primären miRNAs (pri-miRNA) durch die Ribonuklease Drosha in ca. 70 Nukleotid lange pre-miRNAs gespalten. Die pre-miRNAs werden mit Hilfe von Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert und dort durch eine weitere Ribonuklease Dicer in doppelsträngige miRNAs (miRNA:miRNA* Duplex) prozessiert. Dicer kann außerdem von außen eingebrachte doppelsträngige RNA Moleküle (dsRNA) in siRNAs (*small interfering RNAs*) spalten. Nur einer der entstandene miRNA- oder siRNA-Stränge wird vorzugsweise von dem Ribonukleoproteinkomplex RISC gebunden und zur Ziel-mRNA transportiert. Abhängig von der Stärke der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA wird entweder die Translation inhibiert oder die mRNA abgebaut. (ORF: *open reading frame*, offener Leserahmen). Abbildung modifiziert nach He *et al.*, 2004 [64].

fremder Gene transkribiert werden. Dabei entstehen primäre Transkripte, die sogenannten pri-miRNAs, die durch Anlagerung komplementärer Basenpaare mehrere Haarnadelstrukturen ausbilden. Diese werden durch die Ribonuklease Drosha in kürzere Vorläufer (*precursor*) miRNAs (pre-miRNA), die aus 65-70 Nukleotiden und nur noch einer Haarnadelstruktur bestehen, geteilt [94]. Mit Hilfe des Exportrezeptors Exportin 5 werden die pre-miRNAs aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert [188]. Dort werden die Haarnadelstrukturen von dem RNase-III-Enzym Dicer erkannt und zu doppelsträngigen miRNAs prozessiert. Durch Bindung des RNA-Bindeproteins TRBP an Dicer kann der miRNA-Duplex entwunden werden. Es entsteht die reife miRNA und ein dazu komplementärer RNA-Strang, der im als RISC (*RNA induced silencing complex*) bezeichneten Ribonukleoprotein-Komplex abgebaut wird [30]. Der RISC-miRNA-Komplex bindet an die mRNA des Zielgens und kann die Expression des Zielgens über zwei verschiedene Mechanismen regulieren: Ist die miRNA exakt komplementär zu der mRNA, so wird die mRNA

durch Argonaute 2 (Ago2), der katalytisch aktiven Komponente des RISC-Komplex gespalten [116]. Sind miRNA und mRNA nicht exakt komplementär wird die Translation gehemmt [112]. Die zweite Art der Regulation kommt weitaus häufiger vor und erklärt weshalb eine einzige miRNA viele verschiedene Gene regulieren kann.

1.3 Die miRNA let-7

Die miRNA let-7 wurde im Jahr 2000 als eine der ersten miRNAs in einer Studie über die zeitliche Entwicklung des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) entdeckt [139]. Der Begriff miRNA war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht bekannt und let-7 wurde als heterochrones Gen bezeichnet, das zu einer bestimmten Entwicklungsphase von *C. elegans* exprimiert wird. Mutationen in diesem Gen führen zu schweren Entwicklungsstörungen und letztlich zum Tod des Fadenwurms. Aufgrund dieses Phänotyps wurde der Name let-7, wobei let für letal (tödlich) steht, abgeleitet. Kurze Zeit später konnte man durch *in silico* Analysen let-7 in weiteren Spezies mit exakt gleicher Sequenz nachweisen [135]. Die mature Form von let-7 ist im Tierreich hoch konserviert [139]. Im menschlichen Genom umfasst die let-7-Familie 13 Gene aus denen 10 verschiedene reife miRNAs entstehen (let-7a-g, let-7i, miR-98 und miR-202) [145]. Die von let-7 gesteuerten Funktionen umfassen die Stammzellendifferenzierung in *C. elegans* [139], die Entwicklung der Extremitäten in Huhn und Maus [90], sowie die Zellproliferation und Differenzierung [63]. Let-7 wird in nahezu allen differenzierten Zellen exprimiert. In Stammzellen und undifferenzierten Vorläuferzellen ist let-7 kaum nachweisbar [71]. Hier wird die Prozessierung der muren miRNA durch den Stammzellmarker Lin28 inhibiert (siehe Abbildung 1.2) [174].

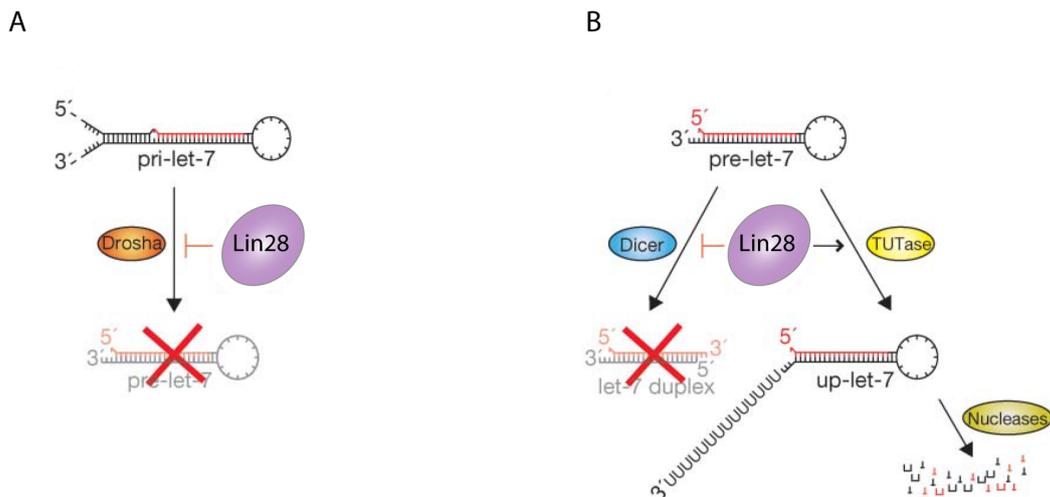


Abbildung 1.2: LIN28 INHIBIERT DIE BIOGENESE VON LET-7. Die Reifung der miRNA let-7 wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen unterdrückt. A) Lin28 inhibiert die Drosha-vermittelte Prozessierung von pri-let-7. B) Lin28 rekrutiert die terminale Uridyltransferase (TUTase) TUT4, die pre-let-7 uridyliert (up-let-7) und zu deren Abbau führt. Abbildung übernommen aus Winter *et al.*, 2009 [184].

Dabei blockiert Lin28 entweder die Drosha-abhängige Prozessierung von pri-let-7 in pre-let-7 (1.2 A) oder Lin28 bindet an pre-let-7 und rekrutiert die terminale Uridyltransferase (TUTase) TUT4 (1.2 B) [68]. TUT4 uridyliert das 3'-Ende der pre-miRNA, wodurch keine Prozessierung durch Dicer möglich ist und diese abgebaut wird.

Im Verlauf der Differenzierung verringert sich die Expression von Lin28, wodurch die Menge an maturen let-7 miRNAs erhöht wird [173]. Let-7 blockiert die Expression von Genen, die wichtig für die Selbsterneuerung der Zellen sind (z. B. HMGA2), was zur terminalen Differenzierung führt (siehe Abbildung 1.3).

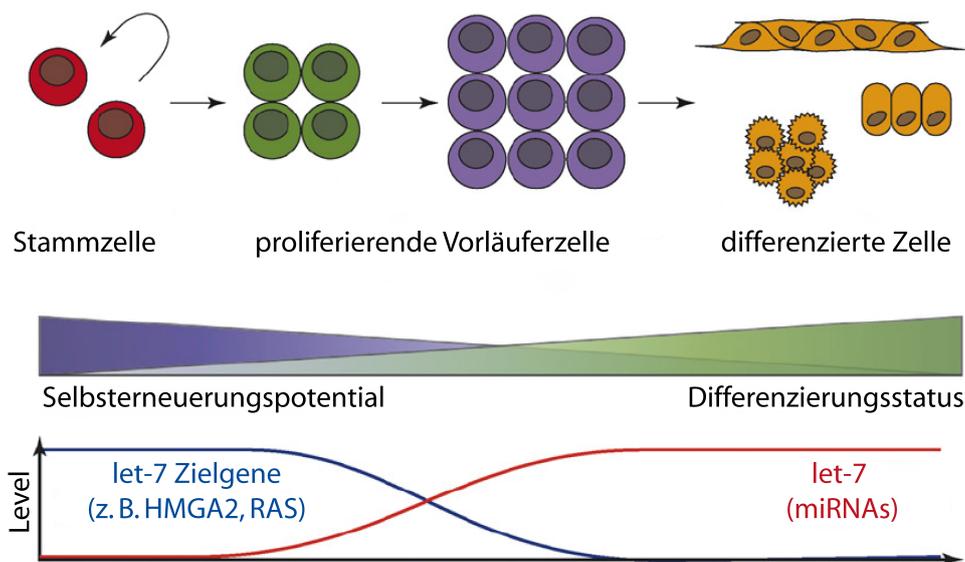


Abbildung 1.3: EXPRESSION VON LET-7 IM VERLAUF DER DIFFERENZIERUNG. In Stammzellen wird die Maturierung von let-7 durch den Stammzellofaktor Lin28 inhibiert. Stammzellen weisen außerdem eine hohe Expression weiterer let-7-Zielgene wie HMGA2 und RAS auf. Diese spielen wie Lin28 eine wichtige Rolle in der Selbsterneuerung der Stammzellen. Während der Differenzierung sinkt die Expression von Lin28, wodurch die Level an let-7 erhöht werden. Let-7 blockiert die Expression seiner Zielgene und führt so zur Differenzierung der Zelle. Abbildung modifiziert nach Büssing *et al.*, 2008 [19].

1.4 Let-7 inhibiert Lin-41

Zeitgleich mit der Entdeckung der miRNAs wurde das erste let-7-Zielgen, Lin-41 in *C. elegans* gefunden [155]. Lin-41 Mutationen führen zu Unfruchtbarkeit und Störungen in der Entwicklung der Hypodermis, die sich durch eine verfrühte terminale Differenzierung der Saumzellen auszeichnen. Die Überexpression von lin-41 hat interessanterweise den gleichen Phänotyp, den man bei einer gewebsspezifischen Deletion des let-7-Gens in den Saumzellen beobachtet. Er zeichnet sich durch eine Verzögerung der terminalen Differenzierung der Saumzellen aus. Später konnte gezeigt werden, dass let-7 den 3' untranslatierten Bereich (3'UTR) von lin-41 bindet und dadurch die Translation des Proteins inhibiert [170].

1.5 Die Trim-Proteinfamilie

Vorhersagen der Domänenstruktur des Lin-41 Proteins führten zur Beschreibung einer neuen Klasse sogenannter RBCC-Proteine [156]. RBCC steht dabei als Abkürzung für die drei charakteristischen Domänen dieser Proteinfamilie: RING, B-Box und Coiled-Coil. Diese drei aufeinander folgenden Proteindomänen führten zur Einführung des Akronyms Trim (*tripartite motif*) für die Proteinfamilie [140]. Die Trim-Proteinfamilie ist eine funktionell heterogene Gruppe von Proteinen und umfasst derzeit mehr als 70 Mitglieder [118].

1.5.1 Die RING-Domäne

Die RING-Domäne ist definiert als eine Aufreihung mehrerer Cystein- und Histidin-Reste, in deren Zentrum zwei Zinkatome gebunden sind [44]. Sie ist in die Ubiquitin-abhängige Degradation von Proteinen involviert, da die RING-Domäne der Hauptbestandteil vieler E3-Ubiquitin Ligasen ist [76]. Bei der Ubiquitinierung von Proteinen muss Ubiquitin zunächst in einem energieabhängigen Schritt durch Bindung an ein E1-Enzym aktiviert werden. Im zweiten Schritt wird das Ubiquitin auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) überführt und schließlich mit Hilfe der E3-Ligase auf das Substrat übertragen. Dabei bindet die E3-Ligase sowohl das E2-Enzym als auch das Zielprotein. Normalerweise führt die Ubiquitinierung von Proteinen zu deren proteasomalen Abbau. Je nach Art der Ubiquitinierung kann es jedoch auch zur Stabilisierung des Proteins führen oder dessen Lokalisation in der Zelle verändern [149].

1.5.2 Die B-Box-Domäne

Im Gegensatz zur RING-Domäne ist die B-Box-Domäne einzigartig für Trim-Proteine. Sie hat die Eigenschaften einer Zinkfingerdomäne und ist häufig mit einer RING-Domäne assoziiert [187]. Die B-Box-Domäne kann in zwei verschiedenen Varianten auftreten (B-Box 1 und B-Box 2), deren genaue Funktionen bisher unbekannt sind [140].

1.5.3 Die Coiled-Coil-Domäne

Das Coiled-Coil-Proteinmotiv besteht aus zwei bis fünf umeinander gewundenen α -Helices, die durch eine Aneinanderreihung mehrerer Aminosäureheptaden in der Primärsequenz des Proteins gebildet werden [31]. In Position eins und vier sind in aller Regel hydrophobe Aminosäuren wie Leucin, Valin und Isoleucin zu finden. Sie liegen dicht beieinander, so dass sie eine Art unpolares Band auf der α -Helix bilden, welches mit dem der zweiten Helix über hydrophobe Wechselwirkungen und van-der-Waals-Kräfte dimerisieren kann. Stabilisiert wird das Dimer durch ionische Wechselwirkungen der polaren Aminosäuren an Stelle fünf und sieben [115]. Die Coiled-Coil-Domäne der Trim-Proteine ist hauptsächlich für die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren verantwortlich, die zur Entstehung hochmolekularer Komplexe führt [140].

1.5.4 Die C-terminale Region

Je nach C-Terminus der Trim-Proteine werden diese in verschiedene Klassen unterteilt. Lin-41 gehört zur Trim-NHL-Proteinfamilie (siehe Abbildung 1.4), dessen C-Terminus aus einer putativen Filaminbindestelle und sechs aufeinander folgenden NHL-Domänen besteht. NHL ist benannt nach den drei Proteinen in denen diese Domäne zuerst gefunden wurde: NCL-1, HT2A und Lin-41. Jede NHL-Domäne besteht aus 44 Aminosäuren, die zusammen eine sechsblättrige Propellerstruktur ausbilden [156].

1.5.5 Die Trim-NHL-Proteinfamilie

Abbildung 1.4 zeigt eine Übersicht über die Trim-NHL-Proteinfamilie, die aus vier (*D. melanogaster* und *M. musculus*) bzw. fünf (*C. elegans*) Mitgliedern besteht. Die Orthologe zu Lin-41 heißen Wech (*D. melanogaster*) und Trim71 (*M. musculus* und *H. sapiens*). Wech wurde nach seinem Phänotyp in der Fruchtfliege benannt, da homozygote Wech-Mutanten eine Ablösung der Muskeln von der umliegenden Matrix zeigen. Wech interagiert direkt mit ILK (Integrin-linked Kinase) und Talin und ist so für die integrinabhängige Muskelanlagerung verantwortlich [105]. Alle Lin-41 Orthologe sind hochkonserviert, was sich unter anderem in ihrer Regulation über let-7 zeigt. So wurde beschrieben, dass let-7 auch die Lin-41 Orthologe aus der Fruchtfliege [133], dem Zebrafisch [87], der Maus [80, 147], dem Huhn [80] und dem Menschen [99] inhibiert. Die hohe Konservierung spiegelt sich auch in einer zu 90 % übereinstimmenden Aminosäuresequenz des murinen und humanen Trim71 wider.

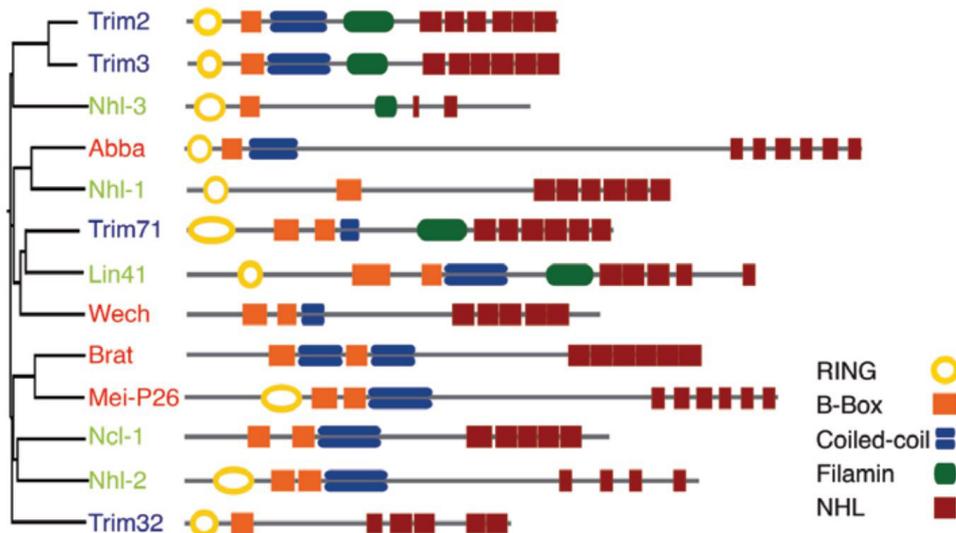


Abbildung 1.4: ÜBERSICHT ÜBER DIE TRIM-NHL-PROTEINFAMILIE. Fast alle Mitglieder der Trim-NHL-Proteinfamilie enthalten die charakteristischen Domänen, RING, B-Box, Coiled-Coil und NHL. Dabei kann die Anzahl der einzelnen Domänen variieren. *C. elegans* Proteine sind in grün, *D. melanogaster* Proteine in rot und *M. musculus* Proteine in blau dargestellt. Abbildung übernommen aus Wulczyn *et al.*, 2011 [187].

1.6 Trim71 als Regulator der Embryonalentwicklung

Die ersten Studien über das Wirbeltierortholog Trim71 aus der Trim-NHL-Proteinfamilie, beschäftigten sich hauptsächlich mit dessen Rolle in der embryonalen Entwicklung von Huhn und Maus. Drei unabhängige Arbeitsgruppen klonierten das Trim71-Gen aus Huhn, Maus und Mensch und analysierten die Expressionsmuster der mRNA mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen [80, 90, 150]. Dabei stellte sich heraus, dass die Expression von Trim71 zeitlich begrenzt und umgekehrt proportional zur Expression der miRNAs miR-125 und let-7 ist [150, 90]. In *C. elegans* wird Lin-41 in Neuronen, Gonaden und im Muskel exprimiert [155]. Im Huhn konnte die Expression im Muskel bestätigt werden. Außerdem wurde in allen drei Veröffentlichungen eine starke Expression von Trim71 in den sich entwickelnden Extremitäten beschrieben, die im Verlauf der Entwicklung zurückgeht. Passend dazu führten Mutationen in Genen, die wichtig für die Extremitätenentwicklung sind (Sonic hedgehog (SHH), FGF8 und Gli3) zu einer verminderten Trim71 Expression [90]. Trim71 wird demnach in der embryonalen Entwicklung durch den Hedgehog- und den FGF-Signalweg aktiviert. Durch die Generierung einer Trim71 Knockout-Maus im Jahr 2008 konnte gezeigt werden, dass Trim71 für die Morphogenese des Zentralnervensystems notwendig ist [108]. Die homozygote Zerstörung des Trim71 Gens ist embryonal letal. Die Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung zwischen den Entwicklungsstadien E10.5 und E11.5. Der auffälligste Phänotyp ist ein Defekt im Neuralrohrschluss, der zum ersten Mal an Tag E9.5 erkennbar wird. In diesem Stadium ist das Neuralrohr in Wildtyp-Embryonen vollständig geschlossen, während in Knockout-Tieren die Neuralfalten noch gut sichtbar sind. Im Gegensatz zum Rest des Körpers, der im Knockout viel kleiner ist, hat der Kopf eine normale Größe. Der Neuralrohrdefekt scheint nicht für den Tod der Embryonen zu einem so frühen Stadium verantwortlich zu sein, da es gut untersuchte Beispiele für Mäuse mit Neuralrohrdefekt gibt, die fähig sind bis in die späte Embryogenese oder gar bis nach der Geburt zu überleben [32]. Die genaue Todesursache ist bislang ungeklärt.

1.7 Funktionelle und molekulare Wirkungsweise von Trim71 in der Zelle

Nach der detaillierten Beschreibung des embryonalen Phänotyps von Trim71^{-/-}-Mäusen, beschäftigten sich die darauf folgenden Veröffentlichungen mehr und mehr mit der molekularen Rolle von Trim71 in der Zelle und beschrieben neue Proteine und mRNAs, die direkt von Trim71 reguliert werden. Rybak *et al.* konnten die Expression von Trim71 in mehreren Stammzellnischen nachweisen, dazu gehören das embryonale Ektoderm, die Basalzellschicht der Epidermis und männliche Keimzellen [147]. Dort kolokalisiert Trim71 mit den miRNA-Prozessierungsproteinen Ago2, Mov10 und Tnrc6b in den sogenannten "*processing bodies*" (P-Bodies). Diese Aggregate im Zytoplasma eukaryotischer Zellen werden aus Enzymen, die für den mRNA-Abbau benötigt werden, gebildet. Des Weiteren konnten Rybak

und Kollegen zeigen, dass Trim71 nicht nur durch let-7 herunterreguliert wird, sondern selbst über eine negative Rückkopplungsschleife zum Abbau von let-7 führt [147]. Der Abbau von let-7 erfolgt dabei indirekt über die Kontrolle der Stabilität von Ago2 durch die E3-Ubiquitinligaseaktivität von Trim71 (siehe Abbildung 1.5 A). Trim71 polyubiquitiniert Ago2, was zu einem proteasomalen Abbau des Proteins samt gebundener miRNA let-7 führt [147]. Somit scheint Trim71 zusammen mit dem Pluripotenzfaktor Lin28 die Aktivität von let-7 in Stammzellen zu unterdrücken und wirkt als wichtiger Effektor im Übergang von Lin28- zu let-7-Expression im Verlauf der Differenzierung [39]. Zudem könnte dieser Mechanismus auch erklären, warum Stammzellen generell eine verringerte Expression an miRNAs im Vergleich zu differenzierten Zellen zeigen [61]. Obwohl die Bindung [28, 104, 26] und Ubiquitinierung [104] von Ago2 durch Trim71 in mehreren unabhängigen Studien bestätigt werden konnte, bleibt die funktionelle Auswirkung dieser Interaktion ungeklärt. So konnten keine Unterschiede in der Stabilität von Ago2 nach Trim71 Knockdown in murinen, embryonalen Stammzellen (mESC) [26] oder nach Überexpression von Trim71 in der Nierenzelllinie HEK293 [104] beobachtet werden. Des Weiteren war auch die Menge an Ago2 in einer Trim71 überexprimierenden neuronalen Vorläuferzelllinie im Vergleich zu Wildtyp-Zellen unverändert [28]. Vor allem zeigten neuronale Vorläuferzellen von Wildtyp- und Trim71^{-/-}-Mäusen ein gleiches Ago2-Ubiquitinierungsmuster *in vivo* [28].

Da die Regulation von Ago2 durch Trim71 bisher nur in artifiziellen Systemen mit transformierten Zelllinien gezeigt werden konnte [147, 29], scheint die Ubiquitinierung von Ago2 und die dadurch verminderte, weitreichende miRNA-Aktivität kein generelles Phänomen zu sein, das von Trim71 beeinflusst wird [39].

J. Chen und Kollegen konnten im Jahr 2012 zeigen, dass Trim71 das Shc-SH2-Bindeprotein 1 (SHCBP1) in murinen, neuronalen Vorläuferzellen bindet und ubiquitiniert [28]. In diesem Fall führt die Ubiquitinierung jedoch zu einer Stabilisierung des Proteins und nicht wie im Fall von Ago2 zum proteasomalen Abbau (siehe Abbildung 1.5 B). Die Expression von SHCBP1 nimmt genau wie die von Trim71 während der neuronalen Differenzierung ab. Außerdem scheint SHCBP1 ein positiver Regulator des FGF-Signalweges in neuronalen Vorläuferzellen zu sein, da der Knockdown von SHCBP1 zu einer verminderten Phosphorylierung/Aktivierung der FGF-Effektorproteine ERK und AKT führt [28], was auch *in vivo* in neuroepithelialen Zellen aus Trim71^{-/-}-Mäusen gezeigt werden konnte. Schon vorher war bekannt, dass die Aktivierung des FGF-Signalweges die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen fördert und die frühzeitige Differenzierung inhibiert [56], gleiches konnte nun für Trim71 gezeigt werden. Somit scheint die Hauptaufgabe von Trim71 während der Embryogenese und vor allem während des Neuralrohrschlusses die Aktivierung des FGF-Signalweges zu sein, um so Zellproliferation und -differenzierung zu kontrollieren. Kurze Zeit später wurde in zwei folgenden, unabhängigen Publikationen eine weitere molekulare Funktion von Trim71 neben der Ligaseaktivität gezeigt (siehe Abbildung 1.5 C). Trim71 wurde als mRNA bindendes Protein beschrieben, das zur translationellen Inhibition und schließlich zum Abbau von Ziel-mRNAs führt und so die Proliferation in

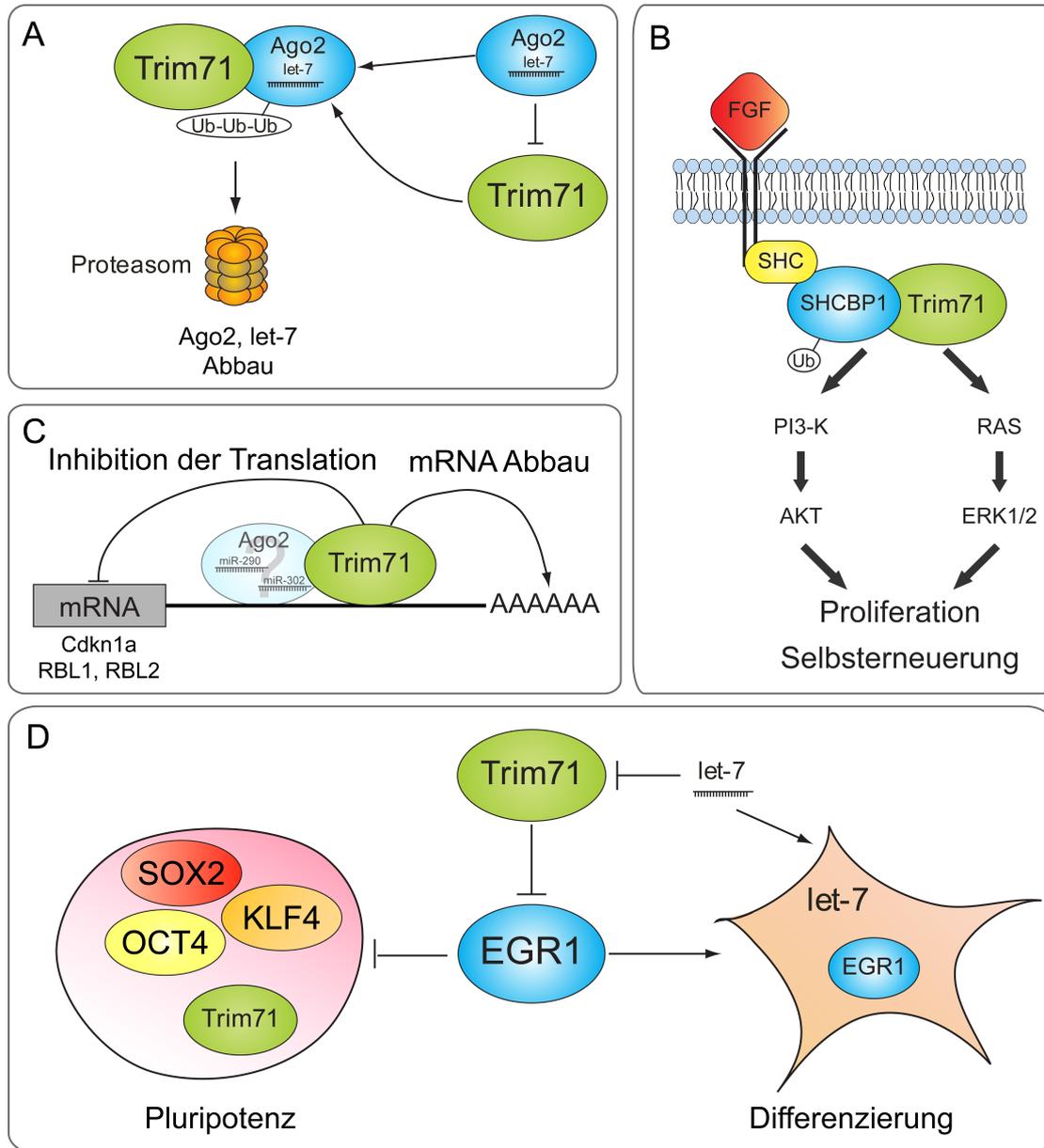


Abbildung 1.5: MÖGLICHE FUNKTIONEN VON TRIM71 IN DER ZELLE. A) Trim71 ubiquitiniert Ago2, wodurch Ago2 mit gebundenen miRNAs proteasomal abgebaut wird, was zu einer verringerten miRNA-Aktivität in der Zelle führt. [147] B) Durch Ubiquitinierung von SHCBP1 durch Trim71 wird der FGF-Signalweg aktiviert. In Folge dessen wird die Proliferationsrate gesteigert und die prämatüre Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen inhibiert. [28] C) Trim71 ist ein mRNA-Bindeprotein, das den Abbau von mRNAs fördert und deren Translation inhibiert. Als mögliche Ziel-mRNAs wurden u.a. Cdkn1a, RBL1 und RBL2 beschrieben, deren Herunterregulation zu einer Verstärkung der Proliferation in ES-Zellen führt. [26, 104] D) Trim71 fördert durch Inhibition von EGR1 die Reprogrammierung von dermalen Fibroblasten in induzierte pluripotente Stammzellen [186]. Abbildung adaptiert nach Dück und Meister, 2009; Chen *et al.* 2012; Escedi *et al.*, 2013 und Worringer *et al.*, 2014 [38, 28, 39, 186].

mESC fördert [26, 104]. Chang *et al.* gehen davon aus, dass die mRNA-Bindung für die Regulation der Proliferation durch Trim71 verantwortlich ist. Sie konnten zeigen, dass Trim71 in Zusammenarbeit mit Ago2 und den ES-Zell-spezifischen miRNAs miR-290 und miR-302 die mRNA von Cdkn1a (p21) bindet und herunterreguliert [26]. Cdkn1a ist ein

Inhibitor cyclinabhängiger Kinasen (*cyclin dependent kinase*) und neben anderen Proteinen für den Zellzyklusarrest am G₁/S-Kontrollpunkt mitverantwortlich [40]. Erst nach Abbau von Cdkn1a kann die Zelle in die S-Phase übergehen [190], somit führt eine Herunterregulierung von Cdkn1a zu einer Erhöhung der Zellproliferation. In mESC führt der siRNA-vermittelte Knockdown von Trim71 zu einer Erhöhung des Cdkn1a-Proteingehalts und zu einer verminderten Proliferation. Durch Knockdown beider Proteine kann dieser Phänotyp wieder rückgängig gemacht werden [26].

Loedige *et al.* (2012) beobachteten eine noch weitreichendere Funktion von Trim71 in der Regulation der mRNA-Stabilität. Sie konnten zeigen, dass durch Bindung von Trim71 an mRNA die Translation inhibiert wird und es zum mRNA-Abbau kommt. Mit Hilfe einer sogenannten RIP-Chip-Analyse (vgl. Abschnitt 2.14.8.1) konnten sie über 800 Gene identifizieren, deren Expression nach Überexpression von Trim71 in HEK293-Zellen signifikant verändert war [104]. Der Großteil dieser Gene (524) wurde dabei herunterreguliert. Unter diesen Kandidaten befanden sich viele Zellzyklusregulatoren wie die Retinoblastom-ähnlichen Proteine 1 und 2 (RBL1 und RBL2). Diese beiden Proteine sind Zellzyklusinhibitoren, deren Hemmung durch Trim71 die verstärkte Proliferationsrate von ESC erklären könnte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Repression von RBL1 und RBL2 durch miRNAs wichtig für die Selbsterneuerung von Stammzellen ist. Diese könnte somit durch Trim71 verstärkt werden [178].

2014 konnte zudem gezeigt werden, dass Trim71 durch die Regulation von Entwicklungs- und Differenzierungsgenen die Reprogrammierung differenzierter Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) fördert [186]. So wurde die Anzahl an ES-Zellkolonien durch die zusätzliche Expression von Trim71 neben den Stammzellfaktoren OCT4, SOX2 und KLF4 (OSK) signifikant erhöht (siehe Abbildung 1.5 D). Worringer und Kollegen konnten den Prodifferenzierungsfaktor EGR1 als direktes Zielgen identifizieren und zeigten, dass die Repression von EGR1 durch Trim71 die Reprogrammierung fördert. Auf diese Weise konnte zum ersten Mal ein regulatorischer Signalweg unterhalb von let-7 beschrieben werden.

Obwohl die unterschiedlichen Veröffentlichungen zu den funktionellen Eigenschaften von Trim71 in der Zelle unterschiedliche Mechanismen der Regulation zeigen, kann man zusammenfassend sagen, dass Trim71 zwei klare molekulare Wirkungsweisen zeigt, zum einen die Proteinubiquitinierung und zum anderen die Bindung und Repression von mRNAs. Außerdem zeigten alle Arbeiten, dass Trim71 ein wichtiger Regulator der Zellproliferation und -differenzierung ist.

1.8 Let-7 als Tumorsuppressor

Eine gestörte Regulation der Expression von miRNAs steht oft im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten wie Alzheimer [177, 66], Parkinson [175] und Krebs [11]. So haben Expressionsanalysen von Tumormaterial eine umfassende Fehlsteuerung von miRNAs in mehreren Krebsarten aufgedeckt [83]. Einige miRNAs (miR-155, miR-21, miR-372) schei-

nen dabei als Onkogene zu wirken und andere (miR-15a, miR-16-1, let-7) als Tumorsuppressoren [191]. In vielen Fällen konnte beispielsweise eine verringerte Expression von let-7 mit einer erhöhten Kanzerogenität in Verbindung gesetzt werden und unterschiedlichste *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen lassen vermuten, dass let-7 tatsächlich als Tumorsuppressor wirkt [19]. In einigen humanen Krebsarten wie Lungenkrebs, Leberkrebs und Eierstockkrebs konnte eine verminderte let-7 Expression nachgewiesen werden [162, 77, 153]. Mechanistisch ist die tumorsupprimierende Wirkung von let-7 u. a. durch Inhibition der Onkogene Myc [148] und Ras [78] zu erklären. Interessanterweise konnte in Tumormaterial genau dieser Krebsarten eine Hochregulation von Trim71 festgestellt werden [29]. Xenotransplantationsexperimente mit Trim71 überexprimierenden Leberzelllinien in immundefizienten Mäusen zeigten, dass Trim71 das Tumorwachstum und die Kanzerogenität erhöht und somit als potentiell Onkogen wirkt [29].

1.9 Modelle der Tumorentstehung

Tumore bestehen aus heterogenen Zellpopulationen, die in unterschiedlichen Differenzierungsgraden vorliegen. Zur Erklärung dieser Heterogenität existieren zwei stark diskutierte Modelle: das stochastische und das hierarchische Modell (siehe Abbildung 1.6). Das stochastische Modell besagt, dass jede Zelle eines Tumors das gleiche intrinsische Potential besitzt zu entarten. Das Tumorwachstum hängt allein von der stochastischen Wahrscheinlichkeit ab, mit der eine Tumorzelle in den Zellzyklus eintritt. Diese wird durch extrinsische und intrinsische Faktoren limitiert. So ist beispielsweise die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren, die auch durch Mutationen beeinflusst werden kann von großer Bedeutung [132]. Im Gegensatz dazu, geht man im hierarchischen Modell davon aus, dass sich die Tumorzellen in einem organisierten System befinden. Tumore können nur aus speziellen Zellpopulationen mit Stammzeleigenschaften hervorgehen, weshalb man auch von der Tumorstammzelltheorie spricht. Der Tumor ist nach dieser Theorie ähnlich dem gesunden Gewebe aufgebaut. An der Basis stehen Tumorstammzellen, die durch Teilung zu einer identischen Tochterzelle mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung bilden und zum anderen stark proliferierende Vorläuferzellen hervorbringen, die differenzieren und den Hauptteil der Tumormasse ausmachen. Die Herkunft der Tumorstammzellen ist bisher ungeklärt. Sie könnten einerseits durch Mutationen in Gewebestammzellen oder frühen Vorläuferzellen hervorgehen oder durch Reprogrammierung differenzierter Zellen entstehen [10].

Zum ersten Mal konnten potenzielle Tumorstammzellen im Jahr 1997 von Bonnet und Dick identifiziert werden. Diese konnten anhand von Oberflächenmarkern aus dem Blut von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) isoliert werden. Durch Injektion dieser $CD34^+/CD38^-$ hämatopoetischen Vorläuferzellen in immundefiziente NOD/SCID Mäuse gelang es, die AML zu etablieren [13]. Auch in mehreren soliden Tumoren konnten Tumorstammzellen nachgewiesen werden. Im Falle des Kolonkarzinoms führte die Injektion einer relativ kleinen $CD133^+$ Zellpopulation in immundefiziente Mäuse zur Tumorbildung, wohingegen die Injektion von $CD133^-$ Zellen keinen Effekt hatte [142, 132]. Gleiches konnte

für Brustkrebs mit $CD44^+$ / $CD24^-$ Zellen gezeigt werden [2].

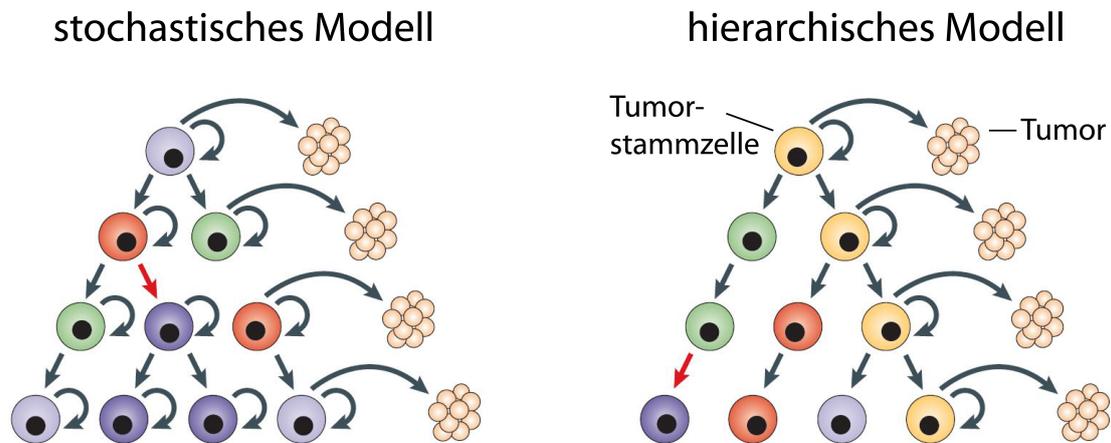


Abbildung 1.6: STOCHASTISCHES UND HIERARCHISCHES MODELL ZUR TUMORINITIATION UND -ENTWICKLUNG. Das stochastische Modell besagt, dass Tumorzellen zwar heterogen sind, aber jede Zelle das gleiche Potential besitzt Tumorwachstum zu initiieren. Demgegenüber steht das hierarchische Modell der Tumorstammzelltheorie. Hier kann nur eine kleine Subpopulation an Zellen (Tumorstammzellen) das Tumorwachstum auslösen und aufrecht erhalten. Abbildung adaptiert nach Vescovi *et al.*, 2006 [171].

1.10 Die Haut als Modellsystem zur Untersuchung von Krebs

Die Haut ist das größte Organ des Körpers und dient dem Schutz vor Verletzungen, sie reguliert die Körpertemperatur und besitzt als Sinnesorgan die Fähigkeit zur Wahrnehmung von Wärme, Kälte und Schmerz. Ihre hohe Fähigkeit zur Selbsterneuerung, macht sie zum idealen Organ zur Untersuchung von Differenzierungs- und Proliferationsprozessen, die auch in der Krebsentstehung von entscheidender Bedeutung sind.

1.10.1 Der Aufbau der Haut

Die Haut ist ein mehrschichtiges Epithel, das aus Epidermis und Dermis besteht. Die Epidermis ist wiederum in vier Schichten eingeteilt: die Hornschicht (*Stratum corneum*), die Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*), die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) und die Basalzellschicht (*Stratum basale*) (siehe Abbildung 1.7). 90 % der epidermalen Zellen sind Keratinozyten. *Stratum corneum* und *Stratum granulosum* bestehen aus verhornten, abgestorbenen Keratinozyten, den Korneozyten. Diese haben ihren Zellkern verloren und sind nicht mehr in der Lage sich zu teilen. Stachelzellschicht und Basalzellschicht enthalten neben lebenden Keratinozyten außerdem Langerhanszellen und Melanozyten. Die Basalzellschicht grenzt die Epidermis von der Dermis ab und dient der Regeneration der Haut. Die Dermis besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern, in die Fibroblasten eingebettet sind. Außerdem enthält sie Immunzellen wie: Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten, Plasmazellen, Granulozyten und Monozyten.

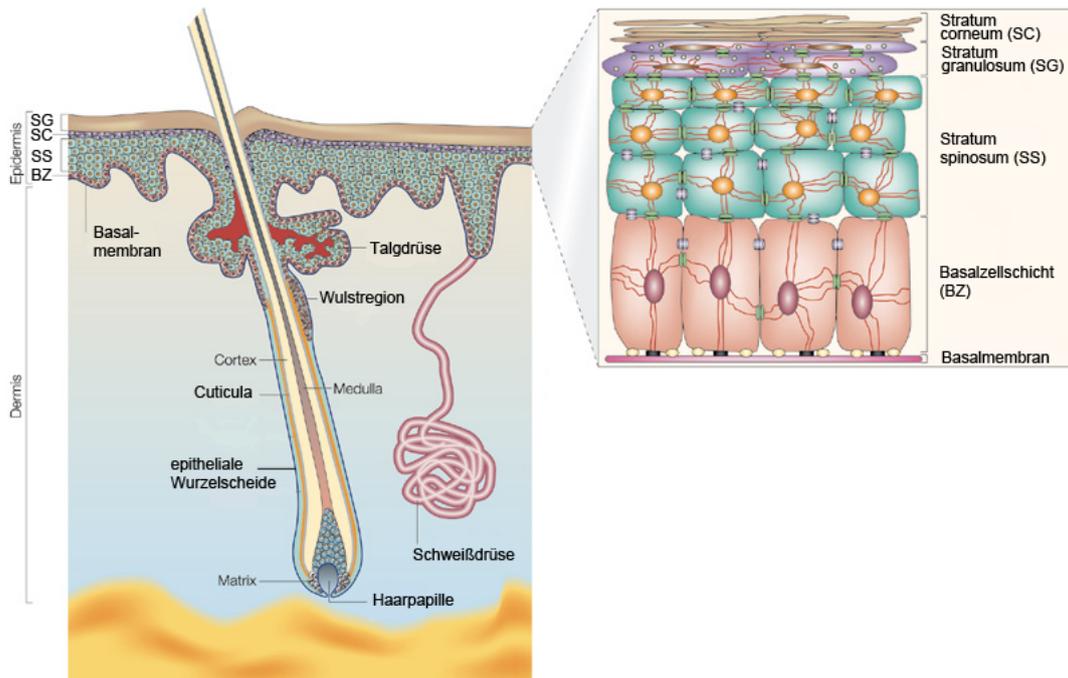


Abbildung 1.7: DER AUFBAU DER HAUT. Die menschliche Haut besteht aus Epidermis und Dermis, die durch die Basalzellschicht voneinander getrennt sind. Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Epithel, das aus verschiedenen Zellschichten zusammengesetzt wird. Die proliferierenden Vorläuferzellen der Basalzellschicht differenzieren von Keratinozyten zu verhornten Korneozyten und bilden so die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*), die Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*) und die Hornschicht (*Stratum corneum*). Außerdem ist der Querschnitt eines Haarfollikels gezeigt. Die äußere Schicht des Haarfollikels grenzt an die Basalzellschicht der Epidermis. Stammzellnischen gibt es in der Basalzellschicht der Epidermis, der Basis der Talgdrüse, dem Wulstbereich des Haarfollikels und der Haarpapille. Abbildung modifiziert nach Fuchs & Raghavan, 2002 [47].

Im Unterschied zur humanen (100 μm) ist die murine Epidermis mit einer Dicke von ca. 25 μm wesentlich dünner, da jede Zellschicht aus nur einer Lage an Zellen besteht. Auch die murine Dermis ist dünner, enthält aber im Vergleich mehr Haarfollikel.

1.10.2 Epidermale Stammzellen

Die Epidermis und ihre Hautanhangsgebilde werden fortwährend regeneriert und sind im Falle einer Verletzung in der Lage, die Wunde zu verschließen und zu heilen. Dafür verantwortlich sind adulte Stammzellen, die in verschiedenen Bereichen der Epidermis zu finden sind. Die Stammzellen der interfollikulären Epidermis befinden sich in der Basalzellschicht der Haut. Sie sind für die alltägliche Regeneration der unterschiedlichen Schichten der Epidermis verantwortlich. Im Haarfollikel gibt es zwei Stammzellnischen, eine zur Regeneration der Talgdrüse, die sich an deren Basis befindet und eine weitere in der Wulstregion, dem unteren Bereich des Haarfollikels. Diese ist für das Haarwachstum durch die Regeneration des Haarfollikels verantwortlich. Im Falle einer Verletzung können sie auch helfen die Epidermis neu zu bilden [164].

1.10.3 Chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese

Bereits in den 1920er Jahren wurde herausgefunden, dass die Tumorentwicklung ein mehrstufiger Prozess ist, bei dem eine erhöhte Zellproliferation eine wichtige Rolle spielt. So konnte in Mäusen gezeigt werden, dass die Applikation eines Mutagens (in diesem Falle Teer) nur dann zur Tumorentwicklung führt, wenn der Maus danach Verletzungen zugeführt wurden [36]. Anhand dieser und anderer Untersuchungen, wurde die Karzinogenese in einen dreistufigen Prozess bestehend aus Initiation, Promotion und Progression eingeteilt [45, 43]. Während der Initiation erfährt die Zelle eine durch ein Kanzerogen ausgelöste stabile Mutation. In der Epidermis ist am häufigsten das *Hras1*-Gen betroffen, bei dem verschiedene Punktmutationen zu einem konstitutiv aktiven Ras-Protein führen können. Experimentell erfolgt die Initiation der Tumorentwicklung durch die einmalige Applikation des Kanzerogens Dimethylbenzanthracen DMBA (siehe Abbildung 1.8), das zu einer Transversion von Adenin zu Thymin an Position 2 des 61. Codons von *Hras1* führt [17]. Zellulär sind dabei hauptsächlich Mutationen in epidermalen Stammzellen (siehe Abschnitt 1.10.2) für die Karzinogenese ausschlaggebend [122]. Während der Promotionsphase, die im Maushautmodell durch wiederholte Behandlung der Maushaut mit dem Tumorpromotor Tetradeacylphorbolacetat (TPA) erreicht wird, bilden sich durch eine erhöhte Zellproliferation klonale Auswüchse. Es entstehen gutartige Tumore, sogenannte benigne Papillome, die sich nach Absetzen des Tumorpromotors spontan zurück entwickeln können [49]. TPA wirkt über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) [23], was in der Haut zu einer entzündlichen Reaktion und zur Hyperproliferation der Epidermis (Hyperplasie) führt. Im letzten Schritt der Mehrstufenkarzinogenese, der Progression entstehen aus ca. 4 % der Papillome bösartige Plattenepithelkarzinome [49]. Diese zeichnen sich durch ungehemmtes Zellwachstum und die Fähigkeit zur Metastasenbildung aus.

Die chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese ist eines der am besten etablierten *in vivo* Modelle für die schrittweise verlaufende Entwicklung von Tumoren. Es kann dabei zum einen zur Untersuchung neuer Krebspräventionsstrategien verwendet werden oder dient zum anderen der Untersuchung der Rolle eines bestimmten Gens in der Tumorentwicklung und -progression [1].

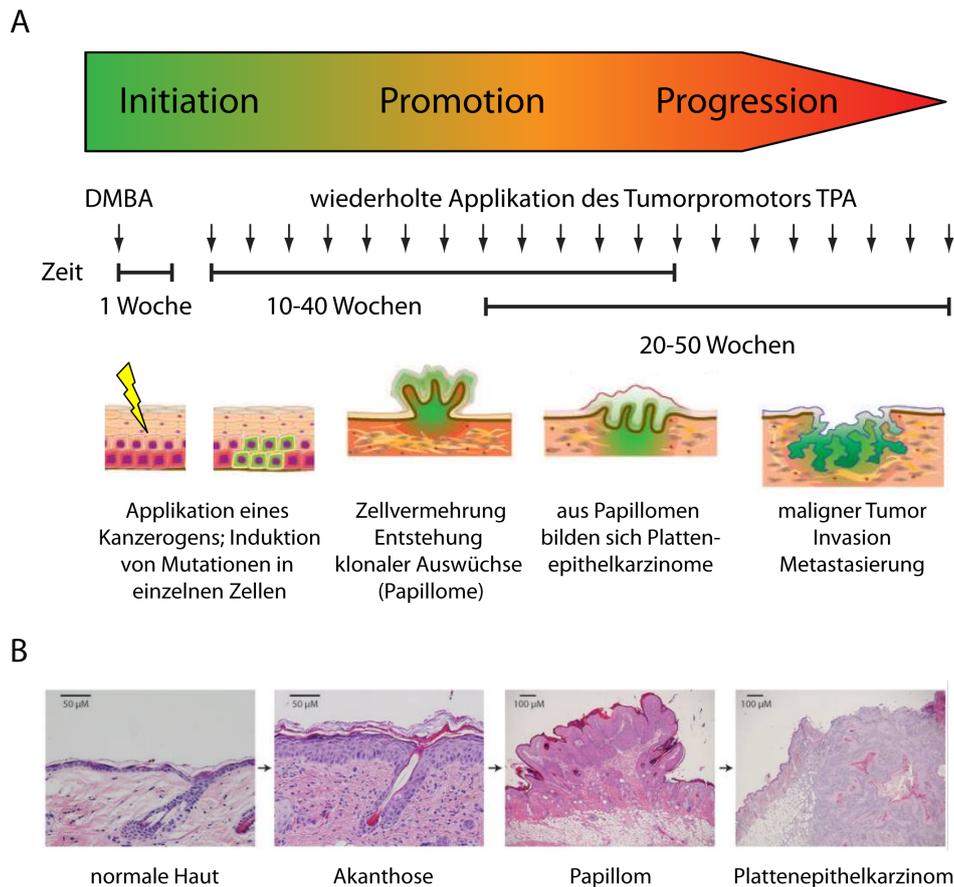


Abbildung 1.8: DARSTELLUNG DES ZEITLICHEN VERLAUFS DER CHEMISCH INDUZIERTEN KARZINOGENESE IN DER MAUS. A) Initiation: Die einmalige Behandlung mit dem Mutagen DMBA führt zu irreversiblen DNA-Schäden. Promotion: Durch wiederholte Applikation des Tumorpromotors TPA, kommt es zu einer erhöhten Zellproliferation, die nach ca. 6-12 Wochen zur Entstehung gutartiger Papillome führt. Progression: Aus einigen Papillomen entstehen nach ca. 20 Wochen maligne Plattenepithelkarzinome. B) Repräsentative H&E-Färbungen, dargestellt sind Schnitte unbehandelter Haut, entzündeter Haut nach TPA-Behandlung, ein Papillom und ein Plattenepithelkarzinom. Abbildung modifiziert nach Abel *et al.*, 2009 [1].

1.11 Ursachen der Krebsentstehung und Epigenese

Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs in Deutschland die zweithäufigste Todesursache: Im Jahr 2012 erlag über ein Viertel (25,5 %) aller Verstorbenen (221.611 Menschen) einem Krebsleiden (statistisches Bundesamt). Die Ursachen für die Entstehung von Krebs sind dabei vielfältig: hierzu gehören zahlreiche Karzinogene, die zur Schädigung der DNA führen und so eine Transformation einer Gewebszelle in eine Tumorzelle begünstigen. Zu den krebserzeugenden Substanzen gehören physikalische Karzinogene wie UV- und Röntgenstrahlung, chemische Karzinogene wie Asbest und Arsensäure und biologische Karzinogene wie bestimmte Viren und Bakterien (z. B. humane Papillomaviren (HPV), Helicobacter). Bei der durch das Kanzerogen ausgelösten Mutation kann es sich um eine Punktmutation, eine Deletion, eine Duplikation oder eine Insertion handeln. Je höher die Frequenz an Mutationen ist, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass Mutationen

auftreten, die zu einer Aktivierung eines Onkogens oder zu einer Inaktivierung eines Tumorsuppressors führen können, was letztlich zur Entstehung von Krebs führt. Ein Beispiel dafür ist der Tumorsuppressor p53, das am häufigsten mutierte Gen humaner Krebserkrankungen. Über die Hälfte aller Tumore tragen mindestens eine Mutation in diesem Gen [84]. Im inaktiven Zustand ist p53 im Zytoplasma an die E3-Ubiquitin Ligase Mdm2 gebunden und wird schnell umgesetzt [121]. Durch Stresssignale wird p53 phosphoryliert, was eine Interaktion mit Mdm2 verhindert und zu einer Akkumulation von p53 im Zellkern führt. Dort induziert es als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur kontrollieren [46]. Mutationen des p53-Gens führen zur Expression eines funktionell inaktiven p53-Proteins mit einer verlängerten Halbwertszeit, das im Zytoplasma akkumuliert und seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht ausüben kann [54]. Als Folge kommt es zu unkontrollierter Proliferation der Zellen mit Tumorwachstum.

Aber nicht nur Genmutationen können der Auslöser für Krebs sein. Auch epigenetische Veränderungen können zur Krebsentstehung beitragen. Darunter versteht man die vererbare, dennoch reversible Modifikation der Genexpression, bei der keine Veränderungen der DNA-Sequenz vorliegen [41]. In eukaryotischen Zellen liegt die DNA in Form von Chromatin als Komplex mit Proteinen vor. Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, bei dem sich die DNA um ein Oktamer aus Histonen windet (siehe Abbildung 1.9 A). Epigenetische Änderungen der Genregulation basieren auf der Modifikation der Chromatinstruktur. Die DNA von dicht gepacktem (kondensiertem) Chromatin ist für Proteine der Transkriptionsmaschinerie unzugänglich. Die Gene sind inaktiv. Offene Chromatinstrukturen weisen auf DNA-Abschnitte hin, deren Gene aktiv transkribiert werden (siehe Abbildung 1.9 B). Gesteuert wird dieser Regulationsprozess über zwei grundsätzliche Mechanismen: Histonmodifikationen und DNA-Methylierung [185].

Es gibt verschiedene Arten der Histonmodifikation, dazu gehören unter anderem Histonacetylierung, -phosphorylierung und -methylierung. Die wichtigste und am besten untersuchte Histonmodifikation ist die Acetylierung von Lysinresten [55]. Lysine tragen eine positiv geladene Aminogruppe, die durch Acetylierung neutralisiert wird. Als Konsequenz wird die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Histonen und der negativ geladenen DNA verringert, was zu einer Lockerung der Chromatinstruktur führt und so die Genexpression ermöglicht [158].

Die DNA-Methylierung ist eine kovalente Modifikation der DNA bei der eine Methylgruppe an das 5. Kohlenstoffatom (C5) des Cytosinringes übertragen wird (siehe Abbildung 1.9 A). Dabei werden nur Cytosine methyliert auf die ein Guanin folgt, sogenannte CpG-Dinukleotide [123]. Diese kommen gehäuft in Promotorregionen vieler Gene als CpG-Inseln vor [51]. Methylierungen der Promotorregion führen zu einer Reduktion der Genexpression, was durch verschiedene Mechanismen erklärt werden kann [73]. Zum einen verhindert die Methylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA [180]. Außerdem kommt es zur Rekrutierung von Methyl-CpG-bindenden Proteinen, die als Repressoren der Transkription wirken [117]. Diese rekrutieren weitere Corepressoren

und Histon-Deacetylasen, die zur Kondensation des Chromatins führen und so zur Inaktivierung der betroffenen Gene beitragen [33]. Darunter können auch Tumorsuppressorgene fallen, durch deren Inaktivierung die Krebsentwicklung gefördert wird. Eine Hypermethylierung CpG-reicher Promotoren konnte bei vielen Krebsarten beobachtet werden. Dazu gehören unter anderem solide Tumore wie Brust- und Prostatakrebs, aber auch hämatologischen Tumore und akute myeloische Leukämie (AML) [8].

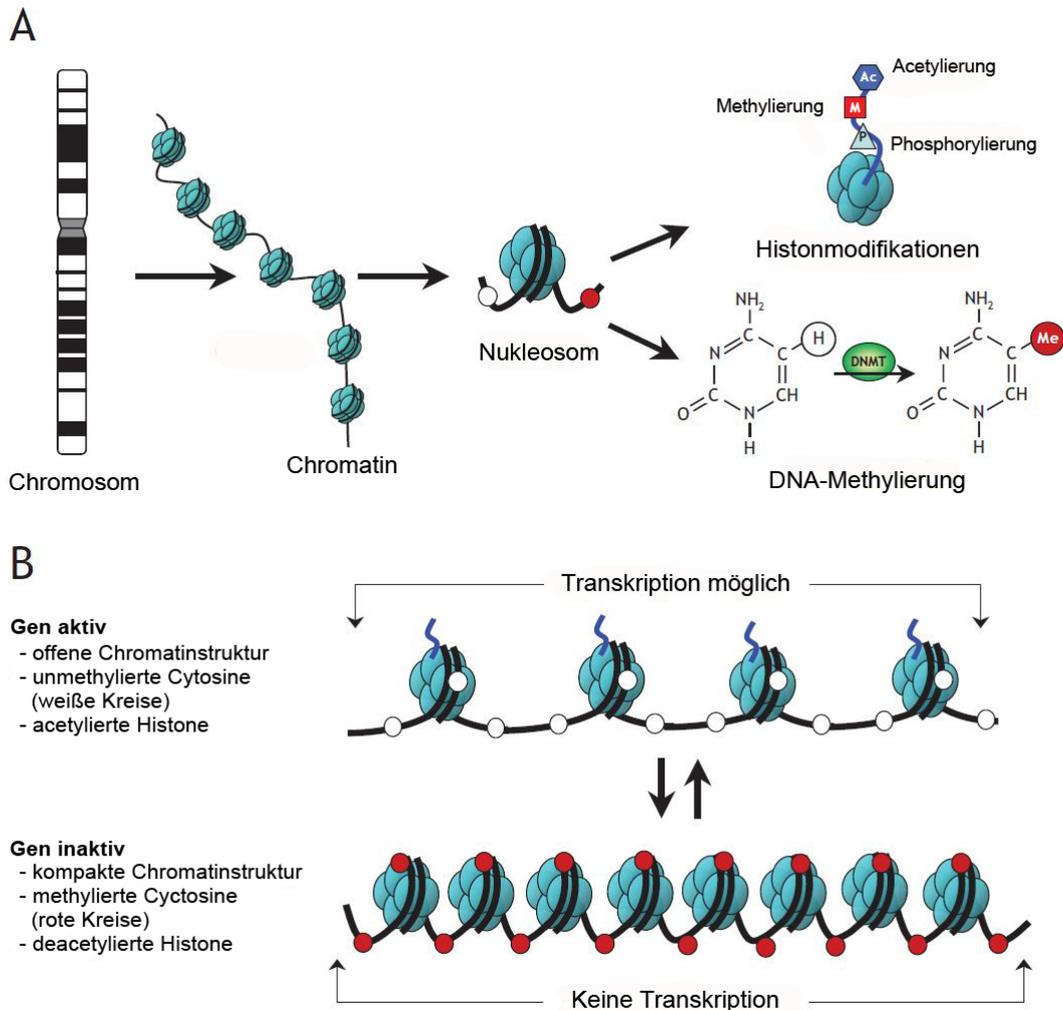


Abbildung 1.9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EPIGENETISCHEN GENREGULATION. A) DNA-Stränge sind um Histonoktamere gewunden und bilden Nucleosomen. Das Chromatin besteht aus vielen Nucleosomen, die durch unverpackte DNA-Abschnitte miteinander verbunden sind. Durch weitere Kondensation der DNA entsteht kurz vor der Zellteilung die dichteste Verpackungsform, das Chromosom. Es gibt verschiedene reversible Arten der Histonmodifikation bei denen unterschiedliche chemische Gruppen auf die Histonenden übertragen werden. Dazu gehören Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung. Die DNA-Methylierung ist eine kovalente Modifikation der DNA, bei der eine Methylgruppe auf das 5. Kohlenstoffatom (C5) des Cytosinringes übertragen wird. Diese Reaktion wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert. B) Schematische Darstellung der reversiblen Änderung der Chromatinorganisation, zur Regulation der Genexpression. Gene werden exprimiert (Gen aktiv), wenn das Chromatin eine offene Struktur aufweist. Sie sind inaktiv, wenn das Chromatin eine kompakte Struktur aufweist. Abbildung modifiziert nach Rodenhiser und Mann, 2006 [143].

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Absaugpumpe	AC, HLC BioTech (Bovenden)
Agarosegeldokumentation	Gel Max, Intas (Göttingen)
Autoklav	135T, H+P (Oberschleißheim)
automatischer Zellseparator	Automacs pro, Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Bakterien-Schüttler	innova44, New Brunswick, Eppendorf (Hamburg)
Binokular	Wild Herrbrugg (Bad Dürkheim)
Blotapparatur	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
CO ₂ -Inkubator	Labotect (Göttingen)
Drehrad	Neolab Rotator, Neolab (Heidelberg)
Durchflusszytometer (FACS)	Canto II, BD Bioscience (Heidelberg)
Elektrophoresekammer (Agarose-Gele)	Polymehr (Paderborn)
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Mini Trans-Blot Cell, Biorad (München)
Elektrophorese-Netzteil	EV-243, Consort (Turnhout, Belgien)
Elektrorasierer	ChroMini Typ 1591, Moser (Unterkirnach)
Entwicklermaschine	SRX-101A, Konica Minolta (Langenhagen)
Feinwaage	AG285, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Heiz- und Magnetrüher	Combimac RCT, IKA (Staufen)
Heizblock	Thermomixer compact, Eppendorf (Hamburg)
Luminometer	MicroLumat Plus LB96V, Berthold (Köln)
Magnetständer	DynaMag™-2 Magnet, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Mikroskop	Axiovert 100, Zeiss (Jena)
Mikroskop	Digital sight ds-fi1, Nikon (Tokio, Japan)
Mikroskop	LSM FV-1000, Olympus (Tokio, Japan)
Mikrotiter-Plattenreader	infinite M200, Tecan (Maennedorf, Schweiz)
Multi-Detektions-Reader	Synergy HT, Biotek (Bad Friedrichshall)
PCR-Gerät	Mycycler, Biorad (München)
pH-Meter	MP220, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Photometer	BioPhotometer plus, Eppendorf (Hamburg)
Realtime PCR-Gerät	I-Cycler iQ5, Biorad (München)
Rollenmischer	RS-TR05, Phoenix Instrument (Garbsen)

Scanner, Aufsicht- und Durchlicht-Spektrophotometer	Scan Maker 8700, Mikrotek (Hsinchu, Taiwan)
Sterilbank	Nanodrop200, Thermo Scientific (Braunschweig)
Ultraschall-Homogenisator	Bioflow, BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Vortex Mixer	Sonoplus, Bandelin Electronic (Berlin)
Waage	UNIMAG ZX3, VELP scientifica (Mailand, Italien)
Wärmeschrank	JB2002-G/FACT, Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Wasserbad	EcoCell 55, MMM Medcenter (München)
Wippe	WNE, Memmert (Schwabach)
Zentrifuge	WS-10, Edmund Bühler (Hechingen)
Zentrifuge	5810R, Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge	5415R, Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge	Avanti J-20XP, Beckman Coulter (München)
Zentrifuge	Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter (München)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	15 mm; Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen)
FACS-Röhrchen	BD Falcon (Heidelberg)
Falcon-Röhrchen	15 und 50 ml; Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Filterspitzen	10, 200 und 1000 µl; Sarstedt (Nümbrecht)
Nitrozellulosemembran	PROTRAN, Schleicher & Schuell (Dassel)
Objektträger (IF)	Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen)
Objektträger (Histologie)	SuperFrost Plus, Menzel-Gläser (Braunschweig)
Pasteurpipetten	Carl Roth (Karlsruhe)
PCR-Reaktionsgefäße	200 µl Thin Wall Tubes, Axygen (Tewksbury, USA)
Petrischalen	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Plastikpipetten	5, 10, 25 ml; Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Plastikspitzen	10, 200, 1000 µl; Carl Roth (Karlsruhe)
qPCR Folien	Peqlab (Erlangen)
qPCR Platten	96-Well; Peqlab (Erlangen)
Reaktionsgefäße	0,5; 1,5 und 2,0 ml; Starlab (Ahrensburg)
Röntgenfilme	Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare (Freiburg)
Röntgenfilme	CL-Xposure Film Thermo Scientific
Spritzen und Kanülen	Braun Melsungen AG (Melsungen)
Sterilfilter	0,2 µm und 0,45 µm; Schleicher & Schuell (Dassel)
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckman (München)
UV-Küvetten	Eppendorf (Hamburg)
Verbandmull	Hartmann (Heidenheim)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturplatten	Greiner Bio-one (Frickenhausen)

Zellkulturschalen Greiner Bio-one (Frickenhausen)
 Zentrifugensäule 5 ml, Thermo Scientific (Braunschweig)

2.3 Chemikalien

Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung, Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe)
Agar	BD (Heidelberg)
Agarose	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Ammoniumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
Antikörper-Verdünnungsmittel, Antibody Diluent	Dako (Hamburg)
Antipain	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Benzamidin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
1-Butanol	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Bromdesoxyuridin (BrdU) labeling reagent	Roche (Mannheim)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe)
Caesiumchlorid (CsCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Citratpuffer, Target Retrieval Solution, pH 6,1	Dako (Hamburg)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe)
Collagen A	Biochrom (Berlin)
Diazabicyclooctan (DABCO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dimethylbenzanthracen (DMBA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
DNA-Ladepuffer, 6x Loading Dye	Fermentas (St. Leon-Rot)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem (Gatersleben)
Dynabeads Protein G	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Einbettmedium (IF), Fluoroshield	Immuno Bioscience (Burlington, USA)
Einbettmedium (IHC), Histomount	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Eosin Y	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	VWR (Frankreich)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Fugene HD	Roche (Mannheim)
Gelatine aus Fischhaut (fish skin gelatin, FSG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Glukose	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Glykogen	Roche (Mannheim)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
LB-Agar	Gibco (Karlsruhe)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
lineares Polyacrylamid (GenElute LPA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Mayers Hämalaunlösung	Merck (Darmstadt)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
MTT	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth (Karlsruhe)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck (Darmstadt)
Phorbolmyristataacetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phenol	Carl Roth (Karlsruhe)
Phenylmethylsulphonyluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ponceau S	Carl Roth (Karlsruhe)
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	GE Gealthcare (Freiburg)
Salzsäure (HCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tetradecanoylphorbolacetate (TPA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
TRIzol Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin, 2,5 %	Gibco (Karlsruhe)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck (Darmstadt)
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe)
10x Zinkfixativ (formalinfrei)	BD Biosciences (Heidelberg)

2.4 Enzyme

Dispase II	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DNase I	1 U/ μ l Thermo Scientific (Braunschweig) 230 U/ μ l Invitrogen (Carlsbad, USA)
DNA-Polymerase	Titanium Taq, Clontech (Göttingen)
DNA-Polymerase	Phusion High-Fidelity, New England Biolabs (Schwalbach)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot)
RNase I	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.5 Kommerzielle Reaktionssysteme (Kits)

Anti FITC MicroBeads	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
BCA Protein Assay Reagenz	Thermo Scientific (Braunschweig)
Click-iT Plus EdU Imaging Kit	Life Technologies (Carlsbad, USA)
ECL Plus Western-Blotting Substrat	Thermo Scientific (Braunschweig)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Kapa Sybr Fast qPCR Mastermix for Bio-Rad iCycler	Peqlab (Erlangen)
miRNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
miScript II RT Kit	Qiagen (Hilden)
miScript Sybr Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey und Nagel (Düren)
NucleoSpin RNA Clean-up	Macherey und Nagel (Düren)
peqGold hot Start Mix Real-Time	Peqlab (Erlangen)
Real Detection System, AP/RED, Rabbit/Mouse	Dako (Hamburg)

2.6 Zellkulturmedien- und Zusätze

DMEM	4,5 g/l Glukose + L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Keratinocyte Growth Medium 2	KGM2	PromoCell (Heidelberg)
FCS	fetales Kälberserum	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
G418	50 mg/ml	Biochrom (Berlin)
Gentamicin	50 mg/ml	PAA (Cölbe)
Opti-MEM	1x	Gibco (Karlsruhe)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin-Streptomycin	100x	PAA (Cölbe)

2.7 Längenstandards

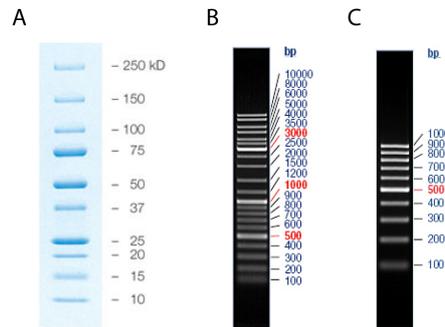


Abbildung 2.1: VERWENDETE PROTEIN- UND DNA-LÄNGENSTANDARDS. **A.** Proteinstandard Precision Plus All Blue von BioRad (München) **B.** DNA-Längenstandard GeneRuler DNA Ladder Mix von Fermentas (St. Leon-Rot) **C.** DNA-Längenstandard GeneRuler 100 bp DNA Ladder von Fermentas (St. Leon-Rot)

2.8 Plasmide

Name	Protein-tag	Resistenz	Herkunft
pN1	GFP	Kanamycin	Clontech ¹
pRK5	flag	Ampicillin	Addgene ¹
pRK5	GFP	Ampicillin	Addgene ¹
pRK5	Ig	Ampicillin	Addgene ¹

¹modifiziert durch W. Kolanus

Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um eukaryotische Expressionsvektoren. Der Vektor GFP pN1 entstand durch Umklonierung des Vektors pEGFP-N1 der Firma Clontech. Die Klonierungskassette wurde so modifiziert, dass eine Klonierung über die Restriktionsschnittstellen *MluI* und *NotI* möglich war. Das Fusionsprotein mit N-terminalem GFP steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors des Zytomegalievirus. Auch die drei pRK5-Vektoren der Firma Addgene, wurden so umkloniert, dass eine Restriktion über die Schnittstellen *MluI* und *NotI* möglich war. In Abbildung 2.2 ist die Vektorkarte des pN1- und des pRK5-Vektros schematisch dargestellt.

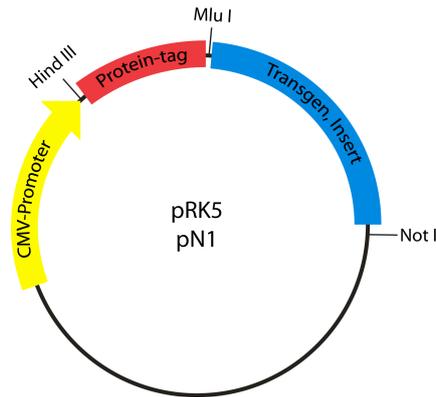


Abbildung 2.2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VEKTORKARTE DES pRK5- BZW. pN1-VEKTORS.

2.9 Antikörper

2.9.1 primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
<i>a</i> -Aktin	Kaninchen	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich
<i>a</i> -Ago2 (11A9)	Ratte	1:1000 (WB)	Sigma-Aldrich
<i>a</i> -Ago2 (C34C6)	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:200 (IF)	Cell Signaling
<i>a</i> -BrdU Biotin	Schaf	1:2000 (IHC)	abcam
<i>a</i> -BrdU	Ratte	1:1000 (IP)	abcam
<i>a</i> -CD34 (RAM34) FITC	Ratte	1:50 (FACS)	eBioscience
<i>a</i> -CD49f (GoH3)	Ratte	1:20 (IF)	eBioscience
<i>a</i> -CD49f (GoH3) Alexa647	Ratte	1:50 (FACS)	eBioscience
<i>a</i> -Flag M2	Maus	1:500 (WB)	Sigma-Aldrich
<i>a</i> -GFP	Maus	1:1000 (WB)	Santa Cruz
<i>a</i> -Keratin 15	Maus	1:200 (IF)	Thermo Scientific
<i>a</i> -Lin28b	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
<i>a</i> -c-Myc	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
<i>a</i> -Cdkn1a	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
<i>a</i> -pStat3 (Tyr705)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
<i>a</i> -Stat3	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling
<i>a</i> -Trim71	Schaf	1:1000 (WB)	R&D
<i>a</i> -Trim71	Kaninchen	1:200 (WB)	Sigma-Aldrich
<i>a</i> -human UBE2C	Maus	1:600 (WB)	Proteintech
<i>a</i> -murin UBE2C	Kaninchen	1:1000 (WB)	Proteintech

2.9.2 sekundäre Antikörper

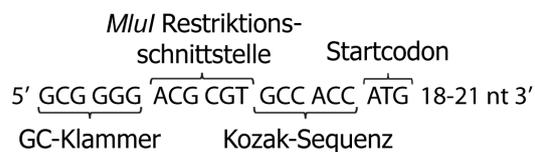
Antikörper	Markierung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
<i>a</i> -Kaninchen IgG	HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Santa Cruz
<i>a</i> -Maus IgG	HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Santa Cruz
<i>a</i> -Ratte IgG	HRP	Ziege	1:5000 (WB)	Santa Cruz
<i>a</i> -Schaf IgG	HRP	Esel	1:5000 (WB)	Santa Cruz
<i>a</i> -Ziege IgG	HRP	Esel	1:5000 (WB)	Santa Cruz
<i>a</i> -Maus IgG2a	Alexa488	Ziege	1:500 (IF)	Invitrogen
<i>a</i> -Kaninchen IgG	Cy2	Ziege	1:100 (IF)	Dianova
<i>a</i> -Kaninchen IgG	Cy3	Esel	1:400 (IF)	Jackson
<i>a</i> -Ratte IgG	Cy3	Ziege	1:400 (IF)	Jackson
<i>a</i> -Ratte IgG	Cy5	Ziege	1:200 (IF)	Jackson

2.10 Oligonukleotide

2.10.1 Klonierungsprimer

Die Primer zur Klonierung verschiedener Konstrukte, wurden so konstruiert, dass sie über die Restriktionsschnittstellen *MluI* und *NotI* in den jeweiligen Vektor ligiert werden konnten. Vor den Restriktionsschnittstellen wurde eine sogenannte GC-Klammer eingefügt, die die Restriktion erleichtern sollte. Der Vorwärtsprimer enthielt außerdem eine Kozak-Sequenz zur besseren Anlagerung der DNA-Polymerase. Der sequenzspezifische Teil des Primers war zwischen 18 und 21 Nukleotiden (nt) lang. In Abbildung 2.3 ist der Aufbau eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers schematisch dargestellt.

Vorwärtsprimer



Rückwärtsprimer



Abbildung 2.3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON VORWÄRTS- UND RÜCKWÄRTSPRIMER ZUR KLONIERUNG.

Name	Sequenz
moTrim71_Mlu f	5'-GCGGGGACGCGTGCCACCATG GCTTCGTTCCCGGAGACCGAC-3'
moTrim71_Not rev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTA GAAGATGAGGATTCGATTGTTGCCAAA-3'
moTrim71_NHL_fw2	5'-GCGGGGACGCGTGCCACCATG TGAGCTTCGGCAGTGAAGGTG-3'
moTrim71 FBS Mlu f	5'-GCGGGGACGCGTGCCACCATG TTTGTTCAGCAGCGGGGCCTTCG-3'
T71_Mm_RBCC_rev	5'-GCGGCCGCTTTA CTTCCAGGACCTGCTGCACGG-3'
moTrim71 Ex3Notr	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTA CTTCCACAACAGCTCACACTCCCGATC-3'
mLin41_NHL_rev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTA GAAGATGAGGATTCGATTG -3'
hLin41_for	5'-GCGGGGACGCGTATG GCTTCGTTCCCGAGACC-3'
T71 Hs RBCC rev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTA GATGTCTAGCGCTCTACCCTCC-3'
huTrim71Ex3Notr	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTA CTTCCACAGCAGCTCACACTCGC-3'
hAgo2 fw	5'-GCGGGGACGCGTGCCACCATG ATGTACTCGGGAGCCGGCC-3'
hAgo2 rev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTA TCAAGCAAAGTACATGGTGCGCAGA-3'
Hs_UBE2C_fw	5'-GCGGGGACGCGTGCCACCAGT GCTTCCAAAACCGCGACCCA-3'
Hs_UBE2C_rev	5'-GCGGGGGCGGCCGCTTTA TCAGGGCTCTGGCTGGTGACCTG-3'

2.10.2 Genotypisierungsprimer

Name	Sequenz
TG206	5'-GAAAGGAGGCTAGCCAAAGG -3'
TG207	5'-ATGCTGTACGGTAGGAGTCTTCC -3
TG209	5'-CACACAAAAAACCAACACACAG -3
Krt14-Cre_tg_fw	5'-TTCCTCAGGAGTGTCTTCGC -3
Krt14-Cre_tg_rev	5'-GTCCATGTTCCTTCCTGAAGC -3
K14-Cre_ic_fw	5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG -3
K14-Cre_ic_rev	5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT -3

2.10.3 qPCR Primer

Name	Sequenz
RT_Hs_ITAG5_fw	5'-CCTCAATGCTTCTGGAAAAC-3'
RT_Hs_ITAG5_rev	5'-AATTCTGACTCGTTCCTGAG-3'
RT_Hs_DLL1_fw	5'-GTCATAGCAACTGAGGTGTAA-3'
RT_Hs_DLL1_rev	5'-GTCTGAACTCGGTTTCTCAG-3'
RT_Hs_RECK_fw	5'-CTTTGCCAGGTGTGTTTAAG-3'
RT_Hs_RECK_rev	5'-AGCCCATTTTCAATTTCTGCTA-3'
RT_Hs_SERBP1_f	5'-GAAGTGATAGATCTTCTTTTTTACA-3'
RT_Hs_SERBP1_r	5'-TGATTGATCCAAGTCACTGT-3'
RT_Hs_HOXA5_fw	5'-AAAACCTCCCTAAGCAACTCC-3'
RT_Hs_HOXA5_rev	5'-ATGTTGTCATGACTTATGTGC-3'
RT_Hs_HOXA9_fw	5'-CCCCATCGATCCCAATAAC-3'
RT_Hs_HOXA9_rev	5'-CTTTTGCTCGGTCTTTGTTG-3'
RT_Hs_LIPT1_fw	5'-CACTTTCTCCTCAGCACTTG -3'
RT_Hs_LIPT1_rev	5'-CGTGTGCATGTTTTACTTCG-3'
RT_Hs_HOXD1_fw	5'-ATGCCTCTAAGAAAGGCAAAC -3'
RT_Hs_HOXD1_rev	5'-TTCTTCTGTTTCATCCTGCG-3'
RT_Hs_HOXB8_fw	5'-AAACCACAAAAGTGTGTCG-3'
RT_Hs_HOXB8_rev	5'-AGAACAGTGAGTTGACGAAA-3'
RT_Hs_UBE2C_fw	5'-TGTTCTCCGAGTTCCTGT-3'
RT_Hs_UBE2C_rev	5'-CTCCTGCTGTAGCCTTTTG -3'
RT_Mm_T71NHL_fw	5'-CACCTGATTGCCAATCTG-3'
RT_Mm_T71NHL_rev	5'-CAAAGTCCACCACGACGA-3'
hHPRT fw	5'-AGCCCTGGCGTCGTGATTAG-3'
hHPRT rev	5'-GTAATCCAGCAGGTCAGCAA-3'
RT_Hs_let7a_for	5'-TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT-3'
RT_Hs_5.8S_for	5'-GCCTGTCTGAGCGTCGCTT-3'
Mm_Trim71_fw	5'-GTGGAAGGTGGAGAAGATCCG-3'
Mm_Trim71_rev	5'-GTCAGGGGGCGTGAACATAA-3'
mHPRT for	5'-GCTGGTGAAAAGGACCTCT-3'
mHPRT rev	5'-CACAGGACTAGAACACCTGC-3'
mRPS6 for	5'-ATCCTGGACTGACAGACAC-3'
mRPS6 rev	5'-GTTCTTCTTAGTGCGTTGCT-3'
RT_Mm_5.8S rRNA fw	5'-CCTGTCTGAGCGTCGGTTG-3'
mCXCL12 fw	5'-CTCTGCATCAGTGACGGTAA-3'
mCXCL12 rev	5'-TTGGGCTGTTGTGCTTACTT-3'
mCXCR4 fw	5'-CAGAAGAAGCTAAGGAGCATGAC-3'
mCXCR4 rev	5'-CTGATGAAGGCCAGGATGAGAAC-3'

2.10.4 TaqMan-Sonden

Gen	ID-Nummer	Fluoreszenzfarbstoff
Ago2/Eif2c2	Hs01085579_m1	FAM
Ago2/Eif2c2	Mm03053414_g1	FAM
CDKN1A	Hs00355782_m1	FAM
GAPDH	Hs01922876_u1	FAM
GAPDH	Mm99999915_g1	FAM
HoxA5	Mm00439362_m1	FAM
LIN28A	Mm00524077_m1	FAM
LIN28B	Mm01190673_m1	FAM
MYC	Hs00153408_m1	FAM
MYC	Mm00487804_m1	FAM
Trim71	Mm01341471_m1	FAM
UBE2C	Mm00835439_g1	FAM

2.11 Organismen

Bakterienstämme (*E. coli*)

Stamm	Referenz
DH5 α	[120]
MC1061	[22]

Eukaryotische Zelllinien

Name	Zelltyp	Donor
HEK293T	embryonale Nierenzellen	Mensch
HEK293	embryonale Nierenzellen	Mensch
JKT-1	Seminomzelllinie	Mensch
P19	embryonale Karzinomzelllinie	Maus

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion [69] wurden ausgewählte Sequenzabschnitte aus verschiedenen cDNA-Bibliotheken oder bereits vorhandener Plasmid-DNA amplifiziert. Zur Vervielfältigung der DNA wurde die *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase der Firma Finnzymes verwendet. Diese weist eine geringe Fehlerrate ($4,4 \times 10^{-7}$) auf und besitzt außerdem eine hohe Lesegeschwindigkeit, was sich besonders bei der Amplifikation längerer DNA-Sequenzen als vorteilhaft erweist. Pro Ansatz wurden zwischen 50 und 200 ng Templat-DNA und 50 μ M Vorwärts- und Rückwärtsprimer eingesetzt. Der Ansatz enthielt außerdem 200 μ M Desoxyribonukleotide (dNTPs), 4 μ l 5x *Phusion* GC-Puffer

und 0,4 U *Phusion High-Fidelity* DNA-Polymerase. Das Endvolumen von 20 µl wurde durch Auffüllen mit *Aqua bidest* erreicht. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte nach dem in der Tabelle unten aufgeführten Programm. Die Elongationszeit betrug 30 s pro Kilobase (kb) und variierte somit je nach Templatgröße. Für die Überprüfung des Ergebnisses wurden dem Ansatz 2 µl entnommen und durch Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.12.2) aufgetrennt. Die Bewertung der Länge erfolgte über einen mitgelaufenen DNA-Längenstandard.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	30-35
Primeranlagerung	54-68 °C	20 s	
Elongation	72 °C	30 s/kb	
terminale Elongation	72 °C	10 min	1
	4 °C	∞	

2.12.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegele wurden je nach Größe der nachzuweisenden DNA mit unterschiedlicher Prozentigkeit hergestellt. Dazu wurde der erforderliche Massenanteil an Agarose in TAE-Puffer unter Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Die Lösung wurde in eine spezielle Gießapparatur gegossen, mit 1 g/ml Ethidiumbromid versetzt und mit einem Kamm versehen, der Taschen zum Auftragen der Proben erzeugte. Nachdem die Agarose ausgehärtet war, wurde den Proben 0,4 µl 6x Ladepuffer zugegeben. Als Referenz diente ein Größenstandard (siehe Abschnitt 2.7) der neben den Proben auf das Gel aufgetragen wurde. Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgte durch das Anlegen einer Spannung, die je nach Größe des Gels zwischen 80 und 100 Volt lag.

TAE-Puffer: 40 mM Tris
 40 mM Essigsäure
 0,5 mM EDTA; pH 8

2.12.3 Fällung des PCR-Produktes und DNA-Aufreinigung

Je nach Reinheitsgrad des PCR-Ansatzes wurde die DNA direkt aus dem Reaktionsansatz verwendet oder aus dem Agarosegel extrahiert. Ist in der PCR nur ein Produkt entstanden, so wurde dieses zur Entfernung der DNA-Polymerase, der Primer und der Nukleotide gefällt. Dazu wurde der PCR-Ansatz mit *Aqua bidest* auf 400 µl aufgefüllt, mit 300 µl Phenol-Chloroform (1:1) versetzt und gevortext. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 40 µl Lithiumchlorid, 1 µl Glykogen und 1 ml eiskaltem Ethanol gemischt. Zur Fällung der DNA wurde das Gemisch 20 min bei -20 °C gelagert. Die ausgefallene DNA wurde

anschließend durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit 70%igem Ethanol gewaschen und danach in 20-50 μ l *Aqua bidest* gelöst.

Zur Reinigung einzelner Banden aus dem Gel wurden diese unter abgeschwächtem UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion des Gelstücks geschah mit Hilfe des *NucleoSpin Gel and PCRClean-up Kits* der Firma Macherey und Nagel nach Angaben des Herstellers.

2.12.4 Restriktionsverdau von DNA

Bei fast allen Vektoren wurden die Schnittstellen *MluI* (5'-Ende) und *NotI* (3'-Ende) zur Klonierung verwendet. Für den Doppelverdau wurden die von Fermentas empfohlenen Puffer verwendet. Dazu wurden 2-5 μ g DNA mit 2-5 U Restriktionsenzym und 4 μ l Puffer versetzt. Der Ansatz wurde auf 20 μ l mit *Aqua bidest* aufgefüllt. Der Verdau erfolgte mindestens eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank. Das Ergebnis wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.12.2) überprüft.

2.12.5 Ligation

Durch Restriktionsverdau vorbereitete PCR-Produkte oder aus Plasmiden herausgeschnittene DNA-Fragmente wurden in mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren eingefügt. Die kohäsiven Enden wurden mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase geschlossen. Ein Ligationsansatz enthielt etwa 200 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss an Insert-DNA und 0,5 U T4-DNA-Ligase in Ligasepuffer. Das Endvolumen von 20 μ l wurde mit *Aqua bidest* eingestellt und der gesamte Ligationsansatz eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

2.12.6 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Pro Transfektionsansatz wurden 80 μ l chemisch kompetente Bakterienzellen (*E. coli* DH5 α oder *E. coli* MC1061) auf Eis aufgetaut und anschließend mit 7 μ l Ligationsansatz vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 45 s bei 42 °C im Wasserbad ausgesetzt und kurz auf Eis gestellt. Der Transformationsansatz wurde unter Zugabe von 1 ml LB-Medium 30 min bei 37 °C auf einem Heizschüttler inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert, in 100 μ l Medium resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Selektionierungsantibiotikum ausgestrichen. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C in den Brutschrank gestellt.

2.12.7 DNA-Minipräparation

Die DNA-Minipräparation dient der schnellen Isolierung geringer Mengen Plasmid-DNA, um neu konstruierte Plasmide überprüfen zu können. Dazu wurden 4 ml LB-Medium (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer einzelnen Kolonie transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Isolierung von

Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse und anschließender Fällung. Hierzu wurden jeweils 2 ml der Übernachtskulturen 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach vorsichtigem Vermischen mit 400 µl Lösung 2, wurde der Ansatz bis zu 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 300 µl Lösung 3 gestoppt. Die im Ansatz enthaltene genomische DNA wurde 10 min bei 13000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand anschließend in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung restlicher Proteine wurde der Überstand mit 300 µl Phenol-Chloroform (1:1) gemischt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und mit 800 µl 2-Propanol versetzt. Die dadurch gefällte Plasmid-DNA wurde anschließend 15 min bei 13000 rpm und 4 °C pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und in 20-50 µl *Aqua bidest* mit je 0,5 µl RNase A gelöst. Durch Restriktionsverdau (siehe Abschnitt 2.12.4) mit darauffolgender Gelelektrophorese wurde der Erfolg der Minipräparation überprüft. Der Rest der Übernachtskultur eines positiven Klons wurde zum Animpfen einer Maxipräparation (siehe Abschnitt 2.12.8) verwendet.

Lösung 1: 10 mM EDTA
pH 8 50 mM Glukose
25 mM Tris/HCl

Lösung 2: 200 mM NaOH
pH 13 1 % SDS

Lösung 3: 5 M Kaliumacetat
pH 5 2 M Eisessig

2.12.8 DNA-Maxipräparation

Zur Isolierung großer Mengen hoch reiner Plasmid-DNA wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Diese entspricht zu einem großen Teil einer Minipräparation, mit dem Unterschied, dass ein Caesiumchlorid-Dichtegradient zur Isolation der DNA verwendet wird. Dazu wurden mit dem Rest der Übernachtskulturen je 1 Liter LB-Medium (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) angeimpft und über Nacht 37 °C geschüttelt. Die Kultur wurde 20 min bei 4200 rpm und 4 °C zentrifugiert und das resultierende Bakterien-Pellet in 40 ml Lösung 1 resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 80 ml Lösung 2, die nach max. 5 min durch Zugabe von 40 ml Lösung 3 gestoppt wurde. Dabei fällt die genomische DNA in Form von weißen Flocken aus. Der Überstand wurde durch einen Verbandmull filtriert und mit 100 ml 2-Propanol gemischt. Die dadurch gefällte Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4 °C) pelletiert. Nach einer Trockenzeit von 15 min wurde das Pellet in 4 ml Lösung 1 resuspendiert. In der Lösung wurden 5,5 g Caesiumchlorid vollständig gelöst und mit 100 µl 10%igem Igepal und 500 µl Ethidiumbromid gemischt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 4500 rpm wurde der

geklärte Überstand mit einer Spritze in Ultrazentrifugen-Röhrchen gefüllt. Durch Ultrazentrifugation (3,5 h, 80000 rpm) stellt sich ein Caesiumchlorid-Dichtegradient ein, in dem sich die DNA an der Position, die ihrer Schwebedichte entspricht, konzentriert. Durch Interkalation mit Ethidiumbromid ist die DNA als rosafarbene Bande erkennbar und konnte mit Hilfe einer Spritze abgenommen werden. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde die Lösung 3x mit 10 ml salzgesättigtem 1-Butanol gewaschen. Zur Plasmid-DNA Fällung wurde die wässrige DNA-haltige Phase mit *Aqua bidest* auf 2 ml aufgefüllt und mit 1 Volumenteil Ammoniumacetat und 3 Volumenteilen 96%igem Ethanol gemischt. Die Lösung wurde 5 min bei 4500 rpm zentrifugiert und das resultierende Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA über Nacht getrocknet und anschließend in 0,5-1 ml sterilem *Aqua bidest* gelöst.

2.12.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch an einem Nanodrop-Spektralphotometer bestimmt. Dazu wurde die Absorption von 1 µl DNA bzw. RNA bei 260 nm gemessen. Eine optische Dichte von 1 ($OD_{260} = 1$) entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml und einer RNA-Konzentration 40 µg/ml. Zur Beurteilung der Reinheit der Nukleinsäuren wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm ($260/280$) sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ist der Quotient geringer, liegt eine Kontamination durch Proteine oder Phenol vor.

2.12.10 Isolation von RNA aus Zellen

RNA wurde mit Hilfe von TRIzol nach dem von Invitrogen angegebenen Protokoll isoliert. $5 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 0,75 ml TRIzol resuspendiert und nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform 15 s gevortext. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C hatten sich zwei Phasen gebildet. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur (RT). Die RNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4 °C) pelletiert und zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde 5 min bei RT getrocknet und anschließend in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und 10 min bei 55-60 °C gelöst.

2.12.11 Isolation von RNA aus geringer Anzahl an Zellen ($<1 \cdot 10^6$)

Stand zur RNA-Isolation nur eine geringe Menge an Zellen zur Verfügung, wurde ein leicht geändertes Protokoll von Baugh *et al.* [7] angewendet. Die Zellen wurden in 300 µl TRIzol homogenisiert und um die RNA Ausbeute zu steigern wurden 5 µg lineares Polyacrylamid (LPA) zugegeben. Nach Zugabe von 60 µl Chloroform wurde die Probe 30 s gevortext und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 180 µl Isopropanol gemischt. Die RNA-Präzipitation

erfolgte bei -20 °C über Nacht. Danach wurde die RNA pelletiert (Zentrifugation: 20 min, 13000 rpm, 4 °C) und zwei Mal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde für 1-2 min an der Luft getrocknet, bevor es in 15 µl RNase-freiem Wasser gelöst wurde.

2.12.12 DNaseI-Verdau isolierter RNA

Um eventuell verbliebene genomische DNA aus der RNA-Lösung zu entfernen, wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt. Dazu wurden zu 2 µg RNA, 2 µl DNaseI und 1 µl DNase-Puffer gegeben. Die Probe wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase erfolgte eine 10 minütige Inkubation bei 95 °C.

2.12.13 cDNA-Synthese

Die RNA wurde mit Hilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* in cDNA (copy DNA) umgeschrieben. 1-2 µg RNA wurden mit 2 µl 10xRT-Puffer, 2 µl 10xRandom Primer, 0,8 µl 25xdNTP-Mix und 1 µl MultiScribe reverser Transkriptase gemischt. Das Volumen wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 20 µl eingestellt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem folgenden Programm in einem PCR-Gerät:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Dauer	10 min	120 min	5 min	∞

2.12.14 cDNA Synthese zum Nachweis von miRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind hochkonservierte, nicht-kodierende RNAs, die eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression spielen. Im Gegensatz zu mRNA sind miRNAs nur 21-23 Nukleotide lang und müssen deshalb vor der cDNA-Synthese verlängert werden. Mit Hilfe des *miScript II RT Kits* der Firma Qiagen erfolgte zunächst eine Polyadenylierung am 3'-Ende der miRNA, so dass die verlängerte miRNA dann mittels eines Oligo(dT)-Primers in cDNA umgeschrieben werden kann. Der Oligo(dT)-Primer enthält außerdem eine Markierung (*universal tag*), dessen reverse Sequenz später in der qPCR (siehe Abschnitt 2.12.15) als Rückwärtsprimer diente. Das Prinzip der reversen Transkription von miRNAs ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Je Ansatz wurden bis zu 1 µg RNA mit 4 µl HiFlex-Puffer, 2 µl Nucleic-Mix und 2 µl miScript-RT-Mix gemischt. Die Probe wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reaktion folgte eine 5 minütige Inkubation bei 95 °C.

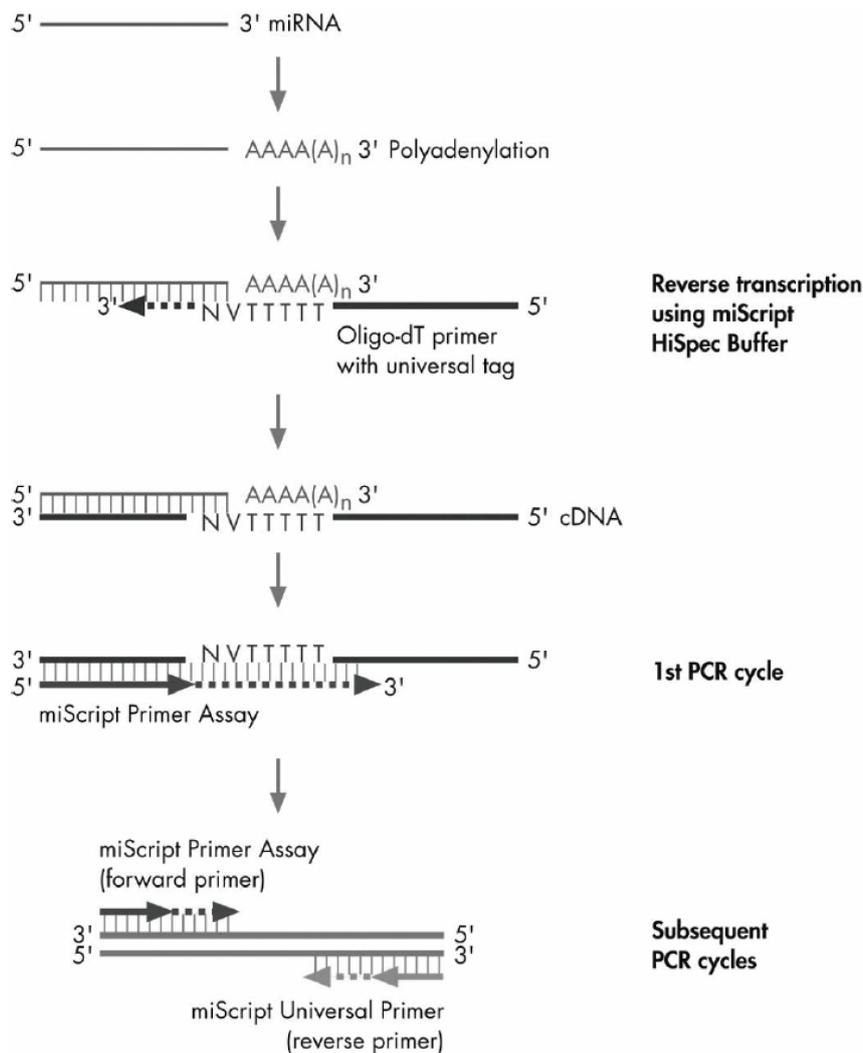


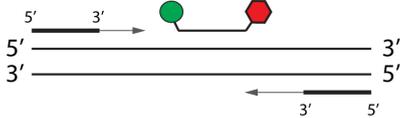
Abbildung 2.4: GEZIELTES UMSCHREIBEN REIFER MIRNAS IN cDNA. Die reife miRNA wird zunächst durch eine Poly(A)-Polymerase verlängert und anschließend mittels Oligo(dT)-Primer in cDNA umgeschrieben. Die cDNA dient in einer darauffolgenden qPCR der Quantifizierung reifer miRNAs. (Quelle: miScript PCR System Handbook, Qiagen)

2.12.15 quantitative Real-Time PCR (qPCR)

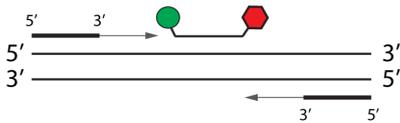
Die quantitative Real-time PCR (qPCR) ist eine Methode zur Quantifizierung der Genexpression (mRNA-Expression) in Echt-Zeit (Real-Time). Dabei gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, die SYBR Green- und die TaqMan-Sonden basierte Quantifizierung. In Abbildung 2.5 sind beide Methoden dargestellt und miteinander verglichen. Die Auswertung der qPCR erfolgte mit dem Programm iQ5 2.0 Standard Edition (Biorad).

TaqMan

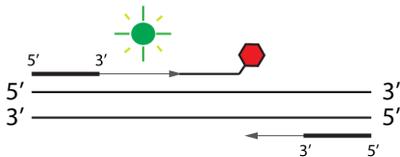
1) An den Enden der TaqMan-Sonde ist je ein fluoreszierender Farbstoff (Reporter) und ein Quencher gekoppelt.



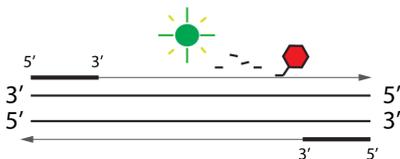
2) So lange die TaqMan-Sonde intakt ist wird die Fluoreszenz durch den Quencher unterdrückt.



3) Die Taq-Polymerase besitzt zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Dadurch wird die Sonde während der Synthese des Gegenstranges abgebaut.



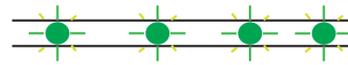
4) Quencher und Fluorophor entfernen sich voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. Diese ist umso größer je mehr Amplifikate entstehen.



- Reporter
- ⬡ Quencher

SYBR Green

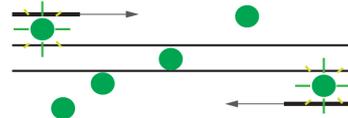
1) SYBR Green ist ein DNA-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet und dadurch fluoresziert.



2) Bei der Denaturierung der DNA wird der Farbstoff freigesetzt und die Fluoreszenz ist drastisch herabgesetzt.



3) Genspezifische Primer binden an die DNA und bilden ein PCR-Produkt an das SYBR Green bindet.



4) Je mehr Produkt gebildet wird, umso stärker ist die Fluoreszenz.

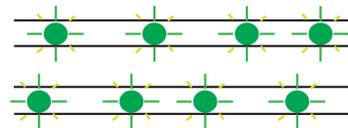


Abbildung 2.5: VERGLEICH ZWISCHEN TAQMAN- UND SYBR GREEN BASIERTER QUANTIFIZIERUNG DER GENEXPRESSION. (verändert nach: Real-Time PCR Applications Guide, Biorad)

2.12.15.1 TaqMan basierte Quantifizierung

Eine Liste der verwendeten TaqMan-Sonden ist in Abschnitt 2.10.4 zu finden. Alle TaqMan-Sonden wurden von der Firma Applied Biosystems bezogen. Die PCR wurde mit Hilfe des peqGOLD Hot Start-Mix der Firma Peqlab durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein zweifach konzentriertes Gemisch aus peqGOLD 'Hot Start' Taq-DNA-Polymerase,

peqGOLD dNTPs und Reaktionspuffer. 10 µl des Reaktionsgemisches wurden mit 1 µl TaqMan-Sonde und ca. 5 ng cDNA gemischt und auf ein Volumen von 20 µl mit nuklease-freiem Wasser gebracht. Jede Probe wurde in Triplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert, die anschließend mit einer selbstklebenden Folie versiegelt wurde. Die qPCR wurde in einem iCycler iQ5 (Biorad) nach folgendem Programm durchgeführt:

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
95 °C	15 s	40
60 °C	1 min	Real-Time

2.12.15.2 SYBR Green basierte Quantifizierung

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.10.3 aufgelistet. Die SYBR Green basierte Quantifizierung der Genexpression erfolgte ähnlich der TaqMan basierten Methoden. Allerdings wurde hier als Mastermix *KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix for Bio-Rad iCycler* (Peqlab) verwendet. Folgendes Programm wurde zur Amplifikation verwendet:

Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
95 °C	3 min	1
95 °C	15 s	40
55 °C	30 s	
72 °C	30 s	
55-95 °C	30 s	Schmelzkurve

Um eventuell entstandene unspezifische Produkte erkennen zu können wurde am Ende der Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

2.13 Zellbiologische Methoden

2.13.1 Auftauen, Passagieren und Einfrieren von Zellen

Zellen wurden zum Aussäen dem flüssigen Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurden sie in 10 ml vorgewärmtes Medium überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm wurde das Pellet in 1 ml frischem Medium sorgfältig resuspendiert. Der komplette Ansatz wurde in eine 10 cm Zellkulturschale, die 9 ml vorgewärmtes Medium enthielt, pipettiert. Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 70-90 %. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. 1 ml Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS) wurde in der Schale verteilt und diese dann einige Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach vollständigem Ablösen der Zellen, was mikroskopisch überprüft wurde, wurde die Re-

aktion durch Zugabe eines Überschusses an frischem Medium gestoppt. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in dem Medium resuspendiert und vereinzelt. Der gewünschte Anteil der Zellsuspension wurde auf einer Schale mit frisch vorgelegtem Medium verteilt. Alle Lösungen wurden vor Benutzung im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Für die Lagerung von Zellen über einen längeren Zeitraum wurden zwischen 5×10^6 und 1×10^7 Zellen abgenommen und pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in eine spezielle Einfrierbox (Mr. Frosty, Nalgene) mit Isopropanol gestellt und über Nacht bei -80 °C schrittweise heruntergekühlt. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: 70 % DMEM
20 % FCS
10 % DMSO

2.13.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und 4 Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Medium konnte nach folgender Formel errechnet werden:

Mittelwert der 4 Großquadrate $\times 10^4 =$ Zellzahl pro ml Medium

2.13.3 Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat

Bei der Calciumphosphat-Methode wird die DNA mit Calciumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung gemischt. Dabei bilden sich DNA-Calciumphosphat-Präzipitate, die von der Zelle endozytiert werden. Als phosphathaltiger Puffer wurde in diesem Falle HBS (*HEPES buffered saline*) verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so gesplittet, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 50 % hatten. Zur Transfektion von Zellen in einer Kulturschale (Durchmesser: 10 cm) wurden 10 µl DNA ($c=1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 30 µl Calciumchlorid (2,5 M) und 260 µl steriles *Aqua bidest* gemischt. Diese Lösung wurde tröpfchenweise unter ständigem Mischen in 300 µl 2x HBS pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur konnte die DNA/HBS-Mischung auf die Zellen, deren Medium frisch gewechselt worden war, gegeben werden. Danach wurden die Zellen 3 Stunden in den Brutschrank gestellt und anschließend 3x mit PBS gewaschen, um die Präzipitate zu entfernen. Die Zellen wurden weitere 24-48 h kultiviert, bis sie dann geerntet oder fixiert wurden.

2x HBS: 50 mM HEPES
pH 7,05 274 mM Natriumchlorid
10 mM Kaliumchlorid
1,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat
10 mM Glukose

2.13.4 Transiente Transfektion mittels Fugene HD

Bei der transienten Transfektion mittels Fugene HD macht man sich das Prinzip der Transfektion via Lipofektion zu Nutze. Am Vortag wurden 2×10^5 Zellen in ein 12-Well ausgesät. Zur Transfektion wurden 50 μ l Opti-MEM mit 1 μ g DNA und 3 μ l Fugene HD-Reagenz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen, deren Medium vorher gewechselt wurde, pipettiert. Die maximale Expression des durch die transiente Transfektion eingebrachten Proteins war nach 24-48 Stunden erreicht.

2.13.5 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung kultivierter Zellen

Die für eine indirekte Immunfluoreszenzmarkierung bestimmten Zellen wurden in einer 12-Well-Platte auf runden, sterilen Deckgläschen (Durchmesser 15 mm) ausgesät. Um die Haftung der Zellen zu verbessern, wurden die Deckgläschen vorher mit 100 μ g/ml Poly-L-Lysin (PLL) in H_2O für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet und danach zwei Mal mit *Aqua bidest* gewaschen. Die Fixierung wurde in dem Well, in dem die Zellen kultiviert wurden durchgeführt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Danach wurde das PBS gründlich entfernt und frisch verdünntes 4%iges PFA in PBS zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Falls intrazelluläre Proteine gefärbt werden sollten, mussten die Zellen 10 min in 0,2 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert werden, um ein Eindringen der Antikörper in die Zelle zu ermöglichen. Nach erneutem Waschen (3 x) wurden die Zellen 30 min mit 3 % BSA in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Die folgende Immunfärbung wurde in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zunächst wurden die entsprechende Verdünnung des Primärantikörpers in 3 % BSA in PBS eine Stunde auf die Zellen gegeben. Daraufhin folgten drei kurze Waschschrte mit PBS, bevor die Zellen eine Stunde mit der Sekundärantikörperlösung bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Sollten zusätzlich die Zellkerne markiert werden, wurde in die Sekundärantikörperlösung der Kernfarbstoff DAPI (Diamidinphenylindol) in einer Konzentration von 1 μ g/ml dazugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und einmaligem Waschen mit *Aqua bidest* konnten die Proben in GelMount + 50 mg/ml Dabco eingebettet werden.

2.13.6 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird die DNA dauerhaft in das Genom integriert, so dass auch nach mehreren Zellteilungen das Protein von Interesse in der Zelle exprimiert wird. Die Integration der DNA in das Genom verläuft zufällig in ca. 1 von 10^5 Zellen. Um Zellen, die stabil transfiziert wurden selektieren zu können, enthielt der verwendete Vektor eine Neomycin-Kassette, die in eukaryotischen Zellen dazu führt, dass diese resistent gegen das Antibiotikum G418 sind. Die Verträglichkeit von G418 unterscheidet sich je nach Zelltyp und liegt normalerweise zwischen 100 und 1000 μ g/ml. Um herauszufinden welche G418-Konzentration für die hier verwendeten HEK293-Zellen (nicht HEK293T, da diese von

Natur aus resistent gegen G418 sind) benötigt wird, wurde ein G418-Verträglichkeitstest durchgeführt. Dazu wurden 2×10^5 Zellen pro 12-Well ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen an G418 (0-1000 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) behandelt. Nach 3 und 5 Tagen wurde die Zellzahl jedes Wells bestimmt und die Konzentration bei der nach 3 Tagen mehr als die Hälfte der Zellen und nach 5 Tagen alle Zellen gestorben waren, wurde zur späteren Selektion verwendet. Für HEK293-Zellen lag die G418-Konzentration bei 600 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Zur Erhöhung der Zellen, die die DNA stabil in das Genom einbauen, wurden 20 μg Vektor-DNA (GFP-Trim71 pN1 und GFP pN1) mit dem Restriktionsenzym *NdeI* linearisiert und anschließend gefällt (siehe Abschnitt 2.12.3). Die Zellen wurden mittels Calciumphosphat transfiziert (siehe Abschnitt 2.13.3). Nach 48 Stunden wurde G418 zur Selektion der stabil transfizierten Zellen ins Medium gegeben und alle 2-3 Tage erneuert. Nach einer Woche konnten die stabil transfizierten Zellen zur Isolation individueller Zellklone vereinzelt werden. Dazu wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und auf einen Titer von 10 Zellen pro ml gebracht. Jeweils 100 μl Zellsuspension wurden mit Hilfe einer Repetierpipette in ein 96-Well pipettiert, so dass sich theoretisch nur eine Zelle pro Well befinden sollte.

Die Zellen wurden so lange kultiviert bis ein Gelbfärbung des Medium zu sehen war. Wells mit verfärbtem Medium wurden mikroskopisch auf ihre Transfektion überprüft und nur solche mit deutlicher Fluoreszenz wurden weiter kultiviert und später mittels Western-Blot (siehe Abschnitt 2.14.4) verifiziert.

2.13.7 MTT-Proliferationstest

Der MTT-Assay ist ein Test zur Bestimmung der Zellviabilität und -proliferation. Der Nachweis erfolgt dabei über die Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs MTT (Dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid) zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazan. Diese Reaktion kann nur in metabolisch aktiven, das heißt vitalen, sich teilenden Zellen stattfinden. Dementsprechend ist die Menge des umgesetzten Farbstoffes proportional zur Anzahl an proliferierenden Zellen.

Je 2×10^3 Zellen wurden in ein Well einer 96-Well-Platte ausgesät und unterschiedlich lang inkubiert (0-168 h). Nach dem gewünschten Zeitpunkt wurden 10 μl MTT (5 mg/ml) in Medium gelöst, zu jedem Well pipettiert und 4 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μl 0,1 M Salzsäure (HCl) in Isopropanol gestoppt. Durch eine weitere Inkubation von 1 h bei 37 °C wurde der Farbstoff gelöst und die Proben konnten nun bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm in einen Mikrotiter-Plattenreader (Tecan) ausgelesen werden. Um Pipettierfehler auszuschließen wurden von allen Proben Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.13.8 Zellsynchronisierung

Zellsynchronisierung ist eine wichtige Methode zur Untersuchung der Aktivität von Zellzyklusproteinen. Diese werden je nach Zellzyklusphase unterschiedlich stark exprimiert, weshalb es für die Analyse wichtig ist, nur Zellpopulationen einer definierten Zellzyklusphase

zu verwenden. Durch die Zugabe von Chemikalien oder den Entzug von Wachstumsfaktoren können die Zellen in der gleichen Zellzyklusphase geblockt und synchronisiert werden. Im Folgenden werden zwei, der in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Zellsynchronisierung, näher erläutert.

Synchronisierung der Zellen in der G₂/M-Phase durch Nocodazol-Behandlung

Nocodazol ist ein Mikrotubuli-Inhibitor, der durch Bindung an die Mikrotubuli-Enden eine Anlagerung weiterer Tubulinuntereinheiten verhindert. Dadurch wird die Mikrotubuli-Polymerisation blockiert, was letztlich zu deren Depolymerisation führt. Zellen, die mit Nocodazol behandelt werden sind nicht in der Lage einen mitotischen Spindelapparat auszubilden und verharren in der Prometaphase der Mitose.

HEK293-Zellen wurden in der G₂/M-Phase synchronisiert, indem sie 16 h mit 100 ng/μl Nocodazol behandelt wurden. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit frischem Medium weiterkultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet (0, 3, 6, 8 h). Die Expression verschiedener Zellzyklusproteine wurde mittels Western-Blot (siehe Abschnitt 2.14.4) nachgewiesen.

Synchronisierung der Zellen in der G₀-Phase durch Serumentzug

Eine Synchronisierung der Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus kann durch Reduktion der Serumkonzentration im Wachstumsmedium erreicht werden. Da das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren nur in den ersten Stunden der G₁-Phase notwendig ist, durchlaufen die Zellen den begonnenen Zellzyklus komplett und verharren danach in der G₀-Phase.

Um HEK293-Zellen in der G₀-Phase zu arretieren wurden sie 60 h mit Hungermedium (DMEM, 1 % FCS) kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und unterschiedlich lang (0, 3, 8, 16, 24, 30, 48 h) mit Voll-Medium (DMEM, 10 % FCS) weiterkultiviert. Die Expression verschiedener Zellzyklusproteine wurde mittels Western-Blot (siehe Abschnitt 2.14.4) nachgewiesen.

2.13.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder kurz FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) ist eine Methode mit der man Zellen zählen und mit unterschiedlichen Markern gekennzeichnete Zellpopulationen sortieren kann. Dazu wurden 1×10^5 - 1×10^6 in FACS-Röhrchen pelletiert und für 15 min mit einem nach Herstellerangaben verdünnten, fluorochromierten Antikörper bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml kaltem PBS und Zentrifugation (10 min, 300 g) gewaschen und je nach Zellzahl in 50-100 μl PBS resuspendiert. Am Durchflusszytometer BD FACS Canto II wurden die Proben gemessen und die Ergebnisse mit Hilfe des Analyseprogramms FlowJo ausgewertet.

2.13.10 Isolation und kurzzeitige Kultivierung primärer Keratinozyten aus neugeborenen Mäusen

Zur Isolation und kurzzeitigen Kultivierung primärer Keratinozyten wurde ein verändertes Protokoll von Lichti *et al.* [97] verwendet. Die Haut von neugeborenen Mäusen wurde präpariert, indem zunächst alle Extremitäten entfernt wurden. Mit Hilfe eines Schnittes entlang der dorsalen Mittellinie des Körpers konnte nun die Haut abgelöst werden. Diese wurde für 2 min in 70%igem Ethanol getränkt und danach in PBS gewaschen. Mit der Dermisseite nach unten wurde die Haut über Nacht in frisch angesetzter, steril filtrierter Dispase II (30 mg/ml) in Keratinozytenmedium bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Haut für 1 h in 0,25 % Trypsin in Medium bei 37 °C inkubiert. Danach konnte die Epidermis vorsichtig von der Dermis gelöst und mit Hilfe einer Rasierklinge zerteilt werden. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis und in vorgekühlten Lösungen und Reaktionsgefäßen. Durch Zentrifugation (280 g, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen pelletiert und anschließend in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden durch ein Zellsieb (100 µm) vereinzelt und anschließend gezählt. Ca. 3×10^6 Zellen wurden in eine 6 cm Zellkulturschale ausgesät. Damit die Keratinozyten besser adhäreren, wurden die Schalen vorher 30 min bei 37 °C mit 0,05 % Kollagen A beschichtet. Das Medium der Zellen wurde täglich erneuert.

2.13.11 Untersuchung der Proliferation mittels Ethynyldeoxyuridin (EdU)

Die Analyse der Proliferation von primär isolierten Keratinozyten erfolgte unter Verwendung des *Click-iT Plus EdU Imaging Kits* der Firma Life Technologies. Dabei handelt es sich um eine schnellere Alternative zur bisher üblichen, Antikörper vermittelten Detektion BrdU⁺-Zellen. EdU (Ethynyldeoxyuridin) ist wie BrdU ein synthetisch hergestelltes Thymidin-Analogon, das während der S-Phase des Zellzyklus anstelle des Nukleosids Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden kann. Nach einer durch Kupfer(I)-katalysierten Click-Reaktion zwischen Fluorochrom und EdU, fluoreszieren EdU-haltige Zellkerne in der jeweiligen Wellenlänge des gebundenen Farbstoffes und können mikroskopisch ausgewertet werden.

Je Deckglas wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen ausgesät und über Nacht bei 37° C inkubiert. Zur besseren Adhäsion wurden die Deckgläser vorher 30 min bei 37 °C mit 0,05 % Kollagen A beschichtet. Die Färbung wurde strikt nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden die Zellkern mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 gegengefärbt.

Die Auswertung des Proliferationsassays erfolgte mikroskopisch. Dazu wurden je Probe 10 Gesichtsfelder ausgezählt. Der Quotient aus Gesamtzellzahl und EdU⁺-Zellen entspricht der Proliferationsrate.

2.13.12 Isolation primärer Keratinozyten aus adulter muriner Epidermis

Die Isolation primärer Keratinozyten erfolgte nach dem leicht geänderten Protokoll von J. A. Nowak und E. Fuchs [129]. Die Haare der toten Maus wurden mit einem Elektrorasierer vollständig entfernt. Mit Hilfe von Schere und Pinzette wurde die komplette Haut präpariert. Dazu wurde zunächst der Bauch vom Schwanz bis zum Kopf aufgeschnitten und Querschnitte oberhalb des Schwanzes und unterhalb des Kopfes gesetzt. Die Haut der Vorder- und Hinterpfoten wurde ausgespart. Danach wurde das Fettgewebe und Blutgefäße mit einem Skalpell abgeschabt. Es ist wichtig, dass die Dermis komplett frei präpariert wird (sieht dann ledrig aus), da sonst die Epidermis nur schwer abgelöst werden kann. Die Haut wurde mit der Dermisseite nach unten in eine 10 cm Schale mit 0,25 % Trypsin in PBS gelegt und 3 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Epidermis konnte nun abgelöst und mit einer Pinzette kleingezupft werden. Anschließend wurden die Keratinozyten 15 min bei 37 °C mit DNaseI (130 U/ml) in DMEM behandelt. Die Zellen wurden durch eine Zellsieb (erst 70 µm dann 40 µm) weiter vereinzelt und mit PBS gewaschen. Je nach weiterer Vorgehensweise wurde das Zellpellet entweder in TRIzol aufgenommen und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C eingefroren oder die Zellen wurden separiert (siehe Abschnitt 2.13.13).

2.13.13 Isolation epidermaler Stammzellen mittels magnetischer Zellseparation (MACS)

Mittels magnetischer Zellseparation (MACS) lassen sich verschiedene Zellpopulation voneinander trennen. Dabei werden die Zellen mit einem Antikörper gegen einen Marker der jeweiligen Zellpopulation inkubiert. Dieser Antikörper ist an magnetische Kügelchen gekoppelt, so dass markierte Zellen über einen Magneten von den anderen isoliert werden können.

In diesem Falle sollten epidermale Stammzellen von Keratinozyten getrennt werden. Als Marker wurde dafür CD34 verwendet, der in der Haut spezifisch in den Stammzellen der Haarfollikel exprimiert wird [126]. Dazu wurden primäre Keratinozyten, wie in Abschnitt 2.13.12 beschrieben, isoliert und die Zellzahl bestimmt. 5×10^5 Zellen wurden als Kontrolle für die Durchflusszytometrie abgenommen. Die übrigen Zellen wurden pelletiert (8 min, 300 g) und zum Macsen verwendet. Das Pellet wurde in 100 µl MACS-Puffer mit 2 µl CD34 FITC Antikörper je 1×10^7 Zellen resuspendiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1-2 ml MACS-Puffer und anschließender Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und danach in 90 µl MACS-Puffer mit 10 µl Anti-FITC MicroBeads je 1×10^7 Zellen resuspendiert. Die Isolation erfolgte an einem automatischen Zellseparator (Automacs pro, Miltenyi). Zur Kontrolle der Reinheit wurden danach 1×10^5 mit dem Keratinozytenmarker Integrin $\alpha 6$ (CD49f) gegengefärbt und gefacst. Alle übrigen Zellen wurden in 300 µl TRIzol aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

MACS-Puffer: 0,5 % FCS
2 mM EDTA
PBS

2.13.14 Isolation und indirekte Immunfluoreszenzmarkierung von *Whole-Mount-Präparaten muriner Epidermis*

Zur Herstellung epidermaler *Whole-Mounts*, das heißt Totalpräparate der Epidermis wurden Mausschwänze verwendet. Die Schwanzepidermis ist im Gegensatz zur dorsalen Epidermis dicker und kann deshalb leichter am Stück präpariert werden. Dazu wurde der Schwanz einer toten Maus entfernt und die Haut mit Hilfe eines Skalpell und einer Pinzette vom Knochen getrennt. Die Haut wurde mit der dermalen Seite nach unten auf ein Stück Nitrozellulose gelegt, um zu verhindern, dass sie sich zusammenrollt. Dann wurde sie in ein 15 ml Reaktionsgefäß gefüllt, mit 5 mM EDTA in PBS transferiert und 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach konnte die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis getrennt werden. Die Epidermis wurde in ca. 1 cm² große Stücke geschnitten und 2 h in 4 % PFA in PBS bei Raumtemperatur fixiert. Wurden die Proben nicht sofort für eine Immunfärbung verwendet, so konnten sie für mehrere Tage in 2 % Natriumazid in PBS gelagert werden. Für die indirekte Immunfärbung wurden die Epidermisstücke für eine Stunde mit der Haarfollikelseite nach unten in Blockierlösung inkubiert. Danach konnten die Präparate über Nacht in eine Lösung aus verdünntem Primärantikörper in Blockierlösung gelegt werden. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die *Whole-Mounts* 5x á 45 min mit 0,2 % Tween in PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls in Blockierlösung verdünnt und die Färbung erfolgte für mindestens eine Stunde in einer dunklen, feuchten Kammer. Die Epidermis wurde mit der Haarfollikelseite nach unten auf ein Deckgläschen gelegt und mit Fluoroshield auf einem Objektträger eingebettet. Mikroskopiert wurden die Proben an einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM FV-1000) der Firma Olympus.

Blockierlösung: 0,5 % Milchpulver
0,25 % fish skin gelatin (FSG)
0,5 % Triton X-100
0,9 % Natriumchlorid
20 mM HEPES

2.14 Proteinbiochemische Methoden

2.14.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Analyse der Proteinexpression in Säugetierzellen wurden Zellen einer 10 cm Schale in 50-100 µl Lysepuffer mit frisch zugesetzten Proteaseinhibitoren resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Waren nur zytoplasmatische Proteine von Interesse, wurde der Igepal-Lysepuffer verwendet. Um Kernproteine zu untersuchen wurde ein Totalextrakt mittels

RIPA-Lysepuffer hergestellt. Dieser enthält neben Triton X-100 Natriumdeoxycholat und SDS, die als ionische Detergenzien in der Lage sind die Kernmembran aufzulösen. Nach der Lyse wurden die Ansätze 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um das Lysat von unlöslichen Bestandteilen (Zelldebris) zu trennen. Das Lysat wurden entweder sofort zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Igepal-Lysepuffer:	10 mM	HEPES
pH 7,5	10 mM	Magnesiumchlorid
	10 mM	Kaliumchlorid
	150 mM	Natriumchlorid
	1 %	Igepal
frisch zugeben:	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
	2 µg/ml	Antipain
	1 mM	Benzamidin
	0,1 mM	PMSF
RIPA-Lysepuffer:	150 mM	Natriumchlorid
pH 7,5	1 %	Triton X-100
	0,5 %	Natriumdeoxycholat
	0,1 %	SDS
	50 mM	Tris
frisch zugeben:	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
	2 µg/ml	Antipain

2.14.2 BCA-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde kolorimetrisch mittels BCA-Reagenz durchgeführt [157]. Dazu wurden je 3 µl Proteinlysate in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Durch Zugabe von 200 µl frisch gemischter BCA-Färbelösung und 10-minütiger Inkubation bei 65 °C entstand ein violetter Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt wurde. Als Kalibrierstandard diente eine Verdünnungsreihe (0-4 µg/µl) aus bovinem Serumalbumin (BSA) in dem jeweiligen Lysepuffer. Mittels linearer Regression konnte aus den Extinktionswerte der Standardreihe eine Eichgerade erstellt werden, die zur Proteinkonzentrationsberechnung der Proben verwendet wurde. Zur Verringerung der Pipettierfehler wurden Zweifachbestimmungen durchgeführt.

2.14.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden Polyacrylamidgele gegossen, die dem von Laemmli [89] entwickelten diskontinuierlichen System entspra-

chen. Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurde eine Gießapparatur der Firma Biorad verwendet, mit deren Hilfe Gele mit einer Dicke von 1 mm gegossen werden konnten. Zuerst wurden Trenngele unterschiedlicher Acrylamidkonzentration (6-15 %) gegossen, denen nach Polymerisation ein Sammelgel mit einer Acrylamidmenge von 5 % aufgesetzt wurde. 20 µg der zu trennenden Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer gemischt und im Thermoblock bei 95 °C 5 min denaturiert. Die Elektrophorese wurde in Laemmli-Puffer bei einer Spannung von zunächst 80 Volt durchgeführt, die zur Auftrennung der Proteine im Trenngel auf 120 Volt erhöht wurde. Anschließend wurden die Gele für den Proteintransfer auf Nitrozellulose verwendet (siehe Abschnitt 2.14.4).

Trenngel:	6-15 %	Acrylamid	Sammelgel:	6-15 %	Acrylamid
pH 8,8	0,375 M	Tris	pH 6,8	0,125 M	Tris
	0,1 %	SDS		0,1 %	SDS
	0,1 %	APS		0,1 %	APS
	0,08 %	TEMED		0,1 %	TEMED

5x SDS-Probenpuffer:	100 mM	Tris/HCl
pH 6,8	4 %	SDS
	0,1 %	Bromphenolblau
	20 %	Glycerin
	200 mM	DTT

10x Laemmli-Laufpuffer:	0,25 M	Tris
	2,5 M	Glycin
	1 %	SDS

2.14.4 Proteintransfer (Western-Blot)

Der Western-Blot ist ein Verfahren zur Immobilisierung von Protein, bei dem die Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden [165]. Dazu wurde das Mini Trans-Blot System der Firma Biorad verwendet. Die Nitrozellulosemembran und das Polyacrylamidgel wurden beidseitig mit jeweils zwei Filterpapieren umgeben und eingebettet zwischen zwei Schwämmen in eine Tankblot-Kassette gelegt. Diese Tankblot-Kassette wurde vollständig in eine mit kaltem Transfer-Puffer gefüllte Kammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V für 2 h im Kühlraum. Der erfolgreiche Transfer der Proteine wurde über eine Färbung der Membran mit Ponceau Rot (5 % Essigsäure, 0,1 % Ponceau S) überprüft. Die Membran wurde kurz in der Lösung geschwenkt und anschließend so lange mit VE-Wasser abgespült, bis der Hintergrund weiß und die Proteinbanden ausreichend rot gefärbt waren.

Transfer-Puffer: 192 mM Glycin
25 mM Tris
20 % Methanol

2.14.5 Immundetektion einzelner Proteine

Der Nachweis einzelner Proteine erfolgte entweder über proteinspezifische Antikörper oder über Antikörper gegen den Immuntag des Vektors. Die Nitrozellulosemembran wurde zunächst für eine Stunde in eine Blockierlösung (5 % Magermilchpulver gelöst in TBST) auf einer Wippe geschwenkt. Danach folgte eine Inkubation mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper (Verdünnungen siehe Tabelle in Abschnitt 2.9.1) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Der primäre Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in TBST für 10 min entfernt. Daraufhin wurde der in TBST verdünnte Sekundärantikörper für eine Stunde auf die Membran gegeben, die danach wie zuvor beschrieben gewaschen wurde. Die Proteinbanden wurden mittels des an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzyms Peroxidase (HRP) durch eine Chemilumineszenzreaktion (ECL) nachgewiesen. Dazu wurde die Membran auf eine Folie in eine Röntgenfilmkassette gelegt und das frisch angesetzte ECL Western-Blot Substrat darauf pipettiert. Nach 5 min Inkubation wurde die Membran mit einer zweiten Folie bedeckt und die überschüssige Lösung entfernt. Das Signal wurde durch Auflegen eines Röntgenfilmes und dessen anschließende Entwicklung in einer Entwicklermaschine sichtbar gemacht. Die Belichtungszeit richtete sich nach der Intensität des jeweiligen Signals. Die entwickelten Filme wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners digitalisiert.

TBST: 50 mM Tris
pH 7,5 140 mM Natriumchlorid
0,05 % Tween

2.14.6 Blot-Regeneration

Um bereits gefärbte Nitrozellulosemembranen zur Immundetektion anderer Proteine wieder verwenden zu können, wurden die an die Membran gebundenen Antikörper durch "Strippen" entfernt. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran in einer Glasschale mit Stripping-Puffer für 20 min auf 150 °C erhitzt und danach mehrere Male in TBST gewaschen.

Stripping-Puffer: 2 % SDS
pH 6,8 62,5 mM Tris
100 mM β -Mercaptoethanol

2.14.7 Coimmunpräzipitation

Zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurden Coimmunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurden Konstrukte der zu untersuchenden Proteine mittels Calciumphosphat (siehe Abschnitt 2.13.3) in HEK293T- Zellen transfiziert. Eines dieser Proteine

war dabei an einen Ig-tag gekoppelt, der eine hohe Affinität zu magnetischen Protein-G gekoppelten Dynabeads hat, welche zur Präzipitation verwendet wurden. Um unspezifische Bindungen des Ig-tags auszuschließen wurde als Kontrolle der Ig-Leervektor mit dem Konstrukt des zweiten Proteins mitgeführt. 24-48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und Zellysate (siehe Abschnitt 2.14.1) in IP-Puffer hergestellt. 20 µg der Zellysate wurden als Expressionskontrolle abgenommen. Von den Lysatresten wurden gleiche Mengen für die Coimmunpräzipitation eingesetzt, je Ansatz wurden 50 µl Dynabeads dazugegeben und die Lösung eine Stunde bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Mit Hilfe eines Magnetständers wurden die Dynabeads 5x mit IP-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 20 µl 2x SDS-Probenpuffer und anschließendem Aufkochen der Proben bei 95 °C für 5 min. Die Auswertung der Coimmunpräzipitation erfolgte mittels Western-Blot (siehe Abschnitt 2.14.4) und anschließender Immundetektion (siehe Abschnitt 2.14.5).

IP-Puffer:	10 mM	HEPES
	2 mM	Magnesiumchlorid
	10 mM	Kaliumchlorid
	0,1 mM	Triton X-100
	0,5 mM	EDTA
	150 mM	Natriumchlorid
frisch zugeben:	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
	2 µg/ml	Antipain
	1 mM	Benzamidin
	0,1 mM	PMSF

2.14.8 RNA-Immunpräzipitations-Microarray (RIP-Chip)

Bei der RIP-Chip-Analyse handelt es sich um eine Immunpräzipitation eines RNA-bindenden Proteins (RBP) verbunden mit einem anschließenden Microarray (Chip). Diese Methode dient dem Nachweis von RNA-Protein-Interaktionen und wurde zum ersten Mal im Jahr 2006 beschrieben [82]. In diesem Fall wurde das RNA-bindende Protein Argonaute 2 (Ago2) präzipitiert. Dabei handelt es sich um den katalytisch aktiven Bestandteil des RISC-Komplexes (*RNA-induced silencing complex*), der eine zentrale Rolle in der Genregulation durch RNA-Interferenz spielt (siehe Abschnitt 1.1). Bei der Präzipitation konnten also nicht nur mRNA, sondern auch miRNAs identifiziert werden. Der genaue Ablauf der Ago2-RIP-Chip ist in Abbildung 2.6 dargestellt.

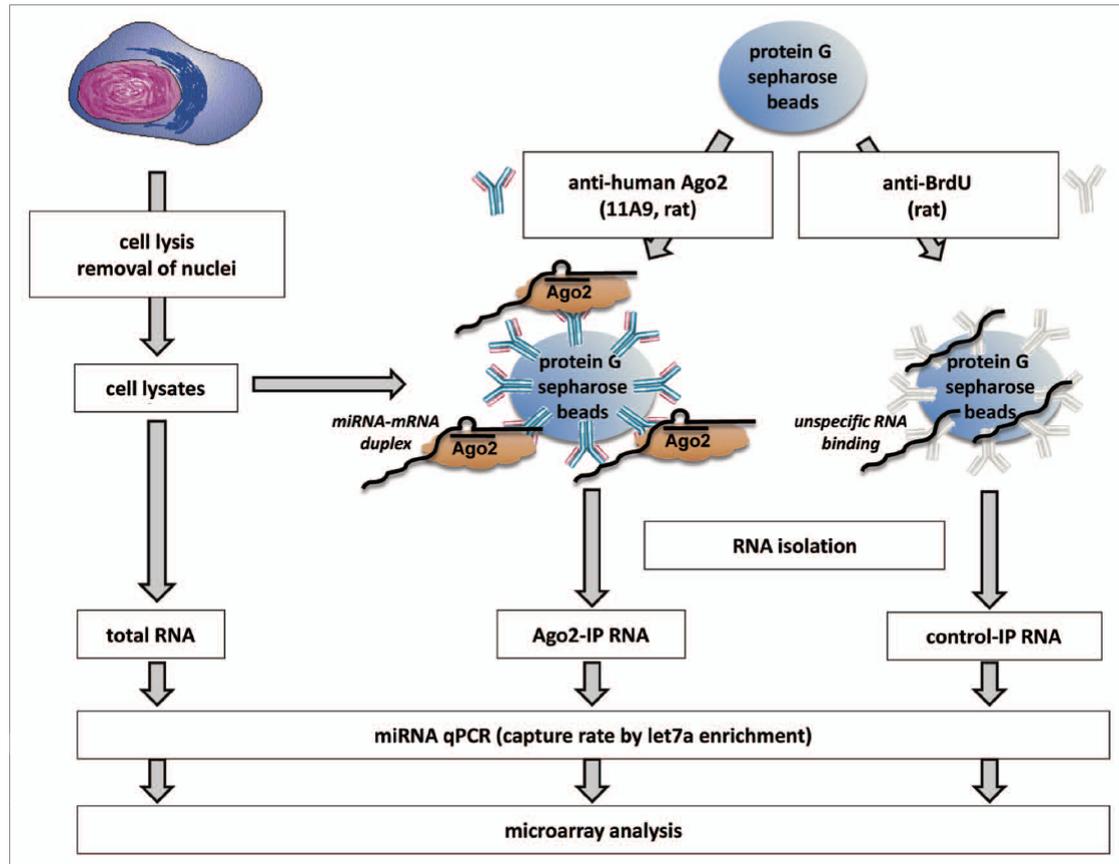


Abbildung 2.6: ABLAUF DES RNA-IMMUNPRÄZIPITATIONS-MICROARRAYS (RIP-CHIP). Protein-G-Sepharosekügelchen werden mit einem monoklonalen Antikörper gegen Ago2 oder mit einem Kontrollantikörper (anti-BrdU) beschichtet. Die Zellen werden lysiert und mit den beschichteten Sepharosekügelchen inkubiert. Nach der Immunpräzipitation kann die gebundene RNA durch Trizol isoliert werden. Die Effizienz der IP wird durch eine qPCR auf eine häufig vorkommenden miRNA (let7) kontrolliert, bevor die Proben in einem Microarray genau analysiert werden. Abbildung aus Malterer *et al.*, 2011 [109]

2.14.8.1 RNA-Immunpräzipitation (RIP)

Die RNA-Immunpräzipitation wurde mit HEK293-Zellen, die stabil mit einem humanen GFP-Trim71 Konstrukt transfiziert wurden (siehe Abschnitt 2.13.6) durchgeführt. Als Kontrolle wurden mit GFP transfizierte HEK293-Zellen verwendet. Die Zellen wurden so auf 15 cm Schalen ausgesät, dass sie am Tag des Versuches eine Konfluenz von ca. 70 % hatten. Von jeweils vierzig 15 cm Zellkulturplatten wurden Zellen geerntet und diese in 10 ml Lysepuffer resuspendiert. Dieser Lysepuffer enthielt noch keine Detergenzien (Igepal, NaF), um die Zellen zunächst zu vereinzeln. Danach wurden weitere 10 ml Lysepuffer mit der doppelten Menge Detergenzien zugegeben und 30 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert um das Lysat von Zelldebris zu befreien. 100 µl Lysat wurden für eine Total-RNA-Kontrolle abgenommen. Der restliche Überstand wurde bis zur Immunpräzipitation (IP) bei -80 °C gelagert. Vor der IP mussten die Sepharosekügelchen mit den Antikörpern inkubiert werden. Dafür wurden 5 ml DMEM, 60 µl Sepharosebeads und 6 µg Ago2-Antikörper bzw.

6 µg Kontrollantikörper gegen Bromdesoxyuridin (BrdU) in eine 5 ml Zentrifugensäule gegeben und bei 4 °C über Nacht auf einem Drehrad inkubiert. Die Säule wurde 2x mit 3 ml Lysepuffer gewaschen, bevor das aufgetaute Zelllysate dazugegeben wurde. Es folgte eine weitere Inkubation auf dem Drehrad bei 4 °C für 3 h. Danach wurde die Säule 5x mit eiskaltem IP-Waschpuffer und um die Detergenzien zu entfernen 1x mit PBS gewaschen. Die gebundene RNA wurde durch Zugabe von 700 µl TRIzol eluiert und mit Hilfe des miRNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Die Effizienz der RNA-Immünpräzipitation wurde durch eine qPCR auf die miRNA let7a überprüft (siehe Abschnitte 2.12.14 und 2.12.15).

Lysepuffer:	150 mM	KCl
pH 7,5	25 mM	Tris
	0,5 %	Igepal
	1 mM	Natriumfluorid (NaF)
	2 mM	EDTA
frisch zugeben:	0,5 mM	DTT
	10 µg/ml	Aprotinin
	10 µg/ml	Leupeptin
	2 µg/ml	Antipain
	1 mM	Benzamidin
IP-Waschpuffer:	300 mM	Natriumchlorid (NaCl)
pH 7,5	50 mM	Tris
	0,01 %	Igepal
	5 mM	Magnesiumchlorid (MgCl ₂)

2.14.8.2 Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schultze, Genomik und Immunregulation des LIMES-Institutes Bonn durchgeführt. Sie übernahmen sowohl die Aufarbeitung der RNA, als auch den Microarray und die bioinformatische Auswertung der Daten. Deshalb werden die einzelnen Schritte hier nur kurz zusammengefasst. Die Qualität der RNA wurde durch Messung des Quotienten der optischen Dichte 260/280 nm bestimmt. Außerdem wurde die Intaktheit der ribosomalen 28S und 18S RNA mittels Agarsegelelektrophorese überprüft. Aus 100 ng RNA wurde mit Hilfe des *Illumina TotalPrep RNA amplification kit* (Applied Biosystems, Darmstadt) cDNA und Biotin-gekoppelte cRNA synthetisiert. Zur Transkriptom-Analyse wurde die cRNA auf den *HumanHT-12 v4 Expression BeadChip* der Firma Illumina (San Diego) hybridisiert und mit dem *Illumina BeadStation 500X* System gescannt. Die erhaltenen Daten wurden unter Verwendung der Partek GS Software ausgewertet.

2.15 Histologische Methoden

2.15.1 Fixierung, Einbettung und Herstellung von Gewebeschnitten

Frisch präparierte murine Haut- und Tumorproben wurden über Nacht in einer gebrauchsfertigen Zinklösung fixiert, anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms (Leica RM 2155) wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die durch Aufschwimmen in einem Wasserbad geglättet wurden, bevor sie auf speziell beschichtete Objektträger überführt wurden. Diese wurden über Nacht bei 37 °C getrocknet.

2.15.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) dient der mikroskopischen Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen. Dabei werden durch den natürlichen Farbstoff Hämatoxylin alle sauren Bestandteile der Zelle (Zellkern, DNA, Ribosomen) blau gefärbt und Eosin färbt alle basischen Strukturen (Zytoplasma, Mitochondrien, Kollagen) rot.

Bevor die Paraffinschnitte gefärbt werden konnten, mussten sie entparaffiniert und rehydriert werden. Dazu wurden sie jeweils 2 min in Xylol, einer abnehmenden Ethanolreihe (100 %, 75 %, 50 %) und in *Aqua bidest* inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte für 2 min in Mayers Hämalaunlösung getaucht und für 5 min in fließendem Leitungswasser gebläut. Das Zytoplasma wurde anschließend für 2 min in einer 5 %igen Eosinlösung gefärbt. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 75 %, 96 %, 100 %, 2x Xylol) gewaschen und entwässert und danach in einem organischen Einbettmedium (Histomount) eingedeckelt.

2.15.3 Untersuchung der Proliferation *in vivo* mittels Bromdesoxyuridin (BrdU)

BrdU ist ein synthetisch hergestelltes Thymidin-Analogon, das während der S-Phase des Zellzyklus anstelle des Nukleosids Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden kann. Es markiert somit proliferierende Zellen, die in einer späteren Immunfärbung mit Antikörpern gegen BrdU sichtbar gemacht und quantifiziert werden können. Zur Untersuchung der Proliferation *in vivo* wurde den Mäusen intraperitoneal (ip) eine BrdU-Lösung (1 ml pro 100 g Gewicht) injiziert. 2 h später wurden Haut- oder Tumorgewebe präpariert und Paraffinschnitte angefertigt (siehe Abschnitt 2.15.1). Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte 20 min in Citratpuffer (pH 6) bei 95-100 °C gekocht und langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Danach wurden die Proben 3x3 min in PBS gewaschen. Die endogene Phosphataseaktivität wurde durch 10 minütige Behandlung mit 3 % H₂O₂ unterdrückt, wodurch gleichzeitig das Gewebe aufgehellt wurde. Es folgten weitere Waschschritte in PBS bevor unspezifische Bindungen mit 5 % BSA in PBS für 30 min blockiert wurden. Der primäre BrdU-Antikörper wurde in einem speziellen Verdünnungsmittel (Dako) angesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei

4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben 30 min mit dem sekundären biotinylierten Antikörper inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte mit Hilfe des *Real Detection Systems* (AP/RED, Rabbit/Mouse, Dako) nach Herstellerangaben. Um einen besseren Kontrast zu erlangen, wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt und in Histomount eingedeckelt.

2.16 Tierexperimentelle Methoden

2.16.1 Maustämme, Zucht und Haltung

Konditionale Trim71 Knockout Mäuse wurden von der Firma Taconic Artemis (Köln) generiert. Zur Herstellung eines hautspezifischen Knockouts wurden diese Tiere, in eine K14-Cre-Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Keratin 14 exprimiert, gekreuzt. Die K14-Cre-Mauslinie wurde zum ersten Mal im Jahr 1999 [169] beschrieben und ist mittlerweile kommerziell bei der Firma Jackson (Bar Harbor, USA) erhältlich. Die hier verwendeten Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre-Mäuse hatten den genetischen Hintergrund des C57BL/6J-Stammes. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und fanden im genetischen Ressourcen Zentrum des LIMES-Instituts (LIMES-GRC) der Universität Bonn statt.

2.16.2 Alkalische DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen und Genotypisierung

Zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse wurde DNA aus Mausschwanzspitzen isoliert. Die Schwanzspitzen wurden in 200 µl 50 mM Natriumhydroxid (NaOH) aufgenommen und 20 min bei 95 °C gekocht. Die Lösung wurde durch Zugabe von 50 µl Tris/HCl pH 8 neutralisiert. Danach wurde die Lösung 1 min bei 4000 rpm zentrifugiert und bei 4 °C gelagert. Von der DNA-Lösung wurden 2 µl als Templat für die PCR eingesetzt. Die PCR wurde mit der Titanium-Taq DNA-Polymerase (Clontech) nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese hat den Vorteil, dass Primeranlagerung und Elongation in einem Schritt bei 68 °C erfolgen, was die Reaktionszeit der PCR drastisch verkürzt.

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.10.2 aufgeführt. Zur Genotypisierung der Trim71-Mäuse wurde eine Drei-Primer-Strategie angewendet. Als Ergebnis konnten drei verschiedene Banden entstehen: eine 242 bp-Bande für das Wildtypallel, eine 322 bp-Bande für das mutierte Allel und eine 361 bp-Bande für das konditionale Allel. Die K14-Cre-Mäuse wurden mit einer Kombination aus zwei Primerpaaren typisiert. Dabei entstand eine 200 bp große Bande als interne Kontrolle der PCR und eine 494 bp-Bande bei allen transgenen Tieren.

PCR-Ansatz:

2 µl	10x Titanium Taq PCR buffer
0,4 µl	10 mM dNTPs
0,8 µl	20 µM Primer 1
0,8 µl	20 µM Primer 2
0,8 µl	20 µM Primer 3
0,8 µl	20 µM Primer 4
2 µl	DNA
0,25 µl	Titanium Taq
ad 20 µl	<i>Aqua bidest</i>

PCR-Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	33
Primeranlagerung/ Elongation	68 °C	1 min	
terminale Elongation	68 °C	3 min	1
	4 °C	∞	

2.16.3 Induktion epidermaler Hyperplasie mittels TPA

Zur Induktion von Akanthose in der murinen Epidermis wurden die Mäuse 2x mit dem Tumorpromotor Tetradecanoylphorbolacetat (TPA) behandelt. Der Rücken von 6-10 Wochen alten Mäusen wurde einen Tag vor Versuchsbeginn rasiert. Dann wurden 50 nmol TPA gelöst in 100 µl Aceton auf den Rücken der Maus pipettiert. Nach zwei Tagen wurde die Applikation wiederholt und nach drei Tagen wurde die Haut präpariert und entweder für histologische Färbungen in Paraffin eingebettet oder für eine spätere RNA-Isolation in TRIzol aufgenommen.

2.16.4 Chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese der murinen Epidermis

Die Induktion epidermaler Tumore in der Maus erfolgte chemisch nach dem Mehrstufenkarzinogenese-Protokoll aus dem Jahr 1981 von Fürstenberger *et al.* [48]. Dabei handelt es sich um ein anerkanntes Modell für Plattenepithelkarzinome in der Maushaut, das verwendet wird, um die Rolle eines Gens in der Tumorentwicklung und -progression zu untersuchen. Die Initiation der Tumorbildung erfolgt durch topische Applikation des Kanzerogens Dimethylbenzanthracen (DMBA). Promotion wurde durch wiederholte Behandlung der Maushaut mit dem Tumorpromotor Tetradecanoylphorbolacetat (TPA) erreicht.

Mindestens 10-20 Mäuse im Alter von 6-10 Wochen bildeten eine Versuchsgruppe. Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden die Rückenhaut der Mäuse mit einem Elektrorasierer enthaart. Das verwendete DMBA wurde in Xylol in einer Konzentration von 25 mg/ml gelöst

und kurz vor Gebrauch 1:200 in Aceton verdünnt. Die Initiation erfolgte mit 200 µl der DMBA-Lösung (entspricht 100 nmol DMBA), die mit einer Pipette direkt auf die nackte Maushaut pipettiert wurde. 5-7 Tage später startete die Tumorpromotion durch topische Applikation von zunächst 10 nmol TPA gelöst in Aceton. Die Konzentration von TPA wurde schrittweise auf eine Konzentration von 50 nmol erhöht. Die Applikation erfolgte 2x pro Woche, mindestens 1x pro Woche wurden die Mäuse rasiert. Die Tumorgroße, -inzidenz (Prozentzahl der Mäuse mit Tumor) und -multiplizität (Anzahl der Tumore pro Maus) wurde über den Versuchsverlauf von 30 Wochen wöchentlich für jedes Individuum dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Trim71 interagiert mit dem RISC-Protein Argonaute 2 (Ago2)

Im Jahr 2008 wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang von Trim-NHL-Proteinen mit der Regulation der miRNA-Aktivität beschrieben. Neumüller und Kollegen konnten zeigen, dass die Drosophila Proteine Mei-P26, Brat und Wech über ihre NHL-Domäne mit dem RISC-Protein Argonaute 1 (Ago1) interagieren und dass Mei-P26 die miRNA-Biogenese inhibiert [125]. Gleichmaßen ist auch die NHL-Domäne des murinen Orthologs zu Mei-P26 und Brat, Trim32 für die Regulation der miRNA-Aktivität verantwortlich. Allerdings verstärkt Trim32 die Expression verschiedener miRNAs [151] und wirkt somit antagonistisch zu Trim71 (murines Ortholog zu Wech), das durch Ubiquitinierung von Ago2 die let-7-Aktivität inhibiert [147]. Über welche Domäne Trim71 mit Ago2 interagiert ist umstritten. Rybak und Chen beschrieben, dass das Coiled-Coil-Motiv von Trim71 für die Interaktion mit Ago2 ausschlaggebend ist [147, 28] und Chang zeigte gleiches für die NHL-Domänen [26]. Um die richtige Bindedomäne von Trim71 zu verifizieren, wurden mehrere C- und N-terminale Deletionskonstrukte des humanen Trim71 (siehe Abbildung 3.1) kloniert und zum immunologischen Nachweis als Fusionsproteine mit dem N-terminal gelegenen flag-tag in HEK293T-Zellen exprimiert.

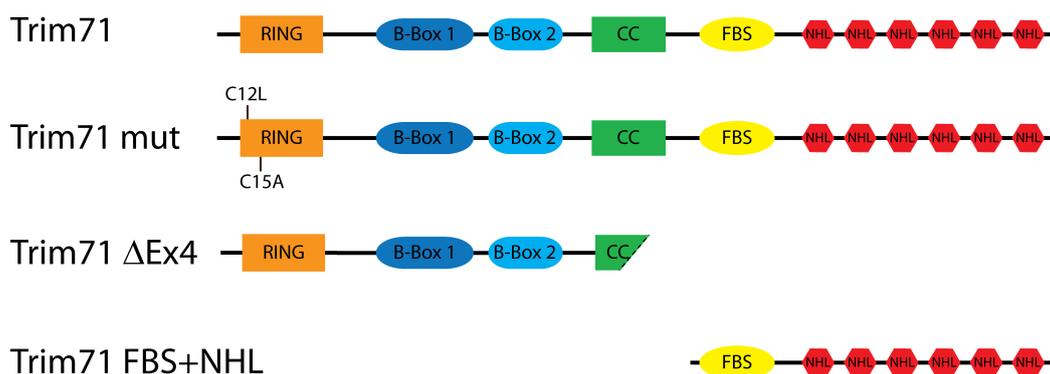


Abbildung 3.1: PROTEINSTRUKTUR VON TRIM71. Dargestellt ist die Domänenorganisation von Trim71 mit der N-terminalen RING-Domäne (orange), B-Box 1 und B-Box 2 (blau), den Heptadenmotiven (grün; CC=Coiled-Coil), der putativen Filamin-Bindungsstelle (FBS, gelb) und den sechs aufeinanderfolgenden NHL-Domänen (rot). Darunter befinden sich schematische Darstellungen der verwendeten Trim71-Konstrukte: Trim71 mut enthält zwei Mutationen in der RING-Domäne (C12L und C15A), die dafür sorgen, dass die E3-Ligaseaktivität zerstört wird [147]. Trim71 Δ Ex4 fehlen alle Domänen, die von Exon 4 kodiert werden, einen Teil der CC-Domäne, die FBS und die NHL-Domänen. Trim71 FBS+NHL enthält nur die C-terminalen Domänen FBS und die NHL-Domänen.

Magnetische Kügelchen mit gebundenem flag-Antikörper dienen der Präzipitation der Trim71-Konstrukte aus dem Zellysat. Gebundenes, endogen exprimiertes Ago2 konnte danach mittels Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen werden. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde als Kontrolle ein Ansatz mit dem flag-pRK5-Leervektor mitgeführt. Die Ergebnisse der Coimmunpräzipitation (CoIP) sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Sowohl mit dem Trim71-Gesamtprotein als auch dem N-terminal deletierten Trim71 FBS+NHL konnte Ago2 copräzipitiert werden. Jedoch ist zu beachten, dass im Fall des Gesamtproteins wesentlich mehr Ago2 copräzipitiert wurde als bei dem Deletionskonstrukt und das, obwohl die Transfektionseffizienz der kürzeren Variante wesentlich höher war. Das Konstrukt, dem Exon 4 fehlt, zeigte keine Bindung an Ago2. Auch die Negativkontrolle, der flag-pRK5-Leervektor bindet nicht unspezifisch an Ago2. Auf dem Expressionsblot ist keine Bande detektierbar, da der flag-tag mit einem Molekulargewicht von 9 kDa zu klein ist.

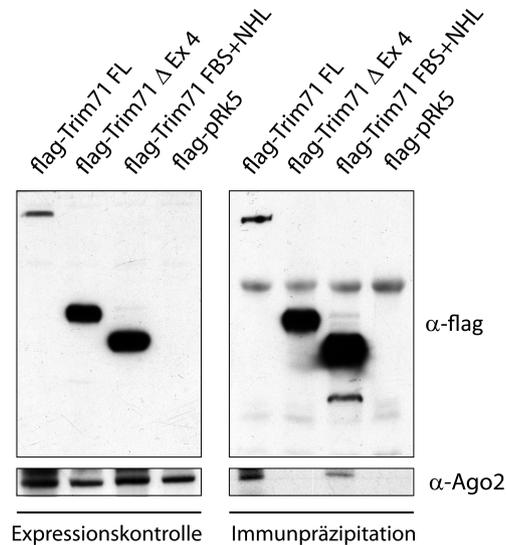


Abbildung 3.2: TRIM71 INTERAGIERT MIT AGO2. CoIP von Ago2 nach Überexpression verschiedener humaner Trim71-Konstrukte in HEK293T-Zellen. Über mit flag-Antikörper gebundene magnetische Kügelchen konnte Trim71 aus dem Zellysat präzipitiert werden. Daran gebundenes Ago2 wurde mittels Antikörper (Klon 11A9) im Western-Blot nachgewiesen. Als Kontrolle diente der flag-pRK5-Leervektor.

3.2 Trim71 ist in P-Bodies lokalisiert

Da bis heute kein für die Immunfluoreszenz geeigneter Trim71-Antikörper kommerziell erwerbbar ist, wurden zur Untersuchung der Lokalisation von Trim71 in der Zelle Transfektionsstudien durchgeführt. Dazu wurde das humane Trim71 als Fusionsprotein mit dem N-terminal gelegenen *green fluorescent protein* (GFP) in JKT-1-Zellen exprimiert. Dabei handelt es sich um eine Keimzelltumorklinie, die aus einem humanen Seminom isoliert wurde [85]. Diese Zellen zeichnen sich durch einen frühen Differenzierungsstatus aus, da sie u.a. die Stammzellmarker NANOG und OCT3/4 exprimieren [14]. Eigene Studien unseres

Labors zeigen außerdem, dass Trim71 in JKT-1-Zellen endogen vorkommt. Mittels Calciumphosphat wurden die Zellen transfiziert, nach 24 h mit PFA fixiert und anschließend gefärbt. Die Gegenfärbung mit Ago2 sollte die biochemisch nachgewiesene Interaktion mit Trim71 verifizieren. Zur Markierung des Zellkerns wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI verwendet. Trim71 und Ago2 waren ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert und zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster in der Zelle (siehe Abbildung 3.3). Dabei waren die beiden Proteine nicht homogen in der Zelle verteilt, sondern bildeten zytoplasmatische Aggregate, die sogenannten P-Bodies (Pfeil). P-Bodies enthalten alle Enzyme, die für einen miRNA-vermittelten Abbau von mRNAs nötig sind [102]. Trim71 war vor allem in den größeren, perinukleären Strukturen zu finden, wohingegen Ago2 auch eine Lokalisation in der Nähe der Plasmamembran zeigte. Ago2 und Trim71 zeigten keine Kernlokalisation.

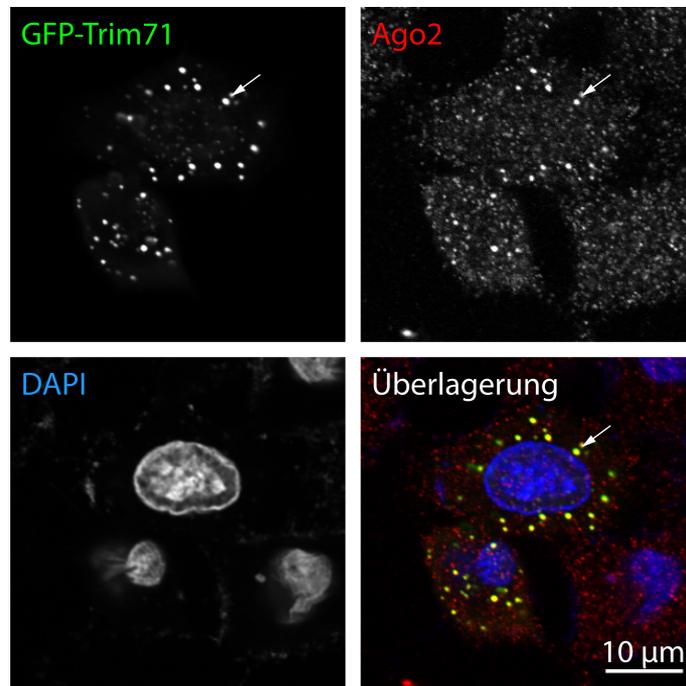


Abbildung 3.3: TRIM71 IST IN P-BODIES LOKALISIERT. Zelluläre Lokalisation von Trim71 in der humanen Keimzelltumorlinie JKT-1. Immunfluoreszenzmarkierung PFA-fixierter JKT-1 Zellen, die mit einem humanen GFP-Trim71-Konstrukt (grün) transfiziert und mit dem C34C6-Antikörper gegen Ago2 (rot) gefärbt wurden. DAPI markiert die Zellkerne (blau). Sowohl Trim71 als auch Ago2 zeigen zytoplasmatische Verteilung und kolokalisieren in den perinukleär gelegenen P-Bodies (Pfeil).

3.3 Überexpression von Trim71 in HEK293T-Zellen führt zur verminderten Expression der miRNA let-7a

Nach der Modellvorstellung von Rybak *et al.* (2009) soll Trim71 durch seine Aktivität als E3-Ligase zum proteasomalen Abbau von Ago2 und den gebundenen miRNAs führen. Gezeigt wurde dies am Beispiel der miRNAs let-7 und miR-124 [147]. In folgenden Veröffentlichungen konnte zwar die Interaktion von Trim71 und Ago2 gezeigt werden,

aber eine verminderte Proteinmenge von Ago2 nach Überexpression von Trim71 wurde nicht bestätigt [28]. Zur Überprüfung, ob Trim71 tatsächlich die Expression von let-7 durch Ubiquitinierung von Ago2 vermindert, wurden verschiedene Trim71-Konstrukte in HEK293T-Zellen überexprimiert und der Ago2-Proteingehalt mittels Western-Blot überprüft (siehe Abbildung 3.4). Zusätzlich zu den für die CoIP verwendeten Konstrukten, wurde eine RING-Domänen-Doppelmutante eingesetzt (siehe Abbildung 3.1). Diese zeigt keine E3-Ligaseaktivität mehr, da zwei essentielle Cysteine zerstört wurden (C12A und C15L) [147]. 24 Stunden nach der Transfektion konnte bei keiner der vier verschiedenen Trim71-Varianten eine Veränderung des Ago2-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle (GFP) festgestellt werden (siehe Abbildung 3.4 A). Erst nach 72 Stunden war eine Reduktion des endogenen Ago2 zu beobachten. Diese war nach Überexpression des Wildtyp Proteins (GFP-Trim71) am stärksten. Die RING-Mutante C12LC15A (GFP-Trim71 mut) zeigte eine etwas schwächere Reduktion von Ago2. Hier lag die Transfektionseffizienz allerdings unter der des Wildtyp-Trim71. Die beiden Deletionskonstrukte Trim71 Δ Ex4 und Trim71 FBS+NHL hatten keine Auswirkungen auf die Expression von Ago2. Da auch die E3-Ligase-Mutante von Trim71 nach Überexpression zu einer Reduktion des Ago2-Gehaltes führte und diese mit einer Verzögerung von 72 Stunden eintrat, scheint beim Abbau von Ago2 keine direkte Ubiquitinierung beteiligt zu sein.

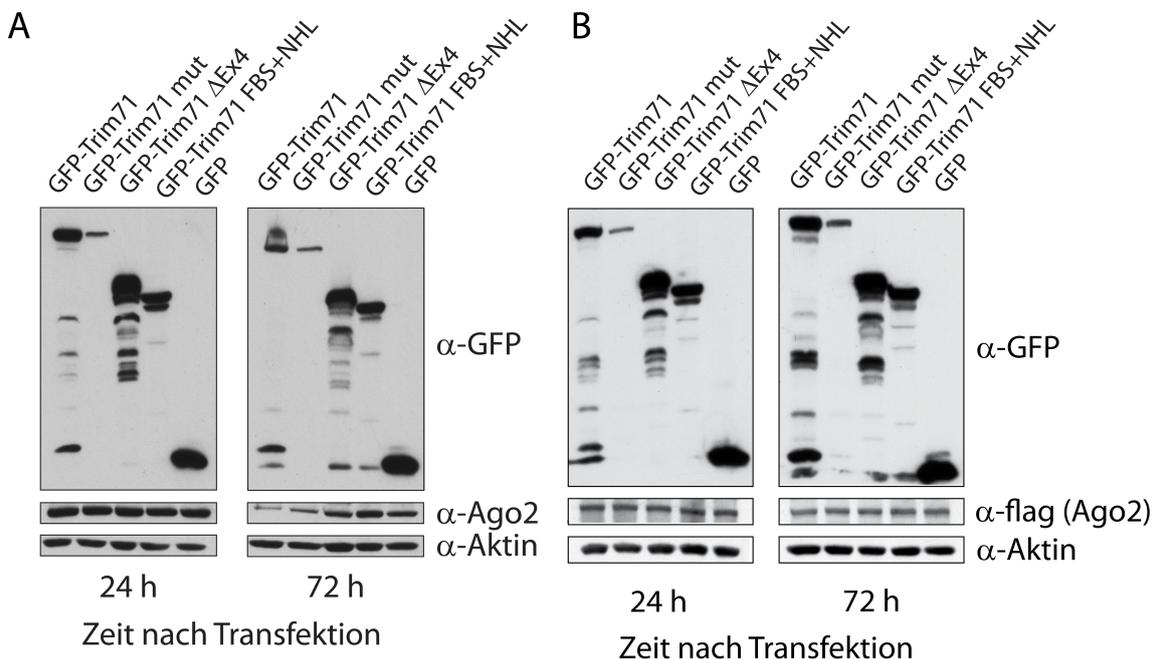


Abbildung 3.4: DIE ÜBEREXPRESSION VON TRIM71 FÜHRT NICHT ZU EINER DIREKTEN VERMINDERUNG DER AGO2-PROTEINMENGE. A) 24 h nach der Überexpression verschiedener Trim71 Deletionskonstrukte in HEK293T-Zellen ist der Ago2-Proteingehalt unverändert. Erst 72 h nach Transfektion kann eine Verminderung der Ago2-Menge nach Überexpression des Trim71-Gesamtproteins und der E3-Ligase-Mutante C12LC15A (Trim71 mut) nachgewiesen werden. B) Wurden sowohl verschiedene Trim71-Konstrukte als auch das Ago2-Gesamtprotein überexprimiert, konnte keine Verminderung von Ago2 nachgewiesen werden, auch nicht 72 h nach Transfektion.

Möglicherweise beeinflusst Trim71 indirekte Prozesse, die die endogene Expression von Ago2 steuern. Um das genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich zu den Trim71-Konstrukten Ago2 als Fusionsprotein mit N-terminalem flag-tag in den Zellen exprimiert. Hier zeigte sich für keine der verschiedenen Bedingungen eine Veränderung der Ago-Expression, auch nicht nach 72 h (siehe Abbildung 3.4 B). Somit ist es denkbar, dass Trim71 nicht direkt den Proteingehalt von Ago2 vermindert, sondern die Transkription von Ago2 beeinflusst, was auf der Ebene der mRNA sichtbar sein müsste.

Um dies zu Überprüfen wurden qPCR-Analysen zur Quantifizierung der Ago2-mRNA durchgeführt. Dazu wurde aus den transfizierten Zellen RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Abbildung 3.5 A zeigt die Ergebnisse der qPCR. Sowohl die Überexpression des Trim71-Gesamtproteins als auch der RING-Mutante (Trim71 mut) führten zu einer signifikanten Reduktion der Ago2-mRNA-Menge. Dabei ist zu beachten, dass die Verminderung der Ago2-mRNA zeitlich vor der Verminderung auf Proteinebene liegt, was einen Proteinabbau durch Ubiquitinierung unwahrscheinlicher macht. Zur Überprüfung des Einflusses von Trim71 auf die Expression von let-7a wurden ähnliche Versuche durchgeführt. Da miRNAs sehr kurz sind (21-23 Nukleotide), müssen sie vor der cDNA-Synthese durch Poly-Adenylierung künstlich verlängert werden und können dann ähnlich den mRNAs per qPCR quantifiziert werden (siehe Abbildung 3.5 B). Die Überexpression von Trim71 führt zu einer um die Hälfte reduzierten Expression von let-7a. Alle anderen Konstrukte hatten keinen signifikanten Effekt auf let-7a.

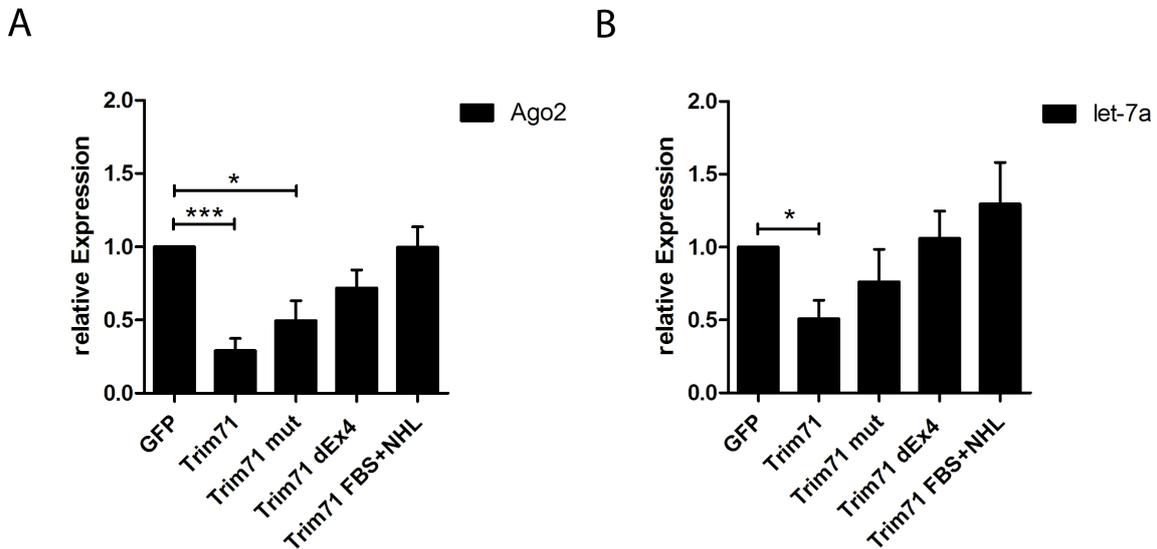


Abbildung 3.5: TRIM71 FÜHRT ZU EINER VERMINDERUNG DER AGO2-MRNA UND DER MI-RNA LET-7A. A) Sowohl die Überexpression des Trim71-Gesamtproteins als auch der RING-Mutante (Trim71 mut) führen 24 h nach Transfektion zu einer signifikanten Reduktion der Ago2-mRNA. Die Deletionskonstrukte Trim71 Δ Ex4 und Trim71 FBS+NHL haben keinen Einfluss auf die Ago2-Expression. B) Nur das Wildtyp-Trim71-Protein führt nach Überexpression zu einer signifikanten Herunterregulation von endogenem let-7a. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression der Haushaltsgene GAPDH (Ago2) bzw. 5.8S rRNA (let-7a) normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Experimente (n=3) mit dem Standardfehler (SEM). * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

3.4 Identifizierung neuer Trim71-Zielgene mittels RIP-Chip

Um neue Trim71-Zielgene, die mit der miRNA-Maschinerie in Zusammenhang stehen zu identifizieren, wurde eine RIP-Chip-Analyse in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schultze durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Immunpräzipitation des RISC-Komplexes mit Hilfe eines Ago2-spezifischen monoklonalen Antikörpers, gefolgt von einer RNA-Extraktion und anschließender Quantifizierung der mRNAs mittels Microarray (vgl. Abschnitt 2.14.8). Dadurch können sämtliche mRNAs, die an den RISC-Komplex gebunden sind und somit von miRNAs reguliert werden, bestimmt werden.

3.4.1 Generierung stabiler Zelllinien

Um den Einfluss von Trim71 auf die miRNA-vermittelte Regulation von mRNAs zu testen, wurde die RNA-Immunpräzipitation in An- und Abwesenheit von Trim71 durchgeführt. Dafür mussten zunächst stabil überexprimierende Zelllinien generiert werden. Dazu wurden im Gegensatz zu den vorher verwendeten HEK293T-Zellen, HEK293-Zellen verwendet. Diese haben keine Neomycin-Resistenz, weshalb man das Antibiotikum G418 zur Selektion positiver Klone verwenden kann. Zur Generierung stabiler Zelllinien wurden HEK293 mit einem linearisierten GFP-Trim71 Plasmid, das eine Neomycin-Resistenzkassette enthält, mittels Calciumphosphat transfiziert. Als Kontrolle diente eine mit dem GFP-Leervektor transfizierte Zelllinie. Eine Woche nach Zugabe des Selektionsmediums konnten die stabil transfizierten Zellen zur Isolation individueller Zellklone vereinzelt werden. Die Expression von Trim71 wurde in den verschiedenen Zellklonen mikroskopisch und mittels Western-Blot und FACS überprüft. Dabei fiel auf, dass die Intensität der Trim71-Expression je nach Klon stark variierte. Als Maß für die Stärke der Expression wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von GFP im FACS gemessen. Für die Untersuchung der let-7a Expression in Abhängigkeit von Trim71 wurden drei verschiedene Klone mit unterschiedlich starker Trim71-Expression ausgewählt. Alle drei Klone zeigten eine Reduktion der let-7a-Expression, die proportional zur Expression von Trim71 war (siehe Abbildung 3.6).

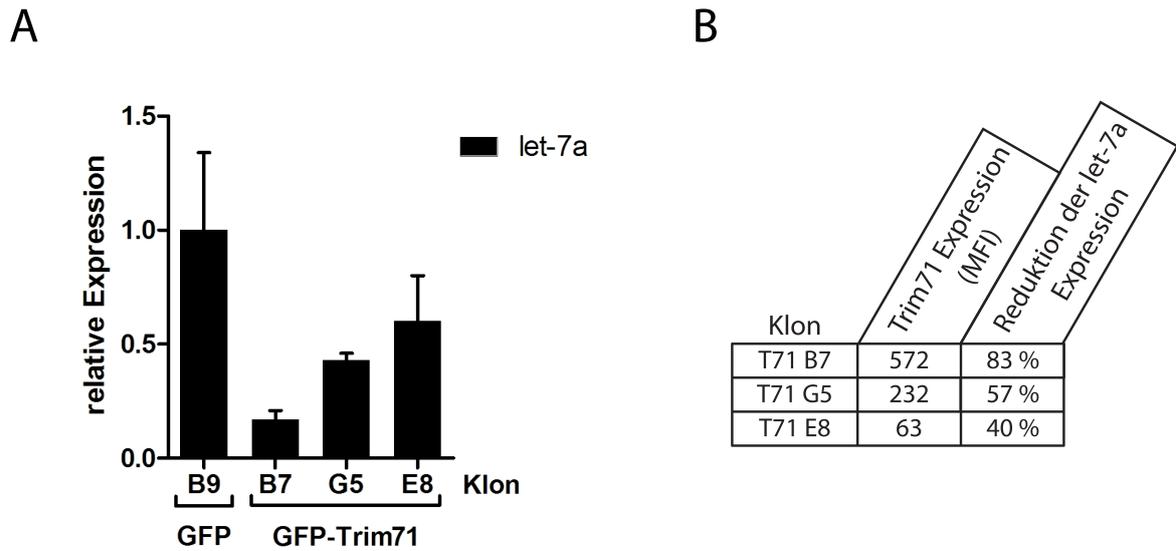


Abbildung 3.6: TRIM71 REGULIERT DIE EXPRESSION VON LET-7A IN STABIL TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLEN. A) Alle drei getesteten Klone (B7, G5 und E8) der mit Trim71 stabil transfizierten HEK293-Zellen führen zu einer Reduktion der let-7a -Expression. B) Diese ist dabei proportional zur Expressionstärke (MFI) von Trim71.

Der Klon B7 mit der höchsten Trim71-Expression zeigte eine Abnahme der let-7a Expression um 83 % und wurde für alle folgenden Experimente verwendet. Anhand der Ergebnisse mit transient überexprimierenden Zellen, konnte eine Ubiquitinierung von Ago2 durch Trim71 als Erklärung der Herunterregulation von Ago2 und let-7a ausgeschlossen werden. Um zu überprüfen, ob dies für die stabil transfizierten Zelllinien gleichermaßen zutrifft, wurde ein Western-Blot mit Zelllysaten von Trim71 überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen durchgeführt, und die Ago2 Expression untersucht. Abbildung 3.7 zeigt, dass trotz starker Reduktion von let-7a keine Veränderung von Ago2 nach Überexpression von Trim71 zu erkennen ist. Somit scheint ein anderer noch unbekannter Mechanismus, unabhängig von Ago2 wichtig für die Regulation von miRNA let-7a zu sein.

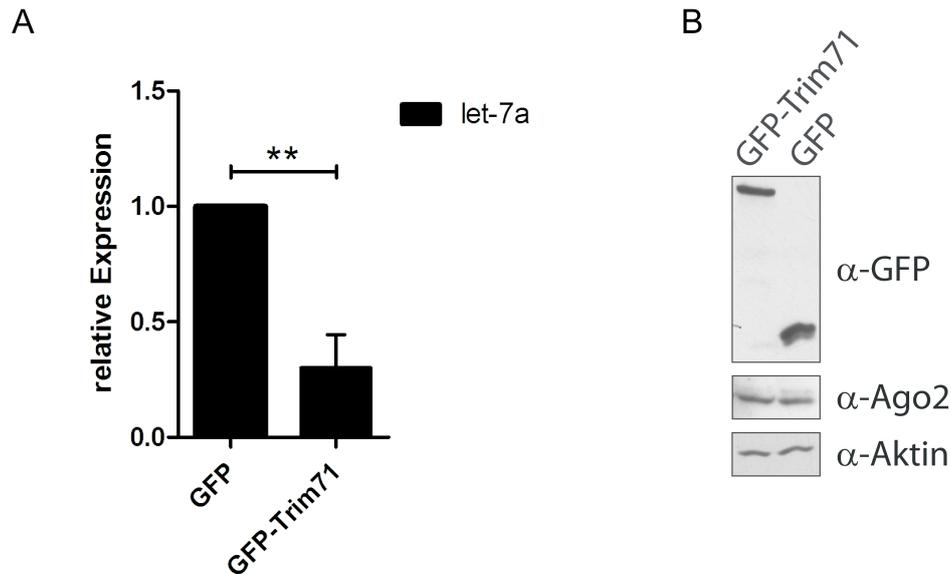


Abbildung 3.7: TRIM71 REGULIERT DIE EXPRESSION VON LET-7A UNABHÄNGIG VON AGO2. A) Die stabile Überexpression von Trim71 in HEK293-Zellen führt zu einer signifikanten Reduktion von let-7a. B) Diese kann nicht durch eine Ubiquitinierung von Ago2 durch Trim71 erklärt werden, da die Ago2-Proteinmenge von der Trim71 Überexpression unbeeinflusst ist. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens 5.8S rRNA normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Experimente (n=3) mit dem Standardfehler (SEM). ** = $p < 0,005$

3.4.2 RIP-Chip-Analyse

Nach der erfolgreichen Generierung stabil überexprimierender GFP-Trim71 und GFP HEK293-Zelllinien, konnten diese zur Identifikation neuer Trim71-Zielgene in einer RIP-Chip-Analyse verwendet werden. Für die IP des RISC-Komplexes wurde ein bereits etabliertes Protokoll [37] verwendet, bei dem ein speziell dafür hergestellter monoklonaler Antikörper gegen das humane Ago2 benutzt wird [146]. Als Isotyp-Kontrolle diente ein monoklonaler Antikörper gegen Bromdesoxyuridin (BrdU). Die Effizienz der IP wurde über die Anreicherung von let-7a mittels qPCR analysiert (siehe Abbildung 3.8). Diese wird aus dem Quotient der Ago-IP mit dem der Kontroll-IP berechnet und betrug 259 für die Trim71 überexprimierenden Zellen und 195 für die Kontrollzellen (GFP).

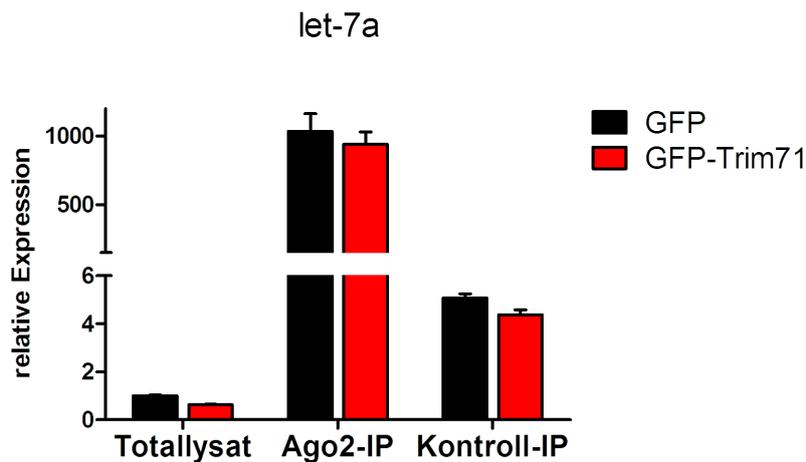


Abbildung 3.8: ANREICHERUNG VON LET-7A NACH AGO2-IP. Im Totallysat der beiden Zelllinien ist die let-7a Expression in den Trim71 überexprimierenden Zellen um 50 % im Vergleich zu den Kontrollzellen (GFP) reduziert. Nach Ago2-IP wird let-7a um das ca. 200-fache im Vergleich zur Kontroll-IP mit BrdU-Antikörper angereichert. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens 5.8S rRNA normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten mit der Standardabweichung (SD).

Danach wurden Microarray-Analysen für drei unabhängige biologische Replikate im Falle des Totallysates und drei technische Replikate im Falle der IP-Proben durchgeführt. Nach Ago-IP waren insgesamt 118 Gene um einen Faktor von mehr als 2 reguliert. Diese zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede im Totalextrakt der beiden Zelllinien. In der IP der Trim71 überexprimierenden Zellen waren im Vergleich zu Kontrollzellen 38 dieser Gene hoch- und 80 Gene herunterreguliert (siehe Abbildung 3.9). 144 Gene zeigten neben der Regulation in der Ago-IP eine Regulation in der Kontroll-IP mit BrdU-Antikörper. Dabei handelt es sich um unspezifisch gebundene Transkripte, die aus der Analyse ausgeschlossen wurden. Die Tabellen mit den genauen Expressionswerten sind im Anhang zu finden.

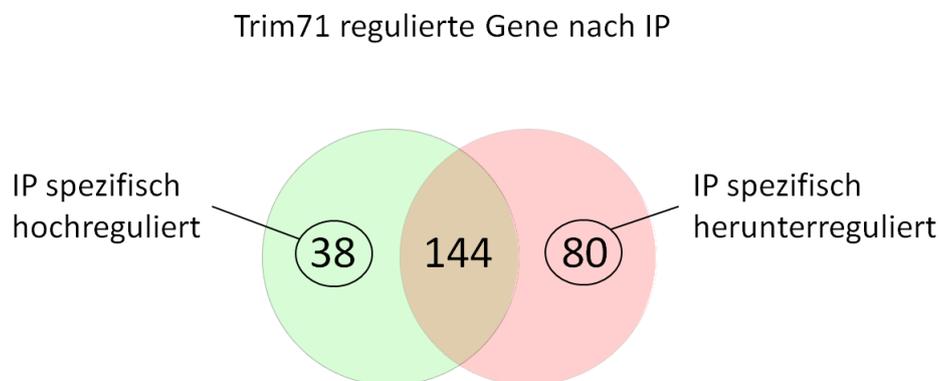


Abbildung 3.9: VENN-DIAGRAMM DER REGULIERTEN GENE NACH AGO2-IP. Dargestellt ist die Anzahl aller Gene bei denen die Änderung des Quotienten (Fold-Change) aus der Expression der Ago2-IP mit der Kontroll-IP größer als 2 ist.

Eine weitere Darstellungsform der regulierten Gene ist die Heatmap (siehe Abbildung 3.10). Hier wird die Stärke der Regulation mit der Intensität der Farbe verdeutlicht, wobei blau eine reduzierte Expression anzeigt, während rot für eine verstärkte Expression steht. Zur Vereinfachung der Darstellung werden ähnlich regulierte Gene mittels Clusteranalyse in Gruppen zusammengefasst. Abbildung 3.10 zeigt die Genexpression aller Gene für die verschiedenen Bedingungen. Hierbei fällt auf, dass es Gene gibt, die allein durch die erhöhte Expression von Trim71 reguliert werden und welche, die spezifisch nach IP verändert sind. Die schwarzen Rahmen markieren die regulierten Gene nach Trim71 Überexpression. Gene, die spezifisch nach der IP reguliert sind, sind grün eingerahmt. Dabei ist zu beachten, dass der größere grüne Kasten viele unspezifisch gebundene Transkripte enthält, da hier ebenfalls eine Regulation in der Kontroll-IP zu erkennen ist.

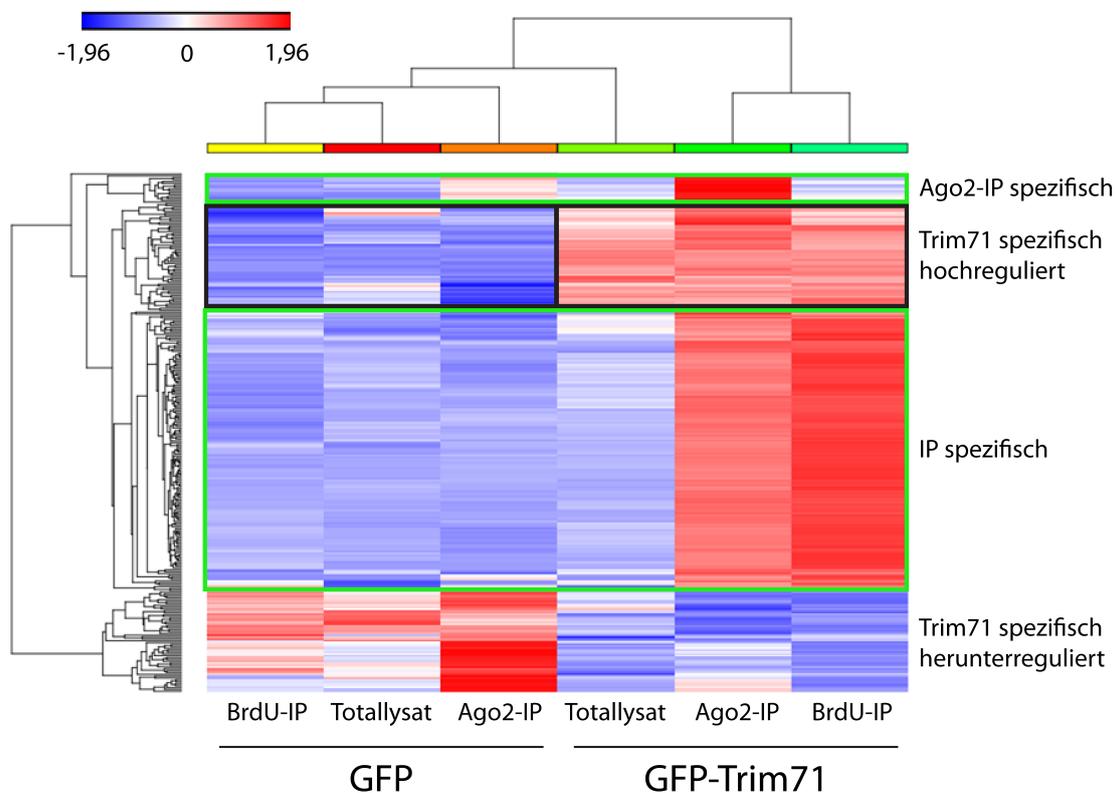


Abbildung 3.10: HEATMAP DER GENEXPRESSION ALLER GENE FÜR DIE VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN. Zur vereinfachten Darstellung wurden ähnlich regulierte Gene in Cluster zusammengefasst. Herunterregulation ist in blau dargestellt, Hochregulation in rot und nicht regulierte Gene in weiß.

Betrachtet man die Liste der regulierten Gene fällt auf, dass mehr als doppelt so viele Gene herunterreguliert wie hochreguliert werden. Dies ist in Einklang mit der bekannten Funktion von Trim71 als mRNA-bindendes und reprimierendes Protein. Bei der Validierung der Ergebnisse mittels qPCR wurden zum einen besonders stark regulierte Gene untersucht und zum anderen solche, die im Zusammenhang mit der Regulation von Proliferation oder bei der Krebsentstehung eine wichtige Rolle spielen. Am stärksten herunterreguliert ist das RNA-Bindeprotein SERBP1 mit einem Faktor von 7,5. SERBP1 spielt eine wichtige

Rolle in der Regulation der mRNA-Stabilität [65] und dient als prognostischer Biomarker für Brustkrebs [152]. Des Weiteren ist SERBP1 ein interessanter Kandidat, weil es ein ähnliches Expressionsmuster wie Trim71 hat. Große Mengen des Proteins sind im Herzen, der Skelettmuskulatur und der Niere zu finden. In Plazenta, Leber und Gehirn ist es schwächer exprimiert. Die Reduktion der SERBP1 mRNA durch Trim71 konnte in einer qPCR bestätigt werden (siehe Abbildung 3.11).

In der Liste der herunterregulierten Gene finden sich außerdem insgesamt vier Hox-Gene (HoxA5, HoxB8, HoxA9 und HoxD1). Dabei handelt es sich um eine Familie von Homöobox-Genen, die als Transkriptionsfaktoren die Morphogenese des Embryos steuern. HoxA5 ist mit einer Dimensionsänderung von 2,9 das am zweitstärksten herunterregulierte Gen. Die Herunterregulation von drei der vier Hox-Gene (HoxA5, HoxA9 und HoxD1) konnte mittels qPCR validiert werden (siehe Abbildung 3.11). HoxB8 zeigt keine signifikante Expressionsänderung.

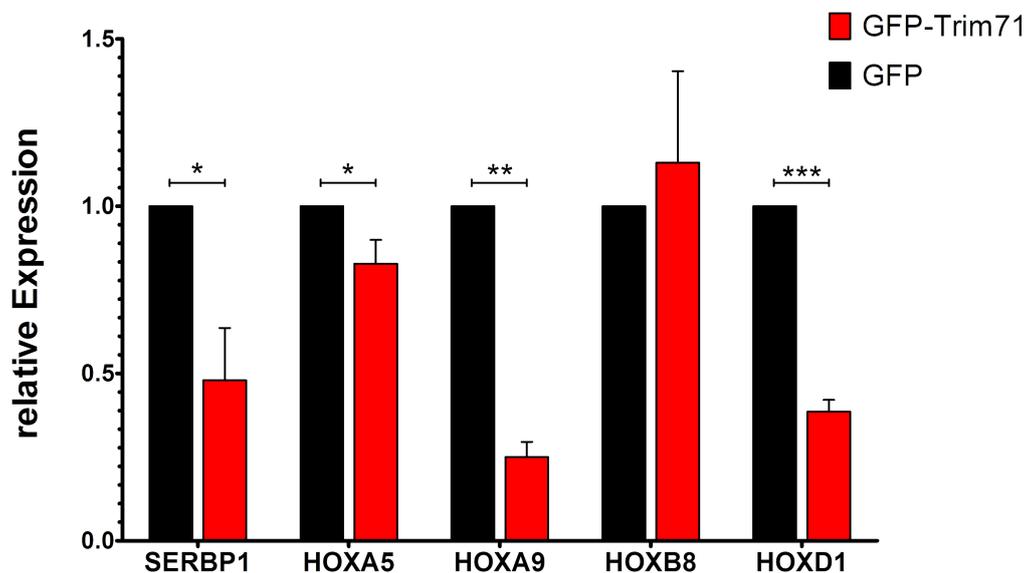


Abbildung 3.11: qPCR-VALIDIERUNG EINIGER LAUT MICROARRAY HERUNTERREGULIERTER GENE. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens HPRT normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Experimente (n=3) mit dem Standardfehler (SEM). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,001$

Aus der Liste der hochregulierten Gene wurden UBE2C, RECK, DLL1 und Itg α 5 zur weiteren Analyse ausgewählt. UBE2C ist ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2), das durch Ubiquitinierung von Zellzyklusproteinen an der Zellzykluskontrolle beteiligt ist. Außerdem ist es in einigen Krebsarten hochreguliert und dient deshalb als potentieller Tumormarker [62]. RECK ist ein Transmembranprotein, das als Tumorsuppressor durch Inhibition der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9) die Tumormetastasierung erschwert [160]. *Delta-like protein 1* (DLL1) ist das humane Homolog des Delta-Liganden im Notch-Signalweg. Durch die Aktivierung des Notch-Signalweges fördert DLL1 die Proliferation von Tumorzellen

[192]. Für Integrin $\alpha 5$ (Itg $\alpha 5$) ist bisher kein direkter Zusammenhang in der Proliferation oder Krebsentwicklung beschrieben worden. Dennoch ist Itg $\alpha 5$ ein interessanter Kandidat für weitere Analysen da Wech, das Drosophila-Homolog zu Trim71 durch seine Interaktion mit ILK (Integrin-linked Kinase) und Talin eine wichtige Rolle in der Integrin-abhängigen Adhäsion spielt [105].

Von diesen 4 untersuchten Genen konnten nur UBE2C und RECK mittels qPCR validiert werden (siehe Abbildung 3.12). Itg $\alpha 5$ und DLL1 zeigten zwar ebenfalls eine verstärkte Expression in Trim71 überexprimierenden Zellen, diese war aber nicht signifikant.

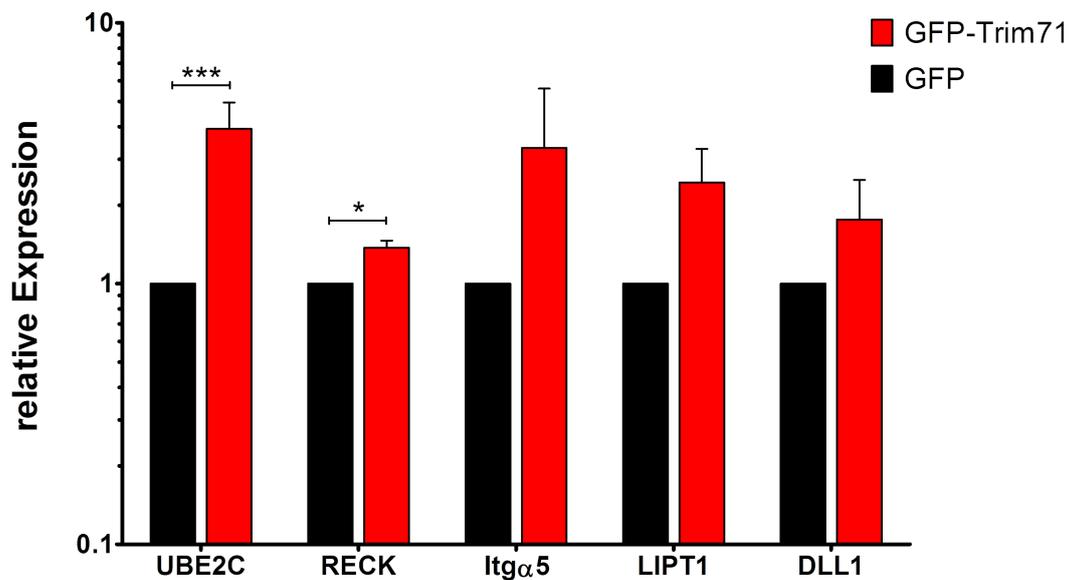


Abbildung 3.12: qPCR-VALIDIERUNG EINIGER LAUT MICROARRAY HOCHREGULIERTER GENE. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens HPRT normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Experimente (n=3) mit dem Standardfehler (SEM). * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

Um festzustellen, ob die Änderung der mRNA-Expression eine Veränderung der Proteinmenge nach sich zieht, wurden Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen HoxA5, SERBP1, UBE2C und Cdkn1a durchgeführt (siehe Abbildung 3.13). HoxA5 und SERBP1 zeigten nach Überexpression keine Veränderung (siehe Abbildung 3.13 A,B). Hier scheint die Reduktion der mRNA keinen Einfluss auf die Proteinmenge zu haben. UBE2C wird nach Überexpression deutlich hochreguliert, was mit den Ergebnissen der qPCR übereinstimmt (siehe Abbildung 3.13 C). Cdkn1a wurde in dem Microarray zwar nicht als von Trim71 reguliertes Gen gefunden, es ist aber als ein solches beschrieben [26] und wurde als Kontrolle mit untersucht. Hier ist eine klare Reduktion der Cdkn1a-Proteinmenge nach Trim71 Überexpression zu erkennen (siehe Abbildung 3.13 D).

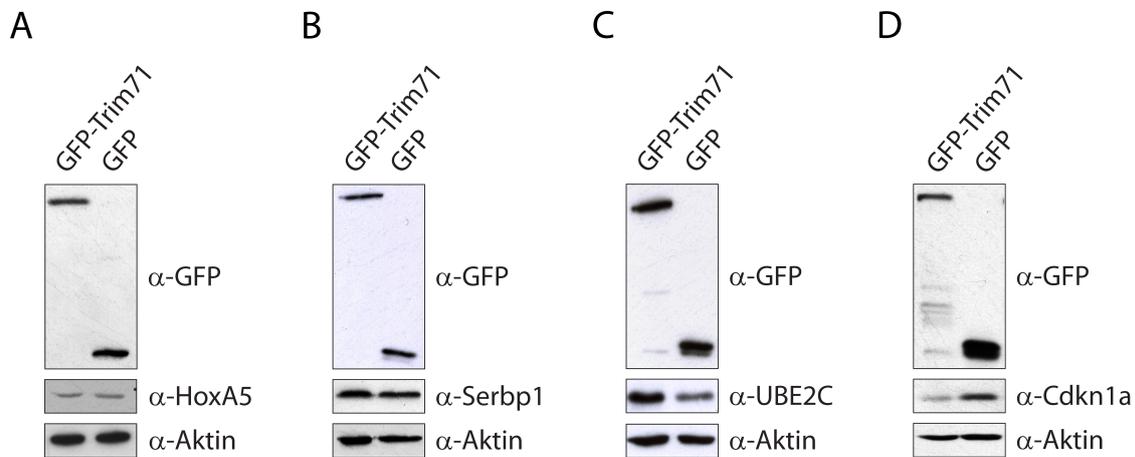


Abbildung 3.13: WESTERN-BLOT-ANALYSE VON POTENTIELLEN TRIM71-ZIELGENEN. A,B) Nach stabiler Überexpression von GFP-Trim71 in HEK293-Zellen konnte keine Veränderung der Proteinmenge von HoxA5 und SERBP1 festgestellt werden. C) UBE2C wird durch Trim71 hochreguliert und D) die Expression von Cdkn1a inhibiert.

3.5 Die Expression von Trim71 und UBE2C korreliert in verschiedenen embryonalen Karzinomzelllinien

Da es sich bei den stabil transfizierten Zelllinien um ein artifizielles System handelt, sollte in Zelllinien, die Trim71 endogen exprimieren überprüft werden, ob die Trim71-Expression mit der Expression von UBE2C korreliert. Dazu wurden verschiedene embryonale Karzinomzelllinien (*embryonic carcinoma*; EC) verwendet. Abbildung 3.14 A zeigt klar, dass es eine Korrelation zwischen UBE2C und Trim71 gibt. Zellen mit einer geringen Expression von Trim71 wie JKT-1 und NCCIT haben auch eine geringe UBE2C Expression. Umgekehrt zeigen Zellen mit einer großen Trim71 Expression ebenfalls ein starkes UBE2C Signal (Tcam2 und NTERA-2). Die Regressionsanalyse (siehe Abbildung 3.14 B) verdeutlicht dies zusätzlich. Die Expressionswerte der einzelnen Zelllinien sind linear angeordnet. Der Korrelationskoeffizient R^2 beträgt 0,9856. Theoretisch kann R^2 Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Je dichter R bei 0 liegt, desto schwächer ist der lineare Zusammenhang, je näher R bei -1 oder $+1$ liegt, desto stärker ist der Zusammenhang: Bei einem Wert von 0,9856 ist somit die Wahrscheinlichkeit groß, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Expression von Trim71 und UBE2C besteht.

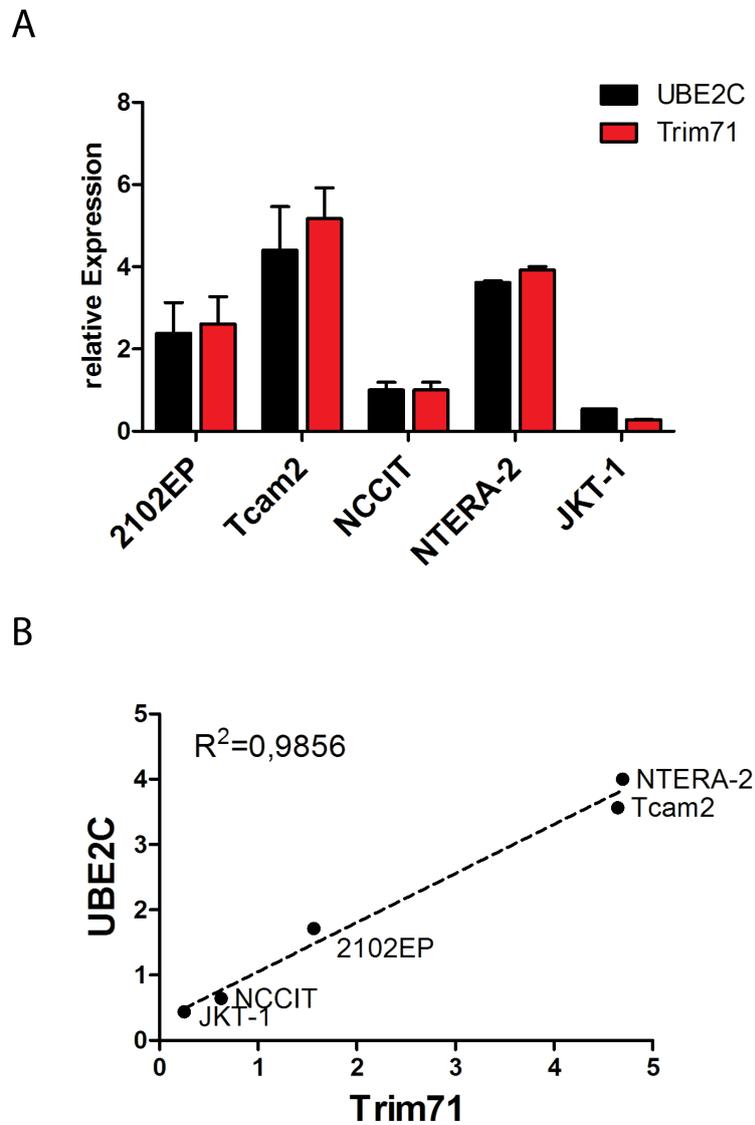


Abbildung 3.14: DIE EXPRESSION VON TRIM71 UND UBE2C KORRELIERT IN VERSCHIEDENEN EC-ZELLINIEN. A) Mittels qPCR wurde die Expression von Trim71 und UBE2C gemessen. Diese scheint zu korrelieren, das heißt je mehr Trim71 eine Zelle exprimiert, umso mehr UBE2C exprimiert sie und umgekehrt. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltgens HPRT normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert von drei technischen Replikaten mit Standardabweichung (SD). B) Regressionsanalyse der Expression von UBE2C und Trim71. Der Korrelationskoeffizient R^2 von 0,9856 zeigt an, dass die Wahrscheinlichkeit für eine lineare Regression von Trim71 und UBE2C sehr hoch ist.

3.6 Überexpression von Trim71 führt zur Erhöhung der Proliferation in HEK293-Zellen

Änderungen der Expression von UBE2C stehen in direktem Zusammenhang mit einer Änderung der Proliferation der Zelle. So konnten Huang und Kollegen im Jahr 2011 zeigen, dass eine UBE2C überexprimierende HEK293T-Zelllinie eine signifikante Erhöhung der Proliferation zeigt [70]. Nach Knockdown von UBE2C wurde zudem eine verringerte Proliferationsrate in verschiedenen Zelltypen beobachtet [98, 75]. Zudem führte die verringerte Expression von UBE2C zu einem Zellzyklusarrest in der S- und G₂/M-Phase des Zellzyklus [154]. In enger Zusammenarbeit mit dem Multiproteinkomplex APC (*anaphase promoting complex/cyclosome*), der eine E3-Ubiquitinligaseaktivität besitzt, führt UBE2C zum Abbau mitotischer Cycline und anderer Mitose-relevanter Substrate [183]. Um zu überprüfen, ob die Überexpression von Trim71 und der damit einhergehende Anstieg von UBE2C einen Einfluss auf die Proliferation der stabil transfizierten HEK293-Zellen hat, wurden MTT-Proliferationstests durchgeführt. Dazu wurden 2×10^3 Zellen ausgesät und nach unterschiedlichen Zeitpunkten mit MTT behandelt. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der proportional zur Zellzahl zu einem violetten Farbstoff umgesetzt wird. Dieser kann anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifiziert werden. Zu Beginn des Proliferationstests sind keine Unterschiede zwischen Trim71 überexprimierenden Zellen und der Kontrollzelllinie zu erkennen (siehe Abbildung 3.15). Erst nach 144 Stunden steigt die Proliferation nach Überexpression von Trim71 im Vergleich zur Proliferation der Kontrollzellen. Dieser Unterschied ist nach 168 Stunden signifikant.

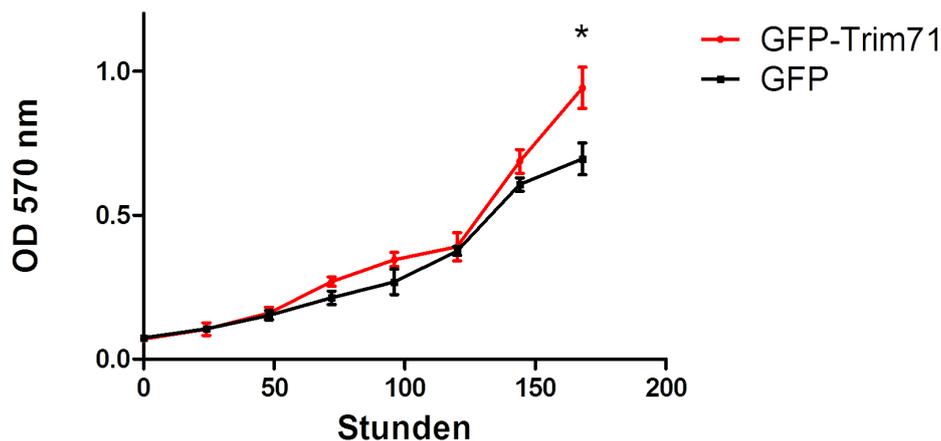


Abbildung 3.15: ÜBEREXPRESSION VON TRIM71 FÜHRT ZU EINER VERSTÄRKTEN PROLIFERATION VON HEK293-ZELLEN. In einem MTT-Proliferationstest mit stabil transfizierten HEK293-Zellen zeigten die GFP-Trim71 überexprimierenden Zellen eine signifikant erhöhte Proliferation nach 168 Stunden. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens GAPDH normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten ($n=3-5$) mit Standardfehler (SEM). * = $p < 0,05$

3.7 Überexpression von Trim71 führt zur Herunterregulierung des UBE2C-Zielgens Geminin

Zu den Substraten von UBE2C gehören unter anderem Geminin, Securin und Cyclin B1 [183]. Diese werden in der Metaphase der Mitose durch den APC in Verbindung mit UBE2C degradiert [181]. Danach ubiquitiniert sich UBE2C selbst und wird proteasomal abgebaut. Die daraus resultierende Akkumulation der Substrate inaktiviert den APC, der Zellzyklus kann fortgesetzt werden und eine neue DNA-Synthese-Phase beginnt. Der periodische Verlauf der Aktivität von UBE2C und dessen Zielproteinen ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

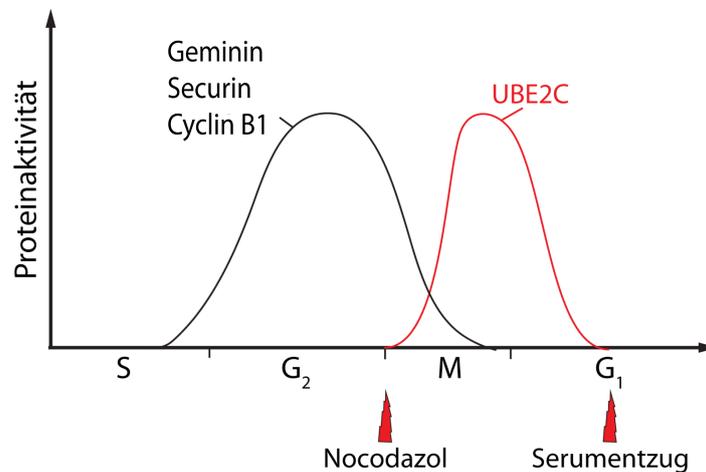


Abbildung 3.16: ÄNDERUNG DER AKTIVITÄT VON UBE2C UND DESSEN SUBSTRATEN WÄHREND DES ZELLYKYLUS. Die Expression von Zellzyklusregulatoren verläuft periodisch. Die Aktivität von Geminin, Securin und Cyclin B1 steigt im Verlauf des Zellzyklus bis zur Mitose an. Dort werden die Substrate von UBE2C ubiquitiniert und abgebaut. UBE2C wird in der G₁-Phase durch Autoubiquitinierung abgebaut.

Zur Untersuchung von Expressionsunterschieden der Zellzyklusregulatoren ist es wichtig, dass sich die Zellen in der gleichen Phase des Zellzyklus befinden. Dazu können die Zellen mit Hilfe unterschiedlicher Methoden synchronisiert werden (siehe Abbildung 3.17). Behandlung der Zellen mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Nocodazol verhindert die Ausbildung eines mitotischen Spindelapparates [92]. Die Zellen verharren in der Prometaphase der Mitose [193]. Eine Synchronisierung der Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus kann durch Reduktion der Serumkonzentration im Wachstumsmedium erreicht werden [119]. Da das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren nur in den ersten Stunden der G₁-Phase notwendig ist, durchlaufen die Zellen den begonnenen Zellzyklus komplett und verharren danach in der G₀-Phase [35].

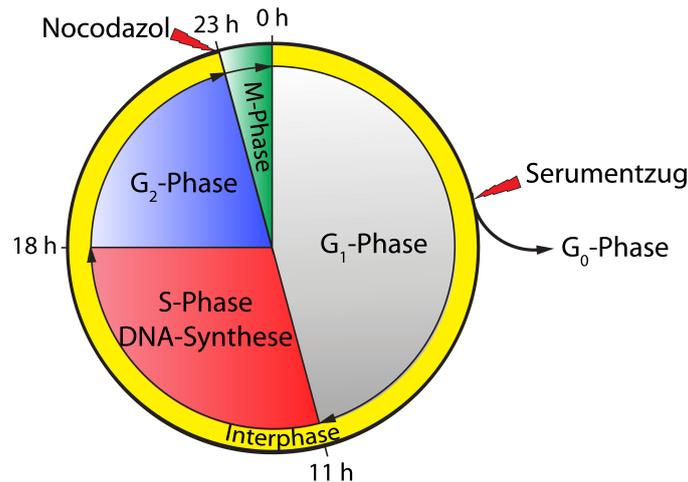


Abbildung 3.17: PHASEN DES EUKARYOTISCHEN ZELLYKLUSS. Es gibt verschiedene Methoden um Zellen zu synchronisieren. Nocodazol führt zu einem Arrest der Zellen in der Mitose und ein Serumentzug lässt die Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus verharren.

Trim71 überexprimierende HEK293-Zellen und Kontrollzellen wurden in der G₂/M-Phase synchronisiert, indem sie 16 Stunden mit 100 ng/μl Nocodazol behandelt wurden. Danach wurden Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und die Expression verschiedener Zellzyklusproteine mittels Western-Blot analysiert (siehe Abbildung 3.18 A). Direkt nach Freisetzung aus der Nocodazol-Behandlung (0 h) befanden sich die Zellen in der Prophase der Mitose. Hier war die Expression von UBE2C am stärksten. Diese sank im Verlauf der Interphase immer weiter ab. Bereits bei nicht synchronisierten Zellen war ein großer Unterschied in der Stärke des UBE2C-Signals zwischen GFP-Trim71 und GFP-überexprimierenden Zellen zu erkennen. Die Analyse des UBE2C-Zielgens Geminin zeigte, dass dessen Expression nach Nocodazol-Behandlung am höchsten war und danach stetig absank. In nicht synchronisierten Zellen ist kein Unterschied in der Menge an Geminin nach Überexpression von Trim71 zu erkennen. Erst nach Gleichschaltung des Zellzyklus wird deutlich, dass in Trim71 überexprimierenden Zellen Geminin herunterreguliert wurde. Gleiches ist in Zellen nach Serumentzug zu beobachten (siehe Abbildung 3.18 B). Direkt nach Freisetzung aus dem Serumentzug befinden sich die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus. Geminin, UBE2C und Securin waren nur schwach nachzuweisen. In der S-Phase (3 h und 8 h) stieg die Expression von Geminin langsam an und hat seinen Höhepunkt nach 16 Stunden am Ende der G₂-Phase kurz vor der Mitose. In der Mitose sorgt dann die angestiegene Aktivität von UBE2C für eine Degradation der beiden Proteine. Nach 30 Stunden sind die Zellen wieder asynchron und die anfänglichen Unterschiede in der Geminin-Expression waren nicht mehr zu detektieren. Der Expressionsverlauf von Securin ähnelt stark dem von Geminin, allerdings ist hier keine Herunterregulation durch Überexpression von Trim71 zu erkennen. Cyclin B1 zeigte nur sehr geringe Expressionsunterschiede im Verlauf des Zellzyklus. Auch hier hat die Überexpression von Trim71 keinen Einfluss.

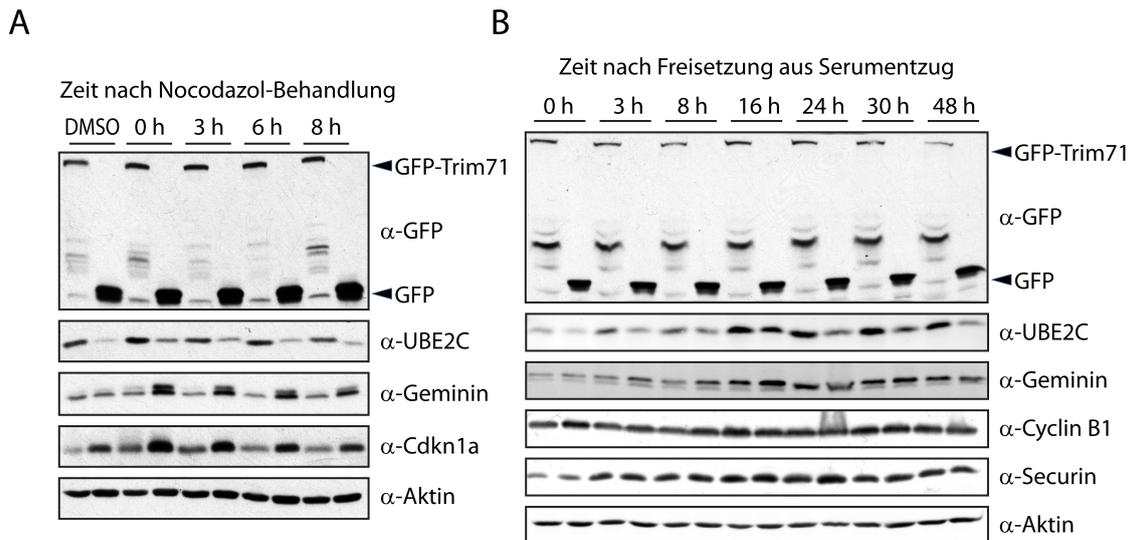


Abbildung 3.18: ANALYSE DER EXPRESSION VON UBE2C-ZIELGENEN NACH ZELLSYNCHRONISATION. A) Stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden 16 h mit 100 ng/μl Nocodazol behandelt und so in der G₂/M-Phase synchronisiert und die Expression des UBE2C-Zielgens Geminin analysiert. In nicht synchronisierten Zellen (DMSO) ist kein Unterschied in der Expression von Geminin nach Überexpression zu erkennen. Erst nach Gleichschaltung des Zellzyklus durch Nocodazol wird eine Herunterregulierung von Geminin nach Trim71 Überexpression deutlich. B) In diesem Fall wurden die Zellen durch eine 60 stündige Reduktion des Serums in der G₀-Phase arretiert. Auch hier wird eine Reduktion der Aktivität von Geminin nach Trim71-Überexpression deutlich. Trim71 hat keinen Einfluss auf die Expression der beiden anderen UBE2C-Substrate Cyclin B1 und Securin.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Trim71 nicht nur zu einer Überexpression von UBE2C führt, sondern auch, dass das dahintergeschaltete UBE2C-Substrat Geminin herunterreguliert wird. Dies könnte eine Erklärung für die erhöhte Proliferationsrate dieser Zellen sein.

3.8 Trim71 interagiert nicht mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym UBE2C

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die zur Hochregulation von UBE2C durch Trim71 führen könnten. Zum einen könnte es direkt über eine Interaktion von Trim71 und UBE2C verlaufen. Es ist beschrieben, dass Trim71 ein mRNA-bindendes-Protein ist, das die Translation der gebundenen Ziel-mRNA inhibiert und zu deren Abbau führt [104]. Allerdings gibt es auch Beispiele dafür, dass Proteine durch Bindung die mRNA stabilisieren und so deren Expression erhöhen [96, 176]. Um herauszufinden, ob Trim71 die mRNA von UBE2C stabilisiert, wurde eine RNA-Immunpräzipitation (RIP) durchgeführt. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit Trim71-Ig bzw. nur Ig als Kontrolle transfiziert und mittels Antikörper gegen das humane Ig immunpräzipitiert. Gebundene RNA wurde isoliert und mittels qPCR quantifiziert (siehe Abbildung 3.19). Es war keine Anreicherung von UBE2C nach Transfektion von Trim71 zu erkennen, weshalb man davon ausgehen kann, dass

Trim71 nicht an die mRNA von UBE2C bindet. Als Kontrolle wurde das in der RIP-Chip-Analyse (siehe Abschnitt 3.4) gefundene HoxA9 verwendet. Nach Trim71-IP ist HoxA9 im Vergleich zur Kontroll-IP um das Doppelte angereichert .

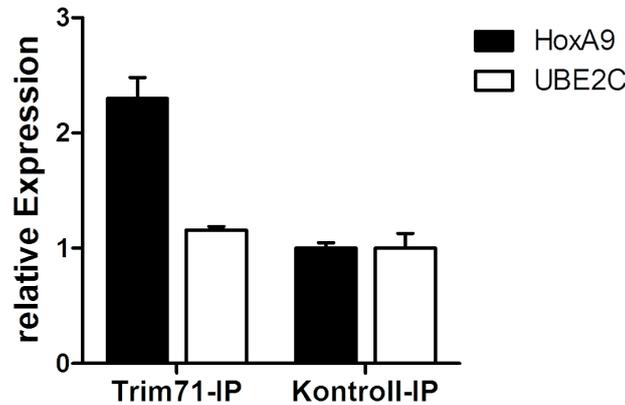


Abbildung 3.19: TRIM71 BINDET NICHT AN DIE MRNA VON UBE2C. Nach RNA-Immünpräzipitation mittels Ig-Antikörper kann keine Anreicherung von UBE2C in mit Ig-Trim71 transfizierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Ig) beobachtet werden. Als Positivkontrolle diente HoxA9. Hier ist eine Anreicherung von ca. 50 % in den Trim71 überexprimierenden Zellen zu erkennen. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens HPRT normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten mit der Standardabweichung (SD).

Weiterhin könnte Trim71 über Bindung des Proteins zu einer Stabilisierung und Hochregulation von UBE2C führen. So konnten Chen und Kollegen zeigen, dass Trim71 durch Bindung und Ubiquitinierung das Shc-SH2-Bindeprotein 1 (SHCBP1) stabilisiert [28]. In einer CoIP wurde die Interaktion von Trim71 mit UBE2C auf Proteinebene untersucht (siehe Abbildung 3.20). Es wurden HEK293T-Zellen mit UBE2C- und Trim71-Konstrukten transfiziert, nach 24 Stunden geerntet und lysiert. Dabei wurde UBE2C als Ig-Fusionsprotein in den Zellen transfiziert. Dies kann direkt an Protein G gekoppelte magnetische Kügelchen binden und über einen Magneten aus dem Zelllysate präzipitiert werden. Trim71 wurde als flag-Fusionsprotein exprimiert, um eine Coimmunpräzipitation mittels flag-Antikörper im Western-Blot nachweisen zu können. Um unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde als Kontrolle ein Ansatz mit dem Ig-pRK5-Leervektor mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde das bereits beschriebene Interaktionspaar Trim71 und Ago2 verwendet. Wie erwartet, konnte in der Positivkontrolle mit Ig-Ago2 das flag-markierte Trim71 copräzipitiert werden. Die zu untersuchende Bindung von Trim71 und UBE2C konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

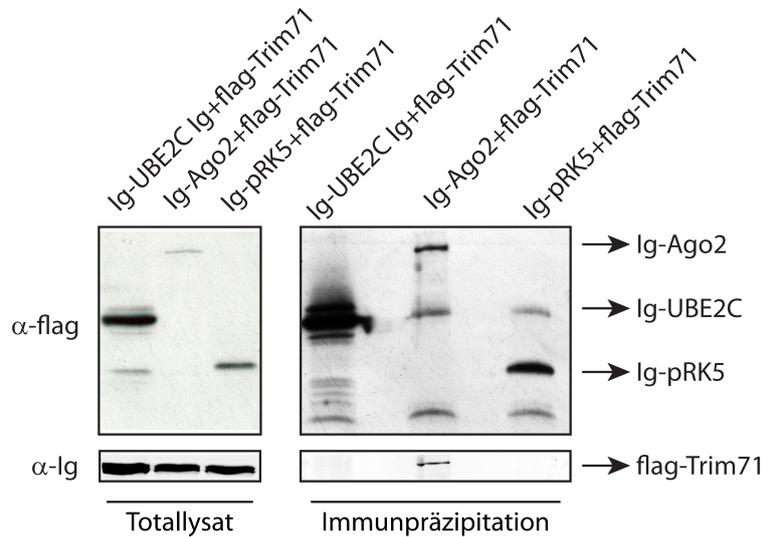


Abbildung 3.20: TRIM71 INTERAGIERT NICHT MIT UBE2C. CoIP von Trim71 nach Überexpression von Trim71 und UBE2C. Mittels Protein G gekoppelter magnetischer Kügelchen konnte das Ig-UBE2C-Fusionsprotein aus dem Zelllysate präzipitiert werden. Eine Interaktion mit Trim71 konnte nicht nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle diente die bereits beschriebene Interaktion von Trim71 und Ago2.

3.9 Überexpression von Trim71 hat keinen Einfluss auf die Expression von c-Myc und p53 in HEK293-Zellen

Da im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass Trim71 nicht direkt mit UBE2C interagiert, muss es einen zwischengeschalteten Regulator geben, dessen Expression von Trim71 beeinflusst wird und der wiederum die Expression von UBE2C beeinflusst. Auch mehrere hintereinandergeschaltete Regulatoren sind denkbar. Der Transkriptionsfaktor c-Myc ist als UBE2C regulierendes Gen beschrieben worden [62]. C-Myc Überexpression führt zu einer verstärkten Expression von UBE2C [16]. Ob Trim71 einen Einfluss auf c-Myc hat und so die Expression von UBE2C erhöht, wurde mittels qPCR und Western-Blot in stabil transfizierten HEK293-Zellen analysiert (siehe Abbildung 3.21). Während sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene eine deutliche Hochregulation von UBE2C nach Überexpression von Trim71 zu erkennen ist, wird c-Myc nicht durch Trim71 reguliert. Somit kann c-Myc, zumindest in diesem System als zwischengeschalteter Regulator ausgeschlossen werden.

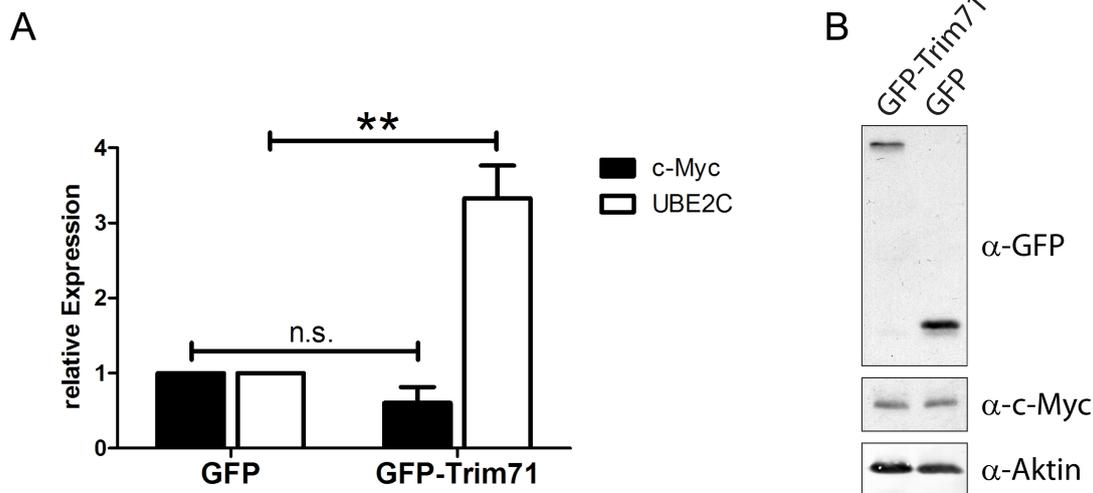


Abbildung 3.21: DIE EXPRESSION VON C-MYC IST NACH ÜBEREXPRESSION VON TRIM71 UNVERÄNDERT. A) qPCR-Analyse der Expression von c-Myc und UBE2C in stabil transfizierten HEK293-Zellen. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens HPRT normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Experimente (n=3) mit dem Standardfehler (SEM). ** = $p < 0,005$; n.s. = nicht signifikant. B) Western-Blot-Analyse der Expression von c-Myc und UBE2C in stabil transfizierten HEK293-Zellen.

Auf der Suche nach anderen potentiellen Regulatoren von UBE2C schien p53 ein weiterer interessanter Kandidat zu sein. Es ist zwar bisher keine direkte Interaktion von p53 und UBE2C beschrieben, jedoch konnte gezeigt werden, dass Tumore p53-defizienter Mäuse UBE2C überexprimieren [50]. Diese Tumore zeigen außerdem eine verringerte Expression von HoxA5, gleiches konnte für die Überexpression von Trim71 in HEK293-Zellen gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.4.2). Der Tumorsuppressor p53 ist im inaktiven Zustand im Zytoplasma an die E3-Ubiquitin Ligase Mdm2 gebunden und wird schnell umgesetzt [121]. Durch Stresssignale wird p53 phosphoryliert, was eine Interaktion mit Mdm2 verhindert. P53 akkumuliert im Zellkern und induziert dort die Transkription von p53-abhängigen Zielgenen [46]. Zur Analyse von p53 Unterschieden in Trim71 überexprimierenden Zellen ist es wichtig, zwischen der aktiven und der inaktiven Form von p53 unterscheiden zu können, da nur die aktive Form die Expression von Zielgenen beeinflusst und die Funktion der inaktiven Form bisher ungeklärt ist. Dazu wurden die Zelllysate in eine Zytoplasma- und in eine Kernfraktion getrennt und die Expression von p53 mittels Western-Blot untersucht (siehe Abbildung 3.22). Zur Überprüfung der Trennung von Zytoplasma- und Kernlysate wurde Histon H3, das nur im Kern exprimiert wird, als Marker verwendet. Wie Abbildung 3.22 zeigt, war die Fraktionierung erfolgreich, da im Zytoplasma kein Histon H3 detektierbar ist. P53 ist nur schwach im Zytoplasma exprimiert. Die Kernfraktion zeigt ein starkes Signal, das durch die Überexpression von Trim71 nicht verändert wird. Somit scheint neben Myc auch p53 als direkter vorangeschalteter Regulator, der die UBE2C-Expression kontrolliert, ausgeschlossen zu sein.

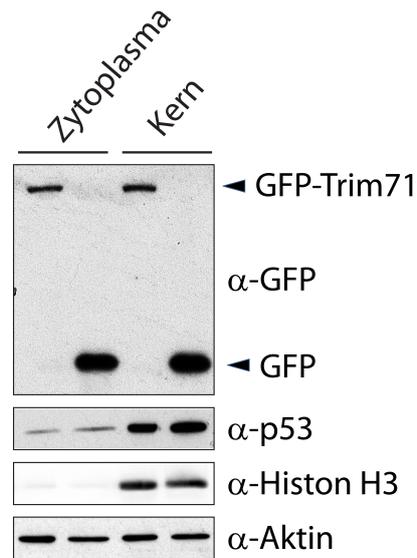


Abbildung 3.22: DIE EXPRESSION VON P53 IST NACH ÜBEREXPRESSION VON TRIM71 IN STABIL TRANSFIZIERTEN HEK293-ZELLEN UNVERÄNDERT. Die aktive Form von p53 ist im Kern lokalisiert, weshalb zur Analyse der p53 Expression das Lysat in eine Zytoplasma- und eine Kernfraktion getrennt wurde. P53 ist nur schwach im Zytoplasma exprimiert. Im Kernlysate ist ein starkes Signal erkennbar, das durch die Überexpression von Trim71 unverändert bleibt. Histone H3 dienen der Kontrolle der Fraktionierung, da es nur im Kern exprimiert wird.

Die Analyse von Expressionsunterschieden nach Überexpression von Trim71 in HEK293-Zellen hat gezeigt, dass mehrere Gene, die den Zellzyklus regulieren, von Trim71 beeinflusst werden (siehe Abbildung 4.1). Interessanterweise können alle diese Gene mit Krebs assoziiert werden. Bei *let-7* handelt es sich um einen anerkannten Tumorsuppressor, der in vielen Krebsarten herunterreguliert wird. Ebenso konnte für *HoxA5* gezeigt werden, dass es tumorsupprimierende Eigenschaften hat [138, 53].

Die Beteiligung von *Cdkn1a* an der Karzinogenese wurde unter anderem in *Cdkn1a*-Knockout-Mäusen untersucht. Diese entwickeln nach 16 Monaten spontane Tumore [111] und sind anfälliger für chemisch induzierte Tumore in der Haut [136]. Diese Beobachtungen und die Tatsache, dass *Cdkn1a* die Proliferation inhibiert, demonstrieren die Funktion von *Cdkn1a* als Tumorsuppressor.

In früheren Veröffentlichungen konnte demonstriert werden, dass UBE2C die Fehlsegregation von Chromosomen verursacht und die Tumorentstehung fördert [168]. UBE2C wird in vielen soliden und hämatologischen Tumoren hochreguliert. Die Menge an UBE2C korreliert dabei mit der Aggressivität des Tumors, weshalb UBE2C als vielversprechender Tumormarker gilt [62].

Trim71 blockiert die Tumorsuppressoren *Cdkn1a* und *let-7* und fördert die Expression von UBE2C. Es wird in einigen Krebsarten hochreguliert und wirkt somit als potentielles Onkogen.

3.10 Generierung einer adulten Trim71 Knockout-Maus

Die im vorangegangenen Teil dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Trim71 die Proliferation nach Überexpression in HEK293-Zellen erhöht. Außerdem sind in diesen Zellen Gene reguliert, die mit Krebs assoziiert werden können. Da es sich bis hierher um ein artifizielles *in vitro* System handelt, war es wichtig den Einfluss von Trim71 auf Proliferation und Tumorentwicklung *in vivo* zu verifizieren. Der konventionelle Knockout von Trim71 wurde bereits im Jahr 2008 von Schulman und Kollegen beschrieben [108]. Diese Mäuse haben einen Neuralrohrdefekt und sterben früh in der Embryonalentwicklung zwischen den Entwicklungsstadien E10.5 und E11.5 (siehe Abschnitt 1.6). Funktionelle Analysen an Embryonen sind kompliziert und sehr zeitaufwändig, weshalb es nötig war eine konditionale Trim71 Knockout-Maus zu generieren, bei der durch gewebespezifische Geninaktivierung letale Defekte vermieden werden sollen. Außerdem können dadurch die Phänotypen eindeutig der primären Funktion von Trim71 in einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten konditionalen Trim71 Knockout-Mäuse (Trim71^{fl/fl}) wurden von der Firma Taconic Artemis (Köln) generiert. Dafür wurde eine Klonierungsstrategie verwendet, bei der das letzte von vier Exons durch zwei gleichgerichtete loxP-Seiten flankiert ist (siehe Abbildung 3.23). Durch die Verpaarung dieser Tiere mit einer transgenen Cre-Linie können gewebespezifische Trim71 Knockout-Mäuse generiert werden.

3.10.1 Generierung einer hautspezifischen Trim71 Knockout-Maus

Trim71 wird in der Basalzellschicht der murinen embryonalen Epidermis exprimiert [147]. Aufgrund ihrer hohen und durchgehenden Fähigkeit zur Selbsterneuerung gilt die Haut als optimales Organ zur Untersuchung von Differenzierungs- und Proliferationsprozessen *in vivo*. Außerdem ist die chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut eines der am besten etablierten *in vivo* Modelle für die schrittweise verlaufene Entwicklung von Tumoren.

Somit schien die Haut das ideale Organ für einen gewebsspezifischen Trim71 Knockout zu sein. Dazu wurden die geflochten Trim71-Mäuse in eine K14-Cre-Mauslinie, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Keratin 14 (K14) exprimiert, gekreuzt (siehe Abbildung 3.23 A). Keratin 14 wird bereits in der frühen Embryonalentwicklung in der Basalzellschicht, aus der später die Epidermis mit ihren Stammzellen gebildet wird, exprimiert [20]. Somit führt die Verpaarung mit einer K14-Cre-Linie zu einem Knockout von Trim71 in der gesamten Epidermis. Da gezeigt werden konnte, dass der humane K14-Promotor in murinen Oozyten transkriptionell aktiv ist und das Enzym bis nach der Befruchtung aktiv bleibt, wurde das transgene Cre-Allel nur durch männliche Tiere auf die Nachkommen übertragen [57]. Der Genotyp der Mäuse wurde mittels PCR überprüft (siehe Abbildung 3.23 B). Alle hautspezifischen Trim71 Knockout-Mäuse werden im Folgenden als K14-Cre/Trim71^{fl/fl} bezeichnet.

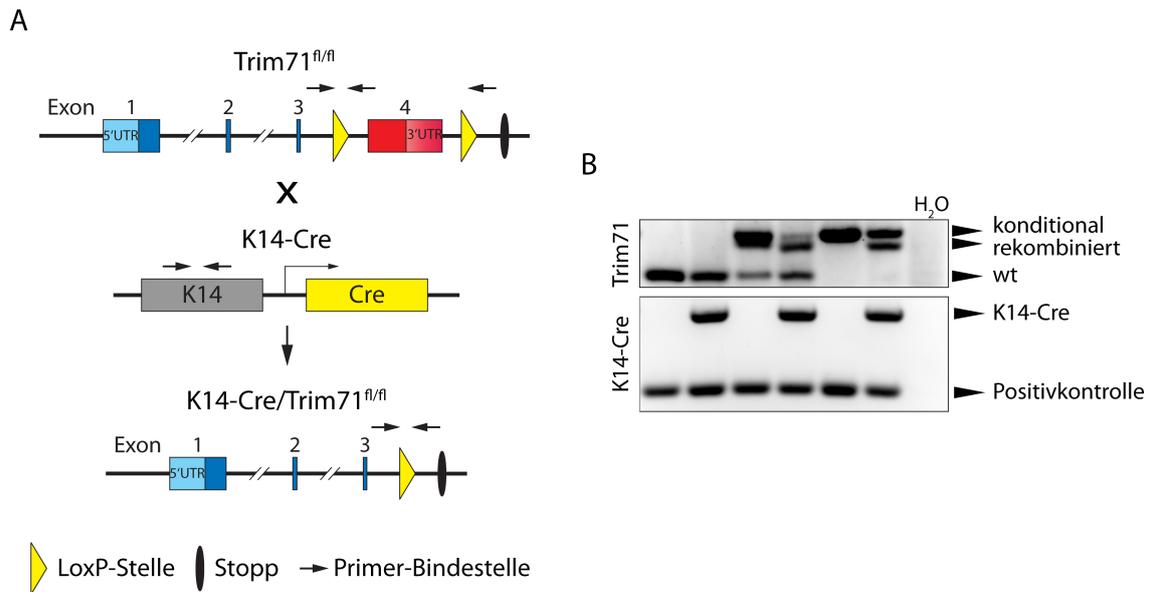


Abbildung 3.23: GENERIERUNG EINER HAUTSPEZIFISCHEN TRIM71 KNOCKOUT-MAUS A) Verpaarungsschema. Exon 4 der konditionalen Trim71 Knockout-Mäuse ist von je einer loxP-Seite flankiert und kann durch Kreuzung in eine K14-Cre-Linie herausgeschnitten werden, um so zu einem epidermalen Trim71 Knockout zu führen (K14-Cre/Trim71^{fl/fl}). B) Die Überprüfung des Genotyps erfolgte mittels PCR sowohl auf die Cre-Rekombinase als auch auf den Trim71 Lokus. Zur Genotypisierung der Trim71-Mäuse wurde eine Drei-Primer-Strategie angewendet. Als Ergebnis konnten drei verschiedene Banden entstehen: eine 242 bp-Bande für das Wildtypallel, eine 322 bp-Bande für das mutierte Allel und eine 361 bp-Bande für das konditionale Allel. Die K14-Cre-Mäuse wurden mit einer Kombination aus zwei Primerpaaren typisiert. Dabei entstand eine 200 bp große Bande als interne Kontrolle der PCR und eine 494 bp-Bande bei allen transgenen Tieren.

3.10.2 Trim71 wird in CD34⁺-Stammzellen der adulten Haut exprimiert

Da *let-7* in nahezu allen differenzierten Zellen nachweisbar ist, war anzunehmen, dass Trim71 in der Haut nur in den epidermalen Stammzellen exprimiert wird. Um dies nachzuweisen und zu zeigen, dass K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse kein Trim71 in der Haut exprimieren, wurden verschiedene Trim71 Antikörper in der Mikroskopie getestet. Keiner der kommerziell erwerblichen Antikörper brachte zufriedenstellende Ergebnisse. Entweder konnte kein Signal detektiert werden oder das Signal war unspezifisch und zeigte keine Unterschied zwischen K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Kontrollmäusen. Die Antikörper wurden auf Paraffin- und Kryoschnitten der Haut und in der Immunfluoreszenz getestet. Auch die Herstellung eines eigenen Antikörpers blieb ohne Erfolg. Dementsprechend musste eine andere Lösung gefunden werden, um zwischen epidermalen Stammzellen und Keratinozyten unterscheiden zu können. Dies ist mittels magnetischer Zellseparation (MACS) möglich, indem man die epidermalen Zellen mit einem Antikörper gegen einen Stammzellmarker inkubiert. Dieser Antikörper ist an magnetische Kügelchen gekoppelt, so dass markierte Zellen über einen Magneten von den anderen isoliert werden können.

In diesem Fall wurde CD34 als Marker für epidermale Stammzellen verwendet, der in der Haut spezifisch in den Stammzellen der Haarfollikel exprimiert wird [126]. Mittels MACS-System mit einem FITC gekoppelten CD34 Antikörper und anti-FITC gekoppelten

magnetischen Kügelchen (MicroBeads) konnten diese angereichert werden. Die Reinheit der isolierten Population wurde in der Durchflusszytometrie überprüft.

Primär isolierte Keratinozyten adulter Mäuse wiesen einen CD34⁺-Zellanteil von ca. 15 % auf (siehe Abbildung 3.24 A). Dieser konnte durch die Zellseparation auf 92,5 % gesteigert werden.

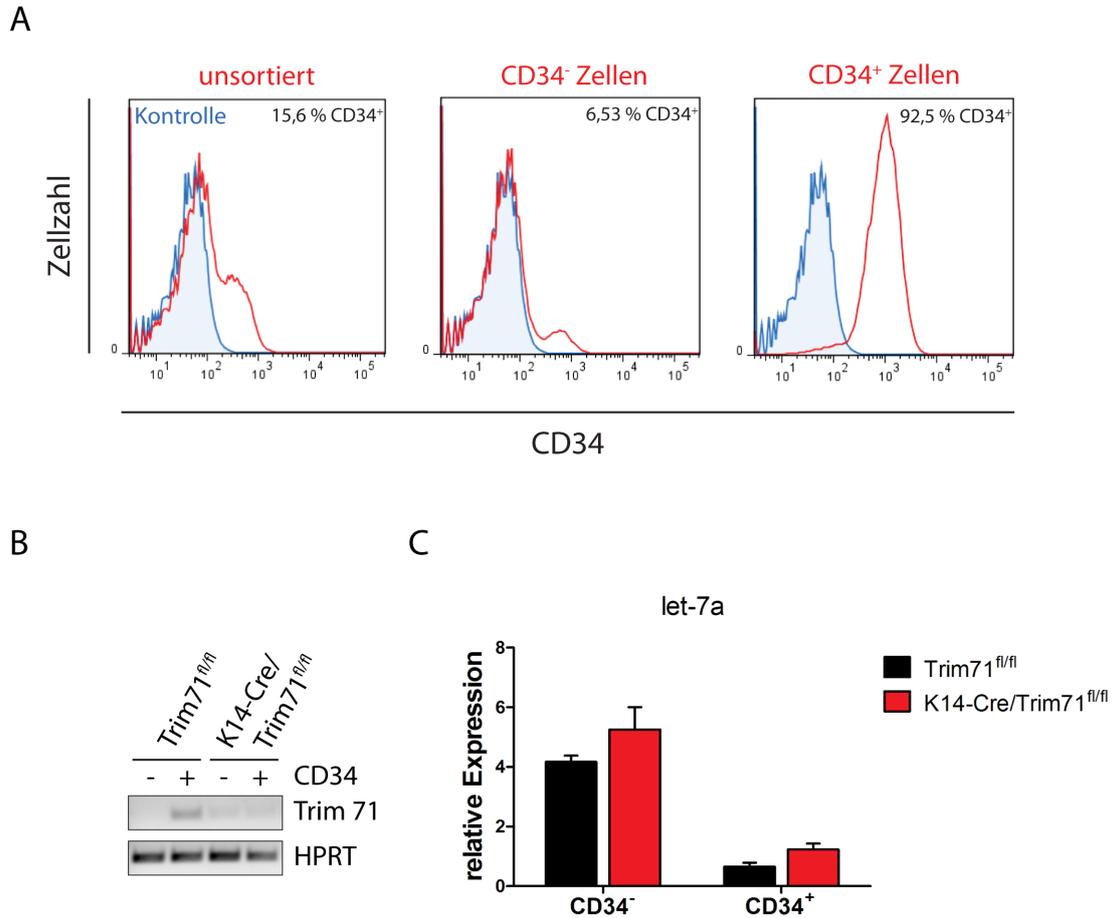


Abbildung 3.24: TRIM71 WIRD IN CD34⁺-STAMMZELLEN DER ADULTEN HAUT EXPRIMIERT. Primäre Keratinozyten wurden aus der Haut adulter Mäuse isoliert. Zur Trennung der epidermalen Stammzellen wurden alle mit einem an magnetische Kügelchen gekoppelte CD34-Antikörper inkubiert. Dieser bindet epidermale Stammzellen, die über einen Magneten von den anderen Zellen getrennt werden können. A) FACS-Analyse der sortierten Zellen. Links: vor der Separation, Mitte: CD34⁻-Fraktion und rechts: CD34⁺-Fraktion. B) Semiquantitative PCR auf Trim71 der sortierten Zellen aus Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen. Als Positivkontrolle der PCR diente das Haushaltsgen HPRT. C) qPCR-Analyse der Expression von let-7a in CD34⁻- und CD34⁺-Zellen. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens 5.8S rRNA normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei technischen Replikaten mit der Standardabweichung (SD).

Aus den sortierten Zellen wurde RNA isoliert und für PCR-Analysen in cDNA umgeschrieben. In einer semiquantitativen PCR mit Primern gegen das murine Trim71 konnte eine Bande in der CD34⁺-Fraktion der Trim71^{fl/fl}-Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 3.24 B). Diese war in der CD34⁻-Fraktion und in Zellen der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Tiere nicht erkennbar. Somit konnte zum einen gezeigt werden, dass der hautspezifische Knock-

out von Trim71 funktionell ist und dass Trim71 spezifisch in den epidermalen Stammzellen und nicht in Keratinozyten exprimiert wird. Des Weiteren wurde die let-7a Expression in den primär isolierten Keratinozyten untersucht (siehe Abbildung 3.24 C). In den CD34⁺-Stammzellen war die Expression gering, während sie in den CD34⁻-Zellen um etwa das Vierfache erhöht war. CD34⁺-Zellen von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}, die kein Trim71 exprimieren, zeigten eine um etwa 50 % erhöhte Expression von let-7a im Vergleich zu CD34⁺-Zellen der Trim71^{fl/fl}-Mäuse. In CD34⁻-Zellen war dieser Unterschied vernachlässigbar klein.

3.10.3 K14-Cre/Trim71^{fl/fl} zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp

K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen Unterschied in Größe, Gewicht oder generellem Erscheinungsbild im Vergleich zu Trim71^{fl/fl}-Kontrolltieren (siehe Abbildung 3.25 A). Auch genauere histologische Untersuchungen der Haut lassen keine Unterschiede erkennen (siehe Abbildung 3.25 B). Durch eine H&E-Färbung an Paraffinschnitten der Haut wird die Epidermis klar sichtbar. Diese ist in der Detailansicht von Abbildung 3.25 B (unten) als oberste violett gefärbte Schicht zu erkennen und grenzt sich gut von der darunterliegenden heller gefärbten Dermis ab.

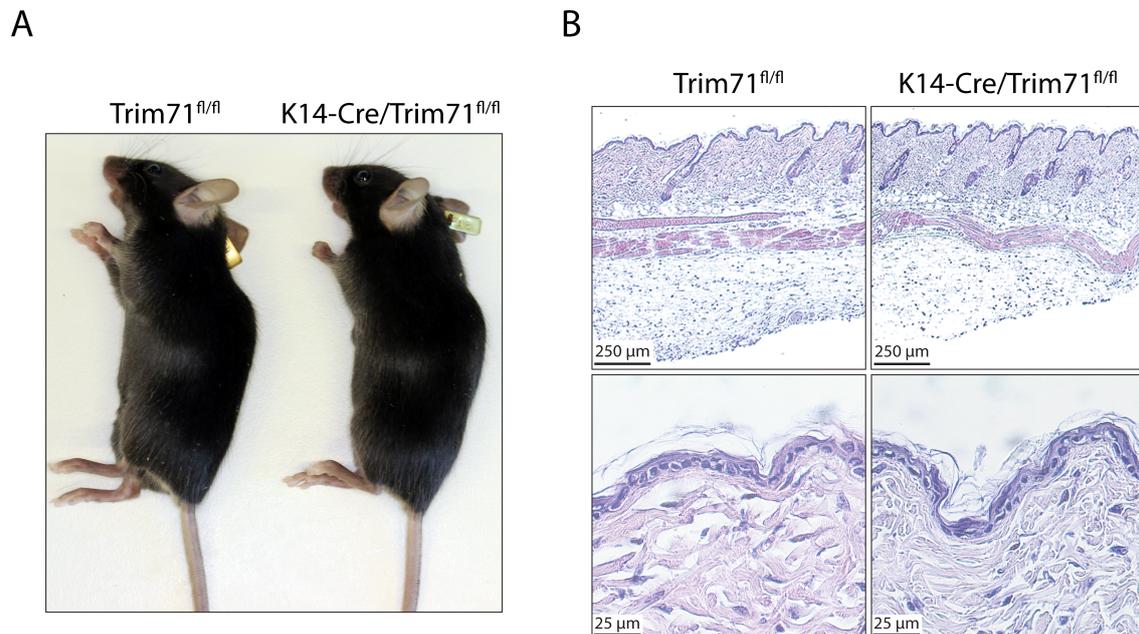


Abbildung 3.25: K14-CRE/TRIM71^{FL/FL} ZEIGEN KEINEN OFFENSICHTLICHEN PHÄNOTYP. A) Repräsentatives Bild von zwei weiblichen Geschwistertieren, im Alter von sechs Wochen. Links ist die Kontrollmaus mit gefloxtem Trim71-Allel ohne Cre-Rekombinase (Trim71^{fl/fl}) zu sehen und rechts eine Maus mit hautspezifischem Knockout von Trim71 (K14-Cre/Trim71^{fl/fl}). B) Repräsentative H&E-Färbungen an Paraffinschnitten der Haut von Trim71^{fl/fl}-Kontrollmäusen und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Tieren in zwei verschiedenen Vergrößerungen.

3.10.4 Die epidermale Stammzellnische bleibt durch den Knockout von Trim71 unverändert

Da im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass Trim71 in CD34⁺-Stammzellen der Haut exprimiert wird, war es wichtig die Stammzellnische der Haarfollikel von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen genauer zu analysieren. Dazu wurde die Epidermis aus Mausschwänzen präpariert und als Totalpräparat (*Whole-Mount*) für die Mikroskopie verwendet. Die Schwanzepidermis ist hierfür besonders gut geeignet, da sie sich leicht, nach einem Verdau mit Trypsin von der Dermis ablösen lässt. Außerdem ist die Haardichte am Schwanz relativ gering, weshalb die Mäuse vorher nicht rasiert werden müssen. Für die indirekte Immunfärbung wurden die Epidermisstücke fixiert und mit Antikörpern gegen Keratin 15 (K15) und Integrin $\alpha 6$ (Itg $\alpha 6$) gefärbt. K15 ist wie CD34 in den Stammzellen der Haarfollikel exprimiert, wohingegen Itg $\alpha 6$ von allen Keratinozyten gebildet wird. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert. Abbildung 3.26 zeigt eine solche *Whole-Mount*-Färbung von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen. Es sind jeweils drei Haarfollikel zu sehen. Bei den schwarzen Bereichen in der Durchlichtaufnahme (siehe Abbildung 3.26 oben) handelt es sich um die Talgdrüsen. Durch unspezifische Bindung des Kernmarkers DAPI an die Haare sind diese gut in blau in der Immunfluoreszenz (siehe Abbildung 3.26 unten) zu erkennen. In rot sieht man die Itg $\alpha 6$ markierten Keratinozyten und in grün alle K15⁺-Zellen. Die Stammzellen sind im unteren Bereich des Haarfollikels in der Wulstregion angeordnet. Betrachtet man die Aufnahmen der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse sind hier keine Auffälligkeiten oder Anomalien im Vergleich zu den Kontrolltieren zu erkennen.

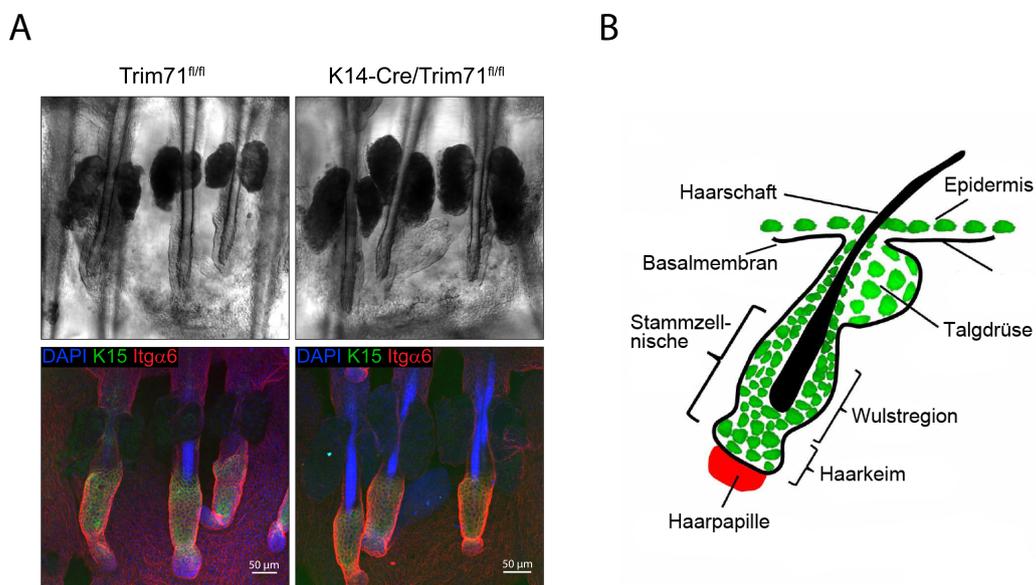


Abbildung 3.26: WHOLE-MOUNT-IMMUNFÄRBUNG DER MAUSSCHWANZEPIDERMIS VON TRIM71^{FL/FL}- UND K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN. A) Dargestellt sind drei Haarfollikel mit Talgdrüsen. Mit einem Antikörper gegen Keratin 15 (K15) wurden die epidermalen Stammzellen des Haarfollikels markiert (grün). In rot sind alle Keratinozyten mit einem Antikörper gegen Integrin $\alpha 6$ (Itg $\alpha 6$) gefärbt worden. Die Zellkerne wurden mit DAPI in blau markiert. B) Schematische Darstellung eines Haarfollikels zur besseren Verständlichkeit der mikroskopischen Aufnahmen. Abbildung adaptiert nach Rompolas *et al.*, 2013 [144].

Um die genaue Anzahl an Stammzellen in der Epidermis zu bestimmen und eventuelle Unterschiede zwischen Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen zu erkennen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Dazu wurde die Expression des Stammzellmarkers CD34 von primär isolierten Keratinozyten in der Durchflusszytometrie gemessen (siehe Abbildung 3.27). Der Anteil an CD34⁺-Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl der Epidermis liegt für beide Genotypen bei ca. 7,5 %.

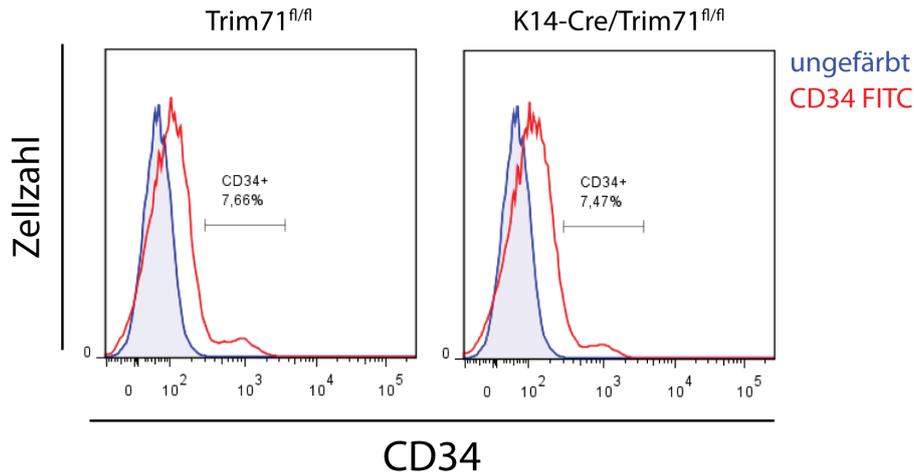


Abbildung 3.27: FACS-ANALYSE DER EPIDERMALEN STAMMZELLEN VON TRIM71^{FL/FL}- UND K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN. Aus der Haut von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen wurden Keratinozyten isoliert und die Expression des Stammzellmarkers CD34 in der Durchflusszytometrie gemessen. Ca. 7,5 % der Keratinozyten beider Genotypen sind positiv für CD34.

3.11 Das Fehlen von Trim71 führt zur Reduktion TPA-induzierter Akanthose in der Haut

Um den *in vitro* beschriebenen Effekt von Trim71 auf die Proliferation *in vivo* zu untersuchen, wurden K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse mit dem Tumorpromotor TPA behandelt. TPA ist ein synthetisches Analogon zu Diacylglycerol (DAG), das über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) zu einer entzündlichen Reaktion und zur Hyperproliferation der Epidermis (Hyperplasie) führt [23]. Je Genotyp wurden drei Mäuse zwei Mal örtlich 50 nmol TPA auf den Rücken appliziert. Am Tag nach der letzten Behandlung wurde die Haut der Mäuse präpariert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und mikroskopisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.28 A dargestellt. Durch die Behandlung mit TPA schwillt die Epidermis dramatisch an. Man spricht dabei von Akanthose, eine Verdickung des *Stratum spinosum* durch Hyperplasie. Diese war in Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen zu beobachten, jedoch zeigten die Kontrolltiere eine signifikant stärkere Reaktion auf TPA (siehe Abbildung 3.28 B). Im Durchschnitt lag die Dicke der Epidermis hier bei 58,4 μm . K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen im Vergleich hatten nur eine mittlere Dicke der Epidermis von

36,7 μm . In unbehandeltem Zustand war kein Unterschied in der Dicke der Epidermis von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen zu erkennen.

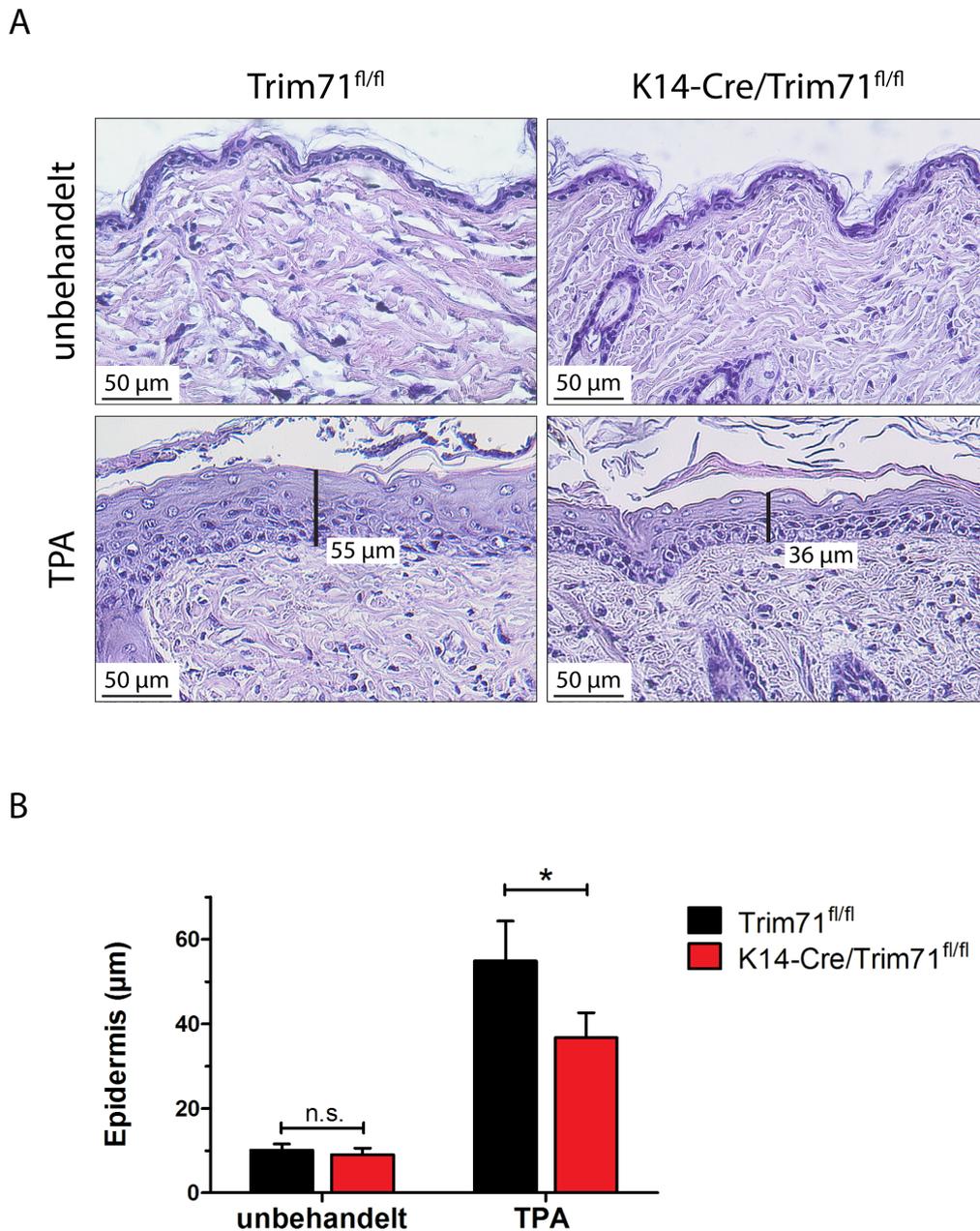


Abbildung 3.28: REAKTION VON K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}- UND KONTROLLMÄUSEN AUF TPA-INDUZIERTE EPIDERMIALE HYPERPROLIFERATION. Gruppen von je drei Mäusen ($n = 3$) wurden zwei Mal mit 50 nmol TPA behandelt. 24 Stunden nach der letzten Behandlung wurde die Haut der Mäuse präpariert und für histologische Färbungen in Paraffin eingebettet. A) H&E-Färbungen der Haut von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen vor und nach der Behandlung mit TPA. B) Die Dicke der Epidermis von drei Mäusen pro Genotyp wurde an je 10 verschiedenen Positionen gemessen. In unbehandelter Haut konnte kein Unterschied festgestellt werden. Nach Behandlung mit TPA zeigte die Epidermis von Trim71^{fl/fl} (58,4 μm) eine signifikant höhere Hyperproliferation im Vergleich zu K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen (36,7 μm). Dargestellt ist der Mittelwert aus allen Messungen mit Standardabweichungen (SD). * = $p < 0,05$; n.s.: nicht signifikant

Die Unterschiede in der Dicke der Epidermis nach TPA-Behandlung sind allerdings noch kein Beweis dafür, dass in der Haut Trim71 defizienter Mäuse die Proliferation verringert ist. Dafür können auch andere Ursachen verantwortlich sein, wie eine durch Trim71 veränderte Apoptoserate in den Keratinozyten. Um Nachzuweisen, dass die Reduktion der TPA-induzierten Akanthose in K14-Cre/Trim71-Mäusen durch eine verringerte Proliferation der Keratinozyten ausgelöst wird, wurde die Anzahl an proliferierenden Zellen bestimmt. Dazu wurde den Mäusen zwei Stunden vor der Präparation der Haut eine BrdU-Lösung intraperitoneal injiziert. BrdU kann als synthetisches Analogon des Nukleosids Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut werden. Über Antikörper gegen BrdU können so proliferierende Zellen markiert werden. Bereits die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Anzahl an BrdU⁺-Zellen in den Kontrolltieren nach TPA-Behandlung wesentlich höher war als in K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen (siehe Abbildung 3.29 A). Die Quantifizierung (siehe Abbildung 3.29 B) ergab bei K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen eine signifikante Reduktion der BrdU⁺-Zellen nach TPA-Behandlung um 70 % im Vergleich zu Kontrolltieren. Unbehandelte Mäuse wiesen keinen Unterschied in der Proliferation auf.

Diese Versuche zeigten zum einen, dass Trim71 eine wichtige Rolle in der TPA-induzierten epidermalen Hyperplasie spielt und zum anderen dass Trim71 die Proliferation von Keratinozyten *in vivo* beeinflusst.

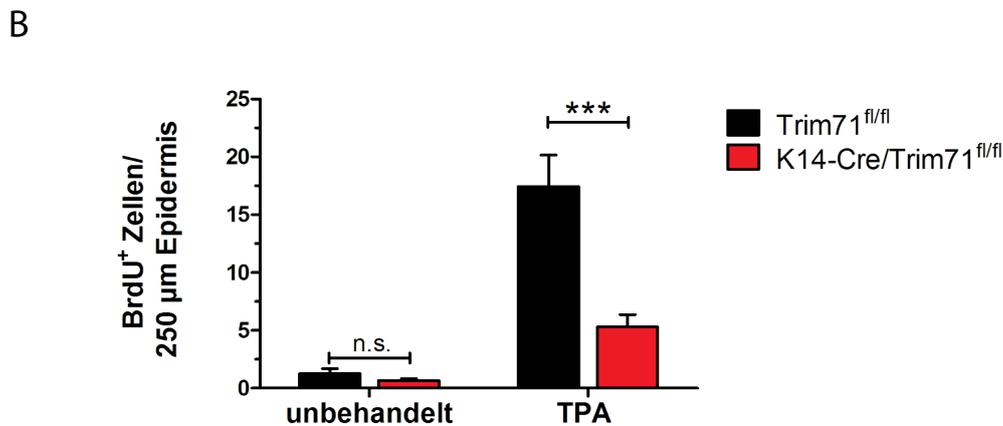
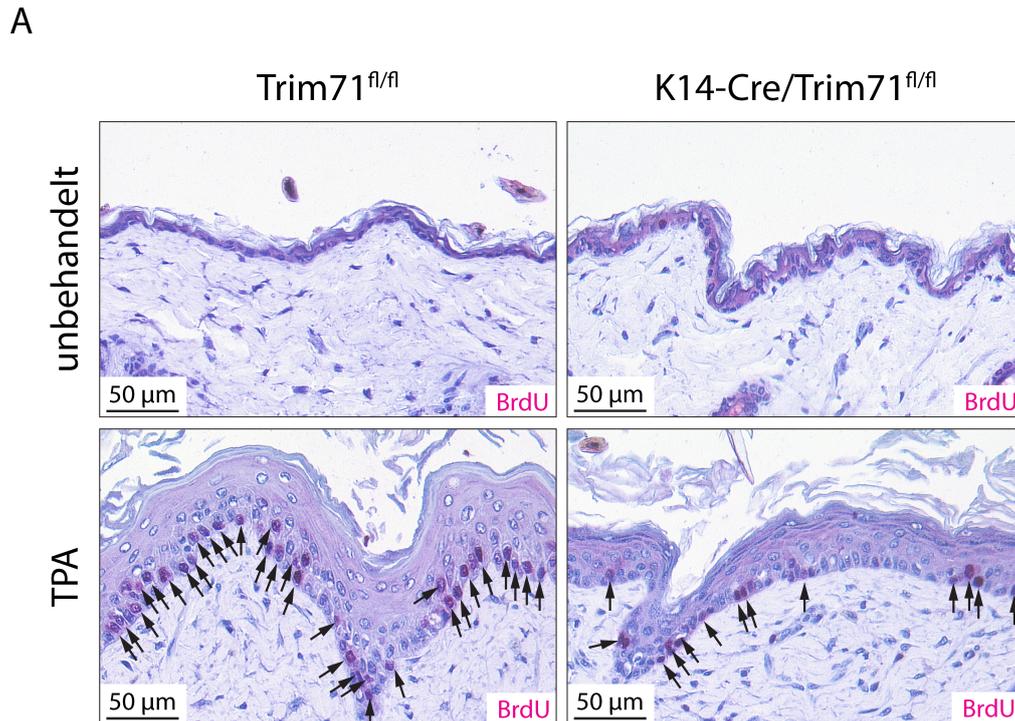


Abbildung 3.29: K14-Cre/Trim71^{FL/FL}-MÄUSE ZEIGEN EINE VERRINGERTE PROLIFERATION NACH TPA-BEHANDLUNG IM VERGLEICH ZU KONTROLLTIEREN (Trim71^{FL/FL}). Gruppen von je drei Mäusen (n=3) wurden wie vorher beschrieben mit TPA behandelt. Zwei Stunden vor Präparation der Haut wurde den Tieren eine BrdU-Lösung (1 ml pro 100 g Gewicht) intraperitoneal injiziert. A) BrdU-Färbung von Parafinschnitten der Haut behandelter (TPA) und unbehandelter Mäuse. BrdU⁺-Zellen sind durch einen Pfeil markiert. B) Quantifizierung der BrdU⁺-Zellen von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen vor und nach der Behandlung mit TPA. In un behandelter Haut konnte kein Unterschied festgestellt werden. Nach Behandlung mit TPA zeigte die Epidermis von Trim71^{fl/fl} eine signifikant höhere Anzahl an BrdU⁺-Zellen im Vergleich zu K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen. Je Maus wurden 5 Gesichtsfelder ausgezählt. Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl an BrdU⁺-Zellen pro 250 µm Epidermis mit Standardabweichung (SD). *** = p<0,001; n.s.: nicht signifikant

3.12 K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse sind partiell gegen DMBA/TPA-induzierte Karzinogenese geschützt

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass Trim71 die Proliferation von Keratinozyten nach TPA-Induktion *in vivo* beeinflusst. Fehlsteuerungen der Proliferation und des Zellzyklus sind maßgeblich an der Entstehung von Krebs beteiligt. Des Weiteren reguliert Trim71 die krebsassoziierten Zielgene UBE2C, let-7a und Cdkn1a (vergleiche Abschnitt 3.4.2) und ist selbst in einigen Krebsarten hochreguliert [29]. Trim71 agiert somit als potentiell Onkogen, weshalb es wichtig war, die Rolle von Trim71 in der Tumorentwicklung und -progression zu analysieren. Dazu eignet sich das sehr gut etablierte *in vivo* Modell der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese, bei dem die Tumorbildung durch die Applikation eines Kanzerogens initiiert und durch wiederholte Behandlung mit einem Tumorpromotor vorangetrieben wird (vergleiche Abschnitt 1.8).

In diesem Fall wurden K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse und Trim71^{fl/fl}-Wurfgeschwister einmalig mit dem Kanzerogen DMBA behandelt. Danach wurde den Tieren zwei Mal wöchentlich der Tumorpromotor TPA appliziert. Das Experiment wurde insgesamt zwei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. Da die Ergebnisse in beiden Fällen sehr ähnlich waren, werden sie hier nur einmal gezeigt.

3.12.1 K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse zeigen einen verzögerten Beginn der Tumorbildung nach DMBA/TPA-Behandlung

Sechs Wochen nach der Tumorinduktion durch DMBA zeigten die Kontrolltiere die ersten Papillome, bei K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen dauerte es sieben Wochen (siehe Abbildung 3.30). Nach zwölf Wochen hatte sich bei allen Kontrolltieren Papillome entwickelt. Trim71 Knockout-Tiere zeigten eine starke Verzögerung im Beginn der Tumorbildung. Es dauerte 26 Wochen bis alle Mäuse dieses Genotyps Papillome aufwiesen (siehe Abbildung 3.30).

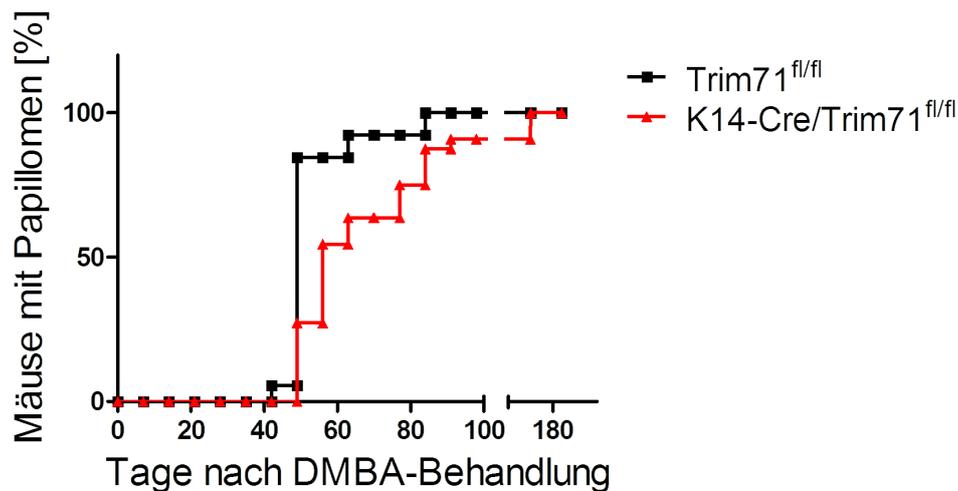
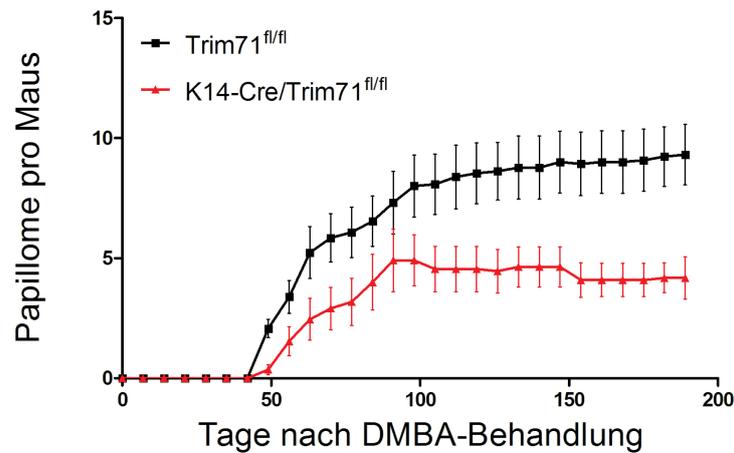


Abbildung 3.30: VERZÖGERTER BEGINN DER TUMORBILDUNG BEI K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN IM VERGLEICH ZU TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN. Gruppen von je 15 Mäusen wurden mit 100 nmol DMBA behandelt. Eine Woche danach startete die Tumorpromotion durch die regelmäßige (zwei Mal pro Woche) Applikation von 50 nmol TPA. Dargestellt ist die Prozentzahl an Mäusen mit Papillomen aufgetragen gegen die Zeit. K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse zeigen einen verspäteten Beginn der Tumorbildung.

3.12.2 Die Anzahl an Papillomen in K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen nach DMBA/TPA-Behandlung ist reduziert

Bereits zu Beginn des Experiments wurde deutlich, dass die K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse durchschnittlich eine geringere Anzahl an Tumoren bildeten (siehe Abbildung 3.31 A). Dieser Unterschied vergrößerte sich im Verlauf des Versuchs, bis am Ende (nach 190 Tagen) die Anzahl an Tumoren von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen um ca. 50 % geringer war als bei den Kontrolltieren (siehe Abbildung 3.31 B). Im Durchschnitt entwickelten K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse 4,18 Papillome pro Maus. Dieser Wert war bei Trim71^{fl/fl}-Mäusen signifikant höher: bei ihnen lag der Durchschnittswert bei 9,31 Papillomen pro Maus.

A



B

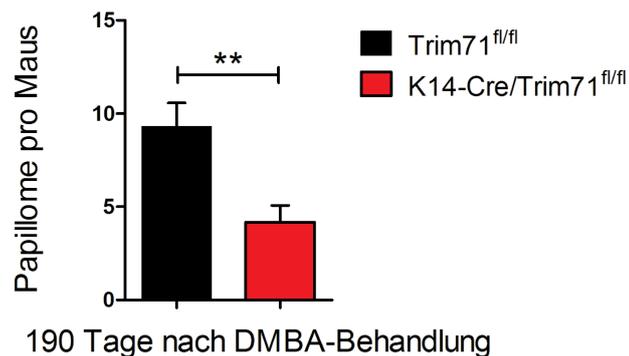


Abbildung 3.31: DIE ANZAHL AN TUMOREN IST IN K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN REDUZIERT. A) Tumormultiplizität: Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl an Papillomen pro Maus im Verlauf der Zeit. B) Anzahl an Papillomen nach 190 Tagen. Aufgetragen ist der Mittelwert an Papillomen pro Maus mit Standardabweichung (SD). ** = $p < 0,005$

3.12.3 Das Fehlen von Trim71 führt zu einer Verminderung der Tumorgroße nach DMBA/TPA-Behandlung

Nach 27 Wochen wurde das Experiment beendet, da die Papillome groß genug waren um ausreichend Material für weitere Analysen daraus zu gewinnen. Vor der Präparation der Papillome wurden alle Mäuse fotografiert und die Größe von jedem Papillom bestimmt. Abbildung 3.32 zeigt repräsentative Aufnahmen von je drei Mäusen pro Genotyp nach Ende der DMBA/TPA-Behandlung. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl und die Größe an Papillomen in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Knockout-Gruppe erhöht ist.

Nach dem Ende der DMBA/TPA-Behandlung wurden alle Papillome präpariert. Der größte Tumor jeder Maus wurde zur histologischen Analyse mit PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. Alle restlichen Papillome wurden zur RNA-Isolation in Trizol aufgenommen. Von den Paraffinschnitten wurden H&E-Färbungen angefertigt, die mikroskopisch analysiert wurden. In Abbildung 3.34 ist eine Auswahl von unterschiedlichen Aufnahmen zusammengestellt. Die Bilder wurden alle in gleicher Vergrößerung aufgenommen, wodurch zusätzlich zur Quantifizierung der Papillome in Abbildung 3.33 deutlich wird, dass Papillome der Trim71^{fl/fl}-Mäuse größer sind als die der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse. Außerdem sind klare morphologische Unterschiede zu erkennen, die sich dadurch erklären lassen, dass Papillome von Trim71^{fl/fl}-Mäusen in ihrer Entwicklung weiter vorangeschritten sind. Die Papillomentstehung beginnt mit einem Anschwellen der Epidermis. Danach bildet die Epidermis astartige Ausläufer, an dessen Rand die Keratinozyten zu Korneozyten (Hornzellen) ausdifferenzieren. Dabei handelt es sich um abgeflachte, abgestorbene Zellen, die ihren Zellkern verloren haben und nicht mehr teilungsfähig sind. Diese verhornten Bereiche des Papilloms werden unspezifisch von Eosin gebunden und erscheinen deshalb in der H&E-Färbung rot (siehe Abbildung 3.34). Bei drei der vier Aufnahmen der Kontrollmäuse sind diese verhornten Bereiche sehr groß und gut erkennbar. Papillome der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse hingegen zeigen zum Großteil nur eine verdickte, aufgefaltete Epidermis.

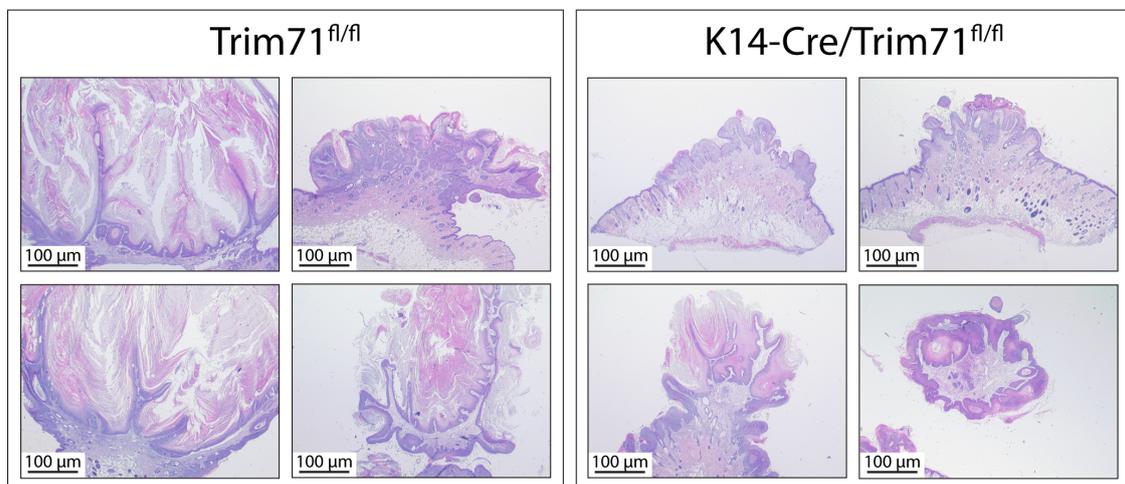


Abbildung 3.34: H&E-FÄRBUNG VON PARAFFIN-SCHNITTEN DER PAPILLOME VON K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}-UND TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN. Papillome von Trim71^{fl/fl}-Mäusen sind größer im Durchmesser und in ihrer Entwicklung weiter vorangeschritten, was man daran erkennt, dass der verhornte Bereich bestehend aus Korneozyten stärker ausgebildet ist. Papillome der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse sind kleiner. Zum Teil ist nur eine angeschwollene, aufgefaltete Epidermis zu erkennen (rechts oben). Die Verzweigung der Epidermis ist weniger ausgeprägt und nur in einem Fall kann man Verhornungen erkennen (links unten).

3.12.4 Keratinozyten aus K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Papillomen zeigen eine verringerte Proliferation

Bereits durch die Induktion von Akanthose (vergleiche Abschnitt 3.11) konnte gezeigt werden, dass die Keratinozyten Trim71 defizienter Mäuse weniger stark proliferieren als die der Kontrolltiere. Um zu untersuchen, ob die Proliferation auch in den Papillomen der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Tiere verändert ist, wurden BrdU-Färbungen wie vorher beschrieben (siehe Abschnitt 3.11) durchgeführt. Dadurch konnten alle proliferierenden Zellen markiert werden (siehe Abbildung 3.35 A). Da die Morphologie der Papillome sehr unterschiedlich ist, wurden Bereiche ausgesucht, die sich relativ ähnlich sind, um so Unterschiede einfacher zu erkennen. Bereits die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Anzahl an BrdU⁺-Zellen in den Papillomen von Kontrolltieren wesentlich höher ist als in Papillomen von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen (siehe Abbildung 3.35 A). Die Quantifizierung (siehe Abbildung 3.35 B) ergab, dass die Anzahl an BrdU⁺-Zellen in Papillomen der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse im Vergleich zu Papillomen der Kontrolltiere um mehr als die Hälfte reduziert ist. Somit bestätigten sich auch hier die Ergebnisse verschiedener *in vitro* Studien, die zeigten, dass Trim71 eine wichtige Rolle in der Zellproliferation spielt. Diese Unterschiede in der Zellproliferation in der Haut und in Papillomen Trim71 defizienter Mäuse könnte eine Ursache für die verringerte Tumorentstehung sein.

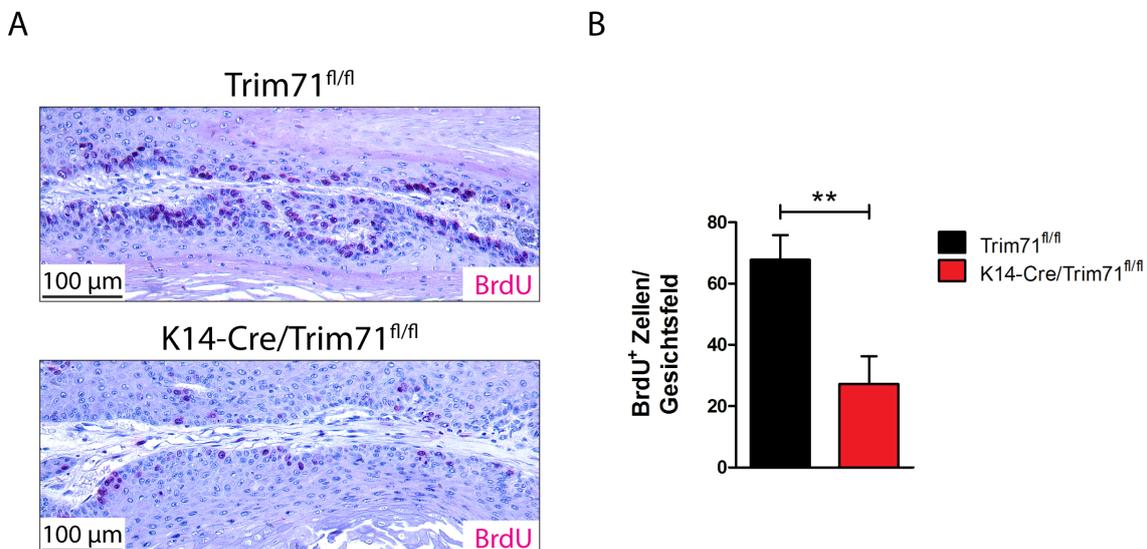


Abbildung 3.35: VERRINGERTE PROLIFERATION VON KERATINOZYTEN AUS PAPILOMEN VON K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN. DMBA/TPA-behandelten Mäusen wurde zwei Stunden vor Präparation der Papillome BrdU intraperitoneal injiziert. Danach wurden die Präparate fixiert und in Paraffin eingebettet. A) BrdU-Färbung von Paraffinschnitten der Papillome DMBA/TPA-behandelter Mäuse. BrdU⁺-Zellen sind rot angefärbt. Zur Kontrastverstärkung wurde mit Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt. B) Quantifizierung der BrdU⁺-Keratinozyten aus Papillomen von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen. Die Anzahl an proliferierenden Zellen in K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen ist signifikant verringert im Vergleich zu Kontrolltieren. Je Maus wurden 5 Gesichtsfelder ausgezählt. Dargestellt ist der Mittelwert der Anzahl an BrdU⁺-Zellen pro Gesichtsfeld mit Standardabweichung (SD). ** = p < 0,005

3.12.5 Trim71 wird in Papillomen von Trim71^{fl/fl}-Mäusen hochreguliert

Neben der histologischen Analyse der Papillome, sollten diese auch molekularbiologisch auf die Expression verschiedener Marker untersucht werden. Dazu wurden die noch nicht verwendeten Papillome einer Maus zusammengefügt und in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Aus dem Pulver konnte RNA isoliert werden, die danach in cDNA umgeschrieben wurde und als Templat für PCR-Analysen diente. Zunächst wurde die Expression von Trim71 mittels semiquantitativer PCR untersucht. Da sich hier die Ergebnisse des ersten und zweiten Experiments unterscheiden, sind beide Versuche gezeigt (siehe Abbildung 3.36). In beiden Fällen ist eine Expression von Trim71 in Papillomen von Trim71^{fl/fl}-Mäusen nachweisbar. In der ersten Versuchsreihe konnte in 10 von 11 Papillomen eine deutlich Bande auf Höhe von Trim71 detektiert werden. In der zweiten Versuchsreihe lag die Anzahl an Trim71 positiven Mäusen bei 50 %. Papillome von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen exprimieren kein Trim71.

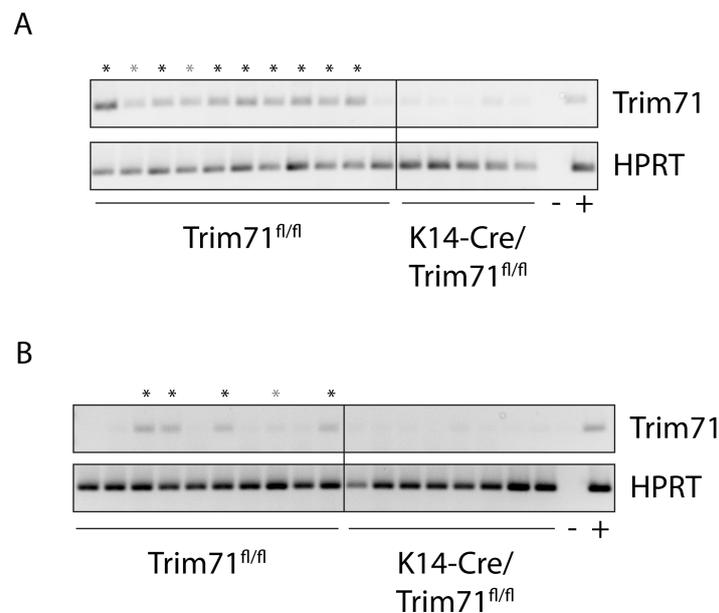


Abbildung 3.36: EXPRESSION VON TRIM71 IN PAPILLOMEN DMBA/TPA-BEHANDELTER MÄUSE. Semi-quantitative PCR zur Analyse der Expression von Trim71 in Papillomen von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen. Das Experiment zur Induktion von Tumoren wurde zwei Mal unabhängig voneinander durchgeführt. A) Ergebnisse der ersten Versuchsreihe. In 10 von 11 getesteten Trim71^{fl/fl}-Mäusen konnte eine Expression von Trim71 in der cDNA der Papillome nachgewiesen werden. Papillome von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen exprimieren kein Trim71. Die Anzahl an Trim71 Knockout-Mäusen ist so gering, da die Tumore zum Teil zu klein waren, um daraus RNA isolieren zu können. B) Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe. Die Hälfte der getesteten Kontrolltiere wies eine Expression von Trim71 in der cDNA der Papillome auf, K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Tiere zeigten wiederum gar keine. Eine PCR auf das Haushaltsgen HPRT diente als Ladekontrolle. Als Positivkontrolle wurde cDNA der murinen, embryonalen Karzinomzelllinie P19 verwendet. Die Negativkontrolle enthielt kein Templat. Mit dem schwarzen Stern sind alle Proben markiert, die eine starke Expression von Trim71 zeigen und der graue Stern markiert alle Proben mit schwacher Trim71 Expression.

3.12.6 Die Expression potentieller Trim71-Zielgene ist unverändert in Papillomen von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, wird Trim71 in einem Großteil der Papillome hochreguliert. Um zu Überprüfen, ob die Expression von Trim71 einen Einfluss auf bereits beschriebene Trim71-Zielgene *in vivo* hat, wurde deren Expression mittels qPCR quantifiziert. Dazu wurden nur Papillome untersucht bei denen eine Expression von Trim71 nachgewiesen werden konnte. Als Vergleich dienten Proben der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Tiere, die kein Trim71 exprimieren. Zunächst wurde die Expression von Ago2 untersucht. Rybak *et al.* (2009) zeigten, dass Trim71 durch seine Aktivität als E3-Ligase zum proteasomalen Abbau von Ago2 führt. Diese Ergebnisse konnten *in vitro* durch Überexpression von Trim71 in HEK293-Zellen nicht bestätigt werden (vergleiche Abschnitt 3.3). Auch *in vivo* ist kein signifikanter Unterschied der Expression von Ago2 in Trim71 positiven Papillomen im Vergleich zu Trim71 negativen Papillomen zu erkennen (siehe Abbildung 3.37).

In Abschnitt 3.3 konnte durch Überexpression von Trim71 in HEK293-Zellen *in vitro* gezeigt werden, dass die Regulation von let-7a durch Trim71 unabhängig von Ago2 zu sein scheint. Let-7a ist ein anerkannter Tumorsuppressor, weshalb es interessant ist zu wissen, ob die Expression dieser miRNA *in vivo* durch Trim71 beeinflusst wird. Dazu wurde die Expression von let-7a in Trim71 positiven Papillomen mit der Trim71 negativer Proben verglichen (siehe Abbildung 3.37). Jedoch ist hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der let-7a Expression zu erkennen.

Des Weiteren wurde die Expression des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms UBE2C untersucht, das *in vitro* durch Überexpression von Trim71 in HEK293-Zellen hochreguliert wurde (siehe Abschnitt 2.14.8). Wie bereits erwähnt ist UBE2C ebenfalls ein tumor-assoziiertes Gen, da es in vielen Krebsarten hochreguliert wird. Es ist eine leichte Erhöhung der UBE2C-Expression in Trim71 positiven Papillomen zu erkennen (siehe Abbildung 3.37). Da allerdings die Varianz bereits innerhalb dieser Gruppe sehr hoch ist, ist der Unterschied im Vergleich zu Papillomen von Trim71 Knockout-Mäusen nicht signifikant. Ein weiterer interessanter Kandidat ist der Zellzyklusregulator Cdkn1a. Trim71 bindet die mRNA von Cdkn1a, wodurch diese abgebaut wird und es zu einer Erhöhung der Proliferation kommt [26]. Diese Ergebnisse konnten *in vitro* durch Überexpression von Trim71 bestätigt werden (vergleiche Abschnitt 2.14.8). *In vivo* sind allerdings keine Unterschiede in der Expression von Cdkn1a zu erkennen. In allen Papillomen ist Cdkn1a gleichmäßig verteilt. Im Gegensatz zu UBE2C sind keine Varianzen innerhalb einer Gruppe zu erkennen.

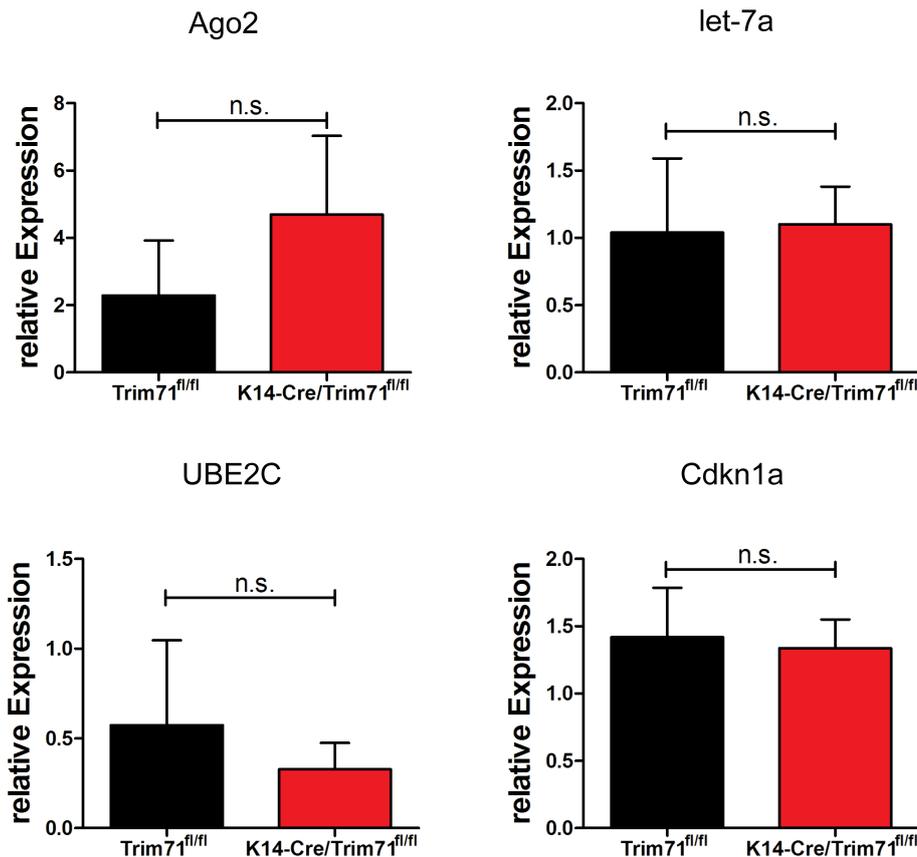


Abbildung 3.37: qPCR-ANALYSE POTENTIELLER TRIM71-ZIELGENE. Papillome, die Trim71 exprimieren wurden auf die Expression verschiedener Marker untersucht und mit der Expression in Papillomen Trim71 defizienter Mäuse verglichen. Bei keinem der vier getesteten Marker konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression der Haushaltsgene GAPDH (Ago2, Cdkn1a, UBE2C) und 5.8S rRNA (let-7a) normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert der Expression von Papillomen mindestens fünf verschiedener Mäuse ($n \geq 5$) mit der Standardabweichung (SD). n.s.= nicht signifikant

3.13 Trim71 reguliert das immunologische Mikromilieu der Haut

Der vorangegangene Abschnitt hat gezeigt, dass es schwierig ist Expressionsunterschiede verschiedener von Trim71 regulierter Gene in Papillomen nachweisen zu können. Zumindest scheint die qPCR keine geeignete Methode dafür zu sein. Das könnte unter anderem daran liegen, dass das Tumormaterial an sich sehr heterogen ist und sich die Expression zumindest einiger Marker bereits innerhalb eines Genotyps stark unterscheidet. Dadurch entstehen große Standardabweichungen, die nur bei sehr hoher Probengröße zu einer Signifikanz führen können. Da es für die Immunohistochemie keinen geeigneten Trim71-Antikörper gibt, ist nicht klar, ob Trim71 homogen im Tumor exprimiert wird oder nur in bestimmten Zellen, wie beispielsweise den Tumorstammzellen. Da für diese Analysen mittels qPCR RNA aus allen Zellen isoliert wurde, könnten Zellen die kein Trim71 exprimieren das Ergebnis verfälschen. Des Weiteren ist es möglich, dass bisher unbekannte

von Trim71 regulierte Gene für den Phänotyp verantwortlich sind. Um herauszufinden, an welchen regulatorischen Prozessen Trim71 beteiligt ist, musste deshalb eine andere Analyseform verwendet werden. Eine gute Methode, um bereits beschriebene Zielgene zu verifizieren und neue Zielgene zu finden, ist die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq). RNA-Sequenzierung ist ein Hochdurchsatzverfahren das auf Sequenzierung der nächsten Generation beruht (engl. *next generation sequencing*, NGS). Innerhalb kürzester Zeit kann das gesamte Transkriptom basengenau quantifiziert werden [179, 182]. Im Gegensatz zur Microarray-Technologie ist es nicht notwendig, das die genetische Information bereits bekannt ist, wodurch die Identifizierung bislang unbekannter Transkripte möglich wird.

Zur Analyse der von Trim71 regulierten Prozesse, wurde RNA aus unbehandelter und TPA-behandelter Epidermis von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}-Mäusen isoliert und für die RNA-Sequenzierung verwendet. Abbildung 3.38 zeigt die Anzahl der regulierten Gene vor und nach TPA-Behandlung in K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}-Mäusen. Den größten Effekt hat dabei die Behandlung mit TPA auf die Expression der Gene. Hier wurden sowohl in den Kontrolltieren als auch in Trim71 defizienten Mäusen um die 1000 Gene hochreguliert und ca. 650 herunterreguliert. Ein Großteil dieser Gene überschneidet sich dabei und weist nicht auf einen Unterschied zwischen den Genotypen hin. Das liegt daran, dass TPA zu einer Aktivierung der Proteinkinase C führt, wodurch verschiedene Signalwege in der Haut aktiviert werden [114]. Dazu gehört die Regulation der Keratinozytenproliferation, die in der Haut unter anderem durch verschiedene Serinproteasen der Kallikrein-Familie beeinflusst wird [110]. So führt die Behandlung mit TPA zu einer erhöhten Expression der Kallikreine KLK6, KLK8 und KLK13 [86], was eine gesteigerte Proliferation zur Folge hat. In diesem Fall wird die Expression von KLK8 durch Behandlung mit TPA um das Zweifache erhöht, KLK6 zeigt eine 10-fach verstärkte Expression und KLK13 gar eine 30-fache Erhöhung. Dabei gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Expression dieser Kallikreine zwischen K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}-Mäusen. Eine Tabelle mit den genauen Expressionwerten ist im Anhang zu finden.

Die Unterschiede zwischen den Genotypen sind wesentlich geringer, so sind in K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen in unbehandeltem Zustand nur 154 Gene hoch- und 27 Gene herunterreguliert (siehe Abbildung 3.38). Die TPA-Behandlung führt im Knockout zu einer Hochregulation von 301 Genen und zu einer Herunterregulation von 8 Genen im Vergleich zu Kontrolltieren. Da nur nach TPA-Behandlung ein Phänotyp in der Haut zu erkennen ist und die Mäuse im Normalzustand keine Unterschiede zeigen, wird sich im Folgenden auf die veränderten Gene nach TPA-Behandlung konzentriert.

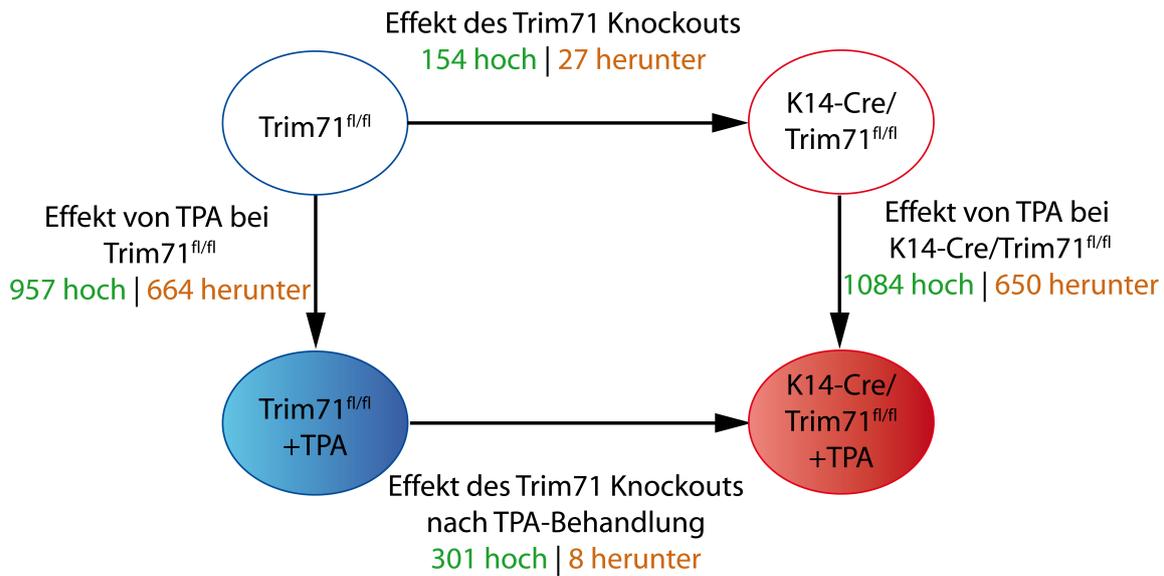


Abbildung 3.38: ÜBERSICHT DER ANZAHL AN REGULIERTEN GENEN IN EPIDERMALEN ZELLEN TRIM71 DEFIZIENTER MÄUSE IM VERGLEICH ZU KONTROLLTIEREN IN UNBEHANDELTEN ZUSTAND UND NACH TPA-BEHANDLUNG.

Mit Hilfe einer Genontologie-Analyse (GOA) wurden diese Gene einer bestimmten Funktion zugeordnet und können so in Gruppen, sogenannte Cluster zusammengefasst werden [3]. Somit können biologische Prozesse wie beispielsweise bestimmte Signalwege identifiziert werden, die besonders von einer Regulation betroffen sind. Abbildung 3.39 zeigt die Ergebnisse der GOA. Interessanterweise besitzt die erhebliche Mehrheit der hochregulierten Gene der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Proben nach TPA-Behandlung immunregulatorische Funktionen. Zu diesen Genen gehören Zytokine und Chemokine wie beispielsweise IL-22, IL23-R, CXCL12 und CXCR4 (siehe Tabelle Anhang), die in Zusammenhang mit Keratinozytenproliferation stehen [12].

So konnte gezeigt werden, dass in Mäusen mit CXCR4 defizienten Keratinozyten die epidermale Hyperproliferation einer IL-23 vermittelten psoriasiformen Dermatitis erhöht ist [163]. Durch *in vitro* Experimente in der gleichen Studie konnte zudem der zugrundeliegende Mechanismus beschrieben werden. Die Stimulation mit IL-22 (der nachgeschaltete Vermittler von IL-23) führt zu einer Erhöhung der Keratinozytenproliferation [127, 9], die durch Co-Stimulation mit CXCL12 inhibiert werden kann [163]. Dies funktioniert über eine Hochregulation von SOCS3 und einer damit verbundenen Inhibition der Stat3-Phosphorylierung und -Aktivierung [25]. Anhand der Sequenzierdaten lässt sich nicht überprüfen, ob die Stat3-Aktivität in Trim71 defizienten Mäusen verändert ist, da diese durch Phosphorylierung des Stat3-Proteins und nicht durch eine Veränderung der Expression ausgelöst wird. Die Phosphorylierung von Stat3 führt zu dessen Dimerisierung und zu einer Translokation in den Zellkern [95]. Dort beeinflusst Stat3 als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Zielgene. Somit kann man indirekt, über die Expression dieser Zielgene die Aktivität von Stat3 anhand der Sequenzdaten untersuchen. Dauer *et al.*

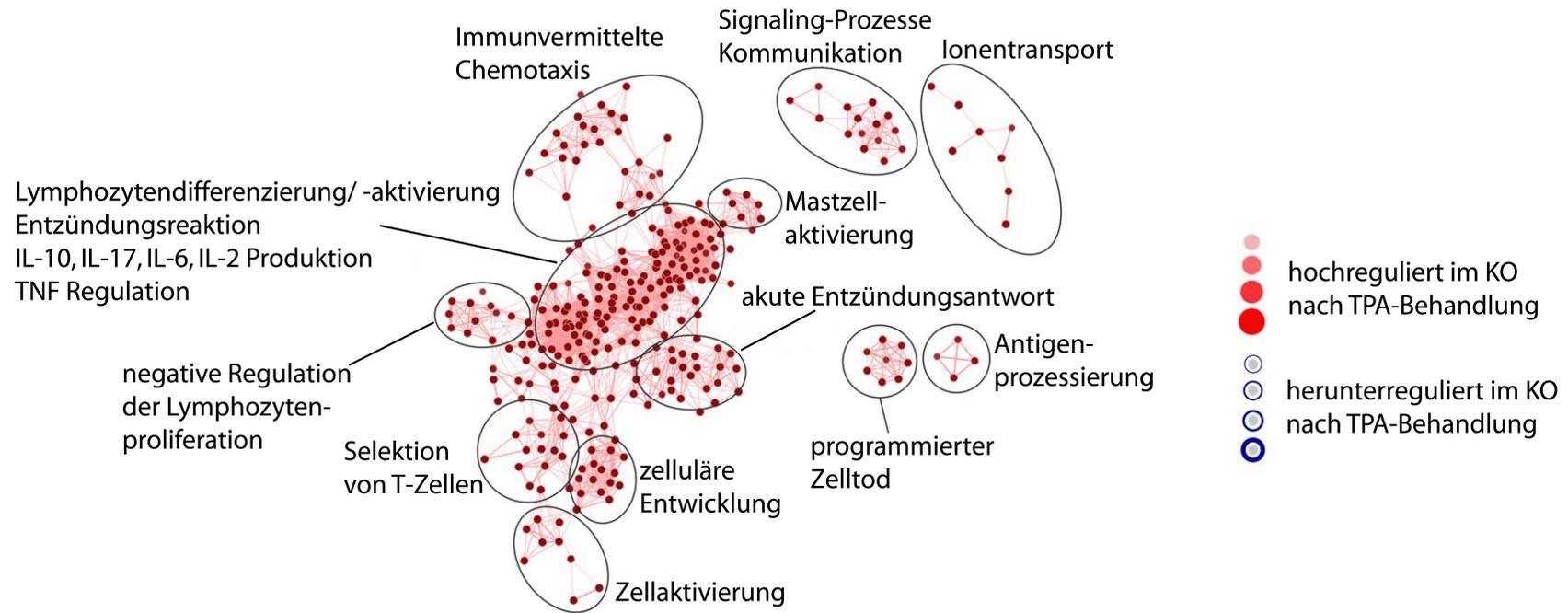


Abbildung 3.39: GENONTOLOGIE-ANALYSE (GOA) DER REGULIERTEN GENE EPIDERMALER ZELLEN VON K14-CRE/TRIM71^{FL/FL} UND TRIM71^{FL/FL} NACH TPA-BEHANDLUNG.

veröffentlichten 2005 eine Liste von Stat3-Zielgenen, die sie mittels Microarray nach Überexpression von Stat3 in humanen A549 Lungenzellen identifizieren konnten [34]. Interessanterweise sind einige dieser Zielgene auch in der Epidermis Trim71 defizienter Mäuse nach TPA-Behandlung reguliert. Von den insgesamt 50 durch Stat3 reprimierten Genen sind elf Gene in epidermalen Zellen von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen nach TPA-Behandlung im Vergleich zu epidermalen Zellen von Trim71^{fl/fl}-Mäusen nach TPA-Behandlung hochreguliert (siehe Tabelle 3.1), was für eine verminderte Aktivität von Stat3 in der Epidermis Trim71 defizienter Mäuse spricht. 20 der 50 Gene werden nicht in der Epidermis exprimiert und die restlichen 19 Genen zeigen keine Unterschiede in ihrer Expression.

Symbol	Genname
IFIT1	Interferon-induzierendes Protein mit Tetratricopeptidrepeats 1
OASL	Oligoadenylat-Synthetase ähnliches Protein
OAS2	Oligoadenylat-Synthetase 2
USP18	Ubiquitin-spezifische Protease 18
IFITM1	Interferon-induzierendes Transmembranprotein 1
SP110	Kernkörperprotein
OAS3	Oligoadenylat-Synthetase 3
TNFSF10/TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
HSPA1A	Hitzeschock 70 kDa Protein 1A
HSPA1B	Hitzeschock 70 kDa Protein 1B
HPGD	Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15-(NAD)

Tabelle 3.1: LISTE IN DAUER ET AL. [34] BESCHRIEBENER STAT3-ZIELGENE. Von den 50 durch Stat3 reprimierten Gene sind nur die dargestellt, die in epidermalen Zellen von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen nach TPA-Behandlung im Vergleich zu epidermalen Zellen von Trim71^{fl/fl}-Mäusen nach TPA-Behandlung hochreguliert sind. 20 der 50 Gene werden nicht in der Epidermis exprimiert und die restlichen 19 Gene zeigen keine Veränderung in ihrer Expression.

Zudem konnte die Hochregulation von CXCL12 und CXCR4 in der Epidermis Trim71 defizienter Mäuse nach TPA-Behandlung validiert werden (siehe Abbildung 3.40). Dafür wurde RNA aus unbehandelter und TPA-behandelter Epidermis von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}-Mäusen isoliert und die Expression von CXCL12 und CXCR4 mittels qPCR quantifiziert. CXCR4 ist in unbehandelter Haut von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}-Mäusen ungefähr gleich stark exprimiert (siehe Abbildung 3.40 A). Bei den Kontrolltieren zeigt die TPA-Behandlung keinen Einfluss auf die Expression von CXCR4, wohingegen CXCR4 in der Epidermis Trim71 defizienter Mäuse durch TPA-Behandlung hochreguliert wird. CXCL12 zeigt bereits in unbehandelter Haut eine etwas stärkere Expression in K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen im Vergleich zu Trim71^{fl/fl}-Mäusen (siehe Abbildung 3.40 B). Nach der Behandlung mit TPA ist dieser Unterschied noch größer.

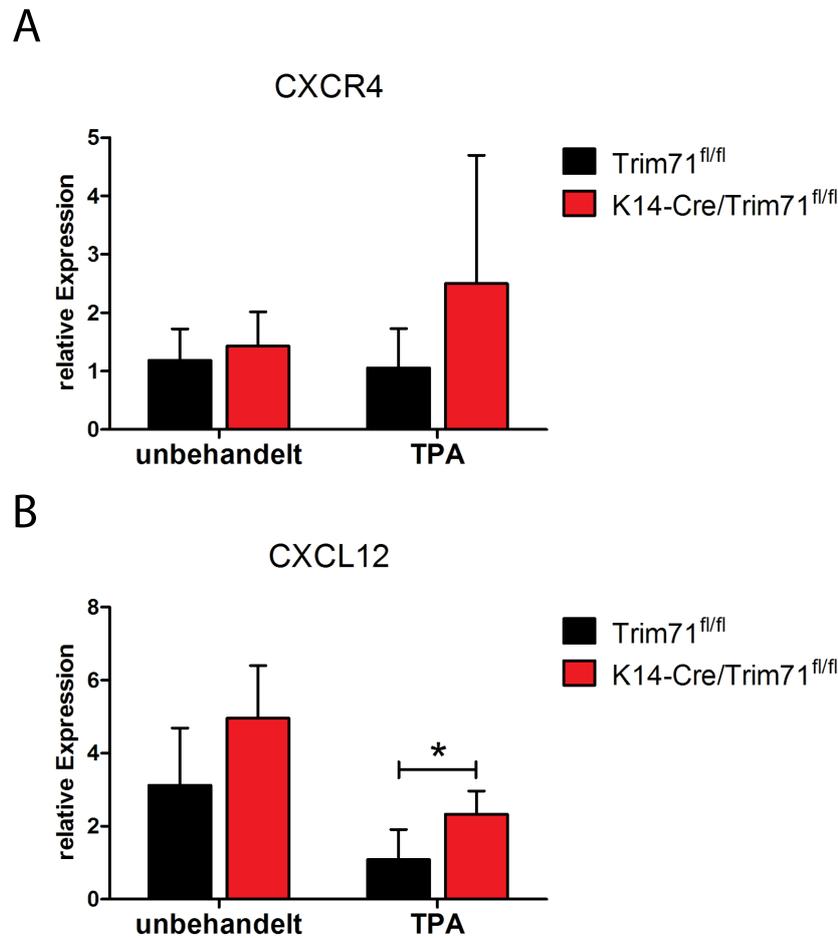


Abbildung 3.40: qPCR-VALIDIERUNG DER LAUT RNA-SEQUENZIERUNG REGULIERTEN GENE CXCR4 UND CXCL12. Aus unbehandelter und TPA-behandelter Epidermis von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}-Mäusen wurde RNA isoliert und die Expression von A) CXCR4 und B) CXCL12 mittels qPCR quantifiziert. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens HPRT normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Experimente (n=3) mit der Standardabweichung (SD). * = p<0,05

Somit konnte gezeigt werden, dass epidermale Zellen von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen nach TPA-Behandlung eine verstärkte Expression von CXCR4 und CXCL12 haben. Bei diesen Daten handelt es sich um *in vivo* generierte Daten. Zur Untersuchung von Unterschieden in der Phosphorylierung von Stat3 ist dieses System allerdings nicht geeignet, da die Präparation der epidermalen Zellen mehrere Stunden in Anspruch nimmt und Phosphorylierungsprozesse wesentlich schneller ablaufen können. Aus diesem Grund wurden primäre Keratinozyten aus neugeborenen Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen isoliert und kultiviert. Diese wurden für eine Stunde mit 50 ng/ml TPA stimuliert und anschließend zur RNA-Isolation oder Proteinlyse gerntet. Keratinozyten exprimieren kein CXCL12, dieses wird in der Epidermis von Fibroblasten freigesetzt. Dementsprechend wurde nur die Expression von CXCR4 analysiert. Diese zeigt in unstimulierten Zellen von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen keinen Unterschied. Nach Stimulation mit TPA wird die Expression von CXCR4 spezifisch in Trim71 defizienten Keratinozyten stark hochreguliert

während sie in Wildtypzellen auf dem Niveau der unstimulierten Proben bleibt.

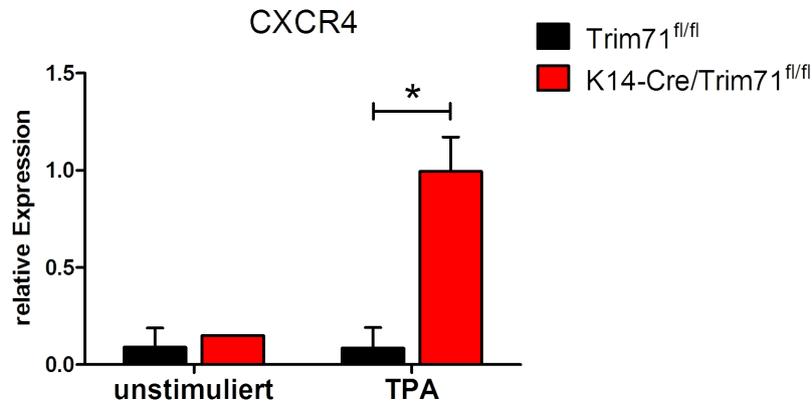


Abbildung 3.41: CXCR4 WIRD IN PRIMÄREN KERATINOZYTEN VON K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN NACH STIMULATION MIT TPA HOCHREGULIERT. Die Expressionsdaten wurden auf die Expression des Haushaltsgens HPRT normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus den Ergebnissen dreier unabhängiger Experimente (n=3) mit dem Standardfehler (SEM). * = p<0,05

Um zu analysieren, ob die veränderte Expression von CXCR4 wie von Takekoshi *et al.* [163] beschrieben die Phosphorylierung von Stat3 inhibiert, wurden Proteinlysate aus primären Keratinozyten von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse hergestellt und die Expression von Stat3 und phosphoryliertem Stat3 (pStat3) im Western-Blot analysiert (siehe Abbildung 3.42). Bereits im unstimulierten Zustand ist die Phosphorylierung von Stat3 in Keratinozyten aus K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen etwas schwächer im Vergleich zu Keratinozyten aus Trim71^{fl/fl}-Mäusen. Nach Stimulation mit TPA ist dieser Unterschied noch deutlicher.

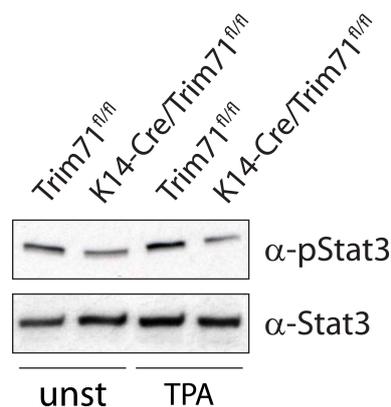


Abbildung 3.42: DIE PHOSPHORYLIERUNG VON STAT3 IST NACH TPA-STIMULATION IN KERATINOZYTEN VON K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN INHIBIERT. Aus primären Keratinozyten von Trim71^{fl/fl}- und K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen wurden Totallysate von unstimulierten (unst) und TPA (1 h, 50 ng/ml) stimulierten Zellen hergestellt. Im Western-Blot wurde die Phosphorylierung von Stat3 (Tyr705) analysiert. Als Ladekontrolle diente die Expression des Stat3-Gesamtproteins. (n=1)

Aktivierung von Stat3 durch Phosphorylierung führt zu einer verstärkten Proliferation in Keratinozyten [163]. Um herauszufinden ob die reduzierte Phosphorylierung von Stat3 in Keratinozyten K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen zu einer verringerten Proliferation dieser Zellen führt, wurde die Proliferationsrate von Trim71 defizienten Keratinozyten mit der von WT-Keratinozyten verglichen. Dazu wurden die Keratinozyten auf Deckgläschen ausgesät und eine Stunde mit Ethynyldeoxyuridin (EdU) inkubiert. EdU wird als synthetisches Analogon des Nukleosids Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut und markiert somit proliferierende Zellen. Über eine durch Kupfer(I)-katalysierte Click-Reaktion konnten proliferierende Zellen markiert und mikroskopisch ausgewertet werden (siehe Abbildung 3.43). Der Quotient aus EdU⁺-Zellen und der Gesamtzellzahl entspricht der Proliferationsrate. Primäre Keratinozyten von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen zeigen eine reduzierte Proliferation im Vergleich zu Keratinozyten von Trim71^{fl/fl}-Mäusen. Dieser Unterschied wird durch die Stimulation mit TPA zusätzlich verstärkt.

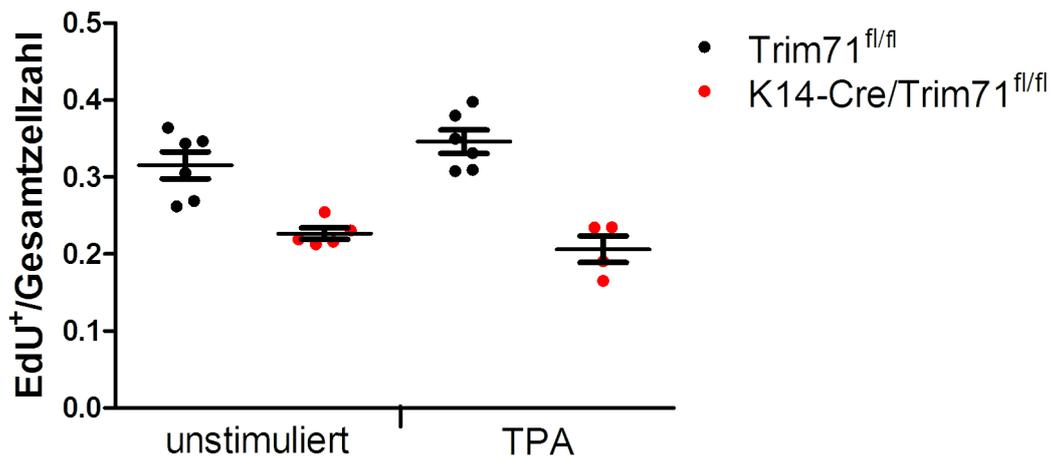


Abbildung 3.43: PRIMÄRE KERATINOZYTEN VON K14-CRE/TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN ZEIGEN EINE VERRINGERTE PROLIFERATION IM VERGLEICH ZU KERATINOZYTEN AUS TRIM71^{FL/FL}-MÄUSEN. Zur Analyse der Proliferationsrate wurden die primären Keratinozyten 1h mit Ethynyldeoxyuridin (EdU) inkubiert. Mittels Click-Chemie konnten EdU⁺-Zellen markiert und mikroskopisch ausgewertet werden. Je höher der Quotient aus EdU⁺-Zellen und der Gesamtzellzahl umso stärker ist die Proliferation. Jeder Punkt entspricht der Auswertung eines Gesichtfeldes. Je Probe wurden insgesamt 5 Gesichtfelder ausgezählt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei Versuchen (n=3).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Trim71 in der Haut zur Regulation neue Zielgene führt, die zu einer Änderung des immunologischen Mikromilieus der Haut führen. Trim71 scheint die Phosphorylierung von Stat3 indirekt zu aktivieren, was eine verstärkte Proliferation der Keratinozyten zur Folge hat.

4 Diskussion

4.1 Trim71 als Regulator der miRNA-Prozessierung

Verschiedene Mitglieder der Trim-NHL-Proteinfamilie wurden als Regulatoren der Genexpression über die Modulation des miRNA-Signalweges beschrieben [39]. Diese Funktion konnte in der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), dem Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) und in Säugetieren (z. B. *Mus musculus*) in Zusammenhang mit einer Interaktion von Trim-NHL mit Argonaute-Proteinen gebracht werden. Mitglieder der stark konservierten Argonaute-Proteinfamilie sind Bestandteil des RISC-Komplex (*RNA induced silencing complex*) und wirken zum Teil als katalytisch aktive Endonukleasen beim Abbau der Ziel-mRNA [100]. Trim-NHL-Proteine können dabei in den verschiedenen Organismen sowohl positiv als auch negativ auf die miRNA-Biogenese wirken [38]. So haben das *C. elegans* Protein NHL-2 und das dazugehörige Säugetierortholog Trim32 eine aktivierende Wirkung [103]. NHL-2 fungiert als positiver Kofaktor des RISC-Komplex, der durch Interaktion mit Ago1 und Ago2 die Aktivität der beiden miRNAs let-7 und lsy-6 verstärkt [60]. Trim32 wirkt ebenfalls über die Interaktion mit Argonaute-Proteinen. Außerdem stimuliert es die Aktivität von let-7 über die Ubiquitinierung und Degradation des Transkriptionsfaktors und let-7 Inhibitors c-Myc [151]. Dagegen zeigt Mei-P26, das *Drosophila* Ortholog zu NHL-2 und Trim32 eine entgegengesetzte Funktion. Es interagiert mit Argonaute 1 (Ago1) und inhibiert über einen bisher unbekanntem Mechanismus die miRNA Expression [125]. Auch das Säugetierprotein Trim71 hat eine hemmende Wirkung auf die Expression von miRNAs. Im Jahr 2009 konnte durch Rybak und Kollegen der zugrundeliegende Mechanismus genau aufgeklärt werden [147]. Trim71 führt zu einer indirekten Reduktion von let-7, indem es die Stabilität von Ago2 mit Hilfe der E3-Ubiquitinligaseaktivität beeinflusst. Trim71 polyubiquitiniert Ago2, was den proteasomalen Abbau des Proteins samt gebundener miRNA let-7 zur Folge hat [147].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche weitreichenden Folgen die let-7 Inhibition durch Überexpression von Trim71 *in vivo* haben könnte. So ist beispielsweise bekannt, dass let-7 als Tumorsuppressor wirkt und in einigen humanen Krebsarten eine verminderte Expression zeigt [5]. Interessanterweise konnte in Tumormaterial genau dieser Krebsarten eine Hochregulation von Trim71 festgestellt werden [29]. Somit wirkt Trim71 als potentiell Onkogen.

4.1.1 Die Interaktion von Trim71 mit dem RISC-Protein Ago2

Bevor langwierige *in vivo* Experimente zur Analyse der Rolle von Trim71 in der Krebsentwicklung durchgeführt wurden, mussten zunächst die bereits beschriebenen Ergebnisse validiert werden. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte die Lokalisation von Trim71 in P-Bodies, dem Kompartiment des mRNA-Abbaus bestätigt werden (siehe Abbildung 3.3). Dort kolokalisiert Trim71 mit Ago2. Des Weiteren konnte eine direkte Interaktion von Ago2 und Trim71 durch Coimmunpräzipitationen nach Überexpression verschiedener Trim71-Konstrukte in HEK293-Zellen rekapituliert werden. Jedoch scheint die von Rybak [147] und Chen [28] beschriebene Coiled-Coil-Domäne von Trim71 nicht allein für die Interaktion mit Ago2 verantwortlich zu sein. So konnte mit einem Konstrukt ohne Coiled-Coil-Motiv endogenes Ago2 präzipitiert werden (siehe Abbildung 3.2). Dieses Konstrukt enthielt die C-terminal gelegene Filaminbindestelle und die darauffolgenden sechs NHL-Domänen. Die Ergebnisse dieses Experimentes sprechen allerdings nicht dafür, dass der C-Terminus allein für die Bindung an Ago2 ausschlaggebend ist. Da trotz stärkerer Expressionsrate des kleineren Konstrukt die Menge an präzipitiertem Ago2 wesentlich geringer ist im Vergleich zur Präzipitation mit dem Trim71-Gesamtprotein, könnte eine zusätzliche Ago2-Bindestelle für eine stärkere Interaktion sorgen. Außerdem können Änderungen in der Sekundärstruktur durch die Überexpression eines Deletionskonstruktes ein Grund für die geringere Bindungsaffinität sein. Nichtsdestotrotz konnten Chang und Kollegen durch Immunpräzipitation mit zusätzlichen Trim71-Deletionskonstrukten zeigen, dass in HeLa-Zellen allein die NHL-Domänen die Bindung an Ago2 vermitteln [26]. Gleiches wurde von Loedige *et al.* in HEK293-Zellen beschrieben [104]. Ebenso konnte für die Trim-NHL-Proteine Brat, Wech, Mei-P26 und Trim32 die NHL-Domänen als Bindedomäne für Argonaute-Proteine ausgemacht werden [125, 151].

4.1.2 Trim71 als Regulator der miRNA let-7

Wichtiger als die genaue Bindedomäne von Trim71 an Ago2 zu bestimmen, ist jedoch die Untersuchung der molekularen Folgen, die diese Interaktion mit sich bringt. Nach der Modellvorstellung von Rybak *et al.* (2009) bindet Trim71 nicht nur an Ago2, sondern ubiquitiniert es gleichzeitig, was zum proteasomalen Abbau des Proteins samt gebundener miRNAs führt. Es konnte gezeigt werden, dass die miRNAs let-7 und miR-124 nach Überexpression von Trim71 herunterreguliert werden [147]. MiRNAs sind neben den Transkriptionsfaktoren die wichtigsten Regulatoren der Genexpression, die zelluläre Veränderungen, die während der Zellproliferation und -differenzierung stattfinden, steuern. Den zugrundeliegenden Mechanismus der Regulation der miRNA-Expression aufzuklären, ist deshalb von großer Bedeutung. Rybak *et al.* zeigten einen möglichen Weg. Jedoch konnten diese Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden. Zwar wurde die Bindung [28, 104, 26] und Ubiquitinierung [104] von Ago2 durch Trim71 in mehreren unabhängigen Studien bestätigt, allerdings konnte eine verminderte Proteinmenge von Ago2 weder *in vitro* [28, 104] noch *in vivo* [28] rekapituliert werden. Die Regulation von miRNAs durch

Trim71 wurde in diesen Veröffentlichungen allerdings außer Acht gelassen.

Zur Überprüfung, ob Trim71 tatsächlich die Expression der miRNA let-7 vermindert, wurden verschiedene Trim71-Konstrukte in HEK293T-Zellen überexprimiert und sowohl der Ago2-Proteingehalt als auch die Expression von let-7 quantifiziert. Interessanterweise konnte tatsächlich eine Reduktion des endogenen Ago2-Proteingehaltes nach Überexpression des Trim71-Gesamtproteins beobachtet werden (siehe Abbildung 3.4 A). Diese trat zeitverzögert 72 Stunden nach Transfektion auf. 24 Stunden nach der Transfektion war noch kein Unterschied erkennbar, was darauf hindeutet, dass Trim71 möglicherweise nicht direkt für einen Abbau von Ago2 verantwortlich ist, sondern, dass es zwischengeschaltete Regulatoren gibt, die für eine Verzögerung sorgen. Ein zweiter Hinweis dafür ist, dass die RING-Mutante von Trim71 ebenfalls zu einer Reduktion von Ago2 führt. Der Effekt der Mutante im Vergleich zum Trim71-Wildtypprotein ist allerdings weniger stark, was durch eine schlechtere Transfektionseffizienz erklärt werden kann (siehe Abbildung 3.4 A). Durch Mutationen zweier essentieller Cysteine (C12A und C15L) zeigt die RING-Mutante keine E3-Ligaseaktivität mehr [147], weshalb eine Ubiquitinierung von Ago2 als Grund für den verminderten Proteingehalt ausgeschlossen werden kann. Diese These wird zusätzlich durch die Ergebnisse der gleichzeitigen Überexpression von Trim71 und Ago2 unterstützt (siehe Abbildung 3.4 B). In diesem Fall kann keine Verminderung von überexprimiertem Ago2 beobachtet werden, auch nicht nach 72 Stunden. Somit ist es denkbar, dass Trim71 zwar nicht direkt den Proteingehalt von Ago2 vermindert, sondern bereits früher in der Genexpression wirkt und die Transkription von Ago2 beeinflusst. Mit Hilfe von qPCR-Versuchen konnte auch exakt dies gezeigt werden (siehe Abbildung 3.5 A). Sowohl die Überexpression des Trim71-Gesamtproteins als auch der RING-Mutante führen zu einer signifikanten Reduktion der Ago2-mRNA. Da die Verminderung der Ago2-mRNA zeitlich vor der Verminderung des Proteingehalts liegt, ist ein Proteinabbau durch Ubiquitinierung sehr unwahrscheinlich. Wie genau Trim71 zur Inhibition der Ago2 Transkription beiträgt, bleibt weiterhin ungeklärt. Da Trim71 als RNA-bindendes-Protein beschrieben wurde [104], könnte es direkt die mRNA von Ago2 binden. Außerdem ist es möglich, dass Trim71 über die Inhibition eines Ago2 Transkriptionsfaktors die Genexpression von Ago2 reguliert.

In der gleichen Versuchsreihe konnte neben der Inhibition der Ago2-Genexpression eine reduzierte Expression von let-7a nach Überexpression von Trim71 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.5 B). Inwiefern die Reduktion von Ago2 mit der von let-7a im Zusammenhang steht ist jedoch unklar. Die Ergebnisse der mit Trim71 stabil transfizierten HEK293-Zellen deuten darauf hin, dass Trim71 die Expression von let-7a unabhängig von Ago2 negativ beeinflusst. Hier führte die Überexpression von Trim71 zu einer Reduktion von let-7a um ca. 75 % und das obwohl keine Veränderung in der Ago2-Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.6).

Über den Ago2-unabhängigen Mechanismus der let-7 Inhibition durch Trim71 kann hier nur spekuliert werden. Vor kurzem konnte eine Interaktion von Trim71 mit dem let-7 Inhibitor Lin28 beschrieben werden [93]. Außerdem weisen unveröffentlichte Daten

aus unserer Arbeitsgruppe darauf hin, dass Trim71 mit Lin28 in murinen, embryonalen Stammzellen zusammenarbeitet, um *let-7* zu supprimieren.

Gleichwohl kann man anhand dieser Ergebnisse eine mögliche Funktion von Ago2 in Trim71/Lin-41-abhängigen Prozessen in anderen Zelltypen und Organismen nicht komplett ausschließen. So konnte erst vor kurzem gezeigt werden, dass Lin-41 in *C. elegans* abhängig von dem Argonaute-Protein ALG-1 *let-7* inhibiert und dadurch eine wichtige Funktion in der Regeneration von Neuronen übernimmt [194].

Außerdem hat die Deletion von Trim71 bzw. Ago2 einen ähnlichen Phänotyp in der Maus. Beide Knockout-Mäuse haben ein offenes Neuralrohr und sterben früh in der embryonalen Entwicklung [101, 108].

4.2 Identifizierung neuer Trim71-Zielgene

Da Trim71 mit dem RISC-Protein Ago2 interagiert und es als Regulator der miRNA *let-7* wirkt, war es wichtig herauszufinden, ob es weitere bisher unbekannte Trim71-Zielgene gibt, die mit der miRNA-Maschinerie in Zusammenhang stehen. Mittels einer sogenannten RIP-CHIP-Analyse (vgl. Abschnitt 2.14.8) konnten insgesamt 118 neue Trim71-Zielgene identifiziert werden. Dabei fällt auf, dass ca. drei Viertel dieser Gene herunterreguliert wurden und nur ein Viertel eine verstärkte Expression zeigte (siehe Abbildung 3.9). Diese Tatsache ist im Einklang mit der bekannten Eigenschaft von Trim71 als mRNA-bindendes und reprimierendes Protein [104]. Die gleiche Funktion von Trim71 konnte ebenfalls durch eine RNA-Präzipitation von Loedige *et al.* herausgefunden werden. Allerdings wurde in diesem Fall Trim71 direkt aus den Zellen präzipitiert und nicht wie hier indirekt über eine Präzipitation von Ago2. Interessanterweise überschneiden sich die Ergebnisse zum Teil. So wurden in beiden Fällen mehrere Hox-Gene identifiziert, die von Trim71 gebunden und reprimiert wurden. Dabei handelt es sich um eine Familie von Homöobox-Genen, die als Transkriptionsfaktoren die Morphogenese des Embryos steuern [52]. Das am stärksten von Trim71 regulierte Hox-Gen, HoxA5, konnte zudem mit der Entstehung von Brustkrebs assoziiert werden [27]. Im Vergleich zu gesundem Brustgewebe zeigen 70 % aller Mammakarzinome eine verringerte Expression von HoxA5, die durch Methylierung des Gens ausgelöst wird [67]. Folglich kann HoxA5 nicht mehr als Transkriptionsfaktor für den Tumorsuppressor p53 wirken, wodurch die Zelle nicht mehr vor einer Entartung geschützt wird [138, 53]. In dieser Signalkaskade könnte Trim71 als übergeordneter Regulator agieren. Jedoch konnte die Inhibition von HoxA5 durch Trim71 nur auf mRNA-Ebene validiert werden (siehe Abbildung 3.11). Änderungen des Proteingehalts von HoxA5 (siehe Abbildung 3.13 A) oder p53 (siehe Abbildung 3.22) wurden durch eine Überexpression von Trim71 in HEK293-Zellen nicht verifiziert.

Dennoch bekräftigt die Repression des Tumorsuppressor HoxA5 durch Trim71 die potentielle Funktion von Trim71 als Onkogen.

4.2.1 UBE2C als neues Zielgen von Trim71

Unter den verbliebenen Genen stellte sich UBE2C als interessanter Kandidat heraus. Dieses Gen wurde nicht nur nach IP angereichert, sondern zeigte bereits allein durch die Überexpression von Trim71 eine verstärkte Expression. Diese konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene validiert werden (siehe Abbildungen 3.12 und 3.13 C). UBE2C ist ein E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym, das in Zusammenarbeit mit der E3-Ubiquitin Ligase APC (*anaphase promoting complex/cyclosome*) zum Abbau mitotischer Cycline und anderer Mitose-relevanter Substrate führt und so eine wichtige Rolle in der Zellzykluskontrolle spielt [183, 159]. Außerdem steht eine erhöhte Expression von UBE2C in Zusammenhang mit chromosomaler Instabilität, Tumorentstehung [168], Tumorprogression und Metastasierung [161]. Da UBE2C in vielen Krebsarten hochreguliert wird, soll es zukünftig als Tumormarker eingesetzt werden [62].

Hier konnte nun zum ersten Mal eine Verbindung zwischen UBE2C und dem potentiellen Onkogen Trim71 hergestellt werden. Diese zeigte sich nicht nur in dem artifiziellen Überexpressionssystem der HEK293-Zellen, sondern konnte gleichermaßen in embryonalen Karzinomzelllinien (*embryonic carcinoma*, EC), die Trim71 endogen exprimieren, reproduziert werden. Die verschiedenen EC-Zellen zeigen eine positive Korrelation zwischen Trim71 und UBE2C (siehe Abbildung 3.14). Eine direkte Regulation von Trim71 durch Bindung der mRNA von UBE2C konnte ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3.19). Ebenso interagieren die beiden Proteine nicht direkt miteinander (siehe Abbildung 3.20).

Somit scheint es einen zwischengeschalteten Regulator zu geben, dessen Expression von Trim71 beeinflusst wird und der wiederum UBE2C reguliert. Es ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor c-Myc die Expression von UBE2C verstärkt [16]. Dennoch konnten keine Änderungen von c-Myc durch Überexpression von Trim71 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.21). Weitere direkte UBE2C-Aktivatoren sind bisher noch nicht beschrieben worden.

Durch Literaturrecherche ließ sich ein zumindest indirekter Zusammenhang zwischen UBE2C und dem Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53 herstellen. Der epidermale Knockout von p53 führt zur spontanen Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen [79, 113]. Eine Microarray-Analyse ergab, dass die Tumore p53-defizienter Mäuse UBE2C überexprimieren [50]. Außerdem zeigen sie eine verringerte Expression von HoxA5. Gleiches konnte für die Überexpression von Trim71 in HEK293-Zellen gezeigt werden. Jedoch konnten keine Unterschiede in der Expression von p53 nach Überexpression von Trim71 festgestellt werden (siehe Abbildung 3.22). Allerdings ist für die Aktivierung p53 abhängiger Signalwege nicht nur die Expression von p53 allein von Bedeutung, sondern spielt auch die Phosphorylierung des Proteins eine wichtige Rolle. Diese dient als Signal zur Relokalisation des Proteins in den Zellkern [46]. Es sind insgesamt 24 Phosphorylierungsstellen im humanen p53 bekannt, die alle an der Aktivierung des Proteins beteiligt sein können [107]. Mögliche Unterschiede in der Phosphorylierung von p53 nach Überexpression von Trim71, könnten Hinweise auf einen Zusammenhang in der Regulation von UBE2C und

HoxA5 geben.

4.3 Einfluss von Trim71 auf die Zellproliferation

Im Jahr 2012 konnte gezeigt werden, dass Trim71 die Proliferation von embryonalen Stammzellen durch Inhibition des Zellzyklusregulators Cdkn1a fördert. Ebenso hat Trim71 einen Einfluss auf die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen [28] und der Leberkarzinom-Zelllinien Huh7 und Hep3B [29]. Durch Überexpression von Trim71 konnte die Repression von Cdkn1a in HEK293-Zellen validiert werden (siehe Abbildung 3.13). Zusätzlich wurde UBE2C als weiterer Zellzyklusregulator in den stabil transfizierten HEK293-Zellen identifiziert. Hier war eine verstärkte Expression von UBE2C in Trim71 überexprimierenden Zellen zu beobachten (siehe Abbildungen 3.12 und 3.13). Änderungen in der Expression von UBE2C haben einen direkten Einfluss auf die Proliferation der Zelle. So führt die Überexpression von UBE2C in HEK293T-Zellen zu einer verstärkten Proliferation [70]. Im Gegensatz dazu konnte nach Knockdown von UBE2C eine verringerte Proliferationsrate in Glioblastomzellen (U251) und in Adenokarzinomzellen (SEG-1) beobachtet werden [98, 75]. Die verringerte Expression von UBE2C führt dabei zu einem Zellzyklusarrest in der S- und G₂/M-Phase des Zellzyklus [154].

Mittels MTT-Proliferationsassay konnte eine erhöhte Proliferation in Trim71 überexprimierenden HEK293-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.15). Da in diesen Zellen ebenfalls Cdkn1a reprimiert ist, ist UBE2C nicht zwangsläufig für eine erhöhte Proliferation verantwortlich. Zukünftige Experimente, in denen die Expression von UBE2C durch Knockdown auf das Niveau der Kontrollzellen gebracht wird, müssten zeigen, ob dadurch die Unterschiede in der Proliferation von Trim71 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen aufgehoben werden können. Es ist durchaus möglich, dass beide Proteine gleichzeitig die Veränderung in der Proliferation beeinflussen.

4.4 Die Rolle von Trim71 in der Krebsentstehung

Durch die vorher diskutierten *in vitro* Experimente konnte gezeigt werden, dass Trim71 als mögliches Onkogen wirkt, da es zum einen Tumorsuppressoren inhibiert (let-7, HoxA5 und Cdkn1a) und zum anderen Onkogene aktiviert (UBE2C) (zusammengefasst in Abbildung 4.1). Zudem konnte gezeigt werden, dass Trim71 in Ovarial-, Lungen- und Leberkarzinomen hochreguliert wird (unveröffentlichte Daten und [29]). *In vivo* konnte bisher nicht gezeigt werden, dass Trim71 tatsächlich zur Krebsentstehung beiträgt. Ausschließlich die erhöhte Proliferation durch Überexpression von Trim71 wurde *in vivo* bestätigt. So zeigt eine Studie, dass Trim71 überexprimierende Leberkarzinomzellen (Huh7) nach Injektion in immundefiziente NOD/SCID Mäuse stärker proliferieren als Kontrollzellen [29]. Dementsprechend sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von Trim71 in der Karzinogenese genauer untersucht werden.

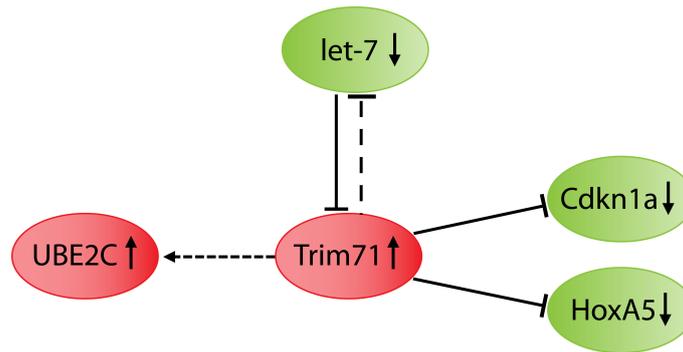


Abbildung 4.1: NETZWERK DER VON TRIM71 REGULIERTEN GENE. Trim71 wird von der miRNA let-7 blockiert und kann wiederum selbst direkt oder indirekt die Expression von let-7 inhibieren. Des Weiteren kontrolliert Trim71 die Expression mehrerer Zellzyklusregulatoren, die in Zusammenhang mit der Tumorentwicklung stehen. Dabei blockiert es die Tumorsuppressoren HoxA5, let-7 und Cdkn1a (grün dargestellt) und führt zur Hochregulation des Onkogens UBE2C (rot dargestellt). Überexpression von Trim71 hat eine verstärkte Proliferation zur Folge, was ein typisches Merkmal eines Onkogens ist.

4.4.1 Der epidermale Knockout von Trim71 zeigt keinen Phänotyp

Zur Untersuchung der Funktion von Trim71 in der Tumorentwicklung und -progression musste zunächst ein geeignetes *in vivo* Modellsystem gefunden werden. Der konventionelle Knockout von Trim71 ist embryonal letal, was funktionelle Analysen sehr kompliziert und zeitaufwändig macht. Die embryonale Letalität musste deshalb durch einen konditionalen Knockout von Trim71 übergangen werden.

Zur Analyse der Tumorbildung eignet sich die Haut als Gewebe sehr gut, da eine Tumorinduktion leicht über die topische Applikation des Kanzerogens DMBA initiiert werden kann. Die Tumorpromotion wird anschließend über eine regelmäßige Behandlung der Maushaut mit dem Tumorpromotor TPA erzielt. Diese chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut ist eines der am besten etablierten *in vivo* Modelle für die schrittweise verlaufene Entwicklung von Tumoren. Außerdem eignet sich die Haut als stabiles, aber dennoch kontinuierlich selbst erneuerndes Organ sehr gut zur Untersuchung von Proliferations- und Differenzierungsprozessen. Zur Expression von Trim71 in der adulten Haut liegen keine Daten vor, aber es konnte gezeigt werden, dass Trim71 stark in der Basalzellschicht der murinen embryonalen Epidermis exprimiert wird [147]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte Trim71 außerdem in CD34⁺-Stammzellen der Epidermis adulter Mäuse nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.24). Aus diesen Gründen wurde ein hautspezifischer Knockout von Trim71 generiert, indem gefloxe Trim71-Mäuse mit K14-Cre-Mäusen verpaart wurden.

Der epidermale Knockout von Trim71 hat keinen offensichtlichen Phänotyp. Die Mäuse sind lebensfähig und zeigen keinen Unterschied in der Hautmorphogenese (siehe Abbildung 3.25). Ferner scheint der epidermale Knockout von Trim71 keinen Einfluss auf die Anzahl und Lokalisation der Haarfollikelstammzellen zu haben (siehe Abbildung 3.27). Betrachtet man den Knockout anderer epidermaler Stammzellfaktoren, war dieser Phänotyp nicht unbedingt zu erwarten. So spielt beispielsweise der Stammzellmarker Sox9 eine

entscheidende Rolle in der Differenzierung der Haarfollikel und der epidermale Knockout von Sox9 führt zum kompletten Haarausfall der Mäuse [172]. Weniger drastisch ist die genetische Ablation des Haarfollikelstammzellmarkers Lhx2. K14-Cre/Lhx2^{fl/fl}-Mäuse sind in der Lage Haarfollikel zu bilden, jedoch ist die Haardichte reduziert [141]. Es gibt aber auch Beispiele, bei denen der Knockout eines epidermalen Stammzellfaktors ähnlich wie bei Trim71 keinen offensichtlichen Phänotyp hat. Dazu gehört unter anderem die hautspezifische Ausschaltung von CD34, einem der ersten bekannten Haarfollikelstammzellmarker [137]. Der konditionale Knockout von CD34 hat keinen Einfluss auf Morphologie, Verteilung oder Orientierung der Haarfollikel. Des Weiteren werden die Stammzellmarker der Wulstregion wie K15 unverändert exprimiert [166]. Interessanterweise wird CD34 zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen benötigt, da CD34^{-/-}-Mäuse nahezu vollständig gegen DMBA/TPA-induzierte Karzinogenese geschützt sind [166]. Gleiches wurde im Rahmen dieser Arbeit für Trim71 gezeigt.

4.4.2 Trim71 als Promotor der Karzinogenese

Fehlsteuerungen der Proliferation und des Zellzyklus sind maßgeblich an der Entstehung von Krebs beteiligt. Zur Untersuchung, ob der Verlust von Trim71 in der Haut einen Einfluss auf die Zellteilung von Keratinozyten hat, wurde die Proliferation in der Epidermis von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen chemisch durch die Applikation des Tumorpromotors TPA induziert. TPA führt über eine Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Hyperproliferation der Epidermis. Bei Menschen kann die als Akanthose bezeichnete Hyperplasie der Epidermis ein Resultat einer entzündlichen Hauterkrankung wie *Psoriasis vulgaris* (Schuppenflechte) sein. In diesem Kurzzeitexperiment konnte ein klarer Unterschied von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen im Vergleich zu Trim71^{fl/fl}-Mäusen in der Reaktion auf TPA festgestellt werden. K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse zeigten eine signifikant schwächere Hyperplasie, die auf eine reduzierte Proliferation der Keratinozyten zurückgeführt werden konnte (siehe Abbildungen 3.28 und 3.29). Neben der Induktion von Proliferation kann die Behandlung mit TPA zu einer Erhöhung der Apoptose in der Epidermis führen [24]. Diese wurde hierbei nicht analysiert, somit können Unterschiede in der Apoptoserate von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren nicht ausgeschlossen werden. Jedoch wurde in einem TUNEL-Assay an Hirnschnitten von Trim71^{-/-}- und WT-Embryonen keine Veränderung in der Apoptoserate festgestellt [28], was dafür spricht, dass allein die veränderte Proliferation in den Keratinozyten von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen für die reduzierte Akanthose verantwortlich ist.

Zur Untersuchung der Rolle von Trim71 in der Karzinogenese wurde das sehr gut etablierte *in vivo* Modell der chemisch induzierten Mehrstufenkarzinogenese verwendet. Dieser weltweit akzeptierte Test gilt als Modell für epidermale Plattenepithelkarzinome, dem zweithäufigsten bösartigen Tumor der Haut. Er dient zudem der Analyse der generellen pro- oder antitumorigenen Wirkung eines bestimmten Gens, was für die Entstehung anderer Krebsarten von Bedeutung ist. Somit wird dieses Modell gerne verwendet, um den

globalen Einfluss eines Gens auf die Karzinogenese zu untersuchen.

In der Tat konnte durch diesen Versuch bestätigt werden, dass Trim71 maßgeblich an der Tumorentstehung beteiligt ist, da der epidermale Knockout von Trim71 partiell vor der DMBA/TPA-induzierten Karzinogenese schützt. K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse zeigen einen verzögerten Beginn der Tumorbildung (siehe Abbildung 3.30), des Weiteren ist die Anzahl und Größe der Tumore signifikant reduziert (siehe Abbildungen 3.31 und 3.33). Trim71 ist ein Stammzellmarker, der zum einen die Zellproliferation fördert und zum anderen die Differenzierung inhibiert [28]. Beides sind wichtige Eigenschaften eines Onkogens und zumindest die Erhöhung der Proliferation durch Trim71 konnte im Rahmen der DMBA/TPA-induzierten Karzinogenese bestätigt werden. Die Markierung proliferierender Zellen in Papillomen von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen und Trim71^{fl/fl}-Mäusen mit BrdU, ergab eine um mehr als die Hälfte reduzierte Proliferationsrate nach Knockout von Trim71 (siehe Abbildung 3.35).

Den Ursprung eines Hauttumors bildet meist eine Stammzelle, die durch eine Ansammlung mehrerer Mutationen in eine maligne Tumorzelle transformiert [134]. Da sich Hauttumore meist klonal entwickeln [130], ist die Lebenszeit anderer Hautzellen wie Keratinozyten zu kurz, um mehr als eine Mutation zu erfahren, was zur Entstehung eines Tumors notwendig wären. Es wird geschätzt, dass beim Menschen fünf dieser Ereignisse erforderlich sind, um zur Transformation der Zelle zu führen [59, 58].

In der Haut gibt es insgesamt drei Stammzellnischen: im Wulstbereich des Haarfollikels, an der Basis der Talgdrüsen und in der dazwischenliegenden interfollikulären Epidermis [72]. Für die Entstehung des Basalzellkarzinoms sind allein die Stammzellen der interfollikulären Epidermis verantwortlich [189], wohingegen lange Zeit geglaubt wurde, dass Plattenepithelkarzinome ausschließlich Haarfollikelstammzellen als Ursprung haben [134, 166]. Neuere Studien hingegen zeigen, dass sowohl Haarfollikelstammzellen als auch Stammzellen der interfollikulären Epidermis zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen beitragen [91]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten ebenso darauf hin, dass es neben den Stammzellen der Haarfollikel eine weitere Stammzellnische in der Epidermis geben muss, die zur DMBA/TPA-induzierten Tumorbildung beitragen kann. Trim71 wird in CD34⁺-Zellen der Haut exprimiert (siehe Abbildung 3.24). Dort markiert CD34 spezifisch die Haarfollikelstammzellen. Wäre allein dieser Stammzellpool für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen verantwortlich, müssten zum einen K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse vollständig vor der DMBA/TPA-induzierten Karzinogenese geschützt und zum anderen in allen Papillomen von Trim71^{fl/fl}-Mäusen eine Expression von Trim71 nachweisbar sein. Beides war nicht der Fall. Trim71 defiziente Mäuse zeigten eine um ca. die Hälfte reduzierte Anzahl an Papillomen und waren somit nicht vollständig resistent gegen die Behandlung mit DMBA und TPA (siehe Abbildung 3.31). Des Weiteren waren nicht alle Papillome von Trim71^{fl/fl}-Mäusen positiv für Trim71. In der ersten Versuchsreihe hatten ca. 90 % der Kontrollmäuse mindestens ein Papillom, das Trim71 exprimierte und in der zweiten Versuchsreihe lag die Anzahl an Mäusen mit Trim71 exprimierenden Papillomen bei ungefähr 50 % (siehe Abbildung 3.36). Da für die Quantifizierung der Trim71 Expression mehrere

Papillome einer Maus zusammengeführt werden mussten, um ausreichend Material zu gewinnen, kann man leider keine Rückschlüsse ziehen, wie viele Papillome pro Maus Trim71 exprimierten. Da es aber Papillome von Trim71^{fl/fl}-Mäuse gibt, die kein Trim71 exprimieren, müssen in diesem Fall Stammzellen der interfollikulären Epidermis den Ursprung des Tumor bilden. Um diese Hypothese zu beweisen, müsste in zukünftigen Experimenten gezeigt werden, dass die Papillome der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse ausschließlich Stammzellmarker der interfollikulären Epidermis exprimieren. Zu diesen gehören unter anderem Lrig1 [74] und MTS24 [128]. In Papillomen von Trim71^{fl/fl}-Mäusen müssten diese ebenfalls in Trim71 negativen Papillomen nachweisbar sein.

Es gibt bereits einige Veröffentlichungen, die zeigen, dass das Fehlen eines Stammzellmarkers in der Epidermis zu einem Schutz vor DMBA/TPA-induzierter Karzinogenese führt (z. B. [166]). Mit Trim71 wurde nun ein weiterer Stammzellmarker beschrieben, der für die Entstehung von Krebs verantwortlich ist.

4.4.3 Stat3 als mögliches Trim71-Zielgen

K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse sind partiell gegen DMBA/TPA-induzierte Karzinogenese geschützt. Um den zugrundeliegenden Mechanismus genauer zu beschreiben, wurden die Papillome von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}-Mäusen auf Expressionsunterschiede einiger bekannter Trim71-Zielgene untersucht. Dabei handelte es sich um die krebsassoziierten Gene *let-7a*, *Cdkn1a* und *UBE2C*. Jedoch konnte für keines dieser Gene ein Unterschied in der Expression in An- und Abwesenheit von Trim71 festgestellt werden (siehe Abbildung 3.37). Das könnte unter anderem daran liegen, dass Plattenepithelkarzinome sehr heterogen sind und sich dadurch die Expression einiger Marker bereits innerhalb eines Genotyps stark unterscheidet. Dadurch entstehen große Standardabweichungen, die nur bei sehr hoher Probengröße zu einem signifikanten Unterschied führen können. Zudem ist nicht klar, ob Trim71 homogen im Tumor exprimiert wird, da es keinen für die Immunohistochemie geeigneten Trim71-Antikörper gibt. So ist es möglich, dass Trim71 nur in den Tumorstammzellen exprimiert wird und Zellen, die kein Trim71 exprimieren, das Ergebnis verfälschen. Des Weiteren ist es möglich, dass bisher unbekanntes von Trim71 regulierte Gene für den Phänotyp verantwortlich sind. Um das herauszufinden, wurde eine RNA-Sequenzierung mit Proben aus unbehandelter und TPA-behandelter Epidermis von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}-Mäusen durchgeführt. Interessanterweise wurden nahezu ausschließlich Gene reguliert, die eine immunregulatorische Funktion haben (siehe Abbildung 3.39). Diese wurden spezifisch nach TPA-Behandlung in der Epidermis von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen hochreguliert. Zu diesen Genen gehörten Zytokine und Chemokine wie beispielsweise *IL-22*, *IL23-R*, *CXCL12* und *CXCR4*, die die Proliferation von Keratinozyten regulieren. So konnte in einem Mausmodell für IL-23 vermittelte Psoriasis gezeigt werden, dass *CXCR4* die epidermale Hyperproliferation inhibiert, indem es indirekt die Stat3-Phosphorylierung/-Aktivierung blockiert [163].

Stat-Proteine sind Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription, die viele

Signalwege in der Zelle steuern [95]. So hat eine Aktivierung von Stat3 Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation der Zelle [106]. Zudem spielt es eine wichtige Rolle in der Onkogenese, da gezeigt werden konnte, dass Stat3 in diversen humanen Krebsarten wie Prostata- und Bauchspeicheldrüsenkrebs konstitutiv aktiv ist [15, 167]. Der epidermale Knockout von Stat3 ähnelt phänotypisch dem hautspezifischen Knockout von Trim71. K5-Cre/Stat3^{fl/fl}-Mäuse sind gegen DMBA/TPA-induzierte Karzinogenese geschützt und reagieren schwächer auf eine TPA-induzierte Hyperproliferation der Epidermis [25]. Somit könnte eine Inhibition der Stat3-Aktivierung die Erklärung für den Phänotyp der K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse sein. Eine Zusammenfassung der Rolle von Trim71 in der Regulation der Keratinozytenproliferation ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

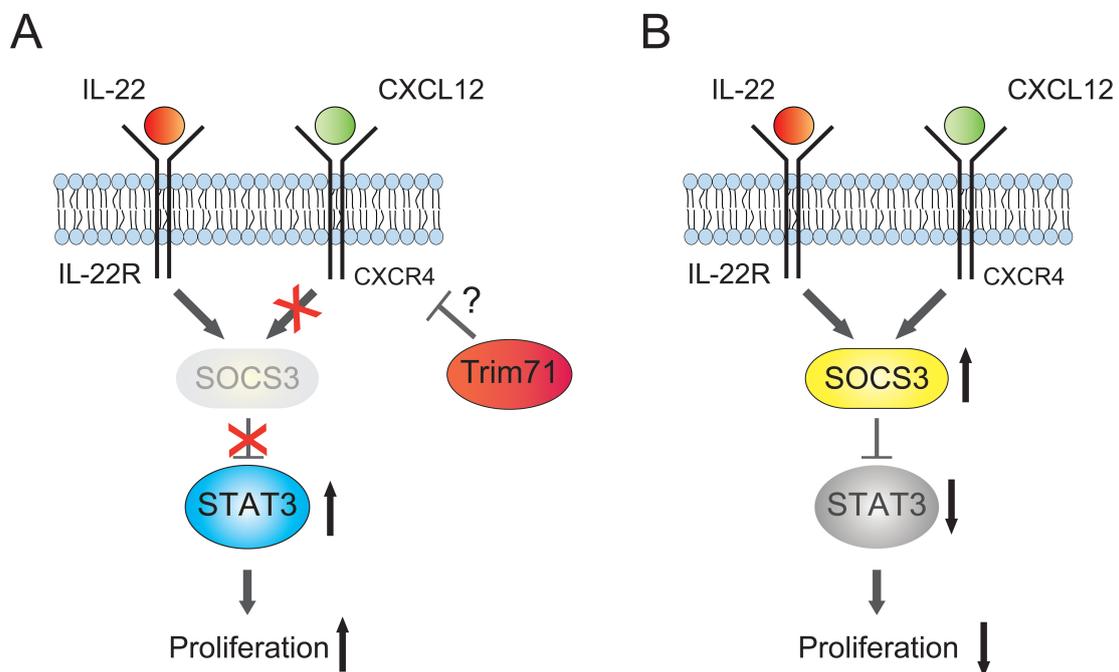


Abbildung 4.2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ROLLE VON TRIM71 IN DER REGULATION DER KERATINOZYTENPROLIFERATION. Die Stimulation mit IL-22 führt zu einer Erhöhung der Keratinozytenproliferation [127, 9], die durch Co-Stimulation mit CXCL12 inhibiert werden kann [163]. Dies funktioniert über eine Hochregulation von SOCS3 und einer damit verbundenen Inhibition der Stat3-Phosphorylierung und -Aktivierung [25]. A) Trim71 scheint die Expression von CXCR4 direkt oder indirekt zu blockieren, wodurch SOCS3 zu schwach exprimiert wird, um Stat3 zu inhibieren. Die Proliferationsrate der Keratinozyten ist erhöht. B) In Abwesenheit von Trim71 wird CXCR4 hochreguliert, was zu einer Inhibition der Stat3-Aktivierung führt und eine verminderte Proliferation zur Folge hat.

Tatsächlich konnte die Hochregulation von CXCR4 nach TPA-Behandlung in primären Keratinozyten von Trim71 defizienten Mäusen mittels qPCR validiert werden (siehe Abbildung 3.41) und erste vorläufige Daten zeigen, dass dies eine verminderte Stat3-Phosphorylierung und Zellproliferation zur Folge hat (siehe Abbildungen 3.42 und 3.43). Interessanterweise sind zudem einige durch Stat3 inhibierte Gene in epidermalen Zellen von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen nach TPA-Behandlung im Vergleich zu epidermalen Zellen von Trim71^{fl/fl}-Mäusen nach TPA-Behandlung hochreguliert (siehe Tabelle 3.1), was zu-

sätzlich für eine verminderte Stat3 Aktivität in der Haut Trim71 defizienter Mäuse spricht. Zu diesen Genen gehört unter anderem das erfolgversprechende Krebsmedikament TRAIL (auch TNFSF10 oder APO2L genannt), das die einzigartige Eigenschaft besitzt, spezifisch in Tumorzellen Apoptose auszulösen, während gesunde Körperzellen verschont bleiben [4]. Eine Induktion der Expression von TRAIL in der Haut führt deshalb zu einem Schutz vor chemisch induzierter Karzinogenese [81].

4.5 Epigenetischer Einfluss von Trim71 auf die Genexpression in der Haut

Trim71 wird in der Basalzellschicht der murinen embryonalen Epidermis exprimiert [147]. Es ist allerdings umstritten, ob Trim71 tatsächlich auch in der adulten Haut exprimiert wird. Im Rahmen dieser Arbeit sind sämtliche Versuche missglückt, das Protein in der Haut nachzuweisen. Mit Hilfe einer semiquantitativen PCR konnte die mRNA von Trim71 in epidermalen Stammzellen detektiert werden. Jedoch sprechen die Daten der RNA-Sequenzierung von epidermalen Zellen gegen eine Expression von Trim71 in der adulten Haut, da weder in unbehandelter noch TPA-behandelter Haut eine Expression von Trim71 belegt werden konnte. Geht man davon aus, dass Trim71 nur in epidermalen Stammzellen exprimiert werden kann, weil in allen anderen Zellen Trim71 durch *let-7* inhibiert wird, könnten je nach Haarzyklus ca. 5-15 % der epidermalen Zellen positiv für Trim71 sein. Es ist somit möglich, dass in RNA-Proben der Haut die Expression von Trim71 so schwach ist, dass sie an der unteren Nachweisgrenze liegt und die Methode der RNA-Sequenzierung hier limitiert ist. Allerdings konnte die Expression anderer Haarfollikelstammzellmarker wie K15, CD34 und *Lhx2* ohne Probleme nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten primär isolierte Keratinozyten von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen und Trim71^{fl/fl}-Mäusen Unterschiede in ihrer Proliferationsrate, obwohl Keratinozyten gar kein Trim71 exprimieren. Somit ist es möglich, dass Trim71 einen Einfluss auf die Genexpression hat, obwohl es gar nicht mehr in dem Gewebe exprimiert wird. Trim71 könnte die Genexpression epigenetisch in der frühen Embryonalentwicklung verändern. Dort wird Trim71 nachweislich exprimiert. Die Modifikation kann an spätere Tochterzellen weitervererbt werden, auch wenn diese kein Trim71 mehr exprimieren.

Epigenetische Änderungen der Genregulation basieren auf der Modifikation der Chromatinstruktur. Gene, die aktiv transkribiert werden, zeigen eine offene Chromatinstruktur. Die DNA von dicht gepacktem (kondensiertem) Chromatin ist für Proteine der Transkriptionsmaschinerie unzugänglich. Die Gene sind inaktiv. Gesteuert wird dieser Regulationsprozess über Histonmodifikationen und DNA-Methylierungen (vergleiche Abschnitt 1.11). Sollte Trim71 die Genexpression der Haut epigenetisch steuern, müsste die Chromatinstruktur von Keratinozyten aus Trim71 defizienten Mäusen verändert sein. Um diese Hypothese zu überprüfen ist eine sogenannte ATAC-Sequenzierung (*assay for transposase-accessible chromatin using sequencing*) mit Keratinozyten von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und

Trim71^{fl/fl}-Mäusen geplant. Dabei handelt es sich um eine neue Methode zur Erstellung eines epigenetischen Genomprofils. Zur Herstellung der DNA-Bibliothek wird die hyperaktive Transposase Tn5 verwendet. Diese ist mit Sequenzieradaptern beladen und kann nur in Regionen inserieren, in denen das Chromatin offen ist [18]. Somit werden nur aktive Gene sequenziert. Unterschiede in den Ergebnissen der ATAC-Sequenzierung von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}-Keratinocyten, würden somit ausschließlich epigenetische Modifikationen anzeigen.

4.6 Ausblick

Im Laufe dieser Arbeit konnten neue funktionelle Aspekte in der molekularen Wirkungsweise des humanen und murinen Trim71 aufgeklärt werden. Der Stammzellfaktor Trim71 spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung von embryonalen Stammzellen [26, 186]. Zum einen ist Trim71 ein Zielgen der miRNA let-7, einem wichtigen, positiven Regulator der Differenzierung [19], zum anderen kann Trim71 über eine negative Rückkopplung die Expression von let-7 inhibieren und blockiert dadurch die Differenzierung. Nach der Modellvorstellung von Rybak *et al.* erfolgt der Abbau von let-7 indirekt über die Kontrolle der Stabilität des RISC-Proteins Ago2 [147]. Dieser Mechanismus der Ubiquitinierung und Herunterregulation von Ago2 durch Trim71 konnte in keiner der darauffolgenden Veröffentlichungen bestätigt werden [26, 104, 28]. In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass Trim71 unabhängig von Ago2 die Expression von let-7a in HEK293-Zellen inhibiert. Allerdings konnte nicht geklärt werden wie genau das passiert. Ob beispielsweise die kürzlich beschriebene Interaktion von Trim71 mit dem let-7 Inhibitor Lin28 [93] eine Rolle spielt, müssen zukünftige Experimente zeigen.

Ein großer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle von Trim71 in der Krebsentstehung. Der epidermale Knockout von Trim71 führt zu einem partiellen Schutz vor DMBA/TPA-induzierter Karzinogenese, der auf eine reduzierte Proliferation in der Epidermis zurückzuführen war. Allerdings scheinen hier die von Trim71 regulierten Gene let-7, Cdkn1a und UBE2C unbeteiligt zu sein, da deren Expression in den Papillomproben von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}- Mäusen unverändert war. Eine RNA-Sequenzierung mit Proben aus unbehandelter und TPA-behandelter Epidermis deutete auf eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch Trim71 hin. Trim71 scheint die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 zu blockieren, wodurch SOCS3 zu schwach exprimiert wird um Stat3 zu inhibieren. Bisher konnte die Hochregulation von CXCR4 nach TPA-Behandlung in primären Keratinocyten von Trim71 defizienten Mäusen validiert werden und erste vorläufige Daten zeigen, dass dies eine verminderte Stat3-Phosphorylierung und Zellproliferation zur Folge hat. Um den genauen Mechanismus bestätigen zu können, müsste zudem noch ein Unterschied in der Expression von SOCS3 nachgewiesen werden. Histologische Färbungen an Paraffinschnitten der Papillome von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}- Mäusen mit Antikörpern gegen SOCS3 und phospho-Stat3, könnten die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges *in vivo* belegen.

Da weder primär isolierte Keratinozyten von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen noch Keratinozyten von Trim71^{fl/fl}-Mäusen Trim71 exprimieren, diese aber Unterschiede in ihrer Proliferation zeigen, scheint Trim71 die Genexpression der Haut epigenetisch zu beeinflussen. Diese Vermutung könnte über die bereits erwähnte Analyse der Chromatinstruktur mittels ATAC-Sequenzierung bestätigt werden.

Zur weiteren Analyse der Funktion von Trim71 in der Kontrolle der Differenzierung und Proliferation sowie der Entstehung von Krebs, könnte die Generierung neuer gewebespezifischer Trim71 Knockout-Mäuse beitragen.

So gibt es Hinweise darauf, dass Trim71 im Skelettmuskel exprimiert wird. Bei der Muskelentwicklung spielen Differenzierungsprozesse eine wichtige Rolle, die unter anderem durch die Expression von *let-7* reguliert werden [21]. Somit wäre es möglich, dass Trim71 an der Kontrolle der Muskeldifferenzierung beteiligt ist, was mit Hilfe einer muskelspezifischen Trim71 Knockout-Maus aufgeklärt werden könnte.

Inwieweit Trim71 an der Entstehung anderer Krebsarten beteiligt ist, kann mit Hilfe weiterer Tumormodelle geklärt werden. Ein Beispiel hierfür ist die K-Ras-induzierte Karzinogenese, mit der die Beteiligung von Trim71 an der Entstehung von Lungenkrebs analysiert werden kann.

4.7 Fazit

Krebs steht auf der Rangliste der häufigsten Todesursachen an zweiter Stelle, weshalb die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten sehr hoch ist. Dabei spielt die Grundlagenforschung eine wichtige Rolle, da sie hilft Vorgänge im Tumor und dessen Mikromilieu besser zu verstehen. Des Weiteren kann die Untersuchung der Rolle eines bestimmten Gens in der Tumorentwicklung und -progression entscheidend zur Verbesserung bestehender Therapien oder zur Entwicklung neuer Medikamente beitragen. Dafür eignet sich das Mausmodell der chemisch induzierten Karzinogenese sehr gut, da dieser Test eines der am besten etablierten *in vivo* Modelle für die schrittweise verlaufene Entwicklung von Tumoren ist. Er dient dabei nicht nur der Aufklärung der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Haut, sondern können anhand der Ergebnissen auch generelle Rückschlüsse über die pro- oder antitumorigenen Wirkung eines bestimmten Gens gezogen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal mit Hilfe der DMBA/TPA-induzierten Karzinogenese an epidermalen Trim71 Knockout-Mäusen gezeigt werden, dass Trim71 eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung spielt und als Onkogen wirkt. Da Trim71 nur schwach in adultem Gewebe exprimiert wird, aber stark in humanen Tumoren hochreguliert ist, repräsentiert es ein vielversprechendes, therapeutisches Zielmolekül in der Behandlung von Krebs. Demzufolge könnte die Herstellung von Inhibitoren gegen Trim71 wichtig für die Behandlung von Krebs sein.

5 Zusammenfassung

Trim71 ist ein hoch konserviertes Gen, das in Vertebraten und Invertebraten als Regulator der Embryonalentwicklung entdeckt wurde. Außerdem konnten neuere Studien zeigen, dass Trim71 eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Proliferation und Differenzierung embryonaler Stammzellen spielt. Die Expression von Trim71 wird stark durch die microRNA let-7 inhibiert, deren Konzentration in pluripotenten Stammzellen sehr gering ist. Erst im Verlauf der Differenzierung wird let-7 hochreguliert, was zu einer Inhibition verschiedener Stammzellfaktoren wie Trim71 führt. Demzufolge beschränkt sich die Expression von Trim71 auf Stammzellen und undifferenzierte Vorläuferzellen. In diesen Zellen inhibiert Trim71 über eine negative Rückkopplung die Expression von let-7.

Kürzlich konnte Trim71 als mRNA bindendes Protein beschrieben werden, das den Abbau bestimmter Ziel-mRNAs fördert. Es bindet unter anderem die mRNA des Zellzyklusregulators Cdkn1a und fördert so die Proliferation embryonaler Stammzellen. Durch Überexpression von Trim71 konnten diese Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit in HEK293-Zellen bestätigt werden. Zudem wurden mittels Microarray-Analyse weitere, durch Trim71 regulierte Gene gefunden. Zu den hochregulierten Genen gehörte unter anderem das E2-Ubiquitin-konjugierende Enzym UBE2C, dessen erhöhte Expression mit einer verstärkten Proliferation korreliert.

Fehlsteuerungen der Proliferation und des Zellzyklus sind maßgeblich an der Entstehung von Krebs beteiligt. Deshalb können Änderungen in der Expression vieler Zellzyklusgene mit Krebs assoziiert werden. UBE2C gilt als vielversprechender Tumormarker, dessen erhöhte Expression in Zusammenhang mit chromosomaler Instabilität, erhöhter Kanzerogenität und Metastasierung steht. Let-7 und Cdkn1a sind anerkannte Tumorsuppressoren. Ferner konnte gezeigt werden, dass Trim71 selbst in einigen humanen Krebsarten hochreguliert wird und somit als potentiell Onkogen agiert. Aus diesen Gründen war es wichtig, die Rolle von Trim71 in der Karzinogenese *in vivo* zu analysieren.

Da der konventionelle Knockout von Trim71 embryonal letal ist, musste zunächst eine adulte Trim71 Knockout-Maus generiert werden. Dazu wurden gefloxt Trim71-Mäuse mit einer Mauslinie verpaart, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des humanen Keratin 14 (K14) Promotors exprimiert, was zu einer hautspezifischen Ablation von Trim71 führt. Diese K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse waren lebensfähig und zeigten keinen Unterschied in der Hautmorphogenese oder der Fellentwicklung. Ferner hatte der epidermale Knockout von Trim71 keinen Einfluss auf die Anzahl und Lokalisation der Haarfollikelstammzellen.

Nach Induktion der Proliferation in der Epidermis durch den Tumorpromotor TPA waren jedoch klare Unterschiede zu erkennen. K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse zeigten eine si-

gnifikant schwächere epidermale Hyperplasie, die auf eine reduzierte Proliferation der Keratinozyten zurückgeführt werden konnte.

In einem Modell für Plattenepithelkarzinome in der Maushaut waren K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäuse partiell vor der DMBA/TPA-induzierten Karzinogenese geschützt. Die epidermale Ablation von Trim71 führte zu einer verzögerten Papillombildung sowie einer reduzierten Tumoranzahl und -größe.

Da die Expression der bereits bekannten Trim71-Zielgene UBE2C, let-7a und Cdkn1a in den Papillomproben von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}- und Trim71^{fl/fl}- Mäusen unverändert war, sollte eine RNA-Sequenzierung mit Proben aus unbehandelter und TPA-behandelter Epidermis zur Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus beitragen. Diese ergab, dass nahezu ausschließlich Gene mit immunbiologischer Funktion nach TPA-Behandlung in der Epidermis von K14-Cre/Trim71^{fl/fl}-Mäusen hochreguliert waren. Zu diesen Genen gehörten unter anderem IL-22, IL23-R, CXCL12 und CXCR4, die die Proliferation von Keratinozyten über den JAK/STAT-Signalweg steuern. Bisher konnte die Hochregulation von CXCR4 nach TPA-Behandlung in primären Keratinozyten aus Trim71 defizienten Mäusen validiert werden und erste vorläufige Daten zeigen, dass dies eine verminderte Stat3-Phosphorylierung und Zellproliferation zur Folge hat. Somit könnte Trim71 durch Aktivierung des Stat3-Signalweges die Tumorentwicklung fördern.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Trim71 entscheidend an der Tumorentwicklung beteiligt ist und als potentiell Onkogen wirkt. Da Trim71 nur schwach in adultem Gewebe exprimiert wird, aber stark in humanen Tumoren hochreguliert ist, repräsentiert es ein erfolgversprechendes Zielmolekül in der Krebstherapie.

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha oder anti
Ago	Argonaute
AML	Akute myeloide Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
APO2L	apoptosis ligand 2
APC	Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
APS	Ammoniumperoxodisulfat 1
ATAC	Assay for Transposase-Accessible Chromatin
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CC	Coiled-Coil
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
CoIP	Coimmunpräzipitation
cRNA	copy RNA
CsCl	Cäsiumchlorid
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Cy	Cyanin
DABCO	Diazabicyclooctan
DAG	Diacylglycerol
DAPI	Diamidinphenylindol
DLL1	Delta like 1
DMBA	Dimethylbenzanthracen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiotreithol

E. coli	Escherichia coli
EC	Embryonic Carcinoma
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	Ethynyldeoxyuridin
EGR1	Early growth response protein 1
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESC	Embryonic Stem Cell
et al.	et alteres (lat.: und andere)
FACS	Fluorescent activated cell sorting
FAM	Fluorescein
FBS	Filamin-Bindungsstelle
FCS	fetal calf serum
FGF	Fibroblast growth factors
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSG	fish skin gelatin
g	Gramm
G418	Geneticin 418
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HBS	HEPES buffered saline
HEK293	human embryonic kidney
HeLa	Henrietta Lacks, menschliche Epithelzelllinie
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	horseradish peroxidase
igG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-22	Interleukin 22
ILK	Integrin-linked kinase
IP	Immunpräzipitation
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
k	Kilo
K14	Keratin 14
K15	Keratin 15
kDa	Kilodalton
KGM2	Keratinocyte Growth Medium 2
KLF4	Kruppel-like factor 4
KLK	Kallikrein-related peptidase

l	Liter
LB	lysogeny broth
let	letal
Lin28	cell lineage abnormal 28
Lin-41	lineage variant 41
Lhx2	LIM/homeobox protein 2
LPA	lineares Polyacrylamid
Lrig1	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1
LSM	Laser Scanning Microscopy
μ	mikro
M	Molarität (mol/l)
MACS	magnetic activated cell sorting
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
miRNA	micro RNA
mRNA	messenger RNA
MTT	Dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid
n	nano
NGS	next generation sequencing
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PLL	Poly-L-Lysin
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RING	really interesting new gene
RIP	RNA-Immunopräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
siRNA	small interfering RNA

SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
Sox9	SRY (sex determining region Y)-box 9
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	tris-buffered saline tween-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNFSF10	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
WB	Western-Blot
z. B.	zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- [1] Erika L. Abel, Joe M. Angel, Kaoru Kiguchi, and John DiGiovanni. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nature protocols*, 4(9):1350–1362, 2009.
- [2] Muhammad Al-Hajj, Max S. Wicha, Adalberto Benito-Hernandez, Sean J. Morrison, and Michael F. Clarke. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7):3983–3988, 2003.
- [3] M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, and G. Sherlock. Gene ontology: tool for the unification of biology. the gene ontology consortium. *Nature genetics*, 25(1):25–29, 2000.
- [4] Avi Ashkenazi, Pamela Holland, and S. Gail Eckhardt. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhapo21/trail). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(21):3621–3630, 2008.
- [5] D. Barh, R. Malhotra, B. Ravi, and P. Sindhurani. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 17(1):70–80, 2010.
- [6] David P. Bartel. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281–297, 2004.
- [7] L. R. Baugh, A. A. Hill, E. L. Brown, and C. P. Hunter. Quantitative analysis of mrna amplification by in vitro transcription. *Nucleic acids research*, 29(5):E29, 2001.
- [8] Stephen B. Baylin and James G. Herman. Dna hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics*, 16(4):168–174, 2000.
- [9] Burkhard Becher and Stanislav Pantelyushin. Hiding under the skin: Interleukin-17-producing $\gamma\delta$ t cells go under the skin? *Nature medicine*, 18(12):1748–1750, 2012.

- [10] Rolf Bjerkvig, Berit B. Tysnes, Karen S. Aboody, Joseph Najbauer, and Terzis, A J A. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature reviews. Cancer*, 5(11):899–904, 2005.
- [11] Cherie Blenkiron and Eric A. Miska. mirnas in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Human molecular genetics*, 16 Spec No 1:R106–13, 2007.
- [12] Wendy B. Bollag and William D. Hill. Cxcr4 in epidermal keratinocytes: crosstalk within the skin. *The Journal of investigative dermatology*, 133(11):2505–2508, 2013.
- [13] D. Bonnet and J. E. Dick. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, 3(7):730–737, 1997.
- [14] Adil Bouskine, Aurélie Vega, Marielle Nebout, Mohamed Benahmed, and Patrick Fénichel. Expression of embryonic stem cell markers in cultured jkt-1, a cell line derived from a human seminoma. *International journal of andrology*, 33(1):54–63, 2010.
- [15] T. Bowman, R. Garcia, J. Turkson, and R. Jove. Stats in oncogenesis. *Oncogene*, 19(21):2474–2488, 2000.
- [16] Markus Bredel, Claudia Bredel, Dejan Juric, Griffith R. Harsh, Hannes Vogel, Lawrence D. Recht, and Branimir I. Sikic. Functional network analysis reveals extended gliomagenesis pathway maps and three novel myc-interacting genes in human gliomas. *Cancer research*, 65(19):8679–8689, 2005.
- [17] K. Brown, A. Buchmann, and A. Balmain. Carcinogen-induced mutations in the mouse c-ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(2):538–542, 1990.
- [18] Jason D. Buenrostro, Paul G. Giresi, Lisa C. Zaba, Howard Y. Chang, and William J. Greenleaf. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, dna-binding proteins and nucleosome position. *Nature methods*, 10(12):1213–1218, 2013.
- [19] Ingo Büssing, Frank J. Slack, and Helge Großhans. let-7 micrnas in development, stem cells and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 14(9):400–409, 2008.
- [20] C. Byrne, M. Tainsky, and E. Fuchs. Programming gene expression in developing epidermis. *Development (Cambridge, England)*, 120(9):2369–2383, 1994.
- [21] Thomas E. Callis, Jian-Fu Chen, and Da-Zhi Wang. Micrnas in skeletal and cardiac muscle development. *DNA and cell biology*, 26(4):219–225, 2007.

- [22] M. J. Casadaban and S. N. Cohen. Analysis of gene control signals by dna fusion and cloning in *escherichia coli*. *Journal of molecular biology*, 138(2):179–207, 1980.
- [23] M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of biological chemistry*, 257(13):7847–7851, 1982.
- [24] C. Cataisson, E. Joseloff, R. Murillas, A. Wang, C. Atwell, S. Torgerson, M. Gerdes, J. Subleski, J.-L. Gao, P. M. Murphy, R. H. Wiltrout, C. Vinson, and S. H. Yuspa. Activation of cutaneous protein kinase c induces keratinocyte apoptosis and intraepidermal inflammation by independent signaling pathways. *The Journal of Immunology*, 171(5):2703–2713, 2003.
- [25] Keith Syson Chan, Shigetoshi Sano, Kaoru Kiguchi, Joanne Anders, Nobuyasu Komazawa, Junji Takeda, and John DiGiovanni. Disruption of stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 114(5):720–728, 2004.
- [26] Hao-Ming Chang, Natalia J. Martinez, James E. Thornton, John P. Hagan, Khang D. Nguyen, and Richard I. Gregory. Trim71 cooperates with micrnas to repress cd-kn1a expression and promote embryonic stem cell proliferation. *Nature communications*, 3:923, 2012.
- [27] Hexin Chen, Seung Chung, and Saraswati Sukumar. Hoxa5-induced apoptosis in breast cancer cells is mediated by caspases 2 and 8. *Molecular and cellular biology*, 24(2):924–935, 2004.
- [28] Jianfu Chen, Fan Lai, and Lee Niswander. The ubiquitin ligase mlin41 temporally promotes neural progenitor cell maintenance through fgf signaling. *Genes & development*, 26(8):803–815, 2012.
- [29] Yu-Ling Chen, Ray-Hwang Yuan, Wan-Ching Yang, Hey-Chi Hsu, and Yung-Ming Jeng. The stem cell e3-ligase lin-41 promotes liver cancer progression through inhibition of microRNA-mediated gene silencing. *The Journal of pathology*, 229(3):486–496, 2013.
- [30] Thimmaiah P. Chendrimada, Richard I. Gregory, Easwari Kumaraswamy, Jessica Norman, Neil Cooch, Kazuko Nishikura, and Ramin Shiekhattar. Trbp recruits the dicer complex to ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051):740–744, 2005.
- [31] J. F. Conway and D. A. Parry. Structural features in the heptad substructure and longer range repeats of two-stranded alpha-fibrous proteins. *International journal of biological macromolecules*, 12(5):328–334, 1990.

- [32] Andrew J. Copp, Greene, Nicholas D E, and Jennifer N. Murdoch. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nature reviews. Genetics*, 4(10):784–793, 2003.
- [33] Jeffrey M. Craig. Heterochromatin-many flavours, common themes. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 27(1):17–28, 2005.
- [34] Daniel J. Dauer, Bernadette Ferraro, Lanxi Song, Bin Yu, Linda Mora, Ralf Buettner, Steve Enkemann, Richard Jove, and Eric B. Haura. Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene*, 24(21):3397–3408, 2005.
- [35] P. K. Davis, A. Ho, and S. F. Dowdy. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *BioTechniques*, 30(6):1322–6, 1328, 1330–1, 2001.
- [36] H. T. Deelman. The part played by injury and repair in the development of cancer. *British medical journal*, 1(3462):872, 1927.
- [37] Lars Dölken, Georg Malterer, Florian Erhard, Sheila Kothe, Caroline C. Friedel, Guillaume Suffert, Lisa Marcinowski, Natalie Motsch, Stephanie Barth, and Michaela Beitzinger. Systematic analysis of viral and cellular microrna targets in cells latently infected with human γ -herpesviruses by risc immunoprecipitation assay. *Cell Host & Microbe*, 7(4):324–334, 2010.
- [38] Anne Dueck and Gunter Meister. Trimming microrna function in mouse stem cells. *Nature cell biology*, 11(12):1392–1393, 2009.
- [39] Matyas Ecsedi and Helge Grosshans. Lin-41/trim71: emancipation of a mirna target. *Genes & development*, 27(6):581–589, 2013.
- [40] S. J. Elledge. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5293):1664–1672, 1996.
- [41] Andrew P. Feinberg and Benjamin Tycko. The history of cancer epigenetics. *Nature reviews. Cancer*, 4(2):143–153, 2004.
- [42] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. C. Mello. Potent and specific genetic interference by double-stranded rna in caenorhabditis elegans. *Nature*, 391(6669):806–811, 1998.
- [43] L. Foulds. Mammary tumours in hybrid mice; growth and progression of spontaneous tumours. *British journal of cancer*, 3(3):345–375, 1949.
- [44] P. S. Freemont. The ring finger. a novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 684:174–192, 1993.
- [45] W. F. Friedewald and P. Rous. The initiating and promoting elements in tumor production: An analysis of the effects of tar, benzpyrene and methylcholanthrene on rabbit skin. *The Journal of experimental medicine*, 80(2):101–126, 1944.

- [46] M. Fritsche, C. Haessler, and G. Brandner. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by dna-damaging agents. *Oncogene*, 8(2):307–318, 1993.
- [47] Elaine Fuchs and Srikala Raghavan. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 3(3):199–209, 2002.
- [48] G. Fürstenberger, D. L. Berry, B. Sorg, and F. Marks. Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12):7722–7726, 1981.
- [49] G. Fürstenberger and A. Kopp-Schneider. Malignant progression of papillomas induced by the initiation–promotion protocol in nmri mouse skin. *Carcinogenesis*, 16(1):61–69, 1995.
- [50] Ramón García-Escudero, Ana B. Martínez-Cruz, Mirentxu Santos, Corina Lorz, Carmen Segrelles, Guillermo Garaulet, Cristina Saiz-Ladera, Clotilde Costa, Agueda Buitrago-Pérez, Marta Dueñas, and Jesús M. Paramio. Gene expression profiling of mouse p53-deficient epidermal carcinoma defines molecular determinants of human cancer malignancy. *Molecular cancer*, 9:193, 2010.
- [51] M. Gardiner-Garden and M. Frommer. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology*, 196(2):261–282, 1987.
- [52] S. J. Gaunt. Expression patterns of mouse hox genes: clues to an understanding of developmental and evolutionary strategies. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 13(10):505–513, 1991.
- [53] Gaëlle Gendronneau, Margot Lemieux, Mélanie Morneau, Josée Paradis, Bernard Têtu, Nancy Frenette, Josée Aubin, and Lucie Jeannotte. Influence of *hoxa5* on p53 tumorigenic outcome in mice. *The American journal of pathology*, 176(2):995–1005, 2010.
- [54] M. S. Greenblatt, W. P. Bennett, M. Hollstein, and C. C. Harris. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer research*, 54(18):4855–4878, 1994.
- [55] M. Grunstein. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389(6649):349–352, 1997.
- [56] François Guillemot and Céline Zimmer. From cradle to grave: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Neuron*, 71(4):574–588, 2011.
- [57] Martin Hafner, Jutta Wenk, Arianna Nenci, Manolis Pasparakis, Karin Scharffetter-Kochanek, Neil Smyth, Thorsten Peters, Daniel Kess, Olaf Holtkötter, Pierre Shephard, Jeffrey E. Kudlow, Hans Smola, Ingo Haase, Angela Schippers, Thomas Krieg,

- and Werner Müller. Keratin 14 cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 38(4):176–181, 2004.
- [58] W. C. Hahn, C. M. Counter, A. S. Lundberg, R. L. Beijersbergen, M. W. Brooks, and R. A. Weinberg. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400(6743):464–468, 1999.
- [59] William C. Hahn and Robert A. Weinberg. Rules for making human tumor cells. *The New England journal of medicine*, 347(20):1593–1603, 2002.
- [60] Christopher M. Hammell, Isabella Lubin, Peter R. Boag, T. Keith Blackwell, and Victor Ambros. Nhl-2 modulates microrna activity in caenorhabditis elegans. *Cell*, 136(5):926–938, 2009.
- [61] Sophie A. Hanina, William Mifsud, Thomas A. Down, Katsuhiko Hayashi, Dónal O’Carroll, Kaiqin Lao, Eric A. Miska, M. Azim Surani, and Michael T. McManus. Genome-wide identification of targets and function of individual micrnas in mouse embryonic stem cells. *PLoS Genetics*, 6(10):e1001163, 2010.
- [62] Zhonglin Hao, Hui Zhang, and John Cowell. Ubiquitin-conjugating enzyme ube2c: molecular biology, role in tumorigenesis, and potential as a biomarker. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 33(3):723–730, 2012.
- [63] Steven Hatfield and Hannele Ruohola-Baker. microrna and stem cell function. *Cell and tissue research*, 331(1):57–66, 2008.
- [64] Lin He and Gregory J. Hannon. Micrnas: small rnas with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*, 5(7):522–531, 2004.
- [65] J. H. Heaton, W. M. Dlakic, M. Dlakic, and T. D. Gelehrter. Identification and cdna cloning of a novel rna-binding protein that interacts with the cyclic nucleotide-responsive sequence in the type-1 plasminogen activator inhibitor mrna. *The Journal of biological chemistry*, 276(5):3341–3347, 2001.
- [66] Sébastien S. Hébert, Katrien Horr , Laura Nicolai, Aikaterini S. Papadopoulou, Wim Mandemakers, Asli N. Silahtaroglu, Sakari Kauppinen, André Delacourte, and Bart de Strooper. Loss of microrna cluster mir-29a/b-1 in sporadic alzheimer’s disease correlates with increased bace1/beta-secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17):6415–6420, 2008.
- [67] Gregory S. Henderson, van Diest, Paul J, Horst Burger, Jose Russo, and Venu Raman. Expression pattern of a homeotic gene, *hoxa5*, in normal breast and in breast tumors. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology*, 28(5-6):305–313, 2006.

- [68] Inha Heo, Chirlmin Joo, Young-Kook Kim, Minju Ha, Mi-Jeong Yoon, Jun Cho, Kyu-Hyeon Yeom, Jinju Han, and V. Narry Kim. Tut4 in concert with lin28 suppresses microrna biogenesis through pre-microrna uridylation. *Cell*, 138(4):696–708, 2009.
- [69] R. Higuchi, B. Krummel, and R. K. Saiki. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of dna fragments: study of protein and dna interactions. *Nucleic acids research*, 16(15):7351–7367, 1988.
- [70] Xiang Huang, Yu-Lin Qiu, Jia-Yu Tan, Ya-Feng Qiao, and Ming Li. [effect of ube2c overexpression on the proliferation of 293t cell line]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology*, 27(6):634–636, 2011.
- [71] Shaun E. Hunter, Emily F. Finnegan, Dimitrios G. Zisoulis, Michael T. Lovci, Katya V. Melnik-Martinez, Gene W. Yeo, and Amy E. Pasquinelli. Functional genomic analysis of the let-7 regulatory network in caenorhabditis elegans. *PLoS genetics*, 9(3):e1003353, 2013.
- [72] Viljar Jaks, Maria Kasper, and Rune Toftgård. The hair follicle—a stem cell zoo. *Experimental cell research*, 316(8):1422–1428, 2010.
- [73] Albert Jeltsch. Beyond watson and crick: Dna methylation and molecular enzymology of dna methyltransferases. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology*, 3(4):274–293, 2002.
- [74] Kim B. Jensen, Charlotte A. Collins, Elisabete Nascimento, David W. Tan, Michaela Frye, Satoshi Itami, and Fiona M. Watt. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell stem cell*, 4(5):427–439, 2009.
- [75] Lei Jiang, Yi Bao, Chun Luo, Guohan Hu, Chengguang Huang, Xuehua Ding, Kehua Sun, and Yicheng Lu. Knockdown of ubiquitin-conjugating enzyme e2c/ubch10 expression by rna interference inhibits glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis in vitro. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 136(2):211–217, 2010.
- [76] C. A. Joazeiro and A. M. Weissman. Ring finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, 102(5):549–552, 2000.
- [77] Charles D. Johnson, Aurora Esquela-Kerscher, Giovanni Stefani, Mike Byrom, Kevin Kelnar, Dmitriy Ovcharenko, Mike Wilson, Xiaowei Wang, Jeffrey Shelton, Jaclyn Shingara, Lena Chin, David Brown, and Frank J. Slack. The let-7 microrna represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer research*, 67(16):7713–7722, 2007.

- [78] Steven M. Johnson, Helge Grosshans, Jaclyn Shingara, Mike Byrom, Rich Jarvis, Angie Cheng, Emmanuel Labourier, Kristy L. Reinert, David Brown, and Frank J. Slack. Ras is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5):635–647, 2005.
- [79] J. Jonkers, R. Meuwissen, van der Gulden, H. H. Peterse, van der Valk, M, and A. Berns. Synergistic tumor suppressor activity of brca2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nature genetics*, 29(4):418–425, 2001.
- [80] Takashi Kanamoto, Koji Terada, Hideki Yoshikawa, and Takahisa Furukawa. Cloning and regulation of the vertebrate homologue of lin-41 that functions as a heterochronic gene in caenorhabditis elegans. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 235(4):1142–1149, 2006.
- [81] Valerie Kedinger, Stephanie Muller, and Hinrich Gronemeyer. Targeted expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand trail in skin protects mice against chemical carcinogenesis. *Molecular cancer*, 10:34, 2011.
- [82] Jack D. Keene, Jordan M. Komisarow, and Matthew B. Friedersdorf. Rip-chip: the isolation and identification of mrnas, micrnas and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nature protocols*, 1(1):302–307, 2006.
- [83] O. A. Kent and J. T. Mendell. A small piece in the cancer puzzle: micrnas as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene*, 25(46):6188–6196, 2006.
- [84] Kian Hoe Khoo, Khoo Kian Hoe, Chandra S. Verma, and David P. Lane. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(3):217–236, 2014.
- [85] K. Kinugawa, F. Hyodo, T. Matsuki, Y. Jo, Y. Furukawa, A. Ueki, and H. Tanaka. Establishment and characterization of a new human testicular seminoma cell line, jkt-1. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, 5(3):282–287, 1998.
- [86] Mari Kishibe, Yoshio Bando, Ryuji Terayama, Kazuhiko Namikawa, Hidetoshi Takahashi, Yoshio Hashimoto, Akemi Ishida-Yamamoto, Ying-Ping Jiang, Branka Mitrovic, Daniel Perez, Hajime Iizuka, and Shigetaka Yoshida. Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins. *The Journal of biological chemistry*, 282(8):5834–5841, 2007.
- [87] Wigard P. Kloosterman, Erno Wienholds, René F. Ketting, and Plasterk, Ronald H A. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic acids research*, 32(21):6284–6291, 2004.
- [88] Jens Kurreck. Rna interference: from basic research to therapeutic applications. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(8):1378–1398, 2009.

- [89] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- [90] Joseph J. Lancman, Nicholas C. Caruccio, Brian D. Harfe, Amy E. Pasquinelli, Jeffrey J. Schageman, Alexander Pertsemlidis, and John F. Fallon. Analysis of the regulation of lin-41 during chick and mouse limb development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 234(4):948–960, 2005.
- [91] Gaëlle Lapouge, Khalil Kass Youssef, Benoit Vokaer, Younes Achouri, Cindy Michaux, Panagiota A. Sotiropoulou, and Cédric Blanpain. Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18):7431–7436, 2011.
- [92] J. C. Lee, D. J. Field, and L. L. Lee. Effects of nocodazole on structures of calf brain tubulin. *Biochemistry*, 19(26):6209–6215, 1980.
- [93] Seo Hyun Lee, Sungchan Cho, M. Sun Kim, Kwangman Choi, Jae Youl Cho, Ho-Shin Gwak, Youn-Jae Kim, Heon Yoo, Seung-Hoon Lee, Jong Bae Park, and Jong Heon Kim. The ubiquitin ligase human trim71 regulates let-7 microRNA biogenesis via modulation of lin28b protein. *Biochimica et biophysica acta*, 1839(5):374–386, 2014.
- [94] Yoontae Lee, Chiyong Ahn, Jinju Han, Hyounjeong Choi, Jaekwang Kim, Jeongbin Yim, Junho Lee, Patrick Provost, Olof Rådmark, Sunyoung Kim, and V. Narry Kim. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956):415–419, 2003.
- [95] David E. Levy and J. E. Darnell. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(9):651–662, 2002.
- [96] N. S. Levy, S. Chung, H. Furneaux, and A. P. Levy. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HUR. *The Journal of biological chemistry*, 273(11):6417–6423, 1998.
- [97] Ulrike Lichti, Joanna Anders, and Stuart H. Yuspa. Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *Nature protocols*, 3(5):799–810, 2008.
- [98] Jules Lin, Duna A. Raoof, Zhuwen Wang, Mu-Yen Lin, Dafydd G. Thomas, Joel K. Greenson, Thomas J. Giordano, Mark B. Orringer, Andrew C. Chang, David G. Beer, and Lin Lin. Expression and effect of inhibition of the ubiquitin-conjugating enzyme E2C on esophageal adenocarcinoma. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 8(12):1062–1071, 2006.

- [99] You-Chin Lin, Li-Ching Hsieh, Ming-Wei Kuo, John Yu, Huan-Hsien Kuo, Wan-Lin Lo, Ruey-Jen Lin, Alice L. Yu, and Wen-Hsiung Li. Human trim71 and its nematode homologue are targets of let-7 microRNA and its zebrafish orthologue is essential for development. *Molecular biology and evolution*, 24(11):2525–2534, 2007.
- [100] Andreas Lingel and Elisa Izaurralde. Rnai: finding the elusive endonuclease. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(11):1675–1679, 2004.
- [101] Jidong Liu, Michelle A. Carmell, Fabiola V. Rivas, Carolyn G. Marsden, J. Michael Thomson, Ji-Joon Song, Scott M. Hammond, Leemor Joshua-Tor, and Gregory J. Hannon. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5689):1437–1441, 2004.
- [102] Jidong Liu, Marco Antonio Valencia-Sanchez, Gregory J. Hannon, and Roy Parker. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology*, 7(7):719–723, 2005.
- [103] Inga Loedige and Witold Filipowicz. Trim-nhl proteins take on miRNA regulation. *Cell*, 136(5):818–820, 2009.
- [104] Inga Loedige, Dimos Gaidatzis, Ragna Sack, Gunter Meister, and Witold Filipowicz. The mammalian trim-nhl protein trim71/lin-41 is a repressor of mRNA function. *Nucleic acids research*, 41(1):518–532, 2013.
- [105] Birgit Löer, Reinhard Bauer, Roland Bornheim, Jessica Grell, Elisabeth Kremmer, Waldemar Kolanus, and Michael Hoch. The nhl-domain protein wech is crucial for the integrin-cytoskeleton link. *Nature cell biology*, 10(4):422–428, 2008.
- [106] Everardo Macias, Dharanija Rao, and John DiGiovanni. Role of stat3 in skin carcinogenesis: insights gained from relevant mouse models. *Journal of skin cancer*, 2013:684050, 2013.
- [107] Nicola J. Maclaine and Ted R. Hupp. The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging*, 1(5):490–502, 2009.
- [108] Maller Schulman, Betsy R. Xianping Liang, Carlos Stahlhut, Casey DelConte, Giovanni Stefani, and Frank J. Slack. The let-7 microRNA target gene, mlin41/trim71 is required for mouse embryonic survival and neural tube closure. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(24):3935–3942, 2008.
- [109] Georg Malterer, Lars Dölken, and Jürgen Haas. The miRNA-targetome of kshv and ebv in human B-cells. *RNA biology*, 8(1):30–34, 2011.
- [110] Mari Kishibe. Kallikrein-related peptidase 8 (klk8): The structure and function in the epidermis. *J Dermatolog Clin Res*, 2(4):1030, 2014.

- [111] J. Martín-Caballero, J. M. Flores, P. García-Palencia, and M. Serrano. Tumor susceptibility of p21(waf1/cip1)-deficient mice. *Cancer research*, 61(16):6234–6238, 2001.
- [112] Javier Martinez and Thomas Tuschl. Risc is a 5' phosphomonoester-producing rna endonuclease. *Genes & development*, 18(9):975–980, 2004.
- [113] Ana Belén Martínez-Cruz, Mirentxu Santos, M. Fernanda Lara, Carmen Segrelles, Sergio Ruiz, Marta Moral, Corina Lorz, Ramón García-Escudero, and Jesús M. Paramio. Spontaneous squamous cell carcinoma induced by the somatic inactivation of retinoblastoma and trp53 tumor suppressors. *Cancer research*, 68(3):683–692, 2008.
- [114] Francesca Mascia, Mitchell Denning, Raphael Kopan, and Stuart H. Yuspa. The black box illuminated: signals and signaling. *The Journal of investigative dermatology*, 132(3 Pt 2):811–819, 2012.
- [115] Jody M. Mason and Katja M. Arndt. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 5(2):170–176, 2004.
- [116] Christian Matranga, Yukihide Tomari, Chanseok Shin, David P. Bartel, and Philip D. Zamore. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of sirna into ago2-containing rnai enzyme complexes. *Cell*, 123(4):607–620, 2005.
- [117] R. R. Meehan, J. D. Lewis, S. McKay, E. L. Kleiner, and A. P. Bird. Identification of a mammalian protein that binds specifically to dna containing methylated cpgs. *Cell*, 58(3):499–507, 1989.
- [118] Germana Meroni and Graciana Diez-Roux. Trim/rbcc, a novel class of 'single protein ring finger' e3 ubiquitin ligases. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 27(11):1147–1157, 2005.
- [119] G. F. Merrill. Cell synchronization. *Methods in cell biology*, 57:229–249, 1998.
- [120] M. Meselson and R. Yuan. Dna restriction enzyme from e. coli. *Nature*, 217(5134):1110–1114, 1968.
- [121] Ute M. Moll and Oleksi Petrenko. The mdm2-p53 interaction. *Molecular cancer research : MCR*, 1(14):1001–1008, 2003.
- [122] Rebecca J. Morris. A perspective on keratinocyte stem cells as targets for skin carcinogenesis. *Differentiation; research in biological diversity*, 72(8):381–386, 2004.
- [123] Cora Mund, Bodo Brueckner, and Frank Lyko. Reactivation of epigenetically silenced genes by dna methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 1(1):7–13, 2006.

- [124] C. Napoli, C. Lemieux, and R. Jorgensen. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant cell*, 2(4):279–289, 1990.
- [125] Ralph A. Neumüller, Joerg Betschinger, Anja Fischer, Natascha Bushati, Ingrid Poernbacher, Karl Mechtler, Stephen M. Cohen, and Juergen A. Knoblich. Mei-p26 regulates micrnas and cell growth in the drosophila ovarian stem cell lineage. *Nature*, 454(7201):241–245, 2008.
- [126] B. J. Nickoloff. The human progenitor cell antigen (cd34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in kaposi's sarcoma. *Archives of dermatology*, 127(4):523–529, 1991.
- [127] Brian J. Nickoloff. Cracking the cytokine code in psoriasis. *Nature medicine*, 13(3):242–244, 2007.
- [128] Nijhof, Joanne G W, Kristin M. Braun, Adam Giangreco, Carina van Pelt, Hiroshi Kawamoto, Richard L. Boyd, Rein Willemze, Mullenders, Leon H F, Fiona M. Watt, de Gruijl, Frank R, and Willem van Ewijk. The cell-surface marker mts24 identifies a novel population of follicular keratinocytes with characteristics of progenitor cells. *Development (Cambridge, England)*, 133(15):3027–3037, 2006.
- [129] Jonathan A. Nowak and Elaine Fuchs. Isolation and culture of epithelial stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 482:215–232, 2009.
- [130] P. C. Nowell. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, 194(4260):23–28, 1976.
- [131] Darren J. Obbard, Gordon, Karl H J, Amy H. Buck, and Francis M. Jiggins. The evolution of rnai as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1513):99–115, 2009.
- [132] Catherine Adell O'Brien, Antonija Kreso, and John E. Dick. Cancer stem cells in solid tumors: An overview. *Seminars in Radiation Oncology*, 19(2):71–77, 2009.
- [133] Fergal O'Farrell, Shiva Seyedoleslami Esfahani, Ylva Engström, and Per Kylsten. Regulation of the drosophila lin-41 homologue dappled by let-7 reveals conservation of a regulatory mechanism within the lin-41 subclade. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 237(1):196–208, 2008.
- [134] David M. Owens and Fiona M. Watt. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nature reviews. Cancer*, 3(6):444–451, 2003.

- [135] Amy E. Pasquinelli, Adam McCoy, Eva Jiménez, Emili Saló, Gary Ruvkun, Mark Q. Martindale, and Jaume Baguña. Expression of the 22 nucleotide let-7 heterochronic rna throughout the metazoa: a role in life history evolution? *Evolution & development*, 5(4):372–378, 2003.
- [136] J. Philipp, K. Vo, K. E. Gurley, K. Seidel, and C. J. Kemp. Tumor suppression by p27kip1 and p21cip1 during chemically induced skin carcinogenesis. *Oncogene*, 18(33):4689–4698, 1999.
- [137] E. Poblet, F. Jimenez-Acosta, and A. Rocamora. Qbend/10 (anti-cd34 antibody) in external root sheath cells and follicular tumors. *Journal of cutaneous pathology*, 21(3):224–228, 1994.
- [138] V. Raman, S. A. Martensen, D. Reisman, E. Evron, W. F. Odenwald, E. Jaffee, J. Marks, and S. Sukumar. Compromised *hoxa5* function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*, 405(6789):974–978, 2000.
- [139] B. J. Reinhart, F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz, and G. Ruvkun. The 21-nucleotide let-7 rna regulates developmental timing in *caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772):901–906, 2000.
- [140] A. Reymond, G. Meroni, A. Fantozzi, G. Merla, S. Cairo, L. Luzi, D. Riganelli, E. Zanaria, S. Messali, S. Cainarca, A. Guffanti, S. Minucci, P. G. Pelicci, and A. Ballabio. The tripartite motif family identifies cell compartments. *The EMBO journal*, 20(9):2140–2151, 2001.
- [141] Horace Rhee, Lisa Polak, and Elaine Fuchs. Lhx2 maintains stem cell character in hair follicles. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5782):1946–1949, 2006.
- [142] Lucia Ricci-Vitiani, Dario G. Lombardi, Emanuela Pilozzi, Mauro Biffoni, Matilde Todaro, Cesare Peschle, and Ruggero de Maria. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123):111–115, 2007.
- [143] David Rodenhiser and Mellissa Mann. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 174(3):341–348, 2006.
- [144] Panteleimon Rempoulas, Kailin R. Mesa, and Valentina Greco. Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate. *Nature*, 502(7472):513–518, 2013.
- [145] Sarah Roush and Frank J. Slack. The let-7 family of microRNAs. *Trends in cell biology*, 18(10):505–516, 2008.
- [146] Sabine Rüdell, Andrew Flatley, Lasse Weinmann, Elisabeth Kremmer, and Gunter Meister. A multifunctional human argonaute2-specific monoclonal antibody. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(6):1244–1253, 2008.

- [147] Agnieszka Rybak, Heiko Fuchs, Kamyar Hadian, Lena Smirnova, Ellery A. Wulczyn, Geert Michel, Robert Nitsch, Daniel Krappmann, and F. Gregory Wulczyn. The let-7 target gene mouse *lin-41* is a stem cell specific e3 ubiquitin ligase for the mirna pathway protein *ago2*. *Nature cell biology*, 11(12):1411–1420, 2009.
- [148] Valerie B. Sampson, Nancy H. Rong, Jian Han, Qunying Yang, Virginie Aris, Patricia Soteropoulos, Nicholas J. Petrelli, Stephen P. Dunn, and Leslie J. Krueger. MicroRNA let-7a down-regulates *myc* and reverts *myc*-induced growth in burkitt lymphoma cells. *Cancer research*, 67(20):9762–9770, 2007.
- [149] Joshua D. Schnell and Linda Hicke. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *The Journal of biological chemistry*, 278(38):35857–35860, 2003.
- [150] Schulman, Betsy R Maller, Aurora Esquela-Kerscher, and Frank J. Slack. Reciprocal expression of *lin-41* and the micrnas *let-7* and *mir-125* during mouse embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 234(4):1046–1054, 2005.
- [151] Jens C. Schwamborn, Eugene Berezikov, and Juergen A. Knoblich. The trim-nhl protein *trim32* activates micrnas and prevents self-renewal in mouse neural progenitors. *Cell*, 136(5):913–925, 2009.
- [152] Nuran Bektas Serce, Andreas Boesl, Irina Klaman, Sonja von Serényi, Erik Noetzel, Michael F. Press, Arno Dimmler, Arndt Hartmann, Jalid Sehoul, Ruth Knuechel, Matthias W. Beckmann, Peter A. Fasching, and Edgar Dahl. Overexpression of *serbp1* (plasminogen activator inhibitor 1 rna binding protein) in human breast cancer is correlated with favourable prognosis. *BMC cancer*, 12:597, 2012.
- [153] S. Shell, S.-M. Park, A. R. Radjabi, R. Schickel, E. O. Kistner, D. A. Jewell, C. Feig, E. Lengyel, and M. E. Peter. *Let-7* expression defines two differentiation stages of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27):11400–11405, 2007.
- [154] Zhihua Shen, Xiaofan Jiang, Chao Zeng, Shaojiang Zheng, Botao Luo, Yumei Zeng, Ranran Ding, Hanguo Jiang, Qiyi He, Junli Guo, and Wei Jie. High expression of ubiquitin-conjugating enzyme 2c (*ube2c*) correlates with nasopharyngeal carcinoma progression. *BMC Cancer*, 13(1):192, 2013.
- [155] F. J. Slack, M. Basson, Z. Liu, V. Ambros, H. R. Horvitz, and G. Ruvkun. The *lin-41* *rbcc* gene acts in the *c. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory rna and the *lin-29* transcription factor. *Molecular cell*, 5(4):659–669, 2000.
- [156] F. J. Slack and G. Ruvkun. A novel repeat domain that is often associated with ring finger and b-box motifs. *Trends in biochemical sciences*, 23(12):474–475, 1998.

- [157] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1):76–85, 1985.
- [158] B. D. Strahl and C. D. Allis. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765):41–45, 2000.
- [159] Matthew K. Summers, Borlan Pan, Kiran Mukhyala, and Peter K. Jackson. The unique n terminus of the ubch10 e2 enzyme controls the threshold for apc activation and enhances checkpoint regulation of the apc. *Molecular cell*, 31(4):544–556, 2008.
- [160] Satoshi Takagi, Siro Simizu, and Hiroyuki Osada. Reck negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. *Cancer research*, 69(4):1502–1508, 2009.
- [161] Yasuo Takahashi, Yukimoto Ishii, Yayoi Nishida, Masahito Ikarashi, Toshihito Nagata, Takeshi Nakamura, Shunji Yamamori, and Satoshi Asai. Detection of aberrations of ubiquitin-conjugating enzyme e2c gene (ube2c) in advanced colon cancer with liver metastases by dna microarray and two-color fish. *Cancer genetics and cytogenetics*, 168(1):30–35, 2006.
- [162] Junichi Takamizawa, Hiroyuki Konishi, Kiyoshi Yanagisawa, Shuta Tomida, Hiro-taka Osada, Hideki Endoh, Tomoko Harano, Yasushi Yatabe, Masato Nagino, Yuji Nimura, Tetsuya Mitsudomi, and Takashi Takahashi. Reduced expression of the let-7 micrnas in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer research*, 64(11):3753–3756, 2004.
- [163] Tomonori Takekoshi, Xuesong Wu, Hiroshi Mitsui, Yayoi Tada, Mandy C. Kao, Shinichi Sato, Michael B. Dwinell, and Sam T. Hwang. Cxcr4 negatively regulates keratinocyte proliferation in il-23-mediated psoriasiform dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, 133(11):2530–2537, 2013.
- [164] G. Taylor, M. S. Lehrer, P. J. Jensen, T. T. Sun, and R. M. Lavker. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*, 102(4):451–461, 2000.
- [165] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9):4350–4354, 1979.
- [166] Carol S. Trempus, Rebecca J. Morris, Matthew Ehinger, Amy Elmore, Carl D. Bortner, Mayumi Ito, George Cotsarelis, Nijhof, Joanne G W, John Peckham, Norris Flagler, Grace Kissling, Margaret M. Humble, Leon C. King, Linda D. Adams, Dhimant Desai, Shantu Amin, and Raymond W. Tennant. Cd34 expression by hair follicle stem cells is required for skin tumor development in mice. *Cancer research*, 67(9):4173–4181, 2007.

- [167] J. Turkson and R. Jove. Stat proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*, 19(56):6613–6626, 2000.
- [168] van Ree, Janine H, Karthik B. Jeganathan, Liviu Malureanu, and van Deursen, Jan M. Overexpression of the e2 ubiquitin-conjugating enzyme ubch10 causes chromosome missegregation and tumor formation. *The Journal of cell biology*, 188(1):83–100, 2010.
- [169] V. Vasioukhin, L. Degenstein, B. Wise, and E. Fuchs. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15):8551–8556, 1999.
- [170] Monica C. Vella, Eun-Young Choi, Shin-Yi Lin, Kristy Reinert, and Frank J. Slack. The *c. elegans* microrna let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the *lin-41* 3'utr. *Genes & development*, 18(2):132–137, 2004.
- [171] Angelo L. Vescovi, Rossella Galli, and Brent A. Reynolds. Brain tumour stem cells. *Nature reviews. Cancer*, 6(6):425–436, 2006.
- [172] Vidal, Valerie P I, Marie-Christine Chaboissier, Susanne Lützkendorf, George Cotsarelis, Pleasantine Mill, Chi-Chung Hui, Nicolas Ortonne, Jean-Paul Ortonne, and Andreas Schedl. Sox9 is essential for outer root sheath differentiation and the formation of the hair stem cell compartment. *Current biology : CB*, 15(15):1340–1351, 2005.
- [173] Srinivas R. Viswanathan and George Q. Daley. Lin28: A microrna regulator with a macro role. *Cell*, 140(4):445–449, 2010.
- [174] Srinivas R. Viswanathan, George Q. Daley, and Richard I. Gregory. Selective blockade of microrna processing by lin28. *Science (New York, N.Y.)*, 320(5872):97–100, 2008.
- [175] Gaofeng Wang, van der Walt, Joelle M, Gregory Mayhew, Yi-Ju Li, Stephan Züchner, William K. Scott, Eden R. Martin, and Jeffery M. Vance. Variation in the mirna-433 binding site of *fgf20* confers risk for parkinson disease by overexpression of alpha-synuclein. *American journal of human genetics*, 82(2):283–289, 2008.
- [176] W. Wang, H. Furneaux, H. Cheng, M. C. Caldwell, D. Hutter, Y. Liu, N. Holbrook, and M. Gorospe. Hur regulates p21 mrna stabilization by uv light. *Molecular and cellular biology*, 20(3):760–769, 2000.
- [177] W.-X. Wang, B. W. Rajeev, A. J. Stromberg, N. Ren, G. Tang, Q. Huang, I. Rigoutsos, and P. T. Nelson. The expression of microrna mir-107 decreases early in alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of -site

- amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *Journal of Neuroscience*, 28(5):1213–1223, 2008.
- [178] Yangming Wang, Scott Baskerville, Archana Shenoy, Joshua E. Babiarz, Lauren Baehner, and Robert Blelloch. Embryonic stem cell-specific micrnas regulate the g1-s transition and promote rapid proliferation. *Nature genetics*, 40(12):1478–1483, 2008.
- [179] Zhong Wang, Mark Gerstein, and Michael Snyder. Rna-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1):57–63, 2009.
- [180] F. Watt and P. L. Molloy. Cytosine methylation prevents binding to dna of a hela cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & development*, 2(9):1136–1143, 1988.
- [181] Katherine E. Wickliffe, Adam Williamson, Hermann-Josef Meyer, Aileen Kelly, and Michael Rape. K11-linked ubiquitin chains as novel regulators of cell division. *Trends in cell biology*, 21(11):656–663, 2011.
- [182] Brian T. Wilhelm and Josette-Renée Landry. Rna-seq-quantitative measurement of expression through massively parallel rna-sequencing. *Methods (San Diego, Calif.)*, 48(3):249–257, 2009.
- [183] Adam Williamson, Katherine E. Wickliffe, Barbara G. Mellone, Ling Song, Gary H. Karpen, and Michael Rape. Identification of a physiological e2 module for the human anaphase-promoting complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43):18213–18218, 2009.
- [184] Julia Winter, Stephanie Jung, Sarina Keller, Richard I. Gregory, and Sven Diedrichs. Many roads to maturity: microrna biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11(3):228–234, 2009.
- [185] A. P. Wolffe and M. A. Matzke. Epigenetics: regulation through repression. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5439):481–486, 1999.
- [186] Kathleen A. Worringer, Tim A. Rand, Yohei Hayashi, Salma Sami, Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Megumi Narita, Deepak Srivastava, and Shinya Yamanaka. The let-7/lin-41 pathway regulates reprogramming to human induced pluripotent stem cells by controlling expression of prodifferentiation genes. *Cell stem cell*, 14(1):40–52, 2014.
- [187] F. Gregory Wulczyn, Elisa Cuevas, Eleonora Franzoni, and Agnieszka Rybak. mirnas need a trim: Regulation of mirna activity by trim-nhl proteins. *Advances in experimental medicine and biology*, 700:85–105, 2011.

- [188] Rui Yi, Yi Qin, Ian G. Macara, and Bryan R. Cullen. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-miRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24):3011–3016, 2003.
- [189] Khalil Kass Youssef, Alexandra van Keymeulen, G  elle Lapouge, Benjamin Beck, Cindy Michaux, Younes Achouri, Panagiota A. Sotiropoulou, and Cédric Blanpain. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nature cell biology*, 12(3):299–305, 2010.
- [190] Z.-K. Yu, Gervais, J. L. M., and H. Zhang. Human cul-1 associates with the skp1/skp2 complex and regulates p21cip1/waf1 and cyclin d proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19):11324–11329, 1998.
- [191] Baohong Zhang, Xiaoping Pan, George P. Cobb, and Todd A. Anderson. miRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1):1–12, 2007.
- [192] Jian-Ping Zhang, Hong-Yan Qin, Li Wang, Liang Liang, Xing-Cheng Zhao, Wei-Xia Cai, Ya-Ning Wei, Chun-Mei Wang, and Hua Han. Overexpression of notch ligand dll1 in b16 melanoma cells leads to reduced tumor growth due to attenuated vascularization. *Cancer letters*, 309(2):220–227, 2011.
- [193] G. W. Zieve, D. Turnbull, J. M. Mullins, and J. R. McIntosh. Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor nocodazole. nocodazole accumulated mitotic cells. *Experimental cell research*, 126(2):397–405, 1980.
- [194] Yan Zou, Hui Chiu, Anna Zinovyeva, Victor Ambros, Chiou-Fen Chuang, and Chieh Chang. Developmental decline in neuronal regeneration by the progressive change of two intrinsic timers. *Science (New York, N.Y.)*, 340(6130):372–376, 2013.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf verschiedenste Art bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle ist hier Herr Prof. Dr. Waldemar Kolanus zu nennen, der es mir durch die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe ermöglicht hat, an diesem interessanten Projekt zu arbeiten. Durch seine sehr gute wissenschaftliche Anleitung und permanente Unterstützung hat er den Fortschritt dieser Arbeit entscheidend vorangetrieben.

Herrn Prof. Dr. Michael Hoch danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Ebenso danke ich Frau PD Dr. Heike Weighardt und Herrn Prof. Dr. Anton Bovier für den Beisitz meiner Prüfungskommission als fachnahe Gutachterin und als fachfremder Gutachter.

Ich bedanke mich recht herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kolanus für die freundliche Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft.

Danke an das "Trim-Team" bestehend aus Sibylle Mitschka, Dr. Tobias Goller, Lucia Torres und Dr. Hideomi Tanaka für die vielen guten Ideen und Ratschläge, die zu einer erfolgreichen Zusammenarbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Thomas Quast und Henriette Peter für die zeitlich sehr aufwändige Keratinozytenkultur und das Durchführen der Proliferationsassays.

Michael Rieck, Felix Eppler, Felix Tolksdorf und Sibylle Mitschka danke ich für die vielen gemeinsamen Mittags- und Kaffeepausen und die schöne Zeit während meiner Doktorarbeit.

Bei Dr. Bettina Jux möchte ich mich dafür bedanken, dass sie durch ihre fachliche Kompetenz viele gute Denkanstöße gegeben und sich stets die Zeit für Diskussionen genommen hat.

Recht herzlichen Dank an Christa Mandel für die Hilfe bei der Mauspräparation, das Gießen zahlreicher Gele, das Ansetzen von Puffern und die vielen aufmunternden Gespräche. Des Weiteren möchte ich mich bei Susanne Weese für die Genotypisierung meiner Mäuse bedanken. Bei Barbara Reichwein bedanke ich mich für ihr Organisationstalent und das Aushandeln der besten Preise. Vielen Dank an Gertrud Mierzwa und Katharina Klein für das Verbreiten von guter Laune und eure Arbeit in der Spülküche.

Für sonstige Hilfe und Unterstützung möchte ich mich bei Dr. Johanna Kolanus, Katrin Heße, Helga Ueing, Anarit Namislo, Dr. Eloho Etemire, Dr. Donald Guu und Dr. Dieter Sedlmeier bedanken.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thomas Tüting möchte

ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der histologischen Färbungen bedanken. Ganz speziell danke ich Tobias Bald für seine Expertise und Anleitung beim Durchführen der *in vivo* Experimente.

Herrn Prof. Dr. Joachim Schultze und seinen Mitarbeitern Dr. Marc Beyer, Dr. Thomas Ulas und Michael Kraut danke ich für die Durchführung und Auswertung des Microarrays und der RNA-Sequenzierung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Linda, Kerstin, Janna und Sascha für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Vielen Dank an all meine Freunde für die wunderbare Zeit außerhalb des Labors mit vielen schönen Erlebnissen und gemeinsamen Unternehmungen.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinem Freund Sascha bedanken. Vielen Dank für eure unermüdliche Unterstützung und stetige Motivation. Es ist schön zu wissen, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

Anhang

Liste der IP spezifisch herunterregulierten Gene

Gen	Mean GFP_Ago2	Mean GFP_BrdU	Mean GFP_total	Mean T71_Ago2	Mean T71_BrdU	Mean T71_total	Fold-Change T71_Ago2 vs. GFP Ago2
SERBP1	10,1686	8,61105	8,29904	7,25375	6,87607	6,85901	-7,54163
HOXA5	11,768	10,4321	10,4956	10,1981	9,68462	9,63315	-2,96884
MRPL20	9,03943	7,11597	7,13411	7,59601	6,69899	7,13312	-2,71964
SGK1	9,01291	7,26964	7,56578	7,73265	6,7501	7,06873	-2,42882
GOLSYN	9,08016	8,04527	7,65024	7,863	7,16734	7,4066	-2,32487
LOC10013360	8,78897	7,22941	7,32194	7,58057	6,72539	7,19767	-2,31082
HOXD1	8,68276	7,52598	7,37771	7,52274	6,97611	7,13838	-2,2346
HOXA9	11,4415	10,3153	10,1293	10,3738	9,92259	9,68209	-2,09611
SC4MOL	7,89576	6,52819	7,33024	6,92953	6,24525	7,39392	-1,95373
ANKRA2	9,30215	7,98732	7,73845	8,34821	7,84189	7,67883	-1,93716
KHDC1	8,8608	7,75888	7,93766	7,90958	7,2606	7,5891	-1,93351
CABYR	9,30534	7,9829	7,99271	8,39381	7,73709	7,86299	-1,88103
FBXO3	8,73497	7,42988	7,28857	7,83327	7,23592	7,35639	-1,86827
LOC729768	10,1665	8,37261	9,07154	9,28801	8,36617	8,8711	-1,83843
ZIC2	10,561	9,3769	9,41301	9,69121	8,70646	9,1429	-1,82747
HOXB8	8,73385	7,66009	7,61779	7,8682	7,57217	7,20309	-1,82216
LOC653071	7,84155	6,82726	7,06694	7,00239	6,56551	7,00814	-1,78901
TRIB1	9,47396	8,40195	7,98965	8,63637	8,05306	7,6746	-1,78706
FTHL16	11,4422	10,3769	10,9891	10,6541	10,1113	11,0422	-1,72674
POP5	10,0504	8,90108	9,18867	9,28678	8,66584	8,91463	-1,69775
LIPT1	8,58767	7,25573	7,31636	7,84853	7,00558	7,33143	-1,66918
MARCH3	8,93776	7,83272	8,03425	8,23407	7,59326	7,7717	-1,62866
TMEM177	9,86224	8,58461	8,59709	9,17078	8,37721	8,68936	-1,61491
CBY1	10,8938	9,7078	9,13305	10,215	9,28374	8,98821	-1,60084
ZNF700	9,38792	8,11737	7,60188	8,71142	8,00731	7,66099	-1,59827
HAUS8	8,99587	7,59503	7,45659	8,33767	7,44508	7,49217	-1,57812
ZNF823	8,91519	7,49621	7,46527	8,26035	7,40701	7,46884	-1,57444
HAUS8	9,15163	7,76065	7,62955	8,5053	7,55923	7,51824	-1,56518
RGS2	9,99192	8,75567	8,56207	9,35168	8,48202	8,28952	-1,55859
GNAI2	9,17827	7,98901	8,24038	8,54666	7,88781	7,89903	-1,54929
YRDC	11,0764	9,80455	9,04389	10,4485	9,8344	9,04953	-1,54538
MARCH3	8,93217	7,8313	7,99182	8,31892	7,56965	7,7372	-1,5297
IL10RB	10,0932	9,02288	9,91392	9,50347	8,72683	9,20015	-1,50496

Liste der IP spezifisch hochregulierten Gene

Gen	Mean GFP_Ago2	Mean GFP_BrdU	Mean GFP_total	Mean T71_Ago2	Mean T71_BrdU	Mean T71_total	Fold-Change T71_Ago2 vs. T71 BrdU
PRSS8	7,54502	6,66895	7,00963	9,60004	7,58867	7,37357	4,03165
DLL1	8,61863	7,76685	7,93352	9,61861	8,05159	7,96253	2,96294
ITGA5	9,08828	8,19264	8,52477	10,3708	8,8286	8,45421	2,91247
POLQ	8,9177	8,4108	8,05235	10,4416	8,90883	8,25778	2,8935
GCC1	8,65644	8,21354	7,80749	9,37041	8,05361	7,71509	2,49113
PKD2	8,24309	7,63844	7,98244	9,43875	8,14515	8,37648	2,45139
EID2B	8,26645	7,28805	7,16756	8,62551	7,35645	7,32843	2,41005
ZDHHC1	8,50878	7,63739	8,05187	9,13952	7,90239	8,00987	2,35729
TNFSF12	7,08518	6,50535	6,65041	7,94214	6,70787	6,82449	2,35262
C2CD2	9,09688	8,51938	8,6459	10,1706	8,9458	8,80144	2,33716
ST6GALNAC6	8,61795	7,66732	7,74509	9,23299	8,01479	7,83899	2,32656
SLC29A3	7,45776	6,67279	6,92761	7,84473	6,65549	7,01463	2,28033
ABCG4	7,54077	6,91743	6,84277	8,16127	6,97251	6,93807	2,27957
AARS	11,5639	10,8434	10,1246	11,974	10,7897	10,0593	2,27259
RECK	7,52397	6,70945	6,82821	8,20878	7,02599	6,94061	2,27016
LOC730107	9,91261	9,03094	8,97211	9,90632	8,72497	9,05944	2,26789
ABCC5	8,07203	7,48389	7,55727	8,75385	7,5761	7,74258	2,26223
FNDC3B	8,56428	7,88757	7,70181	8,85563	7,68087	7,52989	2,25756
RPS14	12,7145	11,9527	12,4527	13,1135	11,9865	12,2517	2,18395
SPRED1	8,96515	8,30454	8,09996	9,09399	7,98325	7,82817	2,15956
RFWD2	9,01268	8,46478	8,53932	9,47163	8,36974	8,43219	2,14636
FNDC3B	8,52664	7,96219	7,82526	8,88877	7,79013	7,54248	2,14153
GCSH	9,34354	8,34726	8,51328	9,13896	8,0563	8,75322	2,11793
CYP2R1	8,49965	7,51784	7,50548	8,71046	7,63042	7,5418	2,1141
RFWD2	9,87516	9,2394	9,24109	10,2037	9,12438	9,218	2,11297
SEMA4B	7,86345	7,06562	7,42172	8,68483	7,62509	7,66014	2,08455
UBE2C	10,6237	9,64782	9,78451	11,3835	10,3238	10,5463	2,08455
BCL3	7,72025	6,84777	6,92893	8,16544	7,11203	7,02629	2,07544
DHRS7B	9,17844	8,38745	8,79325	9,59689	8,54762	8,66242	2,06948
LARGE	8,61357	8,46152	8,67031	9,43903	8,3935	8,63442	2,06412
C19orf22	9,0905	8,15357	8,53401	9,41169	8,37336	8,3351	2,05385
ZNF136	8,40079	7,41564	7,2011	8,65689	7,61857	7,17258	2,05383
MYCN	7,63314	6,91933	6,7736	8,16187	7,12554	7,18293	2,05101
BTN3A1	7,68475	6,84386	7,03595	8,08649	7,06746	7,15424	2,02656
PNPLA6	8,79411	7,93455	8,15283	9,65927	8,64731	8,32477	2,01666
ATP5J2	11,8868	11,019	11,477	11,8811	10,8698	11,2568	2,01571
MOV10	9,035	8,13723	7,75247	9,05344	8,04819	7,61442	2,0073
PPP1CC	12,3818	11,4841	11,1687	12,3973	11,3924	11,4136	2,00682

Liste der regulierten Gene in epidermalen Zellen nach TPA-Behandlung

Gen	Mean K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} TPA	Mean K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl}	Mean Trim71 ^{fl/fl} TPA	Mean Trim71 ^{fl/fl}	Fold-Change K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} TPA vs. Trim71 ^{fl/fl} TPA
Ccl9	27,3387	7,75607	1,07824	1,05216	25,35493026
Il1rl1	42,2953	21,5754	1,70127	2,82583	24,86101559
Lepr	19,985	37,1193	1,16915	1	17,09361502
Lbp	15,7042	8,23213	1	1,59725	15,7042
Lilrb4	135,965	32,1845	9,44629	2,87659	14,39348146
Mrc1	90,1298	27,3729	6,63773	1,55604	13,57840708
Tnfsf14	15,6684	2,33999	1,18025	1,7829	13,27549248
Ifi204	31,2038	13,5371	2,50688	1,45276	12,44726513
Gpx3	44,3772	57,6238	3,70159	3,301	11,98868594
Gdf15	13,4418	4,75156	1,15061	1,73372	11,68232503
Il22	16,5722	3,40488	1,47834	1	11,21000582
Ccr6	10,7995	4,3965	1	1,08215	10,7995
Apold1	13,9748	6,54009	1,31505	1,1157	10,62682027
Slc41a2	77,3249	62,0698	7,71817	38,261	10,01855362
Adam11	16,6737	1,40173	1,66475	1,35229	10,0157381
Il12rb1	19,3423	5,97842	1,97376	2,35552	9,799722357
Fgl2	218,505	152,16	22,998	47,0518	9,501043569
Cd33	17,9707	4,89056	1,90956	1	9,410911414
Lef1	22,7079	36,141	2,48919	8,70747	9,122606149
Frem1	17,7793	20,2397	2,00901	2,70807	8,849781733
Slc12a1	10,2778	6,46153	1,18151	1,13668	8,698868397
Cd163	18,4462	6,4296	2,13437	1	8,642456556
Slc28a2	10,2378	12,9849	1,22219	3,43638	8,376602656
Osm	93,6359	20,2541	11,7848	1,23313	7,945480619
Il12b	18,7248	1	2,37695	1,49635	7,877658344
C1qc	71,399	21,112	9,12799	2,92685	7,821984906
Twist1	13,2528	12,0437	1,70075	1	7,792326915
Ccr5	25,9896	6,1765	3,35365	1	7,749645908
Foxp3	20,5129	9,71522	2,65165	2,58784	7,735900288
Cd300a	30,9076	18,3899	4,47206	6,12246	6,911266843
Zfp521	11,9864	7,12814	1,79344	1,5957	6,683468641
Nkg7	79,0391	84,872	12,4153	52,0555	6,366265817
Xkr9	12,0434	5,60649	1,91435	2,49825	6,291117089
Cd48	31,4951	13,9802	5,0867	3,48598	6,191656673
Slamf1	13,5771	2,70347	2,20189	1	6,16611184
Gpr65	51,5708	14,1039	8,54557	2,99777	6,034799317
Jam2	12,3381	8,83571	2,05332	2,37937	6,008853954
Gpr114	68,6999	29,6674	11,8964	3,89065	5,774847853
Snai3	47,9269	14,8253	8,31773	2,0118	5,7620168
Epsti1	24,0902	9,90677	4,26418	2,71626	5,649433185
Dkk2	24,6122	32,01	4,48324	1,46278	5,489824323
Ccr2	54,4864	13,4695	10,2486	1,71186	5,316472494

Gen	Mean K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} TPA	Mean K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl}	Mean Trim71 ^{fl/fl} TPA	Mean Trim71 ^{fl/fl}	Fold-Change K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} TPA vs. Trim71 ^{fl/fl} TPA
Slc39a4	11,3092	10,6262	2,23163	3,05284	5,067685952
Slamf7	71,9859	52,5996	14,5798	8,4703	4,937372255
Tnfsf12	13,215	8,35988	2,68928	4,31336	4,913954664
Ccl17	19,6695	23,4555	4,01641	1	4,897283893
Ccr7	910,776	263,256	188,675	25,7035	4,827221412
Fstl1	264,724	215,161	55,4202	59,2695	4,776669878
Pdcd1lg2	26,663	4,34603	5,94423	2,65906	4,4855263
Ltc4s	39,0564	38,1415	8,73603	15,5785	4,470726405
Il10ra	110,024	102,821	24,6532	43,9586	4,462868918
C1qa	169,575	53,0297	38,4166	35,8247	4,414107443
Fli1	17,5659	9,51653	4,02842	2,81549	4,360493692
Ptgfr	5,71393	10,4253	1,32311	1,00868	4,318560059
Mmp12	139,615	84,6926	32,7947	17,2708	4,257242786
Lgi3	12,8239	16,7218	3,01915	6,07304	4,247519997
Cd28	31,4427	12,9855	7,40283	2,9961	4,247389174
Icam2	22,3756	3,14359	5,43481	1,71598	4,11708965
Tlr4	14,3446	9,21835	3,49057	3,90942	4,109529389
Ilkzf3	92,5267	33,4284	22,6838	4,10755	4,078977067
Pax3	62,7626	50,1148	15,5865	3,94233	4,026728258
Tmem26	25,6028	17,842	6,57241	6,52255	3,895496477
Itgal	125,478	68,5721	32,2772	45,266	3,887511928
Cxcr4	361,406	185,742	94,8233	100,196	3,811362819
Paqr9	10,8887	2,86466	2,89811	1,59145	3,757172778
Atp1a2	28,9164	19,4741	7,69633	9,39928	3,757167377
Tmem171	11,3642	3,95785	3,14547	1,6961	3,612878203
Ltb	25,1827	12,3238	6,9875	2,09151	3,603964222
Lta	10,5543	5,89621	2,94324	1,13299	3,5859461
Plxnc1	217,975	219,409	61,6343	35,7643	3,536585959
Emr1	65,2401	72,7584	18,5248	13,1766	3,521770815
Ilkzf1	124,656	105,042	37,0512	40,6861	3,364425444
Evi2b	37,0482	19,0886	11,261	1,4948	3,289956487
Slc8a1	46,144	23,5188	14,0873	11,7691	3,275574454
Bex1	14,3498	14,1129	4,40297	1,74538	3,259118277
Glipr1	36,5133	11,4824	11,3064	1,91916	3,229436425
Traf3ip3	13,5833	5,14624	4,24154	1,975	3,202445338
Tox	31,1491	22,3865	10,1861	5,30609	3,058000609
Tyrobp	148,479	93,7538	50,528	64,7591	2,938548923
Cd80	73,7542	17,2759	25,1684	2,63306	2,930428633
Il21r	69,1044	20,1917	23,6973	6,3469	2,916129686
Ptprc	379,406	275,196	130,959	113,724	2,897135745
Spn	69,3241	41,6827	23,9964	17,8976	2,888937507
Klrk1	83,5981	75,6265	29,9558	35,1614	2,790714987
Atoh8	54,497	22,6035	20,1053	4,39125	2,710578803
Nyx	9,8846	12,5963	3,67502	9,9359	2,689672437
P2rx5	62,9754	26,3389	23,8688	17,2879	2,638398244
Flt3	32,128	9,17722	12,4135	1,52823	2,588149998

Anhang

Gen	Mean K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} TPA	Mean K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl}	Mean Trim71 ^{fl/fl} TPA	Mean Trim71 ^{fl/fl}	Fold-Change K14-Cre/Trim71 ^{fl/fl} TPA vs. Trim71 ^{fl/fl} TPA
Il23r	16,4964	13,2006	6,44244	1,83525	2,560582636
Panx3	592,853	226,493	235,5	135,67	2,517422505
Itgax	187,566	137,236	76,4164	28,6725	2,454525468
Cxcl12	549,239	1260,66	225,135	1021,06	2,439598463
Sema6d	251,237	147,15	103,366	62,2833	2,430557437
Gsg1l	73,847	18,586	30,9207	4,64381	2,388270641
Cd69	41,8674	17,0882	18,0553	6,00905	2,318842667
Prelp	98,5245	33,4456	42,6914	6,54785	2,307830148
Ramp1	73,9946	117,236	32,2488	128,52	2,294491578
Cd72	120,254	77,0832	52,5772	36,291	2,287189124
Clstn3	436,812	69,2026	192,552	83,768	2,268540446
Scrg1	26,6991	14,5591	11,8097	4,81947	2,260777158
Itgb7	159,403	76,6358	70,8295	37,0093	2,250517087
Vav1	123,857	46,6329	55,9067	33,0829	2,215423196
Trpm6	49,3502	50,1815	22,3896	21,7907	2,204157287
Adam23	45,4216	16,2235	20,6857	2,6061	2,195797097
Msx1	20,6424	17,1433	9,42406	11,1759	2,190393525
Tlr2	120,824	105,146	55,9117	40,1757	2,160978829
Fxyd4	45,3837	12,4551	21,0698	3,66106	2,153969188
Bche	107,381	62,5001	51,0936	29,3378	2,101652653
Il16	35,6284	20,9247	17,0237	6,21267	2,092870528
Itgb2	103,032	51,4693	49,7442	18,7249	2,071236446
Sv2a	15,3161	11,7899	7,49606	9,34382	2,043220038
Tmem45b	944,199	301,599	469,04	170,023	2,013045796