

Untersuchungen zur posttranskriptionalen Regulation von MRTF-A während der Skelettmuskeldifferenzierung

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Falk Pohl

geb. am 08.03.1988 in Halle

1. Gutachter: Prof. Dr. Guido Posern
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier
3. Gutachter: Prof. Dr. Gunter Meister

Tag der Promotionsverteidigung: 28.11.2016

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	miRISC	microRISC
ACTA1	Skelettmuskelaktin	miRNA/miR	microRNA
ACTA2	Glattmuskelaktin	miTRAP	<i>miRNA trapping by RNA in vitro affinity purification</i>
Abb.	Abbildung	MRTF	<i>myocardin-related transcription factor</i>
AS	Aminosäure	MRTF-A	MRTF Isoform A
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	MRTF-B	MRTF Isoform B
bp	Basenpaare	MSC	<i>multiple Cloning Site</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	MRF4	<i>muscle-specific regulatory factor 4</i>
C	Cytosin	MYF5	<i>myogenic factor 5</i>
CArG-Box	SRF-Bindestelle (CC(A/T) ₆ GG)	MYOD	<i>myoblast determination protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	n.d.	nicht detektierbar
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	nm	Nanometer
CHX	Cycloheximid	nt	Nukleotide
CMV	Cytomegalievirus	oligo-dT	oligo-Desoxythymidin
CPM	<i>counts per million</i>	PAX3	<i>paired box3</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>	PAX7	<i>paired box7</i>
dest.	destilliert	pri-miRNA	Primär-miRNA
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole hydrochloride</i>	pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	qRT-PCR	<i>quantitative Real-Time PCR</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>R. Norvegicus</i>	<i>Rattus Norvegicus</i>
DNase	Desoxyribonuklease	RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat	RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
E	<i>embryonic day</i> (Tag der embryonalen Entwicklung)	RPEL	Aktinbindedomäne mit der Sequenz RPxxxEL
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RNA	Ribonukleinsäure
ES-Zellen	embryonale Stammzellen	RNase	Ribonuklease
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i>	RNPs	Ribonukleoproteine
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
G	Guanin	RPS29	<i>ribosomal protein S29</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	RT	Raumtemperatur
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>H. Sapiens</i>	<i>Homo Sapiens</i>	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
HA-Tag	Hämagglutinin-Markierung	SM22	<i>transgelin</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase	SOMA	<i>single oligonucleotide mutagenesis and cloning approach</i>
kb	Kilobase	SRE	<i>serum response element</i>
kDa	Kilodalton	SRF	<i>serum response factor</i>
Kontrl.	Kontrolle	T	Thymin
LB	<i>Lysogeny Broth</i>	TAD	Transaktivierungsdomäne
<i>M. Musculus</i>	<i>Mus Musculus</i>	TCF	<i>ternary complex factor</i>
Mio.	Million	tRNA	<i>transferRNA</i>
MHC	<i>myosin heavy chain</i>	ü.N.	über Nacht
min	Minute	UTR	untranslatierte Bereich
miRNA	<i>microRNA</i>	3'UTR	3' untranslatierte Region
MLC	<i>myosin light chain</i>	xg	x-fache Erdbeschleunigung
mRNA	<i>messengerRNA</i>	YWHAZ	<i>14-3-3 protein zeta/delta</i>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Muskeldifferenzierung	1
1.2. miRNAs	3
1.3. SRF	6
1.4. MRTFs	9
1.5. Zielstellung	13
2. Materialien	15
2.1. Laborgeräte	15
2.2. Verbrauchsmaterialien	16
2.3. Chemikalien und Reagenzien	17
2.4. Enzyme, fertige Lösungen und Reaktionskits	18
2.5. Medien und Puffer	20
2.5.1. Puffer und Lösungen	20
2.5.2. Nährmedien für <i>E.coli</i> -Zellen	22
2.5.3. Zellkulturmedien	22
2.6. Plasmide	23
2.6.1. vorhandene Vektoren	23
2.6.2. erstellte Vektoren.....	24
2.7. Oligonukleotide	25
2.7.1. qRT-PCR Primer.....	25
2.7.2. <i>Stemloop</i> -Primer	27
2.7.3. <i>small interfering</i> RNA.....	27
2.7.4. Klonierungsprimer.....	28
2.8. Antikörper	29
2.8.1. primärer Antikörper	29
2.8.2. sekundärer Antikörper	29
2.9. Zellmaterial	30
2.9.1. Bakterienstämme.....	30
2.9.2. Zelllinien.....	30

3. Methoden	31
3.1. Mikrobiologische Methoden	31
3.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen	31
3.1.2. Kultivierung von Bakterienstämmen	31
3.1.3. Transformation chemisch kompetenter Zellen	31
3.2. Zellbiologische Methoden	31
3.2.1. Allgemeine Zellkultivierung	31
3.2.2. Kultivierung von C2C12-Zellen	32
3.2.3. Methoden der DNA- und RNA-Transfektion	32
3.2.3.1. Lipofectamin	32
3.2.3.2. Viromer	32
3.2.3.3. Lentiviral	33
3.2.4. Zellproliferationsassay	33
3.2.5. Immunfluoreszenzfärbung	33
3.2.1. Mikroskopie	34
3.3. Biochemische Methoden	34
3.3.1. Proteinextraktion mit RIPA-Puffer	34
3.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung	34
3.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
3.3.1. Western-Blot und Entwicklung	35
3.4. Molekularbiologische Methoden	35
3.4.1. qRT-PCR	35
3.4.1.1. mRNA Quantifizierung	35
3.4.1.2. miRNA Quantifizierung	35
3.4.2. DNA-Modifizierung und Klonierung	36
3.4.2.1. Plasmidpräparation	36
3.4.2.2. PCR	36
3.4.2.3. Plasmidklonierung	37
3.4.2.4. Agarose-Gelelektrophorese	37
3.4.2.5. SOMA-Mutagenese	37
3.4.2.6. Sequenzierung	38
3.4.3. Luciferase Reporterassay	38
3.4.4. miTRAP	38
3.5. Fehlerberechnung und Statistik	39

4. Ergebnisse.....	40
4.1. Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung der Expressionsregulation von MRTF-A.....	40
4.1.1. Untersuchung von Muskelzelllinien	40
4.1.2. Quantifizierung von miRNA in Muskelzellen.....	42
4.2. MRTF-A in der Differenzierung von C2C12-Zellen.....	44
4.2.1. Expressionsprofil differenzierender C2C12-Zellen.....	44
4.2.2. Veränderte MRTF-A-Expression während Differenzierung.....	45
4.3. Untersuchung einer möglichen posttranskriptionalen Regulation von MRTF-A im Differenzierungsprozess von C2C12-Zellen.....	46
4.3.1. Identifizierung potenzieller MRTF-A regulierender miRNAs durch miTRAP	46
4.3.2. Einfluss von miRNA auf die Expression von MRTF-A.....	55
4.3.3. Einfluss der posttranskriptionalen Regulation auf die Expression von MRTF-A	58
4.3.4. Posttranskriptionale Regulation von MRTF-A in der C2C12-Differenzierung	63
4.4. Untersuchung der posttranslationalen Regulation von MRTF-A in der C2C12-Differenzierung	66
4.5. Die Rolle von MRTF-A in der Differenzierung von C2C12-Zellen	68
4.5.1. Etablierung einer MRTF-A Überexpression.....	68
4.5.2. Einfluss von MRTF-A auf C2C12-Differenzierung.....	69
4.5.3. MRTF-A beeinflusst Proliferation in C2C12-Zellen.....	76
5. Diskussion.....	77
5.1. Das Verhalten von MRTF-A während der Differenzierung	77
5.2. MRTF-A: Eine posttranskriptionale Regulation?.....	78
5.3. MRTF-A unterstützt die Proliferation von Myoblasten	85
5.4. MRTF-A: Eine posttranslationale Regulation?	89
6. Zusammenfassung	90
7. Literaturverzeichnis.....	91
8. Anhang	101
Erklärung	105
Curriculum Vitae	106
Danksagung.....	107

1. Einleitung

1.1. Muskeldifferenzierung

Allen Säugetieren ist gemein, dass sie drei Arten an Muskelzellen besitzen: glatte Muskelzellen, Herzmuskelzellen und Skelettmuskelzellen. Letztere stellen dabei den größten Anteil dar und sind mit ca. 40% am Körpergewicht beteiligt (Motohashi & Asakura 2014). Auf Grund der Thematik der vorliegenden Arbeit fokussiert sich dieser Abschnitt auf Skelettmuskelzellen und deren Differenzierungsprozesse.

Reife Skelettmuskelzellen bilden polynukleäre Muskelfasern aus, welche durch Kontraktion Bewegungen ermöglichen (Motohashi & Asakura 2014). Anders als glatte Muskelzellen durchlaufen Skelettmuskelzellen eine irreversible Differenzierung (Okazaki & Holtzer 1966, Latella *et al.* 2000). Für eine Muskelregeneration nach Verletzungen besitzt das Skelettmuskelgewebe Satellitenzellen (Mauro *et al.* 1961). Hierbei handelt es sich um mitotisch ruhende Zellen, die an der Basallamina lokalisiert sind. Bei adulten Tieren beträgt der Anteil an Satellitenzellen 2,5 - 6% (Schultz *et al.* 1974, Hawke & Garry 2001). Kommt es zu einer Muskelverletzung verlassen die Satellitenzellen den ruhenden Zustand und beginnen zu proliferieren. Proliferierende Zellen werden Myoblasten genannt (Chargé & Rudnicki 2004). Myoblasten durchlaufen mehrere Proliferationszyklen um ausreichend Zellen für die Wundbehandlung zur Verfügung zu stellen. Anschließend differenzieren sie irreversibel (terminal) zu Myozyten, was auch den Stopp der Proliferation bedeutet. Als Myozyten fusionieren sie zu mehrkernigen Myotuben und letztendlich zu Muskelfasern, wobei sie auch mit bestehenden Muskelfasern fusionieren und so das beschädigte Gewebe regenerieren. Während die meisten Myoblasten eine terminale Differenzierung durchlaufen wird ein kleiner Anteil an Myoblasten wieder zu mitotisch ruhenden Satellitenzellen. Auf diese Weise wird das Reservoir an Satellitenzellen konstant gehalten (Collins *et al.* 2005). Pax7, ein Homöoboxtranskriptionsfaktor, ist sowohl in ruhenden als auch in proliferierenden Satellitenzellen/Myoblasten exprimiert und ist, wie verschiedenen Studien zeigten, essenziell für die Entwicklung und das Überleben der Satellitenzellen (Seale *et al.* 2000, Oustanina *et al.* 2004, Kuang *et al.* 2006, Lepper *et al.* 2009). Zusammen mit Pax3, ein homologer Transkriptionsfaktor von Pax7, halten sie die Proliferation in Myoblasten aufrecht und verhindern eine verfrühte Differenzierung oder Apoptose (Montarras *et al.* 2005, Relaix *et al.* 2006, Hirai *et al.* 2010, Abb.1-1). Weitere wichtige Transkriptionsfaktoren für die Muskeldifferenzierung sind MYOD (*myoblast determination protein*), MYF5 (*myogenic factor 5*), MRF4 (*muscle specific regulatory factor 4*) und Myogenin (Tapscott *et al.* 2005).

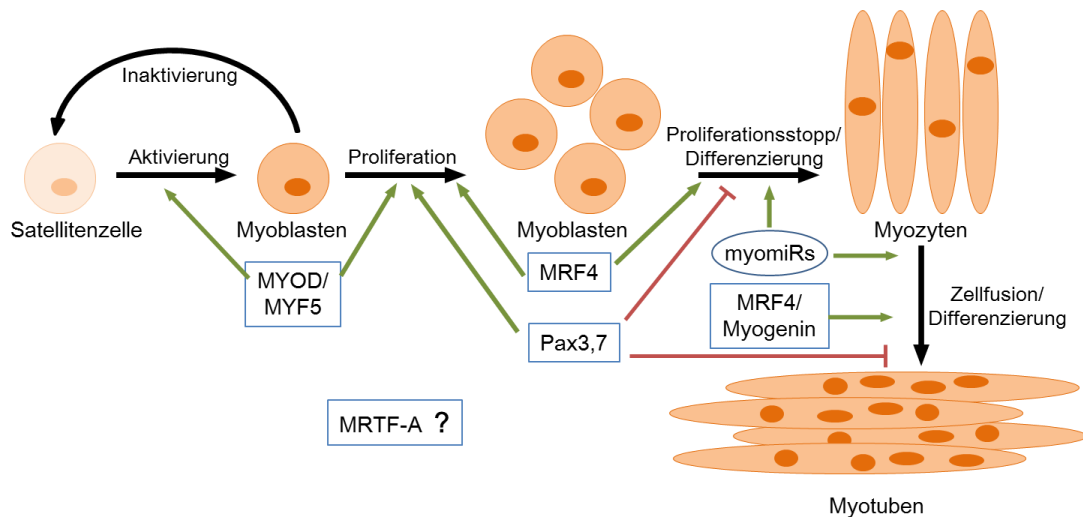


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Differenzierung von Skelettmuskelzellen

Satellitenzellen werden aktiviert und bilden proliferierende Myoblasten. Myoblasten differenzieren terminal über Myozyten zu polynukleären Myotuben, welche Muskelfasern ausbilden und sich mit bestehendem Gewebe verbinden und auf diese Weise beschädigtes Muskelgewebe regenerieren. An diesem Prozess sind mehrere Proteine und miRNAs beteiligt. Die Rolle von MRTF-A in diesem Prozess ist hingegen nur wenig untersucht.

Von MYF5 kann nur die mRNA in Satellitenzellen gefunden werden. Die Translation wird durch miR-31 inhibiert (Cornelison & Wold 1997, Crist *et al.* 2012). MYOD ist weder auf mRNA noch auf Proteinebene in Satellitenzellen exprimiert (Cornelison *et al.* 2000). Kommt es zu einer Muskelverletzung wird das myogene Programm durch die Expression von MYOD gestartet, wodurch die Satellitenzellen anfangen zu proliferieren. Dies verringert die Expression von miR-31, wodurch wiederum die Translation von MYF5 ermöglicht wird und das myogene Programm weiter fördert (Crist *et al.* 2012). Die Expression von MYOD und MYF5 legt die Entwicklung einer Zelle zu Muskelgewebe fest und ist daher essenziell für die Muskelentwicklung (Braun & Gautel 2011). Myogenin ist für die terminale Differenzierung der Myozyten wichtig. MRF4 besitzt eine duale Rolle. Es wird sowohl in differenzierenden Zellen exprimiert, aber auch in proliferierenden Zellen und agiert ähnlich wie MYOD und MYF5.

Während der Bildung von Myoblasten kann man die Satellitenzellen folgendermaßen unterteilen: Ruhende Zellen sind Pax7 positiv, aber MYOD negativ. Proliferierende Zellen sind positiv für Pax7 und MYOD. Differenzierende Zellen sind nur MYOD positiv (Olguin & Olwin 2004, Zammit *et al.* 2004). Einige der proliferierenden Zellen werden wieder MYOD negativ, ruhende Zellen und erhalten so das Reservoir an Satellitenzellen (Baroffio *et al.* 1996, Yoshida *et al.* 1998).

Die genauen Funktionsweisen von Pax7 und Pax3 sind noch nicht vollständig verstanden. Studien zeigten, dass Pax3 während der Entwicklung die Expression von MYOD, möglicherweise über den WNT-Signalweg, nur auf der dorsalen Seite unterstützt. Die Expression von MYF5 wird dagegen sowohl dorsal als auch ventral durch Pax3 gefördert. Für Pax7 wurde bisher nur MYF5 als Zielgen in diesem Zusammenhang identifiziert (Brunelli *et al.* 2007, Sato *et al.* 2010, Braun & Gautel 2011). Untersuchungen von Relaix *et al.* 2005 zeigten, dass eine Inhibierung von Pax3 und Pax7 in Muskelvorläuferzellen die Muskelentwicklung stört. Dies führte zu einer

verringerten Population an Muskelzellen und unterstreicht die Rolle von Pax3 und Pax 7 für die Entwicklung und Differenzierung von Skelettmuskelzellen.

1.2. miRNAs

Neben den Transkriptionsfaktoren spielen auch miRNAs eine wichtige Rolle in der Muskeldifferenzierung. Erste Erfahrungen mit miRNAs sammelte die Wissenschaft in den 1990er bei der Regulation von *lin-14* in *C. elegans*. (Arasu *et al.* 1991, Reinhart *et al.* 2001, Ruvkun *et al.* 1991, Wightman *et al.* 1993). Deren Untersuchungen haben gezeigt, dass *lin-14* posttranskriptional reguliert ist und dafür sowohl die nichtkodierende RNA *lin-4* als auch die 3'UTR von der *lin-14* mRNA notwendig ist. Zu dieser Zeit hielt man die Regulation über *lin-4* für ein *C. elegans* spezifisches Phänomen. Dies änderte sich mit der Entdeckung von *let-7* in *C. elegans*. (Pasquinelli *et al.* 2000). Genau wie *lin-4* ist *let-7* ca. 21 nt lang und reprimiert *lin-41* posttranskriptional. Allerdings ist *let-7* stark konserviert und somit auch in vielen anderen Organismen zu finden, was zeigte, dass eine posttranskriptionale Regulation mit Hilfe von miRNAs kein Phänomen von *C. elegans* allein ist. Aktuelle Studien zeigen, dass die meisten mRNAs durch miRNAs reguliert werden (Kozomara *et al.* 2014, Friedman *et al.* 2009, Ha & Kim 2014).

Die Biogenese ist in mehrere Schritte unterteilt, die wiederum in verschiedenen Zellkompartimenten ablaufen (Lee *et al.* 2002, Lee *et al.* 2004, Cai *et al.* 2004). Die miRNAs werden zunächst als Primärtranskripte, sog. pri-miRNA (Primär-miRNA) mit 5'-Capping-Struktur und 3'-Poly-A-Schwanz durch die Polymerase II synthetisiert. Diese Primärtranskripte sind dabei oft in Introns von proteinkodierenden Genen kodiert und werden daher oft zusammen mit Proteinen exprimiert (Rodriguez *et al.* 2004, Baskerville & Bartel 2005). Im Zellkern bildet die pri-miRNA eine *Stemloop*-Struktur aus, welche von dem *Microprocessor complex* erkannt wird. Dieser Komplex besteht aus der RNase III Endonuklease Drosha und dem Doppelstrang-RNA-Bindeprotein DGCR8 (Gregory *et al.* 2004, Landthaler *et al.* 2004). DGCR8 bindet die *Stemloop*-Struktur und führt Drosha an die vorgesehene Schnittstelle, wodurch aufgrund der Endonukleaseaktivität eine 70-100 nt lange RNA mit *Hairpin*-Struktur entsteht, die sog. pre-miRNA (*precursor* miRNA) (Han *et al.* 2006). Mit Hilfe von Exportin 5 wird die pre-miRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Bohnsack *et al.* 2004, Yi *et al.* 2003). Im Zytoplasma schneidet die RNase III Endonuklease DICER die pre-miRNA, dadurch entsteht eine 22 nt lange doppelsträngige miRNA (Macrae *et al.* 2006). Ein Strang wird nun in den Multiproteinkomplex miRISC, ähnlich dem RISC (*RNA induced silencing complex*), aufgenommen, welcher unter anderem auch ein Argonautenprotein (RNA-Bindeprotein) beinhaltet. Die miRNA dirigiert den miRISC an die Bindestelle in der 3'UTR der Ziel-mRNA und bindet diese über die Komplementarität der ersten 7-8 Nukleotide der miRNA, der sogenannten *seed*-Sequenz (Lewis *et al.* 2003, Brennecke *et al.* 2005). Anschließend kommt es entweder zu einer Translationsinhibierung oder zu einem Abbau der Ziel-mRNA (Pasquinelli *et al.* 2012, Rosenberg *et al.* 2006). Welcher dieser beiden Wege

eingeschlagen wird, hängt von der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, sowie dem Argonautenprotein des miRISC ab. Bei einer hohen Komplementarität kann es zu einem Abbau der mRNA kommen. Dies ist aber nur möglich, wenn das Argonautenprotein AGO2 im miRISC beteiligt ist, da es als Einziges in der Proteinfamilie eine Endonukleaseaktivität besitzt (Hammond *et al.* 2005, Hammond *et al.* 2001, Meister *et al.* 2004, Liu *et al.* 2004). Eine niedrige Komplementarität zwischen mRNA und miRNA führt hingegen zur Translationsinhibierung, wobei der genaue Prozess noch nicht abschließend aufgeklärt ist (Hutvagner & Zamore 2002, Doench *et al.* 2003, Saxena *et al.* 2003, Zeng *et al.* 2002). Es ist allerdings zu erwähnen, dass ein direkter Abbau der mRNA, wie am Beispiel der HOXB8 mRNA und miR-196 seltener vorkommt als die Translationsinhibierung (Mansfield *et al.* 2004, Yekta *et al.* 2004).

Die miRNAs sind in verschiedene Prozesse involviert, wie z.B. Apoptose, Autophagie oder Zellsignalwege (Rane *et al.* 2009, Boon *et al.* 2013, de Leon *et al.* 2008). Eine wichtige Funktion haben die miRNAs lin-4 und let-7 während der Entwicklung von *C. elegans*, da sie die Expression verschiedener Entwicklungsgene zeitlich auf bestimmte Entwicklungsstadien beschränken (Lee *et al.* 1993, Reinhart *et al.* 2000). In *D. melanogaster* regulieren die miRNAs Bantam und miR-14 unter anderem die Apoptose (Brennecke *et al.* 2003, Xu *et al.* 2003). Die Relevanz von miRNAs während der Entwicklung wird auch dadurch verdeutlicht, dass ES-Zellen ohne DICER nicht mehr in der Lage sind zu differenzieren (Kanellopoulou *et al.* 2005). Ein DICER *Knockout* im Zebrafisch führte zu einem kompletten Entwicklungsarrest nach spätestens 8 Tagen, nachdem das maternal vorhandene Reservoir an DICER aufgebraucht war (Bernstein *et al.* 2003). Auch in der späteren Entwicklung spielen miRNAs eine wichtige Rolle. Eine Überexpression von miR-1 im Herzen während der Mausembryogenese ist letal. Die Kardiomyozyten dieser transgenen Mäuse initiierten die Differenzierung früher als der Wildtyp, wodurch es zu einem Entwicklungsarrest an Tag E13.5 kam und dünnere Herzkammerwände ausgebildet wurden, was letztlich zum Herzversagen führte (Zhao *et al.* 2005).

Die miRNAs wurden bisher nur in multizellulären Organismen gefunden, was Wienhold und Plasterk 2005 zu der Theorie führte, dass es miRNAs sind, welche die Differenzierung in verschiedene Zell- und Gewebearten ermöglichen bzw. die Differenzierung der Zellen aufrecht halten. Hinweise für diese Theorie sind unter anderem, dass undifferenzierte Zellen auch ohne miRNAs überleben können. So waren murine ES-Zellen mit inaktivem DICER-Gen vital, aber nicht mehr in der Lage zu differenzieren (Kanellopoulou *et al.* 2005). In der frühen Entwicklung des Zebrafischs, wenn der Differenzierungsgrad niedrig ist, sind nur wenige miRNAs exprimiert. Mit steigendem Differenzierungsgrad nimmt auch die miRNA Expression zu (Wienholds *et al.* 2005b, Chen *et al.* 2005). Eine weitere Studie fand heraus, dass viele Krebsarten eine geringere miRNA Expression aufweisen als die Gewebe aus denen sie entstammen (Lim *et al.* 2005). Außerdem führte die Expression der muskelspezifischen miR-1 oder neuronalspezifischen miR-124 in HeLa-Zellen zu Expressionsprofilen, welche denen von Muskel- bzw. Nervengewebe ähnlich waren (Bartel & Chen 2004).

Allgemein ist festzustellen, dass nur wenige miRNAs wie let-7 ubiquitär exprimiert sind. Die meisten miRNAs sind gewebespezifisch exprimiert. So wird miR-1 z.B. in Kardiomyozyten und anderen Muskelgewebe exprimiert, aber nicht in Niere, Leber oder Lunge (Lagos-Quintana *et al.* 2001, Lau *et al.* 2001, Lee & Ambros 2001). Die muskelspezifischen miRNAs miR-1, -133a, -206 und -208 werden auf Grund ihrer Gewebespezifität auch myomiRNAs genannt und spielen neben den bereits erwähnten Transkriptionsfaktoren essenzielle Rollen während der Skelettmuskeldifferenzierung (Sempere *et al.* 2004, Chen *et al.* 2006, Rao *et al.* 2006, Sokol *et al.* 2005, Zhao *et al.* 2005, McCarthy *et al.* 2008, Luo *et al.* 2013). So binden MYOD und Myogenin die Promoterregion von miR-1 und -133 (Rao *et al.* 2006). Mäusen ohne MYF5 fehlte in der frühen Entwicklung die Expression von miR-1 und miR-206 in den Somiten. Mäuse ohne MYOD zeigten in diesem Zusammenhang eine normale miRNA Expression (Sweetman *et al.* 2008).

miR-206 zeigt eine starke Abundanz in Skelettmuskelzellen. Die Transkription von miR-206 wird durch MYOD und Myogenin initiiert (Baskerville & Bartel 2005, Wienholds *et al.* 2005b, Liang *et al.* 2007, McDaniel *et al.* 2009, Rao *et al.* 2006). Sie besitzt dabei ein temporales Expressionsprofil. miR-206 wird erstmals an Tag E9.5 in der Embryogenese der Maus detektiert. Die Expression nimmt anschließend kontinuierlich bis zum dritten postnatalen Tag zu und sinkt danach wieder ab (Takada *et al.* 2006, Anderson *et al.* 2006, McCarthy *et al.* 2008). Ähnliche Beobachtungen hatten Wienholds *et al.* 2005b im Zebrafisch gemacht, was zu der Überlegung führte, dass miR-206 ein wichtiger Faktor für die embryonale Entwicklung des Muskelgewebes darstellt (Luo *et al.* 2013). Dass miR-206 als myomiR essenziell für die Muskeldifferenzierung ist, wird durch die Inhibierung von POLA1 verdeutlicht. POLA1 ist eine Untereinheit der DNA Polymerase α und essenziell für die DNA Synthese. Für die Differenzierung ist ein Zellzyklusarrest in Verbindung mit einer verringerten DNA Synthese wesentlich (Kim *et al.* 2006). Weiterhin zeigten Studien, dass miR-206 Pax3 und Pax 7 als Antagonisten der Differenzierung inhibiert (Chen *et al.* 2010, Hirai *et al.* 2010).

Interessanterweise besitzt miR-1 dieselbe seed-Sequenz wie miR-206, was sich auch in den Zielgenen wie Pax3 und Pax7 widerspiegelt (Luo *et al.* 2013). Allerdings liegt miR-1 auf Chromosom 2 und 18 und miR-206 auf Chromosom 1 im murinen Genom, was verdeutlicht, dass sie unterschiedlich reguliert werden. Zusätzlich zu MYOD und Myogenin wird die Transkription von miR-1 auch durch SRF, MEF2 und TWIST initiiert (Chen *et al.* 2006, Liu *et al.* 2007). Die Expressionsmuster von miR-1 und miR-206 unterscheiden sich ebenfalls. Während miR-206 ausschließlich in Skelettmuskelzellen exprimiert wird, kann miR-1 auch in glatten Muskel- sowie Herzmuskelzellen gefunden werden (Jiang *et al.* 2010, Minami *et al.* 2012). Studien über weitere Zielgene wie HDAC4, eine Klasse II Histondeacetylase und starker Repressor myogener Genexpression und YY1, ein Zinkfingertranskriptionsfaktor, welcher ebenfalls die Myogentranskription negativ beeinflusst, belegen die Bedeutung von miR-1 für die

Muskeldifferenzierung (Lu *et al.* 2012, Chen *et al.* 2006). Des Weiteren zeigten diese Studien, dass ein *Knockdown* von miR-1 zu einer Inhibierung der Differenzierung führt.

miR-133 ist wie miR-1 auf Chromosom 2 und 18 kodiert und wird auch mit dieser zusammen transkribiert. Daher fällt die Regulation ähnlich wie bei miR-1 aus (Luo *et al.* 2013). Bekannte Zielgene sind MAML1, IGF-1R oder nPTB, welche bei einer normalen Differenzierung inhibiert werden (Chen *et al.* 2006, Rao *et al.* 2006). Zusätzlich haben Chen *et al.* 2006 auch SRF als Zielgen identifiziert. Die Inhibierung von SRF führte laut den Untersuchungen zu einer verbesserten Proliferation von Myoblasten und inhibiert somit indirekt die Differenzierung.

miR-486 ist auf dem Intron 40 des Anhyrin-1-Gens kodiert und wird über einen alternativen Promoter exprimiert. Obwohl miR-486 über Pax7 an der Differenzierung von Skelettmuskelzellen beteiligt ist, zählt sie nicht zu den myomiRNAs (Dey *et al.* 2011). Weitere Untersuchungen zeigten, dass neben MYOD auch SRF und SRF-Co-Aktivatoren an der Regulation von miR-486 beteiligt sind (Small *et al.* 2010).

1.3. SRF

Als Greenberg und Ziff 1984 entdeckten, dass das Protoonkogen c-fos in ruhenden Fibroblasten durch eine Stimulation mit Serum verstärkt exprimiert wird, wussten sie noch nicht, dass sie damit einen Transkriptionsfaktor entdeckten, für den ca. 20 Jahre später 300 mögliche Zielgene beschrieben werden und der mit über 60 Co-Aktivatoren zu einem der am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren gehört (Sun *et al.* 2006, Miano *et al.* 2003). Die Tatsache, dass ein Serumstimulus die Transkription aktivierte, führte zu dem Namen *serum response faktor* (SRF) (Treisman *et al.* 1985). Ca. 300 bp vor dem c-fos Promoter befindet sich eine konservierte DNA Sequenz, welche für die Bindung von SRF notwendig ist und seither als *serum response element* (SRE) bezeichnet wird (Treisman 1986, Deschamps *et al.* 1985, Prywes & Roeder 1986).

Treisman (1986) beschrieb das SRE des c-fos Gens als eine 23 bp lange Sequenz. Diese Sequenz besitzt eine 6 bp lange Kernsequenz. Flankiert wird diese Kernsequenz an beiden Seiten von symmetrisch invertierten, repetitiven Sequenzen. Unabhängig davon entdeckten Minty und Kedes im selben Jahr im Promoter des kardialen α -Aktins eine 10 bp lange Sequenz, die in verschiedenen Spezies (u.a. Maus und Mensch) konserviert ist. Mit der Zeit wurde diese 10 bp lange Sequenz auch in weiteren Promotern, wie z.B. α -Myosin schwere Kette (MHC) sowie leichte Kette (MLC) und in α -Aktin des Skelettmuskels (ACTA1) entdeckt. Auf Grund ihrer Nukleotidsequenz wurde diese 10 bp lange Sequenz als CCArGG-Box bezeichnet. Studien zeigten, dass ein Austausch des SRE des c-fos Gens gegen die CCArGG-Box ebenfalls zu einer SRF-vermittelten Transkription des c-fos Gens führt (Phan-Dihn-Tuy *et al.* 1988, Boxer *et al.* 1989, Taylor *et al.* 1989). Weitere Untersuchungen führten zur Definierung der Konsensussequenz CC(A/T)₆GG, welche heute nicht CCArGG- sondern CArG-Box genannt wird. Des Weiteren gibt es CArG-Box ähnliche Elemente, welche durch eine Substitution von C oder G im A/T-Kern gekennzeichnet sind, aber dennoch durch SRF

gebunden werden können (Miano *et al.* 2003). Die CARG-Box darf dabei nicht mit dem SRE verwechselt werden. Die CARG-Box stellt vielmehr die Kernsequenz des SRE dar und besitzt anders als das SRE keine flankierenden Sequenzen (Miano *et al.* 2003, Norman *et al.* 1988).

Der murine SRF ist auf Chromosom 17 kodiert. Der ca. 11 kb lange Genlocus besteht aus 7 Exons und 6 Introns (Belaguli *et al.* 1997). Je nach Gewebe kann es durch alternatives Spleißen zu unterschiedlichen Isoformen von SRF kommen (Chai & Tarnawski 2002). Dem Aorta-spezifischen SRF-S fehlt Exon 4 und 5. SRF-I ist mit Exon 1, 2, 6 und 7 die kürzeste Form und wurde als solches nur in embryonalem Gewebe exprimiert. Durch das Fehlen von Exon 5 entsteht die dominant negativ agierende Mutante SRF-M (Chai & Tarnawski 2002).

Der vollständig exprimierte SRF ist 508 AS lang, ca. 67 kDa groß und besitzt 3 Domänen (Abb. 1-2). Die DNA-Bindedomäne befindet sich in der Mitte des Proteins (AS133-222) (Norman *et al.* 1988). Diese Domäne besitzt eine starke Konservierung zwischen den Spezies und wurde erstmals in MCM-1(Hefe), Agamous, Deficiens (Pflanze) und SRF (Tier) beschrieben, weshalb diese DNA-Bindedomäne heute als MADS-Box (MCM-1, Agamous, Deficiens, SRF) bezeichnet wird (Shore & Sharrocks 1995, Sommer *et al.* 1990). In SRF dient die MADS-Box zur SRF-Dimerisierung und zur Interaktion von SRF mit Co-Aktivatoren (Affolter *et al.* 1994, Shore & Sharrocks 1995). C-Terminal besitzt SRF eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (Johansen & Prywes 1993). N-Terminal befinden sich multiple Phosphorylierungsstellen, welche die Aktivität von SRF modulieren können. So führt eine Phosphorylierung von Serin103 zu einer erhöhten SRF-Aktivität (Norman *et al.* 1988, Misra *et al.* 1991, Rivera *et al.* 1993, Iyer *et al.* 2003, Iyer *et al.* 2006).

SRF führt zu unterschiedlichen Genexpressionen, die zum Teil gegenläufige Effekte besitzen. So kann SRF Gene aktivieren, welche die Zellproliferation unterstützen, aber auch Gene welche die Differenzierung fördern (Treisman *et al.* 1994, Shore & Sharrocks 1995). Dies zeigt, dass SRF in seiner Aktivität einen sehr komplexen Regulationsmechanismus besitzt. Die Aktivierung von SRF kann über verschiedene Agenzien erfolgen, z.B. Serum, Lysophosphatidsäure und Anisomycin (Chai & Tarnawski 2002). Da die Aktivierung von SRF durch Serum unabhängig von der Neusynthese ist, wird es zu den *immediate early growth response* Genen gezählt (Norman *et al.* 1988). Außerdem besitzt der Promoter von SRF selbst auch eine CARG-Box, was zu einer positiven Autoregulation von SRF führt (Belaguli *et al.* 1997, Spencer & Misra 1996). Weitere Regulationsmöglichkeiten bieten die phosphorylierungsabhängige DNA-Bindung (Manak & Prywes 1991), alternatives Spleißen (Kemp & Metcalfe 2000, Belaguli *et al.* 1999), nukleäre Translokation (Camoretti-Mercado *et al.* 2000), sowie die Assoziation mit Co-Aktivatoren (Treisman *et al.* 1994). Mit über 60 SRF-Co-Aktivatoren ergeben sich vielfältige Regulationsmöglichkeiten (Miano *et al.* 2003). So ist unter anderem bekannt, dass SRF mit Homöodomänenproteinen wie PHOX1 interagiert, was die DNA-Bindung und damit letztlich die SRF-Aktivität erhöht (Grueneberg *et al.* 1992). Das Tinman-homologe

NKX-2.5 wird durch SRF an den Promoter des kardialen α -Aktins rekrutiert (Chen & Schwartz 1996). Zusammen mit GATA4 bildet SRF einen Komplex über die angrenzenden SRF- und GATA-Bindestelle des kardialen ANF Promoters (Morin *et al.* 2001). Die erste größere Gruppe an SRF-Co-Aktivatoren, die entdeckt wurde, waren die *ternary complex factors* (TCF).

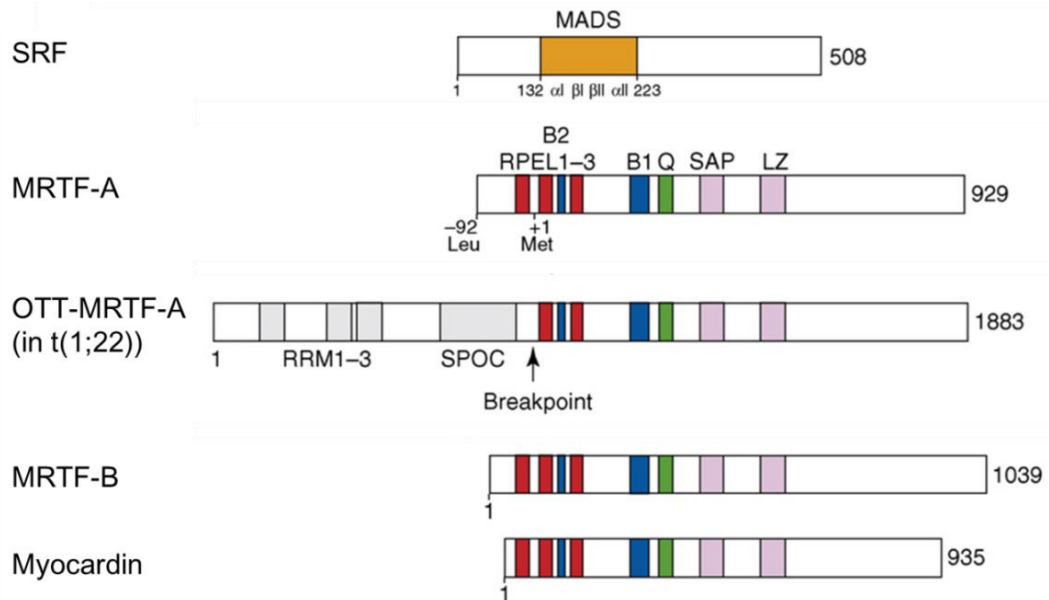


Abb. 1-2: Schematische Darstellung von SRF, MRTF-A, OTT-MRTF-A, MRTF-B und Myocardin

Abkürzungen der Domänen: B1/2= Basisdomäne, Q= glutaminreiche Domäne, LZ= Leucin-Zipper, RRM= RNA-Erkennungsmotiv, SPOC= Spen orthologe c-terminale Domäne.

Abbildung modifiziert nach Posern und Treisman 2006

SRF ist ein ubiquitär exprimiertes Protein. Einer SRF *Knockout* Maus ist es während der Embryogenese nicht mehr möglich Mesoderm auszubilden, die Maus stirbt zwischen Tag E8.5 und E12.5. Dies führte Arsenian *et al.* 1998 zu dem Schluss, dass SRF eine wichtige Rolle in der frühen embryonalen Entwicklung besitzt. Bei dem SRF *Knockout* liegt kein zellautonomer Effekt vor, da ES-Zellen ohne SRF *in vivo* und *in vitro* in der Lage sind in Zellen zu differenzieren, welche Mesodermmarkergene exprimieren (Weinhold *et al.* 2000). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch unbekannt. ES-Zellen ohne SRF besitzen Defekte in der Zellspreizung, Adhäsion und Migration (Schratt *et al.* 2001, Schratt *et al.* 2002). Mit Hilfe von gewebespezifischen Deletionen von SRF konnte gezeigt werden, dass SRF für die Entwicklung verschiedener Gewebe essenziell ist, z.B. für das kardiovaskuläre System (Parlakian *et al.* 2004), die Haut (Verdoni *et al.* 2010), die Leber (Sun *et al.* 2009) oder das zentrale Nervensystem (Alberti *et al.* 2005). Zusammen mit Myocardin, einem wichtigen SRF-Co-Aktivator aus der Myocardin-Familie, ist SRF für die Expression der meisten Markergene der glatten Muskulatur essenziell (Cen *et al.* 2004, Owens *et al.* 2004, Sun *et al.* 2005, Wang *et al.* 2001, Li *et al.* 2003, Wang *et al.* 2003).

SRF ist ebenfalls ein wichtiger Transkriptionsfaktor in Skelettmuskelzellen. So konnten Soulez *et al.* 1996 und Gauthier *et al.* 1996 zeigen, dass ein *Knockdown* von SRF die Differenzierung von Skelettmuskelzellen inhibierte. Wurde der SRF *Knockdown* noch

weiter erhöht, wurde auch die Proliferation der Zellen blockiert, was mit einer Reduktion von Cyclin A korrelierte. Diese Erkenntnisse konnten auch in der Maus bestätigt werden, wo ein SRF *Knockout* zu einer verringerten Muskelmasse und herabregulierten ACTA1 und IL-4 führte (Li *et al.* 2005, Charvet *et al.* 2006). Allerdings widersprachen diese Daten teilweise den Ergebnissen von Chen *et al.* 2006, welche SRF eine reine antiproliferative Wirkung nachsagten. Dies zeigt, dass bei komplexen Regulationsnetzwerken, wie der Muskeldifferenzierung, noch viele unbekannte Faktoren involviert sind und noch viel Aufklärungsarbeit geleistet werden muss. Ein *Knockdown* von SRF in konfluenten, nicht mehr proliferierenden Zellen, blockierte die Zellfusion und Synthese der Differenzierungsmarker MYOD, Myogenin und MHC (Soulez *et al.* 1996, Gauthier *et al.* 1996). Dies führte zu dem Schluss, dass SRF sowohl für die Proliferation, als auch für die Differenzierung notwendig ist. Der genaue Mechanismus ist noch unklar und legt die Vermutung nahe, dass weitere SRF-Co-Aktivatoren an der Muskeldifferenzierung beteiligt sein könnten.

1.4. MRTFs

1995 wurde gezeigt, dass eine Inhibierung des RhoA Signalwegs auch die Seruminduktion der SRE-Reporter gene verhindert. Ein konstitutiv aktives RhoA aktivierte diese SRE-Reporter gene (Hill *et al.* 1995). Eine Inhibierung der TCF hatte allerdings nur geringen Einfluss auf die seruminduzierten SRE-Reporter gene. Dies führte zu der Theorie, dass noch mindestens ein weiterer, TCF unabhängiger, Signalweg existieren muss, welcher im Gegenzug RhoA abhängig ist (Johansen & Prywes 1995). Da keine Modifikationen an SRF gefunden wurden und dieser kernlokalisiert ist, ging man davon aus, dass ein weiterer Co-Aktivator von SRF für diesen Effekt verantwortlich sein muss (Johansen & Prywes 1995). Die Entdeckung von Myocardin als SRF-Co-Aktivator bestärkte diese Theorie. Myocardin bindet stabil an SRF, aktiviert CArG-Box-Reporter gene und ist in glatten Muskelzellen, sowie in Herzmuskelzellen exprimiert, wo auch SRF eine hohe Aktivität aufweist (Wang *et al.* 2001, Wang *et al.* 2002, Chen *et al.* 2002, Du *et al.* 2003, Yoshida *et al.* 2003). Ferner besitzt Myocardin keinen Einfluss auf Zellen, in denen SRF inhibiert ist (Wang *et al.* 2002). Allerdings ist Myocardin nicht in allen Zelltypen exprimiert. *Immediate early genes* sind ubiquitär exprimiert und können daher nicht durch Myocardin reguliert werden (Cen *et al.* 2004). Zur selben Zeit wurde ein Myocardin-ähnliches Gen entdeckt, das sog. *myocardin related transcription factor* (MRTF), welches durch eine Translokation entstand. Diese Translokation tritt nur bei akuter megakaryoblastärer Leukämie auf (Ma *et al.* 2001, Mercher *et al.* 2001). Hierbei ist MRTF-A (Synonyme: MKL1, MAL, BSAC) durch eine Translokation t(1;22) an RBM15 (*RNA binding motif protein 15/ OTT*) fusioniert und erhält so onkogene Eigenschaften (Ma *et al.* 2001, Mercher *et al.* 2001, Sasazuki *et al.* 2002, Wang *et al.* 2002). Mehrere Gruppen konnten anschließend eine humane und murine cDNA von MRTF-A unabhängig von OTT nachweisen. MRTF-A besitzt dabei genau wie Myocardin die Fähigkeit SRE-Reporter gene zu aktivieren und SRF zu binden, weshalb die MRTFs als eine Untergruppe zu der Myocardin-Familie gezählt werden (Sasazuki *et al.* 2002, Wang *et*

al. 2002, Cen et al. 2003, Miralles et al. 2003). MRTF-B ist ein weiteres Mitglied der MRTFs und wurde kurze Zeit später mit denselben Eigenschaften entdeckt (Wang et al. 2002, Selvaraj & Prywes 2003). Obwohl MRTF-A/B ubiquitär in embryonalen und adulten Gewebe, sowie in ES-Zellen exprimiert werden (Du et al. 2004, Sasazuki et al. 2002, Wang et al. 2002), gibt es bezogen auf einzelne Gewebe unterschiedliche Expressionsmuster. MRTF-A zeigt eine stärkere Expression in mesenchymalen, muskulären und epithelialen Zellen verschiedener Organe (Wang et al. 2002, Pipes et al. 2006). MRTF-B hingegen zeigt eine hohe Expression in den Arterien, die sich aus der Neuralleiste bilden und in neuralen Strukturen während der Embryogenese der Maus (Oh et al. 2005).

Die drei Mitglieder der Myocardin-Familie haben eine Homologie von ca. 35%, wobei die einzelnen Domänen stärker konserviert sein können (Abb. 1-2) (Cen et al. 2004). Während MRTF-A die Basis-1-Domäne verwendet, um mit SRF zu interagieren, benötigt Myocardin hierfür zusätzlich die Glutamin-reiche Domäne (Wang et al. 2001, Cen et al. 2003). Die Leucinzipper-ähnliche Domäne wird zur Homo- und Heterodimerisierung der MRTF-Mitglieder verwendet. Eine Deletion der Leucinzipper-ähnlichen Domäne führt bei Myocardin zu einem starken Aktivitätsverlust. In MRTF-A/B hat solch eine Deletion nur geringe Einflüsse auf die Aktivität (Cen et al. 2003, Selvaraj & Prywes 2003, Wang et al. 2003). Weiterhin besitzen alle Mitglieder der Myocardin-Familie eine SAP-Domäne. Dabei handelt es sich um ein 35 AS langes konserviertes Motiv, welches aus zwei amphiphilen α -Helices, in Form einer Helix-Linker-Helix-Struktur, besteht. Auf diese Weise bildet die SAP-Domäne, mit vereinzelt Ausnahmen, Homeodomänen ohne DNA-Erkennungsmotiv (Göhring et al. 1997, Kipp et al. 2000, Sachdev et al. 2001, Böhm et al. 2005). Die SAP-Domäne ist aus vielen nukleär lokalisierten Proteinen wie SAF-A/B, Acinus oder PIAS bekannt. In SAF-B und PIAS dient die SAP-Domäne zur Interaktion mit nukleären Matrixanlagerungsregionen. Es wird vermutet, dass SAF-B und PIAS auf diese Weise helfen, die DNA in Chromatinschleifen zu organisieren und mit der nukleären Matrix zu verknüpfen (Kipp et al. 2000, Sachdev et al. 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Proteine mit SAP-Domänen auch in Prozessen der chromosomalen Dynamik, des nukleären Abbaus sowie in der apoptotischen DNA-Fragmentierung involviert sind (Aravind & Koonin 2000). Die Funktion dieser Domäne in der Myocardin-Familie ist bis heute noch unbekannt. Eine Deletion in MRTF-A hat weder einen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität, noch auf die Komplexbildung mit SRF (Cen et al. 2003, Miralles et al. 2003). Ebenso wenig zeigten Punktmutationen in Myocardin einen Effekt auf die Bindung zu SRF, wogegen die Aktivierung von Muskel-spezifischen Reportergenen inhibiert wurde (Wang et al. 2001). Dies lässt vermuten, dass Myocardin die SAP-Domäne zur Bindung an spezielle Promoter benötigt. Im C-Terminus liegt in allen drei Myocardin-Mitgliedern die Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD). Untersuchungen zeigten, dass die TAD von MRTF-A durch die TAD von VP16 ohne Aktivitätsverlust ersetzt werden konnte, was bedeutet, dass die TAD in MRTF-A eine generelle Aktivierungsdomäne ist, welche keinen Einfluss auf die Spezifität oder die Bindung von MRTF-A an SRF hat (Wang et al. 2001). Erste Untersuchungen der N-terminalen

Region zeigten, dass in diesem Bereich Regulationseinheiten vorhanden sein müssen. So führte eine Deletion dieses Bereiches zu einer erhöhten Aktivität von SRE-Reportergenen (Wang *et al.* 2001, Cen *et al.* 2003, Selvaraj & Prywes 2003). Die Kernlokalisierung erfolgt bei MRTF-A über die zwei Basisdomänen. Werden beide Domänen deletiert findet keine Kerntranslokation mehr statt und MRTF-A verbleibt ohne Funktion im Zytoplasma (Miralles *et al.* 2003). Außerdem besitzen alle drei Mitglieder der Myocardin-Familie N-terminal drei RPEL-Motive. MRTF-A bindet mit diesen Motiven freies Aktin, wodurch erstmals eine Verbindung von MRTF-A und damit auch von der SRF-Aktivität zu Zytoskelettsignalen aufgezeigt wurde (Miralles *et al.* 2003).

Die Entdeckungen, dass die SRF-Aktivität von der RhoA-Aktivität und der Bildung von Aktinfilamenten abhängig ist, waren erste Hinweise auf eine Verbindung der SRF-Aktivität mit dem Zytoskelett (Hill *et al.* 1995, Sotiropoulos *et al.* 1999). Die Aktivierung der SRE-Reportergene durch Serum oder aktivierten RhoA konnte durch ein dominant negatives MRTF-A geblockt werden (Cen *et al.* 2003, Miralles *et al.* 2003). Für eine vollständige Inhibierung dieses Signalweges musste auch MRTF-B deaktiviert werden, was zeigte, dass MRTF-A und -B zu bestimmten Teilen eine redundante Funktion haben. Sotiropoulos *et al.* beobachteten 1999, dass die RhoA-Aktivität zur Ausbildung von Stressfasern führte. Dies führte zu der Frage, ob die Stressfaserbildung ebenfalls einen Einfluss auf die SRF-Aktivität besitzt. Mit Hilfe von Latrunculin B konnte die Ausbildung von Aktinstressfasern blockiert werden, was ebenfalls zu einer inhibierten SRF-Aktivität führte. Eine Überexpression von Aktin hatte denselben Effekt. Dies führte zu der Theorie, dass freies Aktin die SRF-Aktivität reguliert. Untersuchungen von Posern *et al.* 2002 mit Aktinmutanten unterstützten diese Theorie. Mutanten, die nicht in der Lage waren Aktinfilamente zu bilden, inhibierten die SRF-Aktivität. Mutanten die Aktinfilamente stabilisierten und auf diese Weise den Anteil freien Aktins verringerten, erhöhten die SRF-Aktivität.

Untersuchungen zeigten, dass in NIH3T3-Zellen eine Serumstimulation zur Translokation von MRTF-A in den Zellkern führt, einer weiteren wichtigen Erkenntnis zum Verständnis der Regulation der SRF-Aktivität (Miralles *et al.* 2003). Die Translokation ist dabei von dem RhoA/Aktin-Signalweg abhängig. Zusammen mit dem Wissen, dass MRTF-A über die RPEL-Motive freies Aktin bindet und eine Deletion dieser Motive zu einer konstitutiven Kernlokalisierung von MRTF-A führt, erklärten diese Beobachtungen die Sensitivität von SRF gegenüber dem RhoA/Aktin-Signalweg (Miralles *et al.* 2003, Posern *et al.* 2004). Daraus entstand folgendes Regulationsmodell: MRTF-A bindet über die RPEL-Motive freies Aktin und kann auf diese Weise im Zytoplasma lokalisiert werden. Kommt es über den RhoA/Aktin-Signalweg zur Ausbildung von Aktinfilamenten, wird freies Aktin aufgebraucht, was zur Dissoziation des Aktins von MRTF-A führt. MRTF-A kann daraufhin in den Zellkern translokalisieren und zusammen mit SRF die Transkription von Zielgenen aktivieren (Abb. 1-3).

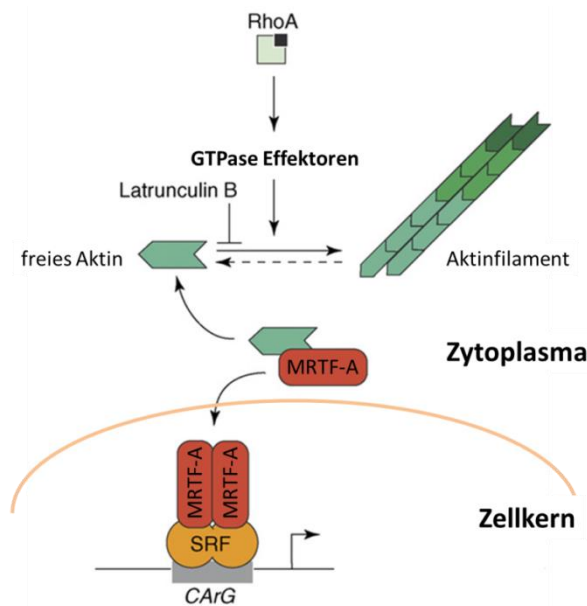


Abb. 1-3: Schematische Darstellung der Regulation von MRTF-A und SRF durch Aktin

MRTF-A bindet über die RPEL-Motive freies Aktin und wird auf diese Weise im Zytoplasma gehalten. Durch den RhoA-Signalweg kommt es zur vermehrten Bildung von Aktinfilamenten, wodurch das freie Aktin aufgebraucht wird. Da MRTF-A nicht mehr an Aktin gebunden ist, kann es in den Kern translokalisieren und SRF binden. Somit kommt es zur Aktivierung von SRF/MRTF-A Zielgenen. Durch Latrunculin B kann die Ausbildung von Aktinfilamenten blockiert werden. Abbildung modifiziert nach Posern und Treisman 2006

Die Translokation von MRTF-A in den Zellkern wird dabei von Importin- α und β vermittelt (Miralles *et al.* 2003, Posern *et al.* 2004, Pawlowski *et al.* 2010, Hirano *et al.* 2011). Mit Hilfe von nukleärem freiem Aktin, welches MRTF-A über die RPEL-Motive bindet, erfolgt ein CRM-1 abhängiger Export von MRTF-A, was letztlich wieder zur Inaktivierung der MRTF-A/SRF-Aktivität führt (Vartiainen *et al.* 2007). Interessanterweise ist Myocardin immer im Kern lokalisiert und nicht durch Aktin reguliert, was auf eine andere Sequenz der RPEL-Motive zurückzuführen ist (Wang *et al.* 2001, Miralles *et al.* 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu einer ERK-vermittelten Phosphorylierung von MRTF-A an Serin454 führt. Die Phosphorylierung hat eine inhibierende Wirkung auf die MRTF-A Aktivität, da sie die Bindung von MRTF-A an freies Aktin verstärkt (Muehlich *et al.* 2008).

Untersuchungen zeigten, dass Myocardin *Knockout* Mäuse embryonal letal waren und spätestens an Tag E10.5 starben, da sie kein differenziertes glattes Muskelgewebe besaßen. Diese Daten zeigten, dass Myocardin essenziell für die Entwicklung von glattem Muskelgewebe ist (Li *et al.* 2003). Eine Untersuchung zeigte aber, dass der Verlust von glattem Muskelgewebe nicht auf Grund einer defekten Differenzierung entsteht. ES-Zellen ohne Myocardin konnten, injiziert in Wildtypmäuse, differenzieren und in vaskuläres Gewebe mit normaler Morphologie inkorporieren (Pipes *et al.* 2005). Die Rolle von MRTF-A sowie dessen Regulation in Muskelgewebe ist hingegen noch wenig untersucht. Studien zum MRTF-A *Knockout* zeigten hingegen zum Teil unterschiedliche Ergebnisse. Während Li *et al.* 2006 eine normale mendelsche Verteilung unter den neugeborenen Mäusen beobachteten, sahen Sun *et al.* 2006 weniger MRTF-A *Knockout* Mäuse als es die mendelsche Verteilung vermuten lässt. Sie führten dies auf die beobachtete Nekrose in Herzzellen bei einem Teil der Embryonen zurück, die bis Tag E10.5 starben. Beiden Studien gemein ist die Erkenntnis, dass die weiblichen MRTF-A *Knockout* Mäuse nicht in der Lage waren ihren Nachwuchs zu stillen, da die Myoepithelzellen, die für die Kontraktion der

Milchdrüsen verantwortlich sind, nicht ausdifferenzierten und über Apoptose abgebaut wurden. Da MRTF-B diesen Phänotyp nicht kompensieren konnte, ist keine 100%ige Redundanz der beiden Faktoren gegeben, was über unterschiedliche Regulation bzw. Interaktionspartner oder gewebespezifische Expressionsunterschiede zu erklären wäre (Pipes *et al.* 2006). Mäuse mit einem MRTF-B *Knockout* zeigten hingegen eine defekte Differenzierung von glatten Muskelzellen, die der Neuralleiste entstammen (Li *et al.* 2005b). Während ACTA2 im Herzen und der Aorta normal exprimiert war, war es in glatten Muskelzellen der Neuralleiste runterreguliert. Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass MRTF-B in diesen Zellen eine wichtige Rolle übernimmt, wogegen in glatten Muskelzellen, die einen anderen Ursprung besitzen, Myocardin und MRTF-A diese Rolle einnehmen. Der genaue Mechanismus ist in diesem Zusammenhang noch unbekannt.

Für MRTF-A konnte ferner gezeigt werden, dass es viele muskelspezifische Zielgene wie SM22, ACTA2, glattmuskel-MHC, ACTA1, skelettmuskel- α -MHC besitzt (Cen *et al.* 2003, Du *et al.* 2004, Selvaraj & Prywes 2003). Indem Jiang *et al.* 2010 zeigten, dass SM22 und ACTA2 durch miR-1 reguliert werden, lieferten sie erste Hinweise für die Regulation von MRTF-A in glatten Muskelzellen. Die Verbindung zu MRTF-A wurde zwei Jahre später durch Minami *et al.* hergestellt. Sie zeigten, dass MRTF-A in synthetischen und damit proliferativen glatten Muskelzellen exprimiert wird und essenziell ist, um diesen Phänotyp aufrechtzuerhalten. miR-1 ist im kontraktiven Phänotyp verstärkt exprimiert. Die posttranskriptionale Regulation von MRTF-A durch miR-1 wurde mittels Luciferase Reporterassay bewiesen (Minami *et al.* 2012). Ein *Knockdown* von MRTF-A in glatten Muskelzellen führte zu einer verminderten Proliferationsrate nach Serumstimulation.

In Skelettmuskelzellen ist die Datenlage zum Teil widersprüchlich. So haben Selvaraj und Prywes 2003 gezeigt, dass eine Inhibierung von MRTF die Differenzierung von Skelettmuskelzellen (C2C12-Zellen) reprimiert. Ein *Knockout* von MRTF-A in Skelettmuskelzellen der Maus führte ebenfalls zu kleineren Muskeln, wobei dies nicht an der Differenzierungsfähigkeit der Zellen lag, sondern an einer Hypoplasie (Li *et al.* 2005). Untersuchungen von Iwasaki *et al.* 2008 kamen dagegen zu dem Ergebnis, dass eine Überexpression von MRTF-A die Differenzierung von C2C12-Zellen inhibiert. Eine weitere Studie zeigte, dass MRTF-A zusammen mit SRF die Expression von miR-486 fördert (Small *et al.* 2010) und damit ebenfalls Einfluss auf die Differenzierung von Skelettmuskelzellen haben könnte.

1.5. Zielstellung

Die Skelettmuskelentwicklung und Differenzierung stellen komplexe Prozesse dar, die noch weit davon entfernt sind, vollständig verstanden zu werden. Dass die Rolle von MRTF-A in diesem Zusammenhang größer sein könnte als bisher vermutet, zeigen die Erkenntnisse über MRTF-A in glatten Muskelzellen. Die posttranskriptionale Regulation ist dabei ein Novum für dieses Protein. Obwohl miR-1 sowie MRTF-A in Skelettmuskelgewebe exprimiert werden, ist die Regulation von MRTF-A in

Skelettmuskelzellen wenig erforscht und die Erkenntnisse zum Teil widersprüchlich. Aus diesem Grund befasst sich die vorliegende Arbeit mit der Frage, wird MRTF-A in Skelettmuskelzellen posttranskriptional reguliert und welche Aufgabe hat MRTF-A in Skelettmuskelzellen?

Um erste Hinweise für eine posttranskriptionale Regulation zu finden wurde das Expressionslevel von MRTF-A auf mRNA und Proteinebene, sowohl in Myoblasten als auch in Myotuben vergleichend untersucht. Anschließend wurde mit C2C12-Zellen ein miTRAP durchgeführt um miRNAs zu identifizieren, welche die MRTF-A mRNA binden. Der Einfluss der miRNAs auf die MRTF-A-Expression, sowie die C2C12-Differenzierung wurde mittels Überexpressions- und *Knockdown*-Versuchen genauer analysiert. Zur Bestätigung der Assoziation der miRNAs an die MRTF-A mRNA wurden die Bindestellen mutiert und MRTF-A mRNA ohne 3'UTR in C2C12-Zellen exprimiert. Für die Untersuchung der Funktion von MRTF-A wurden C2C12-Zellen mit einer erhöhten MRTF-A-Expression erzeugt. Die Expression von Differenzierungsmarkern, die Myotubenbildung sowie die Wachstumsrate dieser Zellen wurden anschließend mit Wildtypzellen verglichen. Eine posttranslationale Regulation von MRTF-A wurde durch Bestimmung der MRTF-A Halbwertszeit in Myoblasten und Myotuben vergleichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es neue Erkenntnisse über die Regulation sowie die Rolle von MRTF-A in Skelettmuskeln zu erlangen und diese in das bestehende Konzept des (komplexen) Transkriptionsnetzwerks zu integrieren.

2. Materialien

2.1. Laborgeräte

Nachfolgend sind die Geräte aufgelistet, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden:

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
-150 °C Kühltruhe	Sanyo (München)
-80 °C Kühltruhe	Thermo Scientific (Braunschweig)
-20 °C Kühlschranks MedLine	Liebherr (Bulle, Schweiz)
4 °C Kühlschranks MedLine	Liebherr (Bulle, Schweiz)
96-Well Plattenleser Multiskan RC	Thermo Scientific (Braunschweig)
Allegra 6KR Centrifuge	Beckman Coulter (Miami, FL, USA)
Blotting-Kammer für Western-Blot	Biorad (Hercules, CA, USA)
Brutschrank HERACell 150i	Thermo Scientific (Braunschweig)
Brutschrank WB 120 K 37 °C	Mytron (Heilbad)
Brutschrank 60 °C	Memmert (Schwabach)
Concentrator plus	Eppendorf (Hamburg)
Fluoreszenz-Mikroskop Axio Imager.M1	Carl Zeiss (Jena)
GloMax 96 Microplate Luminometer	Promega (Madison, WI, USA)
Gelelektrophoresekammern	Werkstatt/Eigenbau
Gelelektrophoresekammern für Western-Blot	Biorad (Hercules, CA, USA)
Gelkämme	Werkstatt/Eigenbau
Gelschlitten	Werkstatt/Eigenbau
GelStick „Touch“ UV-Transilluminator	Intas (Göttingen)
Homogenisator	A. Hartenstein (Würzburg)
Inkubator mit Schüttelvorrichtung I26	Eppendorf (Hamburg)
Kühlkombination Comfort	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Kühlkombination MedLine	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Lichtmikroskop EVOS xl core	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Lichtmikroskop EVOS fl	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
LightCycler 480 II	Roche (Basel, Schweiz)
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph (Schwabach)
Magnetrührer R100	Carl Roth (Karlsruhe)
Mikrowelle	Panasonic (Oaza Kadoma, Osaka, Japan)
Odyssey CLx infrared Imaging System	LI-COR (Bad Homburg)
pH Meter FiveEasy	Mettler Toledo (Gießen)
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph (Schwabach)
Plattformschüttler Rotamax	Heidolph (Schwabach)

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Pipetten	Gilson (Middleton, WI, USA)
Pipetboy	Integra (Zizers, Schweiz)
NALGENE Freezing Container	Thermo Scientific (Braunschweig)
Rollenmischer CAT RM 5	neoLab (Heidelberg)
Spannungsgerät EV261	Peqlab (Erlangen)
Spannungsgerät peqPower	Peqlab (Erlangen)
Spektrophotometer Nanodrop 2000c	Peqlab (Erlangen)
Sprout Minizentrifuge	Biozym (Oldendorf)
Sterilwerkbank Hera Safe	Thermo Scientific (Braunschweig)
Thermocycler T3000	Biometra (Göttingen)
Thermomixer confort	Eppendorf (Hamburg)
Thermocell MiXingBlock	Bioer (Binjiang, China)
Vakuumsystem Vacuu Hand Control	Vacuubrand (Wertheim)
Pumpe HLC	DITABIS (Pforzheim)
Pumpe	KNF (Freiburg)
Vortex Genie 3	IKA (Staufen)
Waage Kern 572	Kern & Sohn (Balingen)
Waage Kern ABS	Kern & Sohn (Balingen)
Wasserbad 1003	GFL (Burgwedel)
Wasserbad WNB 7	Memmert (Schwabach)
Zellzähler CASY TT	Roche (Basel, Schweiz)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Universal 320	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Universal 320R	Hettich (Tuttlingen)

2.2. Verbrauchsmaterialien

Zur Durchführung der Untersuchungen im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden folgenden Verbrauchsmaterialien verwendet:

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
96-Lochplatten für Roch LightCycler	Roche (Basel, Schweiz)
96-Lochplatten für Luciferase-Assay	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Gel-Blotting-Papier	A. Hartenstein (Würzburg)
Handschuhe Peha-soft nitrile	Hartmann (Heidenheim)
Immobilon-FL Blot-Membran	Millipore (Tullagreen, Irland)
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Objektträger	Süsse (Gudensberg)
Parafilm	Bemis (Oshkush, WI, USA)
Pasteurpipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
PCR-Gefäße (0,2ml)	A. Hartenstein (Würzburg)

<u>Artikel</u>	<u>Hersteller</u>
Petrischalen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Starlab (Hamburg)
Pipettenspitzen mit Filter	Kisker Biotech (Steinfurt)
Polypropylene Round-Bottom Tubes (15 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Reaktionsgefäße (0,5-2ml)	Carl Roth (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße steril (1,5 ml)	Brand (Wertheim)
Serologische Pipetten Cellstar	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Skalpell	Bayha (Tuttlingen)
Spritzenfilter steril PVDF (0,2 und 0,45 µm)	Millipore (Tullagreen, Irland)
Sterile Spritze (2 und 10 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zellschaber	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugen-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Zentrifugen-Röhrchen für SW40-Rotor	Beckman (Brea, CA, USA)

2.3. Chemikalien und Reagenzien

Folgende Chemikalien wurden zum Anfertigen der Arbeit genutzt:

<u>Chemikalie/Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
2-Propanol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth (Karlsruhe)
Agar Agar	Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ammoniumacetat	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Amylose-Beads	NEB (Ipswich, MA, USA)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
CaCl ₂	Merck (Darmstadt)
Cycloheximid	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethidiumbromid	Promega (Madison, WI, USA)
G-418/ Geneticin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)

<u>Chemikalie/Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Glykogen	Roche (Basel, Schweiz)
HCl	Carl Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Carl Roth (Karlsruhe)
Heparin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Kanamycin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
KCl	Carl Roth (Karlsruhe)
KH_2PO_4	Merck (Darmstadt)
Maltose	Merck (Darmstadt)
Methanol	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
MG132	Carl Roth (Karlsruhe)
MgCl_2	Merck (Darmstadt)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
NAD+	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Na_2HPO_4	Carl Roth (Karlsruhe)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot [\text{x} 2 \text{H}_2\text{O}]$	Merck (Darmstadt)
NaOH	Applichem (St. Louis, MO, USA)
NaCl	Carl Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA (Heidelberg)
NP40	Applichem (St. Louis, MO, USA)
PEG6000	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Phenol/Chloroform (5:1)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Polybren	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Basel, Schweiz)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth (Karlsruhe)
Sucrose	Merck (Darmstadt)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypton	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe)

2.4. Enzyme, fertige Lösungen und Reaktionskits

Nachstehende Produkte wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific (Braunschweig)
Colorimetric Cell Viability Kit I	PromoKine (Heidelberg)
Casy-Ton	Roche (Basel, Schweiz)
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	NEB (Ipswich, MA, USA)

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
DMEM	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega (Madison, WI, USA)
DyNAmo ColorFlash SYBR Green qPCR Kit	Thermo Scientific (Braunschweig)
Fetales Rinderserum (FCS)	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific (Braunschweig)
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific (Braunschweig)
Hefe tRNA	AG Hüttelmaier (Halle/Saale)
LDS-Puffer	Thermo Scientific (Braunschweig)
L-Glutamin 100x	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Lipofectamin 2000	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Lipofectamin RNAiMAX	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Micro BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Braunschweig)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
miRCURY RNA Isolation Kit	Exiqon (Vedbaek, Dänemark)
miScript II RT Kit	Qiagen (Hilden)
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Opti-MEM 1x	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Penicillin/Streptomycin 100x	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Pferdeserum	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Precision Plus Protein Standards	Biorad (Hercules, CA, USA)
ProLong Gold antifade reagent	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Basel, Schweiz)
Proteinase K	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	NEB (Ipswich, MA, USA)
Q5 Reaction Buffer	NEB (Ipswich, MA, USA)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
Restriktionsenzyme & Puffer	NEB (Ipswich, MA, USA)
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific (Braunschweig)

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
RiboMAX T7 Kit	Promega (Madison, WI, USA)
RNasin	Promega (Madison, WI, USA)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
T4 DNA Ligase	NEB (Ipswich, MA, USA)
T4 DNA Ligase Puffer 10x	NEB (Ipswich, MA, USA)
T4 Polynucleotide Kinase	NEB (Ipswich, MA, USA)
T4 Polynucleotide Kinase Puffer 10x	NEB (Ipswich, MA, USA)
<i>Taq</i> DNA Ligase	NEB (Ipswich, MA, USA)
Trypsin/EDTA-Lösung 10x	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)
Verso cDNA Sythesis Kit	Thermo Scientific (Braunschweig)
Viromer Blue	Lipocalyx (Halle/Saale)
Viromer Red	Lipocalyx (Halle/Saale)
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up	Promega (Madison, WI, USA)
rekombinantes Protein aus Maltose-Bindeprotein und <i>MS2-Loop</i> -Bindeprotein	AG-Hüttelmaier (Halle/Saale)

2.5. Medien und Puffer

2.5.1. Puffer und Lösungen

Nachstehende Puffer und Lösungen wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

Annealing-Puffer, pH 7,4	HEPES	50 mM
	NaCl	100 mM
BB-Puffer (Lysis- und Bindungspuffer)	Tris, pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	Glycerol	8,7% (v/v)
	NP40	0,05% (v/v)
Blocking-Lösung für Immunfluoreszenz	FCS	10% (v/v)
	BSA	1% (w/v)
	Triton X-100	0,05% (v/v)
Blocking-Lösung für Western-Blot	In PBS	
	Milchpulver in TBS-T	5% (w/v)
Glycerolschock Puffer für 1 ml	Glycerol (50%)	300 µl
	H ₂ O	200 µl
	2x PP-Puffer	500 µl

Laufpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1% (w/v)
Lämmli-puffer 3x	EDTA, pH 8,0	10 mM
	SDS	3% (w/v)
	Glycerol	20% (v/v)
	2-Mercaptoethanol	5% (v/v)
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
PBS, pH7,4	KCl	2,7 mM
	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
PP-Puffer, 2x pH 7,05	Na ₂ HPO ₄ [x 2 H ₂ O]	10 mM
	NaCl	280 mM
	KCl	10 mM
	HEPES	50 mM
	Sucrose	12 mM
Ripa-Puffer	Tris, pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	2 mM
	Triton X-100	1% (v/v)
	SDS	0,1% (v/v)
Sammelgel (SDS-Gel)	Acrylamid/Bisacrylamid	5% (v/v)
	Tris-HCl, pH 6,8	127 mM
	Glycerol	4,5% (v/v)
	SDS	0,1% (v/v)
	APS	0,1% (v/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
TAE, pH 8,0	Tris	40 mM
	EDTA	1 mM
	Natriumacetat	5 mM
TBS	Tris-HCl, pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
TBS-T	Tris-HCl, pH 7,5	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1% (v/v)
TE-Puffer, pH 8,0	Tris-HCl, pH 8,0	10mM
	EDTA	1mM

Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
	SDS	0,05% (v/v)
Trenngel (SDS-Gel)	Acrylamid/Bisacrylamid	8% (v/v)
	Tris-HCl, pH 8,8	375 mM
	SDS	0,1% (v/v)
	APS	0,1% (v/v)
	TEMED	0,1% (v/v)

2.5.2. Nährmedien für *E.coli*-Zellen

LB-Medium (engl. *lysogeny broth*) wurde für die Kultivierung des *E. coli*-Stamms *DH5 α* verwendet. 1 l LB-Medium enthält 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl. Falls notwendig wurde 100 μ g/ml Ampicillin als Selektionsmarker zugesetzt. Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5% Agar Agar beigemischt.

2.5.3. Zellkulturmedien

Für alle Zelllinien wurde folgendes Medium verwendet: DMEM, hoher Glukoseanteil (4,5 g/L), mit L-Glutamin, ohne Pyruvat.

Für die Kultivierung der einzelnen Zelllinien wurden dem Medium verschiedene Zusätze zugegeben, welche nachfolgend aufgelistet sind:

C2C12:

Wachstumsmedium	DMEM 10% FCS 1x L-Glutamin 1x Penicillin/Streptomycin
-----------------	--

Differenzierungsmedium	DMEM 5% Pferdeserum 1x L-Glutamin
------------------------	---

Transfectionsmedium	DMEM 10% FCS 1x L-Glutamin
---------------------	----------------------------------

HEK293T:

Wachstumsmedium	DMEM 10% FCS 1x L-Glutamin
-----------------	----------------------------------

Für die Zelllinien A-10, A7r5 und NIH3T3 wurde dasselbe Wachstumsmedium, sowie dasselbe Transfektionsmedium verwendet wie für C2C12-Zellen.

T/G HA-VSM-Zellen wurden in F-12K-Medium kultiviert. Zusätzlich wurden Ascorbinsäure (0,05 mg/ml), Rinderinsulin (0,1 mg/ml), Transferrin (0,01 mg/ml),

Natriumselenit (10 ng/ml), ECGS (0,03 mg/ml), HEPES (10 mM), TES (10 mM), 10% FCS und 1x Penicillin/Streptomycin zugegeben.

Einfriermedium

DMEM
10% FCS
1x L-Glutamin
5% (v/v) DMSO

2.6. Plasmide

2.6.1. vorhandene Vektoren

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pCDNA 3.1 (+) MS2-tag	pcDNA 3.1-Plasmid, welches zwei MS2-Sequenzen besitzt	Juliane Braun (Braun <i>et al</i> 2014)
pEGFP-N1-MAL f.I [ATG]	Fusionsprotein aus MRTF-A und GFP Start mit ATG-Codon unter Kontrolle eines CMV-Promoters	Dmitry Shaposhnikov, AG Posern, Halle
pEF-plink	Leerer Expressionsvektor	Guido Posern
pLVX-puro (new MSC)	Expressionsplasmid, welches zur lentiviralen Infektion verwendet werden kann. MSC wurde verändert	Marcel Lederer, AG Hüttelmaier, Halle
pLVX GFP	GFP unter Kontrolle eines CMV-Promoters	Marcel Lederer, AG Hüttelmaier, Halle
pMD2.G	Verpackungsplasmid zur Synthese von lentiviralen Partikeln	Marcel Lederer, AG Hüttelmaier, Halle
psPAX2	Verpackungsplasmid zur Synthese von lentiviralen Partikeln	Marcel Lederer, AG Hüttelmaier, Halle
pMIR-Glo	Reporterplasmid mit PGK-Promoter regulierter Firefly-Luciferase und einer MSC dahinter. SV40-Promoter regulierte Renilla-Luciferase zur Normalisierung. Verwendet zur Untersuchung potentieller miRNA-Bindestellen.	Promega (Madison, WI, USA)
P3D.A-Luc	Drei Kopien der SRF-Bindestelle des c-fos-Promoter vor einer Xenopus-Typ-5-TATA-Box und Transkriptionsinitiationsstelle. Basisplasmid ist pGL3	Guido Posern (Geneste <i>et al.</i> , 2002)
ptkRL	Renilla-Luciferase unter Kontrolle von Thymidin-Kinase-Promoter. Verwendet zur internen Kontrolle des pGL3-Reporterplasmids	Promega (Madison, WI, USA)
pSuper-miR1	sh-RNA zur Expression von muriner pre-miRNA1a-3p	Laura Leitner, AG Posern, Martinsried

2.6.2. erstellte Vektoren

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pCDNA 3.1 (+) MS2-tag 3'UTR-MAL mouse	3'UTR des murinen MRTF-A in Fusion mit zwei <i>MS2-Loop</i> -Sequenzen dahinter	diese Arbeit
pLVX-ΔN MRTF-A	Murines MRTF-A ohne die ersten 173 AS. CMV- Promoter reguliert	diese Arbeit
pLVX-ΔN MRTF-A HA- Tag	Murines MRTF-A ohne die ersten 173 AS mit HA- Tag. CMV-Promoter reguliert	diese Arbeit
pLVX- MRTF-A	Murines MRTF-A. CMV-Promoter reguliert	diese Arbeit
pLVX- MRTF-A HA-Tag	Murines MRTF-A mit HA-Tag. CMV-Promoter reguliert	diese Arbeit
pLVX- MRTF-A met	Murines MRTF-A ohne die ersten 92 AS. CMV- Promoter reguliert	diese Arbeit
pLVX- MRTF-A met HA- Tag	Murines MRTF-A ohne die ersten 92 AS mit HA- Tag. CMV-Promoter reguliert	diese Arbeit
pMIR-Glo MAL 3'UTR	pMIR-Glo mit muriner 3'UTR von MRTF-A hinter Fireflygen	diese Arbeit
pMIR-Glo MAL 3'UTR ΔmiR1/206	pMIR-Glo mit muriner 3'UTR von MRTF-A hinter Fireflygen. Mögliche miRNA1a-3p Bindestellen (Nukleotide 330-351, 753-776) wurde deletiert	diese Arbeit
pMIR-Glo MAL 3'UTR ΔmiR1/206/24	pMIR-Glo mit muriner 3'UTR von MRTF-A hinter Fireflygen. Mögliche Bindestellen für miRNA1a-3p und miRNA24-3p (Nukleotide 58-79, 330-351, 753-776) wurde deletiert	diese Arbeit
pMIR-Glo MAL 3'UTR ΔmiR1/206/486	pMIR-Glo mit muriner 3'UTR von MRTF-A hinter Firefly-Gen. Mögliche Bindestellen für miRNA1a-3p und miRNA486-5p (Nukleotide 330- 351, 545-579, 753-776) wurde deletiert	diese Arbeit
pMIR-Glo miR1as Positivkontrolle	pMIR-Glo mit miRNA1a-3p Antisense-Sequenz hinter Firefly-Gen. Positivkontrolle	diese Arbeit
pLVX-ΔN MRTF-A + 3'UTR	Murines MRTF-A ohne die ersten 173 AS und mit muriner MRTF-A 3'UTR. CMV-Promoter reguliert	diese Arbeit
pLVX- MRTF-A + 3'UTR	Murines MRTF-A mit muriner MRTF-A 3'UTR. CMV-Promoter reguliert	diese Arbeit
pLVX- MRTF-A met + 3'UTR	Murines MRTF-A ohne die ersten 92 AS und mit muriner MRTF-A 3'UTR. CMV-Promoter reguliert	diese Arbeit

2.7. Oligonukleotide

2.7.1. qRT-PCR Primer

Gen	Spezies	Primername	Sequenz 5'-3'
MRTF-A	<i>Homo</i>	MAL_hum for	TGTGTCTCAACTTCCGATGG
	<i>sapiens</i>	MAL_hum rev	CCCTGTCTGCTTCTGGTC
MRTF-B	<i>Homo</i>	MRTF-B_hum for	AATTATAGGCGTTGGGAAGGAG
	<i>sapiens</i>	MRTF-B_hum rev	CTGCGCTGGAGTGTTTGTAGTCA
ALAS1	<i>Homo</i>	ALAS1_hum for	CTGCAAAGATCTGACCCCTC
	<i>sapiens</i>	ALAS1_hum rev	CCTCATCCACGAAGGTGATT
MYOCD	<i>Homo</i>	MYOCD_hum for	CTCTGGAGCCCAAGCAGACA
	<i>sapiens</i>	MYOCD_hum rev	TCCGGGTCATTTGCTGCTTTAC
TAGLN	<i>Homo</i>	TAGLN_hum for	TGGCTGAAGAATGGCGTGAT
	<i>sapiens</i>	TAGLN_hum rev	GCTGCCATGTCTTTGCCTTC
SMA2	<i>Homo</i>	SMA2_hum for	CGGTGCTGTCTCTCTATGCC
	<i>sapiens</i>	SMA2_hum for	AGCAGTAGTAACGAAGGAATAGCCA
Smoothelin A	<i>Homo</i>	SmoothA-hum for	CAGACCCGAGTGAACAAAGC
	<i>sapiens</i>	SmoothA-hum rev	CTGATCCAGCATCTTGTCCA
Smoothelin B	<i>Homo</i>	SmoothB-hum for	TTGACTGCACTGTTGCGAAG
	<i>sapiens</i>	SmoothB-hum rev	TGGCACCTCACACTGTTC
MRTF-A	<i>Rattus</i>	MRTF-A-RAT-for	CAGACAGTTCCTCCTTTGAC
	<i>norvegicus</i>	MRTF-A-RAT-rev	GCTGAGAAAGAACCTGAGTG
ALAS1	<i>Rattus</i>	ALAS-RAT-1 for	CATTCTTATCCCGAGTCCCT
	<i>norvegicus</i>	ALAS-RAT-1 rev	TTTCTCTTTCTCATTGGCTGG
SMA	<i>Rattus</i>	SMA-RAT-1 for	ATGACCCAGATTATGTTTGAGACC
	<i>norvegicus</i>	SMA-RAT-1 rev	CAGAGTCCAGCACAAATACCAG
TAGLN	<i>Rattus</i>	TAGLN-RAT-1 for	TTTATGAAGAAAGCCCAGGAG
	<i>norvegicus</i>	TAGLN-RAT-1 rev	CATCTTTGCCAGTGATACC
MYOCD	<i>Rattus</i>	MYOCD-RAT-1 for	GTGAAACAGCAAATGACTCGG
	<i>norvegicus</i>	MYOCD-RAT-1 rev	TAACATCGCTCACCTTCCCA
Smoothelin	<i>Rattus</i>	Smooth-RAT for	GGCTCGTCCACTCCAATG
	<i>Norvegicus</i>	Smooth-RAT rev	GGATGAGGAAGAGGAAGAGG
sm-MHC	<i>Rattus</i>	sm-MHC-RAT for	AATCACACCATGTTTCATCCTG
	<i>norvegicus</i>	sm-MHC-RAT rev	TATAGTCCACCTTCCCAGCA
sm-MHC	<i>Homo</i>	sm-MHC-hum for	ATTTGATCAGTTGTTAGCCGAG
	<i>sapiens</i>	sm-MHC-hum rev	CGTCTTCATCTCCTCCATCTG
HPRT	<i>Mus</i>	ADM1.HPRT.rev	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
	<i>musculus</i>	ADM1.HPRT.for	TCAGTCAACGGGGGACATAAA
MYOCD	<i>Mus</i>	MYOCD_mus_for	AGAAGGAAGTTCCGATCAGTC
	<i>musculus</i>	MYOCD_mus_rev	AATCTTCAGTCTTGGCACTATCC
SMA	<i>Mus</i>	SMA_mus_for	TGACGCTGAAGTATCCGATAGA
	<i>musculus</i>	SMA_mus_rev	GTACGTCCAGAGGCATAGAGG

Gen	Spezies	Primername	Sequenz 5'-3'
ACTA1	<i>Mus musculus</i>	ACTA1-mus for ACTA1-mus rev	TCAGAGCAGCAGAACTAGAC TCATCACCCACGTAGGAG
MRTF-A	<i>Mus musculus</i>	MRTF-A-mus-for MRTF-A-mus-rev	GAGAAGAATATCCTGCCTGTG GAGTTGAGAAAGAACCTGAGTG
MRTF-B	<i>Mus musculus</i>	MRTF-B-mus-for MRTF-B-mus-rev	ATGACCTGAACGAGAAGATTGC TTCACCACACCTATAATCGCT
ALAS1	<i>Mus musculus</i>	ALAS mus for ALAS mus rev	CTCCTCGAACCTGTCCAC GCCATCTGGGACTCGTCAG
sm-MHC	<i>Mus musculus</i>	sm-MHC-mus for sm-MHC-mus rev	CTATGCCATTGCCGACAC GAATGAACTTGCCAAAGCGA
MYH4	<i>Mus musculus</i>	MYH4 mus for MYH4 mus rev	CAGGACTTGGTGGACAACTACA TTTAGTGTGAACCTCTCGGCTC
YWHAZ	<i>Mus musculus</i>	YWHAZ-mus_for YWHAZ-mus_rev	TGAAGCCATTGCTGAACTTG GTTGGAAGGCCGTTAATTT
RPS29	<i>Mus musculus</i>	DSQ.RPS29.for DSQ.RPS29.rev	TGAAGGCAAGATGGGTCAC GCACATGTTTCAGCCCGTATT
MYH2	<i>Mus musculus</i>	MYH2 mus for MYH2 mus rev	GAGCAAAGATGCAGGGAAAG TAAGGGTTGACGGTGACACA
MYH1	<i>Mus musculus</i>	MYH1 mus for MYH1 mus rev	CCTGGATGATCTACACCTACTC AAATAGACTGGTTCTCCCGA
DICER1	<i>Mus musculus</i>	DICER1 mus for DICER1 mus rev	ATGCAAAAAGGACCGTGTTTC CAAGGCGACATAGCAAGTCA
MYH11	<i>Mus musculus</i>	MYH11 mus for 2 MYH11 mus rev 2	AGCCGGAAAGACAGAGAACA CCAAAGCGAGAGGAGTTGTC
Smoothelin	<i>Mus musculus</i>	Smooth-mus for smooth-mus rev	GATGGCAGACGAGGCTTTAG TCAGCTTCTCGCTGTTGAGA
TAGLN	<i>Mus musculus</i>	TAGLN-mus for TAGLN-mus rev	AAGCCTTCTGCCTCAACA TCGATCCCTCAGGATACAGG
GFP	<i>Aequorea victoria</i>	GFP_check_for GFP_check_rev	ACATGAAGCAGCAGACTTCT ACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGT
AGO2	<i>Mus musculus</i>	AGO2_mus_for AGO2_mus_rev	AAGTCGGACAGGAGCAGAAA GAAACTTGCACTTCGCATCA
miR1a-3p	<i>Homo sapiens</i>	miR1-for-hum_2 uni-rev-Chen	GCGGCGTGGAATGTAAAGAA GTGCAGGGTCCGAGGT
miR206-3p	<i>Homo sapiens</i>	miR206-for-hum uni-rev-Chen	GCGGACTGGAATGTAAGGAAGT GTGCAGGGTCCGAGGT
miR219a-5p	<i>Homo sapiens</i>	miR219-for-hum uni-rev-Chen	CGGCGTGATTGTCCAAACG GTGCAGGGTCCGAGGT
MiR124-5p	<i>Homo sapiens</i>	MiR124-for-hum uni-rev-Chen	CGTGTTACAGCGGACC GTGCAGGGTCCGAGGT
miRNAs		miScript Primer Assay	Primer wurden von Qiagen bezogen.

2.7.2. Stemloop-Primer

Gen	Primername	Sequenz 5'-3'
miRNA-1a-3p	miR1-Chen	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CTGGATACGACATACAT
miR206-3p	miR206_Chen	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CTGGATACGACCCACAC
miR219a-5p	miR219_Chen	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CTGGATACGACAGAATT
miR-124-5p	miR124_Chen	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CTGGATACGACATCAAG

2.7.3. small interfering RNA

Für einen *Knockdown* der Genexpression wurde ON-TARGET plus siRNA von Dharmacon (Lafayette, CO, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich jeweils um einen Pool von 4 verschiedenen siRNAs, welche in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet sind.

Gen	siRNA Nr.	Sequenz 5'-3'
MRTF-A	1	GCACAUGGAUGAUCUGUUU
	2	GGUCAGCUCUUGUACAGC
	3	GCUGCGUCCUGCUGUCUAA
	4	GGACCGAGGACUAUUUGAA
DICER1	1	GGUAGACUGUGGACCGUUU
	2	GGAAUACCUGUACAACCA
	3	GCAAUUUGGUGGUUCGUUU
	4	ACAGGAAUCAGGAUAAUUA
AGO2	1	GUGUGUGGGACAUGCAGAA
	2	CGUGUUUACAAGUCGGACA
	3	UGAGAAACGCCUCGGAGA
	4	GUUGUAUUGUUUAGCGAUU
Kontrolle	1	UGGUUUACAUGUCGACUAA
	2	UGGUUUACAUGUUGUGUGA
	3	UGGUUUACAUGUUUUCUGA
	4	UGGUUUACAUGUUUCCUA

Für die Überexpression von miRNAs basierend auf *small interfering RNAs* wurde in dieser Arbeit das *mirVana® miRNA Mimic System* von *Life Technologies* (Carlsbad, CA, USA) verwendet.

2.7.4. Klonierungsprimer

Name	Bemerkung	Sequenz 5'-3'	Enzyme
miR-1 as for	Oligonukleotid für Antisense-Strang von miRNA1a-3p	CTAGATACATACTTC TTTACATTCCA	NheI
miR-1 as rev	Oligonukleotid für Antisense-Strang von miRNA1a-3p	AATTTGGAATGTAAA GAAGTATGTAT	EcoRI
MAL_UTR_mus2_for	Forward-Primer für 3'UTR von muriner MRTF-A mRNA zur Klonierung in pMIR-Glo	CTGAGCTAGCCAGA CATGCGCTAGGGAA GGGTCAGA	NheI
MAL_UTR_mus2_rev	Revers-Primer für 3'UTR von muriner MRTF-A mRNA zur Klonierung in pMIR-Glo	CATGGAATTCTGGC AAGTCAGTGTTTTTG TTTTATT	EcoRI
DS.f.l.NotI.for	Forward-Primer für murines MRTF-A Transkript	GGCCGCGGCCGCA CCATGCTGCCCCCT TCCGTCATTGCTGT	NotI
DS.dN.NotI.for	Forward-Primer für murines Δ N MRTF-A Transkript	GGCCGCGGCCGCA CCATGGAGCTGGTG GAGAAGAATATCC	NotI
mmu-MAL met_NotI	Forward-Primer für murines MRTF-A met Transkript	GGCCGCGGCCGCA CCATGCCGCCTTTG AAAAGCCCCG	NotI
mms_MAL-rev_Xho2	Reverse-Primer für murines MRTF-A Transkript	GGGGCTCGAGGTAC CCTACAAGCAGGAA TCCCAGTGGAGCTG CAA	XhoI
DS.MAL.Xho.HA.R	Reverse-Primer für murines MRTF-A Transkript mit HA-Tag C-Terminal	CCGGCTCGAGCTAA GCGTAGTCTGGCAC GTCGTATGGGTACA AGCAGGAATCCC	XhoI
mm_MAL_UTR_D25	Mutagenesprimer zur Deletion der Nukleotide 753-776 in der 3'UTR von muriner MRTF-A mRNA	CCTCCTGTCCTCCG CCAGCATCCCACCT CCCCACTGCATC	
MAL-miR1-mut_mo3	Mutagenesprimer zur Deletion der Nukleotide 330-351 in der 3'UTR von muriner MRTF-A mRNA	CTGCAAGGAAGAAA CTAGCCTATTTTAGC CAGTCCCAGGA	
MAL-miR1-mut_mo7	Mutagenesprimer zur Deletion der Nukleotide 58-79 in der 3'UTR von muriner MRTF-A mRNA	CACACAACCATACC CAGTGTCGACAATC ACAGTCCCTAGG	

Name	Bemerkung	Sequenz 5'-3'	Enzyme
MAL-miR1-mut_mo8	Mutagenesprimer zur Deletion der Nukleotide 544-579 in der 3'UTR von muriner MRTF-A mRNA	TGCTTTCACAACGTA AAAAGTGTGAGAAG TGTGCTATATG	
UTR_XhoI_for	Forward-Primer für 3'UTR von muriner MRTF-A mRNA zur Klonierung in pLVX	CTGACTCGAGCAGA CATGCGCTAGGGAA G	XhoI
UTR_PmeI_rev	Reverse-Primer für 3'UTR von muriner MRTF-A mRNA zur Klonierung in pLVX	GCATGGTTTAAAC TGGCAAGTCAGTGT TTTTGT	PmeI

2.8. Antikörper

2.8.1. primärer Antikörper

Zielprotein	Beschreibung	Quelle	Verdünnung
anti-MRTF-A/B	Kaninchen polyklonal	Hergestellt von Sina Pleiner	WB: 1:1000 IF: 1:100
anti-MYH 1/2/4/6	Maus monoklonal IgG ₁	Santa Cruz cat. sc-32732	WB: 1:1000 IF: 1:100
anti- α -Tubulin	Maus monoklonal IgG ₁ (DM1A)	Sigma Aldrich cat. T9026	WB: 1:2000
anti-AGO2	Kaninchen monoklonal IgG ₁	Abcam cat. ab156870	WB: 1:1000
anti-Vinculin	Maus monoklonal IgG ₂ (hVIN-1)	Sigma Aldrich cat. V9131	WB: 1:1000
anti-HA-Tag	Kaninchen polyklonal	Sigma Aldrich cat. H6908	WB: 1:1000 IF: 1:100
anti-p53	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz cat. sc-6243	WB: 1:1000
anti-Ubiquitin	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz cat. sc-9133	WB: 1:1000
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol	Sigma Aldrich	IF: 1:50000

2.8.2. sekundärer Antikörper

Beschreibung	Quelle	Verdünnung
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG cat. 925-32211	LI-COR (Bad Homburg)	WB: 1:15000
IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG cat. 926-68070	LI-COR (Bad Homburg)	WB: 1:15000

Beschreibung	Quelle	Verdünnung
Alexa 488-goat anti-mouse IgG cat. A11001	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	IF: 1:200
Alexa-488 donkey anti-rabbit IgG cat. A21206	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	IF: 1:200
Alexa 546-goat anti-mouse IgG cat. A11030	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	IF: 1:200
Alexa 546 donkey anti rabbit cat. A10040	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)	IF: 1:200

2.9. Zellmaterial

2.9.1. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung	Quelle
E. coli DH5 α	F- ϕ 80/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 endA1 hsdR17(rK-, mK+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -	Life Technologies (Carlsbad, CA, USA)

2.9.2. Zelllinien

Name	Beschreibung	Quelle
C2C12	murine Myoblasten, differenzieren zu Myotuben wenn in Pferdeserum kultiviert.	AG Hatzfeld (Halle/Saale)
T/G HA-VSMC (ATCC Nr.: CRL-1999)	humane glatte Muskelzellen mit morphologischen Eigenschaften von Fibroblasten, Modell für glatte Muskelzellen	ATCC (Manassas, VA, USA)
A-10	Zelllinie etabliert aus Zellen der Aorta thoracica von <i>Rattus norvegicus</i> , Modell für glatte Muskelzellen	ATCC (Manassas, VA, USA)
A7r5	Zelllinie etabliert aus Zellen der Aorta thoracica von <i>Rattus norvegicus</i> , Modell für glatte Muskelzellen	AG Gekle (Halle/Saale)
NIH3T3	murine embryonale Fibroblasten	AG Treisman (London, UK)
HEK293T	humane embryonale Nierenzellen mit epithelialer Morphologie, genetisch modifiziert, um das Sv40 T- Antigen zu exprimieren	AG Hüttelmaier (Halle/Saale)

3. Methoden

3.1. Mikrobiologische Methoden

3.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 500 µl einer Übernachtskultur angezogen. Am nächsten Tag wurde diese in 50 ml frischem LB-Medium verdünnt und weitere 2 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden anschließend bei 3200 xg und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in 10 ml gekühlten MgCl₂ (100 mM) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach 10 min bei 4°C und 3200 xg pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml gekühlten CaCl₂ (100 mM mit 15% Glycerol) resuspendiert, zu je 100 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.1.2. Kultivierung von Bakterienstämmen

Die verwendeten *E. coli*-Zellen *DH5α* wurden in LB-Medium bzw. auf LB-haltigen Agarplatten kultiviert. Für die Selektion wurde ein entsprechendes Antibiotikum dem LB-Medium zugesetzt. Für die Kurzzeitlagerung wurden die Zellkulturen bei 4°C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in LB-Medium mit 50% (v/v) Glycerol aufgenommen und bei -80°C gelagert.

3.1.3. Transformation chemisch kompetenter Zellen

50 µl chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 10 µl Ligationsansatz oder 1 µl des gewünschten Plasmides wurden zu den Zellen gegeben, mit der Pipettenspitze verrührt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C und eine anschließende 2 minütige Inkubation auf Eis. Zu den Zellen wurde 500 µl vorgewärmtes LB-Medium gegeben. Darauf folgend wurde das Gemisch 1h bei 37°C schüttelnd inkubiert. 100 µl wurden auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die restlichen Zellen wurden 3 min bei 2500 xg zentrifugiert, das entstandene Pellet in 100µl resuspendiert und ebenfalls auf einer entsprechenden LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C ü.N. inkubiert.

3.2. Zellbiologische Methoden

3.2.1. Allgemeine Zellkultivierung

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für alle Arbeiten zur Zellkultivierung wurde unter einer Sterilwerkbank gearbeitet. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie im Verhältnis 1:3 passagiert, dies erfolgte durch eine Behandlung mit Trypsin. Nachdem sich die Zellen von der Zellkulturplastik gelöst haben, wurde die Reaktion mit Zellkulturmedium gestoppt. Falls erforderlich, wurde zur Zellzahlbestimmung 100 µl Zellsuspension in 10 ml Casy-Ton verdünnt und mit Hilfe

des CASY-TT die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden entsprechend dem oben genannten Verhältnis in einer neuen Zellkulturschale bzw. -flasche weiter kultiviert.

Um Zellen wegzufrieren wurde die Zellsuspension nach Abstoppen der Trypsinbehandlung für 5 min bei 100 xg zentrifugiert, der Überstand abgenommen, in Einfriermedium aufgenommen, zu je 1 Mio. Zellen in Kryoröhrchen aliquotiert und zunächst bei -80°C gelagert. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in eine Kühltruhe mit -150°C zur Langzeitlagerung gestellt. Zum Auftauen von Zellen wurde das Kryoröhrchen 2-3 min im 37°C Wasserbad inkubiert, die Zellen in frisches Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturschalen bzw. -flaschen kultiviert.

3.2.2. Kultivierung von C2C12-Zellen

Für die Kultivierung der C2C12-Zellen ergaben sich einige gesonderte Vorgehensweisen. Die Zellkultur erfolgte in T-175er Zellkulturflaschen. Um die Zellen subkonfluent zu halten, wurden für die Passagierung über 2 Tage 280.000 Zellen bzw. für 3 Tage 50.000 Zellen in eine neue Zellkulturflasche eingesät. Für die Differenzierung wurden 300.000 Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte eingesät. Nach 24 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und im Differenzierungsmedium kultiviert. Die Zellen wurden jeden Tag einmal mit PBS gewaschen und in neuem Differenzierungsmedium für die Dauer der Differenzierung bzw. des Experiments kultiviert.

3.2.3. Methoden der DNA- und RNA-Transfektion

3.2.3.1. Lipofectamin

Die Transfektion von Plasmiden und siRNA erfolgte mit Hilfe von *Lipofectamin 2000* bzw. *Lipofectamin RNAiMAX* nach Herstellerangaben.

3.2.3.2. Viomer

Für die Plasmidtransfektion wurde *Viomer Red* nach Herstellerangaben verwendet. Verschiedene Mengen an C2C12-Zellen wurden entsprechend der Experimente in unterschiedlichen Zellkulturschalen 24 h vor der Transfektion eingesät (Tabelle 3-1). Am Tag der Transfektion wurde das Medium gegen Transfektionsmedium getauscht. Das Plasmid wurde mit Puffer E auf eine Konzentration von 18 ng/µl eingestellt. *Viomer Red* wurde im Verhältnis 1:25 mit Puffer E verdünnt. Ein Teil *Viomer Red*-Verdünnung wurde mit 6,8 Teilen Plasmidverdünnung (z.B. 170 µl Plasmidverdünnung und 25 µl *Viomer Red*-Verdünnung) gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Zu den Zellen wurden anschließend entsprechend der Zellkulturschale und Zellzahl verschiedene Mengen Reaktionsmix pipettiert, welche in der Tabelle 3-1 aufgeführt sind. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und ggf. differenziert (siehe 3.2.2).

Zellkulturschale	Zellzahl	Tansfektionsmedium	Reaktionsmix
96-Well	6000	100 µl	10 µl
12-Well	87500	900 µl	100 µl
6-Well	150.000	1,8 ml	200 µl

Tabelle 3-1: Angaben zur Transfektion von C2C12-Zellen mit *Viomer Red*

Für die Transfektion von siRNA bzw. *miRNA mimics* wurde *Viromer Blue* nach Herstellerangaben verwendet. 150.000 C2C12-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion pro Well in 6-Well-Platten eingesät. Am Tag der Transfektion wurde das Medium gegen 1,8 ml Transfektionsmedium getauscht. 100 pmol siRNA wurden mit Puffer F auf 22 µl eingestellt. 2,2 µl *Viromer Blue* wurden mit 197,8 µl Puffer F verdünnt. Die 22 µl siRNA-Verdünnung wurde mit 198 µl *Viromer Blue*-Verdünnung gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Zu den Zellen wurde anschließend 200 µl Reaktionsmix pipettiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und ggf. differenziert (siehe 3.2.2).

3.2.3.3. Lentiviral

6 Mio. HEK293T-Zellen wurden 24 h vor Transfektion in einer 10 cm-Schale eingesät. 77 µg Plasmid (50% pLVX, 37% psPAX2, 13% pMD2.G) wurden mit 840 µl dest. Wasser, 120 µl CaCl₂ (2 M) und 940 µl 2x PP-Puffer gemischt und 20 min bei RT inkubiert. 1800 µl des Reaktionsgemischs wurden tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6 h erfolgte ein Glycerolschock mit 3 ml Glycerolschockpuffer für 3 min. Am nächsten Tag wurde das alte Medium verworfen und gegen neues ersetzt. An den zwei darauf folgenden Tagen wurde das virushaltige Medium gesammelt. 10 ml Medium wurden mit 2,5 ml 50%igen PEG6000, 1,06 ml NaCl (4 M) und 1,14 ml PBS versetzt, für 1,5 h bei 4°C inkubiert und für 10 min bei 7000 xg zentrifugiert. Das virushaltige Pellet wurde in 500 µl Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) aufgenommen, um eine 20x konzentrierte Viruslösung zu erhalten. 20.000 C2C12-Zellen wurden 24 h vor der Infektion pro Well in 24-Well-Platten eingesät. Die Zellen wurden mit 10x konzentrierter Viruslösung und 10 µg/ml Polybren für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Differenzierung der Zellen initiiert.

3.2.4. Zellproliferationsassay

C2C12-Zellen wurden hierfür in 96-Well transfiziert (siehe 3.2.3.2) und in 100 µl Medium kultiviert. Zur Bestimmung der vitalen Zellen wurde pro Well 10 µl CCVK-I-Lösung zugegeben und 90 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 450 nm bestimmt. Da die Extinktion bei 450 nm proportional zur Anzahl vitaler Zellen ist, lässt sich eine relative Aussage über die Menge an vitalen Zellen treffen.

3.2.5. Immunfluoreszenzfärbung

C2C12-Zellen wurden in 12-Well-Platten auf Deckgläsern eingesät und wie unter 3.2.3.2 beschrieben transfiziert und kultiviert. Das Deckglas mit den Zellen wurde mit PBS gewaschen und mit Formaldehyd ü.N. bei 4°C fixiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS, eine Inkubation in Triton X100 (0,2%) für 10 min bei RT und die Inkubation für 30 min in Blocking-Lösung bei RT. Danach wurden die Zellen 1 h mit primärem Antikörper in Blocking-Lösung bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe in PBS. Anschließend wurden die Zellen 45 min mit sekundärem Antikörper in Blocking-Lösung bei RT inkubiert. Die Proben wurden danach in dest. Wasser und Ethanol getaucht und 10 min getrocknet. Auf einem Objektträger wurden

20 μ l *ProLong Gold antifade* aufgetragen und das Deckglas mit der Zellseite auf den Objektträger gelegt, 30 min trocknen gelassen und anschließend mit Nagellack versiegelt.

3.2.1. Mikroskopie

Mikroskopieaufnahmen der Zellkulturen erfolgten mit dem Lichtmikroskop *EVOS xl core* unter Verwendung folgender Objektive:

- LPlan PH2 4x/0,13
- LPlan FL PH2 10x/0,25

Mikroskopieaufnahmen von Immunfluoreszenz gefärbten Präparaten wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop *Axio Imager.M1* unter Verwendung folgender Objektive aufgenommen:

- ECPlan-NEOFLUAR 10x/0,3 PH1
- Plan-NEOFLUAR 20x/0,5

3.3. Biochemische Methoden

3.3.1. Proteinextraktion mit RIPA-Puffer

Verwendete Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde RIPA-Puffer, welcher mit Protease Inhibitor Cocktail (1x) versetzt war, zu den Zellen gegeben, mit Hilfe eines Zellschabers die Zellen gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden 10 min bei 20.000 xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration wurde mit Hilfe des *Micro BCA Protein Assay Kit* nach Herstellerangaben in 96-Well-Platten bestimmt. Die Proteinlysate wurden nach der Messung mit Lämmli-puffer versetzt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Proteinauftrennung wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet, welche aus einem 5%igen Sammelgel und einem 8%igen Trenngel bestehen (siehe 2.5.1). Die Proteinlysate wurden 5 min bei 95°C aufgeköcht um mögliche sekundäre, tertiäre oder quartäre Strukturen zu entfernen. 30 μ g Lysat pro Probe wurden auf einem Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Laufpuffer bei 130 V bis die Bande aus Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte.

3.3.1. Western-Blot und Entwicklung

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer *Blotting*-Kammer von BioRad auf eine *Immobilon-FL Blot*-Membran unter Verwendung des Transferpuffers bei 100 V für 1,25 h übertragen.

Die Membran wurde 1 h in Blocking-Lösung bei RT inkubiert, danach erfolgte die Inkubation mit primären Antikörper in Blocking-Lösung ü.N. bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 min bei RT mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper in Blocking-Lösung 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde die Membran mit Hilfe des *Odyssey CLx infrared Imaging Systems* entwickelt und quantifiziert.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. qRT-PCR

3.4.1.1. mRNA Quantifizierung

RNA wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des *miRCURY RNA Isolation Kit* isoliert. Die Konzentration wurde mit Hilfe des *Nanodrop 2000c* Spektrophotometers bestimmt. Im Anschluss fand die cDNA-Synthese mittels *miScript II RT Kit* nach Herstellerangaben statt. Die cDNA wurde 1:5 verdünnt. Die qRT-PCR erfolgte mit dem *DyNAmo ColorFlash SYBR Green* und folgenden Reaktionsansatz sowie Reaktionsprogramm:

Reaktionsansatz		PCR-Programm	
SYBR Green	5 µl	95°C	10 min
Primermix for/rev (10 µM)	0,25 µl	45 Zyklen	
H ₂ O	3,25 µl	95°C	10 s
Probe	1,5 µl	60°C	30 s

Für die Auswertung der Daten am Computer wurde die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode angewandt (Livak *et al.*, 2001).

3.4.1.2. miRNA Quantifizierung

RNA wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des *miRCURY RNA Isolation Kit* isoliert. Die Konzentration wurde mit Hilfe des *Nanodrop 2000c* Spektrophotometers bestimmt. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese mittels *miScript II RT Kit* nach Herstellerangaben. Die cDNA wurde 1:10 verdünnt. Für die qRT-PCR wurde mit dem *miScript SYBR Green PCR Kit* und folgenden Reaktionsansatz sowie Reaktionsprogramm gearbeitet:

Reaktionsansatz		PCR-Programm	
SYBR Green	5 µl	95°C	15 min
Vorwärtsprimer	1 µl	45 Zyklen	
Rückwärtsprimer	1 µl	94°C	15 s
H ₂ O	2 µl	55°C	30 s
Probe	1 µl	70°C	30 s

Für die reverse Transkription von miRNAs mit *Stemloop*-Primern wurde folgender Ansatz und Reaktionsprogramm verwendet:

Reaktionsansatz		PCR-Programm	
RNA	1 µg	16 °C	30 min
<i>Stemloop</i> -Primer (10 µM)	1 µl	60 Zyklen	
Rückwärtsprimer HPRT (10 µM)	1 µl	16°C	30 s
H ₂ O	13 µl	42°C	30 s
5 min bei 70°C, danach auf Eis lagern		50°C	1 s
Reaktionspuffer 5X	4 µl	Abschließend	
dNTPs	2 µl	85°C	5 min
reverse Transkriptase	1 µl		

Alle weiteren Reagenzien stammen aus dem *Verso cDNA Synthesis Kit*. Die cDNA wurde anschließend 1:500 verdünnt. Die qRT-PCR erfolgte mit dem *DyNAmo ColorFlash SYBR Green* und folgendem Reaktionsansatz sowie Reaktionsprogramm:

Reaktionsansatz		PCR-Programm	
SYBR Green	5 µl	95°C	15 min
Vorwärtsprimer (20 µM)	0,25 µl	45 Zyklen	
Rückwärtsprimer (20 µM)	0,25 µl	94°C	15 s
H ₂ O	3 µl	55°C	30 s
Probe	1,5 µl	72°C	30 s

Die Auswertung der Daten erfolgte im Anschluss am Computer nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak *et al.*, 2001).

3.4.2. DNA-Modifizierung und Klonierung

3.4.2.1. Plasmidpräparation

Zur Plasmidaufreinigung von Bakterienkulturen wurde entweder das *QIAprep Spin Miniprep Kit* oder das *Qiagen Plasmid Maxi Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration wurde mit Hilfe des *Nanodrop 2000c* Spektrophotometers bestimmt.

3.4.2.2. PCR

Eine PCR wurde mit folgendem Reaktionsansatz und PCR-Programm durchgeführt:

Reaktionsansatz		PCR-Programm	
Q5 Reaktionspuffer (5x)	10 µl	98°C	30 s
Vorwärtsprimer (10 µM)	2,5 µl	35 Zyklen	
Rückwärtsprimer (10 µM)	2,5 µl	98°C	10 s
dNTPs Mix (10 µM)	1 µl	58°C	20 s
Q5 Polymerase	0,5 µl	72°C	40 s
cDNA	3,5 µl	Abschließend	
H ₂ O	30 µl	72°C	2 min

Die Primer wurden so designt, dass eine optimale Amplifikation bei 58°C durchgeführt werden konnte.

3.4.2.3. Plasmidklonierung

Plasmide und PCR-Amplifikate wurden mit Enzymen von *New England Biolabs (NEB)* nach folgendem Ansatz verdaut: 1-3 µg Plasmid bzw. das gesamte gelgereinigte PCR-Amplifikat, 3 µl *Cut smart* Puffer, jeweils 1 µl der gewünschten Enzyme, dest. Wasser um ein Endvolumen von 30 µl zu erreichen. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Anschließend folgte eine Gelaufreinigung mittels *MinElute Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden danach mit Hilfe der *T4 DNA Ligase* nach folgendem Ansatz ligiert: 2 µl Insert, 6 µl Plasmid, 1 µl Ligasepuffer (10x), 0,5 µl *T4 DNA Ligase*, 0,5 µl dest. Wasser. Die Ligation erfolgte ü.N. bei 16°C. Der gesamte Ligationsansatz wurde zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen verwendet (siehe 3.1.3).

3.4.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde 1 g Agarose abgewogen und mit TAE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurde Ethidiumbromid zugegeben (0,01% v/v) und die Agaroselösung in eine Gelkammer gegossen, in der sich ein Kamm befand. Es wurde gewartet bis die Agarose eine gallertartige Konsistenz annahm. Die Proben wurden mit 6x *DNA Loading Dye* versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V. Zur Visualisierung und Dokumentation wurde der *GelStick „Touch“ UV-Transilluminator* verwendet. Falls notwendig wurden DNA-Banden mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt.

3.4.2.5. SOMA-Mutagenese

Die Mutagenese wurde entsprechend der Publikation von Pfirrmann *et al.* 2013 durchgeführt. Für die Mutagenesereaktion wurde zuerst der Mutageneseprimer am 5'-Ende phosphoryliert. Hierfür wurden 200 pmol Primer in einen 50 µl Reaktionsansatz mit 5 µl Reaktionspuffer (10x), 0,25 µl ATP (200 mM) und 1 µl T4 Polynucleotidkinase gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reaktion folgte eine 10 minütige Inkubation bei 65°C.

Für die Mutagenesereaktion wurde folgender Reaktionsansatz und Reaktionsprogramm verwendet:

Reaktionsansatz		PCR-Programm	
Q5 Reaktionspuffer (5x):	10 µl	98°C:	1 min
dNTPs (10 µM)	1 µl	30 Zyklen	
NAD ⁺ (5 mM)	10 µl	98°C:	1 min
Plasmid (100 ng/µl)	1 µl	65°C:	1 min
Primer (10 µM)	1 µl	72°C:	5 min
Q5 Polymerase	1 µl		
<i>Taq</i> DNA Ligase	1 µl		
H ₂ O	25 µl		

Danach wurde der PCR-Ansatz mit 2 µl DpnI und 5 µl DpnI-Puffer versetzt und 5 h bei 37°C inkubiert um das Ausgangsplasmid abzubauen. Zum Schluss wurde der

Reaktionsansatz mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und für eine Transformation verwendet (siehe 3.1.3).

3.4.2.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben übernahm *euofins MWG Operon*, Anzinger Straße 7a, 85560 Edersberg.

3.4.3. Luciferase Reporterassay

Der Luciferase Reporterassay wurde mit Hilfe des *Dual-Luciferase Reporter Assay* durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und zur Lyse mit 100 µl passiven Lysepuffer für 15 min auf einen Schüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei -80°C gelagert. Danach wurden die Proben bei 20.000 xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. 20 µl des Überstands wurden in eine *96-Lochplatte für Luciferase-Assay* überführt und die Platte in das *GloMax 96 Microplate Luminometer* gestellt. Durch Zugabe von 50 µl *LARII-Lösung* durch das Luminometer wurde die Fireflyaktivität bestimmt. Anschließend wurde durch das Luminometer *Stop & Glo-Lösung* zu der Probe zugegeben und die Renillaaktivität gemessen. Zur Bestimmung der Reporteraktivität wurde die Fireflyaktivität auf die Renillaaktivität normalisiert.

Für den Luciferase Reporterassay wurden die Zellen entsprechend dem Protokoll von Abschnitt 3.2.3.2 entweder mit 1,5 ng pMIR-Glo Plasmid oder 500 ng p3D.A-Luc und 50 ng ptkRL transfiziert. Um die Plasmidmenge zu erreichen, welche standardmäßig transfiziert wurde, wurde mit pEF-plink aufgefüllt.

3.4.4. miTRAP

20 µg des Plasmids *pCDNA 3.1 (+) MS2-tag 3'UTR-MAL mouse* wurden mit 5 µl *XhoI* und 10 µl Puffer in einem 100 µl Ansatz ü.N. linearisiert. Am nächsten Tag wurde die Probe mit Hilfe des *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µl Nukleasen-freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde mit Hilfe des *RiboMAX T7 Kit* eine *in vitro* Transkription der MRTF-A 3'UTR mit *MS2-Loop*-Sequenz in einen 50 µl Ansatz nach Herstellerangaben durchgeführt. Danach wurden 5 µl DNase zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Schluss fand eine Aufreinigung der RNA mittels *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Kit* statt.

Um die RNA an die Amylose-Beads zu binden wurden 30 µl Amylose-Beads zunächst viermal mit BB-Puffer gewaschen. Die Amylose-Beads wurden anschließend mit 1 ml BB-Puffer und 50 pmol rekombinanten Maltose-Bindeprotein und *MS2-Loop*-Bindeprotein (MBP-MS2BP) versetzt und 30 min bei RT rotierend inkubiert. Danach wurden die Amylose-Beads mit 50 µl BSA (10 mg/ml), 950 µl BB-Puffer und 4 µl Hefe tRNA (10 µg/ml) erneut 30 min bei RT rotierend inkubiert. Nach 3 Waschschrritten mit BB-Puffer wurden 20 µl MRTF-A 3'UTR mit *MS2-Loop*-Sequenz RNA mit Heparin (11µg/ml) in je 1 ml BB-Puffer zu den Amylose-Beads gegeben und 1 h bei RT rotierend inkubiert. Als Kontrolle wurde die *MS2-Loop*-Sequenzen allein verwendet.

In der Zwischenzeit wurden ca. 6 Mio. C2C12-Zellen in 1,2 ml BB-Puffer lysiert, welcher mit Proteaseinhibitor ergänzt war. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Das Lysat wurde anschließend 10 min bei 12.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Amylose-Beads, mit der nun immobilisierten RNA, wurden mit 500 µl BB-Puffer (mit 11 µg/ml Herparin versetzt) gewaschen. Anschließend wurde dieser Ansatz mit 500 µl Zelllysats, 500µl BB-Puffer (mit 11 µg/ml Herparin versetzt), 2 mM DTT und 4 µl (240 U) RNasin versetzt und 30 min bei RT rotierend inkubiert. In dieser Zeit binden miRNAs und Proteine an die MRTF-A 3'UTR. Danach wurde die Probe viermal mit 500 µl BB-Puffer (mit 11 µg/ml Herparin versetzt) gewaschen.

Für die Elution der RNA wurden 150 µl 15 mM Maltose zugegeben und 12 min bei RT rotierend inkubiert. Das Maltoseeluat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Elutionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Zur Isolation der RNA wurden 280 µl des Maltoseeluats mit 80 µl Nukleasen-freiem Wasser, 80 µl NH₄-Acetat (5 M) und 400 µl Phenol/Chloroform (5:1) versetzt, gut gemischt und 15 min bei 15.000 xg und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 100%igen Ethanol und 1 µl Glykogen versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei -20°C inkubiert und danach 10 min bei 4°C und 15.000 xg zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 80%igen Ethanol gewaschen und anschließend in 24 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen.

Als unbehandelte Vergleichsprobe wurden 200 µl des Zelllysats 15 min mit Proteinase K (20 mg/ml) verdaut und anschließend nach demselben Protokoll für die RNA-Isolation verwendet.

Für die Proteinextraktion wurden die Amylose-Beads mit gebundener RNA und Proteinen direkt in 25 µl LDS-Puffer (mit 10% β-Mercaptoethanol) aufgenommen.

3.5. Fehlerberechnung und Statistik

Die Darstellung der Fehlerbalken in dieser Arbeit erfolgt als Standardfehler des Mittelwerts und errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Standardfehler} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\sqrt{\text{Anzahl biologischer Replikate}}}$$

Der Standardfehler stellt damit ein Maß für die durchschnittliche Abweichung des durchschnittlich errechneten Wertes zum wahren Wert dar.

Für die Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde ein Einstichproben-t-Test verwendet, wenn der Kontrollwert auf 1 normalisiert wurde. Andernfalls wurde ein Zweistichproben-t-Test zur Bestimmung der statistischen Signifikanz verwendet.

4. Ergebnisse

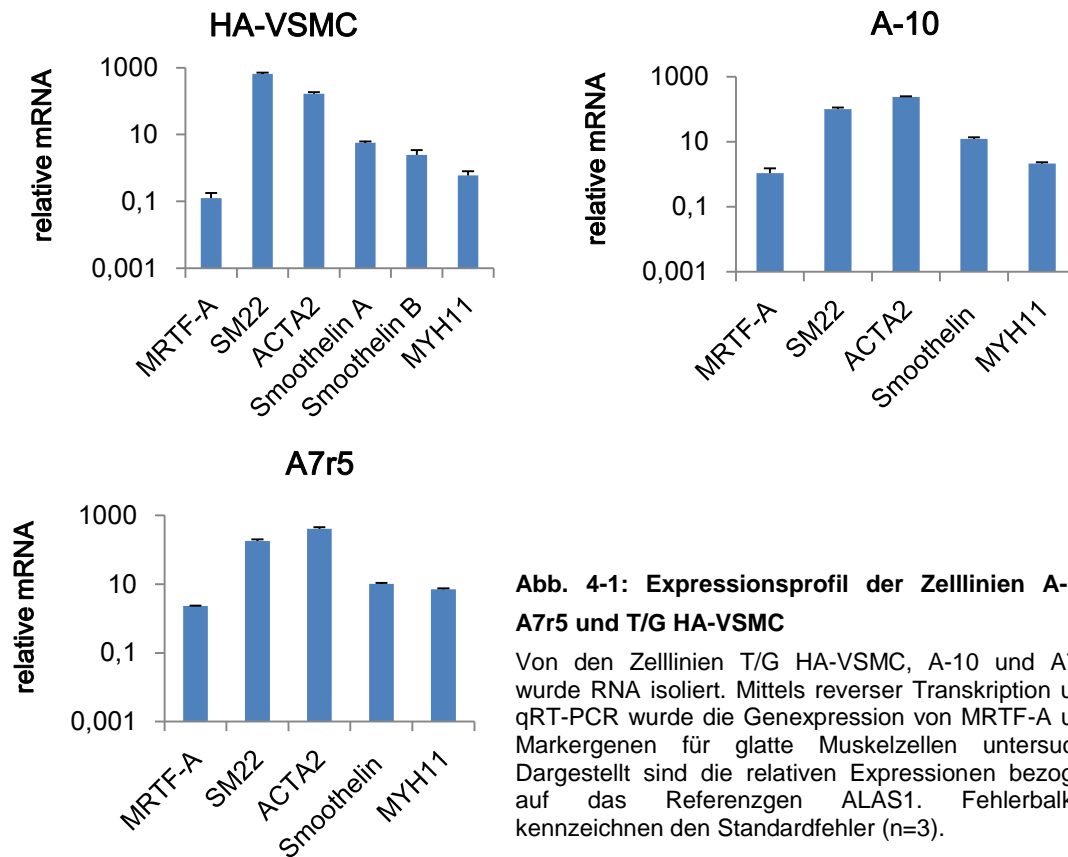
4.1. Etablierung eines Modellsystems zur Untersuchung der Expressionsregulation von MRTF-A

4.1.1. Untersuchung von Muskelzelllinien

MRTF-A ist ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, der über Zielgene wie SM22 α , Glattmuskelmyosin, Glattmuskel- α -Aktin (ACTA2), Skelettmuskel- α -Aktin (ACTA1) und Skelettmuskel- α -MHC auch an der Differenzierung von Muskelgewebe beteiligt ist (Du *et al.* 2004, Scharenberg *et al.* 2010, Sakuma *et al.* 2008). Die Regulation von MRTF-A erfolgt dabei über das Mengenverhältnis von freiem Aktin und Aktinfilamenten in der Zelle (Posern & Treisman 2006). Über die Genexpression von MRTF-A ist hingegen noch nicht sehr viel bekannt. Jiang *et al.* konnten 2010 zeigen, dass miR-1a-3p die Zielgene SM22a und ACTA2 reguliert. Dies führte die Arbeitsgruppe zu der Annahme, dass MRTF-A durch miR-1a-3p posttranskriptional reguliert sein könnte und somit an der Differenzierung von glatten Muskelzellen beteiligt ist. Um dies zu untersuchen ist ein geeignetes Modellsystem notwendig, in dem neben MRTF-A auch miRNAs exprimiert werden. Weiterhin muss das Modellsystem einen undifferenzierten und einen differenzierten Zustand besitzen, um mögliche Unterschiede vergleichen zu können.

Hierfür wurde mit der Untersuchung der Zelllinie T/G HA-VSMC begonnen, welche auch von Jiang *et al.* verwendet wurde. Neben T/G HA-VSMC wurden auch die Zelllinien A7r5 sowie A10 untersucht. All diese Zelllinien entstammen glattem Muskelgewebe. Zunächst wurde die Expression von MRTF-A und verschiedener glattmuskelspezifischer Gene auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR untersucht.

In allen drei Zelllinien sind SM22 und ACTA2 am stärksten exprimiert. Diese Gene werden sowohl im synthetischen als auch kontraktile Phänotyp von glatten Muskelzellen exprimiert (Rensen *et al.* 2006). Smoothelin und MYH11 sind beides Zytoskelettproteine. Da sie vermehrt im kontraktile Phänotyp von glatten Muskelzellen exprimiert werden, werden sie als Marker für die Differenzierung von glatten Muskelzellen verwendet (van der Loop *et al.* 1996, Aikawa *et al.* 1993). Die Expressionen von Smoothelin und MYH11 (Glattmuskel-MHC) sind im Vergleich zu SM22 α und ACTA2 ca.10-fach geringer. Auffällig ist, dass die Expression von MRTF-A in allen drei Zelllinien, im Vergleich zu den anderen Genen, am geringsten ausfällt (Abb. 4-1).



Zusätzlich zu den glatten Muskelzellen wurde die Zelllinie C2C12 untersucht. C2C12 wurde aus Skelettmuskelgewebe gewonnen. Genau wie bei den ersten Zelllinien wurde auch C2C12 mittels qRT-PCR auf die Expression von MRTF-A und Markergenen untersucht.

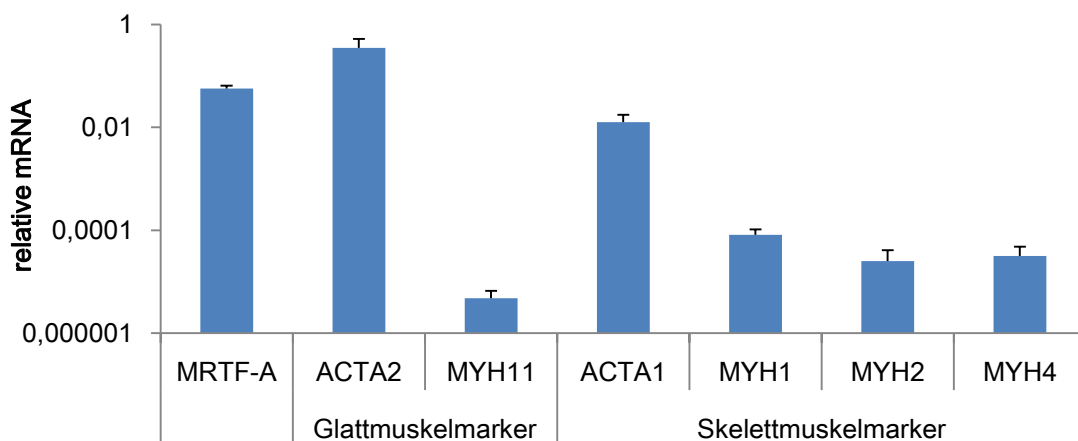


Abb. 4-2: Expressionsprofil von C2C12

Von der Zelllinie C2C12 wurde RNA isoliert. Mittels reverser Transkription und qRT-PCR wurde die Genexpression von MRTF-A und Markergenen für glatte und Skelettmuskelzellen untersucht. Dargestellt sind die relativen Expressionen bezogen auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n=3).

MYH1, MYH2 und MYH4 sind die kodierenden Gene für die schweren Ketten der Myosine 2X, 2A und 2B und kommen als solches nur in Skelettmuskeln vor (Schiaffino & Reggiani 2011). Ferner konnte gezeigt werden, dass MYH4 auch als Marker für

differenzierte C2C12 verwendet werden kann (Wang *et al.* 2013). Es fällt auf, dass diese Gene in kultivierten C2C12 eine sehr schwache Expression aufweisen. Die Expression von ACTA1, welches in Skelettmuskeln exprimiert wird (Akkari *et al.* 1994), zeigt im Vergleich dazu eine weitaus höhere Expression. Die Glattmuskelmarker ACTA2 und MYH11 werden hingegen sehr unterschiedlich exprimiert. ACTA2 zeigt eine vergleichbare Expression wie die verwendeten Referenzgene auf. Wogegen MYH11 eine vielfach schwächere Expression besitzt. Bezogen auf die Glatt- und Skelettmuskelmarker besitzt MRTF-A eine vergleichbare Expression wie ACTA1 (Abb. 4-2).

Neben der Expression der mRNA wurde auch die Expression auf Proteinebene von MRTF-A untersucht. Zu diesem Zweck wurden Proteinlysate der vier untersuchten Zelllinien mit Hilfe des Western-Blots auf Ihre MRTF-A Vorkommen analysiert (Abb. 4-3).

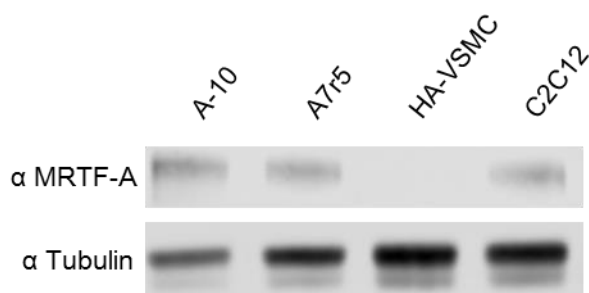


Abb. 4-3: Proteinexpression von MRTF-A in glatten Muskel- und Skelettmuskelzellen

Von den Zelllinien A-10, A7r5, T/G HA-VSMC und C2C12 wurden 30 µg eines Proteinlysats mittels Western-Blot analysiert. Untersucht wurde die Expression von MRTF-A mit einem anti-MRTF-A Antikörper. Als Ladekontrolle wurde Tubulin mit einem anti-Tubulin Antikörper detektiert.

Die Western-Blot Analyse zeigte, dass für die Zelllinien A-10, A7r5 und C2C12 MRTF-A Protein detektiert werden kann. In der Zelllinie T/G HA-VSMC hingegen konnte kein MRTF-A gefunden werden (Abb. 4-3).

4.1.2. Quantifizierung von miRNA in Muskelzellen

Neben Markergenen und im besonderen MRTF-A, muss ein passendes Modellsystem auch miRNAs exprimieren. Eine Möglichkeit stellt dabei die Verwendung des Northern-Blots dar (Várallyay *et al.* 2008). Die Entwicklung des Gels erlaubt eine semi-quantitative Auswertung. Für diese Arbeit war eine Echtzeit-Quantifizierung notwendig. Zu diesem Zweck wurde die qRT-PCR-Methode für die miRNA Quantifizierung angepasst. Die Signaldetektion erfolgte weiterhin mit dem SYBR-Green-Farbstoff. Nach mehreren Etablierungsarbeiten und Austestung verschiedener Systeme wurde entschieden, auf Grund der Sensitivität, das *miScript-PCR-Kit* von Qiagen zu verwenden

Der nächste Schritt war die miRNA Messung in den Kandidatenzelllinien. Eine der prominentesten miRNAs in Muskelgewebe ist dabei miR-1, welche sich an Differenzierungsprozessen sowohl in glatten als auch Skelettmuskelgewebe beteiligt (Jiang *et al.* 2010, Minami *et al.* 2012, Braun & Gautel 2011). Nach Voruntersuchungen an der 3'UTR von MRTF-A mRNA wurden miR-1a-3p und miR-206-3p als mögliche Kandidaten für eine posttranskriptionale Regulation identifiziert (pers. Mitteilung Leitner & Posern). Zusammen mit den Daten von Jiang *et al.* 2010 stellte miR-1a-3p zum

damaligen Zeitpunkt den interessantesten Kandidaten dar. Daher wurde für die ersten Untersuchungen die Expression von miR-1a-3p in den Kandidatenzelllinien analysiert. Als Positivkontrolle wurden NIH3T3-Zellen mit dem Plasmid *pSuper-miR1* transfiziert. Die Daten zu diesem Versuch sind in Abb. 4-4 zusammengefasst und zeigen, dass keine Zelllinie bezogen auf die Kontrolle miR-1a-3p exprimierte.

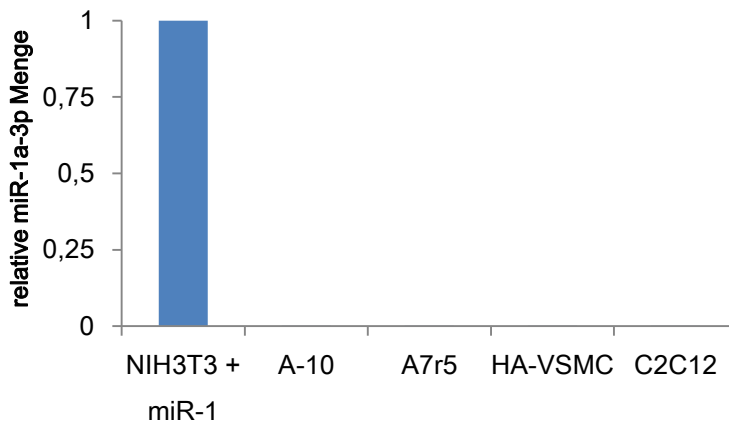


Abb. 4-4: Quantifizierung von miR-1a-3p in verschiedenen Zelllinien

RNA wurde aus den dargestellten Zelllinien isoliert und auf ihren miR-1a-3p-Gehalt mittels *miScript-PCR-Kit* und qRT-PCR untersucht. Als Positivkontrolle wurden NIH3T3-Zellen mit einem miR-1a-3p-Expressionsplasmid transfiziert. Dargestellt ist die relative Expression von miR-1a-3p bezogen auf die Positivkontrolle. Die Normalisierung erfolgte auf das Referenzgen U6.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bis auf T/G HA-VSMC in allen Zelllinien MRTF-A sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene zu finden ist (vergleiche Abb. 4-1, 4-2, 4-3). Bei Betrachtung der Differenzierungsmarker für Skelettmuskelzellen, zeigt sich, dass diese bezogen auf Referenzgene nur schwach exprimiert sind (Abb. 4-2). Dies trifft auch auf Smoothelin und MYH11 in den glatten Muskelzellen zu (Abb. 4-1). Weiterhin handelt es sich bei allen Zelllinien um proliferierende Zellen. Die Tatsache, dass die Differenzierungsmarker nur schwach exprimiert sind und differenzierte Zellen nicht proliferieren, führten zu den Schluss, dass es sich hier um undifferenzierte glatte Muskelzellen (Owens *et al.* 2004, Kang & Hata 2012) bzw. Skelettmuskelzellen handelt (Latella *et al.* 2000, Nadal-Ginard 1978, Caravatti *et al.* 1982). Die fehlende Expression von miR-1a-3p ist ein weiterer Hinweis für undifferenzierte Zellen (Abb. 4-4) (Jiang *et al.* 2010, Minami *et al.* 2012, Braun & Gautel 2011).

Da für die weiteren Versuche die Rolle von MRTF-A während der Differenzierung näher betrachtet werden soll, ist eine Untersuchung des undifferenzierten und differenzierten Zustands von Zellen essenziell. Im Falle der glatten Muskelzellen sind bisher keine Protokolle zur Differenzierung in den kontraktilen Phänotyp bekannt. Die Verwendung von primären Kulturen ist diffizil, da beschrieben ist, dass glatte Muskelzellen aus dem kontraktilen spontan in den synthetischen Phänotyp dedifferenzieren (Owens *et al.* 2004, Kang & Hata 2012). C2C12-Zellen sind ein Modellsystem für Skelettmuskeldifferenzierung mit etabliertem Protokoll für eine irreversible Differenzierung zu polynukleären Myotuben (Okazaki & Holtzer 1966, Latella *et al.* 2000). Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche mit C2C12-Zellen gearbeitet.

4.2. MRTF-A in der Differenzierung von C2C12-Zellen

4.2.1. Expressionsprofil differenzierender C2C12-Zellen

Für die Arbeit wurde zunächst die Differenzierung von C2C12-Myoblasten zu polynukleären Myotuben untersucht und mit Hilfe von Markergenen die Differenzierung überprüft. Hierzu wurden C2C12-Zellen für sieben Tage differenziert. An den Zeitpunkten Tag 0, 4 und 7 wurde jeweils die mRNA Expression mittels qRT-PCR gemessen, sowie Aufnahmen von den morphologischen Veränderungen gemacht. Diese Daten sind in Abb. 4-5 dargestellt.

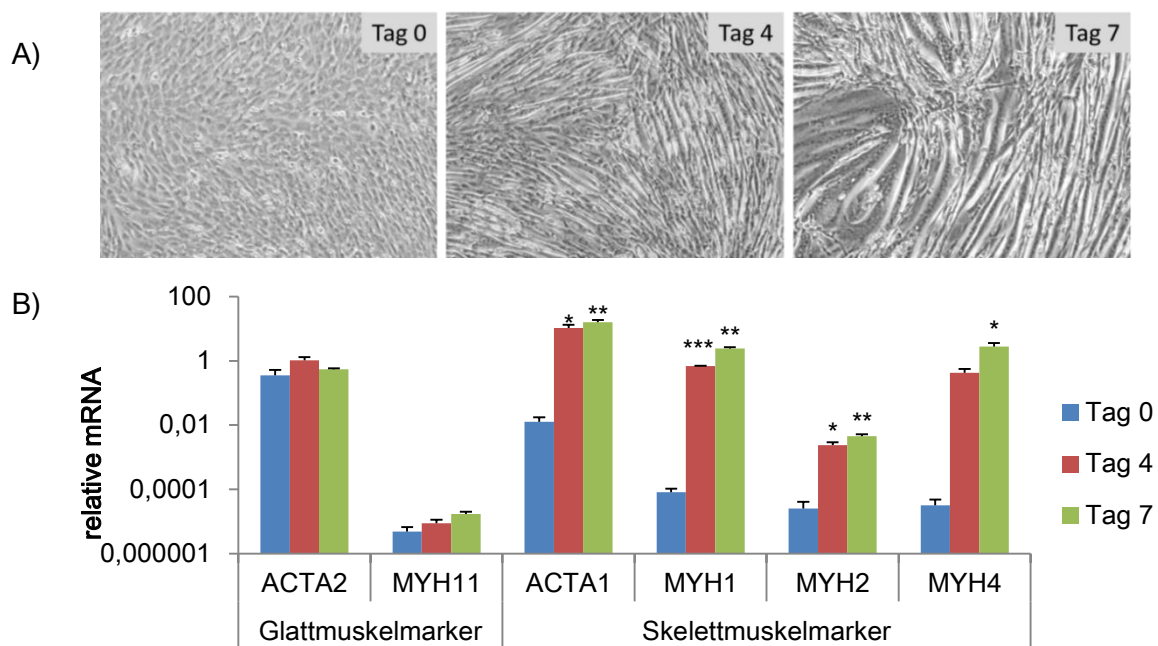


Abb. 4-5: C2C12-Differenzierung induziert die Expression von Skelettmuskelmarkern

A) Abgebildet sind Aufnahmen von C2C12-Zellen im Verlauf der Differenzierung über 7 Tage. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA isoliert und mittels qRT-PCR auf die Expression verschiedener Differenzierungsmarker für glatte und Skelettmuskelzellen untersucht. B) Dargestellt ist die relative Genexpression normalisiert auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. Statistische Signifikanz wurde mit Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Tag-0-Probe bestimmt: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=3$).

Die Differenzierung von C2C12 führt zu morphologischen Änderungen der Zellen. An Tag 0 ist ein konfluenter Zellrasen zu erkennen, welcher nach 4 Tagen erste Myotuben aufzeigt, die im weiteren Verlauf der Differenzierung stetig wachsen und so den Großteil der Zellen ausmachen (Abb. 4-5A vergleiche Tag 0, 4 und 7). In dieser Zeit ändert sich auch das Expressionsverhalten der Zellen (Abb. 4-5B). Die Expression von ACTA2 und MYH11 als Glattmuskelmarker bleibt unverändert. ACTA1, MYH1, MYH2 und MYH4 als Skelettmuskelmarker zeigen hingegen eine signifikant erhöhte Expression an Tag 4 und 7 im Vergleich zu Tag 0, was durch eine Differenzierung der Myoblasten zu kontrahierenden Myotuben zu erklären ist. Diese Gene wurden im weiteren Verlauf der Arbeit als Differenzierungsmarker verwendet.

4.2.2. Veränderte MRTF-A-Expression während Differenzierung

Sollte eine Regulation von MRTF-A während der C2C12-Differenzierung stattfinden, müsste sich dies in einer veränderten Expression von MRTF-A widerspiegeln. Um diesem Aspekt auf den Grund zu gehen, wurde die Expression von MRTF-A während der C2C12-Differenzierung untersucht. Bei einer posttranskriptionalen Regulation durch miRNAs kann eine Reprimierung des Zielgens auf zwei Arten entstehen: entweder es kommt zu einer Translationsinhibierung oder die gebundene mRNA wird degradiert (Doench *et al.* 2003, Hutvágner & Zamore 2002, Hutvágner 2005, Saxena *et al.* 2003, Zeng *et al.* 2003). Die Entscheidung über welchen Weg die Reprimierung erfolgt hängt zum Einem vom Grad der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA ab und zum Andern davon welches Argonautenprotein beteiligt ist. Je höher die Komplementarität, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Degradation der mRNA. Aus diesem Grund wurde sowohl die Transkriptebene als auch die Proteinebene von C2C12 für MRTF-A untersucht.

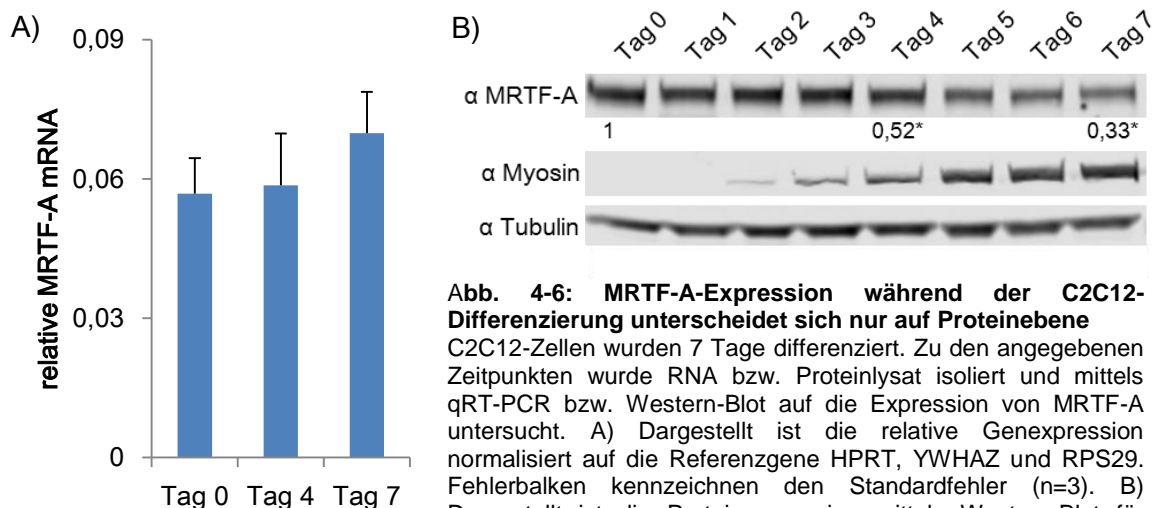


Abb. 4-6: MRTF-A-Expression während der C2C12-Differenzierung unterscheidet sich nur auf Proteinebene

C2C12-Zellen wurden 7 Tage differenziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA bzw. Proteinlysate isoliert und mittels qRT-PCR bzw. Western-Blot auf die Expression von MRTF-A untersucht. A) Dargestellt ist die relative Genexpression normalisiert auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n=3). B) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blot für

MRTF-A und Myosin. Quantifiziertes MRTF-A Protein normalisiert auf die Tag-0-Probe ist unter der MRTF-A-Bande angegeben. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Statistische Signifikanz wurde mit Einstichproben-t-Test bezogen auf die Tag-0-Probe bestimmt: * $P \leq 0,05$. (n=4)

Dabei ist zu erkennen, dass sich die Menge an MRTF-A mRNA während der Differenzierung nicht ändert (Abb. 4-6). Der Proteingehalt von MRTF-A bleibt bis Tag 3 nahezu unverändert. An Tag 4 reduziert sich der Proteingehalt um ca. 50% und verringert sich bis Tag 7 weiter auf ca. 30%. Der stetig zunehmende Myosin Gehalt spiegelt unterdessen die Differenzierung der Zellen zu kontraktile Myotuben wieder. Myosin wurde im weiteren Verlauf als Differenzierungsmarker auf Proteinebene verwendet.

Allerdings können von der Proteinmenge keine genauen Rückschlüsse zu der MRTF-A Aktivität geschlossen werden. Somit wäre es denkbar, dass MRTF-A in undifferenzierten Zellen inaktiv im Zytoplasma vorliegt, wogegen es in differenzierten Zellen im Kern lokalisiert ist und dort entsprechende Zielgene aktiviert. Aus diesem Grund wurde als nächstes die Aktivität von MRTF-A bestimmt. Hierfür wäre die Untersuchung der Expression von Zielgenen von MRTF-A, z.B. ACTA1 (Scharenberg

et al. 2010), möglich. Allerdings können diese Zielgene auch durch andere Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Dies wird durch die Tatsache sichtbar, dass die Expression von ACTA1 während der Differenzierung zunimmt, obwohl das MRTF-A Protein abnimmt (vergleiche Abb. 4-5 und 4-6). Die Aktivität wurde deshalb mit Hilfe der Promotoraktivität gemessen. Dafür wurden die Zellen nach 6-tägiger Differenzierung mit den Reporterplasmiden *p3D.A-Luc* und *ptkRL* zur Normalisierung transfiziert. Nach 24 h wurde die Aktivität der Fireflyluciferase bestimmt. Die Aktivität wurde mit undifferenzierten Zellen verglichen, die auf dieselbe Weise transfiziert wurden.

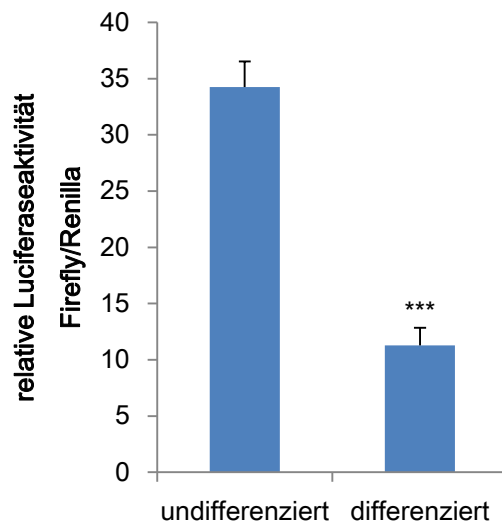


Abb. 4-7: MRTF-A Aktivität verringert sich in differenzierenden C2C12-Zellen.

C2C12-Zellen wurden nach 6-tägiger Differenzierung und undifferenziert mit SRF/MRTF-A Reporterplasmid (*P3D.A-Luc*, exprimiert Fireflyluciferase) und *ptkRL* (exprimiert Renillaluciferase zur Normalisierung) transfiziert. Nach 24 h wurde die Luciferaseaktivität gemessen. Dargestellt ist die relative Aktivität der Fireflyluciferase normalisiert auf die Aktivität der Renillaluciferase. Statistische Signifikanz wurde mit Zweistichproben-t-Test bezogen auf die Tag-0-Probe bestimmt: *** $P \leq 0.001$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n=5).

Dabei konnte festgestellt werden, dass die undifferenzierten C2C12-Zellen eine signifikant höhere Reporteraktivität zeigen als die differenzierten Zellen (Abb. 4-7).

4.3. Untersuchung einer möglichen posttranskriptionalen Regulation von MRTF-A im Differenzierungsprozess von C2C12-Zellen

4.3.1. Identifizierung potenzieller MRTF-A regulierender miRNAs durch miTRAP

In glatten Muskelzellen ist MRTF-A ein wichtiger Faktor um den synthetischen Phänotyp aufrecht zu erhalten (Minami *et al.* 2012). Durch die Expression von miR-1a-3p kommt es zu einer Reduktion von MRTF-A, die glatten Muskelzellen differenzieren in den kontraktile Phänotyp. Damit konnte Minami *et al.* zeigen, dass MRTF-A eine wichtige Rolle im Differenzierungsprozess von glatten Muskelzellen spielt und direkt durch miRNAs reguliert wird. Der Ansatz für diese Arbeit war deshalb, miRNAs in Skelettmuskelzellen zu identifizieren, die MRTF-A regulieren. Bis vor einigen Jahren beschränkte sich diese Suche auf *in silico* basierte Recherchen mit Hilfe verschiedener Algorithmen. Diese basieren auf der Entdeckung, dass viele miRNAs mit den Nukleotiden 2-7, die sog. seed-Sequenz, vollständig komplementär an die mRNA binden (Lewis *et al.* 2003, Brennecke *et al.* 2005). Allerdings gibt es bereits

einige Gegenbeispiele (Pasquinelli *et al.* 2012). Ein weiterer Nachteil solcher Untersuchungen ist, dass sie abgekoppelt von den Vorgängen in den Zellen stattfinden. Aus diesem Grund wurde eine neue Methode angewendet um miRNAs zu identifizieren, welche die MRTF-A mRNA binden, der miTRAP (Braun *et al.* 2014). Hierbei handelt es sich um eine Affinitätsreinigung, bei der eine *in vitro* transkribierte Ziel-RNA als Köder verwendet wird (Abb. 4-8). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die miRNA-Suche, durch die Verwendung eines Zelllysates, direkt in einem Zellsystem von Interesse stattfindet. Weiterhin können, unabhängig von bereits bekannten Bindungsmodellen, alle gebundenen miRNAs identifiziert werden. Der miTRAP wurde in Kooperation mit Juliane Braun in der AG-Hüttelmaier durchgeführt (MLU, Halle).

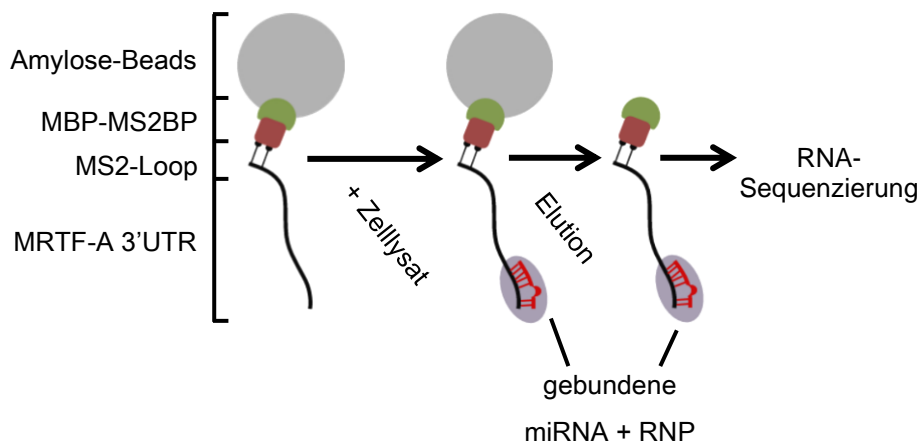


Abb. 4-8: Darstellung des Arbeitsschemas von miTRAP

Für den miTRAP wurde die murine MRTF-A 3'UTR in das *pCDNA 3.1* Plasmid hinter zwei *MS2-Loop*-Sequenzen kloniert (Abb. 4-8). Mit Hilfe eines Fusionsproteins aus Maltosebindepotein und *MS2-Loop*-Bindepotein kann die 3'UTR als *in vitro* transkribierte RNA an Amylose-Beads immobilisiert werden. Die so gebundene 3'UTR wurde einmal mit einem Zelllysate aus 6 Mio. undifferenzierten C2C12-Zellen inkubiert und einmal mit einem Zelllysate aus 6 Mio. 7 Tage differenzierten C2C12-Zellen. Während dieser Inkubation haben miRNAs und RNPs spezifisch an die 3'UTR von MRTF-A gebunden. Anschließend wurde die Probe gewaschen, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Die spezifisch gebundenen RNPs und miRNAs wurden im letzten Schritt eluiert.

Zur Überprüfung, ob der miTRAP erfolgreich war, wurden die Zelllysate und Proben des miTRAP in einem Western-Blot auf die Anreicherung von RNPs untersucht. AGO2 ist Teil des RISC (Meister *et al.* 2004). Daher wurde der miTRAP auf eine Anreicherung von AGO2 untersucht (Abb. 4-9). AGO2 ist sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Zellen detektierbar. Auch in den miTRAP-Proben ist AGO2 vorhanden. In dem miTRAP-Versuch mit MRTF-A 3'UTR und Zelllysate differenzierter Zellen ist mehr AGO2 vorhanden als im miTRAP-Versuch mit MRTF-A 3'UTR und Zelllysate undifferenzierter Zellen. Wurde der Versuch mit den *MS2-Loop*-Sequenzen durchgeführt, konnte kein (differenzierte Zellen) bzw. sehr wenig (undifferenzierte Zellen) AGO2 gefunden werden.

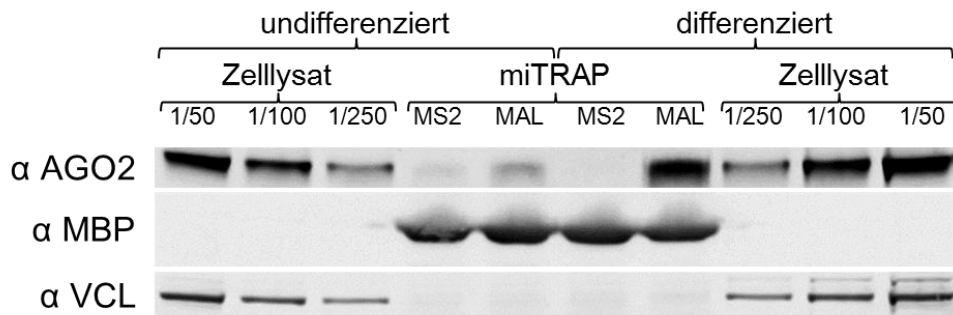


Abb. 4-9: Western-Blot von Zelllysate und miTRAP-Proben

Zelllysate von undifferenzierten und 7 Tage differenzierten C2C12-Zellen wurden für einen miTRAP-Versuch verwendet. Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blot für AGO2, Maltosebindeprotein (MBP) und Vinculin (VCL). Überprüft wird die Anreicherung von AGO2 in den miTRAP-Proben vergleichend zwischen differenzierten und undifferenzierten Zellen (Zelllysate in verschiedenen Verdünnungen) sowie zwischen der Verwendung der MRTF-A 3'UTR (MAL) und als Kontrolle der *MS2-Loop*-Sequenz (MS2). Maltosebindeprotein dient als Positivkontrolle sowie als Ladekontrolle für den miTRAP. Vinculin wurde als Negativkontrolle verwendet.

Daraus lässt sich schließen, dass in differenzierten Zellen AGO2 an die 3'UTR der MRTF-A mRNA bindet. Im Vergleich dazu lagert sich in undifferenzierten Zellen weniger AGO2 an die 3'UTR der MRTF-A mRNA an. Das Maltosebindeprotein kann wie erwartet nur in den miTRAP-Proben detektiert werden. Vinculin als Bestandteil von *Adherens Junctions* ist kein RNA-bindendes Protein (Ziegler *et al.* 2006) und wird daher als Negativkontrolle für den miTRAP verwendet. Wie erwartet ist es nicht in den miTRAP-Proben detektierbar. Der miTRAP kann daher als erfolgreich betrachtet werden, da sich die Positiv- und Negativkontrolle wie erwartet verhalten haben. Die Anreicherung von AGO2 deutet auf eine Anlagerung des RISC und somit auch von miRNAs an die MRTF-A 3'UTR hin.

Als nächstes wurden die Proben von PD Dr. Knut Krohn im interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) *Core Unit* DNA-Technologien in Leipzig mittels *RNA-Seq* sequenziert und gleichzeitig quantifiziert. Als Kontrolle wurden die *MS2-Loop*-Sequenzen ohne MRTF-A 3'UTR verwendet. Für die weitere Auswertung wurden auch RNA-Proben von undifferenzierten und differenzierten C2C12-Zellen sequenziert. Diese Sequenzierung wurde von drei unabhängigen miTRAP-Versuchen durchgeführt. Die sequenzierten Fragmente wurde mittels des *Bowtie2 aligner* gegen die murinen miRNA Sequenzen der Datenbank *miRBase v20* abgeglichen.

Bereits die Größen der nicht normalisierten Bibliotheken weichen stark voneinander ab. So wurden für die Bibliotheken mit MRTF-A 3'UTR in beiden Zuständen durchschnittlich deutlich mehr miRNA Fragmente sequenziert, als für die Bibliotheken mit der *MS2-Loop*-Sequenz (Tabelle 4-1). Dies deutet darauf hin, dass es mit Hilfe der MRTF-A 3'UTR zu einer spezifischen Assoziation von miRNAs im Vergleich zu der *MS2-Loop*-Sequenz kam. Interessant ist aber auch, dass die Bibliothek mit der MRTF-A 3'UTR im differenzierten Zustand mit 421520 sequenzierten Fragmenten doppelt so groß ist, wie im undifferenzierten Zustand mit 200311 sequenzierten Fragmenten. Dies verdeutlicht ebenfalls, dass es während der Differenzierung zu einer erhöhten Anlagerung von miRNAs an die MRTF-A 3'UTR kommt und unterstützt die Ergebnisse des Western-Blots (Abb. 4-9, Tabelle 4-1).

		nicht normalisierte Sequenzbibliothek		
		Gesamt-RNA	MRTF-A 3'UTR	MS2
Anzahl gelisteter sequenzierter miRNA-Fragmente	Tag 0	502233	200311	28197
	Tag 7	392607	421520	20527

Tabelle 4-1: Auflistung der Anzahl sequenzierter miRNA Fragmente der Sequenzbibliotheken

Die Eluate von drei unabhängigen miTRAP-Versuchen aus undifferenzierten und differenzierten C2C12-Zellen mit MRTF-A 3'UTR, MS2-Loop-Sequenz (MS2) sowie die Gesamt-RNA wurden sequenziert und gegen die murine miRNA Sequenz der Datenbank *miRBase* v20 abgeglichen.

Zur Auswertung der Daten wurden zunächst, in Absprache mit Juliane Braun, Grenzwerte festgelegt, ab welchen eine miRNA als detektierbar definiert wird. Für die Gesamt-RNA wurde dieser Wert auf 500 festgelegt. Für die Anreicherung der miRNAs mit Hilfe des miTRAP wurde der Wert auf 1000 festgelegt. Wenn eine miRNA diesen Wert unterschreitet gilt sie als nicht detektierbar (n.d.). Danach wurden die Daten nach der TMM-Methode (*trimmed mean of M-values*) normalisiert (Robinson & Oshlack 2010). Bei dieser Methode wird vorausgesetzt, dass mindestens 70% der miRNA Population zwischen zwei zu vergleichenden Proben nicht differenziell exprimiert wird. Mit Hilfe der Normalisierung wurden aus den Daten für die miRNAs normalisierte „pseudo“ CPM (*Counts per Million*) errechnet, welche für die weiteren Analysen verwendet wurden.

Aus den Daten wurden anschließend miRNAs nach folgenden Kriterien herausgefiltert:

1. Die CPM-Werte einer miRNA von undifferenzierten zu differenzierten Zellen mussten eine *fold change* von mind. 2 besitzen.
Da die verringerte MRTF-A-Expression in differenzierten Zellen beobachtet wurde (Abb. 4-6 & 4-7), waren für die Arbeit nur die miRNAs von Interesse, die während der Differenzierung vermehrt exprimiert wurden.
2. Das miTRAP-Verhältnis (*miTRAP-Ratio*) von differenzierten Zellen in Bezug auf undifferenzierte Zellen musste eine *fold change* von mind. 1,5 besitzen. Das miTRAP-Verhältnis berechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{CPM aus dem miTRAP-Versuch mit MRTF-A 3'UTR}}{\text{CPM aus Gesamt-RNA}}$$

Dieses Verhältnis gibt an, ob und wie stark die Anreicherung einer miRNA mit Hilfe der MRTF-A 3'UTR erfolgt ist. Ist der Wert für den miTRAP mit MRTF-A 3'UTR als nicht detektierbar definiert, ist keine Anreicherung, unabhängig vom miTRAP-Verhältnis der miRNA, erfolgt.

Das Kriterium sollte ebenfalls den Fokus auf die miRNAs legen, welche während der Differenzierung an die 3'UTR der MRTF-A mRNA binden, um die Ergebnisse aus Abb. 4-6 & 4-7 zu erklären. Ist dieses Verhältnis in differenzierten Zellen größer, wurde mehr miRNA gebunden, als in undifferenzierten.

3. Die CPM-Werte einer mittels MRTF-A 3'UTR angereicherten miRNA mussten, bezogen auf die CPM-Werte mit Kontrollsequenz (nur MS2-Loop-Sequenz), einen *fold change* von mind. 4 besitzen. Ferner durfte das Signifikanzniveau, welches mit einem Poisson-Exakt-Test bestimmt wurde, nicht größer als 0,05 sein.

Dies ermöglicht eine Aussage über die Spezifität der miRNA-Bindung. An die *MS2-Loop*-Sequenz sollte theoretisch keine miRNA binden. In dem Versuch kann es dennoch zu Anreicherungen von miRNAs an diese Kontrollsequenz kommen. Diese Bindung wäre jedoch keine MRTF-A 3'UTR-spezifische Bindung und muss daher herausgefiltert werden.

Die Primärdaten der miRNAs sind im Anhang in Tabelle 8-1, 8-2 und 8-3 hinterlegt. Entsprechend der Grenzwerte wurden in der Gesamt-RNA von undifferenzierten C2C12-Zellen 51 miRNAs und in differenzierten Zellen 52 miRNAs exprimiert (Tabelle 8-1). Auffällig ist dabei, dass 43 miRNAs in beiden Zuständen exprimiert wurden. In undifferenzierten Zellen wurden 8 miRNAs exprimiert, welche im differenzierten Zustand nicht mehr vorgefunden wurden. Durch die Differenzierung wurde die Expression von 9 miRNAs initiiert (Abb. 4-10, Tabelle 8-1).

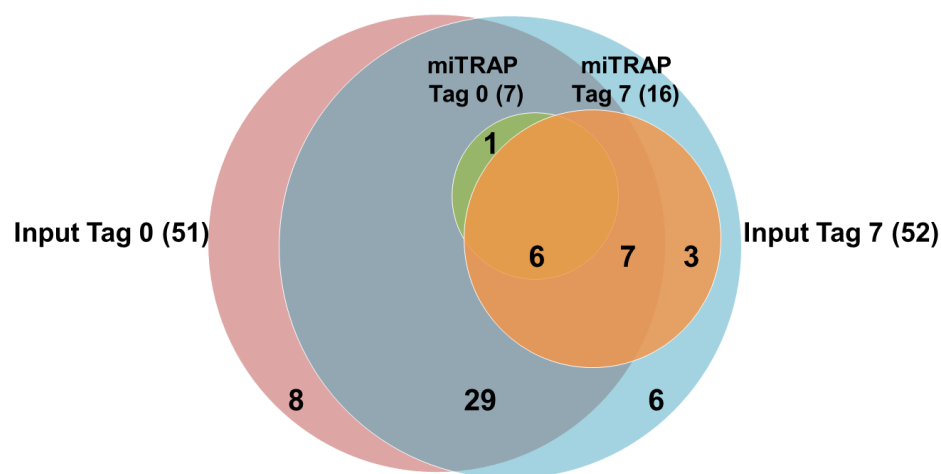


Abb. 4-10: Verteilung identifizierter miRNAs des miTRAP-Experiments

Dargestellt ist ein Venn-Diagramm über die Mengenverteilung der spezifisch angereicherten miRNAs aus dem miTRAP-Experiment. Die Daten entstammen den Tabellen 8-1 und 8-2. Die miRNAs undifferenzierter (rot) und differenzierter (blau) Zellen haben eine gemeinsame Schnittmenge (violett). Die spezifisch angereicherten miRNAs in undifferenzierten und differenzierten Zellen sind grün bzw. orange dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben die Gesamtmenge an identifizierten miRNAs der entsprechenden Experimente wieder. Die weiteren Zahlen repräsentieren die entsprechenden Schnittmengen.

In undifferenzierten Zellen konnten mit Hilfe der MRTF-A 3'UTR 7 miRNAs angereichert werden (Tabelle 8-2). Darunter sind Mitglieder der let-7-Familie, sowie miR-183-5p, miR-31-5p und miR-34c-5p. Die let-7-Familie ist in viele Differenzierungsprozesse involviert und wird daher auch als Tumormarker diskutiert (Wang *et al.* 2012). Auch miR-31 und -34 werden im Zusammenhang mit der Suppression von Tumoren über den Eingriff in den Zellzyklus und der Apoptose diskutiert (Valastyan & Weinberg 2010, Misso *et al.* 2014). miR-183 wird zwar in Verbindung mit der Entwicklung von sensorischen Organen beschrieben, eine Verbindung zur Muskeldifferenzierung konnte bisher aber noch nicht gezeigt werden (Dambal *et al.* 2015). Bis auf miR-183-5p wurden diese miRNAs auch in differenzierten Zellen durch die MRTF-A 3'UTR angereichert. Außerdem wurden weitere Vertreter der let-7-Familie angereichert, genauso wie miR-3107-5p und die Kandidaten-miRNAs von Interesse (siehe Tabelle 8-2, Tabelle 4-2). Drei der Kandidaten-miRNAs (miR-1a-3p, miR-133a-3p und miR-206-3p) werden erst während der Differenzierung exprimiert (Tabelle 8-1, Abb. 4-10).

Die mittels MRTF-A 3'UTR angereicherten miRNAs wurden anschließend entsprechend der oben genannten Kriterien ausgewertet, wodurch nachfolgende Kandidaten-miRNAs herausgefiltert wurden, welche anschließend näher untersucht wurden (Tabelle 4-2).

Name	Kriterium 1 Gesamt-RNA Tag 7 / Tag 0 <i>fold change</i>	Kriterium 2 miTRAP-Verhältnis		Kriterium 3 CPM MRTF-A/ CPM MS2	
		Tag 7 / Tag 0	<i>fold change</i>	Tag 0	Tag 7
mmu-miR-1a-3p	9986 / 0	75,32 / 0*	75,32 / 0*	n.d.	106,4
mmu-miR-24-3p	2,24	4,75 / 2,94*	1,61*	n.d.	33,92
mmu-miR-133a-3p	110,79	0,32 / 0,04*	7,45*	n.d.	8,1
mmu-miR-206-3p	17,54	13,61 / 4,28*	3,18*	n.d.	73,39
mmu-miR-378a-3p	4,76	1,02 / 0,25*	4,17*	n.d.	11,16
mmu-miR-378d	3,24	0,75 / 0,2*	3,7*	n.d.	8,59
mmu-miR-486-5p	11,23	1,6 / 0,67*	2,38*	n.d.	5,79

Tabelle 4-2: Aufgelistete miRNAs binden 3'UTR von MRTF-A während C2C12-Differenzierung

Aufgelistet sind die miRNAs, welche die oben genannten Kriterien erfüllen. Sortiert nach diesen Kriterien sind für die miRNAs der *fold change* der miRNA Expression (Kriterium 1), das miTRAP-Verhältnis, sowie dessen *fold change* (Kriterium 2) und der *fold change* von miTRAP mit MRTF-A 3'UTR und MS2-Loop-Sequenz (Kriterium 3) aufgelistet. Die Primärdaten dieser miRNAs sind im Anhang hinterlegt.

* Die Werte des miTRAP mit MRTF-A 3'UTR, zur Berechnung des miTRAP-Verhältnisses, unterschreiten den Grenzwert von 1000 und gelten als nicht detektierbar

Die Werte des miTRAP mit MRTF-A 3'UTR, zur Berechnung der Spezifität, unterschreiten den Grenzwert von 1000. Daher wurde die Spezifität als nicht detektierbar (n.d.) gekennzeichnet.

Neben den postulierten miRNAs miR-1a-3p sowie miR-206-3p wurden durch den miTRAP noch weitere miRNAs identifiziert, welche die 3'UTR der MRTF-A mRNA während der C2C12-Differenzierung binden: miR-133a-3p, miR-486-5p, miR-378a-3p, miR-378d und miR-24-3p. Aus der Literatur ist bekannt, dass miR-133a-3p, miR-486-5p, miR-378a-3p und miR-24-3p ebenfalls an der Differenzierung von Myoblasten beteiligt sind (Dey *et al.* 2011, Chen *et al.* 2006, Gagan *et al.* 2011, Sun *et al.* 2008). Allerdings sind die genauen Regulationsmechanismen noch nicht bekannt. Über miR-378d gibt es bisher noch keine Literatur. Allerdings zeigen die Einträge auf der Internetseite www.mirbase.org, dass miR-378d bis auf ein Nukleotid identisch ist mit miR-378a-3p (vergleiche Eintragsnummer MIMAT0003151 und MIMAT0025167). Obwohl die let-7-Familie in viele Differenzierungsprozesse involviert ist, werden diese miRNAs während der C2C12-Differenzierung nicht verstärkt exprimiert und erfüllen damit nicht das Kriterium 1.

Die Daten der RNA-Seq zeigen, dass alle identifizierten miRNAs eine signifikant erhöhte Expression in differenzierten Zellen aufweisen (Abb. 4-11 & Tabelle 4-2 Kriterium 1, Tabelle 8-1). Der Grad der erhöhten Expression unterscheidet sich zwischen den miRNAs. Da miR-1a-3p, miR-133a-3p und miR-206-3p in undifferenzierten Zellen nicht detektierbar waren, kommen sie auf die höchste Expressionsinduktion. Danach folgt miR-486-5p mit einer 11-fachen Induktion. Am schwächsten ändert sich die Expression von miR-378a-3p, miR-378d und miR-24-3p mit einer 5-fach, 3-fach bzw. 2-fach erhöhten Expression. Unabhängig von der Expressionsinduktion zeigen miR-133a-3p, miR-378a-3p und miR-486-5p in

differenzierten C2C12-Zellen die höchsten Expressionen auf, wogegen miR-206-3p die niedrigste Expression in differenzierten C2C12-Zellen besitzt (Abb. 4-11).

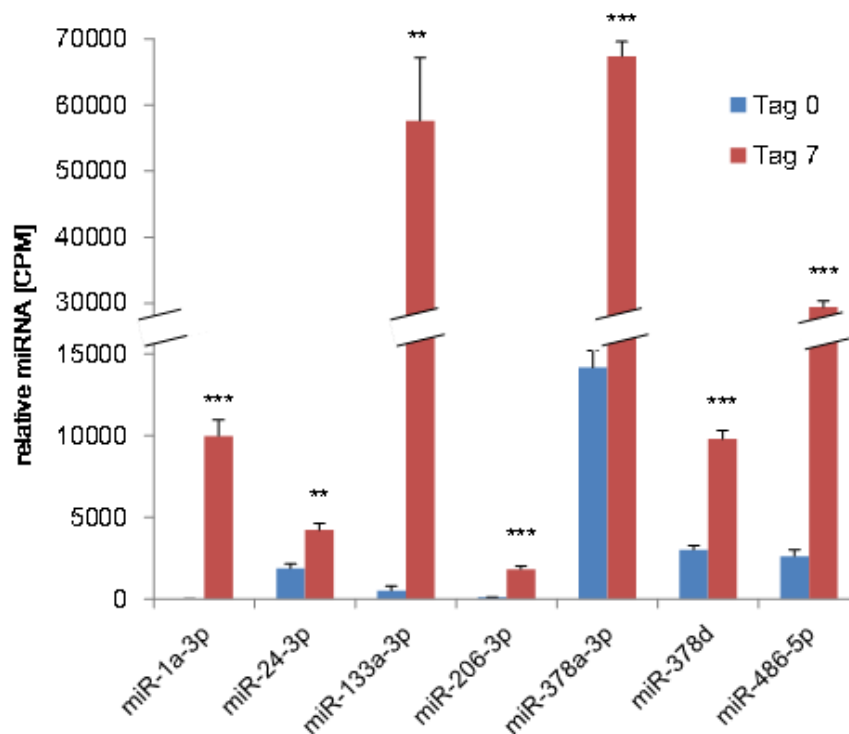


Abb. 4-11: Expression der im miTRAP identifizierten miRNAs während der C2C12-Differenzierung

Die Daten aus der *RNA-Seq* wurden nach verschiedenen Kriterien gefiltert um die MRTF-A-bindenden miRNAs zu erhalten, welche während der Differenzierung verstärkt exprimiert werden. In dem Diagramm sind die Expressionswerte der identifizierten miRNAs als relative Expression in TMM-normalisierte CPM aus den *RNA-Seq*-Daten abgebildet. Gegenübergestellt sind die Expressionen in undifferenzierten (Tag 0) und differenzierten Zellen (Tag 7). Statistische Signifikanz wurde mit Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Tag-0-Probe bestimmt: ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=3$).

Die Werte der identifizierten miRNAs für den miTRAP mit der MRTF-A 3'UTR liegen in undifferenzierten Zellen unter dem Grenzwert von 1000 und gelten damit als nicht detektierbar (Tabelle 8-2). Um ein *fold change* entsprechend des Kriteriums 2 zu erhalten, wurde dennoch mit den „nicht detektierbaren“ Werten ein miTRAP-Verhältnis errechnet. Der erhaltene *fold change* des miTRAP-Verhältnisses von undifferenzierten und differenzierten C2C12-Zellen sollte daher als Mindestwert betrachtet werden, da der tatsächliche *fold change* auf Grund der Werte in undifferenzierten C2C12-Zellen undefinierbar größer ist. Auf dieser Basis lassen sich über die miTRAP-Verhältnisse der einzelnen miRNAs während der Differenzierung folgende angenäherte Aussagen treffen (Tabelle 4-2 Kriterium 2, Tabelle 8-2). miR-1a-3p zeigt den größten *fold change*. miR-133a-3p zeigt eine 7-fache Zunahme des miTRAP-Verhältnisses. Die weiteren miRNAs zeigen eine 2- bis 4-fache Zunahme des miTRAP-Verhältnisses. Unabhängig davon zeigt sich, dass miR-1a-3p in differenzierten C2C12-Zellen das größte miTRAP-Verhältnis und damit die größte Anreicherung an der MRTF-A 3'UTR besitzt, gefolgt von miR-206-3p, miR-24-3p und miR-486-3p. miR-133a-3p zeigt die geringste Anreicherung.

Die Anreicherung der miRNAs an die MRTF-A 3'UTR lässt sich auch über eine Verschiebung der Mengenverhältnisse darstellen. In den differenzierten C2C12-Zellen beträgt der Anteil an miR-1a-3p unter den 7 Kandidaten-miRNAs 6 % (Abb. 4-12A). In dem miTRAP-Versuch erhöht sich dieser Anteil auf 80 %, was auf eine starke Anreicherung an die MRTF-A 3'UTR hindeutet (Abb. 4-12B).

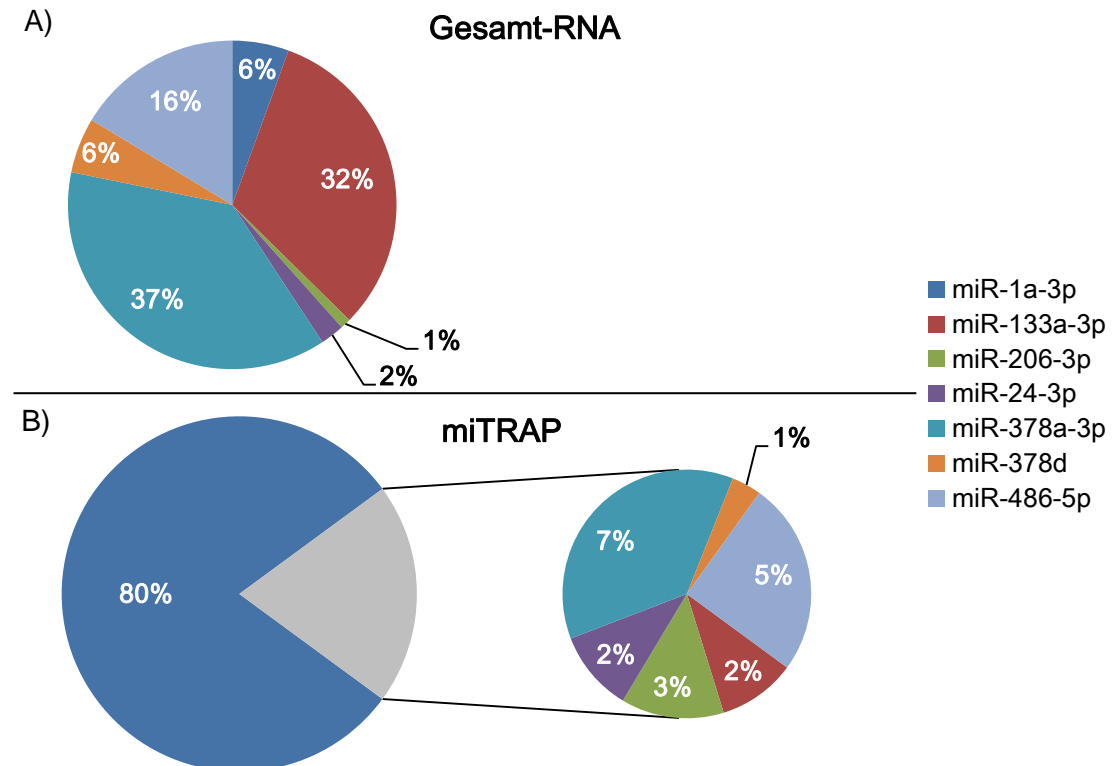


Abb. 4-12: Mengenverhältnis der präzipitierten miRNAs in differenzierten C2C12-Zellen entsprechend der Gesamt-RNA und des miTRAP-Versuchs

Die prozentualen Mengenverhältnisse wurden entsprechend der TTM-normalisierten CPM aus der miTRAP-Bibliothek der differenzierten C2C12-Zellen erstellt. Dargestellt sind die Mengenverhältnisse der, den Kriterien entsprechenden, miRNAs aus der Gesamt-RNA (A) bzw. aus der miTRAP-Präzipitation (B). Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils nur auf die 7 angegebenen miRNAs zueinander.

miR-206-3p wird durch den miTRAP ebenfalls um das 3-fache angereichert, wobei der Anteil im miTRAP-Versuch unabhängig von miR-1a-3p nochmals größer ist (Abb. 4-12A & B). miR-24-3p zeigt in beiden Mengenverhältnissen mit 2 % den gleichen Anteil. Allerdings ist zu beachten, dass unabhängig von miR-1a-3p der Anteil an miR-24-3p im miTRAP-Versuch gegenüber den restlichen miRNAs zunimmt (Abb. 4-12B) und damit auch auf eine erhöhte Anreicherung hindeutet. Interessant sind auch die Anteile von miR-378a-3p, miR-378d und miR-486-5p. Verglichen mit der Gesamt-RNA nimmt ihr Anteil in dem miTRAP-Versuch ab, was für eine schwache Anreicherung der miRNA spricht. Betrachtet man diese Anteile allerdings unabhängig von miR-1a-3p, ändern sich diese Werte nur marginal gegenüber der Gesamt-RNA (Abb. 4-12A & B).

Die Spezifitäten entsprechend Kriterium 3 konnte in undifferenzierten Zellen ebenfalls nicht genau bestimmt werden, da die Primärdaten unter dem Grenzwert von 1000 liegen (Tabelle 4-2 Kriterium 3, Tabelle 8-3). Daher ist für alle miRNAs in undifferenzierten C2C12-Zellen von keiner bzw. nur einer unspezifischen Anreicherung auszugehen. Da es in differenzierten C2C12-Zellen, entsprechend Kriterium 3, zu einer

spezifischen Anreicherung der miRNAs kommt, wurde Kriterium 3 für alle identifizierten miRNAs erfüllt (Tabelle 8-3).

Zur Validierung der Expressionsdaten aus dem miTRAP wurde die Expression der miRNAs in der C2C12-Differenzierung unabhängig von der *RNA-Seq* untersucht. Hierzu wurden C2C12-Zellen differenziert. An den Tagen 0, 4 und 7 wurde die miRNA Expression mit Hilfe von qRT-PCR untersucht.

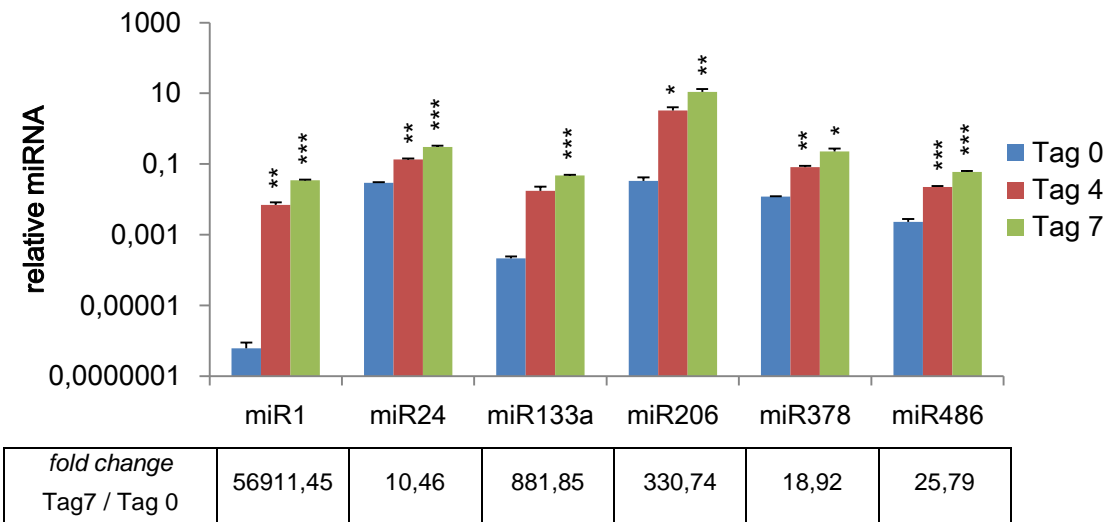


Abb. 4-13: Validierung der *RNA-Seq*-Daten zeigt induzierte miRNAs

C2C12-Zellen wurden 7 Tage differenziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde RNA isoliert und mittels qRT-PCR auf die Expression verschiedener miRNAs untersucht. Dargestellt ist die relative Genexpression normalisiert auf das Referenzgen U6. Die Tabelle zeigt die Zunahme der miRNAs ausgehend von Tag 0 zu Tag 7. Statistische Signifikanz wurde mit Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Tag-0-Probe bestimmt: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=3$).

In Abb. 4-13 ist zu erkennen, dass sich die Daten des *RNA-Seq* (Abb. 4-11) mit qRT-PCR reproduzieren lassen. Auch in diesen Daten zeigt miR-1a-3p die stärkste Expressionsinduktion während der Differenzierung, was verdeutlicht, dass die Expression dieser miRNA erst während der Differenzierung stattfindet und erklärt warum sie in den undifferenzierten glatten und Skelettmuskelzellen nicht detektiert werden konnte (vergleiche mit Abb. 4-4). Ebenfalls hohe Expressionsinduktionen können bei miR-133a-3p und miR-206-3p beobachtet werden. Die restlichen miRNAs zeigen ebenfalls eine signifikante Expressionsinduktion während der Differenzierung, wenn auch nicht in derselben Höhe wie die Erstgenannten. Da miR-378a-3p und miR-378d sich nur in einem Nukleotid unterscheiden, ist eine getrennte Betrachtung in der qRT-PCR nicht möglich. Daher wurden sie unter miR-378 zusammengefasst. Außer für miR-1a-3p ist die Expressionsinduktion in den qRT-PCR-Daten höher als in den *RNA-Seq*-Daten. Unterschiedlich fallen die Expressionslevel der einzelnen miRNAs an Tag 7, verglichen mit den *RNA-Seq*-Daten, aus (vergleiche Abb. 4-11 & 4-13). miR-133a-3p und miR-378a-3p sind in den *RNA-Seq*-Daten die am stärksten exprimierten miRNAs in differenzierten Zellen. In den qRT-PCR-Daten zeigt miR-206-3p die höchste Expression in differenzierten Zellen, wogegen sie in den *RNA-Seq*-Daten die niedrigste Expression besitzt.

4.3.2. Einfluss von miRNA auf die Expression von MRTF-A

Während der Differenzierung sinkt die MRTF-A-Expression und Aktivität um ca. 70 % (Abb. 4-6 & 4-7). Der miTRAP hat gezeigt, dass mehrere miRNAs die MRTF-A mRNA binden können. Wie stark die einzelnen miRNAs die MRTF-A-Expression inhibieren, sollte mit Hilfe einer miRNA Überexpression untersucht werden. Eine Möglichkeit dazu stellt die Verwendung von siRNAs dar, welche miRNAs simulieren (*miR mimic*). Zur Etablierung einer Überexpression von miRNAs wurden verschiedene Transfektionsparameter getestet: Zellzahl, siRNA-Menge, Transfektionsdauer, Transfektionsreagenz und Reagenzmenge. Während der Etablierungsarbeit stellte sich heraus, dass C2C12-Zellen sehr anfällig bezüglich dieser Parameter sind und die Vitalität der Zellen sehr schnell abnimmt. Da für spätere Versuche auch eine mehrmalige Transfektion von Zellen geplant war, war die Vitalität besonders wichtig. Sehr gut haben die Zellen die Transfektion mit *Viromer Blue* vertragen und eine gute Expression der miRNAs gezeigt (Abb. 4-14). Die Zellen wurden 24 h mit den *miR mimics* transfiziert und nach weiteren 24 h für die weitere Untersuchung geerntet. Die Proben wurden sowohl auf Transkript-, als auch auf Proteinebene analysiert. Eine ungewollte Überexpression anderer miRNAs konnte mit dieser Methode nicht beobachtet werden.

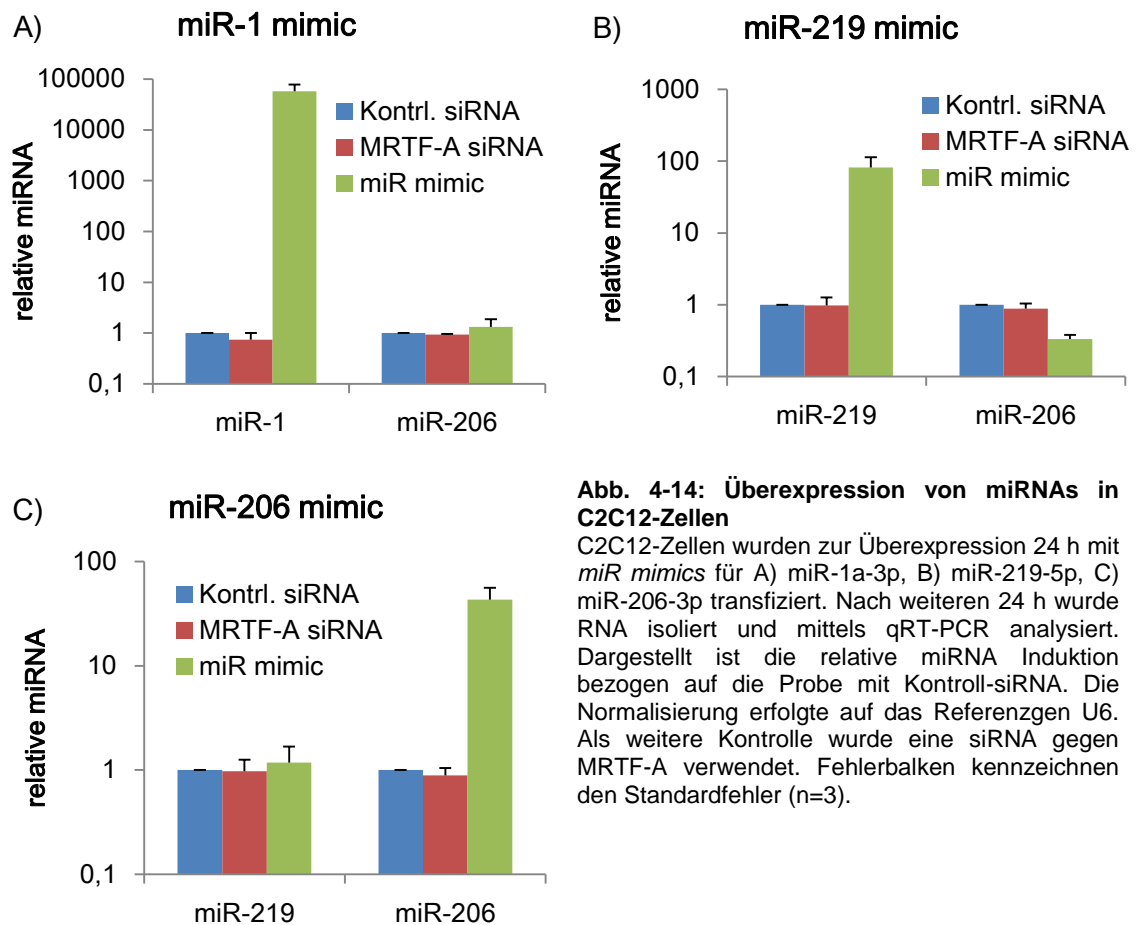


Abb. 4-14: Überexpression von miRNAs in C2C12-Zellen

C2C12-Zellen wurden zur Überexpression 24 h mit *miR mimics* für A) miR-1a-3p, B) miR-219-5p, C) miR-206-3p transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde RNA isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt ist die relative miRNA Induktion bezogen auf die Probe mit Kontroll-siRNA. Die Normalisierung erfolgte auf das Referenzgen U6. Als weitere Kontrolle wurde eine siRNA gegen MRTF-A verwendet. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n=3).

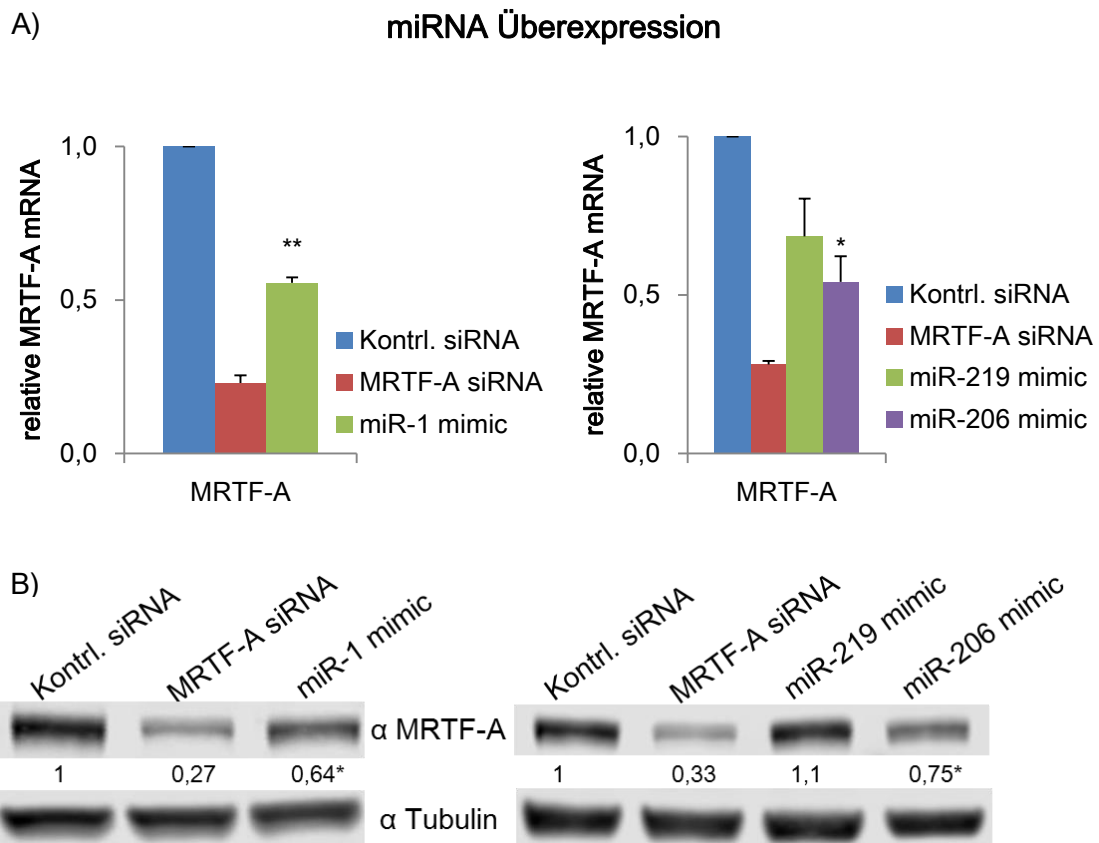


Abb. 4-15: Überexpression von miR-1a-3p und miR-206-3p reduzieren MRTF-A mRNA und Protein
 C2C12-Zellen wurden mit *miR mimics* für 24 h transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mittels qRT-PCR bzw. Western-Blots auf die MRTF-A-Expression untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine siRNA gegen MRTF-A verwendet. A) Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf die Probe mit Kontroll-siRNA. Die Normalisierung erfolgte auf das Referenzgen HPRT. B) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blots für MRTF-A. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Quantifiziertes MRTF-A Protein normalisiert auf die Probe mit Kontroll-siRNA ist unter der MRTF-A-Bande angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Einstichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe bestimmt: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=3$).

Als nächstes wurde die Expression von MRTF-A mittels qRT-PCR und Western-Blot untersucht. Dabei zeigte sich sowohl für die miR-1a-3p-, als auch für die miR-206-3p-Überexpression auf mRNA und Proteinebene eine signifikant verringerte MRTF-A-Expression (Abb. 4-15). Die Überexpression von miR-219-5p führte zu einer nicht signifikant verringerten mRNA Expression von MRTF-A. Die Proteinexpression blieb unverändert. Nach Betrachtung der *in silico* identifizierten miRNAs, wurden als nächstes die miRNAs überexprimiert, die mit Hilfe des miTRAP identifiziert wurden.

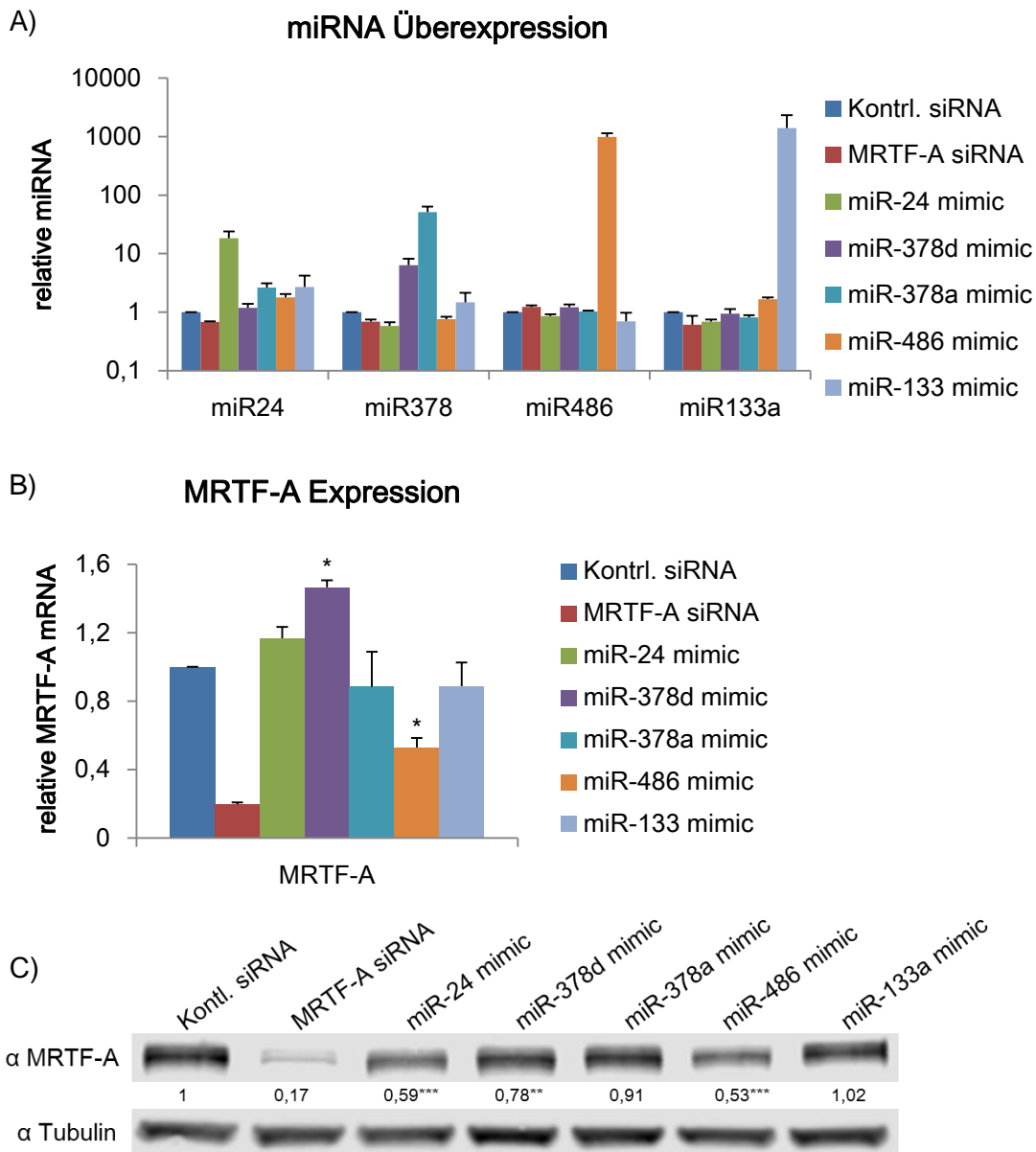


Abb. 4-16: Einfluss der neuen miRNAs aus miTRAP auf MRTF-A

C2C12-Zellen wurden mit *miR mimics* für 24 h transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mittels qRT-PCR bzw. Western-Blots auf MRTF-A-Expression untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine siRNA gegen MRTF-A verwendet. A) Dargestellt ist die relative miRNA Induktion bezogen auf die Probe mit Kontroll-siRNA. Die Normalisierung erfolgte auf das Referenzgen U6. B) Dargestellt ist die relative Genexpression bezogen auf die Probe mit Kontroll-siRNA. Die Normalisierung erfolgte auf das Referenzgen HPRT. C) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blots für MRTF-A. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Quantifiziertes MRTF-A Protein normalisiert auf die Probe mit Kontroll-siRNA ist unter der MRTF-A-Bande angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Einstichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe bestimmt: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=3$).

Wie in Abb. 4-16A zu erkennen ist, war für alle miRNAs eine Überexpression detektierbar. Dabei zeigte sich, dass die miRNA-486-5p-Überexpression eine signifikante Reduktion von MRTF-A sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene hervorrief (Abb. 4-16B & C). Außerdem waren für miR-378d- und miR-24-3p-Überexpression die MRTF-A Proteinmenge reduziert. Interessanterweise kommt es bei diesen miRNAs nicht zu einer Reduktion der mRNA. Bei miR-133a-3p und miR-378a-3p zeigte sich keine veränderte MRTF-A-Expression.

4.3.3. Einfluss der posttranskriptionalen Regulation auf die Expression von MRTF-A

Mit keiner der identifizierten miRNAs alleine konnte die 70%ig verringerte MRTF-A-Expression während der Differenzierung reproduziert werden. Daher wurde anschließend untersucht, wie hoch der Anteil der posttranskriptionalen Regulation an der MRTF-A-Reduktion während der C2C12-Differenzierung ist. Zu diesem Zweck sollte die gesamte miRNA-basierte Regulation inhibiert werden, da die Möglichkeit besteht, dass noch unbekannte MRTF-A regulierende miRNAs existieren. Um dies zu erreichen wurde ein *Knockdown* von AGO2 gemacht. AGO2 gehört zur Familie der Argonautenproteine und stellt das katalytische Zentrum des RISC dar (Meister *et al.* 2004, Liu *et al.* 2004). Ein *Knockdown* von AGO2 sollte die miRNA vermittelte Genrepression inhibieren und damit auch die miRNA vermittelte posttranskriptionale Regulation. Um einen konstanten *Knockdown* von AGO2 während der 7-tägigen Differenzierung sicherzustellen, wurden die Zellen aller 2 Tage erneut mit siRNA gegen AGO2 transfiziert. Die Genexpression wurde mit Hilfe von qRT-PCR und Western-Blot an Tag 0, 4 und 7 untersucht.

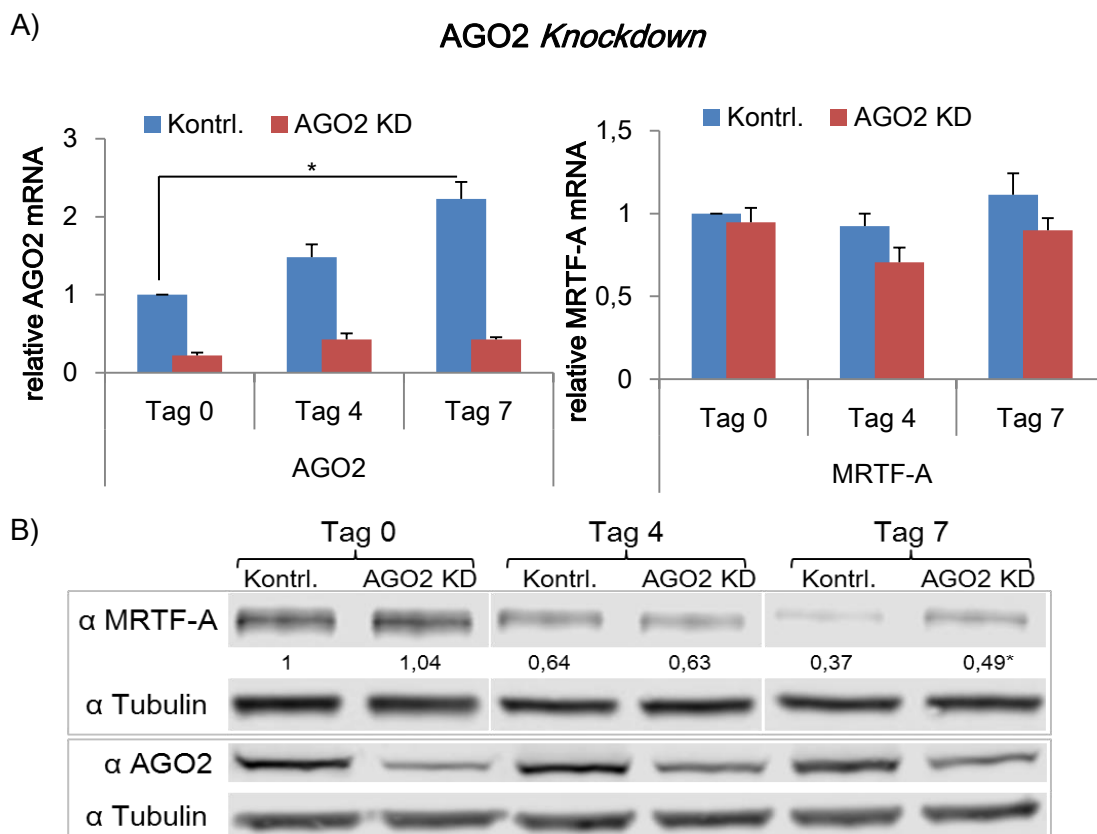


Abb. 4-17: AGO2 Knockdown hemmt die MRTF-A Reduktion während der C2C12-Differenzierung
C2C12-Zellen wurden 1 Tag vor der Differenzierung mit siRNA gegen AGO2 transfiziert. Während der Differenzierung wurden die Zellen erneut an Tag 1, 3 und 5 transfiziert. Proben von Tag 0, 4 und 7 wurden mittels qRT-PCR bzw. Western-Blots auf MRTF-A und AGO2 Expression untersucht. A) Dargestellt ist die relative MRTF-A bzw. AGO2 Expression bezogen auf die Tag-0-Probe mit Kontroll-siRNA. Die Normalisierung erfolgte auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. B) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blots für MRTF-A und AGO2. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Quantifiziertes MRTF-A Protein normalisiert auf die Tag-0-Probe mit Kontroll-siRNA ist unter der MRTF-A-Bande angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Ein- bzw. Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe bestimmt, wenn nicht anders angegeben: * $P \leq 0,05$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n=3).

Dabei stellte sich heraus, dass die mRNA von AGO2 während der Differenzierung signifikant stärker exprimiert wird. Dies ließ sich auf Proteinebene allerdings nicht bestätigen (Abb. 4-17). Der *Knockdown* von AGO2 konnte über den Differenzierungszeitraum konstant gehalten werden. In diesem Zeitraum ändert sich die mRNA von MRTF-A nicht. Auf Proteinebene ist mit der Kontroll-siRNA wieder eine Reduktion von MRTF-A zu sehen. Der AGO2 *Knockdown* zeigt für die Tag-7-Probe allerdings signifikant mehr MRTF-A als die Kontrollprobe (Abb. 4-17B). Somit kommt es im AGO2 *Knockdown* zu einer verringerten Reduktion von MRTF-A während der C2C12-Differenzierung.

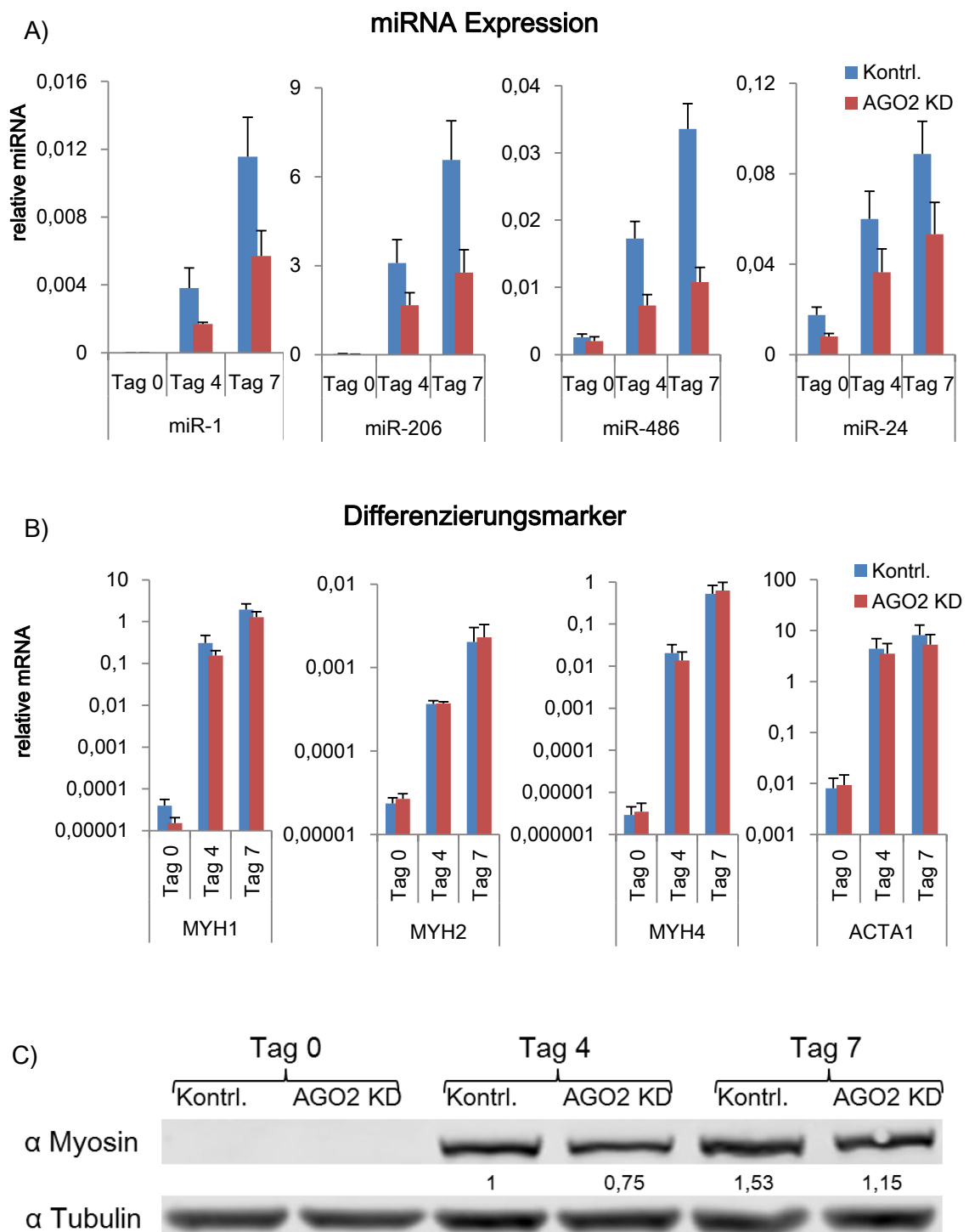
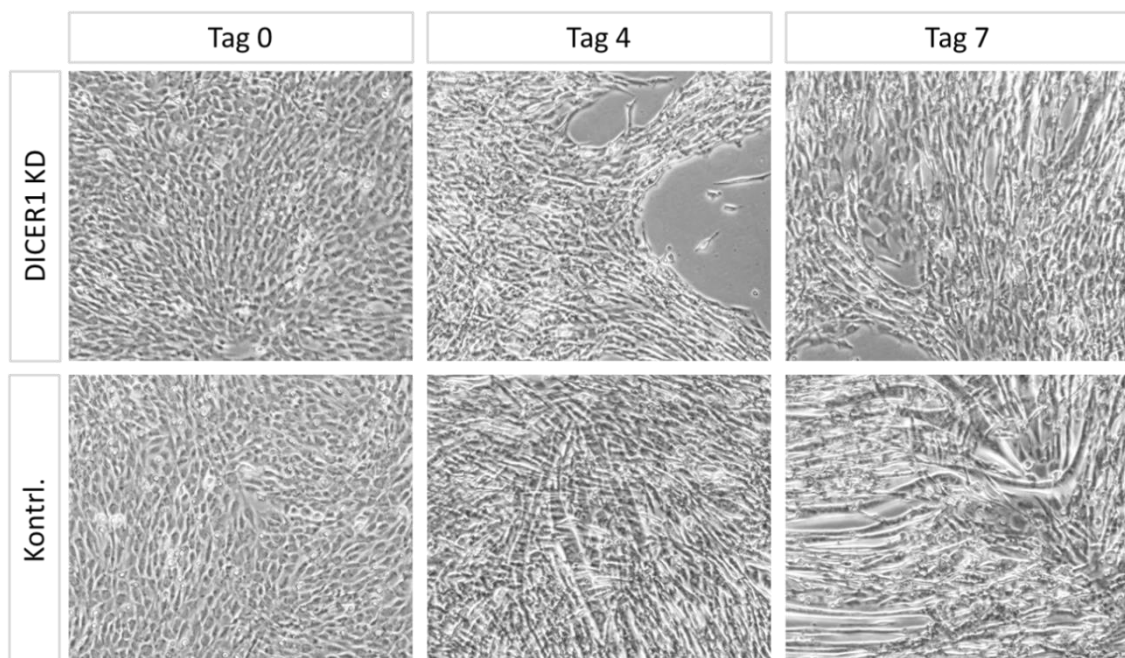


Abb. 4-18: AGO2 Knockdown hemmt die miRNA Expression während der C2C12-Differenzierung

C2C12-Zellen wurden 1 Tag vor der Differenzierung mit siRNA gegen AGO2 transfiziert. Während der Differenzierung wurden die Zellen erneut an Tag 1, 3 und 5 transfiziert. Proben von Tag 0, 4 und 7 wurden mittels qRT-PCR bzw. Western-Blots auf Differenzierungsmarker untersucht. A) Dargestellt ist die relative miRNA Expression normalisiert auf das Referenzgen U6. B) Dargestellt ist die relative Expression der Differenzierungsmarker normalisiert auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. C) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blots für Myosin. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Quantifiziertes Myosin Protein normalisiert auf die Tag-4-Probe mit Kontroll-siRNA ist unter der Myosin-Bande angegeben. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n=3).

Interessanterweise führte der AGO2 *Knockdown* in allen getesteten miRNAs zu einer reduzierten Expression, wie exemplarisch an miR-1a-3p, -206-3p, -486-5p und -24-3p zu sehen ist (Abb. 4-18A). Die Differenzierungsmarker zeigen auf mRNA Ebene keine signifikanten Veränderungen. Auf Proteinebene führt der AGO2 *Knockdown* im Vergleich zur jeweiligen Kontroll-siRNA zu einer leicht verringerten Myosin Expression (Abb. 4-18B & C).

Eine weitere Möglichkeit alle miRNAs herunter zu regulieren ist die Inhibierung der miRNA-Reifung. Dieser Prozess läuft in mehreren Schritten ab (Lee *et al.* 2002). Einer der wichtigsten Schritte stellt der Verdau der pre-miRNA zu ca. 22 Nukleotide langen Doppelstrang-miRNAs durch DICER1 im Zytoplasma dar (Grishok *et al.* 2001, Hutvágner *et al.* 2001, Ketting *et al.* 2001). Aus diesem Grund wurde in C2C12-Zellen ein DICER1 *Knockdown* erzeugt, um damit die Daten des AGO2 *Knockdowns* zu überprüfen. Der Versuchsaufbau blieb dabei unverändert. Bereits die Zellen des DICER1 *Knockdowns* zeigten im Laufe der Differenzierung große morphologische Änderungen verglichen mit der Kontrolle (Abb. 4-19). Es sind viel weniger Myotuben im DICER1 *Knockdown*, verglichen mit der Kontrolle, zu erkennen.

**Abb. 4-19: Weniger Myotubenbildung durch DICER1 Knockdown.**

C2C12-Zellen wurden 1 Tag vor der Differenzierung mit siRNA gegen DICER1 transfiziert. Während der Differenzierung wurden die Zellen erneut an Tag 1, 3 und 5 transfiziert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen vom Differenzierungsverlauf von *Knockdown*-Zellen und Kontrollzellen zu den angegebenen Zeitpunkten.

Wie in Abb. 4-20A zu sehen ist, war auch der *Knockdown* von DICER1 über den gesamten Differenzierungszeitraum stabil. Anders als bei AGO2 verändert sich die DICER1 Expression nicht signifikant im Zuge der Differenzierung (vergleiche Abb. 4-17A und 4-20A). Die Expression von MRTF-A mRNA zeigt, bezogen auf die Kontrolle des jeweiligen Tages, ebenfalls keine signifikanten Änderungen während der Differenzierung. Auf Proteinebene ist für die Kontrollproben wieder eine stetige Abnahme von MRTF-A während der Differenzierung zu erkennen (Abb. 4-20B). Bei Betrachtung des DICER1 *Knockdowns* erkennt man, genau wie bei dem AGO2 *Knockdown*, dass die Tag-7-Probe signifikant mehr MRTF-A aufweist als die Kontrollprobe am selben Tag.

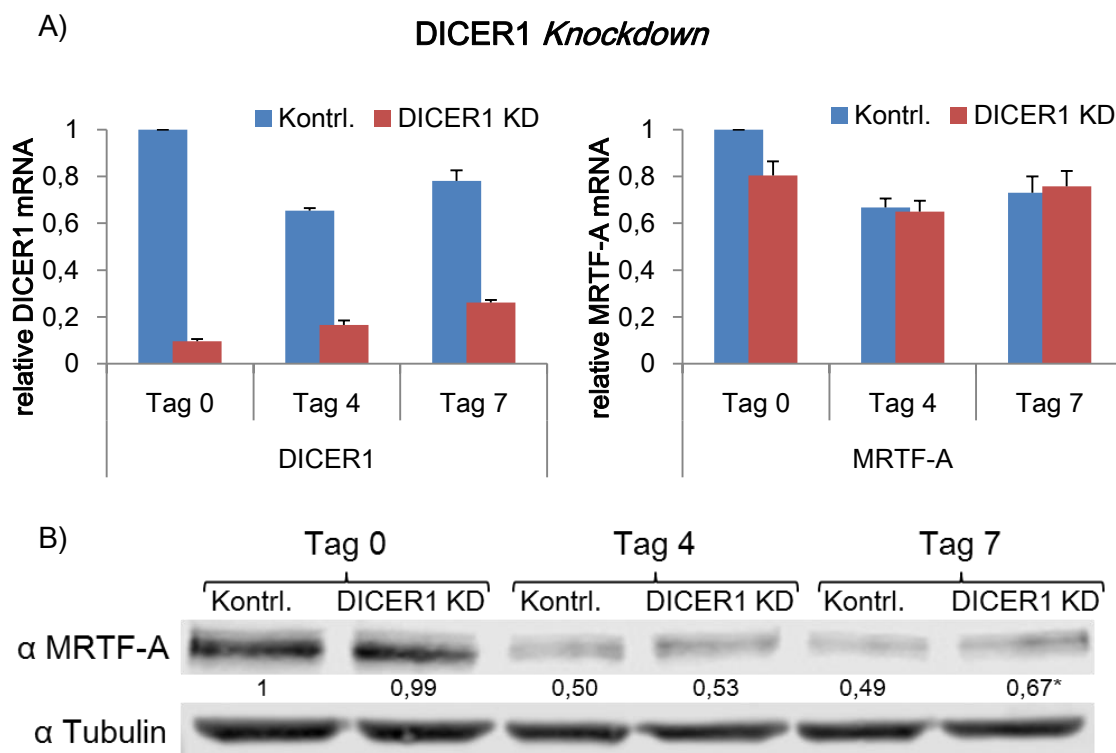


Abb. 4-20: DICER1 *Knockdown* hemmt die MRTF-A Reduktion während der C2C12-Differenzierung
 C2C12-Zellen wurden 1 Tag vor der Differenzierung mit siRNA gegen DICER1 transfiziert. Während der Differenzierung wurden die Zellen erneut an Tag 1, 3 und 5 transfiziert. Proben von Tag 0, 4 und 7 wurden mittels qRT-PCR bzw. Western-Blots auf MRTF-A und DICER1 Expression untersucht. A) Dargestellt ist die relative MRTF-A bzw. DICER1 Expression bezogen auf die Tag-0-Probe mit Kontroll-siRNA. Die Normalisierung erfolgte auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. B) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blots für MRTF-A. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Quantifiziertes MRTF-A Protein normalisiert auf die Tag-0-Probe mit Kontroll-siRNA ist unter der MRTF-A-Bande angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe bestimmt: * $P \leq 0,05$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=3$).

Die miRNA Expression ist für alle getesteten miRNAs im DICER1 *Knockdown* sowohl an Tag 4 als auch 7 der Differenzierung deutlich geringer als in der Kontrollprobe, wie exemplarisch an miR-1a-3p, -206-3p, -486-5p und -24-3p zu sehen ist (Abb. 4-21A). Daraus lässt sich schließen, dass ein DICER1 *Knockdown* wie erwartet die miRNA Reifung inhibiert. Weiterhin ist festzustellen, dass die Differenzierungsmarker nach 4- bzw. 7-tägiger Differenzierung ebenfalls signifikant schwächer exprimiert sind als in der vergleichbaren Kontrolle (Abb. 4-21B). Diese Beobachtung lässt sich auch auf

Proteinebene bestätigen. Verglichen mit den jeweiligen DICER1 *Knockdown* Proben an Tag 4 bzw. 7 zeigen die Kontrollproben signifikant mehr Myosin, was sich auch mit den morphologischen Veränderungen der Zellen des DICER1 *Knockdown* deckt, die weniger Myotuben ausbilden und weniger differenziert sind (vergleiche mit Abb. 4-19).

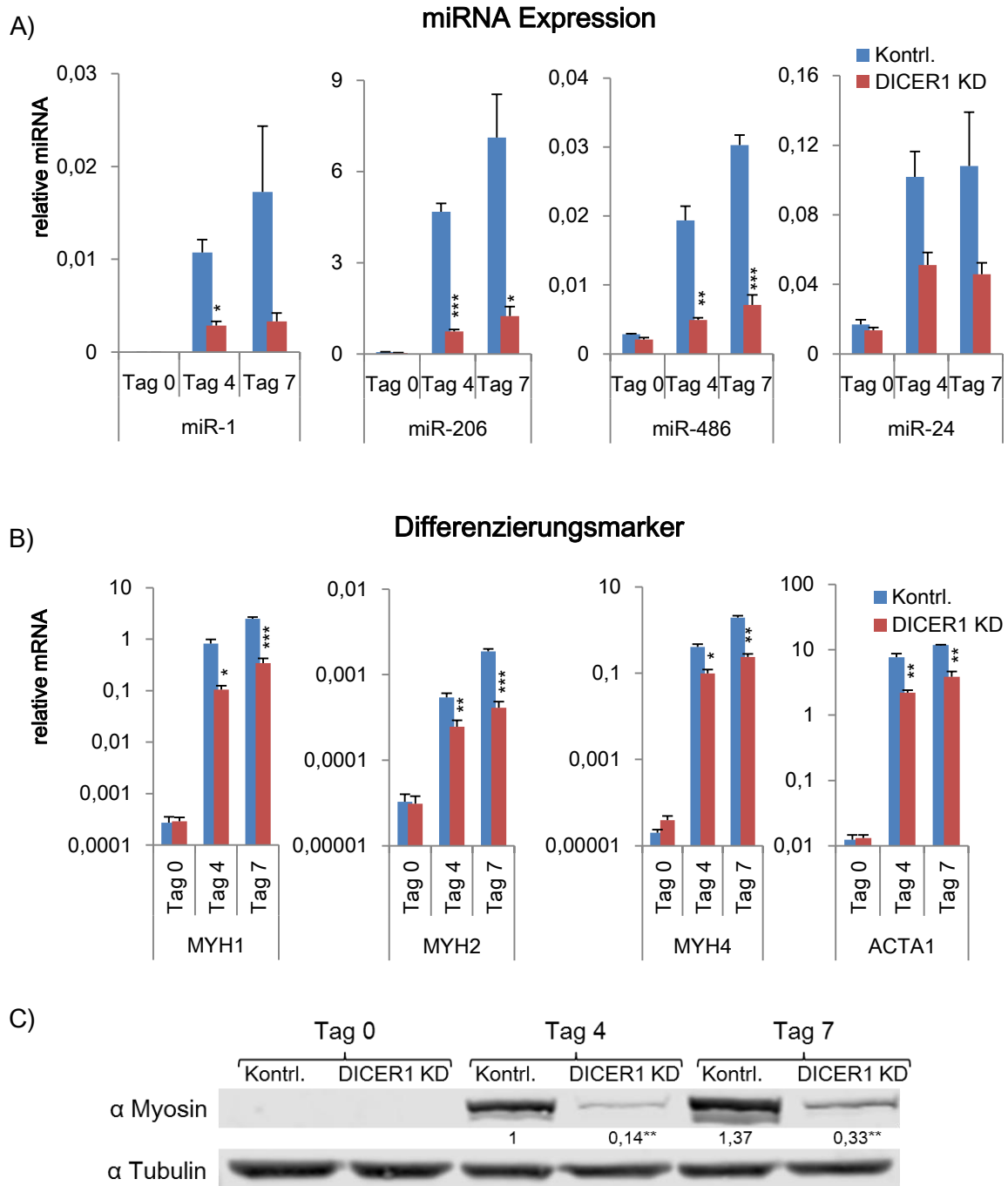


Abb. 4-21: DICER1 *Knockdown* hemmt die miRNA Expression und C2C12-Differenzierung

C2C12-Zellen wurden 1 Tag vor der Differenzierung mit siRNA gegen DICER1 transfiziert. Während der Differenzierung wurden die Zellen erneut an Tag 1, 3 und 5 transfiziert. Proben von Tag 0, 4 und 7 wurden mittels qRT-PCR bzw. Western-Blots auf Differenzierungsmarker untersucht. A) Dargestellt ist die relative miRNA Expression normalisiert auf das Referenzgen U6. B) Dargestellt ist die relative Expression der Differenzierungsmarker normalisiert auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. C) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blot für Myosin. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Quantifiziertes Myosin Protein normalisiert auf die Tag-4-Probe mit Kontroll-siRNA ist unter der Myosin-Bande angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Ein- bzw. Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe bestimmt: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=3$).

4.3.4. Posttranskriptionale Regulation von MRTF-A in der C2C12-Differenzierung

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass miRNAs einen Einfluss auf die Expression von MRTF-A besitzen. Deshalb war das nächste Ziel, nachzuweisen, dass es sich dabei um eine direkte Interaktion von MRTF-A mRNA und miRNA handelt. Aus diesem Grund sollte zuerst untersucht werden, wie sich die MRTF-A-Expression während der Differenzierung verhält, wenn die MRTF-A mRNA keine 3'UTR und damit keine miRNA Bindestellen besitzt. Um diese Fragestellung zu untersuchen wurde in C2C12-Zellen, mit Hilfe der Plasmide *pLVX- MRTF-A + 3'UTR* und *pLVX- MRTF-A*, MRTF-A mRNA mit und ohne 3'UTR transkribiert. Anschließend wurden die Zellen differenziert und die Expression von MRTF-A mittels Western-Blot an Tag 0, 4 und 7 untersucht (Abb. 4-22). Als Kontrolle wurden C2C12-Zellen mit *pLVX-GFP* transfiziert.

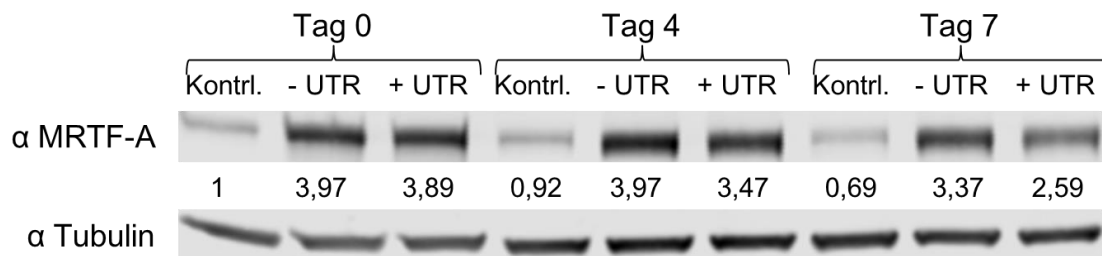


Abb. 4-22: MRTF-A wird über die 3'UTR während der Differenzierung reguliert.

C2C12-Zellen wurden 24 h mit *pLVX*-Plasmiden zur Transkription von MRTF-A mRNA mit bzw. ohne 3'UTR transfiziert. Anschließend wurde die Differenzierung gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten die Expression von MRTF-A untersucht. Als Kontrolle wurden C2C12-Zellen mit einem GFP exprimierenden *pLVX*-Plasmid transfiziert. Dargestellt ist die Protein-Expression mittels Western-Blot für MRTF-A. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Quantifiziertes MRTF-A Protein normalisiert auf die Tag-0-Probe mit Kontrollplasmid ist unter der MRTF-A-Bande angegeben (n=2).

In der Kontrolltransfektion zeigten die Zellen an Tag 4 und 7 im Vergleich zu Tag 0 weniger MRTF-A Protein und ebenfalls den bereits beschriebenen Verlust von MRTF-A während der Differenzierung. Die Transfektion mit *pLVX- MRTF-A + 3'UTR* und *pLVX- MRTF-A* führte in beiden Fällen zu einer ähnlichen Proteinoxpression, die eine 3,97-fache (mit 3'UTR) bzw. 3,89-fache (ohne 3'UTR) Überexpression von MRTF-A im Vergleich zur Kontrolle aufwies. Die Transfektion von *pLVX- MRTF-A + 3'UTR* führte im Verlauf der Differenzierung zu einer Proteinabnahme von ca. 15 % auf eine 3,37-fache Überexpression bezogen auf die Kontrolle von Tag 0. Die Transfektion von *pLVX- MRTF-A* führt im Verlauf der Differenzierung mit ca. 35% zu einer mehr als doppelt so hohen Abnahme des Proteingehalts und besaß an Tag 7 eine 2,59-fache höhere Expression als die Kontrolle von Tag 0. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Abnahme der MRTF-A-Expression während der Differenzierung geringer ausfällt, wenn die mRNA, von der das Protein translatiert wird, keine 3'UTR besitzt.

Daher stellte sich als nächstes die Frage, wo genau auf der 3'UTR die miRNA Bindestellen lokalisiert sind. Um dies zu untersuchen wurde das *pMIR-Glo* Reporterplasmid verwendet. Dieses Plasmid besitzt das Fireflyluciferasegen unter Kontrolle eines Phosphoglyceratkinase1-Promotors (PGK). Hinter die Luciferase ist die

3'UTR der MRTF-A mRNA kloniert worden. Die Etablierungsarbeit erfolgte mit verschiedenen Zelllinien, sowie Transfektionsansätzen und Reagenzien. Zuerst wurde das Reporterplasmid in HEK293T-Zellen exprimiert. Bei gleichzeitiger Überexpression der miRNAs wäre eine Reduktion des Luciferasesignals zu erwarten gewesen. Allerdings war es nach mehreren Optimierungsschritten nicht möglich reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Ferner handelt es sich hierbei um einen sehr artifiziellen Versuchsansatz. Als nächstes wurde eine Expression des Reporterplasmids in C2C12-Zellen untersucht. Während der Differenzierung werden die MRTF-A bindenden miRNAs exprimiert. Diese sollten nun ebenfalls die mRNA der Fireflyluciferase mit dem MRTF-A 3'UTR binden und so für eine verringerte Expression sorgen. Dies würde im Endeffekt zu einem geringeren Reportersignal führen. Für die Plasmidtransfektion in C2C12 waren weitere Etablierungsarbeiten notwendig, auf die in Abschnitt 4.5.1 näher eingegangen wird. Nach weiteren Optimierungsschritten sah das Protokoll wie folgt aus: 1,5 ng Reporterplasmid wurden mit 1,5 µg *pEF-plink* in C2C12-Zellen transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen auf Differenzierungsmedium gewechselt. Zu den Zeitpunkten Tag 0, 4 und 7 wurde eine Probe gesammelt und bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt.

Für die Versuche wurden die miRNAs verwendet, welche die höchste Anreicherung im miTRAP und die stärksten Effekte bei deren Überexpression zeigten, miR-1a-3p, -206-3p, -24-3p und -486-3p. Um eine direkte Bindung von miRNAs nachweisen zu können, musste deren Bindung verhindert werden.

MRTF-A 3'UTR(330-351):mmu-miR-1a-3p 3' uauguaugaagaaaUGUAAGGu 5' mmu-miR-1 330:5' aggccucuacucaccCAUUCc 3' MRTF-A	MRTF-A 3'UTR(756-777):mmu-miR-1a-3p 3' uauguaugaagaaaUGUAAGGu 5' mmu-miR-1 756:5' cucuccacucaccACAUUCc 3' MRTF-A
MRTF-A 3'UTR(330-351):mmu-miR-206-3p 3' ggugugugaaggaauGUAAGGu 5' mmu-miR-206 330:5' aggccucuacucaccCAUUCc 3' MRTF-A	MRTF-A 3'UTR(756-777):mmu-miR-206-3p 3' gguguGUAAGGAAUGUAAGGu 5' mmu-miR-206 756:5' cucucCACUCACCCACAUUCc 3' MRTF-A
MRTF-A 3'UTR(58-79):mmu-miR-24-3p 3' gaCAAGGACGACU-UGACUCGGu 5' mmu-miR-24 58:5' acGCUCcUG-UGACUGUGAGCCu 3' MRTF-A	MRTF-A 3'UTR(554-575):mmu-miR-486-5p 3' gagcccCGUCGAGUCAUGUCCu 5' mmu-miR-486 : : : 554:5' cuguuuGGGGCUUGAUACAGGa 3' MRTF-A

Abb. 4-23: Mögliche Bindungen von miR-1a-3p, -206-3p, -24-3p und 486-5p auf MRTF-A 3'UTR (nach www.microrna.org)

In Abb. 4-23 sind die potentiellen Bindestellen der genannten miRNAs dargestellt (nach www.microrna.org). Anders als es Minami *et al.* 2012 für die humane 3'UTR beschrieben hat, gibt es in der murinen 3'UTR eine weitere potentielle Bindestellen für miR-1a-3p. Interessanterweise sind diese Bindestellen mit denen von miR-206-3p identisch, was an der hohen Sequenzhomologie der beiden miRNAs liegen könnte. Diese Daten konnten auch durch mindestens eine weitere Datenbank bestätigt werden. Auf Basis dieser Daten wurden drei Reporterplasmide erstellt, die jeweils verschiedene Deletionen enthielten, um die potentiellen Bindestellen zu entfernen (Abb. 4-24).

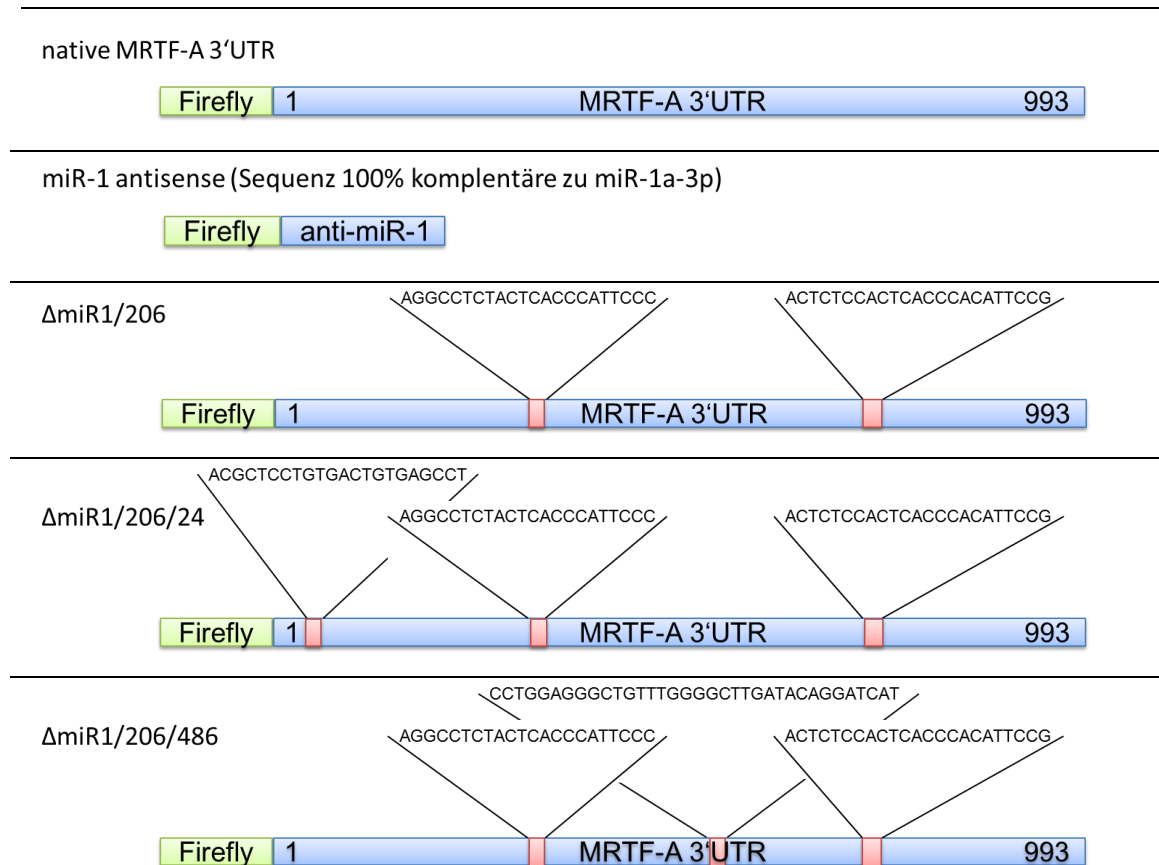


Abb. 4-24: Schematische Darstellung der im Luciferaseversuch verwendeten MRTF-A mRNA 3'UTR

Die MRTF-A mRNA 3'UTR wurde hinter das Fireflygen kloniert (Wildtyp). Als Positivkontrolle wurde die komplementäre Sequenz der miR-1a-3p anstelle der MRTF-A 3'UTR hinter das Fireflygen kloniert (miR-1 antisense). Anhand der potentiellen Bindestellen aus Abb. 4-23 wurden mittels SOMA-Mutagenese verschiedene Sequenzen deletiert. In der Mutante Δ miR1/206 wurden die Bindestellen von miR-1a-3p und -206-3p entfernt. In der Mutante Δ miR1/206/24 ist zusätzlich noch die Bindestelle von miR-24-3p entfernt. In der Mutante Δ miR1/206/486 ist zusätzlich zu den Deletionen von Mutante Δ miR1/206 noch die Bindestelle von miR-486-5p entfernt.

Neben den Mutanten und der Sequenz der nativen 3'UTR wurde für den Versuch auch eine Positivkontrolle verwendet. Hierbei handelt es sich um die komplementäre miR-1a-3p-Sequenz. Kommt es zur Expression von miR-1a-3p, kann diese vollständig die Positivkontrolle binden, was zu einem verringerten Luciferasesignal führt. Die Positivkontrolle zeigt auch wie stark die zu erwartende Reduktion der Luciferaseaktivität maximal ausfallen kann. Die Daten zu dem Luciferaseversuch sind in Abb. 4-25 zusammen gefasst.

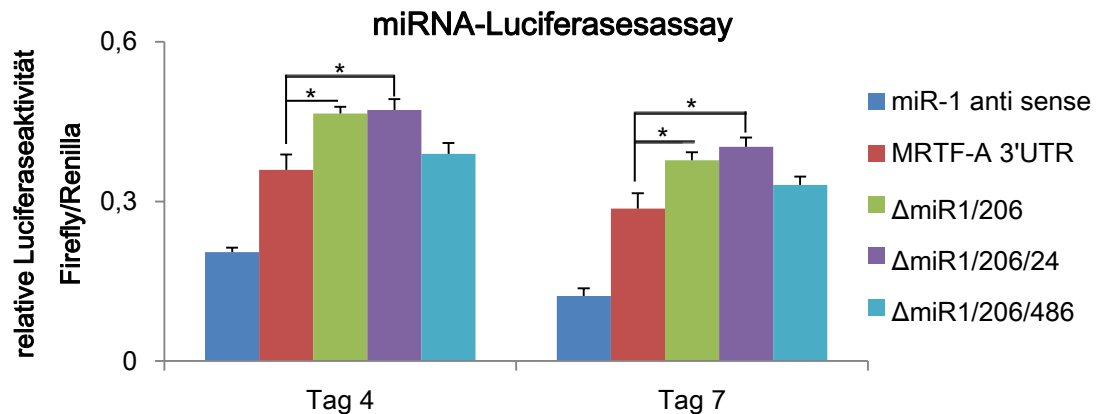


Abb. 4-25: 3'UTR-Sequenzen ohne miRNA Bindestellen zeigen höhere Luciferaseaktivität

C2C12-Zellen wurden mit den *pmiR-Glo* Reporterplasmiden, welche die genannten 3'UTR-Sequenzen besitzen (vergleiche mit Abb. 4-24), transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf Differenzierungsmedium gewechselt. An den Tagen 0, 4 und 7 wurden Proben gesammelt und die Luciferaseaktivität gemessen. Dargestellt ist die relative Aktivität der Fireflyluciferase bezogen auf die Aktivität der Renillaluciferase. Die Daten wurden auf die jeweilige Tag-0-Probe (nicht gezeigt) normalisiert. miR-1 antisense wurde als Positivkontrolle verwendet. Statistische Signifikanz wurde mit Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Probe mit nativer MRTF-A 3'UTR bestimmt: * $P \leq 0,05$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=4$).

Verglichen mit den weiteren Proben zeigte die Positivkontrolle wie erwartet die niedrigste Luciferaseaktivität an Tag 4 und 7. Bezogen auf die Positivkontrolle besaß die native MRTF-A-3'UTR an beiden Tagen eine doppelt so hohe Luciferaseaktivität. Die Mutanten Δ miR1/206 und Δ miR1/206/24 zeigten an Tag 4 und 7 eine signifikant höhere Luciferaseaktivität als die native MRTF-A-3'UTR. An Tag 7 war die Luciferaseaktivität von Mutante Δ miR1/206/24 größer als von Δ miR1/206. Mutante Δ miR1/206/486 wies hingegen an Tag 4 und 7 eine vergleichbare Luciferaseaktivität wie die native MRTF-A-3'UTR auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die 3'UTR von MRTF-A miRNA Bindestellen für miR-1, -206 und -24 besitzt, wodurch es diesen miRNAs möglich ist reprimierend auf die Translation einzuwirken.

4.4. Untersuchung der posttranslationalen Regulation von MRTF-A in der C2C12-Differenzierung

Neben einer posttranskriptionalen Regulation gibt es weitere Möglichkeiten, die das beobachtete Verhalten der MRTF-A-Expression erklären könnten. So wäre es beispielsweise möglich, dass während der Differenzierung die Transkription der MRTF-A mRNA unverändert bliebe, aber posttranslational das MRTF-A Protein vermehrt abgebaut wird. Um dies genauer zu untersuchen wurde der Proteaseinhibitor MG132 und der Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) verwendet. Zunächst wurden undifferenzierte und 4 Tage differenzierte C2C12-Zellen jeweils 6 h mit MG132 (10 μ M) behandelt bzw. DMSO als Kontrolle (Abb. 4-26). Als Positivkontrolle wurde die Expression von p53 und Ubiquitin untersucht. p53 wird durch die E3 Ligase ubiquitiert und auf diese Weise schnell abgebaut. Dadurch ist es in unbehandelten Zellen nicht detektierbar (Asher & Shaul 2005, Abb. 4-26A). Durch die Behandlung mit MG132 wird der proteasomale Abbau inhibiert, p53 stabilisiert und detektierbar.

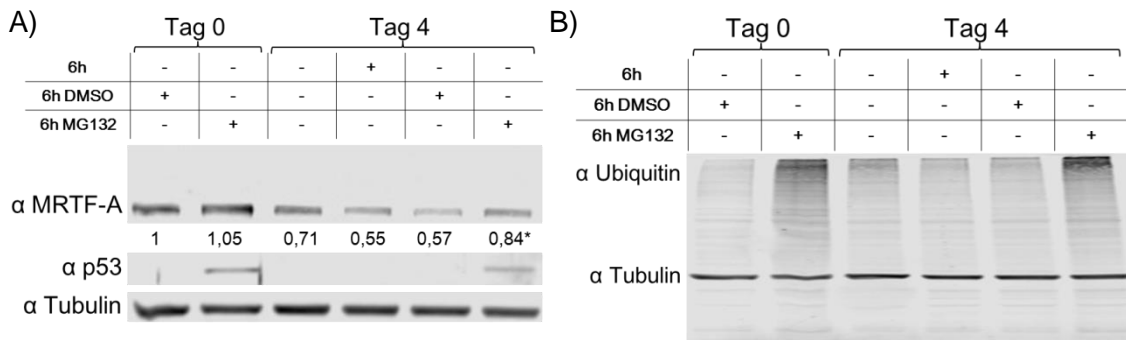


Abb. 4-26: Vermehrtes MRTF-A Vorkommen nach MG132 Behandlung in differenzierenden C2C12
 C2C12-Zellen wurden 4 Tage differenziert oder undifferenziert jeweils 6 h mit MG132 (10 μ M) oder als Kontrolle mit DMSO behandelt. Differenzierende Zellen wurden zusätzlich 6 h ohne weitere Zusätze inkubiert, um die MRTF-A Reduktion in dieser Zeit zu beobachten. Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blots für MRTF-A und p53 als Kontrolle (A) und Ubiquitin als Kontrolle (B). Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Quantifiziertes MRTF-A Protein normalisiert auf die Tag-0-Probe mit DMSO Behandlung ist unter der MRTF-A-Bande angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe bestimmt: * $P \leq 0,05$. (n=3).

Durch eine Proteasominhibierung wird auch Ubiquitin akkumuliert und erzeugt, wie in diesem Experiment beobachtet, ein verstärktes Ubiquitinsignal (Zhang 2011, Abb. 4-26B). Die Reduktion von MRTF-A von Tag 0 auf Tag 4 war auch in diesen Versuch zu erkennen. Die Probe die zusätzlich 6 h inkubiert wurde, zeigte nochmals einen geringeren MRTF-A Gehalt. Wurden die Zellen mit MG132 behandelt, waren in undifferenzierten Zellen bezogen auf die Kontrolle, vergleichbare Mengen an MRTF-A zu erkennen. In differenzierenden Zellen führte die MG132 Behandlung zu einem höheren MRTF-A Gehalt verglichen mit der Kontrolle, was auf einen proteasomalen Verdau von MRTF-A hinweist.

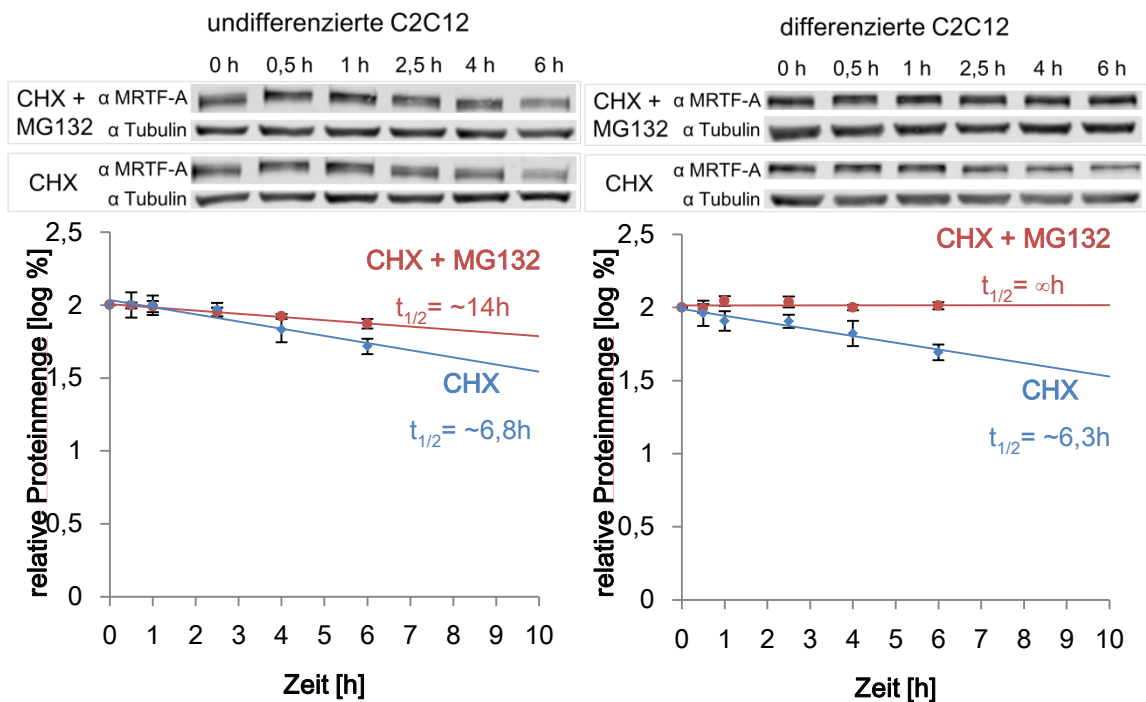


Abb. 4-27: Halbwertszeit von MRTF-A ändert sich während der Differenzierung nicht

C2C12-Zellen im undifferenzierten (links) und differenzierenden (rechts) Zustand mit CHX bzw. CHX und MG132 behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen gesammelt und mittels Western-Blots auf die MRTF-A-Expression untersucht. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Zur Halbwertszeitbestimmung wurden die Banden prozentual auf die 0-h-Probe normalisiert, sodass 0 h=100%. Anschließend wurde der Logarithmus zur Basis 10 der Prozente bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Halbwertszeit wurde aus der sich ergebenden Gerade für $\log_{10} 50\%$ berechnet. Dargestellt sind jeweils repräsentative Western-Blots sowie die logarithmierte MRTF-A Menge aufgetragen gegen die Zeit. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n=3)

Um herauszufinden ob es während der Differenzierung zu einem vermehrten proteasomalem Verdau kommt, wurde als nächstes die Halbwertszeit von MRTF-A in undifferenzierten und differenzierenden C2C12-Zellen bestimmt. Eine vermehrte MRTF-A Degradation während der Differenzierung müsste sich in einer verkürzten Halbwertszeit zeigen. Undifferenzierte und 4 Tage differenzierte C2C12-Zellen wurden hierfür mit 100 µg/ml CHX behandelt. Dies führt zu einer Inhibierung der Translation. Über die Zeit wurde die MRTF-A Proteinmenge quantifiziert und daraus die Halbwertszeit berechnet. Als Kontrolle wurden Zellen mit 100 µg/ml CHX und MG132 (10 µM) behandelt. Durch die zusätzliche Proteasominhibierung sollte sich die Halbwertszeit verlängern. Die Halbwertszeit in undifferenzierten Zellen beträgt 6,8 h und in differenzierenden Zellen 6,3 h (Abb. 4-27). Daraus lässt sich folgern, dass MRTF-A in undifferenzierten sowie differenzierenden C2C12-Zellen mit einer ähnlichen Geschwindigkeit abgebaut wird. Die Kontrolle mit CHX und MG132 führte in beiden Fällen wie erwartet zu einer verlängerten Halbwertszeit und bestätigten damit den ordnungsmäßigen Ablauf des Versuchs.

4.5. Die Rolle von MRTF-A in der Differenzierung von C2C12-Zellen

4.5.1. Etablierung einer MRTF-A Überexpression

Neben der Regulation von MRTF-A in C2C12-Zellen war eine weitere wichtige Frage, wieso MRTF-A während der Differenzierung herunterreguliert wird. Diese Frage sollte mit Hilfe einer stabilen MRTF-A-Überexpression für die Dauer der Differenzierung (maximal 7 Tage) untersucht werden. Hierfür musste besonders auf die Vitalität der Zellen geachtet werden, da die Differenzierung und insbesondere die morphologischen Änderungen mögliche Rückschlüsse über die Funktion von MRTF-A geben könnten. Eine schnelle und einfache Art die Differenzierungsfähigkeit der Zellen zu bestimmen stellt dabei die Myotubenbildung dar, welche fotografisch dokumentiert werden kann. Während der Etablierung einer Plasmidtransfektion, die sowohl schonend für die Zellen, aber gleichzeitig auch 7 Tage stabil ist, wurden verschiedene Reagenzien und Methoden getestet und dabei die Myotubenbildung nach 7 Tagen fotografisch dokumentiert (Abb. 4-28). Zuerst wurde eine transiente Transfektion mit dem Plasmid *pEGFP-N1-MAL f.1* und den Transfektionsreagenz Lipfectamin 2000 getestet. Als Kontrolle wurde *pEGFP-N1* transfiziert. 24 h nach der Transfektion startete die Differenzierung. Nach 7-tägiger Differenzierung waren sowohl für die Überexpression als auch für die Kontrolle nur geringe Ansätze einer Myotubenbildung im Vergleich zu

nicht transfizierten Zellen zu erkennen. Da die Transfektion mit direkt anschließender Differenzierung zu viel Stress für die Zellen sein könnte, wurde als nächstes versucht von den transfizierten Zellen eine stabile Linie zu etablieren. Dies hätte als weiteren Vorteil, dass die Zellen eine hohe Transfektionsrate besäßen. Hierfür wurden Zellen nach demselben Protokoll transfiziert und anschließend 2 Wochen mit G-418 (1 mg/ml) selektiert. Der Zellpool wurde anschließend ausgesät und 24h später startete die Differenzierung. Nach 7 Tagen zeigte sich sowohl bei der MRTF-A Überexpression als auch bei der Kontrolle keine Myotubenbildung. Danach wurde versucht die C2C12-Zellen mit Lentiviren zu infizieren. Das hierfür verwendete *pLVX* Plasmid wird während der Infektion, aber auch bei einer normalen Transfektion, stabil in das Genom der Zellen integriert. 24 h nach der Infektion wurde die Differenzierung gestartet. Nach 7 Tagen war für die Überexpression und auch für die Kontrolle keine Myotubenbildung zu sehen. Da die Zellen für siRNA-Transfektion das *Viromer Blue* sehr gut vertragen haben, wurde als letztes *Viromer Red* zur Plasmidtransfektion getestet. Für eine stabile Überexpression fiel die Entscheidung das *pLVX* Plasmid zu verwenden. Als Kontrolle wurde *pLVX-GFP* transfiziert. Die Auswertung der Daten sind in Abschnitt 4.5.2, Abb. 4-29 dargestellt.

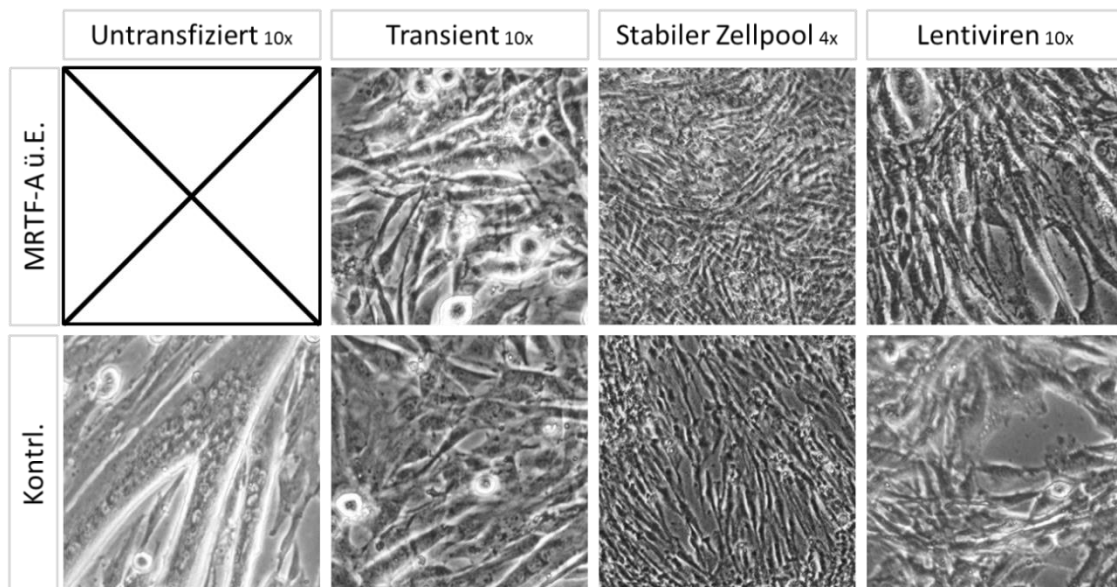


Abb. 4-28: Mit Plasmid transfizierte bzw. infizierte C2C12-Zellen nach 7-tägiger Differenzierung
C2C12-Zellen wurden nach verschiedenen Methoden mit Plasmiden transfiziert bzw. infiziert. Anschließend wurden die Zellen differenziert und nach 7 Tagen mikroskopisch auf Myotubenbildung untersucht. Zelltransfektion mit anschließender Differenzierung = Transient, Zelltransfektion mit 2 Wochen Selektion = Stabiler Zellpool, Zellinfektion mit Lentiviruspartikel = Lentiviren. Untransfizierte Zellen als Kontrolle. Aufnahmen entstanden mit den angegebenen Vergrößerungen.

4.5.2. Einfluss von MRTF-A auf C2C12-Differenzierung

Die Rolle von MRTF-A in der Skelettmuskeldifferenzierung ist, trotz der Zielgene von MRTF-A, die in Skelettmuskelzellen exprimiert werden, noch wenig untersucht. Erste Untersuchungen hierzu haben Selvaraj und Prywes 2003 veröffentlicht. Sie kamen zu dem Schluss, dass eine verminderte MRTF-A/B Aktivität die Proliferation verringert, was im weiteren Verlauf zu einer geminderten Differenzierung führt. 2005 zeigten Li

et al., dass eine verminderte MRTF-A Aktivität in der Maus eine gehemmte Muskelentwicklung zur Folge hat. Die Muskelfasern waren kleiner als in Kontrolltieren, was durch eine Hypoplasie erklärt wurde. Auch konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von MRTF-A in differenzierenden C2C12-Zellen eine inhibierende Wirkung auf die Differenzierung besitzt (Iwasaki *et al.* 2008). Für die Überexpressionsversuche wurden C2C12-Zellen für 24 h mit dem *pLVX* Plasmid transfiziert. Anschließend wurde die Differenzierung gestartet. Neben der Expression mittels qRT-PCR und Western-Blots wurden auch die morphologischen Änderungen mit Hilfe von Mikroskopieaufnahmen dokumentiert. Dabei zeigte sich, dass neben MRTF-A auch die verkürzte Variante (MRTF-A met: erste RPEL-Domäne fehlt) und die konstitutiv aktive Variante (Δ N-MRTF-A: alle RPEL-Domänen fehlen) zur Bildung von Zellaggregationen nach 4-tägiger Differenzierung führen (Abb. 4-29). Dadurch kam es im Vergleich zur Kontrolltransfektion (GFP) zu einer geringeren Myotubenbildung. Nach 7 Tagen Differenzierung haben sich auch in den MRTF-A transfizierten Zellen Myotuben ausgebildet. Die Zellaggregationen waren aber auch an Tag 7 noch erkennbar. Ebenso wirkten die Zellaggregationen der Δ N-MRTF-A Variante größer als die Aggregationen der anderen beiden Varianten.

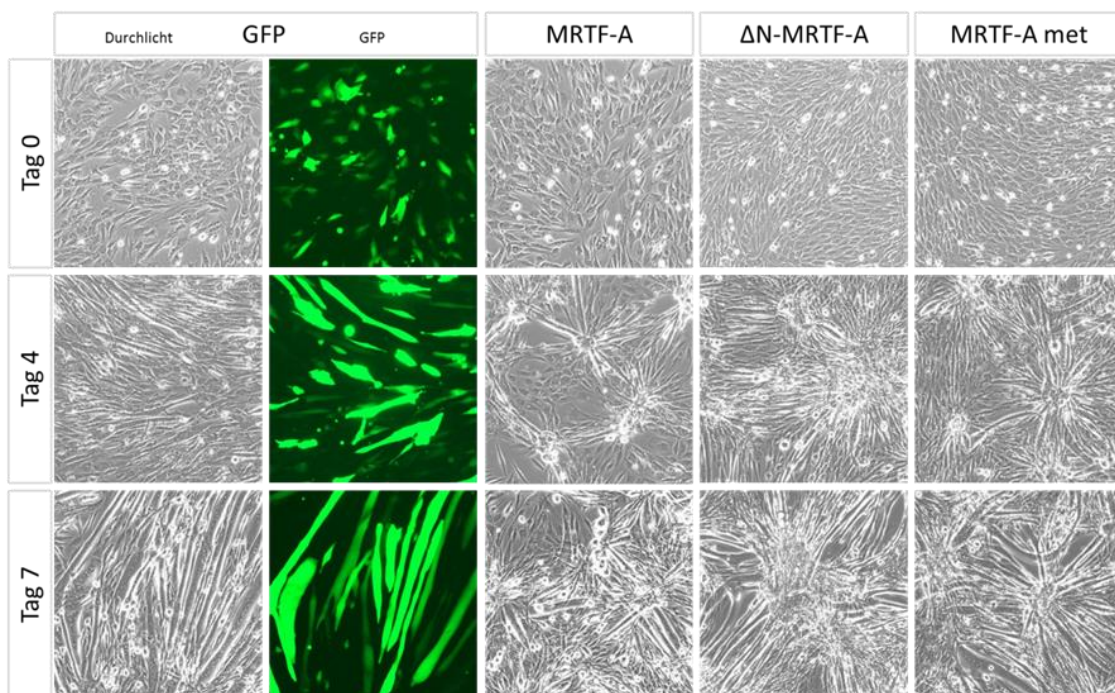


Abb. 4-29: MRTF-A Überexpression führt zu Zellaggregationen während der C2C12-Differenzierung

C2C12-Zellen wurden 24 h mit *pLVX* Plasmiden zur Expression von MRTF-A, Δ N-MRTF-A und MRTF-A met transfiziert. Anschließend wurde die Differenzierung gestartet und die morphologischen Veränderungen mit Hilfe mikroskopischer Aufnahmen dokumentiert. Als Kontrolle wurden C2C12-Zellen mit einem GFP exprimierendem *pLVX* Plasmid transfiziert. Die GFP Fluoreszenz wurde als Indikator für die Transfektionseffizienz mikroskopisch dokumentiert.

Die erfolgreiche und stabile Transfektion der C2C12-Zellen wurde anhand der GFP Expression in Abb. 4-29 und den Immunfluoreszenzfärbungen von MRTF-A und des HA-Tags (Abb. 4-30) dokumentiert. Die Immunfluoreszenzfärbung des HA-Tags zeigt transfizierte Zellen an und weist in den Zellen eine gleichmäßige Verteilung auf. Die

MRTF-A Färbung ist hingegen in allen Zellen detektierbar, wobei die transfizierten Zellen eine stärkere Färbung aufweisen, was auf eine stärkere MRTF-A-Expression hindeutet. Die Färbung für Myosin als Differenzierungsmarker zeigt nur eine geringe Signalintensität, da Myosin in undifferenzierten Zellen nicht exprimiert ist. Zur Färbung der Zellkerne wurde der Farbstoff DAPI verwendet.

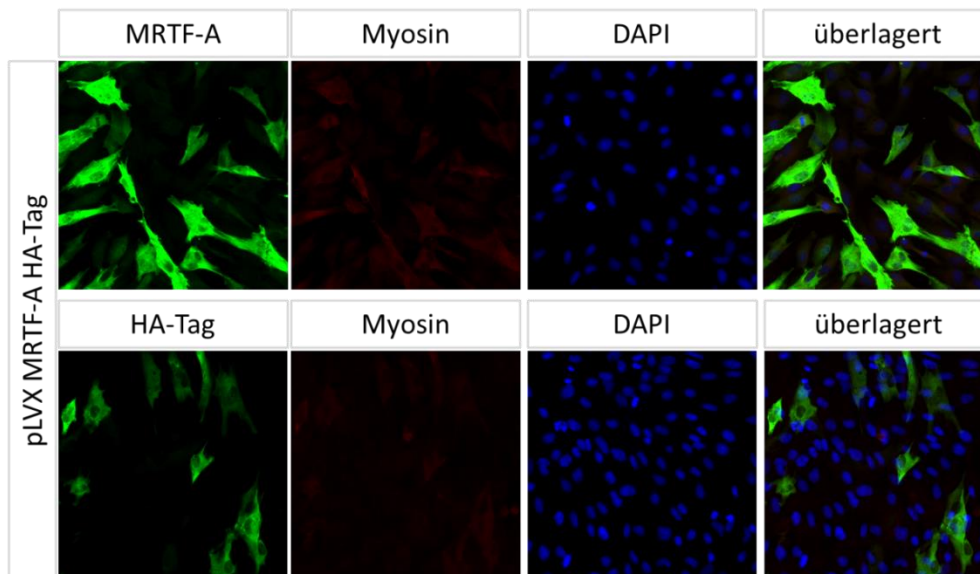


Abb. 4-30: Immunfluoreszenzfärbung zeigt positiv transfizierte undifferenzierte C2C12-Zellen
C2C12-Zellen wurden 24 h mit *pLVX*-Plasmiden zur Expression von MRTF-A transfiziert. Zur Überprüfung der MRTF-A Überexpression wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen gegen MRT-A, Myosin, HA-Tag und DNA (DAPI) durchgeführt. Die Aufnahmen entstanden am *Fluoreszenz-Mikroskop Axio Imager.M1* unter Verwendung eines 20x Objektivs.

Die MRTF-A-Expression dieser Zellen zeigt, dass eine konstante Überexpression für die 7-tägige Differenzierung gegeben war (Abb. 4-31A). Für die Kontrolle ist demgegenüber eine stetig abnehmende MRTF-A-Expression von Tag 0 bis Tag 7 zu beobachten. An Tag 4 war im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant geringere Myosin Expression zu sehen, was für eine inhibierte Differenzierung steht und die Daten der Mikroskopieaufnahmen bestätigt. Die auf die Kontrolltransfektion bezogene, signifikant verringerte Expression von Differenzierungsmarkern konnte auch auf mRNA Ebene bestätigt werden (Abb. 4-31C). Genau wie auf Proteinebene war dieser Unterschied an Tag 7 nur noch teilweise zu erkennen. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass miR-1a-3p und miR-486-5p nur an Tag 4 eine signifikant verringerte Expression im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Dies ist vor allem daher interessant, da miR-1a-3p und miR-486-5p durch SRF bzw. SRF und MRTF-A reguliert werden (Abb. 4-31B, Zhao *et al.* 2005, Chen *et al.* 2010, Small *et al.* 2010). Eine Überexpression von Δ N-MRTF-A und MRTF-A met führt ebenfalls zu einer verringerten Myosin Expression an Tag 4 der Differenzierung (Abb. 4-31D).

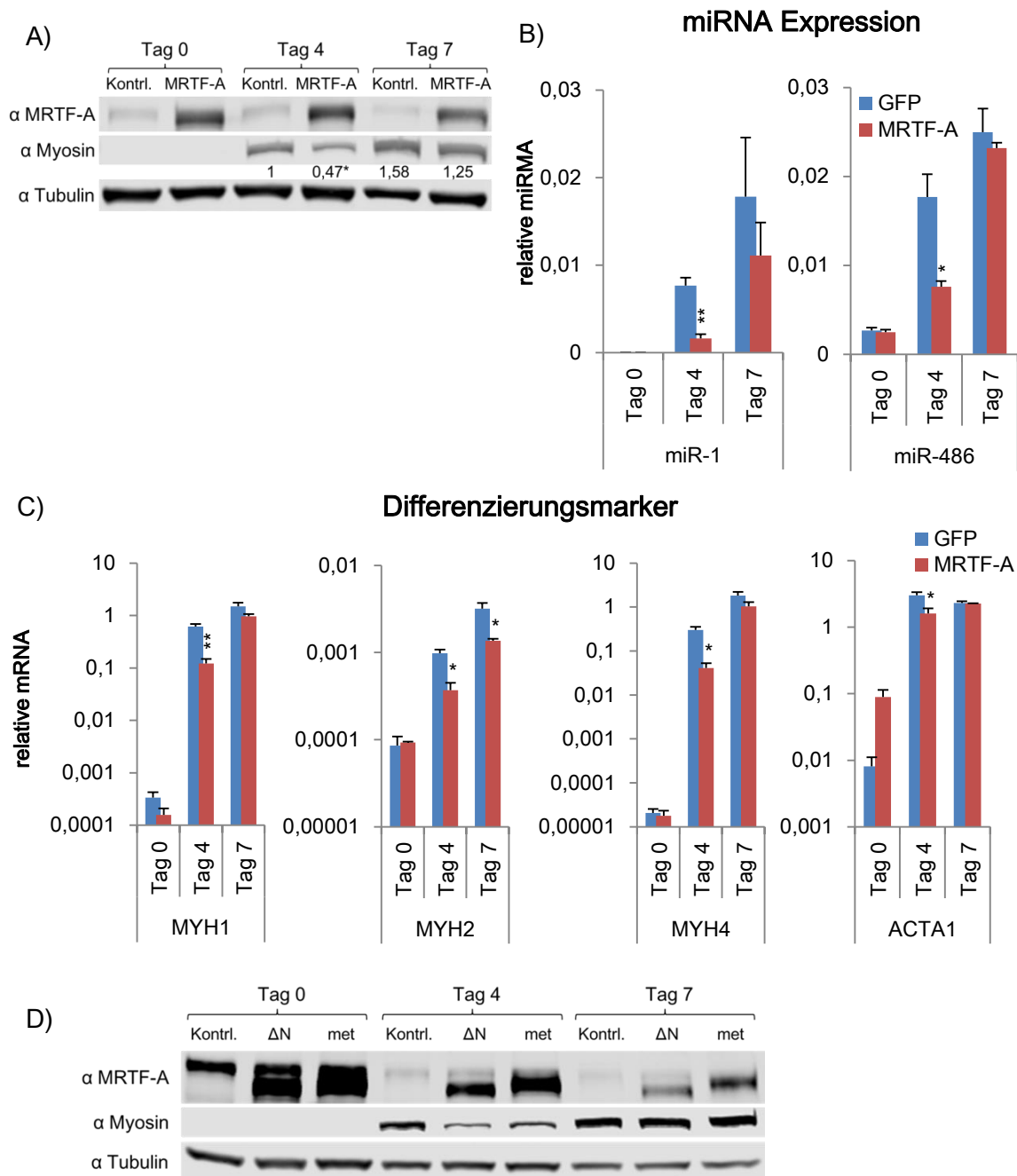


Abb. 4-31: MRTF-A Überexpression inhibiert C2C12-Differenzierung

C2C12-Zellen wurden 24 h mit *pLVX* Plasmiden zur Expression von MRTF-A und GFP als Kontrolle transfiziert. Anschließend wurde die Differenzierung gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten die Expression von MRTF-A, Differenzierungsmarkern und miRNAs untersucht. A) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blots für MRTF-A und Myosin. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Quantifiziertes Myosin Protein normalisiert auf die Tag-4-Probe der Kontrolltransfektion ist unter der Myosin-Bande angegeben. B) Dargestellt ist die relative miRNA Expression normalisiert auf das Referenzgen U6. C) Dargestellt ist die relative Expression normalisiert auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. D) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blots für ΔN (ΔN -MRTF-A) und met (MRTF-A met). Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Statistische Signifikanz wurde mit Ein- bzw. Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe bestimmt: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=3$).

Des Weiteren ist zu erkennen, dass es bei der Überexpression von ΔN -MRTF-A und MRTF-A met, auf Grund ihrer geringeren Größe im Vergleich zur Wildtypvariante, zur Detektion von Doppelbanden im Western-Blot kam. Dies zeigt, dass C2C12-Zellen womöglich nur die MRTF-A Variante mit drei RPEL-Domänen exprimieren.

Verglichen mit den Daten des DICER1 *Knockdowns* (Abb. 4-20 & 4-21), zeigte sich sowohl in der MRTF-A Überexpression, als auch in dem DICER1 *Knockdown* eine erhöhte Expression von MRTF-A nach 7-tägiger Differenzierung. In beiden Versuchen kam es gleichzeitig zu einer verringerten Expression der Differenzierungsmarker. Daher stellte sich die Frage, ob DICER1 und MRTF-A womöglich über denselben Mechanismus auf die Differenzierung von C2C12 einwirken. Die Überlegung war, dass ein *Knockdown* von MRTF-A den Phänotyp des DICER1 *Knockdowns* retten könnte. Dies würde weitere Einblicke in die Rolle von MRTF-A während der Differenzierung ermöglichen.

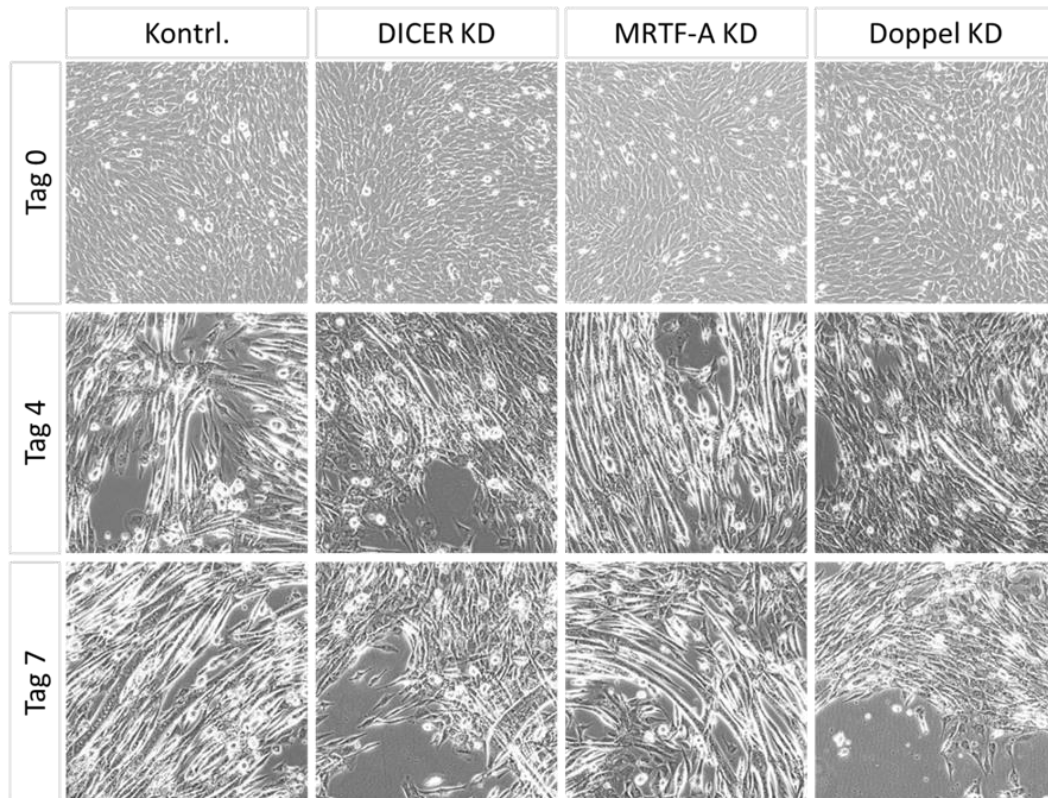


Abb. 4-32: Doppelter *Knockdown* zeigt selben Phänotyp wie DICER1 *Knockdown*

C2C12-Zellen wurden 1 Tag vor der Differenzierung mit siRNA gegen DICER1, MRTF-A oder gegen beides (doppelter *Knockdown*) transfiziert. Während der Differenzierung wurden die Zellen erneut an Tag 1, 3 und 5 transfiziert. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen vom Differenzierungsverlauf von *Knockdown*-Zellen und Kontrollzellen zu den angegebenen Zeitpunkten.

Für die Untersuchung wurde ein doppelter *Knockdown* von MRTF-A und DICER1 in C2C12 durchgeführt. Die Zellen wurden alle 48 h mit siRNA transfiziert um den *Knockdown* stabil für die 7-tägige Differenzierung zu halten. Zu den Zeitpunkten 0, 4 und 7 Tage wurde die Expression auf mRNA und Proteinebene untersucht, sowie mit mikroskopischen Aufnahmen morphologische Änderungen der Differenzierung dokumentiert. Dabei ist zu erkennen, dass sowohl die Kontrollprobe als auch der MRTF-A *Knockdown* an Tag 4 Myotubenbildung zeigten, welche bis Tag 7 weiter zunahm (Abb. 4-32). Der DICER1 *Knockdown* und der doppelte *Knockdown* zeigten stark verringerte Myotubenbildung verglichen mit der Kontrollprobe.

Der *Knockdown* von DICER1, MRTF-A und der doppelte *Knockdown* zeigten auf mRNA und Proteinebene zu allen drei Messpunkten deutlich geringere Expression als

die Kontrollprobe. Somit war der *Knockdown* in allen drei Ansätzen, für den Zeitraum der Messungen, erfolgreich und stabil (Abb. 4-33 & 4-34B). Die mRNAs von MRTF-A und DICER1 blieben ausgenommen von dem *Knockdown* unverändert. Auf Proteinebene war MRTF-A im DICER1 *Knockdown* verglichen zur Kontrolle nach 4- und 7-tägiger Differenzierung stärker exprimiert. Die MRTF-A-Expression des doppelten *Knockdowns* war an beiden Messpunkten der Differenzierung stärker als die Expression des MRTF-A *Knockdowns* aber schwächer als die Expression des DICER1 *Knockdowns* (Abb. 4-34B). Die Differenzierungsmarker zeigten auf mRNA und auf Proteinebene im DICER1 sowie im doppelten *Knockdown* eine verringerte Expression verglichen mit der Kontrolle und dem MRTF-A *Knockdown* am jeweiligen Tag. Zwischen DICER1- und doppelten *Knockdown* waren zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zu erkennen. Die Differenzierungsmarker des MRTF-A *Knockdowns* verhielten sich wie die der Kontrolle (Abb.4-34A & B).

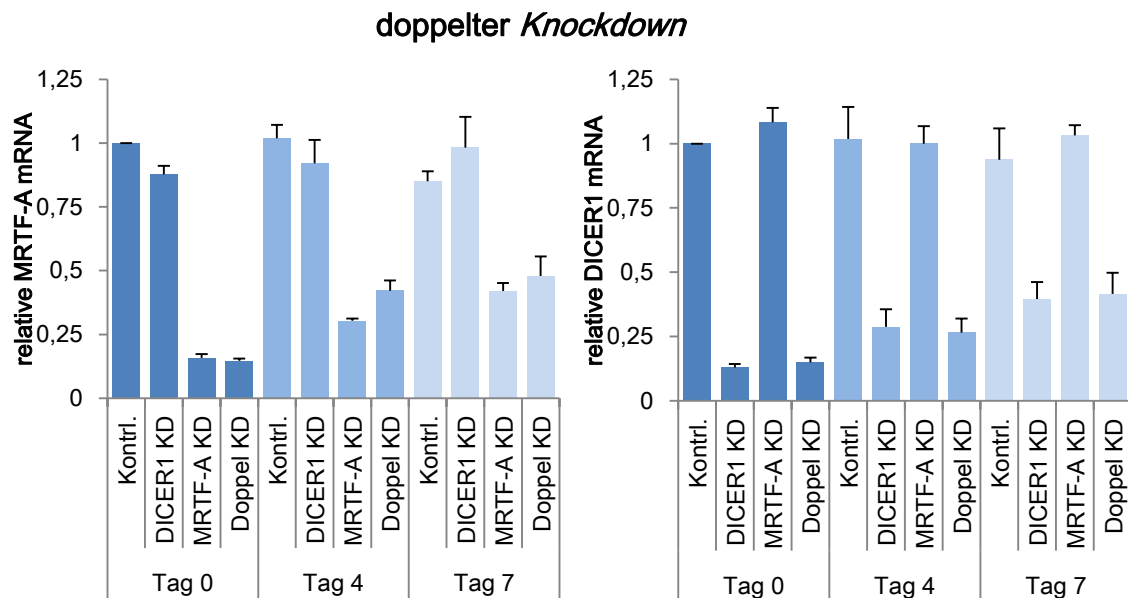


Abb. 4-33: Stabiler *Knockdown* von MRTF-A und DICER1 bei Doppeltransfektion

C2C12-Zellen wurden 1 Tag vor der Differenzierung mit siRNA gegen DICER1, MRTF-A oder gegen beides (doppelter *Knockdown*) transfiziert. Während der Differenzierung wurden die Zellen erneut an Tag 1, 3 und 5 transfiziert. Proben von Tag 0, 4 und 7 wurden mittels qRT-PCR auf die Expression von MRTF-A und DICER1 untersucht. Dargestellt ist die relative MRTF-A bzw. DICER1 Expression bezogen auf die Tag-0-Probe mit Kontroll-siRNA. Normalisiert wurde auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n=3).

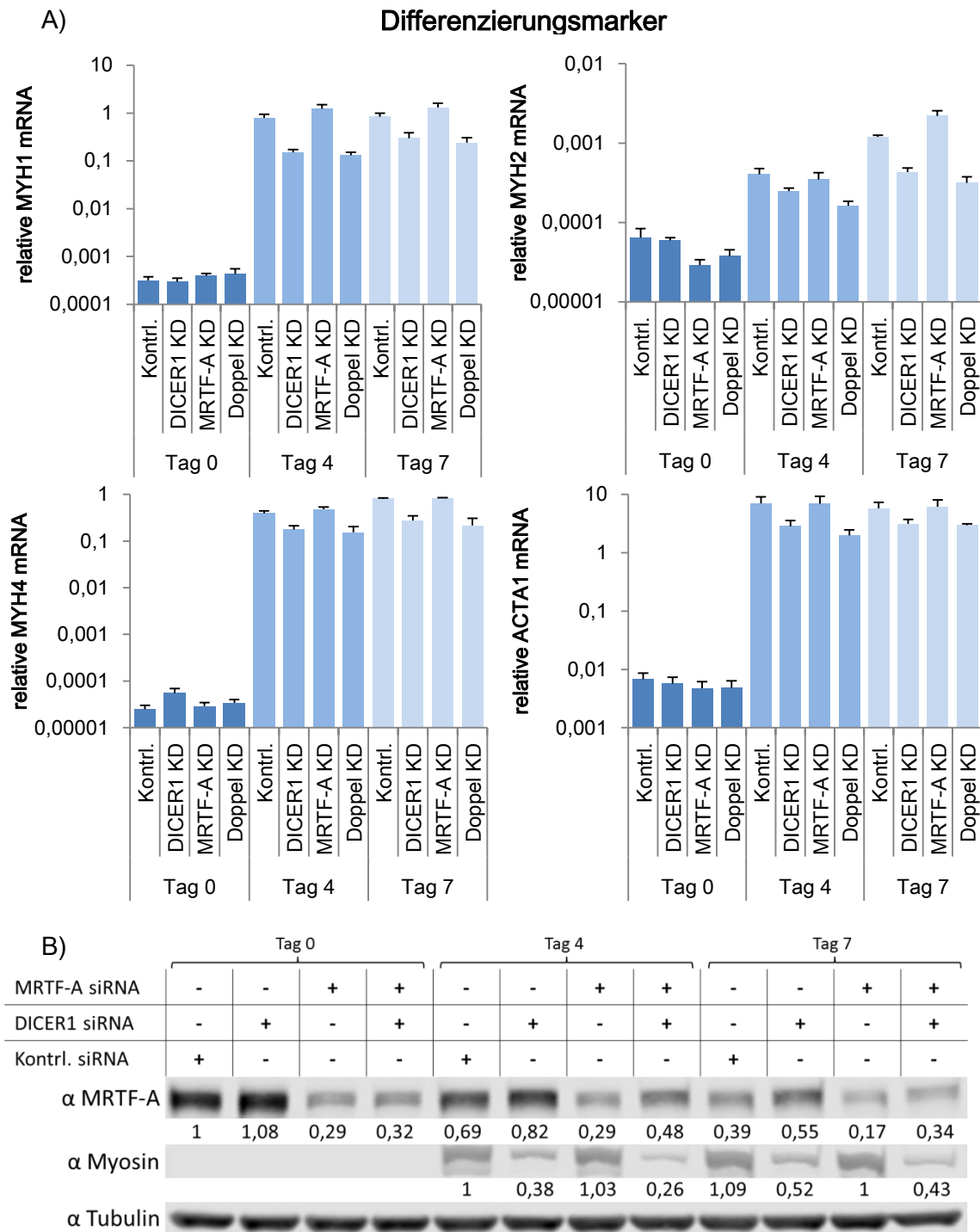


Abb. 4-34: MRTF-A Knockdown hat keinen Einfluss auf Phänotyp von DICER1 Knockdown

C2C12-Zellen wurden 1 Tag vor der Differenzierung mit siRNA gegen DICER1, MRTF-A oder gegen beides (doppelter *Knockdown*) transfiziert. Während der Differenzierung wurden die Zellen erneut an Tag 1, 3 und 5 transfiziert. Proben von Tag 0, 4 und 7 wurden mittels qRT-PCR bzw. Western-Blots auf die Expression von MRTF-A und Differenzierungsmarker untersucht. A) Dargestellt ist die relative Expression von Differenzierungsmarkern normalisiert auf die Referenzgene HPRT, YWHAZ und RPS29. B) Dargestellt ist die Proteinexpression mittels Western-Blots für MRTF-A und Myosin. Als Ladekontrolle wurde Tubulin verwendet. Zur Quantifizierung des Western-Blots wurde auf die Tag-0-Probe (MRTF-A) bzw. Tag-4-Probe (Myosin) mit Kontroll-siRNA normalisiert und unter der jeweiligen Bande angegeben. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (n=3).

4.5.3. MRTF-A beeinflusst Proliferation in C2C12-Zellen

Die Daten zeigten, dass eine Überexpression von MRTF-A zur Bildung von Zellaggregationen führt, welche zur Folge haben, dass die Differenzierung inhibiert wird. Aus der Literatur ist bekannt, dass sowohl SRF als auch MRTF-A die Proliferation beeinflussen und somit gezielt in die Differenzierungsprozesse von Zellen eingreifen (Minami *et al.* 2012, Selvaraj & Prywes 2003, Soulez *et al.* 1996, Olson & Nordheim 2010). Wenn C2C12-Zellen differenzieren, führt dies unter anderem auch zum Proliferationsstopp der Zellen (Okazaki & Holtzer 1966, Caravatti *et al.* 1982, Nadal-Ginard 1987, Latella *et al.* 2000). Daher sollte untersucht werden, ob ein verändertes Proliferationsverhalten der Zellen für die verringerte Differenzierung verantwortlich ist. Hierfür wurden die Zellen mit den verschiedenen Varianten von MRTF-A transfiziert. Nach 24 h wurde die Differenzierung gestartet und aller 24 h bis einschließlich Tag 4 die Extinktion, entsprechend 3.2.4, bei 450 nm bestimmt, da sich zu diesem Zeitpunkt die Differenzierung der Zellen mit MRTF-A Überexpression am stärksten von der Kontrolle unterscheidet. Die Extinktion ist proportional zur Menge an vitalen Zellen. Durch eine Änderung der Menge an vitalen Zellen über die Zeit lässt sich eine Aussage über das Proliferationsverhalten der Zellen treffen. Deshalb wurden die Extinktionen auf Tag 0 normalisiert, wodurch eine Aussage zur Zellpopulation als relative Größe bezogen auf Tag 0 erhalten wurde (Abb.4-35). Dabei erkennt man, dass die Zellpopulation von Tag 0 zu Tag 4 in der Kontrolle abnahm. Die Zellen, die mit den MRTF-A Varianten transfiziert wurden, zeigten hingegen eine Zunahme der Zellpopulation von Tag 0 zu Tag 4. Diese Zunahme ist so groß, dass spätestens an Tag 4 alle MRTF-A Varianten eine signifikant größere Zellpopulation als die Kontrolle aufwiesen.

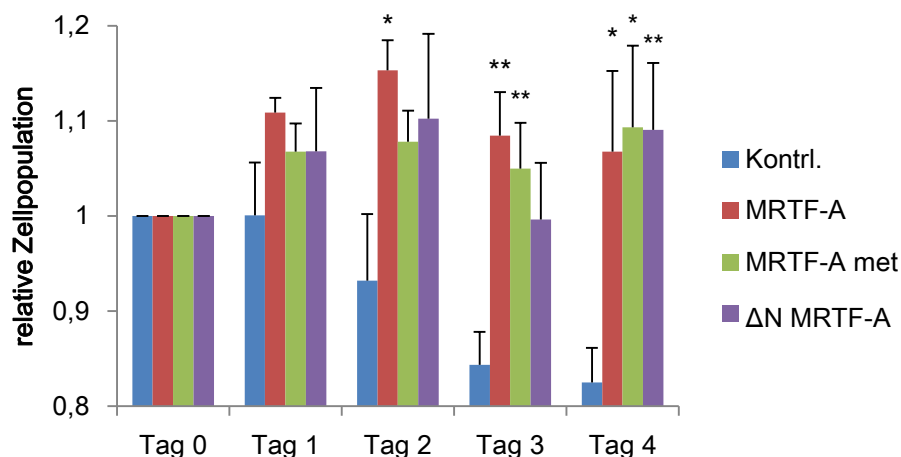


Abb. 4-35: Größere Zellpopulation während der Differenzierung durch MRTF-A

C2C12-Zellen wurden mit MRTF-A Varianten transfiziert. Nach 24 h startete die Differenzierung. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Extinktion, welche proportional zur Menge an vitalen Zellen ist, bestimmt. Dargestellt ist die Zellpopulation als relative Größe für jeden Tag normalisiert auf Tag 0. Daraus ergibt sich die relative Zellpopulation mit Tag 0=1. Statistische Signifikanz wurde mit Zweistichproben-t-Test bezogen auf die jeweilige Kontrollprobe bestimmt: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$. Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler ($n=5$).

5. Diskussion

5.1. Das Verhalten von MRTF-A während der Differenzierung

Die Differenzierung der C2C12-Zellen ist ein komplexer Prozess, welcher letztlich zur Ausbildung polynukleärer Myotuben führt (Abb. 4-5A, Okazaki & Holtzer 1966, Latella *et al.* 2000). Während der 7-tägigen Differenzierung kommt es zu einer vermehrten Expression verschiedener Gene wie ACTA1, MYH1, 2 und 4, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene (Abb. 4-5B und 4-6B). In der Literatur sind diese Gene als spezifisch für Skelettmuskeln beschrieben, weshalb die beobachtete Expression eine erfolgreiche Differenzierung widerspiegelt (Schiaffino & Reggiani 2011, Wang *et al.* 2013, Akkari *et al.* 1994). Die Tatsache, dass die Markergene für die Differenzierung glatter Muskelzellen (ACTA2 und MYH11) während dieses Prozesses nicht differenzial exprimiert werden, verdeutlicht zusätzlich, dass es sich in diesem Fall um einen skelettmuskelspezifischen Prozess handelt (Abb. 4-5B).

Die Expression von MRTF-A zeigt während der Differenzierung ein inhomogenes Verhalten. Auf mRNA Ebene ist keine veränderte Expression während der Differenzierung festzustellen (Abb. 4-6A). Auf Proteinebene verringert sich der MRTF-A Gehalt während der Differenzierung um ca. 70% (Abb. 4-6B). Auf Grund der Regulation von MRTF-A über die Translokation in den Nukleus wäre es möglich, dass der Verlust von 70% Proteingehalt keinen Einfluss auf die Aktivität von MRTF-A als Transkriptionsfaktor besitzt, wenn man davon ausgeht, dass MRTF-A nur anteilig im Nukleus vorliegen könnte, wo es für die Transkriptionsaktivität der Zielgene verantwortlich ist (Abb. 4-30). Dies könnte zur Folge haben, dass der Anteil an kernlokalisiertem MRTF-A und damit auch die MRTF-A Aktivität während der Differenzierung unverändert bliebe. Deshalb wurde die MRTF-A Aktivität während der Differenzierung untersucht (Abb. 4-7). Die Ergebnisse zeigten einen ca. 70%igen Verlust der MRTF-A Aktivität und damit eine ähnliche Größenordnung wie die Daten des MRTF-A Gehalts in der gesamten Zelle (vergleiche Abb. 4-6B & 4-7).

Die Daten zeigen, dass MRTF-A in undifferenzierten C2C12-Zellen eine Funktion besitzen könnte, welche in differenzierten Myotuben nicht mehr notwendig ist oder sogar eine inhibierende Wirkung aufweist und deshalb reprimiert werden muss. In der Literatur ist über die Regulation bzw. Aufgabe von MRTF-A während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen nur wenig und zum Teil Widersprüchliches bekannt. So haben Iwasaki *et al.* 2008 ebenfalls die verringerte Proteinexpression in C2C12-Zellen festgestellt. Sie zeigten, dass MRTF-A die Expression von Id3 unterstützt. Id3 wird als Inhibitor der myogenen Differenzierung beschrieben (Benezra *et al.* 1990). Dies würde erklären, warum MRTF-A für eine erfolgreiche Differenzierung inhibiert werden muss und unterstützt das beobachtete Verhalten der MRTF-A-Expression. Allerdings führten sie keine Analyse der mRNA Expression durch. Li *et al.* zeigten 2005 hingegen, dass der Verlust von MRTF-A in Mäusen zu einer verringerten

Muskelmasse auf Grund von Hypoplasie führt, was zunächst den beobachteten Ergebnissen und denen von Iwasaki *et al.* zu widersprechen scheint. Die Differenzierungsfähigkeit der Myoblasten blieb, so Li *et al.* weiter, unverändert. Selvaraj und Prywes haben 2003 die mRNA und Proteinexpression von MRTF-A in Skelettmuskelzellen untersucht und konnten ähnliche Ergebnisse beobachten, wie in der vorliegenden Arbeit. Da es sich aber um Nebenbeobachtungen von anderen Experimenten handelt, wurde dieser Zusammenhang nicht weiter diskutiert (Vergleiche Abb. 6 & 8 in Selvaraj & Prywes 2003). Daher folgerten sie, gegensätzlich, dass ein Verlust von MRTF-A zu einer verringerten Differenzierung führt. Somit führt die aktuelle Datenlage zu, zum Teil, kontroversen Theorien über die Aufgabe von MRTF-A in Skelettmuskelzellen.

Die Tatsache, dass die mRNA von MRTF-A unverändert bleibt, aber gleichzeitig der Proteingehalt abnimmt, deutet des Weiteren auf eine Regulation hin, welche erst nach der erfolgreichen Transkription der mRNA stattfindet. In der Literatur werden solche Unterschiede zwischen mRNA und Protein als typische Merkmale einer posttranskriptionalen Regulation beschrieben (Pillai *et al.* 2005, Petersen *et al.* 2006, Bazzini *et al.* 2012, Djuranovic *et al.* 2012, Saxena *et al.* 2003, Zeng *et al.* 2003). Somit wäre eine posttranskriptionale Regulation von MRTF-A eine mögliche Erklärung für die beobachteten Expressionen. Eine solche Regulation von MRTF-A konnte durch Minami *et al.* 2012 in glatten Muskelzellen beschrieben werden. Sie zeigten, dass miR-1 die MRTF-A mRNA bindet und sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene herunterreguliert. Interessanterweise handelt es sich bei miR-1 um eine sog. myomiRNA, welche eine muskelspezifische Expression besitzt und ebenfalls während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben eine deutliche Expressionsinduktion vorweist (Abb. 4-11 & 4-13).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Differenzierung von C2C12-Zellen erfolgreich durchgeführt werden konnte und MRTF-A während dieser Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben reprimiert wird, wobei die Regulation einen posttranskriptionalen Charakter besitzt. Unterstützt wird diese Theorie von Ergebnissen aus glatten Muskelzellen, sowie Skelettmuskelzellen. Somit stellen die C2C12-Zellen ein geeignetes Modellsystem dar, um die Regulation und die Aufgaben von MRTF-A während der Differenzierung von Skelettmuskelzellen genauer zu untersuchen. Denn obwohl Selvaraj und Prywes bereits 2004 zeigten, dass die Expressionen vieler muskelspezifischer Gene von der MRTF-A Aktivität abhängig sind, ist die Rolle von MRTF-A in Skelettmuskelzellen nur wenig erforscht. Die Ergebnisse werden in den folgenden Teilabschnitten diskutiert.

5.2. MRTF-A: Eine posttranskriptionale Regulation?

Das Verhalten von MRTF-A während der C2C12-Differenzierung deutet auf eine posttranskriptionale Regulation von MRTF-A hin (Abschnitt 5.1). Da die 3'UTR von MRTF-A ca. 1000 nt lang und konserviert ist, besteht die Möglichkeit, dass mehrere miRNA Bindestellen vorhanden sind. Daher stellte sich bereits 2008 in der

Arbeitsgruppe Posern die grundsätzliche Frage, ob MRTF-A durch miRNAs reguliert wird (pers. Mitteilung Leitner & Posern). Mit Hilfe verschiedener Algorithmen wurden *in silico* drei miRNAs bestimmt, welche potentiell die 3'UTR von MRTF-A binden könnten: miR-1a-3p, miR-206-3p, miR-219-5p.

Im Fall von miR-1 und miR-206 handelt es sich um muskelspezifische myomiRNAs (Dey *et al.* 2011, McCarthy *et al.* 2008, van Rooij *et al.* 2008, Sweetmann *et al.* 2008), welche während der Differenzierung eine erhöhte Expression aufweisen (Abb. 4-11 & 4-13). miR-219 hingegen wird vorrangig im Leberzellkarzinom exprimiert (Budhu *et al.* 2008) und zeigt bei einer Überexpression in C2C12 keinen signifikanten Einfluss auf die MRTF-A-Expression (Abb. 4-14B & 4-15). Daher kann davon ausgegangen werden, dass miR-219 in Bezug auf MRTF-A in C2C12-Zellen keine essenzielle Aufgabe besitzt.

Neben der *in silico* basierten Suche nach MRTF-A bindenden miRNAs wurde ein miTRAP durchgeführt, mit dessen Hilfe weitere miRNAs identifiziert wurden, welche während der C2C12-Differenzierung verstärkt exprimiert werden und womöglich die MRTF-A mRNA binden (Tabelle 4-2 & Abb. 4-11). Interessanterweise wurden mit dem miTRAP auch miR-1a-3p und miR-206-3p als MRTF-A bindende miRNAs identifiziert, was die *in silico* Suche der Arbeitsgruppe Posern bestätigt. miR-219-5p konnte hingegen nicht gefunden werden, was die Daten der Überexpression von miR-219 erneut bestätigen (siehe Abb. 4-15). Mit Hilfe der qRT-PCR wurden die Expressionsdaten des *RNA-Seq* überprüft (Abb. 4-13). Es zeigte sich, dass alle identifizierten miRNAs während der Differenzierung verstärkt exprimiert werden und bestätigt die Daten des *RNA-Seq*. Daher wäre es möglich, dass die genannten miRNAs mit einer vermehrten Expression während der Differenzierung den verringerten MRTF-A Proteingehalt erklären könnten. Allerdings unterscheiden sich die Expressionsinduktionen der einzelnen miRNAs. So zeigt miR-206 in den *RNA-Seq*-Daten, verglichen mit den anderen miRNAs, nur eine geringe Expression. Die qRT-PCR-Daten zeigten für miR-206 hingegen bereits eine hohe Expression in undifferenzierten Zellen, welche in differenzierten Zellen die höchste Abundanz unter den identifizierten miRNAs aufweist (vergleiche Abb. 4-11 & 4-13). Da miR-206 zu den myomiRNAs gehört und bereits während der Embryogenese detektierbar ist, fügen sich die Daten der qRT-PCR besser in die bestehende Literatur (Takada *et al.* 2006, Anderson *et al.* 2006, McCarthy *et al.* 2008, Luo *et al.* 2013). Ausgehend von den miTRAP-Verhältnissen, welche eine Aussage über die Bindung der miRNAs an die MRTF-A 3'UTR erlauben, lässt sich sagen, dass auch in diesem Fall miR-1 die höchste Bindung zur MRTF-A mRNA in differenzierten Zellen besitzt. miR-206 zeigt in differenzierten Zellen ebenfalls eine hohe Bindung an die MRTF-A mRNA. Die Daten des *RNA-Seq* ließen eine genaue Berechnung des miTRAP-Verhältnisses in undifferenzierten Zellen nicht zu, da sie unter dem festgelegten Grenzwert lagen. Allerdings lässt sich aus dem Expressionsprofil von miR-206 aus den qRT-PCR-Daten schließen, dass miR-206 bereits in undifferenzierten Zellen die MRTF-A mRNA binden könnte (Tabelle 4-2 & Abb. 4.14). Weiterhin besitzen auch miR-24-4p und miR-486-5p

entsprechend dem miTRAP-Verhältnis eine stärkere Bindung an die MRTF-A mRNA. Genau wie miR-206 zeigen auch diese miRNAs im Vergleich zu miR-1 eine hohe Abundanz in undifferenzierten C2C12-Zellen, weshalb auch in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden kann, dass miR-24 und miR-486 die MRTF-A mRNA bereits in Myoblasten binden könnten (Tabelle 4-2 & Abb. 4.14). Neben den bereits genannten miRNAs wurden außerdem miR-133a-3p, miR-378a-3p und miR-378d mit geringeren miTRAP-Verhältnissen und daher mit niedriger Affinität zur MRTF-A mRNA identifiziert (Tabelle 4-2).

Auf Grund ihrer erhöhten Expression könnten die, mittels miTRAP entdeckten, miRNAs eine Erklärung für die verminderte MRTF-A Proteinexpression darstellen. Eine Überexpression von miR-1 führt zu einer verringerten MRTF-A-Expression sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene (Abb. 4-14A & 4-15), was auf eine posttranskriptionale Regulation von MRTF-A durch miR-1 schließen lässt. Unterstützt wird diese Folgerung durch Ergebnisse von Jiang *et al.* von 2010, die in glatten Muskelzellen zeigten, dass miR-1 die Expression der MRTF-A-Zielgene SM22 und ACTA2 verringert (Du *et al.* 2004, Scharenberg *et al.* 2010). Eine direkte Regulation von MRTF-A durch miR-1 in glatten Muskelzellen konnte 2012 durch Minami *et al.* bestätigt werden. Somit wäre eine Regulation von MRTF-A durch miR-1 auch in Skelettmuskelzellen denkbar. Interessanterweise hat die Überexpression von miR-206 denselben Effekt auf die MRTF-A-Expression, wie die von miR-1 (Abb. 4-14C & 4-15). Somit könnte auch miR-206 in der Lage sein, MRTF-A posttranskriptional zu regulieren. Diese Vermutung wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die *seed*-Sequenz von miR-1 und miR-206 identisch ist. Möglicherweise konkurrieren miR-1 und miR-206 um die Bindestellen auf der MRTF-A mRNA. Da miR-206 bereits in undifferenzierten Zellen exprimiert wird, wäre es gut möglich, dass es potentielle Bindestellen blockiert, noch bevor die Expression von miR-1 initiiert wurde und genau wie miR-486 die Expression von MRTF-A bereits in Myoblasten posttranskriptional reguliert. Allerdings muss auch angemerkt werden, dass betreffend der Theorie zur *seed*-Sequenz bereits Gegenbeispiele existieren, weshalb ein synergistischer Effekt anstelle der Konkurrenz von miR-1 und miR-206 nicht ausgeschlossen werden sollte (Pasquinelli *et al.* 2012). Ferner zeigen auch die Überexpressionen von miR-24, -486 und -378d, aber nicht von miR-133a oder -378a einen Einfluss auf die MRTF-A Proteinebene (Abb. 4-16C). Daher muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle miRNAs, welche die MRTF-A mRNA binden, in der Lage sind die Expression zu regulieren. Die Überexpression der einzelnen miRNAs führt im Fall von miR-1, -206 und -486 ebenfalls zu einer reduzierten MRTF-A mRNA (Abb. 4-15A & 4-16B). Während der normalen Differenzierung ist solch ein Verhalten nicht zu beobachten, weshalb diese Effekte der artifiziellen Überexpression der miRNAs verschuldet sein könnten, welche zu einer höheren Expressionsinduktion der miRNAs in einer kürzeren Zeit führt, als es die normale Differenzierung vermag.

Unabhängig von den Effekten der einzelnen miRNAs auf MRTF-A, ist die Frage, wie groß der Anteil der MRTF-A Repression ist, der durch posttranskriptionale Effekte

erklärt werden kann. Da AGO2 das katalytische Zentrum von RISC ist (Meister *et al.* 2004, Liu *et al.* 2004), sollte ein AGO2 *Knockdown* die posttranskriptionale Regulation über miRNAs inhibieren. Während der Differenzierung kam es zu einer vermehrten AGO2 mRNA Expression (Abb. 4-17). Eine Vermehrung der RISC-Proteine wäre eine logische Folgerung, um das erhöhte miRNA Aufkommen im Rahmen der Differenzierung zu bedienen. Allerdings war auf Proteinebene keine Zunahme von AGO2 zu beobachten. Der AGO2 *Knockdown* führt ebenfalls zu einer verringerten miRNA Expression (Abb. 4-18A), was ein unerwartetes Phänomen darstellt, da die Beteiligung von AGO2 an der miRNA Prozessierung nur in einzelnen Fällen beschrieben ist (Diederichs *et al.* 2007). Eine mögliche Erklärung könnte im AGO2 *Knockdown* selbst liegen, welcher möglicherweise dazu führte, dass viele miRNAs nicht im RISC integriert werden konnten und somit vorzeitig abgebaut wurden. Die Differenzierungsmarker zeigten hingegen keine Expressionsunterschiede (Abb. 4-18B & C). Dies lässt vermuten, dass der partielle *Knockdown* von AGO2 nicht ausreichte, um die Effekte der miRNA vollständig zu inhibieren und die Zellen dennoch in der Lage waren zu differenzieren. Die MRTF-A mRNA blieb während des AGO2 *Knockdowns* unverändert, wogegen die Proteinexpression signifikant mehr MRTF-A in der Differenzierung zeigte, als die Kontrolle (Abb. 4-17). Da nur AGO2 und die miRNAs eine veränderte Expression aufwiesen, lässt dieses Ergebnis vermuten, dass die erhöhte MRTF-A-Expression im AGO2 *Knockdown* der verringerten miRNA Expression geschuldet ist, was ebenfalls für eine posttranskriptionale Regulation spricht. Ein DICER1 *Knockdown* hatte denselben Effekt auf die MRTF-A-Expression (Abb. 4-20). DICER1 ist an der Prozessierung der miRNAs beteiligt (Grishok *et al.* 2001, Hutvagner *et al.* 2001, Ketting *et al.* 2001), so dass ein DICER1 *Knockdown* die miRNA Expression inhibiert, was ebenfalls beobachtet wurde (Abb. 4-21A). Der DICER1 *Knockdown* hatte weiterhin auch einen Einfluss auf die Differenzierung. So war die Myotubenbildung beeinträchtigt (Abb. 4-19) und die Expression der Differenzierungsmarker war im Vergleich zur Kontrolle reprimiert (Abb. 4-21B & C). Dieses Ergebnis verdeutlicht erneut die wichtige Rolle von miRNAs für die Muskeldifferenzierung, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist (Kim *et al.* 2006, Lu *et al.* 2012, Chen *et al.* 2006). Allerdings konnte sowohl mit dem AGO2 *Knockdown*, als auch mit dem DICER1 *Knockdown* in differenzierten C2C12-Zellen die MRTF-A-Expression nicht auf das Niveau von undifferenzierten Zellen gebracht werden (Abb. 4-17 und 4-20). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte einerseits in dem nur partiellen *Knockdown* von AGO2 und DICER1 liegen. Andererseits wäre es möglich, dass neben der posttranskriptionalen Regulation noch weitere regulatorische Maßnahmen die MRTF-A-Expression steuern.

Letztlich stellt sich die Frage, ob die beobachteten Effekte auf einer direkten oder indirekten Interaktion der miRNAs mit der MRTF-A mRNA beruhen. Ein Western-Blot der miTRAP-Proben zeigte eine Anreicherung von AGO2 an die 3'UTR von MRTF-A in C2C12-Zellen, welche im differenziertem Zustand nochmals zunahm (Abb. 4-9). AGO2 ist Teil des RISC und gewährleistet die Bindung der miRNAs an die mRNA. Außerdem besitzt AGO2 eine Endonukleaseaktivität und ermöglicht auf diese Weise neben einer

Translationsinhibierung auch eine aktive Degradation der Ziel-mRNA. Damit stellt AGO2 das katalytische Zentrum des RISC dar (Martinez *et al.* 2002, Hutvágner & Zamore 2002, Meister *et al.* 2004, Liu *et al.* 2004). Die vermehrte Anreicherung von AGO2 an die MRTF-A mRNA in differenzierten C2C12-Zellen deutet auf eine Anlagerung des RISC und der miRNAs direkt an die 3'UTR der MRTF-A mRNA hin und damit auf eine direkte posttranskriptionale Regulation von MRTF-A während der Differenzierung. Eine mRNA ohne 3'UTR sollte daher keine Bindestellen für miRNAs und den RISC besitzen, was eine direkte posttranskriptionale Regulation unterbinden müsste. Wurde MRTF-A in C2C12-Zellen von einer mRNA mit 3'UTR translatiert, nahm der Proteingehalt während der Differenzierung stärker ab, als wenn die mRNA keine 3'UTR besaß (Abb. 4-21). Der geringere MRTF-A Verlust in der Probe ohne 3'UTR würde sich durch eine fehlende posttranskriptionale Regulation im Vergleich zur Probe mit 3'UTR erklären lassen.

Die Überexpression der einzelnen miRNAs führte nur für miR-1, -206, -24 und -486 zu einer Reduktion des MRTF-A Proteingehalts und damit zu einer posttranskriptionalen Regulation (Abb. 4-15B & 4-16C). Zur Bestimmung der Bindestelle, mit Hilfe des Luciferase Reporterassays, ist diese Reduktion essenziell, weshalb nur die Bindestelle dieser miRNAs untersucht wurde. Ferner wurden für diese miRNAs *in silico* in mindestens zwei verschiedenen Datenbanken identische Bindestellen identifiziert (Abb. 4-23). Minami *et al.* konnten 2012 eine Bindestelle für miR-1 in der humanen mRNA von MRTF-A identifizieren und zeigen, dass MRTF-A über diese Bindestelle in glatten Muskelzellen durch miR-1 reguliert wird. Diese Bindestelle entspricht in der murinen 3'UTR der Nukleotide 756-777 (Abb. 4-23). Eine Deletion dieser Bindestelle führte im Luciferase Reporterassay zu keinem veränderten Signal im Vergleich zur nativen 3'UTR (Daten nicht gezeigt). Ein Unterschied zu den Daten von Minami *et al.* von 2012 besteht darin, dass in der murinen MRTF-A mRNA noch eine weitere Bindestelle für miR-1 in den Nukleotiden 330-351 der 3'UTR vorhanden ist (Abb. 4-23, www.microrna.org). Eine Deletion beider Bindestellen führte im Laufe der C2C12-Differenzierung zu einer signifikant stärkeren Luciferaseaktivität als in der Probe mit der nativen 3'UTR (Abb. 4-23, www.microrna.org). Das Fehlen der Bindestellen würde eine posttranskriptionale Regulation verhindern und somit die erhöhte Luciferaseexpression erklären und die deletierten Sequenzen als miR-1 Bindestellen bestätigen. Entsprechend der Theorie zur *seed*-Sequenz müsste miR-206 dieselben Bindestellen besitzen, weshalb miR-206 nicht getrennt betrachtet werden kann. Wurde zusätzlich die Bindestelle von miR-24 mit den Nukleotiden 58-79 der 3'UTR deletiert, führte dies nach 7-tägiger Differenzierung zu einer nochmals höheren Luciferaseaktivität im Vergleich zur nativen 3'UTR und zur Deletion der Bindestellen von miR-1/206 (Abb. 4-25). Diese Daten deuten auf nochmals geringere posttranskriptionale Regulation hin, was die Nukleotide 58-79 als miR-24 Bindestelle bestätigen würde. Außerdem sprechen diese Daten für einen synergistischen Effekt von miR-1, -206 und -24. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtung, dass keine miRNA in der Lage war die 70%ige MRTF-A Reduktion während der Differenzierung alleine zu erklären (Vergleiche Abb. 4-6, 4-15 & 4-16). Allerdings ist

dieser Effekt nur minimal ausgeprägt, was bedeuten würde, dass noch weitere miRNAs an diesem synergistischen Effekt beteiligt sein müssten. Eine Deletion der Nukleotide 553-575 der 3'UTR sollte entsprechend www.microna.org die Bindestelle von miR-486 aus der MRTF-A 3'UTR entfernen. Eine Kombination dieser Deletion mit den entfernten Bindestellen von miR-1/206 führte erstaunlicher Weise zu einer geringeren Luciferaseaktivität als die alleinige Deletion der miR-1/206 Bindestellen (Abb. 4-25). Dies lässt auf eine höhere posttranskriptionale Regulation schließen, welche auf vergleichbarem Niveau zur nativen 3'UTR liegt. Die Vorhersagen zu den Bindestellen basieren auf der Theorie zur *seed*-Sequenz. Da bereits Beispiele beschrieben sind, in denen sich miRNAs nicht entsprechend dieser Theorie verhalten (Pasquinelli *et al.* 2012), wäre es gut möglich, dass miR-486 eine andere Bindestelle besitzt. Eine weitere Erklärung könnte in der Deletion selbst liegen. Womöglich ist durch diese Deletion eine neue miRNA Bindestelle entstanden, welche von einer anderen miRNA gebunden werden kann, die im Laufe der C2C12-Differenzierung exprimiert werden (Luo *et al.* 2013). Diese Tatsache erschwert die Identifikation der miR-486 Bindestelle und macht weiterer Untersuchungen notwendig.

Mit Ausnahme von miR-378d wurden alle miRNAs bereits in Verbindung mit der Muskeldifferenzierung in der Literatur diskutiert. Für miR-378a ist beschrieben, dass ihre Expression durch MYOD während der Differenzierung verstärkt wird und den Inhibitor von MYOD MYOR (*Myogenic repressor*) reguliert (Gagan *et al.* 2011). Die Folge ist ein positiver *Feedback-Loop*. Interessanterweise ist die MYOD Expression ebenfalls von der SRF Aktivität abhängig, was mittels SRF *Knockdown* Versuchen in Muskelzellen gezeigt werden konnte (Soulez *et al.* 1996). Allerdings ist nicht beschrieben, dass es sich um eine MRTF-A abhängige SRF Aktivität handelt. Da es zu einem Verlust von MRTF-A während der Differenzierung kommt, ist davon auszugehen, dass ein anderer SRF-Co-Aktivator in diesem Zusammenhang aktiv ist. Eine direkte Verbindung von miR-378a und MRTF-A wurde bisher nicht beschrieben. Ebenfalls liegt über miR-378d in der Literatur bisher noch keine Information in Verbindung mit Muskeldifferenzierung oder MRTF-A vor. Diese miRNA unterscheidet sich von miR-378a allerdings nur in einem Nukleotid und könnte daher eine ähnliche Wirkung besitzen wie miR-378a. Für miR-24 konnte bereits gezeigt werden, dass ihre Expression in C2C12-Zellen in Abhängigkeit von Smad3 durch TGF- β 1 inhibiert wird (Sun *et al.* 2008). Ein *Knockdown* von miR-24 führte zu einer reduzierten Expression von Differenzierungsmarkern, wie MEF2 und Myogenin, wogegen eine Überexpression die Differenzierung beschleunigte, was miR-24 als eine Differenzierung fördernde miRNA beschreibt. Über mögliche Ziele von miR-24 ist bisher noch nichts bekannt. Geht man allerdings von einer inhibierenden Wirkung von MRTF-A auf die Muskeldifferenzierung aus, würde eine Regulation durch miR-24 eine logische Erklärung der Daten von Sun *et al.* (2008) darstellen. miR-486 und miR-206 inhibieren Pax7 und unterstützen so die Differenzierung (Dey *et al.* 2011). Interessant ist auch, dass die Expression von miR-486 laut Small *et al.* (2010) durch SRF/MRTF-A in Herzmuskelzellen aktiviert wird. Wenn eine ähnliche Regulation in C2C12-Zellen vorausgesetzt werden würde und miR-486 MRTF-A inhibiert, müsste dies zu einem

negativen *Feedback-Loop* für MRTF-A führen. Möglich wäre, dass sich MRTF-A und miR-486 in undifferenzierten Zellen über diesen Weg in einem Gleichgewicht halten. Allerdings erklärt es nicht, warum die miR-486 Expression während der Differenzierung induziert wird. miR-486 muss also noch durch einen weiteren Faktor induziert werden, welcher auch die Differenzierung positiv beeinflusst. Da auch MYOD die Expression von miR-486 fördert (Small *et al.* 2010), könnte die Induktion von miR-486 durch MYOD erklärt werden. Dies würde MYOD gleichzeitig zu einem indirekten negativen Regulator der MRTF-A-Expression machen. miR-206 gehört zu den myomiRNAs und wird durch MYOD und Myogenin exprimiert (Baskerville & Bartel 2005, Wienholds *et al.* 2005b, Liang *et al.* 2007, McDanel *et al.* 2009, Rao *et al.* 2006). Eine Verbindung zu MRTF-A ist bisher nicht bekannt. miR-206 unterstützt die Differenzierung indem es Pax3 und Pax7 inhibiert (Chen *et al.* 2010, Hirai *et al.* 2010). Geht man davon aus, dass MRTF-A ebenfalls die Differenzierung reprimiert, würde sich eine Regulation durch miR-206 in die bestehende Literatur fügen. Interessanterweise besitzt miR-206 und miR-1 dieselbe *seed*-Sequenz. Für miR-1 ist bereits bekannt, dass sie in glatten Muskelzellen MRTF-A posttranskriptional reguliert (Minami *et al.* 2012). Eine ähnliche Funktionsweise in Skelettmuskelzellen wäre somit möglich. Fraglich bleibt, ob miR-1 und -206 um die Bindestellen an der MRTF-A mRNA konkurrieren oder ein synergistischer Effekt der beiden miRNAs vorhanden ist. miR-133a hemmt die Differenzierung indem es SRF und IGF-1R reprimiert (Huang *et al.* 2011, Chen *et al.* 2006). Damit unterstützt es, im Gegensatz zu den bisher genannten miRNAs, die Proliferation der Myoblasten und inhibiert die Differenzierung. Da miR-133a und miR-1 auf demselben Genlocus codiert sind und zusammen transkribiert werden, stellen die gegenläufigen Wirkungsweisen von miR-1 und -133a eine interessante Kontroverse dar (Chen *et al.* 2006). In Bezug auf MRTF-A relativiert sich dieser Sachverhalt allerdings, da die Daten keinen Hinweis auf eine Reduktion von MRTF-A durch die Bindung von miR-133a zeigen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Daten schließen, dass MRTF-A in Skelettmuskelzellen posttranskriptional über miRNAs reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass neben der bereits publizierten miR-1 auch weitere miRNAs an dieser Regulation beteiligt sind. miR-206 und -24 binden dabei an die MRTF-A mRNA. Da miR-206 und -24 bereits in undifferenzierten C2C12-Zellen exprimiert werden, stellt sich die Frage, ob eine Regulation von MRTF-A auch schon in diesem Zustand stattfindet und ob miR-1 sich überhaupt an die mRNA anlagern kann, oder ob die Bindestellen nicht bereits durch miR-206 blockiert werden. In diesem Zusammenhang muss auch bedacht werden, dass die miR-206 nach qRT-PCR Daten die höchste Abundanz in C2C12-Zellen im Vergleich zu den anderen miRNAs aufwies (Abb. 4-13). miR-486 nimmt nachgewiesenermaßen Einfluss auf die MRTF-A-Expression. Da die Identifikation der miR-486 Bindestelle noch aussteht ist es nicht möglich zu sagen, ob eine direkte Interaktion zwischen MRTF-A mRNA und miR-486 besteht. Ferner ist es auch noch nicht ausgeschlossen, dass miR-133a und -378a MRTF-A regulieren. Allerdings muss in diesen Fällen zunächst die Bindestelle ermittelt werden, um eine klare Aussage über ihre Beziehung zur MRTF-A mRNA treffen zu können. Dass die

Entschlüsselung solcher Regulationsmechanismen teilweise sehr schwierig ist, zeigt die Entdeckung von Chen *et al.* von 2006, welche miR-133a als einen Unterstützer der proliferativen und damit undifferenzierten Myoblasten beschreibt. Die Tatsache, dass andere Paper (Huang *et al.* 2011, Sweetman *et al.* 2008, Chen *et al.* 2006) und die Daten dieser Arbeit eine Induktion von miR-133a während der Differenzierung zeigen, stellt momentan noch einen kontroversen Sachverhalt dar, weil die Differenzierung zu einem Proliferationsstopp der Zellen führt (Nadal-Ginard 1978, Caravatti *et al.* 1982).

5.3. MRTF-A unterstützt die Proliferation von Myoblasten

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass MRTF-A während der C2C12-Differenzierung auf posttranskriptionaler Ebene inhibiert wird. Bekannt ist, dass MRTF-A während der Embryogenese in Muskelzellen gefunden werden kann. Die Notwendigkeit von MRTF-A für die Muskeldifferenzierung wird auch dadurch deutlich, dass eine Überexpression von MRTF-A Glattmuskelgene aktiviert (Du *et al.* 2004, Selvaraj & Prywes 2004, Wang *et al.* 2002). Die Rolle von MRTF-A in der Differenzierung von Skelettmuskelzellen wird unterdessen kontrovers diskutiert. Selvaraj & Prywes kamen 2003 zu dem Schluss, dass ein *Knockdown* von MRTF die C2C12-Differenzierung inhibiert. Dennoch bleibt die Frage, warum eine verringerte MRTF-A-Expression die Muskeldifferenzierung inhibieren soll, wenn in dem Modellsystem C2C12 genau diese Reduktion während der Differenzierung stattfindet (Abb. 4-6 & 4-7, Iwasaki *et al.* 2008). Mit Hilfe einer Überexpression der MRTF-A Varianten wurde die differenzierungsbedingte Reduktion kompensiert. Die Überexpression führte phänotypisch zur Bildung von Zellaggregationen (Abb. 4-29). Ebenfalls schien die Myotubenbildung bis Tag 4 gehemmt zu sein. Des Weiteren war die Expression der Differenzierungsmarker bis Tag 4 niedriger als in der Kontrolle (Abb. 4-31A & C). Diese Ergebnisse deuten auf eine gehemmte Differenzierung der Zellen hin. Das MRTF-A als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene direkt inhibiert ist bisher nicht beschrieben. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte darin liegen, dass MRTF-A andere Gene aktiviert bzw. aktiviert hält, welche während der normalen Differenzierung gar nicht mehr exprimiert werden. Li *et al.* zeigten 2005 in einer MRTF-A *Knockout* Maus eine verringerte Muskelmasse, was sie auf Hypoplasie und damit auf eine verringerte Proliferation der Zellen zurückführten. Minami *et al.* machten 2012 in glatten Muskelzellen ebenfalls die Beobachtung, dass ein MRTF-A *Knockdown* zu einer verringerten Proliferation der Zellen führt. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass eine Überexpression von MRTF-A die Proliferation fördert. Dies würde bedeuten, dass MRTF-A in C2C12-Zellen den proliferativen Phänotyp unterstützt und dadurch, ähnlich wie Pax7 und Pax3, die Zellen im undifferenzierten Zustand hält (Montarras *et al.* 2005, Relaix *et al.* 2006, Hirai *et al.* 2010). Dies könnte auch erklären, warum die Expression der Differenzierungsmarker an Tag 7 wieder auf Wildtypniveau ist (Abb. 4-31A & C). Die Expression der Differenzierungsmarker wird nicht direkt blockiert. Allerdings wird die Differenzierung der Zellen durch proliferative Signale gehemmt, was die Expressionsinduktion verlangsamen könnte, weshalb das Expressionslevel zunächst niedriger ausfällt und

erst später sein Maximum erreicht. Gegen diese Theorie sprechen hingegen Publikationen, die MRTF-A mit antiproliferativen Eigenschaften beschreiben. So zeigten Descot *et al.* 2009, dass MRTF-A in Fibroblasten die Expression von Mig6, ein negativer Regulator des EGFR Signalwegs, induziert und auf diese Weise die Proliferation negativ beeinflusst. Auch Sasazuki *et al.* zeigten 2002 eine antiproliferative Wirkung von MRTF-A in embryonalen Fibroblasten einer Traf2/Traf5 doppel-*knockout* Maus. Shaposhnikov *et al.* zeigten 2012 des Weiteren, dass die Expression von BOK und NOXA direkt durch MRTF-A induziert werden und MRTF-A auf diese Weise proapoptotisch in Fibroblasten wirkt. Allerdings muss man bei diesen Daten berücksichtigen, dass MRTF-A in Fibroblasten eine andere Aufgabe besitzen könnte, als in Myoblasten, wo die Aufgabe von MRTF-A noch sehr wenig erforscht ist.

Eine anhaltende Proliferation der C2C12-Zellen nach Erreichen der Konfluenz könnte ebenfalls die beobachteten Zellaggregationen während der MRTF-A Überexpression erklären. Die Daten des Proliferationsversuchs zeigen, dass während der Differenzierung die Zellzahl leicht abnimmt, da die Zellen aufhörten zu proliferieren und die Differenzierung einleiteten (Abb. 4-35, Nadal-Ginard 1978, Caravatti *et al.* 1982). Die Überexpression der MRTF-A Varianten führte hingegen zu einem leichten Anstieg der Zellpopulation, welche ab Tag 2 stagnierte (Abb. 4-35). Von daher wäre es gut möglich, dass kurz nach Einleitung der Differenzierung, mit Hilfe des Differenzierungsmediums, die Zellen die Proliferation einstellen und den Differenzierungsprozess starten. Wenn eine Überexpression von MRTF-A aber die Proliferation unterstützen würde, würde dies den Proliferationsstopp hinauszögern, was mehr Zellen zur Folge hätte, dies könnte die Zellaggregation erklären (Abb. 4-29). Ein verzögerter Proliferationsstopp würde eine verspätete Differenzierung verursachen, was ebenfalls die zeitlich verschobene Expressionsinduktion der Differenzierungsmarker erklären würde (Abb. 4-31A & C), welche, wie bereits erwähnt, durch Proliferationssignale gehemmt sein könnten. MRTF-A würde somit die Differenzierung indirekt behindern, indem es die Proliferation der Myoblasten unterstützt. Diese Erklärung deckt sich ebenfalls mit den Beobachtungen des MRTF-A *Knockouts* in der Maus, welcher mit einer Hypoplasie auf Grund fehlender Proliferation von Myoblasten genau den gegensätzlichen Phänotyp zur Folge hatte (Li *et al.* 2005). Die Differenzierung in Form von Zellfusion zur Myotubenbildung war bei diesem *Knockout* nicht beeinträchtigt. Kontrovers dazu steht hingegen die Aussage von Selvaraj und Prywes von 2003. Sie beobachteten ebenfalls eine verringerte Proliferation nach Inhibierung von MRTF. Allerdings kamen sie zu dem Schluss, dass dadurch die Differenzierung inhibiert wird. In Abb. 7A ihrer Publikation ist zu erkennen, dass die Zellen ca. 50% konfluent waren. Für eine normale Differenzierung sollten C2C12-Zellen allerdings ca. 90% konfluent sein. Wenn die MRTF bedingte Proliferation bei 50%iger Konfluenz blockiert würde, können die Zellen die Konfluenz nicht erreichen und somit auch keine normale Differenzierung initiieren. Diese Daten würden somit eher die beobachtete Hypoplasie von Li *et al.* 2005 unterstützen, als dass sie die Notwendigkeit von MRTF für die Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben zeigen.

Ferner führt die MRTF-A-Expression auch zu einer verringerten Expressionsinduktion der miRNAs (Abb. 4-31). Eine mögliche Erklärung wäre auch hier die gehemmte Expression der Differenzierungsmarker durch die anhaltenden Proliferationssignale, wodurch die anschließende Expression der miRNAs inhibiert wird. Besonders für miR-1 und -486 ist dieses Ergebnis interessant. miR-1 wird durch SRF und Myocardin in glatten Muskelzellen exprimiert. Allerdings kann Myocardin in Skelettmuskelzellen nicht detektiert werden, was in diesem Fall einen anderen Transkriptionsfaktor oder womöglich SRF-Co-Aktivatoren notwendig macht (Zhao *et al.* 2005, Chen *et al.* 2011, Yoshida *et al.* 2002, Wang *et al.* 2002, Wang *et al.* 2001, van Tuyn *et al.* 2005, Wang *et al.* 2003). Damit ergibt sich für Skelettmuskelzellen ein ähnliches Verhalten von miR-1 und MRTF-A wie es von Minami *et al.* 2012 in glatten Muskelzellen beschrieben wurde. In kardialen Muskelzellen ist miR-486 durch MRTF-A reguliert (Small *et al.* 2010). In Skelettmuskelzellen könnte MYOD an der Expression von miR-486 beteiligt sein (Small *et al.* 2010). Durch die gehemmte Differenzierung auf Grund der MRTF-A-Expression, würde dieser Faktor womöglich nicht exprimiert, was die fehlende miR-486 Induktion erklären könnte.

Neben der MRTF-A Überexpression führte auch der DICER1 *Knockdown* zu einer Differenzierungsinhibierung und erhöhten MRTF-A-Expression nach 7-tägiger Differenzierung (Abb. 4-19, 4-20, 4-21). Dies könnte bedeuten, dass die verringerte Differenzierung, möglicherweise durch den DICER1 *Knockdown*, wegen des erhöhten MRTF-A Proteingehalts zu erklären wäre. Die Ergebnisse des doppelten *Knockdowns* von DICER1 und MRTF-A zeigten aber, dass die zusätzliche Reduktion von MRTF-A im DICER1 *Knockdown* nicht zu einer erhöhten Expression von Differenzierungsgenen und damit nicht zu einer verbesserten Differenzierung führte (Abb. 4-32 & 4-34). Daraus lässt sich schließen, dass DICER1 und MRTF-A womöglich über verschiedene Wege die Differenzierung beeinflussen. Andererseits wäre denkbar, dass der MRTF-A *Knockdown* zeitlich früher angesetzt werden müsste, um eine Kompensation des DICER1 *Knockdowns* zu erzeugen. Berücksichtigt man die Tatsache, dass Proteine eine bestimmte Halbwertszeit besitzen, könnte bei einem gleichzeitigen Doppel-*Knockdown* der Effekt des MRTF-A *Knockdowns* womöglich zu spät einsetzen, als dass er das Fehlen von DICER1 zu Beginn der Differenzierung kompensieren kann. Daher würde auch in diesem Fall die Differenzierung verzögert ablaufen, wie sie bei der MRTF-A Überexpression zu beobachten war. Um diese Frage genauer zu betrachten, könnte der DICER1 *Knockdown* in Myoblasten, die einen konstitutiven *Knockout* von MRTF-A besitzen, wiederholt werden. Zusätzlich muss man aber auch bedenken, dass der *Knockdown* von DICER1 eventuell einen viel umfangreicheren Einfluss auf die Differenzierung besitzt. Dies könnte darüber erklärt werden, dass durch den DICER1 *Knockdown* alle miRNAs der Zelle betroffen sind und eine miRNA auf Grund ihrer nicht vollständig komplementären Bindung mehrere mRNAs reprimieren kann (Doench *et al.* 2004, Brennecke *et al.* 2005). Der Einfluss von MRTF-A wird sich hingegen vermutlich nur auf einzelne bisher noch unbekannte Faktoren begrenzen.

Zusammenfassend bedeutet dies, dass MRTF-A eine wichtige Rolle in der Muskelbildung besitzen könnte. So wäre MRTF-A, anders als in Fibroblasten, an der Regulation der Myoblastenproliferation beteiligt, um ausreichend Zellmasse zur Verfügung zu stellen. Wenn dies nicht der Fall ist, könnte es zum Muskelschwund auf Grund einer Hypoplasie der Muskelzellen kommen. Die terminale Differenzierung führt die Zellen hingegen in den Proliferationsstopp, die Zellen ruhen in der G₀-Phase. In diesem Zustand würden Proliferationssignale Störfaktoren darstellen, was erklären würde, weshalb MRTF-A reprimiert werden muss (Abb. 5-1). Zusätzlich könnte diese Repression einen indirekten positiven *Feedback-Loop* für die Differenzierungsfaktoren erzeugen, was die Expressionsinduktion zusätzlich verstärkt und die terminale Differenzierung beschleunigt. Über welche Faktoren MRTF-A die Proliferation unterstützt ist momentan aber noch unklar. Da zurzeit nur antiproliferative Zielgene von MRTF-A bekannt sind, zeigt diese Entdeckung wie vielseitig die SRF/MRTF-A-Expressionsinduktion sein kann.

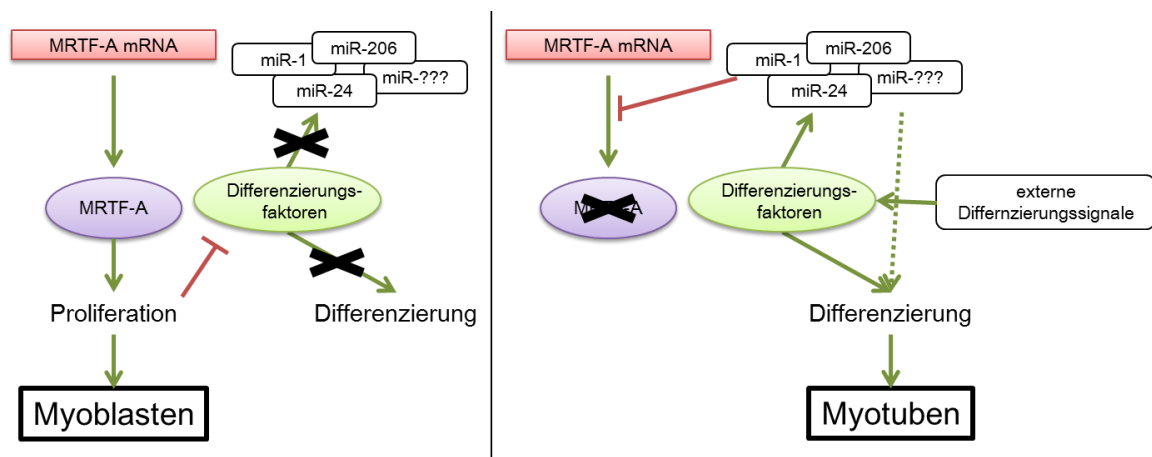


Abb. 5-1: Schematische Darstellung der möglichen Rolle von MRTF-A in der Muskeldifferenzierung

In Myoblasten wird u.a. MRTF-A exprimiert, welches den proliferativen Phänotyp der Zellen unterstützt. Die proliferativen Faktoren haben eine hemmende Wirkung auf die Expression von Differenzierungsfaktoren und müssen vor einer terminalen Differenzierung reprimiert werden. Wenn über externe Signale die terminale Differenzierung initiiert wird, werden initial die Differenzierungsfaktoren exprimiert, welche wiederum die Expression von antiproliferativen miRNAs induzieren. Die miRNAs reprimieren die Expression proliferativer Signale u.a. durch eine posttranskriptionale Regulation von MRTF-A. Ohne Proliferationssignal kann es zur vollen Expressionsinduktion von Differenzierungsfaktoren und miRNAs kommen und die Myoblasten differenzieren zu Myotuben. Die miRNAs unterstützen somit indirekt die Differenzierung (durch gestrichelten Pfeil gekennzeichnet).

Bis auf miR-133 ist für alle miRNAs, welche mit dem miTRAP identifiziert wurden, eine antiproliferative Wirkung in der Literatur beschrieben, was diese Erklärung unterstützt (Minami *et al.* 2012, Chen *et al.* 2005, Chen *et al.* 2011, Dey *et al.* 2011, McCarthy *et al.* 2008, van Rooij *et al.* 2008, Sweetman *et al.* 2008, Gagan *et al.* 2011, Chen *et al.* 2006, Small *et al.* 2010, Sun *et al.* 2008). Für den Transkriptionsfaktor, HMGA2, konnte ein ähnliches Verhalten gezeigt werden. In ruhenden Satellitenzellen ist dieser Faktor nicht exprimiert. Kommt es hingegen zu einer Wundbildung, welche die Bildung neuer Muskelfasern notwendig macht, werden die Satellitenzellen aktiv und bilden proliferierende Myoblasten. In diesen Zellen wird HMGA2 exprimiert. Kommt es zur Bildung der Muskelfaser durch terminale Differenzierung wird die Expression von HMGA2 wieder reduziert (Li *et al.* 2012). Eine ähnliche Wirkungsweise von MRTF-A könnte alle bisher gesammelten und zum Teil kontroversen Erkenntnisse in Einklang bringen.

5.4. MRTF-A: Eine posttranslationale Regulation?

Die Daten in dieser Arbeit haben gezeigt, dass MRTF-A während der C2C12-Differenzierung posttranskriptional reguliert wird. Die *Knockdown*-Versuche von AGO2 und DICER1 sollten eine posttranskriptionale Regulation von MRTF-A verhindern, was sich in einer geringeren Repression von MRTF-A im Vergleich zur Kontrolle widerspiegelte (Abb. 4-17, 4-20). Obwohl es sich in beiden Fällen um partielle *Knockdowns* handelt, fallen die Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle zu klein aus, um den Verlust von ca. 70% MRTF-A während der Differenzierung ausschließlich mit der posttranskriptionalen Regulation zu erklären. Daher stellt sich die Frage, ob neben einer posttranskriptionalen auch eine posttranslationale Regulation vorliegen könnte, welche ebenfalls eine verringerte Proteinexpression bei konstanter mRNA Expression erklären würde. Eine posttranslationale Regulation von MRTF-A wurde bisher in der Literatur noch nicht diskutiert. Wurden C2C12-Zellen während der Differenzierung mit einem Proteaseinhibitor behandelt, fiel die MRTF-A Reduktion geringer aus, als in der Kontrolle (Abb. 4-26). Auf Grund des Verlustes von MRTF-A während der Differenzierung ist diese Beobachtung zu erwarten. Ein spezifisch erhöhter Abbau könnte mittels einer Ubiquitinierung von MRTF-A realisiert werden. Bei einer Ubiquitinierung wird Ubiquitin, ein kleines stark konserviertes Protein, kovalent an Proteine gebunden, die mit Hilfe des Proteasoms abgebaut werden sollen (Hershko & Ciechanover 1998, Hochstrasser 1996). Eine Ubiquitinierung müsste sich nach der Inhibierung des Proteasoms durch weitere MRTF-A Signale im Western-Blot, die langsamer als das ursprüngliche Signal laufen, darstellen lassen. Solche Signale konnten für MRTF-A nicht gefunden werden, was gegen eine vermehrte Ubiquitinierung und damit auch gegen einen verstärkten Abbau von MRTF-A während der Differenzierung sprechen würde (Abb. 4-26).

Die Halbwertszeit von MRTF-A in undifferenzierten C2C12-Zellen beträgt ca. 6,8 h und ist damit mehr als doppelt so lang wie in COS7-Zellen (Abb. 4-27, Hinson *et al.* 2008). Dies könnte bedeuten, dass MRTF-A in C2C12-Zellen stabiler ist als in COS7-Zellen. Interessanterweise ändert sich die Halbwertszeit in differenzierenden C2C12-Zellen nur geringfügig auf 6,3 h. Eine erhöhte Degradation müsste sich in einer verkürzten Halbwertszeit widerspiegeln. Da sich die Halbwertszeit von MRTF-A während der Differenzierung nur marginal verringert, kann aus diesen Daten nicht ohne jeden Zweifel auf eine posttranslationale Regulation von MRTF-A während der Differenzierung geschlossen werden.

Die miRNA vermittelte Regulation vermag es nach der aktuellen Datenlage nicht die 70%ige Repression von MRTF-A während der Differenzierung zu erklären. Deshalb sollte auf Grund der Daten der Halbwertszeitbestimmung eine posttranslationale Regulation von MRTF-A in C2C12-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Es wäre gut möglich, dass es dieser geringe Unterschied in der Halbwertszeit von MRTF-A zwischen undifferenzierten und differenzierenden Zellen ist, welcher über den Zeitraum von 7 Tagen den MRTF-A Gehalt signifikant beeinflusst. Allerdings bedarf es hierfür noch weitere Untersuchungen um genauere Aussagen treffen zu können.

6. Zusammenfassung

Da Muskelgewebe mit ca. 40% einen großen Anteil unseres Organismus ausmacht, können Defekte in der Entwicklung sowie der Differenzierung dieses Gewebes weitreichende Folgen haben. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse könnte hilfreich sein, um auch Myopathien besser verstehen und behandeln zu können. Allerdings sind gerade die Muskelentwicklung und -differenzierung sehr komplexe Prozesse, die noch viele ungeklärte Fragen aufwerfen. So ist auch die Rolle von SRF und seinen Co-Aktivatoren in diesen Gewebearten nur zum Teil geklärt.

In dieser Arbeit sollte daher die Rolle des SRF-Co-Aktivators MRTF-A während der Muskelzellendifferenzierung genauer untersucht werden. Initiale Untersuchungen zeigten, dass der MRTF-A Proteingehalt während der C2C12-Differenzierung abnimmt. Versuche zur proteasomalen Degradation sowie der Halbwertszeit brachten allerdings keine verlässlichen Hinweise für eine posttranslationale Regulation von MRTF-A, weshalb eine mögliche posttranskriptionale Regulation von MRTF-A in Skelettmuskelzellen Untersuchungsschwerpunkt dieser Arbeit ist.

Mit Hilfe des miTRAP, einem *Pull-down* Assay für miRNAs, konnten miRNAs identifiziert werden, welche während der C2C12-Differenzierung an die 3'UTR von MRTF-A binden. Dabei konnte vor allem die muskelspezifische miR-1 identifiziert werden. Weitere miRNAs waren miR-206, miR-24 und miR-486, welche genau wie miR-1 durch eine Überexpression MRTF-A sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene reprimieren konnten. Durch ein Luciferase Reporterassay konnte gezeigt werden, dass MRTF-A während der C2C12-Differenzierung direkt posttranskriptional durch miR-1, -206 und -24 gebunden und z.T. reprimiert wird. Die Repression der miRNA Expression mit Hilfe des *Knockdowns* von AGO2 und DICER1 bestätigten diese Erkenntnisse und zeigten, dass die genannten miRNAs während der Skelettmuskelzellendifferenzierung womöglich direkt an der Regulation von MRTF-A beteiligt sind.

Die Notwendigkeit der MRTF-A-Repression für die Muskelzellendifferenzierung konnte mit MRTF-A-Überexpressionsversuchen verdeutlicht werden. Zellproliferationsassays mit C2C12-Zellen zeigten, dass eine Überexpression von MRTF-A die Proliferation von Myoblasten über die Konfluenz hinaus weiter fördert. Dadurch kam es zur Bildung von Zellaggregationen. Durch den zeitlich verschobenen Proliferationsstopp wurde letztlich ebenfalls die Differenzierung behindert. Diese Daten lassen vermuten, dass MRTF-A womöglich nicht nur in glatten Muskelzellen, sondern auch in Skelettmuskelzellen ein Schlüsselement in der komplexen Regulation der Differenzierung sein könnte.

Obwohl MRTF-A in anderen Gewebearten antiproliferativ und apoptotisch wirkt, zeigt diese Arbeit unterstützt durch weitere Studien, dass MRTF-A in Muskelgewebe an der Zellproliferation beteiligt sein könnte. Mit der posttranskriptionalen Regulation und der essentiellen Funktion während der Muskelzellendifferenzierung könnten in dieser Arbeit weitere Charakteristika von MRTF-A entdeckt wurden sein, welche die Vielseitigkeit dieses Proteins unterstreichen und die Basis für weitere spannende Fragen legen.

7. Literaturverzeichnis

- Affolter M, Montagne J, Walldorf U, Groppe J, Kloter U, LaRosa M, *et al.* The Drosophila SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development*. 1994;120(4):743–53.
- Aikawa M, Sivam PN, Kuro-o M, Kimura K, Nakahara K, Takewaki S, *et al.* Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res*. 1993;73(6):1000–12.
- Akkari PA, Eyre HJ, Wilton SD, Callen DF, Lane SA, Meredith C, Kedes L, Laing NG. Assignment of the human skeletal muscle alpha actin gene (ACTA1) to 1q42 by fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet*. 1994;65(4):265-7.
- Alberti S, Krause SM, Kretz O, Philippar U, Lemberger T, Casanova E, *et al.* Neuronal migration in the murine rostral migratory stream requires serum response factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(17):6148–53.
- Anderson C, Catoe H, Werner R. MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(20):5863–71.
- Arasu P, Wightman B, Ruvkun G. Temporal regulation of h ' n-14 by the antagonistic action of two other heterochronic genes , h ' n-4 and lin-28. *Genes Dev*. 1991;5:1825–33.
- Aravind L, Koonin EV. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(3):112-4.
- Arsenian S, Weinhold B, Oelgeschläger M, Rütter U, Nordheim a. Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J*. 1998;17(21):6289–99.
- Asher G, Shaul Y. p53 proteasomal degradation: poly-ubiquitination is not the whole story. *Cell Cycle*. 2005;4(8):1015-8.
- Baroffio A, Hamann M, Bernheim L, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Bader CR. Identification of self-renewing myoblasts in the progeny of single human muscle satellite cells. *Differentiation*. 1996;60(1):47-57.
- Bartel DP, Chen C-Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2004;5(5):396–400.
- Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. 2005;11(3):241–7.
- Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. Ribosome Profiling Shows That miR-430 Reduces Translation Before Causing mRNA Decay in Zebrafish. *Science*. 2012;336(6078):233–37.
- Belaguli NS, Schildmeyer L a, Schwartz RJ. Organization and myogenic restricted expression of the murine serum response factor gene. A role for autoregulation. *J Biol Chem*. 1997;272(29):18222–31.
- Belaguli NS, Zhou W, Trinh TH, Majesky MW, Schwartz RJ. Dominant negative murine serum response factor: alternative splicing within the activation domain inhibits transactivation of serum response factor binding targets. *Mol Cell Biol*. 1999;19(7):4582–91.
- Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*. 1990;61(1):49-59.
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, *et al.* Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003;35(3):215-7.
- Böhm F, Kappes F, Scholten I, Richter N, Matsuo H, Knippers R, *et al.* The SAF-box domain of chromatin protein DEK. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(3):1101–10.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185–91.
- Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, *et al.* MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature*. 2013;495(7439):107-10.
- Boxer LM, Prywes R, Roeder RG, Kedes L. The sarcomeric actin CARG-binding factor is indistinguishable from the c-fos serum response factor. *Mol Cell Biol*. 1989;9(2):515–22.
- Braun J, Misiak D, Busch B, Krohn K, Hüttelmaier S. Rapid identification of regulatory microRNAs by miTRAP (miRNA trapping by RNA in vitro affinity purification). *Nucleic Acids Res*. 2014;42(8).
- Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;12(6):349–61.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell*. 2003;113(1):25–36.

- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005;3(3):0404–18.
- Brunelli S, Relaix F, Baesso S, Buckingham M, Cossu G. Beta catenin-independent activation of MyoD in presomitic mesoderm requires PKC and depends on Pax3 transcriptional activity. *Dev Biol.* 2007;304(2):604–14.
- Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, *et al.* Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2008;47(3):897–907.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004;10(12):1957–66.
- Camoretti-Mercado B, Liu HW, Halayko a J, Forsythe SM, Kyle JW, Li B, *et al.* Physiological control of smooth muscle-specific gene expression through regulated nuclear translocation of serum response factor. *J Biol Chem.* 2000;275(39):30387–93.
- Caravatti M, Minty A, Robert B, Montarras D, Weydert A, Cohen A, *et al.* Regulation of muscle gene expression. The accumulation of messenger RNAs coding for muscle-specific proteins during myogenesis in a mouse cell line. *J Mol Biol.* 1982;160(1):59-76.
- Cen B, Selvaraj A, Burgess RC, Hitzler JK, Ma Z, Morris SW, *et al.* Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Mol Cell Biol.* 2003;23(18):6597–608.
- Cen B, Selvaraj A, Prywes R. Myocardin/MKL family of SRF coactivators: Key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *J Cell Biochem.* 2004;93(1):74–82.
- Chai J, Tarnawski AS. Serum response factor: Discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol.* 2002;53(2):147–57.
- Chargé SBP, Rudnicki M a. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84(1):209–38.
- Charvet C, Houbron C, Parlakian A, Giordani J, Lahoute C, Bertrand A, *et al.* New role for serum response factor in postnatal skeletal muscle growth and regeneration via the interleukin 4 and insulin-like growth factor 1 pathways. *Mol Cell Biol.* 2006;26(17):6664–74.
- Chen CY, Schwartz RJ. Recruitment of the tinman homolog Nkx-2.5 by serum response factor activates cardiac alpha-actin gene transcription. *Mol Cell Biol.* 1996;16(11):6372-84.
- Chen J, Kitchen CM, Streb JW, Miano JM. Myocardin: a component of a molecular switch for smooth muscle differentiation. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(10):1345-56.
- Chen PY, Manninga H, Slanchev K, Chien M, Russo JJ, Ju J, *et al.* The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes Dev.* 2005;19(11):1288–93.
- Chen C, Ridzon D a., Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, *et al.* Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005b;33(20):1–9.
- Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006;38(2):228–33.
- Chen JF, Tao Y, Li J, Deng Z, Yan Z, Xiao X, *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *J Cell Biol.* 2010;190(5):867–79.
- Chen J, Yin H, Jiang Y, Radhakrishnan SK, Huang ZP, Li J, *et al.* Induction of MicroRNA-1 by myocardin in smooth muscle cells inhibits cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(2):368–75.
- Collins C a., Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge T a., *et al.* Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell.* 2005;122(2):289–301.
- Cornelison DD, Olwin BB, Rudnicki M a, Wold BJ. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol.* 2000;224(2):122–37.
- Cornelison DDW, Wold BJ. Single-Cell Analysis of Regulatory Gene Expression in Quiescent and Activated Mouse Skeletal Muscle Satellite Cells. *Dev Biol.* 1997;191(2):270–83.
- Crist CG, Montarras D, Buckingham M. Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell [Internet]. Elsevier;* 2012;11(1):118–26.
- Dambal S, Shah M, Mihelich B, Nonn L. The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(15):7173-88.
- De Leon G, Sherry TC, Krucher NA. Reduced expression of PNUTS leads to activation of Rb-phosphatase and caspase-mediated apoptosis. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(6):833-41.
- Deschamps J, Meijlink F, Verma IM. Identification of a transcriptional enhancer element upstream from the proto-oncogene fos. *Science.* 1985;230(4730):1174-7.

- Descot A, Hoffmann R, Shaposhnikov D, Reschke M, Ullrich A, Posern G. Negative regulation of the EGFR-MAPK cascade by actin-MAL-mediated Mig6/Errfi-1 induction. *Mol Cell*. 2009;35(3):291-304.
- Dey BK, Gagan J, Dutta A. miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. *Mol Cell Biol*. 2011;31(1):203–14.
- Diederichs S, Haber D a. Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression. *Cell*. 2007;131(6):1097–108.
- Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*. 2012;336(6078): 237–240.
- Doench JG, Petersen CP, Sharp P a. siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*. 2003;17(4):438–42.
- Doench JG, Sharp P a. Specificity of microRNA target selection in translational repression. 2004;504–11.
- Du KL, Ip HS, Li J, Chen M, Dandre F, Yu W, *et al*. Myocardin Is a Critical Serum Response Factor Cofactor in the Transcriptional Program Regulating Smooth Muscle Cell Differentiation Myocardin Is a Critical Serum Response Factor Cofactor in the Transcriptional Program Regulating Smooth Muscle Cell Differe. 2003;23(7):2425–37.
- Du KL, Chen M, Li J, Lepore JJ, Mericko P, Parmacek MS. Megakaryoblastic Leukemia Factor-1 Transduces Cytoskeletal Signals and Induces Smooth Muscle Cell Differentiation from Undifferentiated Embryonic Stem Cells. *J Biol Chem*. 2004;279(17):17578–86.
- Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92–105.
- Gagan J, Dey BK, Layer R, Yan Z, Dutta A. MicroRNA-378 targets the myogenic repressor MyoR during myoblast differentiation. *J Biol Chem*. 2011;286(22):19431–8.
- Gauthier-Rouviere C, Vandromme M, Tuil D, Lautredou N, Morris M, Soulez M, *et al*. Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscle-determining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts. *Mol Biol Cell*. 1996;7(5):719–29.
- Göhring F, Schwab BL, Nicotera P, Leist M, Fackelmayer FO. The novel SAR-binding domain of scaffold attachment factor A (SAF-A) is a target in apoptotic nuclear breakdown. *EMBO J*. 1997;16(24):7361–71.
- Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature*. 1984;311(5985):433-8.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432(7014):235-40.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, *et al*. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001;106(1):23–34.
- Grueneberg DA, Natesan S, Alexandre C, Gilman MZ. Human and Drosophila homeodomain proteins that enhance the DNA-binding activity of serum response factor. *Science*. 1992;257(5073):1089-95.
- Ha M, Kim N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014;15:509-524
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy a a, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001;293(5532):1146–50.
- Hammond SM. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett*. 2005;579(26):5822-9.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, *et al*. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*. 2006;125(5):887–901.
- Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*. 2001;91:534–51.
- Hershko A, Ciechanover. THE UBIQUITIN SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry*. 1998;67:425-79
- Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*. 1995;81(7):1159–70.
- Hinson JS, Medlin MD, Taylor JM, Mack CP. Regulation of myocardin factor protein stability by the LIM-only protein FHL2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(3):H1067–75.
- Hirai H, Verma M, Watanabe S, Tastad C, Asakura Y, Asakura A. MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3. *J Cell Biol*. 2010;191(2):347–65.

- Hirano H, Matsuura Y. Sensing actin dynamics: Structural basis for G-actin-sensitive nuclear import of MAL. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;414(2):373–8.
- Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*. 1996;30:405-39.
- Huang MB, Xu H, Xie SJ, Zhou H, Qu LH. Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-133 during skeletal myogenesis. *PLoS One*. 2011;6(12).
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli a E, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834–8.
- Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002;297(5589):2056–60.
- Hutvagner G. Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett*. 2005;579(26):5850–7.
- Iwasaki K, Hayashi K, Fujioka T, Sobue K. Rho/Rho-associated kinase signal regulates myogenic differentiation via myocardin-related transcription factor-A/Smad-dependent transcription of the Id3 gene. *J Biol Chem*. 2008;283(30):21230–41.
- Iyer D, Belaguli N, Flück M, Rowan BG, Wei L, Weigel NL, Booth FW, *et al*. Novel phosphorylation target in the serum response factor MADS box regulates alpha-actin transcription. *Biochemistry*. 2003;42(24):7477-86.
- Iyer D, Chang D, Marx J, Wei L, Olson EN, Parmacek MS, *et al*. Serum response factor MADS box serine-162 phosphorylation switches proliferation and myogenic gene programs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(12):4516–21.
- Jiang Y, Yin H a O, Zheng XL. MicroRNA-1 inhibits myocardin-induced contractility of human vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):506–11.
- Johansen FE, Prywes R. Identification of transcriptional activation and inhibitory domains in serum response factor (SRF) by using GAL4-SRF constructs. *Mol Cell Biol*. 1993;13(8):4640–7.
- Johansen FE, Prywes R. Serum response factor: transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1242(1):1-10.
- Kanellopoulou C, Muljo S a., Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, *et al*. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*. 2005;19(4):489–501.
- Kang H, Hata A. MicroRNA regulation of smooth muscle gene expression and phenotype. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(3):224–31.
- Kemp PR, Metcalfe JC. Four isoforms of serum response factor that increase or inhibit smooth-muscle-specific promoter activity. *Biochem J*. 2000;345 Pt 3:445–51.
- Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Bernstein E, Sijen T, Sijen T, *et al*. *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001;(516):2654–9.
- Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol*. 2006;174(5):677-87.
- Kipp M, Göhring F, Ostendorp T, van Drunen CM, van Driel R, Przybylski M, *et al*. SAF-Box, a conserved protein domain that specifically recognizes scaffold attachment region DNA. *Mol Cell Biol*. 2000;20(20):7480–9.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1):68–73.
- Kuang S, Chargé SB, Seale P, Huh M, Rudnicki M a. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol*. 2006;172(1):103–13.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.
- Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The Human DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 and Its D. melanogaster Homolog Are Required for miRNA Biogenesis. *Development*. 2004;14(23):2162–7.
- Latella L, Sacchi a, Crescenzi M. Long-term fate of terminally differentiated skeletal muscle cells following E1A-initiated cell cycle reactivation. *Cell Death Differ*. 2000;7(2):145–54.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-62.
- Lee RC. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–54.
- Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):862-4.
- Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* [Internet]. 2002;21(17):4663–70.

- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051–60.
- Lepper C, Conway SJ, Fan C. Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements. 2009;460(7255):627–31.
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell.* 2003;115(7):787–98.
- Li S, Wang D-Z, Wang Z, Richardson J a, Olson EN. The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9366–70.
- Li S, Czubryt MP, McAnally J, Bassel-Duby R, Richardson J a, Wiebel FF, *et al.* Requirement for serum response factor for skeletal muscle growth and maturation revealed by tissue-specific gene deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(4):1082–7.
- Li J, Zhu X, Chen M, Cheng L, Zhou D, Lu MM, *et al.* Myocardin-related transcription factor B is required in cardiac neural crest for smooth muscle differentiation and cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005b;102(25):8916–21.
- Li S, Chang S, Qi X, Richardson J a, Olson EN. Requirement of a myocardin-related transcription factor for development of mammary myoepithelial cells. *Mol Cell Biol.* 2006;26(15):5797–808.
- Li Z, Gilbert J a., Zhang Y, Zhang M, Qiu Q, Ramanujan K, *et al.* An HMGA2-IGF2BP2 Axis Regulates Myoblast Proliferation and Myogenesis. *Dev Cell [Internet]. Elsevier Inc.;* 2012;23(6):1176–88.
- Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics.* 2007;8:166.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005;433(7027):769-73.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 2004;305(5689):1437-41.
- Liu N, Williams AH, Kim Y, McAnally J, Bezprozvannaya S, Sutherland LB, *et al.* An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(52):20844–9.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- Lu L, Zhou L, Chen EZ, Sun K, Jiang P, Wang L, *et al.* A novel YY1-miR-1 regulatory circuit in skeletal myogenesis revealed by Genome-wide prediction of YY1-miRNA network. *PLoS One.* 2012;7(2).
- Luo W, Nie Q, Zhang X. MicroRNAs Involved in Skeletal Muscle Differentiation. *J Genet Genomics [Internet]. Elsevier Limited and Science Press;* 2013;40(3):107–16.
- Ma Z, Morris SW, Valentine V, Li M, Herbrick JA, Cui X, Bouman D, Li Y, *et al.* Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2001;28(3):220-1.
- Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science.* 2006;311(5758):195-8.
- Manak JR, Prywes R. Mutation of serum response factor phosphorylation sites and the mechanism by which its DNA-binding activity is increased by casein kinase II. *Mol Cell Biol.* 1991;11(7):3652–9.
- Mansfield JH, Harfe BD, Nissen R, Obenaus J, Srineel J, Chaudhuri A, *et al.* MicroRNA-responsive “sensor” transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet.* 2004;36(10):1079–83.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 2002;110(5):563–74.
- Matkovich SJ, Hu Y, Dorn GW. Regulation of cardiac microRNAs by cardiac microRNAs. *Circ Res.* 2013;113(1):62–71.
- Mauro A. Satellite Cell of Skeletal Muscle Fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9(2):493–5.
- McCarthy JJ. MicroRNA-206: The skeletal muscle-specific myomiR. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech.* 2008;1779(11):682–91.
- McDanel TG, Smith TPL, Doumit ME, Miles JR, Coutinho LL, Sonstegard TS, *et al.* MicroRNA transcriptome profiles during swine skeletal muscle development. *BMC Genomics.* 2009;10:77.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 2004;15(2):185–97.

- Mercher T, Coniat MB, Monni R, Mauchauffe M, Nguyen Khac F, Gressin L, *et al.* Involvement of a human gene related to the *Drosophila* *spen* gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(10):5776–9.
- Miano JM. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35(6):577–93.
- Minami T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Takaoka M, Kinoshita H, Nakao K, *et al.* Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice. *EMBO J [Internet]. Nature Publishing Group;* 2012;31(23):4428–40.
- Minty A, Keddes L. Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol Cell Biol.* 1986;6(6):2125–36.
- Miralles F, Posern G, Zaromytidou AI, Treisman R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell.* 2003;113(3):329–42.
- Misra RP, Rivera VM, Wang JM, Fan PD, Greenberg ME. The serum response factor is extensively modified by phosphorylation following its synthesis in serum-stimulated fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1991;11(9):4545–54.
- Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, Zarone MR, Gullà A, Tagliaferri P, Tassone P, Caraglia M. Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3:e194.
- Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T, *et al.* Direct Isolation of Satellite Cells for Skeletal Muscle Regeneration. *Science.* 2005;309(5743):2064–67
- Morin S, Paradis P, Aries a, Nemer M. Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol Cell Biol.* 2001;21(4):1036–44.
- Motohashi N, Asakura A. Muscle satellite cell heterogeneity and self-renewal. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2(1):1–21.
- Muehlich S, Wang R, Lee S-M, Lewis TC, Dai C, Prywes R. Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Mol Cell Biol.* 2008;28(20):6302–13.
- Nadal-Ginard B. Commitment, fusion and biochemical differentiation of a myogenic cell line in the absence of DNA synthesis. *Cell.* 1978;15(3):855–64.
- Norman C, Runswick M, Pollock R, Treisman R. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell.* 1988;55(6):989–1003.
- Oh J, Richardson J a, Olson EN. Requirement of myocardin-related transcription factor-B for remodeling of branchial arch arteries and smooth muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(42):15122–7.
- Okazaki K, Holtzer H. Myogenesis: fusion, myosin synthesis, and the mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1966;56(5):1484–90.
- Olguin HC, Olwin BB. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: A potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol.* 2004;275(2):375–88.
- Olson EN, Nordheim A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(5):353–65.
- Oustanina S, Hause G, Braun T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* 2004;23(16):3430–9.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev [Internet].* 2004;84(3):767–801.
- Parlakian A, Tuil D, Hamard G, Tavernier G, Hentzen D, Concordet J-P, *et al.* Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol Cell Biol.* 2004;24(12):5281–9.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 2000;408(6808):86–9.
- Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet.* 2012;13(4):271–82.
- Pawlowski R, Rajakylä EK, Vartiainen MK, Treisman R. An actin-regulated importin α/β -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *EMBO J.* 2010;29(20):3448–58.
- Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp P a. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell.* 2006;21(4):533–42.

- Pfirrmann T, Lokapally A, Andreasson C, Ljungdahl P, Hollemann T. SOMA: A Single Oligonucleotide Mutagenesis and Cloning Approach. *PLoS One*. 2013;8(6):e64870.
- Phan-Dinh-Tuy F, Tuil D, Schweighoffer F, Pinset C, Kahn A, Minty A. The 'CC.Ar.GG' box. A protein-binding site common to transcription-regulatory regions of the cardiac actin, c-fos and interleukin-2 receptor genes. *Eur J Biochem*. 1988;515:507–15.
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, *et al.* Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science*. 2005;30(5740):1573-76.
- Pipes GCT, Sinha S, Qi X, Zhu CH, Gallardo TD, Shelton J, *et al.* Stem cells and their derivatives can bypass the requirement of myocardin for smooth muscle gene expression. *Dev Biol*. 2005;288(2):502–13.
- Pipes GCT, Creemers EE, Olson EN. The myocardin family of transcriptional coactivators: Versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev*. 2006;20(12):1545–56.
- Posern G, Sotiropoulos A, Treisman R. Mutant Actins demonstrate a Role for unpolymerized Actin in control of transcription by serum response factor. *Mol Biol Cell*. 2002;13(6):2001–15.
- Posern G, Miralles F, Guettler S, Treisman R. Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO J*. 2004;23(20):3973–83.
- Posern G, Treisman R. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol*. 2006;16(11):588–96.
- Prywes R, Roeder RG. Inducible binding of a factor to the c-fos enhancer. *Cell*. 1986;47(5):777-84.
- Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, *et al.* Downregulation of MiR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1?? and sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009;104(7):879–86.
- Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(23):8721–6.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
- Reinhart BJ, Ruvkun G. Isoform-specific mutations in the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* affect stage-specific patterning. *Genetics*. 2001;157(1):199–209.
- Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*. 2005;435(7044):948-53.
- Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, *et al.* Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol*. 2006;172(1):91–102.
- Rensen SSM, Niessen PMG, Long X, Doevendans P a., Miano JM, Van Eys GJJM. Contribution of serum response factor and myocardin to transcriptional regulation of smoothelins. *Cardiovasc Res*. 2006;70(1):136–45.
- Rivera VM, Miranti CK, Misra RP, Ginty DD, Chen RH, Blenis J, *et al.* A growth factor-induced kinase phosphorylates the serum response factor at a site that regulates its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol*. 1993;13(10):6260–73.
- Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 2010;11(3):R25.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004;14(10 A):1902–10.
- Rosenberg MI, Georges S a., Asawachaicharn A, Analau E, Tapscott SJ. MyoD inhibits *Fstl1* and *Utrn* expression by inducing transcription of miR-206. *J Cell Biol*. 2006;175(1):77–85.
- Ruvkun G, Wightman B, Bürglin T, Arasu P. Dominant gain-of-function mutations that lead to misregulation of the *C. elegans* heterochronic gene *lin-14*, and the evolutionary implications of dominant mutations in pattern-formation genes. *Dev Suppl*. 1991;1:47–54.
- Sachdev S, Bruhn L, Sieber H, Pichler A, Melchior F, Grosschedl R. PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev*. 2001;15(23):3088–103.
- Sakuma K, Akiho M, Nakashima H, Akima H, Yasuhara M. Age-related reductions in expression of serum response factor and myocardin-related transcription factor A in mouse skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2008;1782(7-8):453–61.

- Sasazuki T, Sawada T, Sakon S, Kitamura T, Kishi T, Okazaki T, *et al.* Identification of a novel transcriptional activator, BSAC, by a functional cloning to inhibit tumor necrosis factor-induced cell death. *J Biol Chem.* 2002;277(32):28853–60.
- Sato T, Rocancourt D, Marques L, Thorsteinsdóttir S, Buckingham M. A Pax3/Dmrt2/Myf5 regulatory cascade functions at the onset of myogenesis. *PLoS Genet.* 2010;6(4).
- Saxena S, Jónsson ZO, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2003;278(45):44312–9.
- Scharenberg M a., Chiquet-Ehrismann R, Asparuhova MB. Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis. *Int J Biochem Cell Biol [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;42(12):1911–4*
- Schiaffino S, Reggiani C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1447–531.
- Schultz E. A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle. *Anat Rec.* 1974;180(4):589-95.
- Schratt G, Weinhold B, Lundberg a. S, Schuck S, Berger J, Schwarz H, *et al.* Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol [Internet]. 2001;21(8):2933.*
- Schratt G, Philippar U, Berger J, Schwarz H, Heidenreich O, Nordheim A. Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J Cell Biol.* 2002;156(4):737–50.
- Seale P, Sabourin L a, Girgis-Gabardo a, Mansouri a, Gruss P, Rudnicki M a. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 2000;102(6):777–86.
- Selvaraj A, Prywes R. Megakaryoblastic Leukemia-1/2, a Transcriptional Co-activator of Serum Response Factor, is required for Skeletal Myogenic Differentiation. *J Biol Chem.* 2003;278(43):41977–87.
- Selvaraj A, Prywes R. Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent. *BMC Mol Biol.* 2004;5:13.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 2004;5(3):R13.
- Shaposhnikov D, Descot A, Schilling J, Posern G. Myocardin-related transcription factor A regulates expression of Bok and Noxa and is involved in apoptotic signalling. *Cell Cycle.* 2012;11(1):141-50.
- Shingara J, Keiger K, Shelton J, Laosinchai-Wolf W, Powers P, Conrad R, *et al.* An optimized isolation and labeling platform for accurate microRNA expression profiling. *RNA.* 2005;11(9):1461–70.
- Shore P, Sharrocks a D. The ETS-domain transcription factors Elk-1 and SAP-1 exhibit differential DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(22):4698–706.
- Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, Gerard RD, *et al.* Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(9):4218–23.
- Sokol NS, Ambros V. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev.* 2005;14:2343–54.
- Sommer H, Beltrán JP, Huijser P, Pape H, Lönning WE, Saedler H, *et al.* Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in *Antirrhinum majus*: the protein shows homology to transcription factors. *EMBO J.* 1990;9(3):605–13.
- Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell.* 1999;98(2):159–69.
- Soulez M, Rouviere CG, Chafey P, Hentzen D, Vandromme M, Lautredou N, *et al.* Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. *Mol Cell Biol.* 1996;16(11):6065–74.
- Spencer J a, Misra RP. Expression of the serum response factor gene is regulated by serum response factor binding sites. *J Biol Chem.* 1996;271(28):16535–43.
- Sun L, Trausch-Azar JS, Ciechanover A, Schwartz AL. Ubiquitin-proteasome-mediated degradation, intracellular localization, and protein synthesis of MyoD and Id1 during muscle differentiation. *J Biol Chem.* 2005;280(28):26448–56.
- Sun Q, Chen G, Streb JW, Long X, Yang Y, Stoeckert CJ, *et al.* Defining the mammalian CArGome. *Genome Res.* 2006;16(2):197–207.

- Sun Q, Zhang Y, Yang G, Chen X, Zhang Y, Cao G, *et al.* Transforming growth factor- β -regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(8):2690–9.
- Sun K, Battle M a, Misra RP, Duncan S a. *Body Growth in Mice.* 2009;49(5):1645–54.
- Sweetman D, Goljanek K, Rathjen T, Oustanina S, Braun T, Dalmay T, *et al.* Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Dev Biol.* 2008;321(2):491–9.
- Takada S, Berezikov E, Yamashita Y, Lagos-Quintana M, Kloosterman WP, Enomoto M, *et al.* Mouse microRNA profiles determined with a new and sensitive cloning method. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(17).
- Tapscott SJ. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. *Development.* 2005;132(12):2685–95.
- Taylor M, Treisman R, Garrett N, Mohun T. Muscle-specific (CARG) and serum-responsive (SRE) promoter elements are functionally interchangeable in *Xenopus* embryos and mouse fibroblasts. *Development.* 1989;106(1):67–78.
- Treisman R. Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell.* 1985;42(3):889-902.
- Treisman R. Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell.* 1986;46(4):567-74.
- Treisman R. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4(1):96-101.
- Valastyan S, Weinberg R. miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell Cycle.* 2010;9(11):2124-9.
- van der Loop FT, Schaart G, Timmer ED, Ramaekers FC, van Eys GJ. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1996;134(2):401–11.
- van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet.* 2008;24(4):159-66.
- van Tuyn J, Knaän-Shanzer S, Van De Watering MJM, De Graaf M, Van Der Laarse A, Schali J MJ, *et al.* Activation of cardiac and smooth muscle-specific genes in primary human cells after forced expression of human myocardin. *Cardiovasc Res.* 2005;67(2):245–55.
- Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc.* 2008;3(2):190–6.
- Vartiainen MK, Guettler S, Larijani B, Richard Treisman R. Nuclear Actin Regulates Dynamic Subcellular Localization and Activity of the SRF Cofactor MAL. *Science.* 2007;316(5832):1749-52.
- Verdoni AM, Ikeda S, Ikeda A. Serum Response Factor is Essential for the Proper Development of Skin Epithelium Mamm Genome. 2010;21(1-2):64–76.
- Wang DZ, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson J a., Small E, *et al.* Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell.* 2001;105(7):851–62.
- Wang D-Z, Li S, Hockemeyer D, Sutherland L, Wang Z, Schratt G, *et al.* Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):14855–60.
- Wang Z, Wang D-Z, Pipes GCT, Olson EN. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(12):7129–34.
- Wang D. miRNA in Cardiomyocyte Development. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011;3(2):183–90.
- Wang X1, Cao L, Wang Y, Wang X, Liu N, You Y. Regulation of let-7 and its target oncogenes. *Oncol Lett.* 2012;3(5):955-960.
- Wang F, Wang H, Wu H, Qiu H, Zeng C, Sun L, *et al.* TEAD1 controls C2C12 cell proliferation and differentiation and regulates three novel target genes. *Cell Signal [Internet]. Elsevier B.V.;* 2013;25(3):674–81.
- Weinhold B, Schratt G, Arsenian S, Berger J, Kamino K, Schwarz H, Rüther U, Nordheim A. Srf(-/-) ES cells display non-cell-autonomous impairment in mesodermal differentiation. *EMBO J.* 2000;19(21):5835-44.
- Wienholds E, Plasterk RH a. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* 2005;579(26):5911–22.
- Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science.* 2005b;309(5732):310-1.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993;75(5):855–62.

- Xie C, Huang H, Sun X, Guo Y, Hamblin M, Ritchie RP, *et al.* MicroRNA-1 regulates smooth muscle cell differentiation by repressing Kruppel-like factor 4. *Stem Cells Dev.* 2011;20(2):205–10.
- Xu P, Vernoooy SY, Guo M, Hay BA. The Drosophila MicroRNA Mir-14 Suppresses Cell Death and Is Required for Normal Fat Metabolism. *Curr Biol.* 2003;13(9):790–5.
- Yekta S, Shih I-H, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 2004;304(5670):594–6.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17(24):3011-6.
- Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates “reserve cells”. *J Cell Sci.* 1998;111 (Pt 6):769–79.
- Yoshida T, Sinha S, Dandré F, Wamhoff BR, Hoofnagle MH, Kremer BE, *et al.* Myocardin is a key regulator of CArG-dependent transcription of multiple smooth muscle marker genes. *Circ Res.* 2003;92(8):856–64.
- Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge T a., Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: A mechanism for self-renewal? *J Cell Biol.* 2004;166(3):347–57.
- Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell.* 2002;9(6):1327–33.
- Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(17):9779–84.
- Zhang L, Hu JJ, Gong F. MG132 inhibition of proteasome blocks apoptosis induced by severe DNA damage. *Cell Cycle.* 2011;10(20):3515-8.
- Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature.* 2005;436(7048):214-21.
- Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* 2006;16(9):453-60.

Verwendete Internetseiten

Bestimmung der miRNA Bindestellen	http://www.microrna.org/microrna/getMrna.do?gene=223701&utr=7803&organism=10090 [Stand 01.01.2016, 15:17 Uhr]
Bestimmung der miRNA Sequenzen: MIMAT0003151	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0003151 Stand 01.01.2016, 15:28 Uhr] [
MIMAT0025167	http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?mature_acc=MIMAT0025167 [Stand 01.01.2016, 15:29 Uhr]

8. Anhang

Gesamt-RNA C2C12 undifferenziert (Tag 0)								
miRNA	Input 1	Input 1 normalisiert [CPM]	Input 2	Input 2 normalisiert [CPM]	Input 3	Input 3 normalisiert [CPM]	Mittelwert normalisiert [CPM]	Bemerkung
mmu-let-7a-5p	668	1775	1786	4875	2138	2769		
mmu-let-7c-5p	1177	3128	3048	8320	3554	4603	5350	
mmu-let-7e-5p	1101	2926	1899	5184	3316	4294	4135	
mmu-let-7f-5p	14146	37596	23945	65363	47517	61537	54832	
mmu-let-7g-5p	1995	5302	4288	11705	6770	8767	8592	
mmu-let-7i-5p	1204	3200	1980	5405	3717	4814	4473	
mmu-let-7j	3009	7997	4934	13468	9505	12309	11258	
mmu-miR-133a-3p	400	1063	53	145	272	352	520	n.d.
mmu-miR-140-3p	2269	6030	3595	9813	5351	6930	7591	
mmu-miR-143-3p	8930	23733	10081	27518	16782	21734	24328	
mmu-miR-148b-3p	652	1733	1247	3404	2266	2935	2690	
mmu-miR-151-3p	1695	4505	1380	3767	4678	6058	4777	
mmu-miR-181c-5p	755	2007	781	2132	2423	3138	2425	
mmu-miR-183-5p	2136	5677	661	1804	3648	4724	4068	
mmu-miR-186-5p	3752	9972	1906	5203	8008	10371	8515	
mmu-miR-196a-5p	528	1403	639	1744	1314	1702	1616	
mmu-miR-199a-3p	1894	5034	2048	5590	5498	7120	5915	
mmu-miR-199b-3p	1916	5092	2174	5934	5414	7011	6013	
mmu-miR-1a-3p	0	0	0	0	0	0	0	n.d.
mmu-miR-206-3p	56	149	28	76	68	88	104	n.d.
mmu-miR-21a-5p	113254	300993	144497	394435	458496	593776	429734	
mmu-miR-221-3p	3940	10471	6073	16578	13402	17356	14802	
mmu-miR-222-3p	843	2240	1856	5066	2884	3735	3681	
mmu-miR-22-3p	8411	22354	8768	23934	22471	29101	25130	
mmu-miR-23a-3p	746	1983	689	1881	1728	2238	2034	
mmu-miR-24-3p	709	1884	520	1419	1807	2340	1881	
mmu-miR-25-3p	1997	5307	3066	8369	5830	7550	7076	
mmu-miR-26a-5p	994	2642	816	2227	2348	3041	2637	
mmu-miR-27a-3p	1769	4701	1083	2956	3934	5095	4251	
mmu-miR-27b-3p	4114	10934	3430	9363	8281	10724	10340	
mmu-miR-28a-3p	850	2259	1619	4419	2562	3318	3332	
mmu-miR-29a-3p	1328	3529	606	1654	2351	3045	2743	
mmu-miR-30a-3p	555	1475	975	2661	1904	2466	2201	
mmu-miR-30a-5p	5111	13583	6358	17355	15926	20625	17188	
mmu-miR-30d-5p	1848	4911	3176	8670	5913	7658	7080	
mmu-miR-30e-5p	946	2514	594	1621	1792	2321	2152	
mmu-miR-3107-5p	1290	3428	807	2203	1723	2231	2621	
mmu-miR-31-5p	1609	4276	2110	5760	4994	6467	5501	
mmu-miR-345-3p	1148	3051	780	2129	2193	2840	2673	
mmu-miR-34c-5p	502	1334	490	1338	1260	1632	1434	
mmu-miR-378a-3p	5508	14638	4461	12177	12095	15664	14160	
mmu-miR-378d	1073	2852	1004	2741	2682	3473	3022	
mmu-miR-486-5p	1282	3407	788	2151	1773	2296	2618	
mmu-miR-532-5p	921	2448	1083	2956	1932	2502	2635	
mmu-miR-6238	664	1765	2520	6879	1899	2459	3701	
mmu-miR-6239	1848	4911	3495	9540	3369	4363	6272	
mmu-miR-6240	807	2145	930	2539	2167	2806	2497	
mmu-miR-6241	12435	33048	10670	29126	9591	12421	24865	
mmu-miR-6244	25628	68111	21975	59985	20169	26120	51405	
mmu-miR-7680-3p	1112	2955	583	1591	1695	2195	2247	
mmu-miR-7680-5p	992	2636	533	1455	1599	2071	2054	
mmu-miR-92a-3p	14100	37473	19073	52064	42871	55520	48352	
mmu-miR-98-5p	860	2286	1027	2803	2533	3280	2790	
mmu-miR-99b-5p	3153	8380	1716	4684	5598	7250	6771	

Tabelle 8-1: Primärdaten des RNA-Seq aus der Gesamt-RNA

Aufgelistet sind die miRNAs, die im mittels *RNA seq* in undifferenzierten und differenzierten C2C12 identifiziert wurden. Dargestellt sind jeweils die Rohwerte (Input) und die normalisierten Werte als CPM der miRNAs. Input 1, 2 und 3 spiegeln dabei jeweils die drei biologischen Replikate wieder, aus denen ein Mittelwert errechnet wurde. Die miRNAs, welche entsprechend den Kriterien aus 4.3.1 gefiltert wurden, sind grau hinterlegt. In undifferenzierten Zellen haben die Rohwerte von miR-1a-3p, miR-133a-3p und miR-206-3p den Schwellenwert von 500 nicht erreicht und werden deshalb als nicht detektierbar (n.d.) definiert.

Fortsetzung

Tabelle 8-1

Gesamt-RNA C2C12 differenziert (Tag 7)							
miRNA	Input 1	Input 1 normalisiert [CPM]	Input 2	Input 2 normalisiert [CPM]	Input 3	Input 3 normalisiert [CPM]	Mittelwert normalisiert [CPM]
mmu-let-7a-5p	951	2356	1228	3063	890	2954	2791
mmu-let-7c-5p	1387	3436	1440	3592	1071	3555	3527
mmu-let-7e-5p	891	2207	1087	2711	753	2499	2473
mmu-let-7f-5p	11792	29209	14608	36434	10535	34970	33538
mmu-let-7g-5p	2495	6180	2318	5781	1856	6161	6041
mmu-let-7j	2278	5643	2863	7141	1244	4129	5638
mmu-miR-128-3p	976	2418	1236	3083	1167	3874	3125
mmu-miR-133a-3p	16601	41121	23103	57622	22322	74095	57613
mmu-miR-133b-3p	5337	13220	9267	23113	9569	31763	22699
mmu-miR-140-3p	1524	3775	1672	4170	757	2513	3486
mmu-miR-143-3p	26608	65908	28080	70035	10731	35620	57188
mmu-miR-151-3p	1427	3535	1628	4060	801	2659	3418
mmu-miR-181a-5p	3308	8194	3023	7540	2087	6928	7554
mmu-miR-181c-5p	1186	2938	1218	3038	1030	3419	3132
mmu-miR-186-5p	1391	3445	1708	4260	928	3080	3595
mmu-miR-199a-3p	3104	7689	3570	8904	2057	6828	7807
mmu-miR-199b-3p	3174	7862	3485	8692	2070	6871	7808
mmu-miR-1a-3p	3864	9571	3431	8557	3564	11830	9986
mmu-miR-206-3p	597	1479	747	1863	649	2154	1832
mmu-miR-21a-5p	73596	182297	75527	188374	48195	159978	176883
mmu-miR-221-3p	1790	4434	2114	5273	973	3230	4312
mmu-miR-22-3p	32256	79898	32778	81753	20985	69657	77103
mmu-miR-23a-3p	901	2232	1015	2532	832	2762	2508
mmu-miR-24-3p	1828	4528	1359	3390	1426	4733	4217
mmu-miR-25-3p	1835	4545	1677	4183	957	3177	3968
mmu-miR-26a-5p	3838	9507	3739	9326	3114	10337	9723
mmu-miR-27a-3p	1298	3215	1234	3078	1001	3323	3205
mmu-miR-27b-3p	10752	26633	10400	25939	7816	25944	26172
mmu-miR-29a-3p	1287	3188	1460	3641	913	3031	3287
mmu-miR-30a-5p	14090	34901	14299	35664	7911	26260	32275
mmu-miR-30d-5p	7061	17490	6951	17337	5436	18044	17624
mmu-miR-30e-5p	1200	2972	1240	3093	922	3060	3042
mmu-miR-3107-5p	12019	29771	12353	30810	8407	27906	29496
mmu-miR-31-5p	743	1840	638	1591	543	1802	1745
mmu-miR-34c-5p	661	1637	696	1736	372	1235	1536
mmu-miR-362-3p	3523	8726	5410	13493	4878	16192	12804
mmu-miR-378a-3p	25822	63961	28682	71537	20086	66673	67390
mmu-miR-378d	3860	9561	4313	10757	2741	9098	9806
mmu-miR-486-5p	11763	29137	12489	31149	8406	27903	29396
mmu-miR-532-5p	1936	4795	1903	4746	1163	3860	4467
mmu-miR-542-3p	1030	2551	1353	3375	919	3051	2992
mmu-miR-6237	541	1340	908	2265	549	1822	1809
mmu-miR-6238	2844	7045	3033	7565	1766	5862	6824
mmu-miR-6239	3963	9816	5067	12638	3249	10785	11080
mmu-miR-6240	3554	8803	4436	11064	3607	11973	10613
mmu-miR-6241	20690	51249	31305	78079	22608	75045	68124
mmu-miR-6244	30047	74426	48056	119858	34753	115358	103214
mmu-miR-7680-3p	592	1466	1603	3998	1066	3538	3001
mmu-miR-7680-5p	589	1459	1537	3833	1049	3482	2925
mmu-miR-92a-3p	4003	9915	4077	10169	1821	6045	8710
mmu-miR-98-5p	546	1352	679	1694	544	1806	1617
mmu-miR-99b-5p	2307	5714	1994	4973	1244	4129	4939

miTRAP-Verhältnis: miTRAP(MRTF-A)/Input C2C12 undifferenziert (Tag 0)													
miTRAP 1 (MRTF-A)	miTRAP 1 normalisiert [CPM]	Input 1 normalisiert [CPM]	miTRAP-Verhältnis 1	miTRAP 2 (MRTF-A)	miTRAP 2 normalisiert [CPM]	Input 2 normalisiert [CPM]	miTRAP-Verhältnis 2	miTRAP 3 (MRTF-A)	miTRAP 3 normalisiert [CPM]	Input 3 normalisiert [CPM]	miTRAP-Verhältnis 3	miTRAP-Verhältnis Mittelwert	Bemerkung
mmu-let-7c-5p	2708	19052	1177	6,49	38038	3048	5,21	2397	19149	3554	4,75	5,48	
mmu-let-7f-5p	10269	72246	14146	2,05	140107	23945	2,44	5376	42946	47517	0,80	1,76	
mmu-let-7g-5p	2156	15168	1995	3,05	4228	4288	2,28	1583	12646	6770	1,65	2,32	
mmu-let-7j	1450	10201	3009	1,36	5276	29191	2,47	1518	12127	9505	1,12	1,65	
mmu-miR-133a-3p	0	0	400	-	0	53	-	5	39,94	272	0,13	-	n.d.
mmu-miR-133a-5p	1656	11651	2136	2,19	4156	22994	14,53	3118	24908	3648	6,02	7,58	
mmu-miR-1a-3p	6	42,21	0	-	2	11,07	-	2	15,98	0	-	-	n.d.
mmu-miR-206-3p	112	787,96	56	5,64	52	287,71	4,29	28	223,68	68	2,90	4,28	
mmu-miR-24-3p	728	5121,74	709	2,90	887	4907,59	3,94	512	4090,13	1807	2	2,94	
mmu-miR-31-5p	56563	397941	1609	99,19	234808	1298038	256,91	86754	693037	4994	122,36	159,49	
mmu-miR-34c-5p	8503	59822	502	47,79	21716	120150	102,40	12722	101630	1260	71,12	73,77	
mmu-miR-378a-3p	481	3384,01	5508	0,25	641	3546,52	0,33	269	2148,91	12095	0,16	0,25	n.d.
mmu-miR-378d	81	569,86	1073	0,21	114	630,74	0,26	51	407,42	2682	0,13	0,20	n.d.
mmu-miR-486-5p	329	2314,63	1282	0,72	275	1521,52	0,81	123	982,59	1773	0,49	0,67	n.d.

miTRAP-Verhältnis: miTRAP(MRTF-A)/Input C2C12 differenziert (Tag 7)													
miTRAP 1 (MRTF-A)	miTRAP 1 normalisiert [CPM]	Input 1 normalisiert [CPM]	miTRAP-Verhältnis 1	miTRAP 2 (MRTF-A)	miTRAP 2 normalisiert [CPM]	Input 2 normalisiert [CPM]	miTRAP-Verhältnis 2	miTRAP 3 (MRTF-A)	miTRAP 3 normalisiert [CPM]	Input 3 normalisiert [CPM]	miTRAP-Verhältnis 3	miTRAP-Verhältnis Mittelwert	Bemerkung
mmu-let-7a-5p	8118	26068	951	15,79	11752	31832	16,97	6947	35271	890	18,67	17,14	
mmu-let-7c-5p	10645	34183	1387	14,20	14861	40253	18,30	8825	44805	1071	19,70	17,40	
mmu-let-7e-5p	3173	10189	891	6,59	4585	12365	7,45	2220	11271	753	7,05	7,03	
mmu-let-7f-5p	30943	99363	11792	4,85	46404	125692	5,63	29912	151866	10535	6,79	5,76	
mmu-let-7g-5p	10396	33383	2495	7,71	15661	42420	11,98	10170	51634	1856	13,10	10,93	
mmu-let-7j	5841	18756	2278	4,74	7937	21498	4,92	3146	15973	1244	6,05	5,24	
mmu-miR-133a-3p	2643	8487	16601	0,29	3754	10168	0,29	3562	18085	22322	0,38	0,32	
mmu-miR-1a-3p	127246	408608,60	3864	60,92	183755	497725,60	94,96	104438	530241,72	3564	70,07	75,32	
mmu-miR-206-3p	4161	13362	597	12,89	5866	15889	13,92	3802	19303	1378	14,01	13,61	
mmu-miR-24-3p	3212	10314	1828	3,25	4267	11558	5,57	3236	16429	1426	5,43	4,75	
mmu-miR-31-5p	41640	133713	743	103,68	56044	151803	155,76	24511	124445	543	107,94	122,46	
mmu-miR-3107-5p	8520	27359	12019	1,31	10523	28503	1,51	7031	35697	8407	2,00	1,61	
mmu-miR-34c-5p	30244	97119	661	84,64	41853	113365	106,63	16046	81467	372	103,15	98,14	
mmu-miR-378a-3p	12426	39902	25822	0,89	14247	38590	0,88	10869	55183	20086	1,29	1,02	
mmu-miR-378d	1150	3693	3860	0,55	1465	3968	0,60	1261	6402	5820	1,10	0,75	
mmu-miR-486-5p	8581	27555	11763	1,35	10506	28457	1,49	6933	35200	8406	1,97	1,60	

Tabelle 8-2: Primärdaten des RNA-Seq aus dem miTRAP. Aufgelistet sind die Expressionswerte der miRNAs in der Gesamt-RNA (Input) und im miTRAP-Experiment mit MRTF-A 3'UTR (miTRAP), die im miTRAP identifiziert wurden. Dargestellt sind jeweils die Rohwerte und die normalisierten Werte als CPM für undifferenzierte und differenzierte C2C12-Zellen. Input 1, 2 und 3, sowie die dazu gehörigen miTRAP-Experimente spiegeln jeweils die drei biologischen Replikate wieder. Die miTRAP-Verhältnisse wurden für jedes Replikat berechnet und am Schluss ein Mittelwert bestimmt. miRNAs, dessen Rohwerte im miTRAP-Experiment den Schwellenwert von 1000 nicht erreicht haben, werden als nicht detektierbar (n.d.) definiert. Die miRNAs, welche entsprechend den Kriterien aus 4.3.1 gefiltert wurden, sind grau hinterlegt.

Spezifität: miTRAP(MRTF-A)/Kontrolle(MS2) C2C12 undifferenziert (Tag 0)														
miRNA	miTRAP 1 (MRTF-A)	miTRAP 1 normalisiert [CPM]	Kontrolle 1 (MS2)	Kontrolle 1 normalisiert [CPM]	miTRAP 2 (MRTF-A)	miTRAP 2 normalisiert [CPM]	Kontrolle 2 (MS2)	Kontrolle 2 normalisiert [CPM]	miTRAP 3 (MRTF-A)	miTRAP 3 normalisiert [CPM]	Kontrolle 3 (MS2)	Kontrolle 3 normalisiert [CPM]	Spezifität Mittelwert	Bemerkung
mmu-miR-1a-3p	6	83,23	2	56,89	2	13,44	0	0,00	2	26,63	0	0,00	2,17	n.d.
mmu-miR-24-3p	728	10098,54	4	113,78	887	5958,59	36	490,00	512	6817,33	22	432,53	22,07	n.d.
mmu-miR-133a-3p	0	0,00	0	0,00	0	0,00	2	27,22	5	66,58	3	58,98	0,77	n.d.
mmu-miR-206-3p	112	1553,62	0	0,00	52	349,32	0	0,00	28	372,82	1	19,66	115,75	n.d.
mmu-miR-378a-3p	481	6672,25	35	995,56	641	4306,04	60	816,66	269	3581,76	58	1140,31	4,93	n.d.
mmu-miR-378d	81	1123,60	9	256,00	114	765,82	11	149,72	51	679,07	5	98,30	5,10	n.d.
mmu-miR-486-5p	329	4563,76	20	568,89	275	1847,36	32	435,55	123	1637,76	30	589,81	5,05	n.d.

Spezifität: miTRAP(MRTF-A)/Kontrolle(MS2) C2C12 differenziert (Tag 7)													
miRNA	miTRAP 1 (MRTF-A)	miTRAP 1 normalisiert [CPM]	Kontrolle 1 (MS2)	Kontrolle 1 normalisiert [CPM]	miTRAP 2 (MRTF-A)	miTRAP 2 normalisiert [CPM]	Kontrolle 2 (MS2)	Kontrolle 2 normalisiert [CPM]	miTRAP 3 (MRTF-A)	miTRAP 3 normalisiert [CPM]	Kontrolle 3 (MS2)	Kontrolle 3 normalisiert [CPM]	Spezifität Mittelwert
mmu-miR-1a-3p	127246	746086,99	148	5303,76	183755	532111,96	202	6027,84	104438	428427,19	201	4747,26	106,14
mmu-miR-24-3p	3212	18833,06	11	394,20	4267	12356,24	16	477,45	3236	13274,77	20	472,36	33,08
mmu-miR-133a-3p	2643	15496,82	36	1290,10	3754	10870,72	57	1700,92	3562	14612,09	105	2479,91	7,49
mmu-miR-206-3p	4161	24397,37	9	322,53	5866	16986,58	8	238,73	3802	15596,62	9	212,56	73,64
mmu-miR-378a-3p	12426	72857,90	125	4479,52	14247	41256,02	125	3730,10	10869	44586,98	306	7227,17	10,28
mmu-miR-378d	1150	6742,84	16	573,38	1465	4242,30	23	686,34	1261	5172,89	28	661,31	8,41
mmu-miR-486-5p	8581	50313,35	159	5697,95	10506	30422,94	206	6147,20	6933	28440,66	334	7888,48	5,53

Tabelle 8-3: Primärdaten des RNA-Seq aus dem miTRAP

Aufgelistet sind die Expressionswerte der miRNAs im miTRAP-Experiment mit MRTF-A 3'UTR (miTRAP) und mit MS2-Loop-Sequenz (Kontrolle), die im miTRAP identifiziert wurden. Dargestellt sind jeweils die Rohwerte und die normalisierten Werte als CPM für differenzierte und undifferenzierte C2C12-Zellen. miTRAP 1, 2 und 3, sowie die dazu gehörigen Kontrolle spiegeln dabei jeweils die drei biologischen Replikate wieder. Die Werte der jeweiligen Replikate wurde gemittelt und am Schluss die Spezifität aus den Mittelwerten berechnet. In undifferenzierten Zellen haben die Rohwerte der miRNAs im miTRAP-Experiment den Schwellenwert von 1000 nicht erreicht und werden deshalb als nicht detektierbar (n.d.) definiert.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

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

Halle (Saale), April 2016

Falk Pohl

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Pohl, Falk
 Geburtsdatum: 08.03.1988
 Geburtsort: Halle/Saale
 Nationalität: Deutsch
 Anschrift (privat): Wegscheiderstraße 27, 06110 Halle/Saale

Ausbildung

09/1994 - 07/1996 Deutsche Schule Bandung, Indonesien
 07/1996 - 08/1997 Grundschule Bertolt Brecht, Halle
 08/1997 - 08/2000 Sekundarschule Salzmünde
 08/2000 - 08/2002 Burg-Gymnasium Wettin
 08/2002 - 08/2004 Deutsche Schule San Salvador, El Salvador
 08/2004 - 07/2007 Burg-Gymnasium Wettin
 07/2007 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Abitur

 10/2007 - 08/2010 Biochemie-Studium (*B.Sc.*) an der MLU, Halle
 10/2009 - 02/2010 Studentische Hilfskraft bei AG Reuter, MLU, Halle
 03/2010 - 06/2010 Bachelor-Arbeit bei AG Reuter, MLU, Halle
Thema: Genetische und molekularbiologische Analyse der dSETDB1-Mutante egg¹⁴⁷³ in *D. melanogaster*
 08/2010 Abschluss: Bachelor of Science

 10/2010 - 06/2012 Biochemie-Studium (*M.Sc.*) an der MLU, Halle
Wahlmodule:

- Tumor- und Stammzellbiologie
- Nukleinsäurebiochemie, Zellbiochemie und Virologie
- Strukturbiologie und Bioinformatik
- Proteintechnologie und Biotechnologie

 10/2011 - 05/2012 Master-Arbeit bei PD Dr. Staeger, LZG, Halle
Thema: Untersuchungen zur Beteiligung des Transkriptionsfaktors ONECUT2 an der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms
 06/2012 Abschluss: Master of Science

 09/2012 - heute Promotionsarbeit in Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Guido Posern, Institut für Physiologische Chemie, Halle
Thema: Posttranscriptionale Regulation von MRTF-A während der Muskeldifferenzierung
Promotionsstudent des Graduiertenkolleg (GRK) 1591

Halle/Saale, April 2016

Falk Pohl

Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Guido Posern für die Möglichkeit bedanken an diesem interessanten Thema in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten, für die Ratschläge und hilfreichen Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt Juliane Braun aus der AG Hüttelmaier für ihre tatkräftige Hilfe bei der Durchführung und Auswertung des miTRAP sowie vielseitige Ideen für weitere Experimente. In diesem Zusammenhang will ich mich bei Dr. Knut Krohn für die Durchführung des *RNA-Seq* bedanken.

Darüber hinaus will ich mich bei meinen Kollegen Astrid Veß, Franziska Schikora, Julia Weisbach, Sara Werner, Jens Wulfänger, Anurag Singh, Herbert Neuhaus, Anja Weber und Anja Seifert bedanken. Die zahlreichen Hinweise, vielseitigen Diskussionen und großzügige Unterstützung haben schnell über so manchen frustrierenden Moment hinweg geholfen, die Eis-ess-Pausen mit eingeschlossen.

Des Weiteren will ich mich bei dem GRK1591 für die zahlreichen Vorträge und Diskussionen bedanken, die mir geholfen haben das Ziel des Projekts nicht aus den Augen zu verlieren.

Der wichtigste Dank gilt allerdings meiner Familie. Meiner Frau, die jegliche Höhen und Tiefen während dieser Zeit mit ganz viel Geduld und Einfühlvermögen ertragen und mich immer wieder aufs Neue motiviert hat. Meiner Schwester und Ihrer Familie, die immer wieder für Abwechslung im Alltag gesorgt haben. Meinen Eltern und Großeltern, welche mir nicht nur das Studium und damit die Promotion ermöglicht haben, sondern mir in jeder Lebenslage mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Leider war es nicht allen meinen Verwandten vergönnt meinen Abschluss dieses Lebensabschnitts mizuerleben. Aus diesem Grund widme ich diese Arbeit Edith Lindhorst, Elfriede Plattner, Gerhard Pohl und Martin Raschdorf. Waren es nicht zuletzt auch ihre Lebenswege, die mir zeigten, wieviel man mit Mut, Engagement und Fleiß im Leben erreichen kann. Für ihren bedingungslosen Beistand, der mir geholfen hat auch meinen Weg im Leben zu gehen, bin ich ihnen für immer zu tiefst verbunden.