Abstrakt der Doktorarbeit von Andrey A. Eremeev

„Funktionelle Analyse von Parvulin Protein Par14“

In der vorliegenden Arbeit sollten die Voraussetzungen für einen doppelten Knockout von Pin1 und Par14 innerhalb des DT40-Zellsystems geschaffen werden.

Zunächst wurde das Zielkonstrukt für den Par14-Locus in einer mehrstufigen Klonierung generiert. Dies schloss 7 kb der genomischen Par14-Sequenz ein sowie eine LoxPErkennungssequenz innerhalb von Intron 1-2 sowie eine zweite LoxP-Stelle und einem Neomycin-Selektionsmarker innerhalb der 3‘-Sequenz. Mit diesem Konstrukt wurden DT40-MerCreMer-Zellen transfiziert und auf Insertion des Konstrukts selektiert. Der erfolgreiche Austausch des ersten Alles wurde mittels Southern Blot nachgewiesen, der hierfür im Labor erstmalig etabliert wurde. Der Austausch des zweiten Allels war auch nach mehrmaligenWiederholungen nicht erfolgreich.

Das DT40-System mit stabil integrierter Cre-Rekombinase ermöglicht neben einem induzierbaren Knockout, das Ausschalten eines anderen Proteins (Doppel-Knockout). In der vorliegenden Arbeit konnte die genomische Sequenz des Pin1-Locus zwischen dem ersten und vierten Exon von Gallus gallus amplifiziert und sequenziert werden. Dies war nur nach methodischen Verbesserungen beim Amplifizieren und Klonieren von extrem GC-reichen Nukleotidsequenzen möglich. Somit liefert diese Arbeit die Voraussetzung für einen späteren Knockout des Pin1-Locus von Gallus gallus.

Im Laufe der Arbeiten für den genetischen Knockout von Par14 in DT40-Zellen zeigte eine Studie von einer Arbeitsgruppe aus Japan eine Möglichkeit, die Expression von Par14 mittels der Knockdown-Methode zu reduzieren (Fujiyama-Nakamura et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von Par14/17 mittels RNA-Interferenz durch die Verwendung von Stealth-siRNA-Konstrukten deutlich reduziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von Parvulin durch eine starke Änderung im Phänotyp sowohl beim Wachstum als auch im Zellzyklus-Profil begleitet wird. Als DNA-bindendes Protein könnte Par14 auch einen Einfluss auf das Transkriptom haben. Dieser Einfluss wurde durch Microarray-Hybridisierung nach einem siRNA-Knockdown untersucht. Hier zeigte Par14 keinen Effekt, der offensichtlich vergleichbar war mit den Microarrays von bekannten Transkriptionsfaktoren. Die Daten der Microarray-Analyse liefern jedoch Informationen für zukünftige Studien zu einer möglichen kompensatorischen Funktion von anderen Genen (z. B. für ribosomale Biogenese) bei Par14-Verlust.