

Overexpressed microRNA-198 is secreted via exosomes from hepatoma cells

Inaugural Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. nat. med.
der Medizinischen Fakultät
und
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Xiaojie Yu
aus Hubei, China

Köln, 2017

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most malignant tumours worldwide, leading to the death of nearly seven million people each year. HCC develops mainly from chronic liver diseases. miR-198 is the most downregulated microRNA in HCC. Previous studies have shown that transient transfection of chemically synthesised miR-198 mimics leads to inhibition of hepatoma cell growth, proliferation and migration.

In this study, I have established a Tet-on doxycycline inducible miR-198 expression system in hepatoma cells. Doxycycline treatment greatly induced the upregulation of intracellular miR-198 within the first eight hours, followed by an immense decrease within the next 40 hours. In parallel, miR-198 was massively enriched in the supernatant of the hepatoma cells. Furthermore, the exosomal vesicular fraction from supernatants was purified and characterized by the exosomal markers HSP70 and CD63. This vesicular fraction was highly enriched with miR-198. Negative staining and electron microscopy demonstrated that the fraction contained vesicles of the size of exosomes and autophagosomes.

Importantly, in response to miR-198 overexpression, the synthesis of the autophagy marker LC3 was upregulated and the scaffold protein p62/SQSTM1, which is involved in autophagosomal loading, was found in the vesicular exosomal fraction. The inhibition of autophagy by the autophagy inhibitors chloroquine and bafilomycin A1 led to a strong increase of intracellular miR-198 levels. In addition, autophagy and miR-198 secretion were inhibited by RNA interference using siRNA against the autophagy mediator ATG7, acting as an ubiquitin E1 ligase. Furthermore, I identified large amounts of proteins which were related to the ubiquitin machinery and sequestered in the exosomal vesicle fraction. Therefore, I studied the link between miR-198 secretion and ubiquitination. Ubiquitin immunoprecipitation proved that miR-198 was strongly associated with ubiquitin in the cells as well as in the exosomal vesicular fraction. Hence, involvement of ubiquitin in autophagosomal secretion of miR-198 was suggested. Indeed, transgenic ubiquitin overexpression leads to enhanced miR-198 secretion, whereas inhibition of the ubiquitin proteasome pathway leads to a strong accumulation of intracellular miR-198 levels.

In conclusion, miR-198 expression levels are tightly controlled in hepatocellular carcinoma cells. Its overexpression leads to autophagy activation, directing miR-198

Abstract

release. This whole process is suggested to be mediated by the ubiquitin-proteasome pathway.

Zusammenfassung

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist eines der häufigsten malignen Tumore weltweit und führt jährlich zum Tod von etwa sieben Millionen Menschen. Das HCC entwickelt sich vor allem aus chronischen Lebererkrankungen. miR-198 ist die am stärksten herunterregulierte microRNA in HCC dar. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die transiente Transfektion chemisch synthetisierter miR-198 (mimics) zur Inhibierung des Hepatomzellwachstums, der Proliferation und Migration führt.

In der vorliegenden Studie wurde ein Tet-on Doxycyclin-induzierbares miR198 Expressionssystem in verschiedenen Hepatomzellen etabliert. Doxycyclin-Behandlung induzierte eine starke Hochregulierung der intrazellulären miR-198 innerhalb der ersten 8 Stunden, gefolgt von einem erheblichen Rückgang innerhalb der folgenden 40 Stunden. Gleichzeitig lag im Überstand der Hepatomzellen miR-198 massiv angereichert vor. Des Weiteren wurde die exosomale vesikuläre Fraktion aus den Überständen aufgereinigt und mithilfe der exosomalen Marker HSP70 und CD63 charakterisiert. Vor allem in dieser vesikulären Fraktion lag miR-198 stark angereichert vor. Mittels Negativfärbung und Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Vesikelfraktion Vesikel von der Größe von Exosomen und Autophagosomen enthielt.

Zudem war die Synthese der Autophagiemarker LC3 als Reaktion auf die miR-198 Überexpression hochreguliert und das Gerüstprotein p62/SQSTM1, das in die autophagosomale Beladung involviert ist, wurde in der vesikulären exosomalen Fraktion gefunden. Inhibierung der Autophagie durch die Autophagieinhibitoren Chloroquin und Bafilomycin A1 führte zu einem starken Anstieg der intrazellulären miR-198 Menge. Darüber hinaus konnten die Autophagie und miR-198-Sekretion durch RNA-Interferenz mithilfe von siRNA gegen den Autophagie-Mediator ATG7, der als Ubiquitin E1 Ligase wirkt, inhibiert werden. Des Weiteren wurden zahlreiche Proteine identifiziert, die im Zusammenhang mit der Ubiquitinmaschinerie stehen und in der exosomalen Vesikelfraktion abgesondert wurden. Aus diesem Grund wurde der Zusammenhang zwischen miR-198 Sekretion und Ubiquitinierung analysiert. Die Ubiquitin-Immünpräzipitation zeigte, dass miR-198 sowohl in den Zellen als auch in der exosomalen vesikulären Fraktion stark assoziiert mit Ubiquitin vorlag. Dies wird als Hinweis auf die Beteiligung von Ubiquitin an der autophagosomalen Sekretion von miR-198 gedeutet. In der Tat führt transgene Ubiquitin-Überexpression zu

Abstract

gesteigerter Sekretion von miR-198, während die Inhibierung des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges zu einer starken Anreicherung intrazellulärer miR-198 führt. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass miR-198 Expressionspiegel in hepatozellulären Karzinomzellen einer strengen Kontrolle unterliegen. und die erhöhte miR-198 Expression zur Aktivierung von Autophagie führt, welche die Freisetzung von miR-198 einleitet. Es wurden Hinweise gesammelt, dass der gesamte Prozess vom Ubiquitin-Proteasom-Signalweg abhängt.