

Funktionale Analyse von Parvulin-Protein Par14

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Andrey A. Eremeev
aus Ufa, Russland

August 2011

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB), Arbeitsgruppe Strukturelle und Medizinische Biochemie an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Bayer

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Rassow

3. Gutachter: ----

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. M. Kaiser

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Okt. 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Familie der Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen	1
1.2 Die Parvulin-Familie kleiner PPIasen	3
1.2.1 Pin1 – der mitotische Regulator innerhalb der Parvulin-Familie.....	3
1.2.2 Parvuline.....	5
1.3 Zielsetzung der Arbeit	8
2 Materialien und Methoden	9
2.1 MATERIALIEN	9
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	9
2.1.2 Instrumente.....	9
2.1.3 Lösungen, Puffer und Medien	11
2.1.4 Kits	11
2.1.5 Klonierungs-/Ausgangs- Vektoren	11
2.1.6 Antibiotikum-Konzentrationen.....	12
2.1.7 Oligonukleotide.....	12
2.1.8 Bakterienstämme	13
2.1.9 Zelllinien	14
2.1.10 siRNAs	14
2.1.11 Software.....	14
2.1.12 Online Datenbanken; DNA- und Protein-Analyse Tools	14
2.2 METHODEN	15
2.2.1. DNA und RNA	15
2.2.1.1 DNA-Isolierung aus DT40-Zellen	15
2.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	15

2.2.1.3 DNA-Restriktion	17
2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	17
2.2.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	18
2.2.1.6 Klenow-Füllen klebriger Enden mit der DNA-Polymerase I.....	18
2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten	19
2.2.1.8 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	19
2.2.1.9 Zielgerichtete Mutagenese	19
2.2.1.10 Sequenzanalyse	20
2.2.1.11 RNA-Isolierung	20
2.2.1.12 cDNA-Synthese.....	21
2.2.1.13 Quantitative RT-PCR.....	21
2.2.1.14 Microarray-Analyse	23
2.2.1.15 Southern Blot.....	23
2.2.2 Bakterienkultur.....	27
2.2.2.1 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	27
2.2.2.2 TOPO TA Klonierung.....	27
2.2.2.3 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	28
2.2.2.4 Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen	29
2.2.3 Zellkultur.....	29
2.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	29
2.2.3.2 Zellzählung der DT40-Zellen.....	30
2.2.3.3 Zellzählung und Wachstums-Messungen der HeLa-Zellen	30
2.2.3.4 Transfektion von DT40-Zellen durch Elektroporation.....	31
2.2.3.5 Selektion der DT40-Zellen auf Antibiotikum-Resistenz.....	31
2.2.3.6 Induzierte Gendeletion mittels des Cre/loxP-Systems	32
2.2.3.7 Transfektion von HeLa-Zellen mit Lipofectamine 2000.....	33
2.2.3.8 Titration der siRNA-Konstrukte.....	33
2.2.3.9. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	34

2.2.3.10 Zellzyklusanalyse mit 7-AAD.....	35
2.2.3.11. Proliferations-Assay mit FITC-BrdU	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Klonierung eines Konstrukts für den Par14-Knockout in DT40-Zellen.....	38
3.1.1 Par14-Locus im Hühner-Genom	38
3.1.2 Klonierung des Par14-Knockout-Konstrukts	40
3.1.2.1 Klonierung des 5'- Bereiches des Konstrukts (PCR-Fragment A)	40
3.1.2.2 Klonierung des 3'-Bereiches des Konstrukts (PCR-Fragment B)	41
3.1.2.3 Klonierung von PCR-Fragment C.....	41
3.1.2.4 Ligation der Fragmente A und B	42
3.1.2.5 Insertion des Exon-haltigen Fragments C in das Ligationsplasmid A+B	43
3.1.2.6 Einfügen der Neomycin-Resistenz-Kassette.....	43
3.1.3 Austausch des ersten Allels von Par14 in DT40-Zelllinie.....	44
3.1.4 Expression von Flp-Rekombinase im positiven Klon 11	46
3.1.5 Austausch des zweiten Par14-Allels in DT40-Zellen	47
3.2. Amplifikation des nicht sequenzierten Pin1-Locus im Genom des Haushuhns <i>Gallus gallus</i>	48
3.2.1. Analyse der Datenbank-Einträge des Pin1-Locus in Metazoa	48
3.2.2. Amplifikation von extrem GC-reichen Sequenzen innerhalb des Pin1-Locus des Huhnes	51
3.2.2.1 PCR- Programm	51
3.2.2.2 Polymerasen	51
3.2.2.3 DNA- Template	52
3.2.2.4 Dimethylsulfoxid-Ansatz	53
3.2.2.5 Magnesium-Ansatz.....	53
3.2.3. Mapping des Pin1-Locus des Huhnes	54
3.3 siRNA-Knockdown von Par14/17 in HeLa-Zellen.....	57
3.3.1 Reduktion der mRNA von Parvulin 14/17 mittels RNA-Interferenz.....	58
3.3.2 Wachstums-Reduktion von HeLa-Zellen beim Knockdown von Parvulin	61

3.3.3 Microarray-Analyse von HeLa-Zellen nach dem Knockdown von Parvulin 14/17	61
3.3.4 Der Knockdown von Parvulin 14/17 verursacht Änderungen im Zellzyklus-Profil von HeLa-Zellen	63
4 Diskussion	67
4.1 Knockout von Par14 in DT40-Zellen.....	67
4.2. Amplifikation des Pin1-Locus von <i>Gallus gallus</i>	67
4.3 Die Reduktion der Expression von Parvulin 14 mittels Knockdown.....	68
4.3.1 Der Knockdown von Par14 führt zu Änderungen im Wachstum und Zellzyklus.....	69
4.3.2 Knockdown von Par14 und seine Auswirkungen auf das Transkriptom	70
4.3.3 Über den möglichen Einfluss von Off-Targets-Effekten der siRNAs.....	71
5 Zusammenfassung.....	76
6 Referenzen.....	77
6 Anhang	85
Danksagung.....	92
Lebenslauf.....	93
Publikationsliste und Konferenzen.....	96
Erklärungen	97

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro
4HT	4-Hydrotamoxifen
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Amp	Ampicillin
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BrdU	5-Brom-2-Deoxyuridin
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CsA	Cyclosporin A
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTD	C-terminale Domäne
CypA	Cyclophilin A
CypB	Cyclophilin B
CypD	Cyclophilin D
Cyps	Cyclophiline
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECACC	<i>European Cell Culture Collection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	European Patent
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKBP	FK506-bindende Proteine
g	Gramm
G-418	Geneticin
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase

HEK293	<i>Human Embryonic Kidney</i> Zelllinie
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid
hEPVH	<i>human eukaryotic parvulin homologue</i>
HIV	humanen Immundefizienz-Virus
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hsp70	Hitzeschock Protein 70
Hsp90	Hitzeschock Protein 90
<i>in vitro</i>	vom Lateinisch im Glas
<i>in vivo</i>	vom Lateinisch im Lebendigen
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>Luria-Bertani</i> (Medium)
loxP	<i>locus of crossover</i>
m	milli
M	molar
MEFs	Mouse Endothelial Fibroblasts, Zelllinie
min	Minute
miRNA	<i>micro</i> -Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/l)
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
n	nano
NIMA	<i>never in mitosis gene A</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Poly-Ethylen-Glykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen
prä-mRNA	<i>praecursor</i> „Vorläufer“ -mRNA
qRT-PCR	<i>quantitative real-time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference

rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
shRNA	<i>short</i> oder <i>smoll hairpin</i> RNA
SSC	sidewarts scatter
Std.	Stunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	<i>Unit</i>
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
wt	Wildtyp
ZMB	Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen
Δ	Delta

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Die PPIase-Familie, deren Mitglieder die Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerisierung katalysieren	1
Abb. 1.2 Modell der Interaktion Ess1 mit der C-Terminal-Domäne von RNA-Polymerase II (CTD)	4
Abb. 1.3 Wachstumsdiagramm von nicht synchronisierten (A) und synchronisierten (B) MEF-Zellen bei dem Pin1-Knockout	5
Abb. 1.4 Schema des menschlichen Par14-Gens mit dem alternativen Start-Codon von Par17 (A) und schematische Darstellung der Par14- und Par17-Proteine (B) mit N-terminaler und PPIase-Domäne	6
Abb. 1.5 Reduktion des Zellwachstums nach Knockdown von Par14 in HEK293-Zellen (A) und Western Blot mit β -Tubulin als Kontrolle (B)	8
Abb. 2.1 Die verwendeten DNA-Marker	18
Abb. 2.2 Die Parameter von qRT-PCR	22
Abb. 2.3 Schema vom Blotting-Sandwich für den Elektrotransfer von DNA	25
Abb. 2.4 Das Prinzip der TOPO TA Klonierung	28
Abb. 2.5 Schema des Mechanismus von Cre/loxP-Systems in DT40-Zellen	32
Abb. 2.6 Merkmale der Lichtstreuung einer Zelle und die Darstellung deren bei FACSCalibur	34
Abb. 2.7 Fluoreszenzspektren von 7-AAD und BrdU-FITC	35
Abb. 2.8 Chemische Formel von Fluorophor 7-AAD	36
Abb. 2.9 Bestandteile des BrdU-Labeling Kits von BD Biosciences	37
Abb. 3.1 Par14-Locus von Gallus gallus	39
Abb. 3.2 Karten der Klonierungs-Plasmiden mit PCR-Fragment A und PCR-Fragment B	41
Abb. 3.3 Karte des Plasmids von BC 992 mit PCR-Fragment C	42
Abb. 3.4 Karte vom Ligationsplasmid A+B	42
Abb. 3.5 Insertion des Exon-haltigen Fragment C in das Ligationsplasmid A+B	43

Abb. 3.6 Einfügen der Neo-Kassette	44
Abb. 3.7 Die Klonierungsstrategie der DT40-Mutanten für den Knockout von Par14	45
Abb. 3.8 Die Ergebnisse von Southern Blot	46
Abb. 3.9 Sequenzvergleich zwischen den cDNAs von Pin1 aus <i>Gallus gallus</i> und <i>Homo sapiens</i>	50
Abb. 3.10 Vergleich der PCR-Effizienz von verschiedenen Polymerasen	52
Abb. 3.11 Wirkung des DNA-Templates auf die PCR-Effizienz	53
Abb. 3.12 Einfluss des Dimethylsulfoxid-Ansatzes (DMSO) auf die PCR-Effizienz	53
Abb. 3.13 Wirkung von Magnesium auf die PCR-Effizienz	54
Abb. 3.14 Die Amplifizierung des Pin1-Locus von Gallus gallus	54
Abb. 3.15 Vergleich der Struktur des Pin1-Locus in Metazoen	55
Abb. 3.16 Das Fragment der menschliche mRNA von Par14/17 (NM_006223) mit Start-Codons und Bindungsstellen von Stealth-siRNA-Konstrukten	58
Abb. 3.17 $\Delta\Delta C_t$ -Werte von qRT-PCR beim Knockdown von Par14/Par17 nach 24 und 72 Std	60
Abb. 3.18 Wachstumsdiagramm von transfizierten HeLa-Zellen nach dem Parvulin-Knockdown	61
Abb. 3.19 Die Daten der Microarray-Analyse von Parvulin-Knockdown nach 40 Std (Chip HG-U133 Plus 2.0)	62
Abb. 3.20 Beispiel-Diagramm einen FACS-Messungen mit BrdU- und 7-AAD-Färbung	64
Abb. 3.21 Diagrammen von HeLa-Zellen nach dem Parvulin-Knockdown in zwei Zeitpunkten (24 und 48 Std.) mit Proliferations-Kit	65
Abb. 3.22 Zell-Zyklus-Profil (mit 7-AAD Färbung) von HeLa-Zellen nach dem Parvulin-Knockdown in zwei Zeitpunkten (24 und 48 Std)	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Standard-PCR-Ansatz mit miTaq-Polymerase	16
Tabelle 2.2 Standard PCR-Programm	16
Tabelle 2.3 Das Reaktionsgemisch für ABsolute QPCR SYBR Green Mix	22
Tabelle 3.1 Die Anzahl der Sequenzeinträgen (ID-Gene) von Pin1 Locus im Vergleich mit Par14 und FKBP1A	48
Tabelle 3.2 Ct-Mittelwerte mit Standartabweichungen	59
Tabelle 3.3 Die Konzentration und Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA für die Microarray-Hybridisierung	62
Tabelle 3.4 Die Reduktion von Par14-Expression bei der Microarray-Hybridisierung (Chip HG-U133Plus_2.0)	63
Tabelle 4.1 Designvorschlag für siRNA-Konstrukte vom Programm BLOCK-iT RNAi Designer	72
Tabelle 4.2 Designvorschlag für siRNA-Konstrukte vom Programm AsiDesigner	73
Tabelle 4.3 Designvorschlag für siRNA-Konstrukte vom Programm siDirect Version 2.0	74
Tabelle 4.4 Die Regulierung der Gene, die eine Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz bei der BLAST-Suche mit dem si311-Konstrukt aufweisen	75
Tabelle 6.1 Ct-Werte und Schmelztemperaturen von qRT-PCR nach 24 und 72 Std. von Transfektion.	85
Tabelle 6.2 Die Ergebnisse von der GeneTail-Analyse	86
Tabelle 6.3 Die mögliche Interaktions-Partner von Par14 bei der Ribosomenbiogenese (von Fujiyama-Nakamura et al., 2009) mit Ratio Log von der Microarray.	89
Tabelle 6.4 Die Ergebnisse von BLAST-Vergleich der Nukleotidsequenz von siRNA-Konstrukten mit der Datenbank von menschlichen mRNAs	91

1 EINLEITUNG

1.1 Die Familie der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen

Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen, kurz PPIasen, bilden eine Gruppe von evolutionär hochkonservierten Proteinen, die die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolin-Amid-Bindungen katalysieren (Abb. 1.1). Sie spielen eine wichtige Rolle sowohl bei der Proteinfaltung neu synthetisierter Proteine, als auch bei der Veränderung der Konformation wichtiger zellulärer Substrate (Lu et al., 2006).

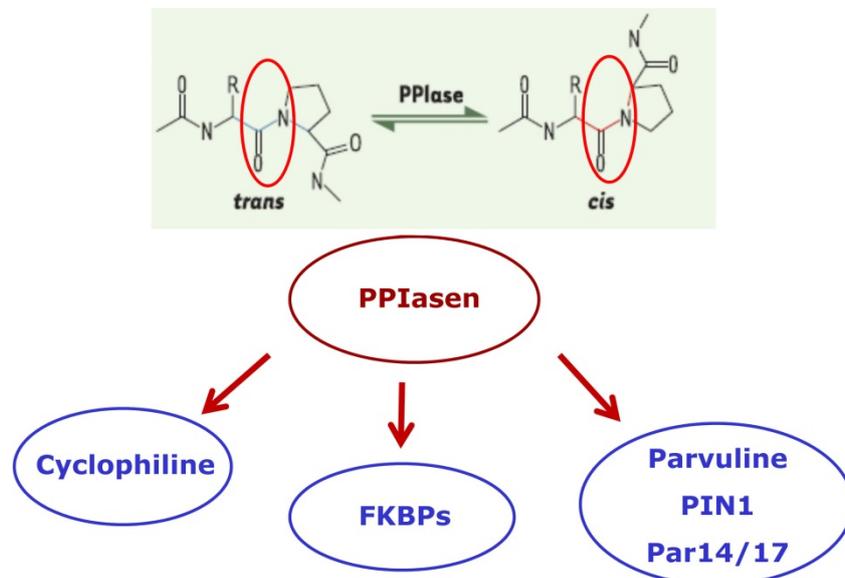


Abb. 1.1 Die PPIase-Familie, deren Mitglieder die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung katalysieren.
Proteine der PPIase-Familie katalysieren die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolin-Amid-Bindungen.
Diese Familie besteht aus drei Subfamilien: Cyclophiline, FK506-bindende Proteine (FKBP) und Parvuline

Die PPIasen umfassen drei Familien: Cyclophiline (Cyps), FK506-bindende Proteine (FKBP) und Parvuline (Rahfeld et al., 1994, Schmid, 1995, Shaw, 2007).

Cyclophiline (Cyps) sind eine Gruppe von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen, deren enzymatische Aktivität von Cyclosporin A (CsA) inhibiert wird (Giorgio et al., 2010). Cyps sind in allen Prokaryoten und Eukaryoten vorhanden. Im Menschen sind sechzehn verschiedenen Cyclophiline identifiziert worden (Galat, 2003). Auch in anderen Lebewesen sind Cyps zahlreich vorhanden, z. B. *Arabidopsis* hat bis zu neunundzwanzig (Waldmeier et al., 2003), *Sacchromyces* – acht (Arevalo-Rodriguez et al., 2004) und *Drosophila* – mindestens neun (Galat, 2003) Cyps.

Cyps haben ein breites Spektrum intrazellulärer Funktionen: Sie sind an der Proteinfaltung (CypA und CypB, Daum et al., 2009) und an der Aktivierung der Immunantwort durch

Interaktion mit dem Transmembran-Protein CD147 beteiligt (Yurchenko et al., 2002). Außerdem kann CypA unter Stressbedingungen (Hypoxie) die Kinasen ERK1/2, p38MAPK und SAPKs aktivieren und dadurch die Apoptose regulieren (Seko et al., 2004). Weiterhin spielt Cyclophilin A (CypA) eine wichtige Rolle beim Eintritt des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) in seine Wirtszellen (Luban et al., 1993, Colgan et al., 1996).

FK506-bindende Proteine (FKBP) bilden eine andere Gruppe von Proteinen, die Immunsuppressiva wie FK506 oder Rapamycin binden und die eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität zeigen.

Im Zytoplasma regulieren FKBP unterschiedliche Signal-Transduktionswege. Der FKBP/FK506-Komplex, so wie auch CypA/CsA, inhibiert die enzymatische Aktivität der Phosphatase Calcineurin. Dies führt zur Hemmung der Expression des IL-2-Gens und der Aktivierung von T-Lymphozyten (Ke und Huai, 2003). Andererseits kann der Rapamycin/FKBP12-Komplex statt mit Calcineurin mit dem Protein mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) interagieren. Da mTOR die T-Lymphozyten aktivieren kann, zeigt der Rapamycin/FKBP12-Komplex eine immunsuppressive Wirkung (Sharma et al., 1994, McMahon et al., 2011). Im Komplex mit den Hitzeschockproteinen Hsp90/Hsp70 sind FKBP außerdem bei der Modulation der Steroidhormon-Rezeptoren von z. B. Progesteron beteiligt (Davies et al., 2002, Wu et al., 2004, Davies und Sánchez, 2005).

Vor kurzem wurde von neuen nukleären Funktionen von FKBP berichtet. Fpr4, ein Vertreter von FKBP in *Saccharomyces cerevisiae*, bindet die N-terminale-Domäne von Histon H3 und isomerisiert dort das Prolin P38. Dies führt zur Methylierung von Lysin K36 (H3K36) und zur Induktion der Transkription einiger Gene (Nelson et al., 2006, Santos-Rosa et al., 2009). Darüber hinaus können FKBP auf die Transkription einwirken und die Histon-Chaperon-Aktivität (Hsp90) beeinflussen. Auch in Pflanzen spielen FKBP (als Beispiel AtFKBP53 von *Arabidopsis*) eine wichtige Rolle bei der Modifizierung der Chromatin-Struktur und Regulation der Histon-Chaperon-Aktivität (Li und Luan, 2010).

Dieser kurze Überblick über zwei Familien von PPIasen zeigt die Komplexität der zellulären Funktionen von Cyclophilinen und FKBP. Die beiden enzymatischen Gruppen sind jeweils hoch konserviert, was vermutlich den starken evolutionären Druck widerspiegelt. Die Komplexität der zellulären Funktionen und die hohe Homologie innerhalb der einzelnen Familie sind auch wichtig für die Betrachtung der dritten PPIase-Familie, der Parvuline.

1.2 Die Parvulin-Familie kleiner PPIasen

1.2.1 Pin1 – der mitotische Regulator innerhalb der Parvulin-Familie

Pin1 ist der bekannteste und meist erforschte Vertreter der Parvulin-PPIase-Familie, der die *cis/trans*-Isomerisierung von phosphorylierten Ser/Thr-Pro-Motiven katalysiert (Yaffe et al., 1997, Shen et al., 1998). Pin1 ist 18 kDa groß und besteht aus zwei funktionalen Domänen: einer WW-Domäne (39 Aminosäuren) für Protein-Protein-Interaktionen und einer carboxyterminalen PPIase-Domäne für die katalytische Aktivität (Lu et al., 1996, Zhou et al., 2000). Beide Domänen sind mit einem flexiblen Linker verbunden (Bayer et al., 2003).

Menschliches Pin1 wurde erstmalig 1996 als Interaktions-Partner des Proteins NIMA (*never in mitosis gene A*), einer mitotischen Kinase aus *Aspergillus nidulans*, beschrieben (Lu et al., 1996). Die Überexpression von NIMA induziert die Chromosomenkondensation und führt zum Zelltod. Die gleichzeitige Überexpression von Pin1 eliminiert diesen Effekt (Lu et al., 1996). Somit wurde die Funktion von Pin1 als negativer Regulator der Mitose gezeigt.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist nur ein einzelnes Parvulin, Ess1, vorhanden. Ess1 ist etwa 19,5 kDa groß und ist ein direkter Homolog von Pin1. Die Deletion von Ess1 führt zum Arrest der Hefe-Zellen in der Mitose bzw. zu einem Defekt bei der Zellseparation (Hanes et al., 1989).

Mutationen in der PPIase-Domäne, die zur Reduktion von Ess1 führten, zeigten einen deutlichen Phänotyp im vegetativen Wachstum, jedoch nur dann, wenn die Protein-Konzentration auf weniger als 0,2 % des normalen Niveaus gesunken war (Gemmill et al., 2005). Diese Beobachtung kann bei einem Knockdown entscheidend sein, da dabei eine sehr hohe Knockdown-Effizienz erforderlich sein könnte.

Innerhalb verschiedener Fungi-Spezies ist die Funktion von Ess1-Homologen nicht eindeutig beschrieben. Zum Beispiel führt die Reduktion der Aktivität von PinA, einem Pin1-Homologen in *Aspergillus nidulans*, oder von Ess1 in *Candida albicans* zu einer Reduktion des Zellwachstums (Devasahayam et al., 2002, Joseph et al., 2004). Andererseits zeigt die Deletion von Pin1p, einem Pin1-Homologen aus *Schizosaccharomyces pombe*, keinen Effekt auf Zellzyklus oder Wachstum, gleichzeitig wird aber die Empfindlichkeit der Zellen auf UV-Licht und auch auf die Konzentration von Cyclophilin-Inhibitor CsA erhöht (Huang et al., 2001).

Es ist unklar, warum hoch konservierte Pin1-Homologe unterschiedliche Effekte bei verschiedenen Fungi-Arten haben. Möglicherweise können andere hoch exprimierte PPIasen ihre Funktion übernehmen, so wie z. B. Cyclophilin A in Hefen die Funktion von Ess1

übernimmt (Fujimori et al., 2001). Unterschiede in der Funktionsweise können weiterhin auch dadurch erklärt werden, dass die Proteinstrukturen verschieden sind. So führt der strukturelle Unterschied von dem Linker zwischen WW- und Isomerase-Domäne bei den einzelnen Ess1 und Pin1 Proteinen zu starken Abweichungen der Funktion (Li et al., 2005).

Ess1 spielt eine Rolle bei der Modifizierung der Chromatin-Struktur (Arévalo-Rodríguez et al., 2000) sowie bei der Regulation der RNA-Polymerase II (Wu et al., 2000, Wu et al., 2003). Ess1 bindet an die phosphorylierte C-terminale Domäne von RNA-Polymerase II (CTD), isomerisiert diese und ermöglicht dadurch die Bindung anderer Proteine an die RNA-Polymerase II (CTD-BP) (siehe Abb. 1.2). Diese Proteine sind für die Initiation, die Elongation und die Terminierung der Transkription notwendig. Die Interaktion zwischen Ess1 und der CTD wird durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung mit Hilfe von CTD-Kinasen und CTD-Phosphatasen reguliert (Wu et al., 2000).

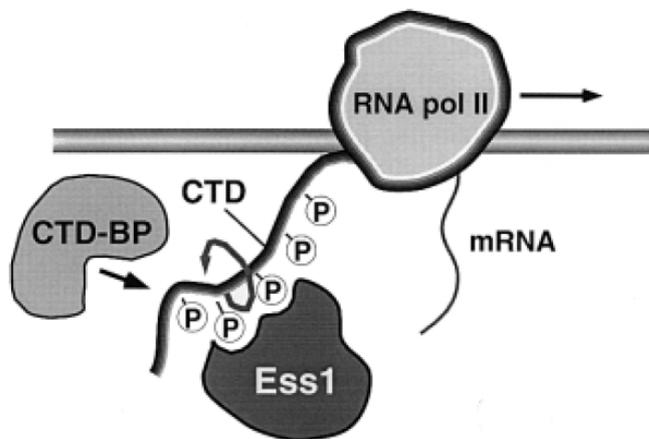


Abb. 1.2 Modell der Interaktion Ess1 mit der C-Terminal-Domäne von RNA-Polymerase II (CTD) (Wu et al., 2000).

Menschliches Pin1 zeigt ebenfalls einen Einfluss auf die C-terminale-Domäne von RNA-Polymerase II. Die Überexpression von Pin1 in HeLa-Zellen inhibiert die Transkription der prä-mRNA (vom lat. *praecursor* „Vorläufer“-mRNA) *in vivo*, und das prä-mRNA-Splicing *in vitro* (Xu et al., 2003, Palancade et al., 2004).

Pin1 spielt eine Rolle bei der Zell-Proliferation und reguliert den Ablauf der Mitose (Fujimori et al., 1999). Fujimori und Mitarbeiter beschrieben einen Knockout von Pin1 in MEF-Zellen (*mouse embryo fibroblasts*). Diese Zellen zeigten nur geringe Unterschiede im Wachstum zwischen Wildtyp- und Knockout-Pin1-Zellen (sowohl hetero- als auch homozygot). Wenn diese MEF-Zellen jedoch mittels Serum-Reduktion des Kulturmediums in der G₀-Phase synchronisiert wurden, konnten MEFs ohne Pin1 (Pin1^{-/-}) nicht weiter proliferieren und zeigten eine deutliche Reduktion im Wachstumsdiagramm (Abb. 1.3).

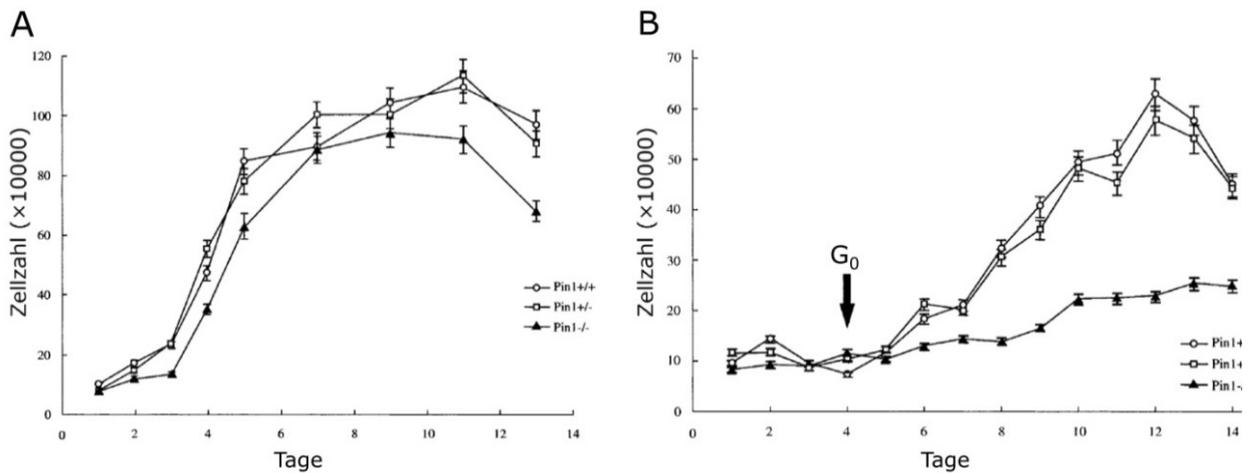


Abb. 1.3 Wachstumdiagramm von nicht synchronisierten (A) und synchronisierten (B) MEF-Zellen bei dem Pin1-Knockout (geändert nach Fujimori et al., 1999).

Der erste Pin1-Knockout in der Maus wurde 2002 beschrieben (Liou et al., 2002). Der Phänotyp von Pin1^{-/-} war nicht letal, jedoch hatten diese Mäuse eine bis zu 30 %ige Gewichtsreduktion im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem hatten die Männchen Störungen bei der Spermatogenese und waren unfruchtbar. In dieser Arbeit wurde postuliert, dass andere PPIasen die Funktion vom Pin1 übernehmen können. Dieser Punkt ist wichtig bei möglichen Knockout-Studien mit anderen Proteinen der Parvulin-Familie. Der Einfluss von Pin1 auf die Spermatogenese wurde auch in anderen Studien nachgewiesen (Atchison et al., 2003, Atchison et al., 2004).

Die *cis/trans*-Isomerisierung des phospho-Ser/Thr-Pro-Motivs durch Pin1 spielt nicht nur beim Zellzyklus eine kritische Rolle, sondern auch bei der Entwicklung der Alzheimer-Krankheit durch die Regulierung der Funktion des Tau Phospho-Proteins (Lu et al., 1999, Lu et al., 2003).

Zahlreiche Bindungspartner sind für Pin1 publiziert worden: Cyclin D (Liou et al., 2002), Cyclin E (Yeh et al., 2006), β -catenin (Ryo et al., 2001), JUN (Wulf et al., 2001), p53 (Zacchi et al., 2002) und viele andere. Dies zeigt das breite Spektrum von Prozessen, an denen Pin1 beteiligt ist oder beteiligt sein kann.

1.2.2 Parvuline

Der erste Vertreter von Parvulinen innerhalb der PPIase-Familie wurde aus *E. coli* isoliert (Rahfeld, Schierhorn et al., 1994). Dieses Protein zeigte Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität, hatte eine molekulare Masse von 10,1 kDa und war kleiner als alle bekannten Cyps und FKBP. Deshalb wurde dieses Enzym Parvulin 10 (Par10) von Latein *Parvulus* – „das kleinste“ genannt (Rahfeld, Rücknagel et al., 1994, Rudd et al., 1995). Im zellularen Extrakt

interagiert Par10 mit der Untereinheit C der Alkyl-hydroperoxide-reductase (AhpC) und spielt dadurch eine große Rolle beim Schutz der Zellen vor oxidativem Stress (Malesević et al., 2010).

Im systematischen Reich Pilze ist das Gen von Par14 (Analog von Par10) nur in der Ordnung Saccharomycotina vorhanden (Pemberton 2006). Alle anderen systematischen Gruppen von Pilzen besitzen nur ein Parvulin-Gen (Analog von Pin1).

In menschlichen Zellen wurde ein Par10-Analog erstmalig in HEK293-Zellen (*Human Embryonic Kidney*) gefunden. Es war 14 kDa groß und wurde zuerst hEPVH (*human eukaryotic parvulin homologue*) genannt (Rulten et al., 1999, Thorpe et al., 1999). Später erhielt es wegen seiner molekularen Masse von 14 kDa seinen gegenwärtigen Namen Par14.

Par14 enthält eine C-terminale PPIase-Domäne, die auf der Ebene der Aminosäure-Sequenz 34 % mit der PPIase-Domäne von Par10 und 39 % mit der PPIase-Domäne des menschlichen Pin1 identisch ist (Sekerina et al., 2000). Außerdem hat Par14 im Gegensatz zu Pin1 in der flexiblen N-terminalen Domäne einen Lysin-, Serin- und Glycin-reichen Bereich (Rahfeld, Rücknagel et al., 1994; Terada et al., 2001).

Das menschliche Par14-Gen befindet sich auf dem q-Teil des X-Chromosoms und besteht aus vier Exons und drei Introns (Abb. 1.4). Durch alternative Transkriptions-Initiation wird eine verlängerte mRNA abgeschrieben, die bei der Translation ein zu Par14 ähnliches Protein ergibt, das N-terminal 25 zusätzliche Aminosäuren aufweist. Dieses Protein wird als Parvulin 17 (Par17) bezeichnet (Mueller et al., 2006). Par17 ist ein Protein, das nur in den Genomen der großen Affen einschließlich des Menschen kodiert ist (Kessler et al., 2007).

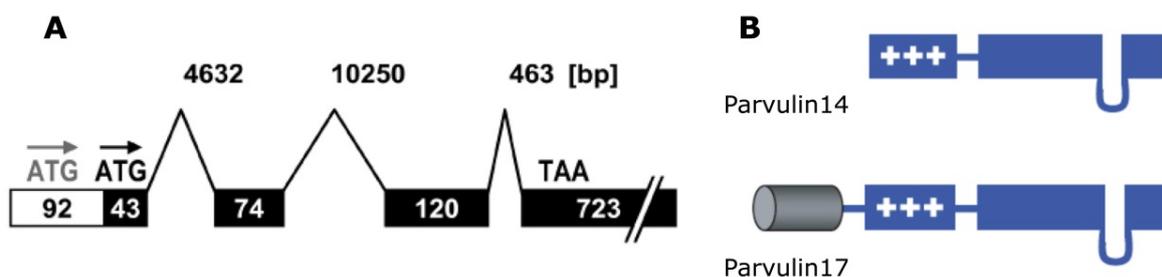


Abb. 1.4 Schema des menschlichen Par14-Gens mit dem alternativen Start-Codon von Par17 (A) und schematische Darstellung der Par14- und Par17-Proteine (B) mit N-terminaler, basischer Domäne (+++) und PPIase-Domäne. Die Schleife deutet eine Par14-spezifische Insertion von fünf Aminosäuren an. (A, nach Mueller et al., 2006, B, nach Mueller und Bayer, 2008).

Die Gruppe von John Kay beobachtete zunächst, dass Par14 gleichmäßig verteilt im Zellkern und im Zytoplasma vorliegt und in Mitochondrien angereichert ist (Rulten et al., 1999, Thorpe et al., 1999). Später wurde aber nachgewiesen, dass Par14 nur im Zellkern und im

Zytosol lokalisiert ist (Surmacz et al., 2002, Reimer et al., 2003, Kessler et al., 2007); bei der mitochondrialen Lokalisierung handelt es sich um den Par17 (Kessler et al., 2007).

Die Expression von Par14 wurde mit Hilfe von Northern Blots in zahlreichen Geweben nachgewiesen: sehr schwach in Gehirn und Lunge; normale Expression in Plazenta, Leber, Niere und Bauchspeicheldrüse; erhöhte Expression im Myokard und in Skelett-Gewebe (Rulten et al., 1999, Uchida et al., 1999).

Die mRNA von Par17 wurde mit Hilfe von qRT-PCR in Skelett-Muskulatur und Leber (etwa 0,5 % der Gesamt-RNA von Parvulinen) und in Gehirn und Epithelien (bis zu 1,5 % der Gesamt-RNA von Parvulinen) nachgewiesen (Mueller et al., 2006).

Der Knockdown des Par14-Analogen in *C. elegans* (ID-Gen Y48C3A.16) führt zu pathologischer postembryonaler Entwicklung und zum Tod (Rual et al., 2004, Sönnichsen et al., 2005, <http://www.wormbase.org>). Der genaue Mechanismus wurde dabei jedoch nicht beschrieben.

Für die mögliche Funktion von Par14 gibt es einige Hinweise aus *in vitro*-Experimenten. So zeigt Par14 eine hohe Affinität für doppelsträngige DNA und könnte dadurch eine Rolle bei der Chromatin-Organisation spielen (Surmacz et al., 2002, Reimer et al., 2003). Menschliches Par14 ist darüber hinaus mit dem präribosomalen Ribonukleinprotein-Komplex (pre-rRNP) assoziiert und könnte so auch bei der prä-rRNA-Prozessing (rRNA - ribosomale Ribonukleinsäure) und der ribosomalen Biogenese beteiligt sein (Fujiyama et al., 2002, Takahashi et al., 2003, Fujiyama-Nakamura et al., 2009).

Alle bisherigen Studien über menschliches Par14 beschreiben nur mögliche Funktionen dieses Proteins, jedoch keinen Phänotyp durch Reduktion (*knockdown*) oder Ausschalten (*knockout*) der Expression von Par14. In der Arbeitsgruppe von Peter Bayer wurde mehrmals versucht, mittels eines Gemisches von siRNAs (*siRNA pool*) sowie mit plasmidbasierenden shRNAs den Expressions-Level von Par14-mRNA zu reduzieren (Doktorarbeit Saningong, 2010). Bei diesen Versuchen war jedoch die Knockdown-Effizienz sehr niedrig (< 10%) und es wurden keine Änderungen im Phänotyp festgestellt.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die erste erfolgreiche Par14-Knockdown-Studie in menschlichen HEK293-Zellen veröffentlicht (Fujiyama-Nakamura et al., 2009). Die Reduktion der Par14-Expression ging dort mit einer deutlichen Reduktion des Wachstums im Vergleich mit Kontroll-Zellen einher (Abb. 1.5). Daher wurde in einem zweiten Teil dieser Arbeit auch an einem Par14-Knockdown gearbeitet.

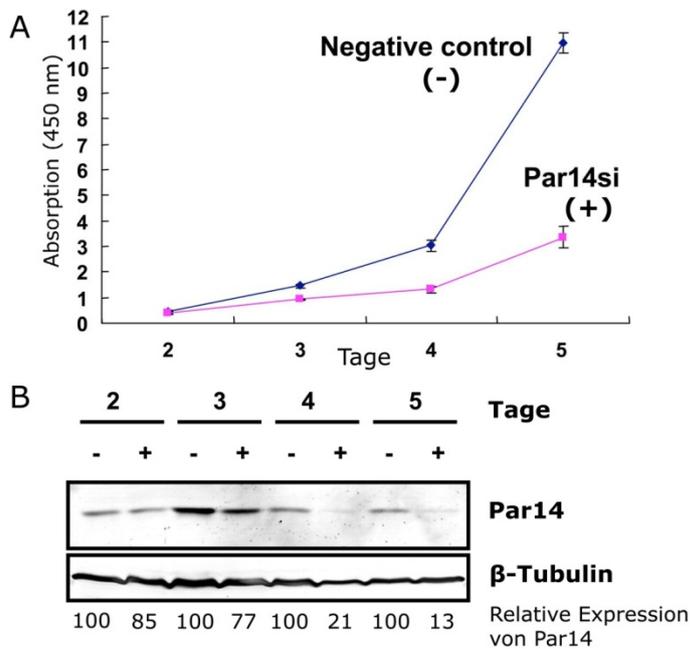


Abb. 1.5 Reduktion des Zellwachstums nach Knockdown von Par14 in HEK293-Zellen (A) und Western Blot mit β -Tubulin als Kontrolle (B) (geändert nach Fujiyama-Nakamura et al., 2009). Par14si-Konstrukt entspricht si311 in dieser Arbeit.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Par14 ist im Zellkern und im Zytosol lokalisiert und kann mit DNA assoziieren. Darüber hinaus weisen einige Studien auf eine mögliche Interaktion von Par14 mit prä-ribosomalen Ribonukleoprotein-Komplexen hin, und damit auf eine mögliche Rolle bei der Biogenese von Ribosomen. Somit bleibt die eigentliche Funktion von Par14 bisher ungeklärt. Funktionale Studien werden jedoch erschwert, da andere Vertreter der PPIase-Familie die Funktion teilweise übernehmen können. Für den Verlust von Pin1 wurde bereits eine teilweise kompensatorische Funktion von Par14 (Liou et al, 2002, Uchida et al., 2003) bzw. CypA (Arevalo-Rodriguez et al., 2000, Wu et al., 2000, Fujimori et al., 2001) postuliert.

Somit sollten in dieser Arbeit die Voraussetzungen geschaffen werden für einen doppelten Knockout von Pin1 und Par14 innerhalb des DT40-Zellsystems. Dies schließt zum einen die Klonierung eines entsprechenden Zielkonstrukts für Par14 ein. Zum anderen musste der genomische Locus von Pin1 näher charakterisiert werden, da die entsprechende Sequenz bisher noch nicht in öffentlichen Datenbanken verfügbar ist.

Die Reduktion der Parvulin-Expression war in vorangegangenen Arbeiten nicht möglich gewesen. Im Laufe dieser Arbeit wurde eine Knockdown-Studie mit menschlichem Par14 veröffentlicht. Somit sollte im zweiten Teil dieser Arbeit der Knockdown von Par14 reproduziert und dessen Phänotyp im Hinblick auf Wachstum und Zellzyklus sowie die Auswirkungen auf das Transkriptom untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Fluka (Neu-Ulm) verwendet. Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase und weitere Enzyme wurden von den Firmen Metabion (Martinsried), New England BioLabs (NEB, Frankfurt am Main), Fermentas (St. Leon-Rot), Thermo Scientific (Karlsruhe), Agilent Technologies (Böblingen) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Die DNA-Marker stammen von den Firmen Metabion (Martinsried) und New England BioLabs (NEB, Frankfurt am Main). Die Kits zur Isolierung von DNA, Gesamt-RNA und zur DNA-Aufreinigung wurden von der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Der Farbstoff 7-AAD und das Proliferations-Kit zum BrdU-Einbau für FACS-Analysen wurden von BD Biosciences (Heidelberg) erworben. Plastikware für die Zellkultur wurde von den Firmen Greiner (Frickenhausen), BD Biosciences (Heidelberg) oder Eppendorf (Hamburg) bezogen. Das DNA-Labeling-Kit für den Southern Blot und die Nylon-Membran Nytran N stammen von GE Healthcare (München). Das radioaktiv markierte Nukleotid alpha-³²P-dCTP wurde bei Hartmann Analytic (Braunschweig) erworben. Molekulargewichtsmarker für Proteine wurden bei Fermentas (St. Leon-Rot) und Invitrogen (Karlsruhe) gekauft. Serum, Medien für Zellkultur und Transfektionsreagenzien wurden von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), PAN-Biotech (Aidenbach), Roche (Mannheim) und Lonza (Köln) erworben.

2.1.2 Instrumente

Geräte	Hersteller
Abzug	Wesemann, Syke
Bakterienbrutschrank	CO ₂ Inkubator CB, Binder, Tuttlingen
Dampfsterilisator	Varioklav, H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Elektro-Perforator	Nucleofector II Device Lonza, Köln
Entwicklermaschine	CaWomat 2000 IR, CAWO, Schrobenhausen
Eraser	FUJIFILM, über Raytest, Berlin
FACS	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg
Geigerzähler	S.E.A. CoMo 170, Dülmen
Geldokumentation	Biometra, Göttingen
Gelkammern	Sub-Cell Model 96, BioRad, München

Hybridisierungsöfen	OV 2, Biometra, Göttingen
Kühl-/Gefriergeräte	Liebherr, Ochsenhausen Hera freeze (-86 °C), Heraeus, Hanau Sanyo Ultra Low (-152 °C), München
Magnetrührer	MR 3000, Heidolph, Schwabach
Mikroskop	Lichtmikroskop Olympus CK2, Hamburg
Mikrowelle	Sharp, Hamburg
Neubauer-Kammer	0,100 mm Tiefe, Assistent, Sondheim
PCR-Cycler	Thermocycler T3000, Biometra, Göttingen Master Cycler Gradient, Eppendorf, Hamburg StepOne Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Darmstadt
pH-Meter	Seven Easy pH Meter, Toledo, Giessen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Biophotometer, Eppendorf, Hamburg
Scanner	FujiFilm FLA-5000, Düsseldorf
Schüttelinkubatoren	HT INFORS, Bottmingen, Schweiz
Spannungsgeber	Power Pac, Bio-Rad, München Power Pac P25T, Biometra, Göttingen
Spektrometer	nanoDrop ND1000, PEQLAB, Erlangen
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus, Hanau
Thermomixer	Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch	N36-M Benda, Wiesloch BioDoc Analyze Ti5, Biometra, Göttingen
Vakuum-Konzentrator	Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA
Waagen	EG, Kern, Balingen ABJ, Kern, Balingen
Wasserbad	Memmert, Büchenback HAAKE SWB25, Thermo Fisher, Dreieich
Zellkulturinkubator	CO ₂ Inkubator C200, Labotect, Göttingen
Zentrifugen	5415R, Eppendorf, Hamburg 5810R, Eppendorf, Hamburg Avanti J-E, Beckman Coulter, CA, USA
Zellzähler	Casy 1 TT, Schärfe System Innovatis, Bielefeld

2.1.3 Lösungen, Puffer und Medien

PBS (1×)	4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH 7,4
SSC (20×)	3M NaCl; 0,3M Citrat C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ , pH 7,0
EDTA	0,5M, pH 8,0
TBE (1×)	90 mM Tris-Borat; 1 mM EDTA, pH 8,0
TE (1×)	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0
TAE (1×)	40 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; eingestellt mit Essigsäure auf pH 8,0

Weitere verwendete Puffer und Lösungen sind bei den jeweiligen Methoden in den nachfolgenden Abschnitten aufgelistet.

2.1.4 Kits

Verso cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Karlsruhe
Absolute QPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific, Karlsruhe
NucleoSpin RNA II Total RNA Isolation Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond Xtra Midi EF DNA Purification Kit	Macherey-Nagel, Düren
FITC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen (Heidelberg)
Venor GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Cell Line Nucleofector Kit Solution T	Lonza, Köln
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, USA
Amersham Rediprime II DNA Labeling System	GE Healthcare, München

2.1.5 Klonierungs-/Ausgangs- Vektoren

Plasmide	Resistenz/Eigenschaft	Quelle
pCR 2.1-TOPO	Amp, Kan; Klonierungs-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
BC 795	Amp; Vektor zur Klonierung der Neomycin Resistenzkassette pBSKSPacloxPFrt-NEOFrt#26	von Dr. Tilman Brummer (Zentrum für Biosystemanalyse, Freiburg)
BC 805	Amp; pCAGGSFLPe-IRESpuro - Expressions-Vektor für die eukaryontische Flipase mit Puromycin-Selektionsmarker	von Dr. Tilman Brummer (Zentrum für Biosystemanalyse, Freiburg); Schaft et al., 2001
BC 774	Chloramphenicol. CHORI-261-100A14 in pTARBAC2.1	http://bacpac.chori.org/chicken261.htm
BC 804	Klonierungs-Vektor mit 5'-arm des Knockout-Konstrukts Par14 mit Primer 705F und 717R im pCR2.1- TOPO	Stammsammlung der Arbeitsgruppe Peter Bayer (Institut für Biochemie, Essen)

BC 799	Klonierungs-Vektor mit 3'-arm des Knockout-Konstrukts Par14 mit Primer 707F und 685R im pCR2.1- TOPO	Stammsammlung der Arbeitsgruppe Peter Bayer (Institut für Biochemie, Essen)
BC 867	Knockout-Konstrukt ckPar14 E1/E2_loxP_NEO-Klon6	Stammsammlung der Arbeitsgruppe Peter Bayer (Institut für Biochemie, Essen)
BC 870	883F+820R_Klon7 Sonde für Southern Blot KO ckPar14 im pCR2.1- TOPO	Stammsammlung der Arbeitsgruppe Peter Bayer (Institut für Biochemie, Essen)
BC 992	Klonierungs-Vektor von Par14-Locus mit Primer 767F und 733R im pCR2.1- TOPO	Stammsammlung der Arbeitsgruppe Peter Bayer (Institut für Biochemie, Essen)

2.1.6 Antibiotikum-Konzentrationen

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Stock-Lösung
Ampicillin	100 µg/ml	40 mg/ml
Kanamycin	50 µg/ml	50 mg/ml
Geneticin (G-418)	2 mg/ml	100 mg/ml
Puromycin	0,5 µg/ml	1 mg/ml

2.1.7 Oligonukleotide

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Die Primer für Mutagenese (QuickChange-Primer) wurden zusätzlich mittels HPLC gereinigt.

Name	Sequenz 5' - 3'
Sequenzierungsprimer	
T7-F	TAATACGACTCACTATAGGG
M13-RP	CAGGAAACAGCTATGACC
687F	CTCACAGGCCTGGCTCGGTTTCATGG
688R	CATGAAACCGAGCCAGGCCTGTGAGC
706R	GAAATCTGCCATCCCCTGAGAGGGAAG
714R	GCTCCCAGCACACATCTCTTTGGTGT
716F	TCAGGAAAGTTTGTGCTTTATTTCTTCCC
792F	GAAGCTAGCTTGAAACTGTTTGGTCAC
793R	GTGACCAAACAGTTTCAAGCTAGCTTC
794F	CACTAAATGCCTGTTGCTCCCTCAG
795R	CTGAGGGAGCAACAGGCATTTAGTG
796F	GATAGAACAGAAGGTTTGTACAAGCCAG
797R	CTGGCTTGACAAACCTTCTGTTCTATC

PCR-Primer		
685R	AGTCAGATGAACAGCTGGAGTACTGCACC	
705F	GACTGGAACAGATTGCCAGAGAAGCTG	
707F	GCTTAACCCTGGTGGTTCTTCCTGC	
717R	CATCGCCGCAGCTCCGCCGCGCTC	
767F	ACTGTCAGGAAAGTTTGTGCTTTATTTCTTCCCCTATTTCTG	
775F	TGGGAGAAGCGCATGAGCCGCAGCTC	
778R	CCTTCGCTGAGCTGCAGTCACTGAACTG	
779F	CAGTTCAGTGACTGCAGCTCAGCGAAGG	
780R	GTGCGCAGGATGATGTGGATCCC	
803R	GAGCTCCAGGGCTTCGTCTTTGGTCCTCG	
804F	CAACCACATCACCAACGCCAGCCAATGG	
810F	ATGGCGGAGGAGGAGAAGCTGCC	
820R	TGTCTGGGCCTTCTCAGCATTCTCTAACAC	
883F	GTGGATTCTCCTGAGATGACTCTGACTC	
qRT-PCR Primer		
JO-251F	CGGCTTTCAGGCATTTGTTTAG	Mueller et al, 2006
JO-252R	GCGGCATCTTGAAGCTTGTT	
JO-253F	TGGGAGTGACAGTGCTGACAA	
JO-254R	CATGTTTTTACATAGAATGTGTCTGAC	
555F	GCTTGTCAATGGAAATCCC	Europäisches Patent EP2108705, 2009
556R	AGCCTTCTCCATGGTGG	
Primer für Mutagenese (QuikChange-Primer)		
732QC-F	GCCTAAAGCCTAGTAAGttaattaaCTTGTCTTCTGGTAAAC	
733QC-R	GTTTTACCAGAAGGACAAGttaattaaCTTACTAGGCTTTAGGC	
770QC-F	GAGCGGGGCCGGGGG ataacttcgtata atgtatgc tatacgaagttat AGGGAGGCCTGCAAAGC	
771QC-R	GCTTTGCAGGCCTCCCT ataacttcgtata gcatacat tatacgaagttat CCCCCGGCCCGCTC	

2.1.8 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac [F0 proAB lacqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Agilent Technologies, Böblingen
<i>E. coli</i> ElectroSHOX	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 ara Δ 139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ - rpsL (StrR) nupG	Bioline, Luckenwalde

2.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Organismus/Gewebe/Charakteristika	ATCC Nr./Referenz
HeLa	Cervix Adeno-Karzinom, <i>Homo sapiens</i>	CCL-2
DT40 MerCreMer	B cell from bursal lymphoma, <i>Gallus gallus</i>	Brummer et al., 2002

2.1.10 siRNAs

si RNA	Sequenz	Referenz
control siRNA	5` – GGCACACUGUAGAGUAAAGUGCAAA – 3`	Fujiyama-Nakamura et al., 2009
	3` – AAACGUGAAAUGAGAUGUCACACGG – 5`	
si5	5` – AACAAUUGCCUGAAAGCCGCAUCUC – 3`	
	3` – CUCUACGCCGAAAGUCCGUAACAA – 5`	
si311	5` – UUAUCUUCACUAUACUGUGCGGCC – 3`	Fujiyama-Nakamura et al., 2009
	3` – CCGGCGUGUCAUAUCACUUCUAUUU – 5`	
si418	5` – UAAGUGGGAUGGAUAAGCCUGUGUU – 3`	
	3` – UUGUGUCCGAAUAGGUAGGGUGAAU – 5`	

2.1.11 Software

DNA-Sequenzen wurden mit den Programmen BioEdit und Vector NTI Advance analysiert. Für die FACS-Analyse wurden BD FACSCComp, BD CellQuestPro, FSC Express 4.0 und FlowJo 6.1.1 verwendet. Für qRT-PCR und die Auswertung der Daten wurde die StepOne Software (Applied Biosystems, Darmstadt) angewendet. Außer Standard-Office-Programmen wurden zur Datenauswertung und Bildbearbeitung Adobe Photoshop CS2 und CorelDraw 12 benutzt.

2.1.12 Online Datenbanken; DNA- und Protein-Analyse Tools

BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClustelW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Oligo Calculator	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
Nucleic Acid Sequence Massager	http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
Vector Database	https://www.lablife.org/g?a=vdb
Invitrogen Fluorescence Spectrum Viewer	http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html

2.2 METHODEN

2.2.1. DNA und RNA

2.2.1.1 DNA-Isolierung aus DT40-Zellen

Lyse-Puffer	10 mM Tris-HCl pH-8.0, 10 mM EDTA pH-8.0, 150 mM NaCl, 0,2% SDS, 400 µg/ml Proteinase K
Isopropanol	100%
TE-Puffer (1×)	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
Pasteur-Pipetten	

Die DT40-Zellen wurden 10 min bei 4 °C, 300 rpm abzentrifugiert, das Pellet wurde in 500 µl Lyse-Puffer resuspendiert und bei 55 °C schüttelnd inkubiert. Nach 5 - 6 Stunden Inkubation wurden 500 µl Isopropanol (100 %) dazugegeben und leicht gemischt. Die Zugabe von Isopropanol führt zur Dehydrierung von genomischer DNA, so dass man die gut erkennbaren „DNA-Fäden“ mit einer Pasteur-Pipette herausfischen kann. Falls die DNA-Menge zu niedrig ist und man keine „DNA-Fäden“ sieht, kann das Gemisch 10 min bei 4 °C, 13 500 rpm abzentrifugiert werden. Die so gewonnene genomische DNA wurde bei RT kurz getrocknet und im Anschluss in TE-Puffer (1×) bei 4 °C über Nacht resuspendiert.

2.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation definierter DNA-Sequenzen erfolgt in einem Thermoblock der Firmen Biometra bzw. Eppendorf. Dabei wurden die DNA-Polymerasen miTaq (Metabion, Martinsried), Deep Vent und Phusion Hot Start (NEB, Frankfurt am Main) sowie KOD Xtreme Hot Start (Merck, Darmstadt) verwendet. Ein Ansatz für eine analytische PCR beträgt 20 µl, für eine Standard-PCR 50 µl (Tabelle 2.1). Die PCR-Reaktionen wurden entsprechend den Hersteller-Angaben der DNA-Polymerasen angesetzt.

Das PCR-Programm besteht grundsätzlich aus drei Schritten: Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Zuerst wird die doppelsträngige DNA bei 94 °C denaturiert, um einzelsträngige DNA zu gewinnen. Danach werden die vorhandenen Oligonukleotidprimer mit der einzelsträngigen Templat-DNA hybridisiert und anschließend bei 72 °C mittels Taq-Polymerase verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Dabei entsteht das PCR-Produkt, das zur DNA-Matrix komplementär ist.

Tabelle 2.1 Standard-PCR-Ansatz mit miTaq-Polymerase

Komponente	Volumen 50 μ l	Volumen 20 μ l
PCR-Puffer (10 \times)	5 μ l	2 μ l
10 mM dNTPs	2 μ l	0,8 μ l
5'-Primer (10 pmol/ μ l)	2 μ l	0,8 μ l
3'-Primer (10 pmol/ μ l)	2 μ l	0,8 μ l
DNA-Templat	100 ng	40 ng
DMSO (optional)	1 μ l	0,4 μ l
ddH ₂ O	bis 50 μ l Endvolumen	bis 20 μ l Endvolumen
miTaq-Polymerase 5 Units/ μ l	0,5 μ l	0,2 μ l

Für jede Polymerase werden vom jeweiligen Hersteller optimale Parameter für das PCR-Programm empfohlen. In der folgenden Tabelle 2.2 wird das Standard PCR-Programm angegeben.

Tabelle 2.2 Standard PCR-Programm

PCR-Schritte	Temperatur $^{\circ}$ C	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	3 min	-
Denaturierung	95	1 min	3
Hybridisierung	T _m - 8	1 min	
Elongation	72	1 min pro 1 Kb	
Denaturierung	95	1 min	30
Hybridisierung	T _m - 3	1 min	
Elongation	72	1 min pro 1 Kb	
Finale Elongation	72	10 min	-
Reaktionsende	8		

Die Hybridisierungstemperatur wird ausgehend von der Schmelztemperatur (T_m) der Primer ermittelt, die von der Länge und vom GC-Gehalt des Primers abhängig ist. In der einfachsten Variante wird die T_m mittels folgender Formel berechnet:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2 \times (\text{Anzahl A bzw. T})$$

Diese Berechnung und weiter entwickelte Algorithmen verwendet auch die Internet-Software *Oligonucleotide Properties Calculator* zur Vorhersage der Schmelztemperatur von Primer (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit dem NucleoSpin Extract II PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren) direkt aufgereinigt oder über eine Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend isoliert.

2.2.1.3 DNA-Restriktion

Die DNA-Restriktion wurde mit Restriktionsendonucleasen der Firmen New England BioLabs (NEB, Frankfurt am Main) und Fermentas (St. Leon-Rot) in den mitgelieferten Restriktionspuffern durchgeführt. Generell wurden 500 ng DNA in 20 µl Volumen bei 37 °C 20 min verdaut (für Klonierung oder Restriktionskontrolle). Für das Linearisieren des Knockout-Konstruktes wurde die Restriktion in einem größeren Volumen angesetzt und bei 37 °C für 4 Std. durchgeführt.

Gemisch für Fermentas-Enzyme:

FastDigest Puffer (10×)	2 µl
Plasmid-DNA	500 ng
ddH ₂ O bis 19 µl Endvolumen	X µl
FastDigest Enzyme (1 Unit/µl)	1 µl

Gemisch für NEB-Enzyme:

NEB-Puffer (10×)	2 µl
BSA (100×)	0,5 µl
Plasmid-DNA	500 ng
Enzyme	5 Units
ddH ₂ O bis 20 µl Endvolumen	

Gemisch zur Linearisierung des Knockout-Konstrukts:

FastDigest Puffer (10×)	20 µl
Plasmid-DNA	10 µg
FastDigest Enzyme (1 Unit/µl)	5 µl
ddH ₂ O bis 200µl Endvolumen	

2.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

TAE (1×)	40 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; eingestellt mit Essigsäure auf pH 8,0
Proben Puffer (10×)	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Marker 1 kb oder 100 bp	Metabion (München)
Agarose NEEO Ultra	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid-Lösung 1% (10 mg/ml)	Roth (Karlsruhe)

Die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe erfolgte in einem 0,8 bis 1,2 %igen Agarose-Gel. Zur Herstellung von Agarose-Gelen wurde Agarose NEEO Ultra (Roth, Karlsruhe) in TAE-Pufferlösung (1×) durch Aufkochen gelöst und nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration: 0,3 µg/ml). Vor dem Auftragen aufs Gel wurden die Proben mit Proben-Puffer (10×) versetzt. Um die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen, wurde ein DNA-Marker aufs Gel aufgetragen. In Abb. 2.1 werden die verwendeten Marker gezeigt.

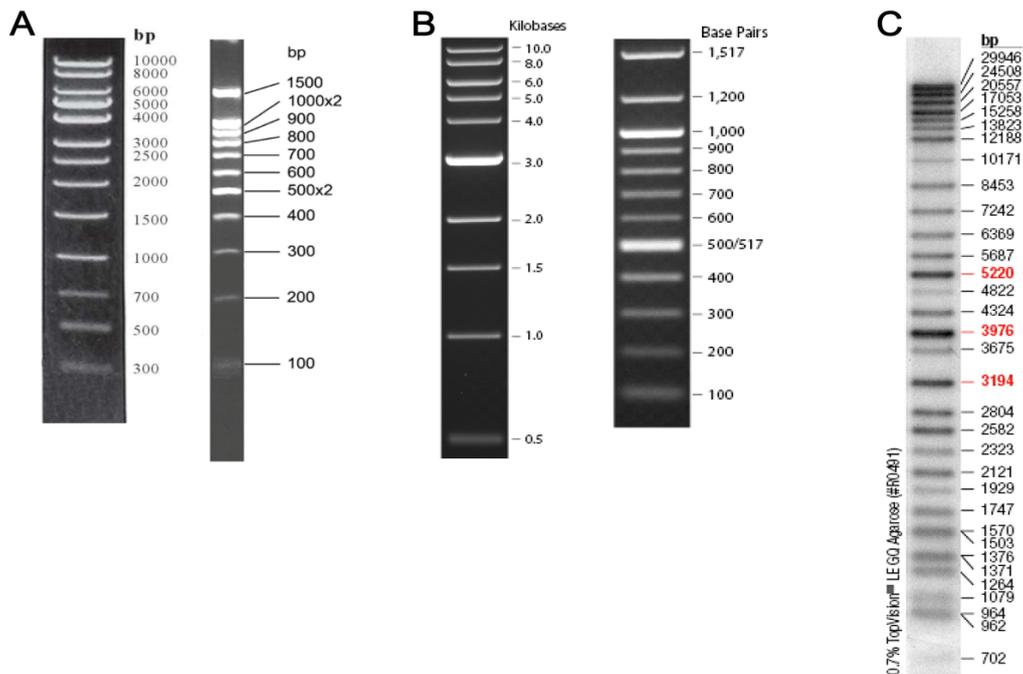


Abb. 2.1 Die verwendeten DNA-Marker. A – Marker 1 kb und 100 bp von Metabion (München); B - Marker 1 kb und 100 bp von NEB (Frankfurt am Main); C - DNA Marker II von Fermentas (St. Leon-Rot)

2.2.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die DNA-Extraktion wurde mit dem NucleoSpin Extract II PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt und in ddH₂O eluiert.

2.2.1.6 Klenow-Füllen klebriger Enden mit der DNA-Polymerase I

Um eine bestimmte Restriktionsstelle zu eliminieren, wurde der Mix nach der Restriktion mit NEB-Enzymen (Frankfurt am Main) und Hitze-Inaktivierung sofort weiter als Ansatz fürs Klenow-Füllen nach folgendem Pipettierschema verwendet:

Restriktions-Mix nach Hitze-Inaktivierung	20 µl
NEB-Puffer 2 (10×)	0,3 µl
dNTPs (5 mM)	2,64 µl
ddH ₂ O bis Endvolumen 24 µl	1 µl
DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (NEB)	1 µl

Das Gemisch wurde 40 min bei 37 °C inkubiert, danach 20 min bei 75 °C inaktiviert. Anschließend wurde die aufgefüllte DNA mittels Agarose-Gel gereinigt und schließlich in ddH₂O eluiert.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 ermöglicht die Ligation eines DNA-Fragmentes (Insert) in einen linearisierten Vektor. Dabei werden die Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxylenden des Vektors und 5'-Phosphatenden des Inserts ATP-abhängig geknüpft. Für eine höhere Effizienz der Ligation wurde ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1 zu 4 verwendet, die Reaktion wurde nach dem angegebenen Schema angesetzt:

Vektor	1 µl
Insert	4 µl
Puffer (10×)	2 µl
Polyethylenglykol PEG4000 (5%)	2 µl
ddH ₂ O bis Endvolumen 19 µl	X µl
Ligase T4 (Metabion) 150 Units	1 µl

Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei 16 °C und Hitze-Inaktivierung bei 65 °C für 10 min wurden die Reaktionsansätze direkt für die Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

2.2.1.8 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mittels NanoDrop 1000 (PEQLAB, Erlangen), durch die Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Eine Absorptionseinheit bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml oder 40 µg RNA/ml. Die Absorption von Proteinen liegt bei 280 nm, von Salzen bei 230 nm. Die Verunreinigungen lassen sich mit den Verhältnissen 260/280 nm bzw. 260/230 nm gut nachweisen: liegt das 260/280 nm-Verhältnis zwischen 1,8 und 2, so enthält die Probe keine Kontamination durch Proteine oder Phenol. Ist das 260/230-Verhältnis kleiner als 2, so ist das ein Zeichen für eine erhöhte Salzkonzentration. Im optimalen Fall stehen 230 nm : 260 nm : 280 nm im Verhältnis 1:2:1.

2.2.1.9 Zielgerichtete Mutagenese

Für die zielgerichtete Mutagenese wurde die QuickChange-Technik verwendet (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, Böblingen). Bei dieser Methode erfolgt der Einbau der gewünschten Nukleotidsequenz in die DNA-Matrix mittels Polymerase-Kettenreaktion und Oligonukleotidprimer, in denen die gewünschte Mutation vorhanden ist. Im Anschluss wird der Reaktionsansatz mit der Endonuclease DpnI versetzt, um die methylierte Ausgangs-DNA zu zerstören.

Für GC-reiche Sequenzen oder für die *LoxP*-Klonierung des Knockout-Konstrukts, in der sehr lange Primer benutzt werden, wurde die PCR mit optimierten Parametern durchgeführt. Die Unterschiede sind im folgenden Schema aufgeführt.

„Standard“-Mutagenese	„schwierige“ Mutagenese
PCR-Mix für 25 µl:	
Reaktionspuffer (10×) – 2,5 µl Plasmid-DNA – 25 - 40 ng Forward-Primer (10 pmol/µl) – 0,6 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl) – 0,6 µl dNTPs Mix – 0,5 µl ddH ₂ O bis Endvolumen 24,5 µl <i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl) – 0,5 µl	Reaktionspuffer (10×) – 2,5 µl Plasmid-DNA – 25 - 40 ng Forward-Primer (10 pmol/µl) – 0,6 µl Reverse-Primer (10 pmol/µl) – 0,6 µl dNTPs Mix – 0,5 µl DMSO von 2 bis 6% ddH ₂ O bis Endvolumen 24,5 µl <i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (2,5 U/µl) – 0,5 µl
PCR-Programm:	
1. 95 °C – 1 min 2. 95 °C – 30 sec 3. 55 °C – 1 min 4. 68 °C – 1 min pro 1 Kb 25 Zyklen (Schritte 2-4) 5. 8 °C – Pause	1. 95 °C – 1 min 2. 95 °C – 30 sec 3. 58 °C – 30 sec 4. 68 °C – 1 min pro 1 Kb 25 Zyklen (Schritte 2-4) 5. 8 °C – Pause
DpnI Verdau + 0,5 µl DpnI zum PCR-Mix und 1 Std. bei +37 °C inkubieren	
Transformation in <i>E. coli</i> XL-1Blue	
<ul style="list-style-type: none"> ◆ Auftauen der chemisch kompetenten <i>E. coli</i> auf Eis ◆ 5 µl PCR-Mix nach dem DpnI-Verdau zu den Zellen geben ◆ 30 min Inkubation auf Eis ◆ Hitze-Schock 45 sec bei 42 °C, dann 5 min auf Eis inkubieren ◆ 200 µl LB-Medium zu den Zellen geben und schüttelnd bei +37 °C 1 Std inkubieren ◆ Ausplattieren der Zellen auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ◆ Inkubation der Platten 12 - 16 Std bei 37 °C 	

2.2.1.10 Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung nach der Sanger-Methode wurde bei der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Online-Software (ClustelW, NCBI Blast) sowie mit den Programmen BioEdit und Vector NTI (Invitrogen, Karlsruhe).

2.2.1.11 RNA-Isolierung

Die RNAs aus HeLa-Zellen bei dem Knockdown-Projekt wurden mittels NucleoSpin RNA II Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel, Düren) gewonnen, in RNase-freiem Wasser eluiert und aliquotiert bei -84 °C gelagert.

2.2.1.12 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des Verso cDNA Kit (Thermo Scientific) durchgeführt:

total-RNA	1 µg (1000 ng)
dNTPs	2 µl
Puffer (5×)	4 µl
RNA Primer Mix (1:3, Oligo dT:Hexamers Random Primer)	1 µl
ddH ₂ O bis Endvolumen 19 µl	X µl
Verso Enzyme Mix	1 µl

Das Programm für die cDNA-Synthese:

1. 42 °C – 30 min
2. 95 °C – 2 min

2.2.1.13 Quantitative RT-PCR

StepOne Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
ABsolute QPCR SYBR Green Mix	Thermo Scientific, Karlsruhe
Platten	Applied Biosystems, Darmstadt
Deckel	Applied Biosystems, Darmstadt

Die Expression der Par14/17 mRNA nach dem Knockdown wurde mit Hilfe der qRT-PCR untersucht. Die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (kurz qRT-PCR) ist eine PCR-basierende Methode, die die Amplifikation und gleichzeitig Quantifizierung der gewonnenen DNA-Moleküle ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (hier SYBR Green) durchgeführt, die sich in die doppelsträngige DNA einlagern (interkalieren) und dann stark fluoreszieren. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert daher mit der Zunahme der DNA-Menge von Zyklus zu Zyklus. Die Fluoreszenzmessung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

Ein wichtiger Parameter bei der qRT-PCR ist der Ct-Wert (engl. *Cycle Threshold*) bzw. der Cp-Wert (engl. *Crossing Point*) (Abb. 2.2). Er beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt (sprich ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg). Ein zweiter Parameter, der am Ende der PCR indirekt die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität der PCR-Produkte zeigt, ist die Schmelztemperatur. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht (von 50 °C bis zu 95 °C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur wird der

Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen denaturiert. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) freigesetzt, und dadurch eine Fluoreszenzabnahme registriert. Ein uniformes PCR-Produkt zeigt hierbei einen einzigen Temperaturübergang, der reproduzierbar immer wieder bei einer einzigen Temperatur stattfindet.

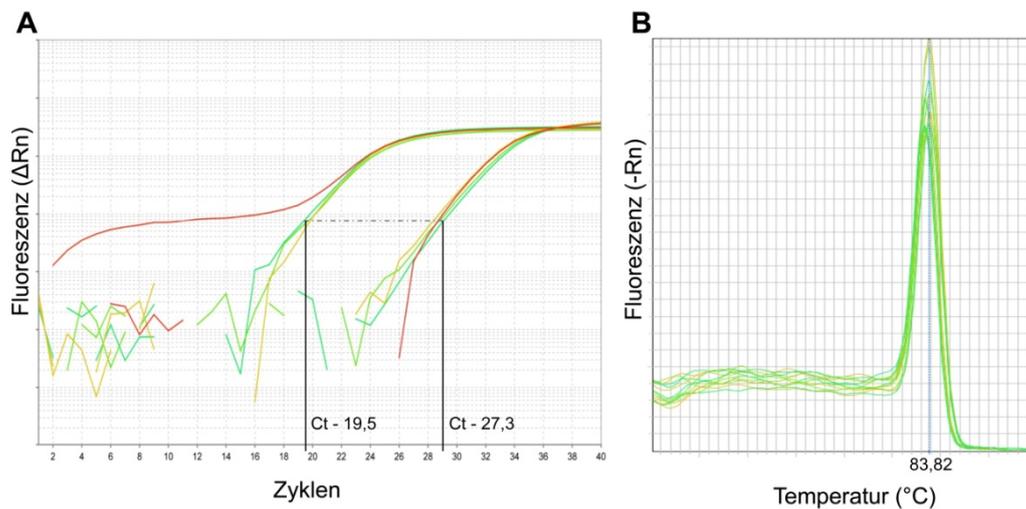


Abb. 2.2 Die Parameter von qRT-PCR. A - Amplifikationskurven für Target- und Referenz-Gen (Houskeeping-Gen); B - Schmelzkurven.

Die Veränderungen der Genexpression werden üblicherweise mittels relativer Quantifizierung analysiert. Dabei werden die Level von zwei verschiedenen Target-Sequenzen (Target-Gen und Referenz-Gen) untersucht und in den jeweiligen Proben verglichen.

Für die Expression von Par17 wurden die Primer 251F und 252R (siehe Kapitel 2.1.8) verwendet, für total Parvulin (Par14 und Par17) 253F und 254R (Mueller et al., 2006). Als Referenz-Gen wurde die Expression von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit den Primern 555F und 556R bestimmt. qRT-PCR wurde am StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt und die Daten wurden mit der entsprechenden Software ausgewertet.

Das Reaktionsgemisch mit dem Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Karlsruhe) wurde für Quadruplet-Pipettierschema angesetzt (siehe Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3 Das Reaktionsgemisch für Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific, Karlsruhe)

	für eine Probe	für fünf Proben
cDNA	0,6 μ l	3 μ l
Forward Primer (10 pmol/ μ l)	2 μ l	10 μ l
Reverse Primer (10 pmol/ μ l)	2 μ l	10 μ l
SYBR Green Puffer Mix	12,5 μ l	62,5 μ l
ddH ₂ O	7,5 μ l	39,5 μ l
Endvolumen	25 μ l	125 μ l

Die PCR wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

Beschreibung	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorinkubation	1	95 °C	15 min
Amplifikation			
Denaturierung	40	95 °C	15 sec
Annealing		56 °C	30 sec
Elongation		72 °C	30 sec
Schmelzkurve			
Annealing	1	55 °C	15 sec
Schmelzen		+0,3 °C/sec bis 95 °C	15 sec
Abkühlen	1	40 °C	

2.2.1.14 Microarray-Analyse

Die Microarray-Analyse wurde bei PD Dr. Ludger Klein-Hitpass (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt. Mit der verwendeten Biochip HG-U133 Plus 2.0 wurden etwa 54000 Probesets getestet, was ungefähr dem gesamten bekannten menschlichen Transkriptom entspricht.

2.2.1.15 Southern Blot

Eine zentrale Aufgabe dieser Arbeit war das Etablieren der Southern Blot-Methode. Diese erlaubt den Nachweis einer bestimmten Gensequenz durch DNA-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde vor dem Hintergrund eines vollständigen und komplexen Genoms. Zur Verfügung standen drei verschiedene Protokolle aus anderen Arbeitsgruppen, aus denen ein geeignetes Protokoll für die sehr GC-reiche DNA aus dem Huhn adaptiert wurde. Das resultierende Protokoll wurde mehrmals geprüft und hat sehr gute und reproduzierbare Ergebnisse gezeigt. Die Methode besteht aus verschiedenen Schritten, die hier im Folgenden beschrieben sind.

Bsu361 (10 Units/µl)	NEB, Frankfurt am Main
BSA (100×)	NEB, Frankfurt am Main
DNA Marker II	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Proben Puffer (10×)	Fermentas, St. Leon-Rot
TBE (1×)	90 mM Tris-Borat; 1 mM EDTA; pH 8,0
Ethidiumbromid-Lösung 1% (10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe

Nylon Membran Nytran N	GE Healthcare, München
Depurierungslösung	0,25 M HCl
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	3,0 M NaCl, 0,5 M Tris pH-7,4
UV-Crosslinker	GE Healthcare, München
Whatman-Papier	GE Healthcare, München
TE (1×)	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
Rediprime DNA-Labeling Kit	GE Healthcare, München
radioaktiv markierte Nukleotid alpha- P32-dCTP	Hartmann Analytic, Braunschweig
EDTA (0,5 M)	Roth, Karlsruhe
Hybridisierungspuffer	1 M NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 10% Dextransulfat, 1% SDS, 200 µg/ml Fischspermien-DNA
MicroSpin G-50 Columns	GE Healthcare, München
Fischspermien-DNA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphor-imaging Platte	GE Healthcare, München
BAS Cassette2 2025	FujiFilm

Restriktion genomischer DNA aus DT40-Zellen. 10 µg genomischer DNA wurden in einem Volumen von 200 µl mit 10 Units des Restriktionsenzymes Bsu361 (NEB, Frankfurt am Main) versetzt und 12 Std. bei 37 °C inkubiert. Danach wurden zum Gemisch zusätzliche 10 Units des Enzyms in 50 µl von Restriktionsmix gegeben und weitere 12 Std. bei 37 °C inkubiert.

10 µg genomischer DNA-Lösung	X µl
Restriktionspuffer 3 (10×)	20 µl
BSA (100×)	5 µl
ddH ₂ O bis zu einem Volumen 199 µl	X µl
Enzyme Bsu361 (10 Units/µl)	1 µl
Endvolumen	200 µl

Gelelektrophorese. Nach dem Verdau wurden die Proben mit Hilfe eines Vakuum-Konzentrators bis auf 25 µl eingedampft, mit Proben-Puffer (10×) gemischt und auf ein 0,76 %iges TBE-Agarose-Gel mit 50 ng DNA-Marker II (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde über Nacht (etwa 12 Std.) in TBE-Puffer (1×) bei 24 mV bei Raumtemperatur durchgeführt. Am nächsten Tag wurde das Gel in frischem TBE-Puffer mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,3 µg/ml) 10 min invertierend inkubiert und anschließend mittels Geldokumentation (Biometra, Göttingen) fotografiert.

Elektro-Transfer von DNA auf Nylonmembran.

Depurierungslösung	0,25 M HCl
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralierungspuffer	3,0 M NaCl, 0,5 M Tris pH 7,4

Vor dem Transfer wurde das Gel zuerst 15 min in Depurierungslösung geschwenkt, dann 15 min in Denaturierungslösung und anschließend 20 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Das Blotting-Sandwich ist in der Abb. 2.3 gezeigt. Der Elektrotransfer wurde 30 min bei 4 mA/cm² mit TBE-Puffer (1×) durchgeführt. Nach dem Transfer wurden die Taschen vom Gel mit Bleistift auf die Membran übertragen. Die Membran wurde kurz in frischem TBE-Puffer gewaschen und auf Whatman-Papier getrocknet. Die DNA wurde mit Hilfe eines UV-Crosslinkers 30 min bei 0,02 J/cm² auf der Membran fixiert.



Abb. 2.3 Schema vom Blotting-Sandwich für den Elektrotransfer von DNA.

Vorbereitung der Sonde. Die Sonde ist ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment, das mit der komplementären DNA-Sequenz der getesteten Klone hybridisiert. Durch die Markierung lässt sich dann die Größe der geschnittenen DNA-Fragmente bestimmen.

Die Sonde muss einigen Kriterien entsprechen:

Die Größe. Je größer die Sonde ist, desto komplizierter und schwieriger ist die Hybridisierung. Andererseits darf die Sonde nicht zu kurz sein. Die optimale Größe liegt zwischen 0,7 und 1 kb.

GC-Gehalt. Die Hybridisierung der Sonde mit DNA findet bei 60 – 65 °C statt. Deswegen muss die Schmelztemperatur der Sonde unter 60 °C liegen.

Repetitive Sequenzen und Spezifität. Repetitive Sequenzen können zu unspezifischer Hybridisierung führen und sollen vermieden werden.

Die ausgewählte Sonden-Sequenz (966 nt Länge, 45% GC-Gehalt) wurde mit den Primern 883F und 820R amplifiziert, in den Vektor pCR2.1 kloniert und sequenziert. Die Sonde wurde aus dem Vektor mit EcoRI (Fermentas, St. Leon-Rot) ausgeschnitten und aufgereinigt.

Radioaktive Markierung der Sonde. Die Sonde (50 ng in 45 µl TE-Puffer) wurde 10 min bei 99 °C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Zentrifugieren

wurde die denaturierte Sonde mit lyophilisiertem DNA-Labeling Kit (GE Healthcare, München) gemischt und nach der Zugabe von 5 µl radioaktivem Isotop P³²-dCTP (Hartmann Analytic, Braunschweig) 40 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Polymerase I Klenow Fragment, die in diesem Kit vorhanden ist, synthetisiert die neue DNA, wobei auch das radioaktiv markierte dCTP eingebaut wird. Der Prozess wird danach mit 5 µl EDTA (0,5 M) gestoppt.

Prähybridisierung.

Hybridisierungspuffer	1 M NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 10% Dextransulfat, 1% SDS, 200 µg/ml Fischspermien-DNA
MicroSpin G-50 Röhrchen	GE Healthcare, München
Fischspermien-DNA	Sigma-Aldrich, Steinheim

Die Membran wurde in Röhrchen (MicroSpin G-50) übertragen und mit 10 ml des vorgewärmtem Hybridisierungspuffers 2 Std. bei 60 °C im Hybridisierungssofen (Biometra OV 2, Göttingen) inkubiert.

Hybridisierung. Nach der Prähybridisierung wurde der Hybridisierungspuffer erneuert und die radioaktiv markierte Sonde dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60 °C im Hybridisierungssofen.

Waschen

Waschpuffer	SSC (2×), 0,1% SDS
Phosphor-Imaging Platte	GE Healthcare, München
BAS Cassette2 2025	FujiFilm
Software	Image Reader FLA-5000 V2.1
	Aida Image Analyser v.3.44

Nach dem Abgießen des Hybridisierungspuffers am nächsten Tag wurde die Membran mit 50 ml vorgewärmtem Waschpuffer 10 min bei 65 °C inkubiert. Der Waschpuffer wurde mehrmals gewechselt bis die Radioaktivität im Röhrchen weniger als 1 Bq war.

Detektion der Phosphor-Imaging-Platte. Die Membran wurde eingeschweißt und in einer BAS-Cassette mit der Phosphor-Imaging-Platte bis zu 36 Std inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurde die Phosphor-Imaging Platte im Dunkeln mit dem Scanner FujiFilm FLA-5000 ausgelesen und das Bild mit der Software Aida Image Analyser v.3.44 bearbeitet.

2.2.2 Bakterienkultur

2.2.2.1 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

LB Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, in 1 l H ₂ O, pH 7,0 sterilisiert durch Autoklavieren
Agar Platten	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar, in 1 l H ₂ O, pH 7,0; sterilisiert durch Autoklavieren; nach Abkühlen auf 50-60 °C Zugabe von Antibiotikum

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden zuerst auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von Plasmid-DNA bzw. eines Ligationsansatzes weitere 25 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 45 sec einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, für 5 min auf Eis abgekühlt und mit 200 µl vorgewärmten LB-Medium versetzt. Die Bakteriensuspension wurde 1 Std bei 37 °C schüttelnd inkubiert und auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Agar-Platten wurden über Nacht (12 – 16 Std) bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.2 TOPO TA Klonierung

TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
X-Gal (40 mg/ml)	400 mg 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid lösen in 10 ml Dimethylformamid
IPTG (100 mM)	1,19 g Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid in 50 ml ddH ₂ O, sterilfiltrieren und Aliquots bei -20 °C lagern

Die TOPO TA Cloning-Methode (Invitrogen, Karlsruhe) erlaubt die effiziente Klonierung von PCR-Produkten direkt nach der PCR mit Taq-Polymerase in den Vektor (TOPO TA Cloning User manual). Die Taq-Polymerase hat eine Template-unabhängige Nukleotid-Transferase-Aktivität. Dadurch wird ein zusätzliches Nukleotid (meist dATP) an das 3'-Ende des synthetisierten Strangs angefügt. Der linearisierte Vektor pCR2.1 des TOPO TA Cloning-Kits besitzt an seinen 5'-Enden einzelne Desoxythymidinreste (dTTP). Dieses TA-Anlagern hat bereits eine höhere Effizienz als die Ligation von glatten Enden. Zusätzlich sind die Vektor-Enden mittels DNA-Topoisomerase aktiviert. Topoisomerase I des Vaccinia-Virus bindet mittels einer Tyrosinseitenkette kovalent an das 5'-Phosphat des DNA-Einzelstranges. Diese Bindung konserviert die Energie der gespaltenen Bindung zwischen 3'-Phosphat-Ende des DNA-Abbruches und Tyrosinreste von Topoisomerase I (Tyr-274) und ermöglicht es, die beiden Enden nach der Topoisomerisierung wieder zu verbinden. Für ihre Tätigkeit benötigt das Enzym keine weitere Energie in Form von ATP (Abb. 2.4).

Der Reaktions-Mix wird 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die kompetenten *E. coli*-Zellen mit 2 µl des Reaktionsansatzes transformiert (siehe Kapitel 2.2.2.1).

Insert (PCR-Produkt)	bis 4 µl
Salz-Lösung	1 µl
ddH ₂ O bis Endvolumen 5 µl	X µl
TOPO Vektor	1 µl

Für die positive Blau-Weiß Selektion werden die *E. coli*-Zellen auf Agar-Platten mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) und 40 µl IPTG (100 mM) ausplattiert.

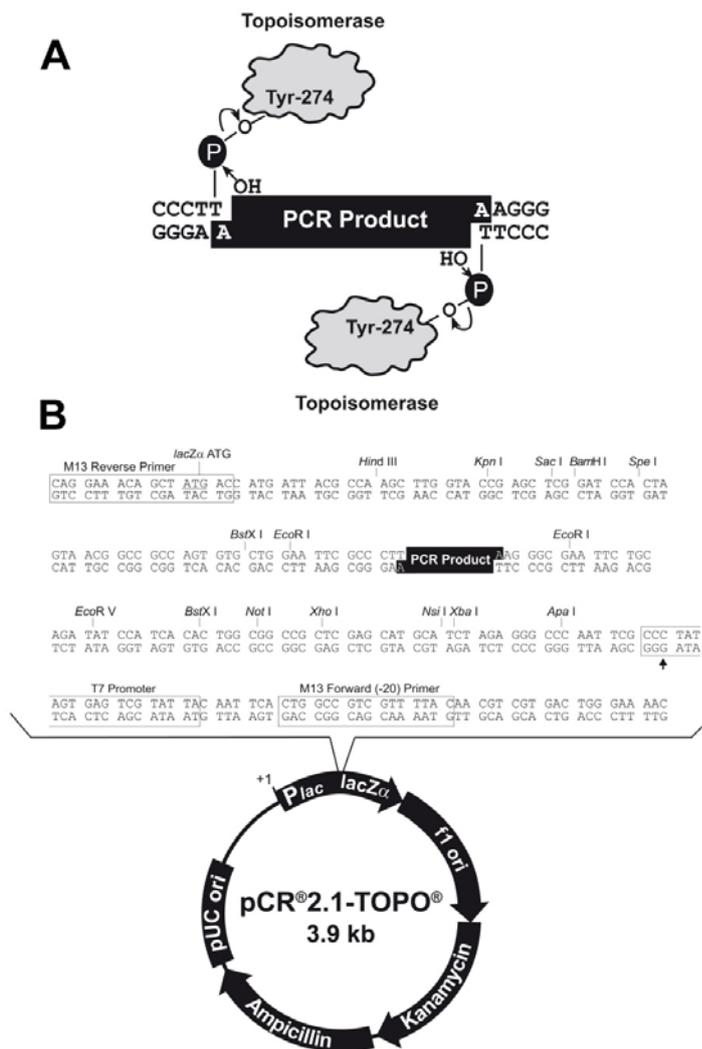


Abb. 2.4 Das Prinzip der TOPO TA Klonierung. A – Ligation mit Hilfe der DNA-Topoisomerase I; B – Vektor pCR2.1-TOPO (TOPO TA Cloning User manual)

2.2.2.3 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde aus *E. coli*-Zellen mit dem NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren) isoliert und in ddH₂O von den Säulen eluiert. Für größere DNA-Mengen wurde das NucleoBond Xtra Midi EF DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren) benutzt.

2.2.2.4 Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen

Für die Herstellung der Glycerinkulturen wurden zuerst Flüssigkulturen von Bakterien angeimpft und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Flüssigkulturen mit 40 % (v/v) sterilem Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

DMEM+GlutaMAX-1	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
OPTI-MEM (1x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
FCS	PAN-Biotech (Aidenbach)
Chicken Serum	PAN-Biotech (Aidenbach)
L-Glutamin (100x)	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin	Gibco Invitrogen (Karlsruhe)
HEPES (1M)	Roth (Karlsruhe), sterilfiltriert
MEM (100x)	PAN-Biotech (Aidenbach)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
DMSO	Roth (Karlsruhe)
Petrischale mit Durchmesser 100 mm	Greiner (Frickenhausen)

HeLa-Zellen wurden entsprechend den Angaben der ATCC (*The American Type Culture Collection*) kultiviert. Zur Passagierung wurden adhärenente Zellen durch kurze Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit frischem DMEM gewaschen. Die DT40-Suspensions-Zelllinie wurde in Petrischalen kultiviert. Die langfristige Lagerung der Zellen erfolgte in FCS mit 10 % DMSO-Anteil bei -150 °C.

HeLa-Medium		DT40-Medium	
DMEM+GlutaMAX-1	500 ml	RPMI 1640	500 ml
FCS	50 ml	FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin (100x)	5 ml	Chicken Serum	5 ml
MEM (100x)	5 ml	Penicillin/Streptomycin (100x)	5 ml
		L-Glutamin (100x)	5 ml
		HEPES (1M)	5 ml
		β-Mercaptoethanol (1%)	1 ml

2.2.3.2 Zellzählung der DT40-Zellen

Trypanblau	Merck, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	0,1 mm Tiefe, Assistent GmbH, Sondheim

Die Zellzählung der DT40-Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Zellen werden zuerst abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Für die Vitalfärbung von Zellen werden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt. Die abgestorbenen Zellen nehmen den Farbstoff auf und werden dadurch dunkelblau angefärbt, die lebendigen Zellen bleiben ungefärbt. Das Gemisch mit Trypanblau wird auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen werden unter dem Mikroskop ausgezählt, und zwar nur in 4 großen Eckquadraten. Die Zahl wird durch 4 geteilt, um einen Mittelwert pro Eckquadrat zu bekommen. Dieser Wert wird dann mit dem Verdünnungsfaktor ($2\times$) multipliziert. Damit erhält man die Anzahl der Zellen pro Mikroliter, oder $\times 10^4$ in einem Milliliter.

2.2.3.3 Zellzählung und Wachstums-Messungen der HeLa-Zellen

CASYTon	Schärfe System Innovatis, Bielefeld
CasyClean	Schärfe System Innovatis, Bielefeld
CasyCups	Schärfe System Innovatis, Bielefeld

Für die Wachstumsstudien wurde die Zellzahl von lebendigen HeLa-Zellen je 24 Stunden mit einem CASYTon Partikelanalysator bestimmt.

Die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS (pH 7,4) gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin 2 min bei 37 °C inkubiert und anschließend in 10 ml DMEM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, bei $300 \times g$ für 5 min zentrifugiert und die Zellpellets in je 1 ml DMEM resuspendiert. Für die Messung mit dem CASYTon wurden 50 µl der Zellsuspension mit 10 ml CASY-Lösung im CasyCups vermischt und das entsprechende Messprogramm verwendet.

Wenn die Zellzahl gleich oder mehr als 5×10^6 war, wurden die Zellen bis 2×10^6 verdünnt, die entsprechenden Verdünnungsfaktoren wurden bei den weiteren Messungen berücksichtigt.

2.2.3.4 Transfektion von DT40-Zellen durch Elektroporation

Amaxa Nucleofector II Device	Lonza, Köln
Cell Line Nucleofector Kit Solution T	Lonza, Köln
Zellkulturmaterialien	Greiner, Frickenhausen

In dieser Studie wurde die Elektroporation mit Hilfe des Amaxa Nucleofectors durchgeführt, um das Par14-Knockout-Konstrukt in die DT40-Zellen einzubringen. Auch für die transiente Flp-Recombinase-Expression wurde die Elektro-Transfektion angewendet.

3×10^6 DT40-Zellen wurden in 100 μ l Amaxa-Solution T (37 °C) resuspendiert. 20 μ g Plasmid-DNA (für das Knockout-Konstrukt wurde die DNA zuvor linearisiert) wurden zur Zellsuspension pipettiert und das ganze Gemisch in die Amaxa Elektroperforations-Küvette übertragen. Die Zellen dürfen nicht länger als 20 min im Transfektionsreagenz bleiben. Für jede Zelllinie gibt es ein spezielles Transfektionsprogramm, für die DT40-Zellen wird das Programm B-23 empfohlen (<http://www.lonzabio.com>). Nach der Transfektion werden die Zellen in die Petrischale übertragen und in 10 ml frischem Medium kultiviert.

2.2.3.5 Selektion der DT40-Zellen auf Antibiotikum-Resistenz

Geneticin-Lösung (G-418)	Roche, Mannheim
Puromycin-Lösung	Gibco Invitrogen, Karlsruhe

Nach der Elektroperforation mit dem Knockout-Konstrukt wurden die transfizierten DT40-Zellen in 50 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension wurde auf zwei 48-wells Kulturplatten (500 μ l pro well) verteilt. Nach 24 Std. wurde das Medium mit Geneticin Lösung (G-418) (Endkonzentration 2 mg/ml) versetzt. Alle zwei Tage wurde das Medium mit G-418 gewechselt. Die Zellen, in denen das Knockout-Konstrukt mit Neomycinresistenz in die genomische DNA integriert wurde, leben weiter und vermehren sich. Die Zellen ohne Antibiotikum-Resistenz sterben ab und werden durch Medium-Wechsel entfernt. Nach etwa zwei Wochen Selektion wurden die einzelnen resistenten Zellkolonien mit einer 50 μ l Pipette gepickt und in neue wells übertragen. Die Klone wurden zwei weitere Passagen lang mit Neomycinmedium kultiviert. Anschließend wurde aus diesen Klonen genomische DNA extrahiert und mittels Southern Blot untersucht.

Während der Flp-Recombinase-Expression zur Entfernung der Neomycin-Resistenzkassette wurden die DT40-Zellen unter Puromycin-Selektion gesetzt. Nach Elektro-Transfektion mit dem Flpase-Expression-Plasmid wurden die Zellen in 10 ml frisches Medium in einer

Petrischale übertragen und nach 2 Std wurde das Puromycin (Endkonzentration 0,5 µg/ml) dazugegeben. Die Puromycin-Selektion dauerte 30 Std.

2.2.3.6 Induzierte Gendeletion mittels des Cre/loxP-Systems

4-Hydroxytamoxifen Sigma-Aldrich, Steinheim

In dieser Studie wurden DT40-Zellen mit induzierbarer Cre-Rekombinase-Aktivität verwendet. Die stabile Zelllinie DT40-MerCreMer exprimiert ein Fusionsprotein bestehend aus der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 und zwei mutierten Östrogenrezeptoren von Maus (MER - Mutated Estrogen Receptor), die die Rekombinase N- und C-terminal flankieren (Verrou et al., 1999). Hsp90-Protein (heat shock protein 90), das sich hauptsächlich im Cytosol der Zellen befindet, bindet mit gespaltenen mutierten Östrogenrezeptoren und dadurch bleibt das ganze Fusionsprotein (MerCreMer) im Cytosol (Abb. 2.5). Durch Zugabe des Östrogen-Derivates 4-Hydroxytamoxifen (4-HT) ändern die MER-Proteine ihre Konformation, das MerCreMer-Fusionsprotein dissoziiert von Hsp90 und dadurch kann es in den Zellkern wandern. Dort erkennt die Cre-Rekombinase eine 34 bp lange Erkennungssequenz (locus of crossover in P1; loxP-Sequenz) und kann so die Rekombination loxP-flankierter „ge-flocter“ DNA-Abschnitte einleiten.

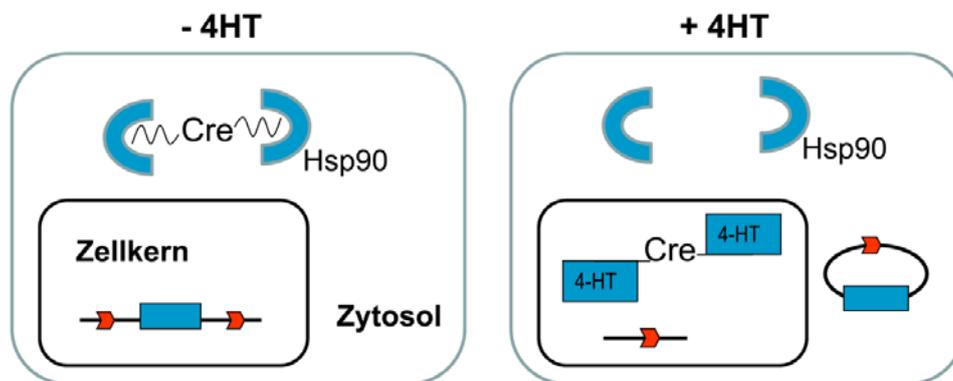


Abb. 2.5 Schema des Mechanismus von Cre/loxP-Systemen in DT40-Zellen

Nach dem Austausch des ersten Allels wurden die DT40-Zellen zur Kontrolle im Kulturmedium mit 200 nM 4-HT 24 Std geerntet. Anschließend wurde die DNA-Extraktion durchgeführt und die gewonnene DNA mit Southern Blot auf erfolgreiche Cre-Rekombination untersucht.

2.2.3.7 Transfektion von HeLa-Zellen mit Lipofectamine 2000

Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
OPTI-MEM (1x)	Gibco Invitrogen, Karlsruhe

HeLa-Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion in HeLa-Medium ohne Antibiotikum bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für die Transfektion wurden die Zellen 2×10^6 in 10 cm Petrischale mit frischem 10 ml HeLa-Medium ausgesät und 2 Std. inkubiert.

Das Reagenz zur Transfektion für 2×10^6 Zellen wurde wie folgt angesetzt: 15 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) in 1,5 ml OPTI-MEM aufgelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zum Lipofectamine-Gemisch 300 pmol siRNA in 1,5 ml OPTI-MEM gegeben und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS (pH 7,4) gewaschen und mit 3 ml des Transfektions-Mix 4 Stunden inkubiert, danach einmal mit 10 ml PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend mit 10 ml frischem HeLa Medium weiter kultiviert.

2.2.3.8 Titration der siRNA-Konstrukte

Um die optimale Konzentration der siRNA-Konstrukte für den Par14/17-Knockdown zu bestimmen, wurde ein Titrationsversuch durchgeführt. 3×10^6 HeLa-Zellen wurden mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) und dem Konstrukt si418 in einer Konzentrations-Reihe von 600 pmol, 300 pmol, 150 pmol und 75 pmol transfiziert. Als Referenz wurde das Konstrukt siRNA-Kontrolle bei einer Konzentration von 600 pmol benutzt.

Das Pipettierschema:

	si418				siRNA-Kontroll
siRNA in 1,5 ml OPTI-MEM	600 pmol	300 pmol	150 pmol	75 pmol	600 pmol
Lipofectamine 2000 in 1,5 ml OPTI-MEM	30 µl	15 µl	7,5 µl	3,75 µl	30 µl

Nach drei Tagen wurde die Zellzahl dieser Zellen mit dem CASYTon bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.3). Die Konzentrationen von 75 pmol und 150 pmol von si418 zeigten keine Reduktion des Wachstums, 300 pmol und 600 pmol vermindern dagegen stark die Teilung der Zellen. Da die Wachstumsreduktion der Zellen schon mit 300 pmol von siRNA beobachtet wurde, wurden 300 pmol aller siRNAs für die weiteren Versuche verwendet.

2.2.3.9. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

FACSCalibur	BD Biosciences (Heidelberg)
FACS Röhrechen	BD Biosciences (Heidelberg)

Die Durchflusszytometrie ist eine Technologie, die verschiedene physikalische Eigenschaften einzelner Partikel, meist Zellen, gleichzeitig misst und analysiert. Die einzelnen Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbei geführt. Dabei werden die folgenden Eigenschaften der Partikel gemessen: die relative Partikelgröße (FSC), die relative Granularität oder interne Komplexität (SSC) und die relative Fluoreszenzintensität in verschiedenen Kanälen. Eine besondere Form der Durchflusszytometrie erlaubt die Sortierung von Fluoreszenz-markierten Zellen entsprechend ihrer Färbung. Entsprechende Geräte werden als FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) bezeichnet.

Das Prinzip jeder Messung basiert auf zwei physikalischen Eigenschaften: Lichtstreuung und Fluoreszenz. In der Physik versteht man unter Streuung die Ablenkung eines Objektes durch Wechselwirkung mit einem anderen Objekt. Wenn die Zelle im FACS-Gerät einen Lichtstrahl passiert, lenkt sie diesen aufgrund ihrer Größe und interner Komplexität ab. Dabei werden das Vorwärtstreuilight (*Forward Scatter*, FSC) und das Seitwärtstreuilight (*Side Scatter*, SSC) gemessen (Abb. 2.6). Das FSC ist proportional zur Zelloberfläche oder Zellgröße und entspricht hauptsächlich dem gebeugten Licht. Das SSC ist proportional zur internen Komplexität, auch Zellgranularität genannt, und entsteht aus der Messung des gebrochenen und reflektierten Lichtes.

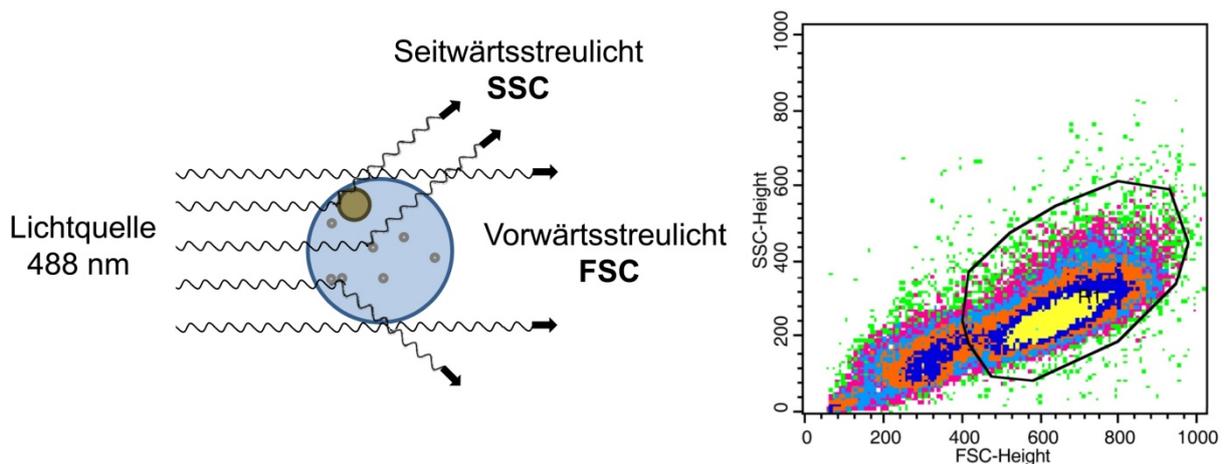


Abb. 2.6 Merkmale der Lichtstreuung einer Zelle (links) und die Darstellung deren bei FACSCalibur (rechts).

Neben dem gestreuten Licht kann im Durchflusszytometer auch die Fluoreszenz gemessen werden. Fluoreszenz kann als Absorption von kurzwelligem Licht mit der gleichzeitigen Emission von Licht größerer Wellenlänge beschrieben werden. Bestimmte Elektronen von

fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochrome) können Photonen vom Anregungslaser (beim FACSCalibur ist es ein Argon-Laser mit 488 nm Wellenlänge) absorbieren und dadurch in ein höheres Energieniveau gelangen. Da dieses angeregte System instabil ist, verlieren die Elektronen die absorbierte Energie und fallen deshalb auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei setzen sie die aufgenommene Energie wieder frei und es kommt zur Emission des Fluoreszenzlichtes. Das emittierte Licht ist immer etwas energieärmer als das Anregungslicht, weil ein Teil der Energie auch in Wärme umgesetzt wird.

Der Bereich der emittierten Wellenlängen für ein bestimmtes Fluorophor wird als Emissionsspektrum bezeichnet. Der Bereich des Lichtes, innerhalb dessen eine Einzelverbindung angeregt werden kann, wird als Absorptionsspektrum bezeichnet. Für jedes Fluorophor existieren eigene Absorption- und Emissionsspektren, einige Spektren von in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffen (7-AAD, BrdU-FITC) sind in Abb. 2.7 dargestellt.

Dabei muss man beachten, dass für jede FACS-Messung außer analysierten Proben auch zwei Kontroll-Proben benötigt werden, um die korrekte Einstellungen am FACS-Gerät einzustellen (Blank-Kontrolle, die Zellen nicht gefärbt sind, und gefärbte Zellen vom Wildtyp).

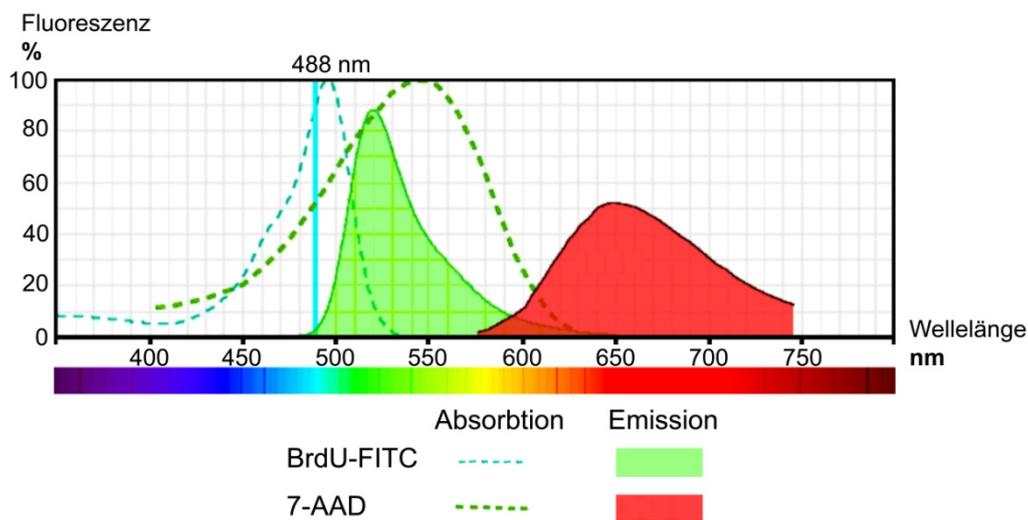


Abb. 2.7 Fluoreszenzspektren von 7-AAD und BrdU-FITC (verändert nach BD Fluorescence Spectrum Viewer http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp)

2.2.3.10 Zellzyklusanalyse mit 7-AAD

7-AAD BD Biosciences (Heidelberg)

7-Aminoactinomycin (7-AAD) ist ein Fluoreszenz-Farbstoff mit großer Affinität zu doppelsträngiger DNA (Abb. 2.8). Dabei interkaliert 7-AAD spezifisch zwischen Cytosin und Guanin und verändert seine Fluoreszenzeigenschaften stark. Das Absorptionsmaximum von

7-AAD liegt bei 546 nm und das Emissionsmaximum bei 647 nm (Abb. 2.7). Deswegen kann 7-AAD in Kombination mit anderen Fluorophoren für eine mehrfarbiger Analyse verwendet werden.

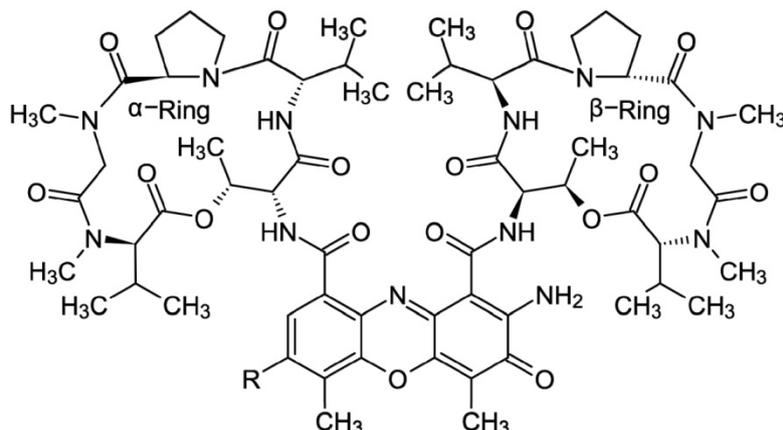


Abb. 2.8 Chemische Formel von Fluorophor 7-AAD

HeLa-Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS (pH 7,4) gewaschen, mit 1 ml Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe) 2 Min bei 37 °C inkubiert und anschließend in 10 ml DMEM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei $300 \times g$ für 5 min zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 5 ml PBS gewaschen und 5 Min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Die Zellen wurden in 200 μ l PBS resuspendiert und nach Zugabe von 2 ml 70% EtOH bei -20 °C 2 Std. inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension 5 Min bei $300 \times g$ und +4°C zentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS mit 0,02% Triton X auf Eis 10 min inkubiert, anschließend einmal mit 5 ml PBS gewaschen und nochmal zentrifugiert.

Die Zellpellets wurden danach in 200 μ l PBS mit 10 μ l 7-AAD (BD Biosciences) resuspendiert und 10 Min bei RT vor der sich anschließenden FACS-Messung inkubiert.

Für jede dieser Messungen werden außer den zu analysierten Proben auch zwei Kontrollproben benötigt, um die korrekte Einstellungen am FACS-Gerät einzustellen. Zum einen die „Blank“-Kontrolle, Zellen, die nicht gefärbt sind, sowie gefärbte Zellen vom Wildtyp.

2.2.3.11. Proliferations-Assay mit FITC-BrdU

FITC-BrdU Kit	BD Biosciences (Heidelberg)
7-AAD	BD Biosciences (Heidelberg)

Zur Markierung der proliferierenden Zellen wurde 5-Brom-2-Desoxyuridin (BrdU) verwendet (Abb. 2.9). BrdU ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. Es kann von vitalen Zellen aufgenommen werden und in phosphorylierter Form (als

Nukleotid) während der Synthese-Phase des Zellzyklus anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Spezifische Antikörper gegen BrdU können danach eingesetzt werden, um die stattgefundene DNA-Synthese immunchemisch nachzuweisen. Im verwendeten Kit (BD Biosciences) wird BrdU mittels eines FITC gekoppelten Antikörper detektiert.

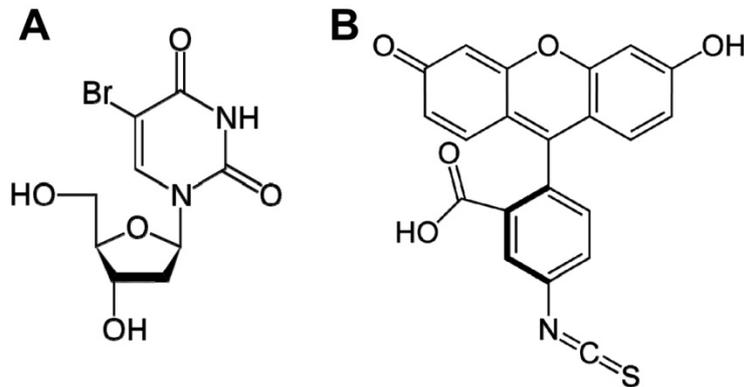


Abb. 2.9 Bestandteile des BrdU-Labeling Kits von BD Biosciences.
A – 5-Brom-2-desoxyuridin; B – Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) ist ein fluoreszierender Farbstoff aus der Gruppe der Xanthenfarbstoffe. Er hat sein Absorptionsmaximum bei 496 nm und sein Emissionsmaximum bei 521 nm, somit liefert er ein grünes Fluoreszenzsignal.

3×10^6 HeLa-Zellen wurde 2 Std in Kulturmedium mit BrdU-Lösung (Endkonzentration 10 μ M) inkubiert und anschließend nach den Angaben des Herstellers des Kits bearbeitet und gefärbt.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung eines Konstrukts für den Par14-Knockout in DT40-Zellen

Die zelluläre Funktion von Par14 war bis zum aktuellen Zeitpunkt trotz mehrerer Studien immer noch unklar (siehe Kapitel 1). Aus früheren Studien war bekannt, dass die Änderungen im Phänotyp nur bei der Reduktion von Ess1, einem anderen Vertreter der PPIase-Familie in *Saccharomyces cerevisiae*, auf unter 95 % der zellulären Proteinkonzentration erkennbar sind (Gemmill et al., 2005). Diese Eigenschaft könnte auch bei einem Knockdown von Par14 auftreten. Eine Effizienz von mindestens 95 % beim mRNA-Knockdown ist nicht immer erreichbar. Außerdem treten bei Knockdown-Verfahren häufig Off-target-Effekte auf. Dabei handelt es sich um eine Übereinstimmung (*mismatch*) zwischen siRNA und mRNA von anderen wichtigen Genen. Dies kann eine unspezifische Gen-Suppression induzieren, so dass die mRNA-Levels von anderen nicht-gezielten Genen reduziert werden (Jackson et al., 2003). Deswegen wurde die Knockout-Methode für dieses Projekt bevorzugt.

Für den Knockout von Par14 sollte eine stabile Hühner B-Lymphozyten DT40 Zelllinie verwendet werden. Dieses System ist weit weniger komplex und aufwendig als der Knockout in einem Mausmodell. Letztens enthält zudem zahlreiche Pseudogene von Par14, die die Knockout-Effizienz verringern könnten. Die DT40-Zellen weisen eine sehr hohe homologe Rekombinationsrate auf. Desweiteren ermöglicht die Zelllinie DT40-MerCreMer (siehe Kapitel 2.2.3.6) einen induzierbaren Knockout mittels induzierbarer Cre-Rekombinase-Aktivität (Buerstedde and Takeda, 1991). Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Schritte der Klonierung eines Knockout-Konstrukts und die Charakterisierung der erhaltenen DT40-Mutanten beschrieben.

3.1.1 Par14-Locus im Hühner-Genom

In einem ersten Schritt wurde nach der genomischen Sequenz des Par14-Locus des Haushuhns im Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) gesucht. Dieser Locus ist in 41 verschiedenen Species sequenziert (Tabelle 3.1, Kapitel 3.2.1), unter diesen ist auch *Gallus gallus*. Im Hühner-Genom befindet sich der Par14-Locus auf Chromosom 4 und besteht aus 4 hoch konservierten Exons sowie 3 relativ kurzen Introns (Abb. 3.1 A).

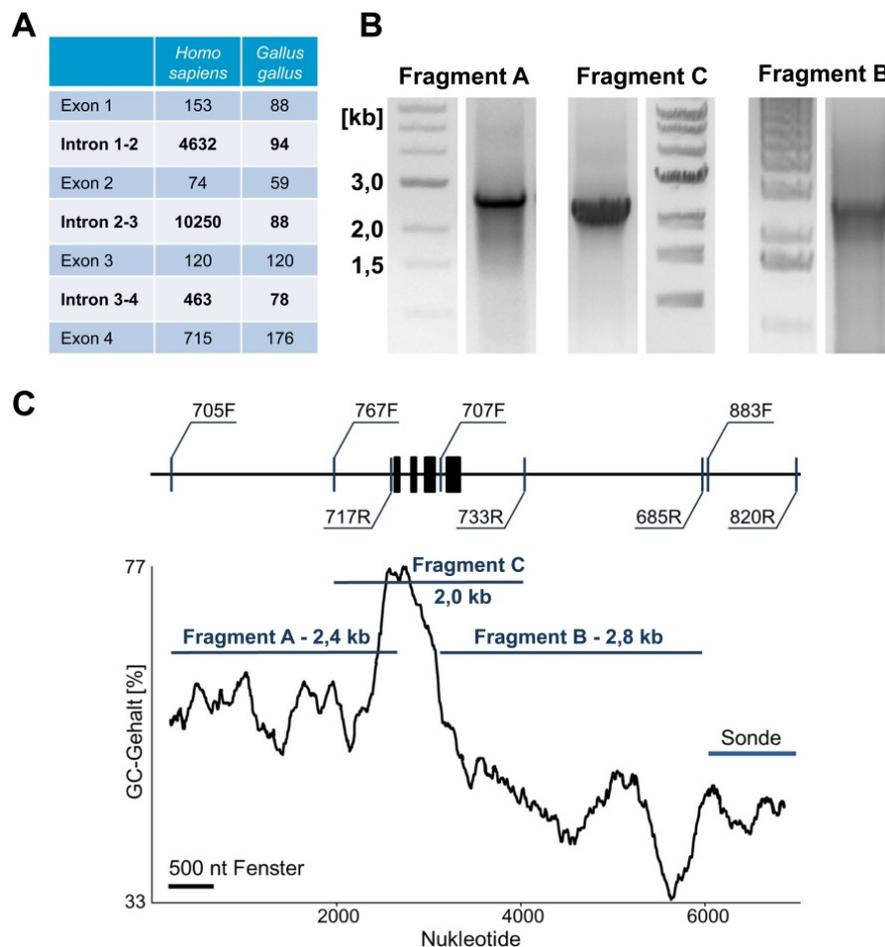


Abb. 3.1 Par14-Locus von *Gallus gallus*. A - Vergleich des Par14-Locus von *Gallus gallus* und *Homo sapiens*; B - Amplifikation des Nukleotidsequenzen; C - GC-Gehalt und Amplifikationsprimer

Der Par14-Locus ist in Contig 11.115 enthalten und hat einen GC-Gehalt von bis zu 77 % (gleitender Durchschnitt über 500 nt). Die PCRs wurden auf denaturierter genomischer DNA mit verschiedenen Zusatzstoffen (DMSO, Mg^{2+}), PCR-Programmen und Polymerasen (mi-Taq, mi-Pfu, DeepVent) durchgeführt, jedoch ohne eindeutige Amplifikationsprodukte. Daher sollte versucht werden, den Par14-Locus zu teilen und diese Teile (Fragmente A, B und C) getrennt zu amplifizieren (Abb. 3.1 B und C). Um die Effizienz der PCR und die Ausbeute an PCR-Produkt zu erhöhen, wurden die PCRs auf BAC-DNA durchgeführt (CHORI-261-100A14 in pTARBAC2.1, siehe Kapitel 2.1.6). BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) ist ein künstliches Chromosom aus dem F-Plasmid (Fertilitätsplasmid) von *E. coli*, das relativ große DNA-Fragmente (von 350 kB bis 700 kB) enthalten kann (Shizuya et al., 1992). In unserem Fall enthält das BAC nur das Contig 11.

Das Knockout-Konstrukt für den Par14-Locus beinhaltet die 5'-genomische Sequenz mit endogenem Promoter und die 3'-Sequenz mit der Polyadenylierungsstelle von Parvulin 14. Für eine hohe Effizienz der homologen Rekombination müssen diese Sequenzen homolog zur Nukleotidsequenz des Allels sein.

Bei dem geplanten Par14-Knockout werden die Exons 2, 3, 4 sowie auch die

Polyadenylierungsstelle mittels induzierbarer Cre-Rekombinase ausgeschnitten. Dabei entsteht ein nicht-funktionales Protein ohne PPIase-Domäne, das nach der Translation abgebaut wird. Bei dieser Strategie bleibt der Promotor unverändert, so dass vom veränderten Allel vor der Induktion immer noch funktionale Par14-mRNA abgeschrieben wird. Für diese Art des Knockouts muss die kodierende Sequenz (Exons 2, 3, 4 und die Polyadenylierungsstelle) mit LoxP-Sites auf beiden Seiten flankiert werden („gefloxt“). LoxP-Sites sind die Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase, die aus 34 Nukleotiden bestehen: 13 Nukleotide auf beiden Seiten sind palindromische Bindemotive; 8 Nukleotide in der Mitte sind die Orientierungssequenz und bestimmen die Richtung für die Cre-Rekombinase. Zwischen den Exons 1 und 2 wurde innerhalb von Intron 1-2 die erste LoxP-Site mittels QuikChange eingefügt (siehe Kapitel 2.2.1.9). Die zweite LoxP-Site ist in der Neomycin-Resistenz-Kassette vorhanden, die im Konstrukt in etwa 630 Nukleotide in 3'-Richtung vom Stop-Codon entfernt liegt. Die Neo-Kassette wird als ein Selektionsmarker beim Austausch beider Allele verwendet. Deswegen muss es eine Möglichkeit geben, diese Kassette auszuschneiden, um diesen Marker später wiederzuverwenden. Dafür dient das FLP-Rekombinase-System (Schaft et al., 2001). Die Neomycin-Resistenz-Kassette ist von beiden Seiten mit FRT-Sequenzen (Erkennungssequenzen für FLP-Rekombinase) flankiert, mit Hilfe derer den markierten DNA-Abschnitt aus dem Allel entfernt wird.

Im Folgenden werden die Klonierungsschritte in Einzelheiten beschrieben.

3.1.2 Klonierung des Par14-Knockout-Konstrukts

3.1.2.1 Klonierung des 5'- Bereiches des Konstrukts (PCR-Fragment A)

Der 5'-Arm des Knockout-Konstrukts (PCR-Fragment A) wurde mit den Primern 705F und 717R amplifiziert, TOPO kloniert und sequenziert (BC 804, siehe Kapitel 2.1.6) (Abb. 3.2). In dieser Sequenz ist eine endogene SacII-Schnittstelle vorhanden, über die später die Fragmente ligiert werden.

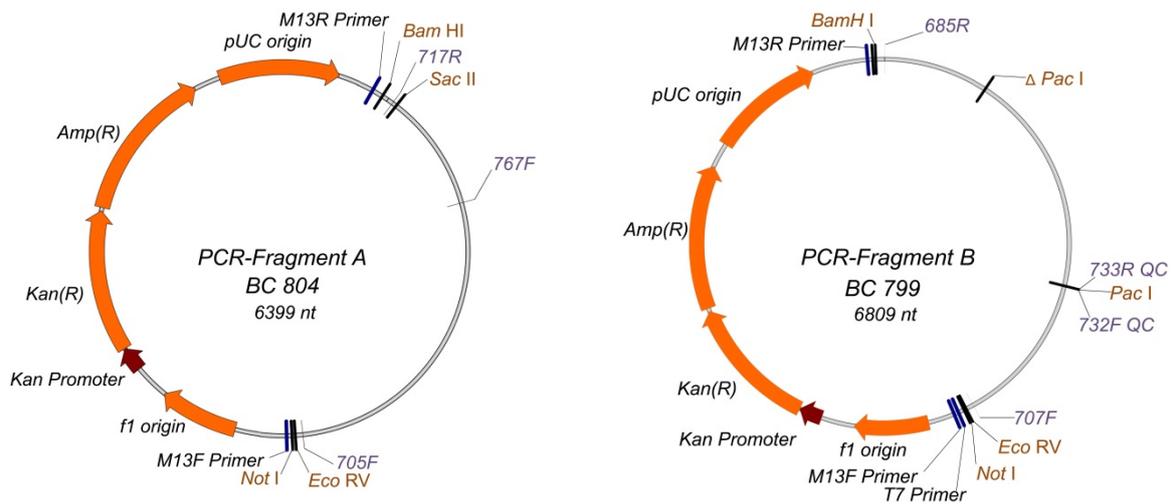


Abb. 3.2 Karten der Klonierungs-Plasmiden mit PCR-Fragment A (links) und PCR-Fragment B (rechts)

3.1.2.2 Klonierung des 3'-Bereiches des Konstrukts (PCR-Fragment B)

PCR-Fragment B wurde mit den Primern 707F und 685R amplifiziert, kloniert und sequenziert (BC 799, siehe Kapitel 2.1.6). Innerhalb des 3'-Arms des Knockout-Konstrukts sollte später mittels PacI-Schnittstelle die Neomycin-Resistenz-Kassette eingefügt werden. Diese darf nicht zu weit vom Stop-Codon liegen (Maximum 800 nt), um die Effizienz der homologen Rekombination nicht zu beeinträchtigen. Eine schon vorhandene endogene PacI-Schnittstelle, die zu weit entfernt lag, wurde deshalb mutiert. Dazu wurde das Plasmid mit Pac I verdaut und nach dem Klenow-Füllen mit T4-Ligase wieder ligiert. Eine neue PacI-Stelle wurde mittels QuikChange-Technik mit den Primern 732F und 733R, 630 nt vom Stop-Codon entfernt, eingefügt (Abb. 3.2).

3.1.2.3 Klonierung von PCR-Fragment C

Das PCR-Fragment C wurde unter verbesserten PCR-Eigenschaften für GC-reiche Sequenzen mit dem Forward-Primer 767 und QuikChange-Reverse-Primer 733, der eine PacI-Schnittstelle enthielt, amplifiziert und anschließend in den TOPO-Vektor kloniert (BC 992, Abb. 3.3). Die LoxP-Site wurde mit den Primern 770F und 771R mittels QuikChange-Technik zwischen Exons 1 und 2 im Intron 1-2 eingefügt.

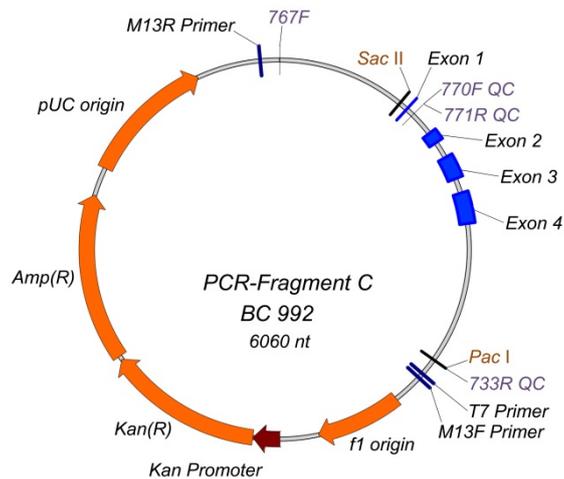


Abb. 3.3 Karte des Plasmids von BC 992 mit PCR-Fragment C

3.1.2.4 Ligation der Fragmente A und B

In einem weiteren Schritt wurde das PCR-Fragment A in das Plasmid mit dem PCR-Fragment B eingefügt. Dabei sollten die Fragmente so orientiert sein, dass das 3'-Ende des Fragments A mit dem 5'-Ende des Fragments B verknüpft wird. Dafür wurde Plasmid-DNA mit dem PCR-Fragment A (BC 804) zuerst mit BamHI verdaut, das am 3'-Ende von Fragment A schneidet. Danach wurden diese klebrigen BamHI-Enden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und die DNA anschließend mit dem Restriktionsenzym NotI verdaut. Das gewonnene Fragment besitzt am 5'-Ende die klebrigen Enden der NotI-Restriktion und am 3'-Ende die glatten Enden. Es wurde nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese gereinigt.

Die Plasmid-DNA mit dem PCR-Fragment B nach der @PacI-QuikChange wurde mit NotI und EcoRV verdaut. Beide Enzyme schneiden im 5'-Bereich des Fragmentes B: NotI mit klebrigen Enden und EcoRV mit glatten Enden (siehe Abb. 3.2). Somit werden die klebrigen Enden der NotI-Restriktion sowie die glatten Enden von EcoRV und BamHI nach Klenow-Füllen mittels T4-DNA-Ligase in der richtigen Orientierung zusammengefügt (Abb. 3.4).

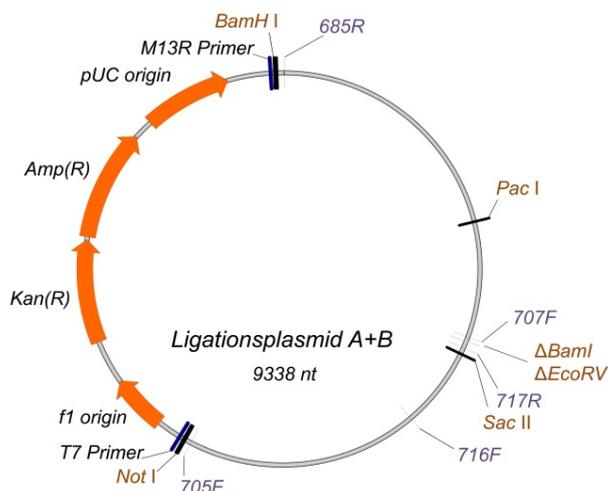


Abb. 3.4 Karte vom Ligationplasmid A+B

3.1.2.5 Insertion des Exon-haltigen Fragments C in das Ligationsplasmid A+B

In dem Ligationsplasmid A+B ist eine *Sac*II-Schnittstelle (im Fragment A) und eine *Pac*I-Schnittstelle (im Fragment B) enthalten, die im Folgenden zur Insertion des PCR-Fragmentes C sowie zum Einfügen der Neomycin-Resistenz-Kassette verwendet wird.

Ligationsplasmid A+B und das Plasmid mit PCR-Fragment C wurden mit *Sac*II und *Pac*I verdaut und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 3.5 A). Dabei wurden aus dem Gel zwei Restriktionsprodukte ausgeschnitten: eine Bande von etwa 8,3 kB von dem Ligationsplasmid A+B und eine andere Bande von etwa 1,45 kB von dem Plasmid mit PCR-Fragment C. Diese Produkte wurden aufgereinigt und anschließend zusammen ligiert (Abb. 3.5 B). Zusammenfassend wurde der gesamte *Par14*-Locus aus drei getrennt amplifizierten Teilen in ein Plasmid kloniert.

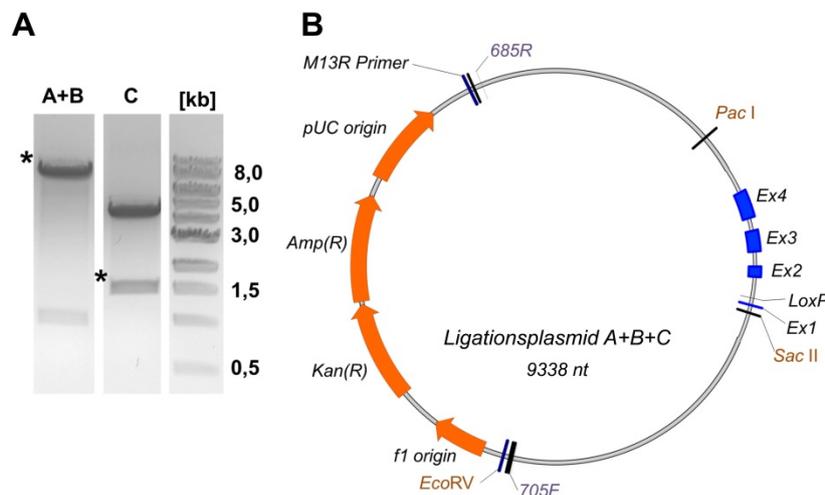


Abb. 3.5 Insertion des Exon-haltigen Fragment C in das Ligationsplasmid A+B. A – Restriktion des Ligationsplasmid A+B und Plasmide mit Fragment C mit *Sac*II und *Pac*I. Die Banden etwa 8,3 kB und etwa 1,45 kB sind mit * markiert; B – Karte vom Klonierungs-Plasmid nach der Ligation A+B+C

3.1.2.6 Einfügen der Neomycin-Resistenz-Kassette

Die Neomycin-Resistenz-Kassette (1,7 kB) wurde aus dem Plasmid pBSKSPacloxPFrt-NEOFrt#26 (BC 795) mit *Pac*I ausgeschnitten (Brummer et al., 2002). Das Ligationsplasmid A+B+C (etwa 9,76 kB) wurde ebenfalls mit *Pac*I linearisiert und mittels Gelelektrophorese gereinigt (Abb. 3.6 A). Die Ligation wurde mit Ligase T4 durchgeführt.

In diesem finalen Konstrukt (BC 867, Abb. 3.6 B) befindet sich die erste *LoxP*-Site im Intron 1-2. Die zweite *LoxP*-Site liegt am 5'-Ende der Neo-Kassette. Für eine Cre-vermittelte Deletion müssen die beiden *LoxP*-Sites in die gleiche Richtung orientiert sein, was mittels Sequenzierung überprüft wurde.

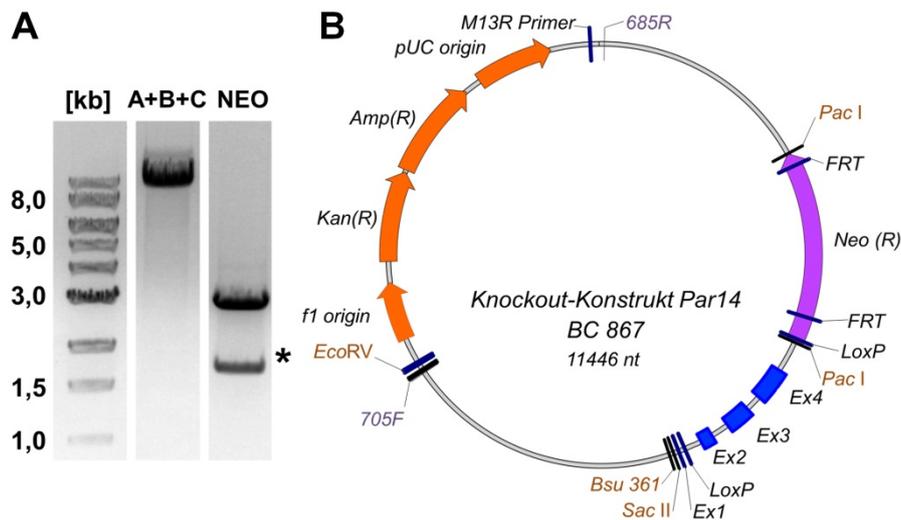


Abb. 3.6 Einfügen der Neo-Kassette. A – Gelelektrophorese nach dem PacI-Verdau; B - Vektorkarte des Knockout-Konstrukts nach dem Einfügen der Neomycin-Resistenz-Kassette (BC 867)

Das ganze Konstrukt wurde komplett sequenziert, um mögliche PCR- und Klonierungsfehler zu detektieren. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NucleoBond Xtra Midi EF DNA Purification Kits (Macherey-Nagel, Düren) isoliert.

3.1.3 Austausch des ersten Allels von Par14 in DT40-Zelllinie

Das finale Knockout-Konstrukt für den Par14-Locus besteht aus einer genomischen 5'-Sequenz mit endogenem Promoter und eigener 3'-Sequenz einschließlich einer möglichen Polyadenylierungsstelle von Parvulin 14. Im Intron 1-2 befindet sich die erste LoxP-Erkennungssequenz für die Cre-Rekombinase. Die zweite LoxP-Site ist am 5'-Ende der Neo-Resistenz-Kassette vorhanden, die im Konstrukt nach den Exons 2, 3, 4 und etwa 630 Nukleotide vom Stop-Codon entfernt liegt. Außerdem besitzt die Neo-Kassette die FRT-Erkennungssequenzen, die für die Flp-Rekombinase notwendig sind.

In Abb. 3.7 ist die geplante Klonierungsstrategie von DT40-MerCreMer-Zellen Par14^{-/-} dargestellt. Die erste Transfektion von DT40-Zellen mit dem Par14-Knockout-Konstrukt und die Neomycin-Selektion führen zum Austausch des ersten Allels vom Par14-Gen. Danach sollten die positiven Klone mit Flp-Rekombinase-Expressionsplasmid transfiziert und gegen Puromycin selektiert werden. Die Flp-Rekombinase schneidet die Neo-Resistenzkassette aus dem ausgetauschten Allel aus und ermöglicht damit, diesen Selektionsmarker später auch für den Austausch des zweiten Allels zu verwenden. Nach jedem Schritt wird der Erfolg mittels Southern Blot überprüft. Anschließend werden die gleichen Schritte für das zweite Allel wiederholt. Um den Par14-Knockout zu induzieren, werden die DT40-Mutanten 24 Std. mit 200 nM 4-Hydrotamoxifen im Kulturmedium inkubiert. Dabei wandert die Cre-Rekombinase

in den Zellkern und schneidet die kodierende Sequenz von Exons 2, 3, 4 und die Polyadenylierungsstelle aus dem Par14-Locus aus.

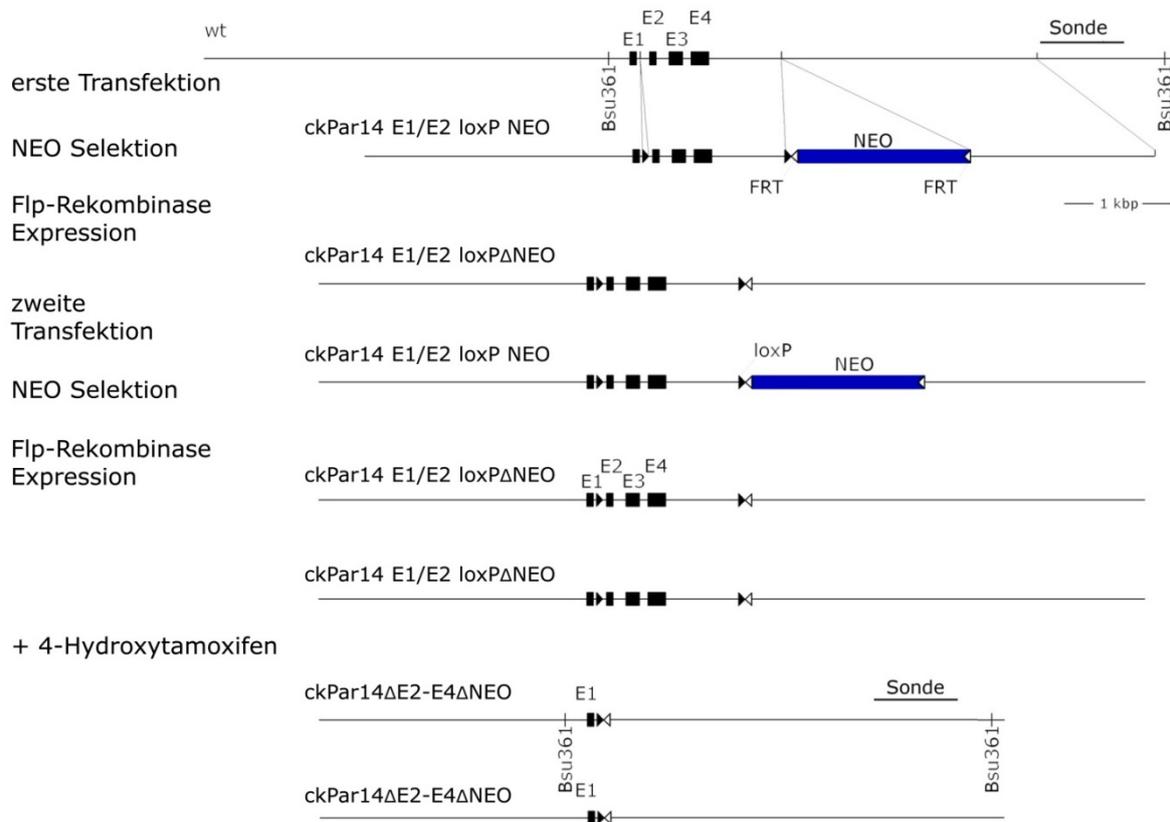


Abb. 3.7 Die Klonierungsstrategie der DT40-Mutanten für den Knockout von Par14

Für den Austausch des ersten Allels wurde Plasmid-DNA des oben beschriebenen Knockout-Konstrukts (BC 867) mit dem Restriktionsenzym EcoRV linearisiert und gereinigt. Wildtyp-DT40-MerCreMer-Zellen wurden mit dem linearisierten Knockout-Konstrukt mit dem Amaxa Nucleofector transfiziert (siehe Kapitel 2.2.3.4) und anschließend zwei Passagen gegen Neomycin selektiert (siehe Kapitel 2.2.3.5).

Nach der Selektion wurden insgesamt 34 Klone mittels Southern Blot auf die erfolgreiche Rekombination hin getestet. Lediglich einer davon, Klon11, konnte als positiv identifiziert werden (Abb. 3.8 A). Die Allele von Wildtyp-DT40-Zellen sind nach dem Verdau mit Bsu361I etwa 6,3 kB groß. Der positive Klon 11 zeigt im Southern Blot zwei Banden: eine 6,3 kB-große Bande, die dem Wildtyp entspricht, und zusätzliche eine etwa 8,0 kB-große Bande, die mit der erfolgreichen Insertion der 1,7 kB-umfassenden Neomycin-Resistenzkassette mit FRT- und LoxP-Sites, erklärt werden kann.

3.1.4 Expression von Flp-Rekombinase im positiven Klon 11

Damit zur zielgerichteten Veränderung des zweiten Allels wieder die Neomycin-Resistenz als Selektionsmarker verwendet werden kann, muss die schon vorhandene Resistenz-Kassette aus dem ersten Allel mittels Flp-Rekombination entfernt werden. Dazu wurden DT40-Zellen des Klon 11 (ckPar14 E1/E2 loxP NEO) mit einem Flp-Rekombinase-Expressionsplasmid (BC 805) transfiziert und 24 Std gegen Puromycin selektiert (siehe Kapitel 2.2.3.5). Während der Selektion schneidet die Flp-Rekombinase die mit FRT-Sites flankierte NEO-Kassette (etwa 1,4 kB) aus dem ersten Allel aus. Dies wurde mit dem Southern Blot nachgewiesen (Abb. 3.8 A). Nicht transfizierte Zellen werden durch das Puromycin abgetötet.

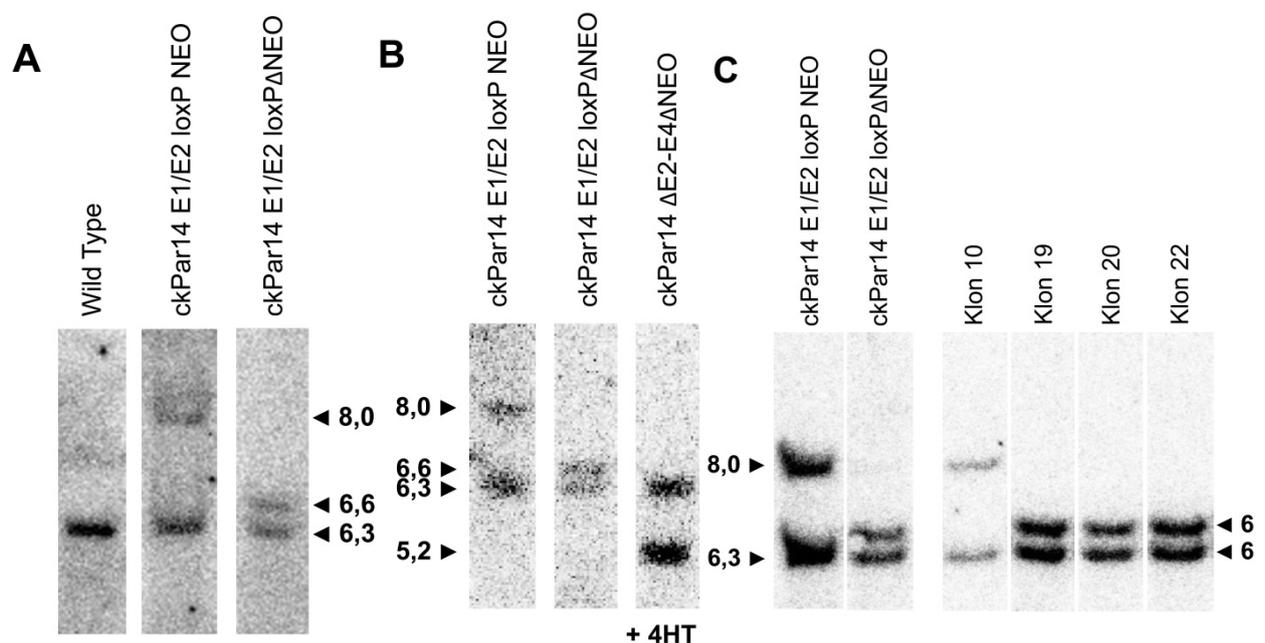


Abb. 3.8 Die Ergebnisse von Southern Blot. A – nach dem ersten Austausch. B - Klon11 nach Kultivierung mit 4-Hydroxytamoxifen. C – nach dem Austausch von zweitem Allel

Um zu prüfen, ob sowohl die LoxP-Site innerhalb des Intron 1-2 inseriert wurde als auch das Cre-Recombinase-System funktioniert, wurden DT40-Zellen vom Klon 11 (ckPar14 E1/E2 loxP ΔNEO) 24 Std in Medium mit 4-Hydroxytamoxifen kultiviert, was dazu führt, dass die nukleäre Cre-Aktivität induziert wird (siehe Kapitel 2.2.3.6). Die extrahierte DNA dieser Zellen wurde dann im Southern Blot untersucht (Abb. 3.8 B).

Die DNA von Zellen ckPar14 E1/E2 loxP ΔNEO hat im Southern Blot zwei Banden mit unterschiedlicher Größe: eine 6,3 kB-große Bande, die dem Wildtyp-DT40-Zellen gehört, und eine etwa 6,6 kB-große Bande, die dem ersten ausgetauschten Allel mit LoxP-Site nach der Deletion der Neo-Kassette (ΔNEO) durch Flp-Rekombinase-Expression entspricht. Nach der Behandlung der Zellen ckPar14 ΔE2-E4 ΔNEO mit 4-Hydroxytamoxifen wurde die Größe

des ausgeknockten Allels geändert. Das Allel nach der Cre-Rekombinase-Aktivität war etwa 5,2 kB groß, was eine Deletion von 1,4 kB DNA-Abschnitt (dem LoxP-markierte Teil von Exon 2, 3, 4 und Polyadenylierungsstelle des Par14-Loci) entspricht.

3.1.5 Austausch des zweiten Par14-Allels in DT40-Zellen

Für den Austausch des zweites Allels wurden DT40-Zellen des Klons 11 (ckPar14 E1/E2 loxP Δ NEO) mit der linearisierten Plasmid-DNA (BC 867) transfiziert und gegen Neomycin selektiert. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt. Nach der Selektion wurden insgesamt 140 Klone isoliert. Die Ergebnisse des Southern Blots haben gezeigt, dass die Homologie-Rekombination nach der zweite Transfektion stattgefunden hat, aber bei keinem dieser Klone war ein Austausch des zweiten Par14-Allels erfolgt (Abb. 3.8 C).

Einige Klone, z. B. Klone 19, 20, 22, zeigten zwei Banden unterschiedlicher Größe: etwa 6,3 kB des Wildtyp-Allels und 6,6 kB vom ersten Austausch. Sämtliche Klone waren gegen Neomycin resistent. Da die Neomycin-Resistenz-Kassette jedoch nicht am Par14-Locus eingebaut wurde, kann vermutet werden, dass das Knockout-Konstrukt nur zufällig ins Genom inseriert wurde. Bei wenigen Klonen (z. B. Klon 10) konnten Banden von 6,3 kB und etwa 8,0 kB beobachtet werden. In diesem Fall wurde vermutlich mittels Homologie-Rekombination noch einmal das bereits ausgetauschte Allel von der ersten Transfektion mutiert, und nicht das (zweite) Wildtyp-Allel.

3.2. Amplifikation des nicht sequenzierten Pin1-Locus im Genom des Haushuhns *Gallus gallus*

Es wird postuliert, dass die Funktion von Par14 durch ein anderes hoch konserviertes Parvulin-Protein, dem mitotischen Regulator Pin1, teilweise übernommen werden kann (Uchida, 2003). Um diese Aussage genauer zu prüfen, benötigt man eine Zelllinie, bei der sowohl Pin1 als auch Par14, ausgeknockt sind. Entsprechende genetische Arbeiten sind in der Zelllinie DT40 des Haushuhns *Gallus gallus* möglich, die als B-Zell-Vorläufer eine außergewöhnlich hohe Effizienz bei der homologen Rekombination aufweist (Buerstedde and Takeda, 1991). Eine genetische Veränderung von Pin1 in Hühner-Zelllinien wird jedoch zurzeit erschwert, da der entsprechende Locus nicht im bisher öffentlich verfügbaren Genom enthalten ist (Hillier et al., 2004). Somit stellt das Sequenzieren des Pin1-Locus einen wesentlichen Beitrag zur Herstellung einer Doppelknockout-Zelllinie dar.

3.2.1. Analyse der Datenbank-Einträge des Pin1-Locus in Metazoa

Eine erste Analyse bereits vorhandener Informationen über den Pin1-Locus im Ensembl-Genom-Browser (www.ensembl.org) zeigt, dass der Pin1-Locus in Metazoa aufgeführt ist, die Anzahl der Genome, in denen ein Pin1-Locus sequenziert wurde (41) jedoch deutlich niedriger ist, als die Anzahl der Einträge anderer verwandten Proteinen aus der PPIase-Familie: z. B. Parvulin-Protein Par14 (46) oder FKBP1A (49) (Tabelle 3.1).

Außerdem zeigt die Analyse der Publikationen eine Vielzahl von Artikeln über Pin1 (662) und auch über FKBP1A (920) im Vergleich mit Par14-Locus/PIN4 (27), obwohl der Pin1-Locus nicht in allen Tierarten sequenziert wurde (Quelle: PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Tabelle 3.1 Die Anzahl der Sequenzeinträgen (ID-Gene) von Pin1 Locus im Vergleich mit Par14 und FKBP1A. Quelle: Ensemble Genom Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>)

Species	Par14	Pin1	FKBP1A
<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	ENSAMEG00000005801	ENSAMEG00000012355	ENSAMEG00000000337
<i>Anolis carolinensis</i>	ENSACAG00000008618	-	ENSACAG00000008323
<i>Bos taurus</i>	-	ENSBTAG00000016988	ENSBTAG00000008303
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Y48C3A.16	Y110A2AL.13	Y18D10A.19 Y18D10A.25
<i>Callithrix jacchus</i>	ENSCJAG00000004992	ENSCJAG00000006079	ENSCJAG00000020908
<i>Canis familiaris</i>	ENSACAFG00000024653 ENSACAFG00000025119	ENSACAFG00000017967	ENSACAFG00000006795 ENSACAFG00000023724
<i>Cavia porcellus</i>	ENSCPOG00000011401	ENSCPOG00000021671	ENSCPOG00000003243
<i>Choloepus hoffmanni</i>	ENSCHOG00000008855	-	ENSCHOG00000012118

<i>Ciona intestinalis</i>	ENSCING00000008045 ENSCING00000012696	-	ENSCING00000002707
<i>Ciona savignyi</i>	ENSCSAVG00000007195	ENSCSAVG00000002656	ENSCSAVG00000006859 ENSCSAVG00000006630
<i>Danio rerio</i>	ENSDARG00000004527	ENSDARG000000089606	ENSDARG00000022684 ENSDARG00000033567
<i>Dasytus novemcinctus</i>	ENSDNOG00000012537	ENSDNOG00000023992	ENSDNOG00000005868
<i>Dipodomys ordii</i>	ENSDORG00000006985	ENSDORG00000006498	ENSDORG00000013029
<i>Drosophila melanogaster</i>	FBgn0039305	FBgn0015379 FBgn0052845	FBgn0013954
<i>Echinops telfairi</i>	-	ENSETEG00000004674	ENSETEG00000007454
<i>Equus caballus</i>	ENSECAG00000000364	ENSECAG00000006687	ENSECAG00000017887
<i>Erinaceus europaeus</i>	ENSEEUG00000009335	ENSEEUG00000006534	-
<i>Felis catus</i>	ENSFCAG00000012036	ENSFCAG00000009380	ENSFCAG00000012842
<i>Gallus gallus</i>	ENSGALG00000003878	-	-
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	ENSGACG00000018418	ENSGACG00000016585	ENSGACG00000004338 ENSGACG00000012061
<i>Gorilla gorilla</i>	ENSGGOG00000016008	ENSGGOG00000006008	ENSGGOG00000001729
<i>Homo sapiens</i>	ENSG00000102309	ENSG00000127445	ENSG00000088832
<i>Loxodonta africana</i>	ENSLAFG00000018261	ENSLAFG00000007143	ENSLAFG00000008413
<i>Macaca mulatta</i>	ENSMMUG00000012956	ENSMMUG00000008245	ENSMMUG00000015996 ENSMMUG00000016459
<i>Macropus eugenii</i>	ENSMEUG00000003611	ENSMEUG00000005498	ENSMEUG00000000628
<i>Meleagris gallopavo</i>	-	-	ENSMGAG00000007031
<i>Microcebus murinus</i>	ENSMICG00000001640	ENSMICG00000001996	ENSMICG00000014382
<i>Monodelphis domestica</i>	ENSMODG00000010913	ENSMODG00000004724	ENSMODG00000019554 ENSMODG00000023244 ENSMODG00000024640
<i>Mus musculus</i>	ENSMUSG00000079480	ENSMUSG00000032171	ENSMUSG00000032966
<i>Myotis lucifugus</i>	ENSMLUG00000012073	ENSMLUG00000008553	ENSMLUG00000006330
<i>Nomascus leucogenys</i>	ENSNLEG00000018119	ENSNLEG00000011999	ENSNLEG00000009356
<i>Ochotona princeps</i>	ENSOPRG00000000376	ENSOPRG00000014413	ENSOPRG00000003570
<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	ENSOANG00000014709	-	-
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	ENSOCUG00000008715 ENSOCUG00000021523	ENSOCUG00000023707	ENSOCUG00000009904
<i>Oryzias latipes</i>	ENSORLG00000007301	ENSORLG00000009334	ENSORLG00000002452 ENSORLG00000014598 ENSORLG00000017909
<i>Otolemur garnettii</i>	ENSOGAG00000011133	ENSOGAG00000017002	ENSOGAG00000002629
<i>Pan troglodytes</i>	ENSPTRG00000022022	ENSPTRG00000010452	ENSPTRG00000013163
<i>Pongo abelii</i>	-	-	ENSPPYG00000010852 ENSPPYG00000012604
<i>Pongo pygmaeus</i>	ENSPPYG00000020460	ENSPPYG00000009537	-
<i>Procavia capensis</i>	ENSPCAG00000000166	ENSPCAG00000009036	ENSPCAG00000008816
<i>Pteropus vampyrus</i>	ENSPVAG00000013595	ENSPVAG00000008629	ENSPVAG00000013840
<i>Rattus norvegicus</i>	-	ENSRNOG00000020474	ENSRNOG00000008822
<i>Sorex araneus</i>	ENSSARG00000003732	-	ENSSARG00000006723 ENSSARG00000008492
<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	ENSSTOG00000015344	ENSSTOG00000005299	ENSSTOG00000012646
<i>Sus scrofa</i>	-	ENSSSCG00000013669	ENSSSCG00000007188 ENSSSCG00000007194
<i>Taeniopygia guttata</i>	ENSTGUG00000004983	-	ENSTGUG00000006927
<i>Takifugu rubripes</i>	ENSTRUG00000011179	ENSTRUG00000013606	ENSTRUG00000003030

<i>Tarsius syrichta</i>	-	-	ENSTSYG00000007013
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	ENSTNIG00000005615	-	ENSTNIG00000012496
<i>Tupaia belangeri</i>	ENSTBEG00000004347	ENSTBEG00000003793	ENSTBEG00000010764
<i>Tursiops truncatus</i>	ENSTTRG00000010740	ENSTTRG00000008524	ENSTTRG00000003547
<i>Vicugna pacos</i>	ENSVPAG00000010947	-	ENSVPAG00000011511
<i>Xenopus tropicalis</i>	ENSXETG00000022578	ENSXETG00000005855	ENSXETG00000011165
Die Zahl der Arten	46	41	49

Mit dem Programm BLASTX (*Basic Local Alignment Search Tool*) wurde mit der Proteinsequenz des menschlichen Pin1 in der Datenbank EST (*Expressed Sequence Tags*) von NCBI nach exprimierten Sequenz-Tags (ESTs) aus dem Huhn gesucht. Sechs ESTs mit hoher Ähnlichkeit zum menschlichen Pin1 (BU333631.1, BU296161.1, BU460225.1, CN225897.1, BU397448.1, AI982182.1) wurden ausgewählt und mit dem Programm ClustalW2 verglichen. Dieser Sequenzvergleich liefert eine vorläufige mRNA-Sequenz von Pin1 aus dem Huhn, die in Abb. 3.9 mit der cDNA des menschlichen Pin1 mittels ClustalW2 verglichen wird.

	Exon I	810F	
Pin1_Gallus	ATGGCGGAGGAGGAGAAGCTGCCCGGGATGGGAGAAGCGCATGAGCCGCAGCTCCG	60	
Pin1_Homo	ATGGCGGACGAGGAGAAGCTGCCCGCCGGCTGGGAGAAGCGCATGAGCCGCAGCTCAG	60	

	Exon II	804F	
Pin1_Gallus	CGTGTCTATTACTTCAACCACATACCAACGCCAGCCAATGGGAGAGGCCGAGCGGGC	119	
Pin1_Homo	CGAGTGTACTACTTCAACCACATCACTAACGCCAGCCAGTGGGAGCGGCCAGCGGCAAC	120	
	** * * *		
Pin1_Gallus	AGCCG----GGCGC----AACGGCCCCGGGAGCCAGCAAAGTGC GTTGCTCCACCTG	171	
Pin1_Homo	AGCAGCAGTGGTGGCAAAAACGGGCGAGGGGAGCCCTGCCAGGGTCCGCTGCTGCACCTG	180	
	** * * * * *		
Pin1_Gallus	CTGGTGAAGCACAAACCAATCACGGCGCCCGTCTCTGGAGGCAGGAGAAGATCACAGG	231	
Pin1_Homo	CTGGTGAAGCACAGCCAGTCAACGGCGCCCTCGTCTGGCGGCAGGAGAAGATCACCCG	240	

Pin1_Gallus	ACCAAAGACGAAGCCCTGGAGCTCATCAACGCTACATCCAGAAGATCAAATCAGGAGAA	291	
Pin1_Homo	ACCAAGGAGGAGGCCCTGGAGCTGATCAACGCTACATCCAGAAGATCAAGTCGGGAGAG	300	

	Exon III	803R	779F
Pin1_Gallus	GAGGACTTTGAATCTCTCGCTTCGCAGTTTCAGTGACTGCAGCTCAGCGAAGGCTGGGGGA	351	
Pin1_Homo	GAGGACTTTGAGTCTCTGGCCTCACAGTTTCAGCTGCAGCTCAGCAAGGCCAGGGGA	360	

	778R		
Pin1_Gallus	GATCTGGGCGCCTTTGGACGTGCTCAGATGCAGAAACCCTTCGAAGACGCTTCGTTTGCG	411	
Pin1_Homo	GACCTGGGTGCCTTCAGCAGAGCTCAGATGCAGAAAGCCATTGAAGACGCCTCGTTTGCG	420	
	** * * * *		
	Exon IV		
Pin1_Gallus	CTGAGGGCGGGCGAGATGAGCGGGCCGGTTCACAGAGTCAGGGATCCACATCATCCTG	471	
Pin1_Homo	CTGCGGACGGGGAGATGAGCGGGCCCGTTCACAGGATTCCGGCATCCACATCATCCTC	480	
	** * * * *		
Pin1_Gallus	CGCACGGAGTGAAGGGCTGCAGTGCAAGGGCCGGGGGAGGAAGAAGGAAGGAGAGAGG	531	
Pin1_Homo	CGCACTGAGTGA-----	492	

	780R		

Abb. 3.9 Sequenzvergleich zwischen den cDNAs von Pin1 aus *Gallus gallus* und *Homo sapiens*.
Die Exon-Exon-Grenzen des menschlichen Pin1 (hellblau/weiß alternierend) wurden auf ckPin1 übertragen.
Verwendete Primer zur Amplifikation sind ebenfalls dargestellt.

Ausgehend von den verfügbaren Informationen über menschlichen Pin1-Loci müssen jedoch der Locus selbst und auch die Exon-Exon-Grenzen konserviert sein. Die in Abbildung 3.9 ebenfalls dargestellten Vorwärts-Primer („F“-Primer), wurden jeweils an das 5′-Ende der

entsprechenden Exons gelegt. Analog sind die Rückwärts-Primer („R“-Primer) komplementär zu den 3'-Enden der Exons. Somit sollten alle amplifizierte Sequenzen einen (fast) bekannten Teil der Exons enthalten, was als Kontrolle für die PCR und das Sequenzieren benutzt werden konnte.

3.2.2. Amplifikation von extrem GC-reichen Sequenzen innerhalb des Pin1-Locus des Huhnes

Für die Amplifikation des Pin1-Locus wurde die genomische DNA der DT40-Zelllinie als Template verwendet. Wie sich später herausstellte, enthielt der Pin1-Locus von *Gallus gallus* sehr GC-reiche Sequenzabschnitte. Nach zunächst ergebnislosen PCRs wurden die PCR-Bedingungen in Bezug auf GC-reiche Sequenzen optimiert. Hierfür wurden verschiedene Parameter getestet und optimiert.

3.2.2.1 PCR- Programm

Die „Standard“-Bedingungen für PCR wurden im Kapitel 2.2.1.2 beschrieben. Für die Taq-Polymerase wurde das modifizierte Drei-Schritte-Programm verwendet: Die Elongation wurde statt 72 °C bei 68 °C mit verdoppelter Zeit (2 min für 1 kB) durchgeführt. Alle anderen Polymerasen wurden unter den Standard-Bedingungen des Herstellers verwendet. Es wurden auch die Touchdown- und Slowdown- PCR-Programmen getestet (Frey et al., 2003). Aber wegen der hohen Unspezifität waren diese Programme beim Amplifizieren des Pin1 Locus von *Gallus gallus* mit unbekannter Größe nicht anwendbar.

3.2.2.2 Polymerasen

Es wurden in dieser Arbeit folgende Polymerasen verwendet: mi-Taq DNA Polymerase (Metabion, Martinsried), mi-Pfu DNA Polymerase (Metabion, Martinsried), Deep Vent DNA Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt am Main), Phusion Hot Start DNA Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt am Main), Herculase Enhanced DNA Polymerase (Agilent Technologies, USA), KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase (Merck, Darmstadt).

Die PCR-Effizienz bei Amplifikation der Sequenz mit einem GC-Gehalt von 50 – 60 % war für die Tag-Polymerase (mi-Taq) besser als für die Pfu-Polymerase (mi-Pfu) (Abb. 3.10. A). Die thermostabile Pfu-Polymerase (von *Pyrococcus furiosus*) besitzt die Fähigkeit, während der Amplifizierung die Nukleotidsequenz zu prüfen und gleichzeitig zu korrigieren (*proofreading*-Funktion). Diese Funktion kann die PCR der GC-reichen DNA-Abschnitte

stören. Deshalb hat die PCR mit der Taq-Polymerase (von *Thermus aquaticus*), die dieses Proofreading nicht hat, bessere Ergebnisse gezeigt.

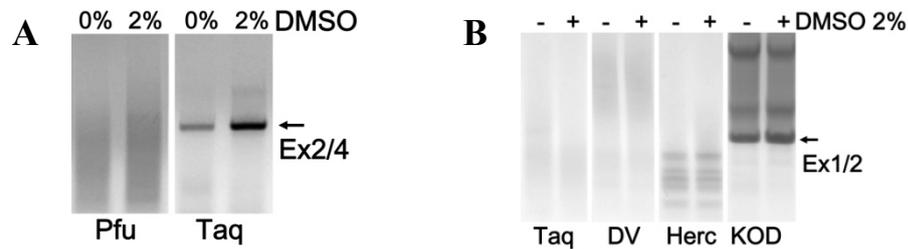


Abb. 3.10 Vergleich der PCR-Effizienz von verschiedenen Polymerasen.

A – Amplifikation von normalen DNA-Sequenzen (GC-Gehalt weniger als 60 %) mit mi-Pfu und miTag Polymerasen (Metabion, Martinsried). B – Amplifikation von DNA- Fragmenten mit GC-Gehalt mehr als 60 % mit verschiedenen Polymerasen: Taq - mi-Tag(Metabion, Martinsried), DV - Deep Vent DNA Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt am Main), Herc - Herculase Enhanced DNA Polymerase (Agilent Technologies, USA), KOD - KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase (Merck, Darmstadt)

Die Hot Start-Polymerasen sind modifizierte Varianten der Taq-Polymerase, die durch Inkubation bei 95 °C über einen Zeitraum bis zum 15 min aktiviert werden müssen. Dadurch werden die unspezifischen Bindungen von Primer-Dimeren bei niedrigen Temperaturen zur Beginn der PCR verhindert. Außerdem verbessert die hohe Temperatur die Denaturierung doppelsträngiger GC-reicher DNA-Sequenzen.

Die in dieser Studie getesteten Hot Start-Polymerasen zeigten bei der Amplifikation von normalen DNA-Sequenzen (GC-Gehalt weniger als 60 %) eine höhere Effizienz als die Taq-Polymerasen. Außerdem war die Amplifikation von DNA- Fragmenten in einigen Fällen (GC-Gehalt mehr als 60 %) nur mit den Hot Start-Polymerasen möglich (Phusion und KOD Extreme Hot Start Polymerase) (Abb. 3.10. B).

3.2.2.3 DNA- Template

Für die PCR wurde die DNA bei 95 °C 5 min denaturiert und auf Eis rasch abgekühlt. Die Wirkung des DNA-Templates auf die PCR-Effizienz war nicht linear. Die besten Ergebnisse wurden in einem PCR-Ansatz mit 50-100 ng DNA (in 50 µl Reaktions-Volumen) erhalten (Abb. 3.11).

Für die PCR von GC-reichen Sequenzen mittels Hot Start Polymerasen wurde die DNA-Menge nach den Empfehlungen des Herstellers gewählt.

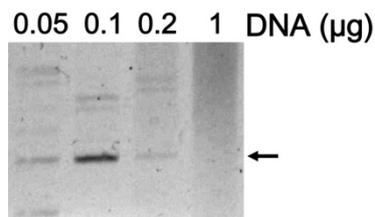


Abb. 3.11 Wirkung des DNA-Templates auf die PCR-Effizienz. Die verschiedene DNA-Mengen wurde in einem 50 µl Reaktions-Volumen mit mi-Taq Polymerase (Metabion, Martinsried) getestet.

3.2.2.4 Dimethylsulfoxid-Ansatz

Dimethylsulfoxid (DMSO) denaturiert die DNA-Moleküle und verhindert damit die Entstehung von Sekundär-Strukturen bei Primern und DNA-Templates. Dadurch kann DMSO die Effektivität der PCR erhöhen, insbesondere im Falle von GC-reichen Sequenzen.

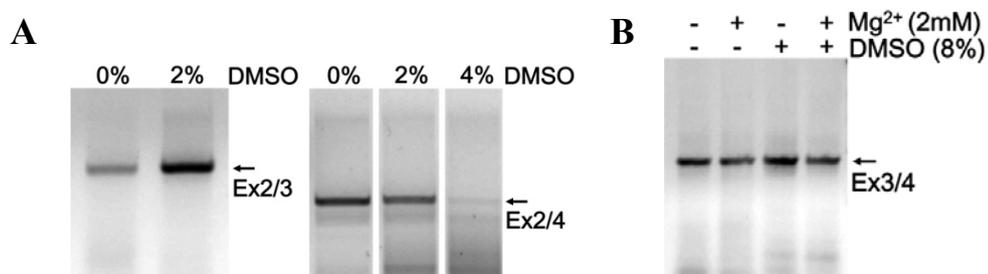


Abb. 3.12 Einfluss des Dimethylsulfoxid-Ansatzes (DMSO) auf die PCR-Effizienz.

A – Die Amplifikation der GC-reichen Sequenzen mit GC-Gehalt mehr als 60 % mit Phusion Hot Start DNA Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt am Main). B – Die Amplifikation der DNA-Fragmenten mit GC-Gehalt weniger als 60 % mit mi-Taq DNA Polymerase (Metabion, Martinsried)

Es wurde festgestellt, dass die Zugabe von bis zu 2 % DMSO die Ausbeute der PCR-Produkte für „normale“ Sequenzen (GC-Gehalt 50 %) erhöht (Abb. 3.12. A). Eine DMSO-Menge bis zu 8 % hat keinen großen Effekt auf die Amplifikation der „normalen“ Sequenzen gezeigt (Abb. 3.12. B). Hohe DMSO-Konzentrationen können auch negativ auf die PCR-Effizienz von GC-reichen Sequenzen (GC-Gehalt 60 % und mehr) wirken (Abb. 3.12. A). Andere Studien haben gezeigt, dass die Zugabe von DMSO bis zu 10 % die Spezifität der PCR erhöht (Jensen et al., 2010). Dies ist jedoch nur für die Amplifikation von kurzen GC-reichen Sequenzen (500 nt) gültig. Außerdem ist bekannt, dass 10 % DMSO in der PCR-Reaktion zur Reduktion der Aktivität der Taq-Polymerase führt (Kolmodin et al., 2002).

3.2.2.5 Magnesium-Ansatz

Für den Einbau der dNTP's braucht die Taq-Polymerase eine gewisse Menge von Mg^{2+} -Ionen im Puffer. Die Gesamtkonzentration von Mg^{2+} -Ionen muss höher als die Gesamtkonzentration

von dNTP sein, weil freies Mg^{2+} -Ion als Kofaktor für die PCR nötig ist (Kolmodin et al., 2002).

Daher wurden zusätzliche Ansätze von Magnesium-Konzentration getestet. Bei der Amplifikation von „normalen“ Sequenzen hat die Magnesium-Konzentration (2 mM) keinen großen Effekt gezeigt (Abb. 3.12. B). Aber für GC-reiche Sequenzen können höhere Mg^{2+} -Ionen-Konzentration die PCR-Effizienz verschlechtern (Abb. 3.13).

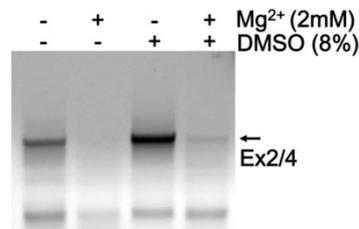


Abb. 3.13 Wirkung von Magnesium auf die PCR-Effizienz.

3.2.3. Mapping des Pin1-Locus des Huhnes

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach der Gelelektrophorese durch Gel-Extraktion aufgereinigt, in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und sequenziert. Zur Kontrolle der Spezifität der PCR-Fragmente wurden die PCRs mit verschiedenen Primer-Kombinationen durchgeführt und die Größe der erhaltenen PCR-Produkte miteinander verglichen (Abb. 3.14).

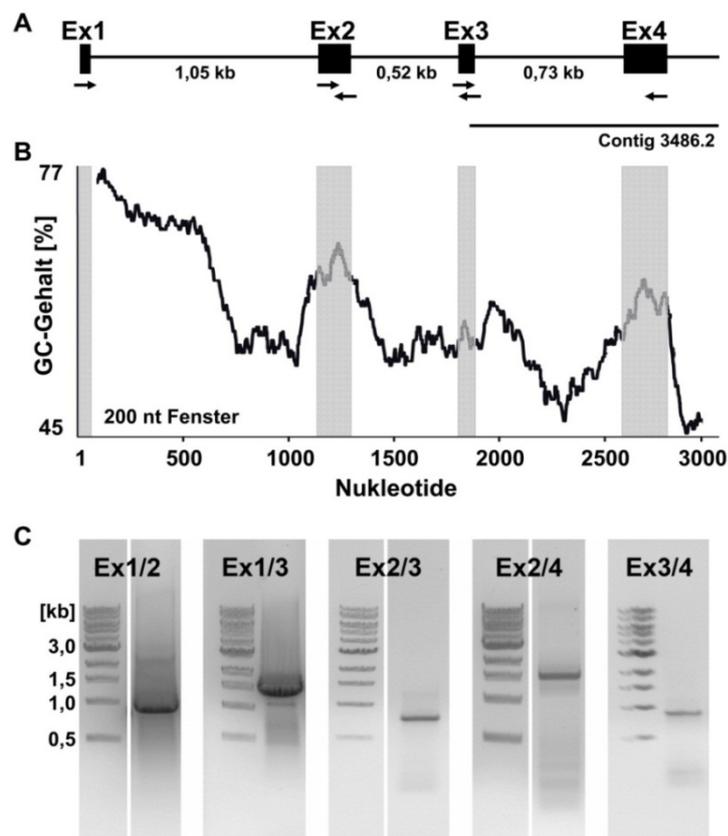


Abb. 3.14 Die Amplifizierung des Pin1-Locus von *Gallus gallus*.

A – Schema vom Pin1-Locus von *Gallus gallus* mit PCR-Primer und Größe von amplifizierten PCR-Fragmenten. B – GC-Gehalt vom Pin1-Locus (gleitender Durchschnitt über 200 nt). C – Amplifikation mit den folgenden Primern: Ex1-2 mit Primer 810F + 803R; Ex2-3 mit 804F + 778R; Ex1-3 mit 810F + 778R; Ex2-4 mit 804F + 780R; Ex3-4 mit 779F + 780R.

Der Vergleich der Pin1-Sequenz von *Gallus gallus* mit dem Pin1-Locus von *Homo sapiens* zeigt, dass die Exons hoch konserviert und vergleichbar sind. Dies wurde auch für das gesamte Genom vom Huhn beschrieben. Die protein-kodierenden Sequenzen von *Gallus gallus* haben bis zu 75,3 % Aminosäuren-Identität (im Vergleich dazu 88 % zwischen Mensch und Maus) (Gibbs et al., 2004; Hillier et al., 2004). Außerdem zeigen die kodierenden Sequenzen von Proteinen, die in zytoplasmatische oder nukleare Prozesse involviert sind, eine höhere Konservierung als andere Proteine, z. B. für die Reproduktion.

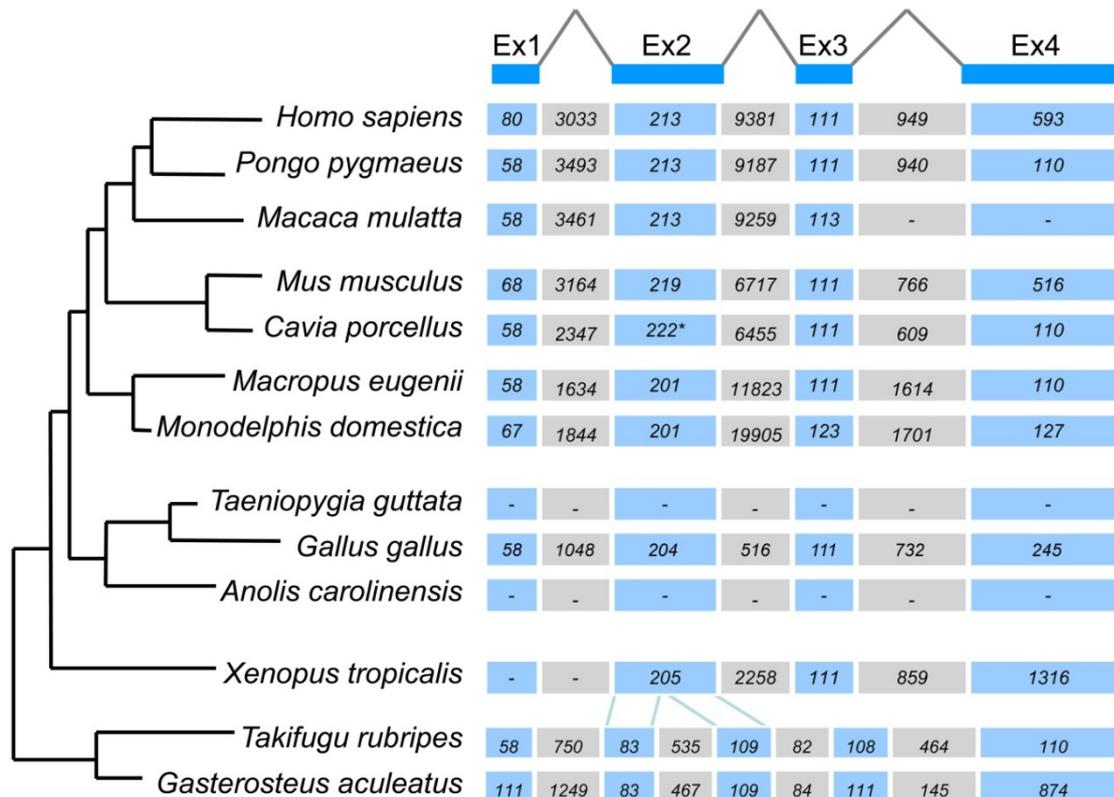


Abb. 3.15 Vergleich der Struktur des Pin1-Locus in Metazoen. Quelle: Ensemble Genom Browser, die ID-Gene sind in Tabelle erläutert. * Exon 2 in *Cavia porcellus* besteht in der Datenbank aus zwei Exons und einem Intron 50+27+145 nt.

Die neu amplifizierten Introns hingegen sind deutlich kürzer, deswegen ist die gesamte Größe des Locus wesentlich kleiner als die des menschlichen Pin1-Locus. Interessant ist, dass die Introngröße der Gene mit dem GC-Gehalt korreliert. Der erhöhte GC-Gehalt wurde für die Gene mit kleineren Introns beschrieben, die auch mit der Größe der Chromosomen korreliert sind (Hillier et al., 2004).

Auffallend ist, dass in keinem der verfügbaren Reptilien- und Vogel-Genome ein Pin1-Locus zu finden war.

In der systematischen Überklasse Fische hat das Pin1-Transkript folgende Besonderheiten: Erstens besteht der Pin1-Locus nicht aus 4, sondern aus 5 Exons. Der Vergleich der Exons-

Nukleotidsequenzen mit dem BLAST-Program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) zeigt grundsätzliche Übereinstimmungen des Pin1-Locus von Fischen mit dem Locus von *Xenopus tropicalis*. Exon 2 des Frosches ist bei den Fischen auf Exon 2 und 3 gesplittet. Vermutlich sind diese Exons im Laufe der Evolution zusammen gruppiert worden.

Zweitens ist der Pin1-Locus in der Gruppe der Fische relativ klein und kompakt (*Gasterosteus aculeatus* - 3233 nt, *Takifugu rubripes* - 2299 nt) im Vergleich zu dem primären Pin1-Transkript aus dem Frosch (bereits ohne Exon 1 und Intron 1 - 4749 nt) oder jenen Loci der Säugetiere.

In der vorliegenden Arbeit konnte die gesamte genomische Sequenz zwischen dem ersten und vierten Exon des Pin1-Loci von *Gallus gallus* amplifiziert und sequenziert werden. Die Exons sind hoch konserviert und vergleichbar mit dem Pin1-Locus von *Homo sapiens*. Die Introns hingegen sind deutlich kürzer. Deswegen ist die gesamte Größe des Locus wesentlich kleiner als der menschliche Pin1-Locus. Die entsprechenden PCRs gestalteten sich sehr schwierig, da Teile des Pin1-Locus des Huhns sehr GC-reich waren.

3.3 siRNA-Knockdown von Par14/17 in HeLa-Zellen

Der siRNA-vermittelte Knockdown ist eine effektive und sehr verbreitete Methode für die funktionale Analyse von Proteinen. Dabei findet die Transkription der zu untersuchenden Proteine ohne Störungen statt, anschließend wird aber der mRNA-Spiegel mittels RNA-Interferenz (RNAi) reduziert. Die synthetischen RNA-Moleküle (siRNA), die zu einer Ziel-mRNA komplementär sind, binden an den RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*). Dieser spaltet schließlich mit Hilfe von Ribonuklease-Enzymen die Ziel-RNA und unterdrückt dadurch die Translation der genetischen Information (Preall und Sontheimer, 2005, Jinek und Doudna, 2009).

In unserem Labor wurde in vorangegangenen Studien versucht, mit zwei verschiedenen Verfahren die Expression von Par14/17 mittels der Knockdown-Methode zu unterdrücken: mit Plasmid-basierenden shRNA (*short hairpin RNA*) im Vektor pRNTin-H1.2/Hygro (GenScript, USA) und mit dem siRNA-Pool für Par14/17 von Dharmacon (Thermo Scientific, Karlsruhe) (Saningong, 2010). Die Transfektions-Effizienz für HCT116-Zellen (*Human colorectal carcinoma cells*) lag bei etwa 60 %, und für HeLa-Zellen bei nicht mehr als 30 %. Die Knockdown-Effizienz wurde mit qRT-PCR nur für die transfizierten HCT116-Zellen durchgeführt und lag bei etwa 10 %. Diese sehr niedrige Knockdown-Effizienz zeigte keinen Phänotyp und keine ausreichende Reduktion der Expression von Par14/17. Deswegen wurde in dieser Studie zuerst die Knockout-Methode bevorzugt.

Im Laufe der Arbeiten für den genetischen Knockout von Par14 in DT40-Zellen wurde eine erfolgreiche Knockdown-Studie von Par14 von einer Arbeitsgruppe aus Japan veröffentlicht (Fujiyama-Nakamura et al., 2009). Dort gelang ein Par14-Knockdown mit Stealth-siRNAs, der einen deutlichen Phänotyp bei der Reduktion des Zellwachstums zeigte.

Bei der Stealth-siRNA (siRNA) handelt es sich um eine neue Generation synthetischer RNA, die vor kurzem auf den Markt kam und von Invitrogen patentiert wurden. Diese RNA-Moleküle bilden einen Duplex von 21-Basen langen Oligonukleotiden, die in eine Form *short/small interfering RNAs* zusammengebunden sind. Durch die chemische Modifizierung besitzen Stealth-siRNA im Vergleich mit „Standard“-siRNA eine extrem lange Stabilität im Kultur-Medium und eine höhere Effizienz bei Knockdown-Experimenten. Außerdem ermöglichen diese eine hohe Spezifität und niedrigere Rate von sogenannten „Off-targets-Effekten“ -unabsichtlichen Effekten von RNAi durch Cross-Hybridization siRNA mit nicht-gezielten Transkripten (Jackson et al., 2003, Rao et al., 2009, Seinen et al., 2011).

Aufgrund der vielen Vorteile wurden die neuen Stealth-siRNA-Konstrukte im Rahmen dieser Arbeit für den Par14-Knockdown verwendet.

3.3.1 Reduktion der mRNA von Parvulin 14/17 mittels RNA-Interferenz

Für die Knockdown-Studie wurden zwei siRNA-Konstrukte verwendet (Kontroll-siRNA und si311 als Par14si genannt), die bereits in einer vorangegangenen Studie beschrieben wurden (Fujiyama-Nakamura et al., 2009). Die anderen zwei siRNAs (si5 und si418) wurden neu entworfen. Dabei sollte si5 spezifisch für die verlängerte mRNA von Par17 sein; si418 sollte wie das bereits publizierte Oligonukleotid si311 die Gesamt-Parvulin-mRNA reduzieren (Abb. 3.16).



Abb. 3.16 Das Fragment der menschliche mRNA von Par14/17 (NM_006223) mit Start-Codons (in roten Kästchen) und Bindungsstellen von Stealth-siRNA-Konstrukten. Das Target des si5-Konstrukts ist die verlängerte mRNA von Par17; Oligonukleotide si418 und si311 sollten die Gesamt-Parvulin-mRNA reduzieren. Das si311-Konstrukt entspricht dem Par14si-Konstrukt von Fujiyama-Nakamura et al., 2009.

Die HeLa-Zellen wurden mit den Stealth-siRNA-Konstrukten mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert (siehe Kapitel 2.2.3.7). Die Gesamt-RNA wurde 24 und 72 Std. nach der Transfektion aus den entsprechenden Zellen extrahiert (siehe Kapitel 2.2.1.11) und nach der cDNA-Synthese (siehe Kapitel 2.2.1.12) als Template für die qRT-PCR verwendet.

Um die Reduktion der Expression von Par17 und Gesamt-Parvulin nachzuweisen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Die Expression von Par17 wurde mit den Primern 251F und 252R detektiert, für Gesamt-Parvulin wurden die Primer 253F und 254R verwendet. Als Referenz-

Gen wurde die Expression von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mit den Primern 555F und 556R untersucht (siehe Kapitel 2.2.1.13).

Während der PCR wurden als Qualitätskontrolle für die Primer die Schmelzkurven und die Schmelztemperatur (T_m) des entstehenden PCR-Produktes gemessen. Die Schmelzkurvenanalyse zeigt einen einzigen reproduzierbaren Temperaturübergang für jede Primernkombination. Die Schmelztemperaturen waren für Par17, Gesamt-Parvulin und GAPDH bei mehreren Reaktionen konstant und sind mit statistisch signifikanten Standard-Abweichungen in der Tabelle 6.1 (siehe Anhang) dargestellt. Dies bestätigt die Spezifität der Primer und auch der amplifizierten PCR-Produkte.

Für den Nachweis von Veränderungen der Genexpression wurde eine relative Quantifizierung mittels Ct-Wert durchgeführt. Der Ct-Wert (engl. *Cycle Threshold*) entspricht einem exponentiellen und daher quantifizierbaren Anstieg der Fluoreszenz im Reaktionsgefäß und dadurch einem exponentiellen Anstieg des PCR-Produktes in der Reaktion (siehe Kapitel 2.2.1.13). Die Mittelwerte von Ct aus 4 Replikaten spiegeln das Expressionsniveau von Par17, Gesamt-Parvulin und GAPDH als Referenz-Gen wider (Tabelle 3.2). Bei der relativen Quantifizierung werden die Spiegel des jeweiligen Target-Gens (Par17 bzw. Gesamt-Parvulin) mit dem Referenz-Gen verglichen (ΔCt) und das Ergebnis als Verhältnis dieser Gene mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode für jede siRNA dargestellt (Schmittgen and Livak, 2008).

$$\Delta Ct_{\text{Kontrol}} = Ct_{\text{Target}} - Ct_{\text{Ref}}$$

$$\Delta Ct_{\text{Exp}} = Ct_{\text{Target}} - Ct_{\text{Ref}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Exp}} - \Delta Ct_{\text{Kontrol}}$$

Tabelle 3.2 Ct-Mittelwerte mit Standardabweichungen.

Nach 24 Std				Nach 72 Std			
Target	Probe	Ct-Mittelwert	Ct-Stabw	Target	Probe	Ct-Mittelwert	Ct-Stabw
Par17	Kontrol	23,04	0,24	Par17	Kontrol	26,20	0,37
	si5	23,68	2,44		si_5	27,31	0,47
	si311	26,01	1,30		si_311	30,44	0,25
	si418	27,85	0,37		si_418	30,73	0,31
Gesamt-Par	Kontrol	18,84	0,47	Gesamt-Par	Kontrol	20,02	0,96
	si5	19,22	0,71		si_5	20,52	0,15
	si311	24,51	0,90		si_311	25,00	0,83
	si418	24,86	0,43		si_418	24,39	0,41
GAPDH	Kontrol	19,63	0,18	GAPDH	Kontrol	13,22	0,52
	si5	19,44	0,14		si_5	12,70	0,96
	si311	18,82	0,02		si_311	13,46	0,35
	si418	18,99	0,11		si_418	13,31	0,61

Die Veränderungen der Genexpression von Par17 und Gesamt-Par waren sehr ähnlich für alle drei siRNA-Transfektionen nach 24 Std. und 72 Std. (Abb. 3.17).

Das Konstrukt si5 hat einen sehr schwachen Effekt auf das mRNA-Niveau der Parvuline. Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von si5 für Par17 und Gesamt-Par liegen unter 1 und es gibt keine Veränderungen dieses Verhältnisses nach 24 und 72 Std.

Die siRNA-Konstrukte si311 und si418 haben im Vergleich mit si5 einen sehr starken Effekt auf die mRNA von Par17 sowie auch auf das Gesamt-Par-Tanskript. Si311 und si418 zeigen eine 6-fache Änderung der Genexpression von Parvulin ($\Delta\Delta\text{Ct} = 6$) nach 24 Std und eine 4-fache Änderung ($\Delta\Delta\text{Ct} = 4$) nach 72 Std.

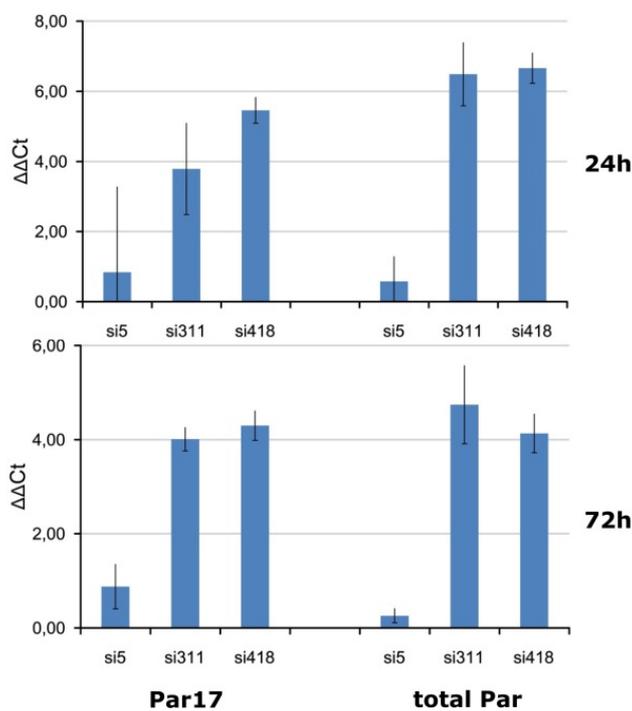


Abb. 3.17 $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte von qRT-PCR beim Knockdown von Par14/Par17 nach 24 und 72 Std.

Um die Knockdown-Effizienz zu ermitteln, wurden die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der logarithmischen Ct-Skala durch Potenzieren ($2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$) in Vielfache der Änderung (*fold-change*) umgewandelt. Ausgehend von einer Genexpression von Parvulin von 100 %, erhält man durch Division die nach dem Knockdown übrig bleibende Transkript-Menge in Prozent.

Beim Parvulin-Knockdown mit Hilfe von Stealth-siRNAs konnte die Expression von Par17 und Gesamt-Parvulin auf mRNA-Ebene mit einer Knockdown-Effizienz von mehr als 98 % für Gesamt-Parvulin und etwa 93 % für Par17 nach 24 Std deutlich reduziert werden. Nach 72 Std. sanken diese Werte geringfügig auf ~ 98 % für Par17 und ~ 94 % für Gesamt-Parvulin.

3.3.2 Wachstums-Reduktion von HeLa-Zellen beim Knockdown von Parvulin

Für die Analyse des Zellwachstums von Parvulin-Knockdown wurden HeLa-Zellen nach der Transfektion mit 300 pmol aller siRNA jeden Tag trypsiniert und gezählt (siehe Kapitel 2.2.3.3). Dieser Versuch wurde 4-mal wiederholt und die Daten sind als Wachstumskurven mit signifikanten Fehlerbalken in Abb. 3.18 dargestellt.

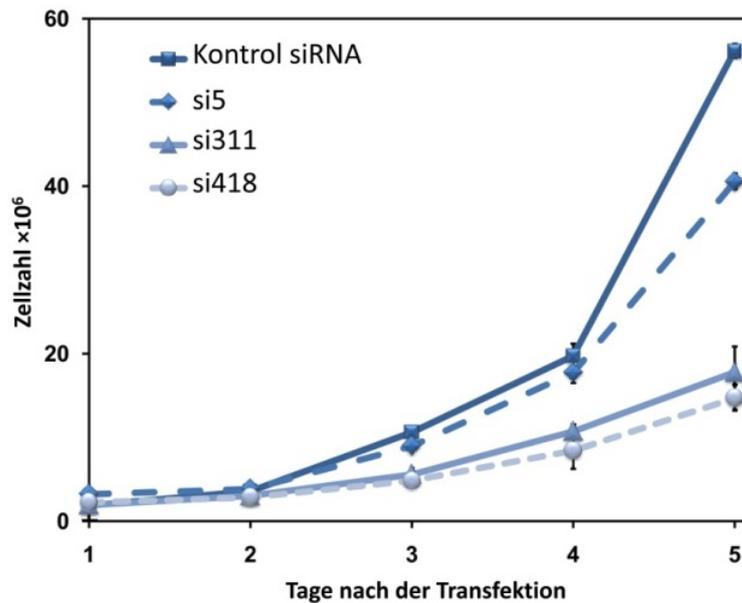


Abb. 3.18
Wachstumsdiagramm von transfizierten HeLa-Zellen nach dem Parvulin-Knockdown. Der Versuch wurde 4-mal wiederholt und mit statistisch signifikanten Fehlerbalken angegeben.

Das Wachstum von si311- und si418-transfizierten Zellen war deutlich reduziert, während si5 nur einen geringfügigen Effekt auf die Zellteilung zeigte. Somit war für die siRNAs, die die Parvulin-mRNA am stärksten reduzierten, der Einfluss auf das zelluläre Wachstum am größten.

3.3.3 Microarray-Analyse von HeLa-Zellen nach dem Knockdown von Parvulin 14/17

Wegen der hohen Knockdown-Effizienz von Par14/17 und dem offenbaren Phänotyp der siRNA-Konstrukte (vor allem si311 und si418) auf das Zellwachstum wurde die Auswirkungen des Parvulin-Knockdowns auf der Transkriptom-Ebene mittels Microarray-Hybridisierung analysiert (Dr. Ludger Klein-Hitpass, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen). Dazu wurde die Gesamt-RNA von HeLa-Zellen 40 Std. nach der Transfektion extrahiert (siehe Kapitel 2.2.1.11) und die Qualität und die Konzentration von Gesamt-RNA mit Hilfe eines NanoDrop 1000 (PEQLAB, Erlangen) bestimmt (Tabelle 3.3).

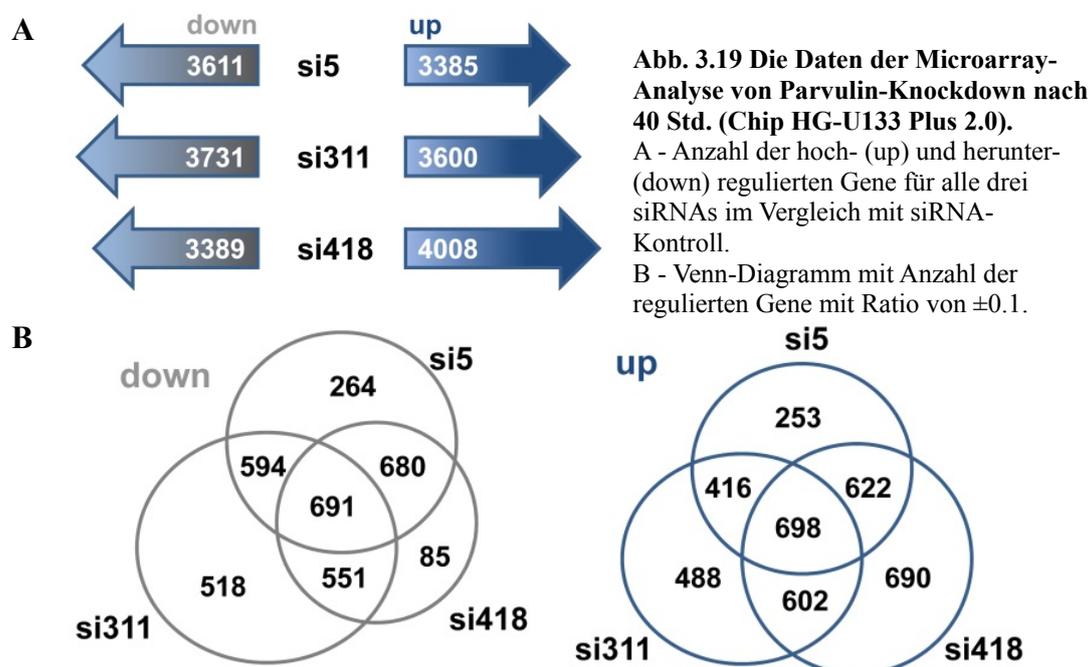
Die hochqualitative Gesamt-RNA wurde auf einem Affimetrix GeneChip (Chip HG-U133 Plus 2.0) hybridisiert, der etwa 54 000 menschliche *Probesets* enthielt. Dabei wird der wichtige Parameter *Ratio Log* berücksichtigt. Er zeigt die Differenz der

Hybridisierungseffizienz zwischen dem gemessenen Fluoreszenzsignal von jedem einzelnen Probeset relativ zur Kontrolle (Eisen et al., 1998) an. Der negative Ratio Log-Wert weist auf ein abnehmendes Fluoreszenz-Signal und dadurch auf eine Unterregulation des Gens hin. Im Gegensatz dazu zeigt ein positiver Ratio Log ein zunehmendes Fluoreszenz-Signal und dadurch eine Hochregulation des Gens. Sämtliche Rohdaten der Microarray-Analyse sind auf dem digitalen Speichermedium enthalten, das dieser Doktorarbeit beiliegt.

Tabelle 3.3 Die Konzentration und Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA für die Microarray-Hybridisierung

Probe	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
si5-3	1425,85	35,646	17,157	2,08	2,27
si311-3	1536,93	38,423	18,486	2,08	2,19
si418-3	1288,28	32,207	15,594	2,07	2,16
Kontrol-siRNA-2	1643,09	41,077	19,834	2,07	2,18

Die Anzahl der herauf- und herunter-regulierten Gene für alle drei siRNAs ist in Abb. 3.19 A dargestellt. Wie im Venn-Diagramm in Abb. 3.19 B und C zu sehen, war die Überlappung der drei Datensätze im Vergleich zur Kontroll-siRNA nicht besonders hoch.



Alle drei siRNA-Konstrukte zeigten eine Reduktion der Par14-Expression: si5 zeigt eine schwache Reduktion (-0,6 Ratio Log), si311 und si418 haben im Gegensatz dazu einen stärkeren Einfluss auf die Par14-mRNA (-2 Ratio Log) (Tabelle 3.4). Diese Werte stimmen in der Tendenz sehr gut mit den qRT-PCR-Daten überein.

Tabelle 3.4 Die Reduktion von Par14-Expression bei der Microarray-Hybridisierung (Chip HG-U133Plus_2.0).

Gen ID	Gen Name	Probeset	Ratio Log	siRNA
PIN4	Protein (peptidyl prolyl cis/trans isomerase)	204572_s_at	-0,6	si5
	NIMA-interacting, 4 (parvulin)		-2.0	si311
			-2.0	si418

Der Datensatz wurde mittels GeneTrail (Backes et al., 2007) analysiert, um signifikante Überlappungen mit bereits publizierten Datensätzen zu finden. Dabei analysiert die Software GeneTrail den Datensatz des Microarrays (Probesets) und teilt ihn in funktionale Gruppen ein, z. B. *negative regulation of programmed cell death* oder *regulation of apoptosis* (Backes et al., 2007). Dieses Programm berücksichtigt nicht, wie stark die Gene reguliert sind, sondern lediglich deren Auftreten in verschiedenen Prozessen, Pathways oder Gruppen. Ein Gen (oder ein Probeset) kann gleichzeitig in mehreren Gruppen eingeordnet sein.

Alle drei siRNAs zeigten bei der GeneTrail-Analyse ein breites Spektrum möglicher Funktionen (siehe Ordner 9 auf der beigefügten DVD).

In Tabelle 6.2 (siehe Anhang) sind einige Gruppen mit statistisch relevanten Daten aufgelistet, die in zwei oder allen drei siRNAs vorkommen. Innerhalb der regulierten Gene von allen drei siRNAs sind Vertreter aus dem Zytoplasma, dem Endoplasmatischen Retikulum, des Membran-Systems und von Protein-Bindung überrepräsentiert.

Die meisten regulierten Gene befinden sich auf den Chromosomen 3, 4, 5, 8 und 10. Außerdem ähnelt der Effekt von siRNA 311 und si418 jenem von microRNAs: hsa-miR-513-3p, hsa-miR-363, hsa-miR-582-3p. Dieser Effekt kann auch indirekt das ganze Transkriptom beeinflussen.

3.3.4 Der Knockdown von Parvulin 14/17 verursacht Änderungen im Zellzyklus-Profil von HeLa-Zellen

Als nächstes wurde eine Proliferations- und Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Dazu wurden transfizierte HeLa-Zellen 24 und 48 Std nach der Transfektion 2 Std mit BrdU (Endkonzentration 10 μ M) kultiviert und anschließend mit dem Proliferations-Kit (BD Biosciences, Heidelberg) mit BrdU-Labeling und 7-AAD-Färbung untersucht (siehe Kapitel 2.2.3.11).

Die untersuchten Zellen werden dabei nur eine kurze Zeit (2 Std.) im Medium mit 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU) kultiviert. Der Einbau dieses Nukleotids anstelle von

Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in die neu synthetisierte DNA dient als Merkmal der Geschwindigkeit des Metabolismus der Zellen. Außerdem werden Zellen mit einem Farbstoff gefärbt, der mit der Gesamt-DNA interagiert (7-AAD). Diese Kombination mit zwei Farbstoffen (*two-color flow cytometric analysis*) erlaubt die Messung und Charakterisierung der Proliferation der Zellen (mit BrdU-Färbung) bezüglich ihrer Position im Zellzyklus (mit 7-AAD-Färbung). In Abb. 3.20 ist ein typisches Diagramm einer solchen FACS-Messungen dargestellt.

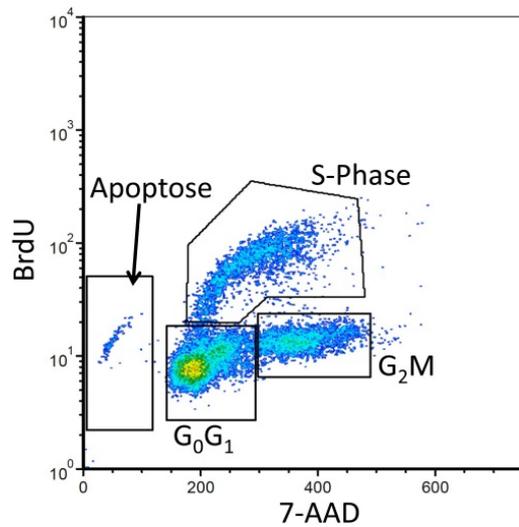


Abb. 3.20 Beispiel-Diagramm einer FACS-Messungen mit BrdU- und 7-AAD-Färbung.

Auf diese Weise wurden HeLa-Zellen 24 und 48 h nach der Transfektion mit den verschiedenen siRNA-Oligonukleotiden analysiert. In Abb. 3.21 sind die Ergebnisse dieses Proliferations-Assays dargestellt.

Die si5-transfizierten HeLa-Zellen zeigen keinen großen Unterschied in der Proliferation im Vergleich mit der Kontrolle. Im Gegenteil verlangsamten die siRNA-Konstrukte si311 und si418 die metabolischen Prozesse. Dies spiegelt sich in den Prozentzahlen der Zellen in der S-Phase (21,3 % von si311 und 16,4 % von si418) wider. Gleichzeitig wirken diese siRNAs etwas unterschiedlich: si311 blockiert die Zellen in der G₀G₁-Phase, während si418-Zellen in der G₂M-Phase verbleiben.

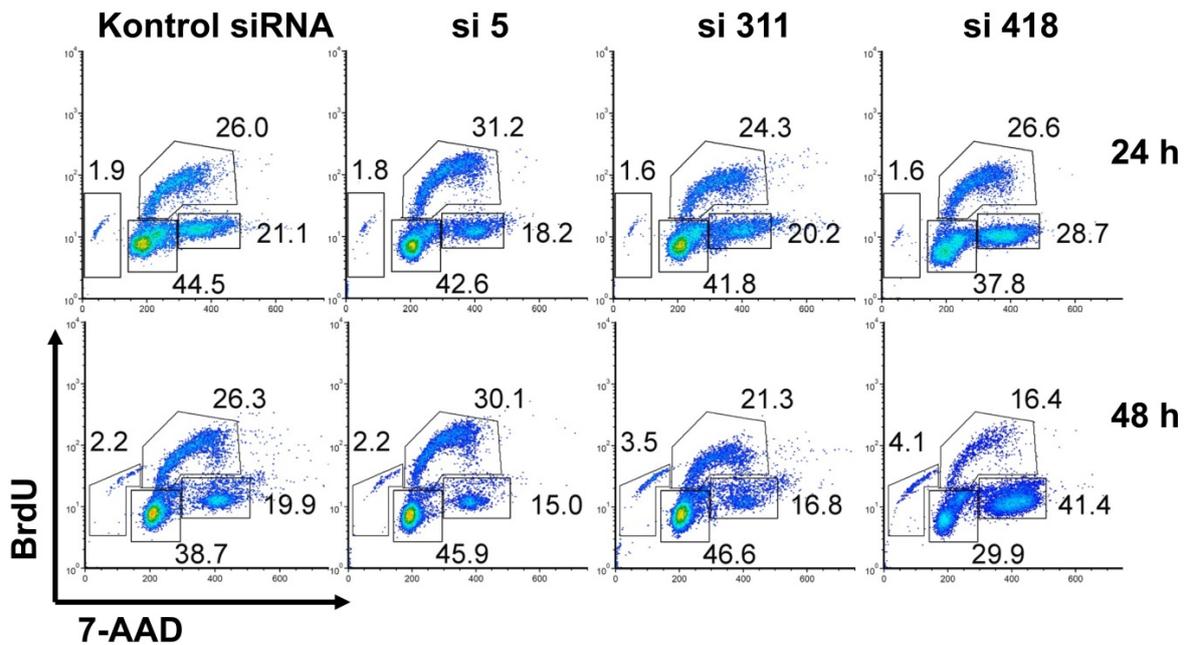


Abb. 3.21 Diagrammen von HeLa-Zellen nach dem Parvulin-Knockdown zu zwei Zeitpunkten (24 und 48 Std.) mit Proliferations-Kit (BD Biosciences, Heidelberg).

Deutlicher fallen die beschriebenen Unterschiede im Zell-Zyklus-Profil bei der 7-AAD-Färbung aus (Abb. 3.22). Der Unterschied zwischen si311 und si418 bezüglich der Anteile von G₁ und G₂/M ist noch deutlicher (G₀G₁-Phase 56,4 %, G₂M-Phase 17,3 % von si311 und G₀G₁-Phase 29,1 %, G₂M-Phase 31,6 % von si418). Der Effekt von si5 ist sehr schwach und vergleichbar mit der Kontroll-siRNA.

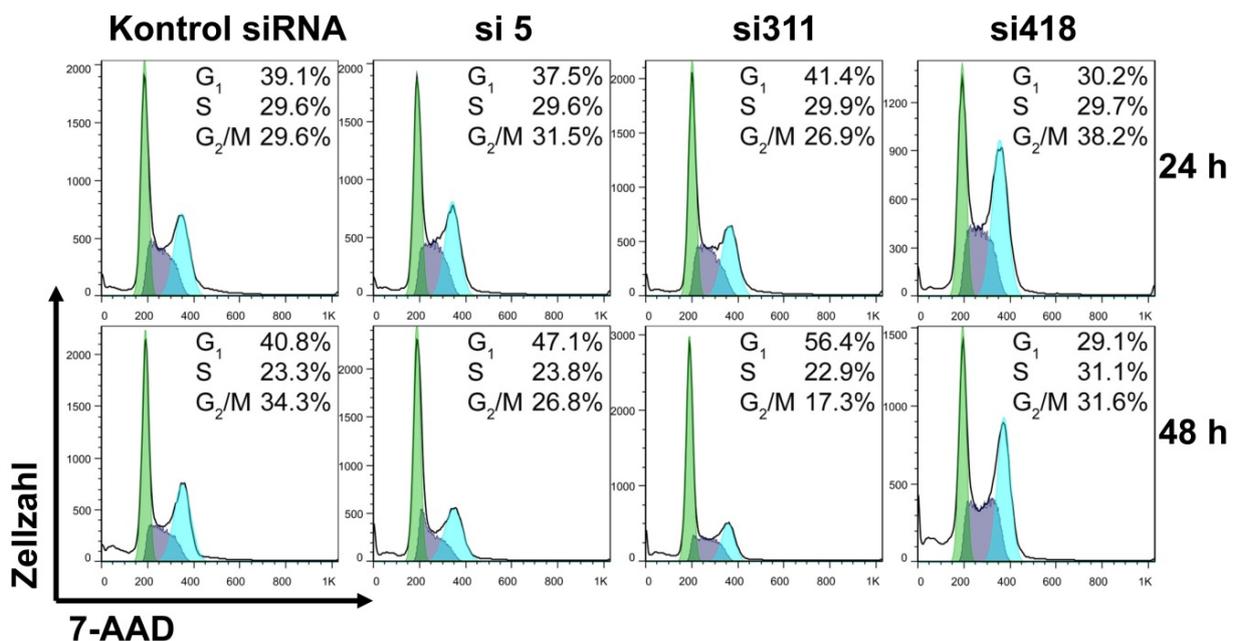


Abb. 3.22 Zell-Zyklus-Profil (mit 7-AAD Färbung) von HeLa-Zellen nach dem Parvulin-Knockdown zu zwei Zeitpunkten (24 und 48 Std.).

Die vorliegenden Arbeiten zeigen erstmalig einen gelungenen Knockdown von Par 14/17 mittels RNA-Interferenz. Die Reduktion der Parvulin-mRNA wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen. Die Knockdown-Effizienz für Par17 und Gesamt-Par war mehr als 98 % für die Konstrukte si311 und si418. Ein weiteres Konstrukt (si5), das ursprünglich zum gerichteten Knockdown von Par17 entworfen worden war, zeigte nahezu keine Wirkung auf den mRNA-Level von Par17 und auch auf Gesamt-Par. Der Parvulin-Knockdown zeigte starke Änderungen im Phänotyp, und zwar im zellularen Wachstum und auch im Zellzyklus. Zurzeit ist unklar, wieso die zwei siRNAs (si311 und si418), die beide die Gesamt-Parvulin-mRNA ausschalten, einen unterschiedlichen Effekt im Zellzyklus zeigen. Si311 führt zur Blockade der Zellen in der G₀G₁-Phase und das si418-Konstrukt scheint einen G₂M-Arrest zu verursachen.

4 Diskussion

4.1 Knockout von Par14 in DT40-Zellen

Mittels homologer Rekombination sollte in dieser Studie ein induzierbarer Knockout von Par14 erzeugt werden. Dafür wurde eine DT40-Zelllinie in unserem Labor etabliert, die stabil und gleichzeitig induzierbar das Cre-Rekombinase-System enthielt.

Für das Par14-Knockout-Konstrukt wurde die 5' genomische Sequenz mit endogenem Promoter und die 3'-Sequenz mit der Polyadenylierungsstelle auf GC-reichem Par14-Locus amplifiziert und mit verschiedenen Klonierungsschritten zusammen in einem Plasmid ligiert. Nach der erste Transfektion von DT40-Zellen mit dem Par14-Knockout-Konstrukt und der Neomycin-Selektion wurden insgesamt 34 Klone mittels Southern Blot auf eine erfolgreiche Rekombination getestet. Lediglich der Klon Nummer 11 konnte als positiv identifiziert werden (Abb. 3.8 A).

Die Transfektion für den Austausch des zweiten Allels wurde mehrfach wiederholt. Die Ergebnisse des Southern Blots haben gezeigt, dass bei keinem der 140 isolierten Klone ein Austausch des zweiten Par14-Allels erfolgt war.

Zu dieser Schwierigkeit kann der extrem hohe GC-Gehalt des Par14-Locus führen. Man muss erwähnen, dass der Par14-Locus im Hühner-Genom im Vergleich zum menschlichen Par14-Gen kürzer und bis zu 77 % GC-reich ist. Dies beeinträchtigte die Amplifikation und die gesamte Klonierung des Knockout-Konstrukts. Aufgrund des extrem hohen GC-Gehaltes kann das Konstrukt bei der Transfektion der Zellen zufallsbedingt im Genom eingebaut werden. Außerdem verstärken die zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Cytosin und Guanin im Vergleich zu AT-reichen Regionen die Bindung zwischen den DNA-Einzelstrangs des Knockout-Konstrukts, was für die effiziente Homologe Rekombination kritisch sein kann.

Auf Grund massiver Schwierigkeiten bei der Mutation des zweiten Allels des Par14-Knockouts und des aktuellen Stands der funktionalen Analysen von Par14 wurde die funktionale Studie von Parvulin weiter mit der Knockdown-Methode untersucht.

4.2. Amplifikation des Pin1-Locus von *Gallus gallus*

Der neu amplifizierte menschliche Pin1-Locus enthält vier Exons, die in allen Metazoen

ähnlich groß und hoch konserviert sind (Abb. 3.15). Die Introngröße ist hingegen nur innerhalb einzelner systematischer Gruppen ähnlich, wie z. B. innerhalb der Primaten, Nagetiere (Rodentia) oder Beutelsäuger (Metatheria). Der Pin1-Locus des einzigen Vertreters der Klasse Amphibia, des Krallenfrosches (*Xenopus tropicalis*), ist nur teilweise sequenziert. Das vorhandene Material deutet aber auf eine ähnliche Organisation (Größe) von Exons 2 und 3 hin. Exon 4 scheint eine deutlich größere 3'-nicht translatierte Region (3' UTR) als in allen anderen Spezies zu enthalten.

Eine BLAST-Suche mit der neuen Sequenz im ganzen Hühner-Genom ergab eine Sequenz (NW 001472557.1 Contig 3486.2), die Intron 3 und Exon 4 enthält (Nukleotide 1918 bis 2772 unserer Sequenz). Diese Sequenz war bisher noch keinem Gen in der Datenbank zugeordnet worden. Wo diese Sequenz sich befindet ist unklar, da Contig 3486.2 im unbenannten Chromosom (WASHUC2:Un_random) angegeben ist.

Der Karyotyp von *Gallus gallus* besteht aus 78 Chromosomen (2n), 38 Chromosomen sind autosomal, die zwei übrigen sind Geschlechts-Chromosomen ZZ – Männchen, ZW – Weibchen (Masabanda et al., 2004). Die 22 Chromosomen (von 17 – bis 38), die 7 Mb oder kleiner sind, gehören zu den sogenannten Mikro-Chromosomen (Masabanda et al., 2004; Musa et al., 2005). In der Arbeit von Hillier et al. (2004), wurde festgestellt, dass der GC-Gehalt mit der Chromosomen-Größe negativ korreliert ist (je kleiner das Chromosom desto höher der GC-Gehalt). Da der Pin1-Locus vom Huhn sehr GC-reich ist, befindet sich der Pin1-Locus vermutlich in einem der Mikro-Chromosomen. Dies kann eine mögliche Erklärung für das Fehlen dieses wichtigen Locus in den entsprechenden Genom-Sequenzierungen anderer Vögel und Reptilien sein (Janes et al., 2010).

Die hier beschriebene Sequenz ist für einen genetischen Knockout von Pin1 in DT40-Zellen ausreichend. Damit die Homologe-Rekombination stattfinden kann, muss das Knockout-Konstrukt eine gewisse Länge von 5'- und 3'-Sequenzen besitzen. Einige Studien empfehlen hier für den 5'-Arm eine Länge von 1,5 kB und für den 3'-Arm von 1 kB (Brunner et al., 2002). Somit sollte es in Zukunft möglich sein, mit der hier beschriebenen Sequenz ein Knockout-Konstrukt zu klonieren.

4.3 Die Reduktion der Expression von Parvulin 14 mittels Knockdown

Die Expression von Par14/17 konnte in der vorliegenden Arbeit mittels RNA-Interferenz durch die Verwendung von Stealth-siRNA-Konstrukten (Invitrogen, Karlsruhe) deutlich reduziert werden. Die qRT-PCR hat die 6-fache Reduktion der Parvulin-mRNA durch die

Konstrukte si311 und si418 gezeigt. Dies entspricht einer Knockdown-Effizienz von mehr als 98 % (Abb. 3.17).

Ein weiteres Konstrukt (si5), das ausschließlich die verlängerte mRNA von Par17 reduzieren sollte, zeigte in der qRT-PCR keine Wirkung auf den mRNA-Level von Par17 (Abb. 3.17). Die Sequenz für das si5-Konstrukt (wie auch für si418) wurde mit der Internet-Software *BLOCK-iT RNAi Designer* (Invitrogen, Karlsruhe) basierend auf dem Par14/17-Transkript (NM_006223.2) entworfen. Obwohl dieses Oligonukleotid vom Algorithmus als sehr gut bewertet wurde, hatte si5 keinen messbaren Einfluss auf die mRNA von Parvulin.

4.3.1 Der Knockdown von Par14 führt zu Änderungen im Wachstum und Zellzyklus

Der Knockdown von Parvulin wurde durch eine starke Änderung im Phänotyp sowohl beim Wachstum als auch im Zellzyklus-Profil begleitet. Das zelluläre Wachstum war durch die siRNA-Konstrukte si311 und si418 merklich reduziert. Auch hier hatte das Konstrukt si5 lediglich einen schwachen Effekt auf das Wachstum (Abb. 3.18).

Die beiden Stealth-siRNA-Konstrukte 311 und 418 bewirkten eine nachweislich starke Reduktion der Parvulin-mRNA und die Reduzierung des zellulären Wachstums. Eine sichtbare Differenz der beiden Konstrukte wird im Zellzyklus- und Proliferations-Profil beobachtet. Das Konstrukt si311 blockiert die Zellen in der G₁-Phase, während si418 einen G₂M-Arrest zu verursachen scheint. Zurzeit ist unklar, wieso die zwei siRNAs, die beide die Gesamt-Parvulin-mRNA ausschalten, einen unterschiedlichen Effekt auf den Zellzyklus zeigen. Das si311-Konstrukt (als Par14si genannt) wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit beschrieben (Fujiyama-Nakamura et al., 2009). Dort jedoch wurde keine Zellzyklus-Studie durchgeführt. Deswegen kann der Effekt von si311 nicht mit dieser Studie verglichen werden.

Interessant ist die Tatsache, dass der Knockout des verwandten Parvulin-Proteins Pin1 zum G₀-Arrest der MEFs-Zellen (Fujimori et al., 1999) oder zur Hemmung der G₁S-Phase der Urkeimzellen (englisch *Primordial Germ Cell*) führt (Atchison et al., 2003). Wenn die Aussage stimmt, dass Pin1 und Par14 teilweise ihre Funktionen übernehmen können (Fujimori et al., 1999; Liou et al., 2002; Uchida et al., 2003), müssen sie auch gleiche Interaktionspartner haben und in gleichen Signalwegen beteiligt sein. Darüber hinaus kann der Effekt von si311 in dieser Arbeit eine gewisse Analogie zum Effekt vom Pin1-Knockout haben. Um diese Aussage zu verstärken, wäre es nötig, noch ein weiteres siRNA-Konstrukt zu entwerfen und die gleichen Zellzyklus-Studien zu wiederholen.

4.3.2 Knockdown von Par14 und seine Auswirkungen auf das Transkriptom

In der Doktorarbeit von Akuma Saningong wurde beschrieben, dass Par14 mit DNA assoziiert ist, darüber hinaus kann Par14 bei einigen nukleären Prozessen beteiligt sein (Doktorarbeit Saningong, 2010). Um die Auswirkungen des Parvulin-Knockdowns auf Transkriptom-Ebene zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA von transfizierten HeLa-Zellen mittels Microarray-Hybridisierung (Dr. Ludger Klein-Hitpass, Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) analysiert.

Da Par14 mit prä-ribosomalen Ribonukleoprotein-Komplexen assoziiert ist, kann es eine Rolle bei der Biogenese der Ribosomen spielen (Fujiyama-Nakamura et al., 2009). Mit Hilfe der Flüssig-Chromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (*LC-MS, Liquid chromatography–mass spectrometry*) wurden dort 54 Proteine als mögliche Interaktionspartner von Par14 identifiziert. Wenn diese aufgelisteten Proteine eine Kompensierungsfunktion beim Par14-Knockdown haben, müssen die Änderungen in der Expression von diesen Proteinen auf Transkriptom-Ebene beobachtet werden.

Die Identifikationsnummer von möglichen Interaktionspartnern von Par14 (ID Gene) wurden nun benutzt, um in der Datenbank *NetAffx Query* von Affymetrix (www.affymetrix.com) die entsprechenden Probesets und damit die *Ratio Log* Werte aus der Ergebnisliste des Microarrays herauszufinden (Ordner 8 auf DVD). Diese Werte sind in Tabelle 6.3 im Anhang zusammengestellt.

Mehrere Gene der aufgelisteten Proteine wurden bei unseren Microarray-Analysen als nicht reguliert identifiziert. Diejenigen, die einen Unterschied zu Kontrolle zeigten, sind sehr schwach reguliert mit *Ratio Log*-Werten zwischen -0,7 bis 0,7.

Diese relativ schwachen Signale können trotzdem echte Signale sein. Man muss dazu erwähnen, dass die Expression von Par14 nach 40 Std. auf der Transkriptom-Ebene eine relativ milde Reduktion zeigte (*Ratio Log* -2,0, siehe Tabelle 3.4). Diese Reduktion kann zur geringen Regulation anderer Gene führen. Vermutlich zeigt die Unterdrückung der Expression von Par14 einen stärkeren Effekt zu einem späteren Zeitpunkt nach der RNAi, was auch stärker regulierte Gene beeinflussen wird.

Nur das siRNA-Konstrukt si5 zeigt bei dem Protein Rpf1 (*Ribosome production factor 1 homolog S. cerevisiae*) ein sehr starkes Signal (-2,0). Obwohl die mit dem Konstrukt si5 transfizierten HeLa-Zellen keinen Phänotyp im Wachstum und im Zellzyklus hatten, haben diese Zellen eine starke Änderung auf der Transkriptom-Ebene im Vergleich zur Kontrolle.

Wegen der hohen Unspezifität des Antikörpers war es in der vorliegenden Studie nicht möglich, die Protein-Menge von Par14 nach Behandlung mit den siRNA-Konstrukten zu

bestimmen (Daten nicht gezeigt). Jedes Protein ist unterschiedlich stabil, wird in unterschiedlichen Konzentrationen von den Zellen synthetisiert und hat seine eigene Halbwertszeit in der Zelle. Die Reduktion der Expression wird nicht sofort auf Protein-Ebene bemerkbar. Somit kann es sein, dass 40 Std. nach dem Knockdown von Par14, trotz starkem Einfluss auf die mRNA, keine Reduktion der Protein-Konzentration eingetreten war.

In der Arbeit von Fujiyama-Nakamura et al., 2009, zeigt ein Western Blot eine 80%-ige Reduktion des Par14-Proteinniveaus mit einer Par14si-RNA (das si311-Konstrukt in dieser Arbeit) bereits nach 4 Tagen nach der Transfektion (Abb. 1.5 B). Wie stark der Effekt des Par14-mRNA-Knockdowns auf die Protein-Menge dieser Studie ist, ist unklar. Dafür ist ein Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper notwendig.

4.3.3 Über den möglichen Einfluss von Off-Targets-Effekten der siRNAs

Der Vergleich der Daten von si311 und si418 ergab keine große Übereinstimmung bei den regulierten Probesets. Dies war auch zu erwarten, da beide Konstrukte unterschiedlich auf den Zellzyklus wirkten und dadurch auf unterschiedliche Prozesse und Pathways wirken konnten. Hierfür könnten (unterschiedliche) Off-Targets-Effekte der beiden siRNAs verantwortlich gemacht werden.

Off-Targets-Effekte sind unbeabsichtigte Wirkungen bei der RNAi auf die Expression von anderen Genen. Man unterscheidet zwei Arten solcher Effekte: unspezifische und spezifische Off-Targets-Effekte (Rao et al., 2009). Zu den unspezifischen Off-Targets-Effekten gehören die natürlichen immunologischen und toxischen Effekte der direkten Interaktion der siRNA-Konstrukte mit dem mRNA-Transkript. Dieser Effekt kann durch chemische Modifizierung vermindert werden. Dabei wird 2'-Hydroxy-Uridin im Konstrukt durch 2'-Fluoro-, 2'-Deoxy-, oder 2'-O-Methyl-Uridin ausgetauscht (Sioud M. 2006; M.Rao et al., 2009). Alternativ kann die Sequenz mittels Insertion von G:U-Mismatches modifiziert werden (Watanabe et al., 2006). Die Stealth-siRNAs von Invitrogen (Karlsruhe), die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind nach Hersteller-Angaben so chemisch modifiziert worden, dass Off-Targets-Effekte reduziert wurden. Leider wurde die Art der Modifizierung nicht angegeben.

Bei unspezifischen Off-Targets-Effekten handelt es sich auch um einen möglichen Einfluss der siRNA-Konstrukte auf die microRNA. MicroRNAs (*miRNAs*) sind nicht-kodierende RNAs, die die Genexpression auf der post-transkriptionalen Ebene (He und Hannon, 2004) regulieren. Die BLAST-Analyse auf Übereinstimmungen zwischen den siRNA-Konstrukten und den microRNAs ist begrenzt, weil keine umfangreiche Datenbank von miRNAs existiert.

Die Daten der GeneTrail-Analyse verweisen jedoch indirekt auf eine mögliche Interaktion zwischen den siRNAs mit miRNAs (Tabelle 6.2).

Bei spezifischen Off-Targets-Effekten handelt es sich um eine zufällige Übereinstimmung zwischen der verwendeten siRNA und der mRNA von anderen nicht gezielt ausgerichteten (*not targeted*) Genen (Rao et al., 2009). Dies kann eine ungewollte Gen-Suppression induzieren, so dass die mRNA-Levels anderer Gene ebenfalls reduziert werden.

Deswegen ist bei dem Problem der Off-Targets-Effekte das richtige Design der siRNAs wichtig. Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs wurden mittels der Internet-Software *BLOCK-iT RNAi Designer* (Invitrogen, Karlsruhe) entworfen. Zudem wurden si311 und die verwendete Kontroll-siRNA bereits von Fujiyama-Nakamura et al., 2009 beschrieben.

Jede Software benutzt beim Design der Konstrukte einen eigenen Algorithmus und deshalb unterscheiden sich die Ergebnisse der Analyse. Zum Vergleich des Designs der siRNAs wurden außer dem Programm *BLOCK-iT RNAi Designer* (Invitrogen, Karlsruhe) auch zwei weitere Softwares *AsiDesigner* (Park et al., 2008) und *siDirect v2.0* (Yamada und Morishita, 2005) verwendet. Die Ergebnisse dieser Programme sind in den Tabellen 4.1, 4.2, und 4.3 dargestellt.

Tabelle 4.1 Designvorschlag für siRNA-Konstrukte des Programms BLOCK-iT RNAi Designer (<https://rnaidesigner.invitrogen.com>). Es wurden folgende Parameter eingegeben: Accession number - NM_006223.2; Regions for target design - Open reading frame (ORF), 5' UTR, 3' UTR; Database for Blast - Human - Homo sapiens; Minimum and maximum G/C percentage - 35 - 55 %. Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs (5, 311 und 418) sind in der Tabelle grau hinterlegt.

siRNA Position	Sequenz	GC-Gehalt	Region
5	GAGATGCGGCTTTCAGGCATTTGTT	0,48	UTR5
76	TGGAGCGGTTTCAGCGTTCAACAACA	0,52	ORF
220	CAGTAAAGGTCAGACACATTCTATG	0,40	ORF
311	GGCCGCACAGTATAGTGAAGATAAA	0,44	ORF
371	AGGGTCCATGGTGGGACCATTTCAA	0,52	ORF
383	GGGACCATTTCAAGAAGCAGCATT	0,44	ORF
408	GCCTTGCCTGTAAGTGGGATGGATA	0,52	ORF
409	CCTTGCCTGTAAGTGGGATGGATAA	0,48	ORF
418	TAAGTGGGATGGATAAGCCTGTGTT	0,44	ORF
1016	CCTTTCAGTGTTAACTCCTTTCTTT	0,36	UTR3

Tabelle 4.2 Designvorschlag für siRNA-Konstrukte vom Programm AsiDesigner (<http://sysbio.kribb.re.kr/AsiDesigner/>). Es wurden folgende Parameter eingegeben:

Organism : Human - Homo.sapiens; Target mRNA ID : NM_006223; siRNA design options: A. siRNA sequence with - NN(19bp); B. Select target region - Full transcript; C. GC Content Range - zwischen 30 - 55 % (empfohlene Einstellung); D. Maximum consecutive - A<=5, C<=3, G<=3, T<=5, G/C<=7 (empfohlene Einstellung); E. Number of bases matched to other mRNAs - 15 (empfohlene Einstellung); F. + SNPs existed; G. + Exclusion of siRNA secondary structure. Die in dieser Arbeit verwendete siRNA 5 ist in der Tabelle markiert.

siRNA Position	Sequenz	GC-Gehalt	Ähnlichkeit	Tm
787	cuGACUCUCAGUCUGUCCCAUaa	0,53	14	60,0
687	aaGUGAAUGUCAACUGUAGUAgg	0,37	14	51,6
5	gaGAUGCGGCUUUCAGGCAUUug	0,53	13	58,9
837	agCAGAUUAUCAACUCACACUauu	0,37	14	51,2
791	cuCUCAGUCUGUCCCAUAAAUua	0,42	14	54,0
978	uaGCUCCACUGUCUUAACAUAgu	0,42	14	55,0
614	aaGAUAUUGGAUGCUCUUGUau	0,42	15	53,9
774	ccCAGAACUAUUUCUGACUCuca	0,37	14	50,6
940	caUGUUAGUCAACUCUGAUCUuc	0,37	15	52,4
220	caGUAAGGUCAGACACAUCua	0,42	15	52,9

Das Programm *AsiDesigner* benutzt einen Algorithmus für die Auswahl der Target-Sequenz aufgrund alternativen Spleißens mit der Berücksichtigung der Energie von Sekundärstruktur der siRNA-Moleküle (Park et al., 2008). Außerdem werden möglichen Übereinstimmungen mit anderen mRNAs durch BLAST- und FASTA-Algorithmen beachtet. Der Parameter Ähnlichkeit weist auf Folgendes hin: je niedriger die Zahl ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit von Off-Targets-Effekten (Tabelle 4.2). An dieser Stelle wird deutlich, dass es die perfekte siRNA mit weniger als 10 Nukleotiden Ähnlichkeit nicht gibt.

Die Software *siDirect Version 2.0* verwendet ebenfalls den BLAST-Algorithmus, um Ähnlichkeiten mit anderen mRNAs zu identifizieren. Hier wurde jedoch nur eine maximale Länge von 19 Nukleotiden angestrebt (Yamada und Morishita, 2005). Deswegen kann man diese Ergebnisse mit den Ergebnissen von *BLOCK-iT RNAi Designer* (Invitrogen, Karlsruhe) und *AsiDesigner* schlecht vergleichen (Tabelle 4.3).

Die drei verwendeten Programme zeigten große Unterschiede bei den vorgeschlagenen Sequenzen für die RNA-Interferenz. Dabei wurde die Sequenz von dem nicht funktionierenden si5-Konstrukt von zwei Programmen ausgewählt (Tabelle 4.1 und 4.2). Die Sequenzen von si311 und si418 kamen nur in der Ergebnisliste von *BLOCK-iT RNAi Designer* (Invitrogen, Karlsruhe) vor.

Tabelle 4.3 Designvorschlag für siRNA-Konstrukte vom Programm siDirect Version 2.0 (<http://design.RNAi.jp>). Das Design wurde mit folgenden Parameter durchgeführt: Query name: NM_006223; Seed-duplex stability - Max Tm: 21.5°C; Specificity check: *Homo sapiens* non-redundant database; GC content: 35% - 55%; Custom pattern: NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN (23 Nukleotide).

siRNA Position	Sequenz	GC-Gehalt
24	CAGAAGAATGGTACAAATCCAAG	Ok
159	CCCTTAAAGGAACCAATGAGTCC	Ok
261	AGGATGAGATTCAGAATATGAAG	-
461	CTGGTTGATACCCACTCAAAAAG	Ok
462	TGGTTGATACCCACTCAAAAAGG	Ok
491	CTGATTAAGACGGTTGAAACTAG	Ok
519	GACAGGTTATCAACGAACTTCT	Ok
521	CAGGTTATCAACGAACTTCTCA	Ok

Jackson et al. (2003) bestimmten, dass bereits eine Übereinstimmung zwischen siRNA und Transkript von 11 Nukleotiden zu Off-Targets-Effekten führen kann. Um zu prüfen, ob diese Aussage in unserem Fall zutrifft, wurden die Sequenzen von den siRNA-Konstrukten (si5, si311 und si418) über das BLAST-Programm mit der ganzen RefSeq RNA Datenbank von *Homo sapiens* verglichen. Mit der Gene ID (Identifikationsnummer von Genen) wurden nach möglichen Probesets von dem Chip (GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array) auf der Affymetrix-Seite (www.affymetrix.com) in der *NetAffx Query* Datenbank gesucht. Die aufgelisteten Probesets wurden danach in der Ergebnisliste mit statistisch signifikanten Daten vom Mikroarray (p-value <0,002 für die hoch-regulierten Gene und p-value >0.998 für unter-regulierten Gene im Ordner 8 auf der DVD) für jedes siRNA-Konstrukt herausgesucht. Alle Probesets mit Übereinstimmungen in der Nukleotidsequenz wurden in dieser Liste nach der *Signal Log Ratio* (die Änderung der Expression eines Gens im Vergleich zur Kontrolle) gesucht. Die ersten zehn Gene mit maximaler Überlappung sind in Tabelle 6.4 (siehe Anhang) aufgelistet.

Für jede angegebene siRNA gab es bei der BLAST-Suche mehrere Übereinstimmungen mit unterschiedlicher Größe von 10 bis 18 Nukleotiden. Diese wurden in der Ergebnisliste nach möglichen Expressionsänderungen geprüft. Nur zwei davon waren nach dem BLAST-Vergleich von der si311-Nukleotidensequenz reguliert (KIAA1598, ZMYM4 Tabelle 6.4, siehe Anhang). Außerdem wurden diese zwei Gene nicht nur von dem si311-Konstrukt, sondern auch von anderen siRNA-Konstrukten reguliert, obwohl diese keine Überlappung in der Nukleotidsequenz mit Transkripten hatten (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4 Die Regulierung der Gene, die eine Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz bei der BLAST-Suche mit dem si311-Konstrukt aufweisen.

Gen ID	Gen Name	Probeset	Ratio Log	siRNA
PIN4	Protein (peptidyl prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 (parvulin)	204572_s_at	-0,6	si5
			-2,0	si311
			-2,0	si418
KIAA1598	Homo sapiens KIAA1598 transcript variant 2, mRNA	221802_s_at	-0,5	si5
			-1,7	si311
			-0,5	si418
ZMYM4	Zinc finger, MYM-type 4	202051_s_at	-0,4	si5
			-0,4	si311
			-0,6	si418

Das si5-Konstrukt, das keinen Einfluss auf die Parvulin-mRNA zeigte, hatte ebenfalls eine Auswirkung auf diese Gene gezeigt (Ratio Log -0,5 für KIAA1598; und -0,4 für ZMYM4). Aus diesem Grund kann man vermuten, dass alle Übereinstimmungen, die in dem BLAST-Vergleich gefunden wurden, keine spezifische Off-Targets-Effekte mit Interaktion von anderen mRNA verursachen können, beziehungsweise dass regulierte Gene nicht durch spezifische Off-Targets-Effekte beeinflusst worden waren.

5 Zusammenfassung

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 LoxP-Erkennungssequenz 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 Allels wurde mittels Southern Blot nachgewiesen, der hierfür im Labor erstmalig etabliert wurde. Der Austausch des zweiten Allels war auch nach mehrmaligen Wiederholungen 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.

6 Referenzen

Andreeva L, Heads R, Green CJ. Cyclophilins and their possible role in the stress response. *Int J Exp Pathol*. 1999 Dec;80(6):305-15.

Arévalo-Rodríguez M, Cardenas ME, Wu X, Hanes SD, Heitman J. Cyclophilin A and Ess1 interact with and regulate silencing by the Sin3-Rpd3 histone deacetylase. *EMBO J*. 2000 Jul 17;19(14):3739-49.

Arevalo-Rodriguez M, Wu X, Hanes SD, Heitman J. Prolyl isomerases in yeast. *Front Biosci*. 2004 Sep 1;9:2420-46.

Atchison FW, Capel B, Means AR. Pin1 regulates the timing of mammalian primordial germ cell proliferation. *Development*. 2003 Aug;130(15):3579-86.

Atchison FW, Means AR. A role for Pin1 in mammalian germ cell development and spermatogenesis. *Front Biosci*. 2004 Sep 1;9:3248-56.

Backes C, Keller A, Kuentzer J, Kneissl B, Comtesse N, Elnakady YA, Müller R, Meese E, Lenhof HP. GeneTrail--advanced gene set enrichment analysis. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jul;35(Web Server issue):W186-92. Epub 2007 May 25.

Brummer T, Shaw PE, Reth M, Misawa Y. Inducible gene deletion reveals different roles for B-Raf and Raf-1 in B-cell antigen receptor signalling. *EMBO J*. 2002 Nov 1;21(21):5611-22.

Buerstedde JM, Takeda S. Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell*. 1991 Oct 4;67(1):179-88.

Colgan J, Yuan HE, Franke EK, Luban J. Binding of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein to cyclophilin A is mediated by the central region of capsid and requires Gag dimerization. *J Virol*. 1996 Jul;70(7):4299-310.

Daum S, Schumann M, Mathea S, Aumüller T, Balsley MA, Constant SL, de Lacroix BF, Kruska F, Braun M, Schiene-Fischer C. Isoform-specific inhibition of cyclophilins. *Biochemistry*. 2009 Jul 7;48(26):6268-77.

Davies TH, Ning YM, Sánchez ER. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J Biol Chem*. 2002 Feb 15;277(7):4597-600. Epub 2001 Dec 20.

Davies TH, Sánchez ER. FKBP52. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Jan;37(1):42-7.

Devasahayam G, Chaturvedi V, Hanes SD. The Ess1 prolyl isomerase is required for growth and morphogenetic switching in *Candida albicans*. *Genetics*. 2002 Jan;160(1):37-48.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14863-8.

- Fischer G, Tradler T, Zarnt T: The mode of action of peptidyl prolyl cis/trans isomerase in vivo: binding vs. catalysis. *FEBS Lett* 1998; 426: 17 – 20.
- Frey UH, Bachmann HS, Peters J, Siffert W. PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. *Nat Protoc.* 2008;3(8):1312-7.
- Fujimori F, Gunji W, Kikuchi J, Mogi T, Ohashi Y, Makino T, Oyama A, Okuhara K, Uchida T, Murakami Y. Crosstalk of prolyl isomerases, Pin1/Ess1, and cyclophilin A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 23;289(1):181-90.
- Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, Uchida T. Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Nov 30;265(3):658-63.
- Fujiyama S, Yanagida M, Hayano T, Miura Y, Isobe T, Fujimori F, Uchida T, Takahashi N. Isolation and proteomic characterization of human Parvulin-associating preribosomal ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem.* 2002 Jun 28;277(26):23773-80. Epub 2002 Apr 17.
- Fujiyama-Nakamura S, Yoshikawa H, Homma K, Hayano T, Tsujimura-Takahashi T, Izumikawa K, Ishikawa H, Miyazawa N, Yanagida M, Miura Y, Shinkawa T, Yamauchi Y, Isobe T, Takahashi N. Parvulin (Par14), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, is a novel rRNA processing factor that evolved in the metazoan lineage. *Mol Cell Proteomics.* 2009 Jul;8(7):1552-65.
- Galat A. Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity targets functions. *Curr Top Med Chem.* 2003;3(12):1315-47.
- Gemmill TR, Wu X, Hanes SD. Vanishingly low levels of Ess1 prolyl-isomerase activity are sufficient for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2005 Apr 22;280(16):15510-7. Epub 2005 Feb 23.
- Gibbs RA, Weinstock GM, Metzker ML, Muzny DM, Sodergren EJ et al., Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. Rat Genome Sequencing Project Consortium. *Nature.* 2004 Apr 1;428(6982):493-521.
- Giorgio V, Soriano ME, Basso E, Bisetto E, Lippe G, Forte MA, Bernardi P. Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jun-Jul;1797(6-7):1113-8. Epub 2009 Dec 21.
- Hanes SD, Shank PR, Bostian KA. Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1989 Jan-Feb;5(1):55-72.
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K. Schnorr, D., and Loening, S. (1997) Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 25 (19), 3957–3958
- Hillier LW, Miller W, Birney E, Warren W, Hardison RC, et al. 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 432:695–716

- Huang HK, Forsburg SL, John UP, O'Connell MJ, Hunter T. Isolation and characterization of the Pin1/Ess1p homologue in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 20):3779-88.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*. 2003 Jun;21(6):635-7. Epub 2003 May 18.
- Janes DE, Organ CL, Fujita MK, Shedlock AM, Edwards SV. Genome evolution in Reptilia, the sister group of mammals. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010 Sep 22;11:239-64.
- Jensen MA, Fukushima M, Davis RW. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. *PLoS One*. 2010 Jun 11;5(6):e11024.
- Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):405-12.
- Joseph JD, Daigle SN, Means AR. PINA is essential for growth and positively influences NIMA function in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*. 2004 Jul 30;279(31):32373-84. Epub 2004 Jun 3.
- Ke H, Huai Q. Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Nov 28;311(4):1095-102.
- Kessler D, Papatheodorou P, Stratmann T, Dian EA, Hartmann-Fatu C, Rassow J, Bayer P, Mueller JW. The DNA binding parvulin Par17 is targeted to the mitochondrial matrix by a recently evolved prepeptide uniquely present in Hominidae. *BMC Biol*. 2007 Sep 17;5:37.
- Kolmodin LA, Birch DE. Polymerase chain reaction. Basic principles and routine practice. *Methods Mol Biol*. 2002;192:3-18.
- Li H, Luan S. AtFKBP53 is a histone chaperone required for repression of ribosomal RNA gene expression in *Arabidopsis*. *Cell Res*. 2010 Mar;20(3):357-66. Epub 2010 Feb 9.
- Li L, Lou Z, Wang L. The role of FKBP5 in cancer aetiology and chemoresistance. *Br J Cancer*. 2011 Jan 4;104(1):19-23. Epub 2010 Nov 30.
- Li Z, Li H, Devasahayam G, Gemmill T, Chaturvedi V, Hanes SD, Van Roey P. The structure of the *Candida albicans* Ess1 prolyl isomerase reveals a well-ordered linker that restricts domain mobility. *Biochemistry*. 2005 Apr 26;44(16):6180-9.
- Liou YC, Ryo A, Huang HK, Lu PJ, Bronson R, Fujimori F, Uchida T, Hunter T, Lu KP. Loss of Pin1 function in the mouse causes phenotypes resembling cyclin D1-null phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1335-40. Epub 2002 Jan 22.
- Lu KP, Hanes SD, Hunter T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature*. 1996 Apr 11;380(6574):544-7.
- Lu KP, Liou YC, Vincent I. Proline-directed phosphorylation and isomerization in mitotic regulation and in Alzheimer's Disease. *Bioessays*. 2003 Feb;25(2):174-81.

- Lu KP, Suizu F, Zhou XZ, Finn G, Lam P, Wulf G. Targeting carcinogenesis: a role for the prolyl isomerase Pin1? *Mol Carcinog.* 2006 Jun;45(6):397-402.
- Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature.* 1999 Jun 24;399(6738):784-8.
- Luban J, Bossolt KL, Franke EK, Kalpana GV, Goff SP. Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell.* 1993 Jun 18;73(6):1067-78.
- Malesević M, Poehlmann A, Hernandez Alvarez B, Diessner A, Träger M, Rahfeld JU, Jahreis G, Liebscher S, Bordusa F, Fischer G, Lücke C. The protein-free IANUS peptide array uncovers interaction sites between *Escherichia coli* parvulin 10 and alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry.* 2010 Oct 5;49(39):8626-35. Epub 2010 Sep 9.
- Maleszka R, Hanes SD, Hackett RL, de Couet HG, Miklos GL. The *Drosophila melanogaster* dodo (dod) gene, conserved in humans, is functionally interchangeable with the ESS1 cell division gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 9;93(1):447-51.
- Masabanda JS, Burt DW, O'Brien PC, Vignal A, Fillon V, Walsh PS, Cox H, Tempest HG, Smith J, Habermann F, Schmid M, Matsuda Y, Ferguson-Smith MA, Crooijmans RP, Groenen MA, Griffin DK. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the first complete avian karyotype. *Genetics.* 2004 Mar;166(3):1367-73.
- McMahon G, Weir MR, Li XC, Mandelbrot DA. The evolving role of mTOR inhibition in transplantation tolerance. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Mar;22(3):408-15. Epub 2011 Feb 25.
- Mueller JW, Bayer P. Small family with key contacts: par14 and par17 parvulin proteins, relatives of pin1, now emerge in biomedical research. *Perspect Medicin Chem.* 2008 Mar 7;2:11-20.
- Mueller JW, Kessler D, Neumann D, Stratmann T, Papatheodorou P, Hartmann-Fatu C, Bayer P. Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation. *BMC Mol Biol.* 2006 Mar 7;7:9.
- Musa HH, Li BC, Chen GH, Lanyasunya TP, Xu Q, Bao WB. Karyotype and Banding Patterns of Chicken Breeds. *International Journal of Poultry Science* 4 (10): 741-744, 2005
- Nelson CJ, Santos-Rosa H, Kouzarides T. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell.* 2006 Sep 8;126(5):905-16.
- Osmani SA, Engle DB, Doonan JH, Morris NR. Spindle formation and chromatin condensation in cells blocked at interphase by mutation of a negative cell cycle control gene. *Cell.* 1988 Jan 29;52(2):241-51.
- Ozaki K, Fujiwara T, Kawai A, Shimizu F, Takami S, Okuno S, Takeda S, Shimada Y, Nagata M, Watanabe T, Takaichi A, Takahashi E, Nakamura Y, Shin S. Cloning, expression and chromosomal mapping of a novel cyclophilin-related gene (PPIL1) from human fetal brain. *Cytogenet Cell Genet.* 1996;72(2-3):242-5.

- Palancade B, Marshall NF, Tremeau-Bravard A, Bensaude O, Dahmus ME, Dubois MF. Dephosphorylation of RNA polymerase II by CTD-phosphatase FCP1 is inhibited by phospho-CTD associating proteins. *J Mol Biol.* 2004 Jan 9;335(2):415-24.
- Park YK, Park SM, Choi YC, Lee D, Won M, Kim YJ. AsiDesigner: exon-based siRNA design server considering alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W97-103. Epub 2008 May 14.
- Pemberton TJ. Identification and comparative analysis of sixteen fungal peptidyl-prolyl cis/trans isomerase repertoires. *BMC Genomics.* 2006 Sep 22;7:244.
- Preall JB, Sontheimer EJ. RNAi: RISC gets loaded. *Cell.* 2005 Nov 18;123(4):543-5.
- Pu RT, Xu G, Wu L, Vierula J, O'Donnell K, Ye XS, Osmani SA. Isolation of a functional homolog of the cell cycle-specific NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* and functional analysis of conserved residues. *J Biol Chem.* 1995 Jul 28;270(30):18110-6.
- Rahfeld JU, Rücknagel KP, Schelbert B, Ludwig B, Hacker J, Mann K, Fischer G. Confirmation of the existence of a third family among peptidyl-prolyl cis/trans isomerases. Amino acid sequence and recombinant production of parvulin. *FEBS Lett.* 1994 Sep 26;352(2):180-4.
- Rahfeld JU, Schierhorn A, Mann K, Fischer G. A novel peptidyl-prolyl cis/trans isomerase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 1994 Apr 18;343(1):65-9.
- Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Jul 25;61(9):746-59. Epub 2009 Apr 20.
- Reimer T, Weiwad M, Schierhorn A, Ruecknagel PK, Rahfeld JU, Bayer P, Fischer G. Phosphorylation of the N-terminal domain regulates subcellular localization and DNA binding properties of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase hPar14. *J Mol Biol.* 2003 Jul 25;330(5):955-66.
- Rual JF, Ceron J, Koreth J, Hao T, Nicot AS, Hirozane-Kishikawa T, Vandenhoute J, Orkin SH, Hill DE, van den Heuvel S, Vidal M. Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res.* 2004 Oct;14(10B):2162-8.
- Rudd KE, Sofia HJ, Koonin EV, Plunkett G 3rd, Lazar S, Rouviere PE. A new family of peptidyl-prolyl isomerases. *Trends Biochem Sci.* 1995 Jan;20(1):12-4.
- Rulten S, Thorpe J, Kay J. Identification of eukaryotic parvulin homologues: a new subfamily of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jun 16;259(3):557-62.
- Ryo A, Liou YC, Wulf G, Nakamura M, Lee SW, Lu KP. PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/Ras-induced transformation of mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol.* 2002 Aug;22(15):5281-95.
- Ryo A, Nakamura M, Wulf G, Liou YC, Lu KP. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat Cell Biol.* 2001 Sep;3(9):793-801.

- Saningong AD. Functional Studies on Par14/Par17 with Emphasis on Chromatin, the Cell Cycle, and Protein-Protein Interactions. Dissertation, Fakultät Biologie und Geografie, Universität Duisburg-Essen. 2010
- Santos-Rosa H, Kirmizis A, Nelson C, Bartke T, Saksouk N, Cote J, Kouzarides T. Histone H3 tail clipping regulates gene expression. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Jan;16(1):17-22. Epub 2008 Dec 14.
- Schaft J, Ashery-Padan R, van der Hoeven F, Gruss P, Stewart AF. Efficient FLP recombination in mouse ES cells and oocytes. *Genesis.* 2001 Sep;31(1):6-10.
- Schmid FX: Protein folding. Prolyl isomerases join the fold. *Curr Biol* 1995; 5: 993 – 994.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
- Seinen E, Burgerhof JG, Jansen RC, Sibon OC. RNAi-induced off-target effects in *Drosophila melanogaster*: frequencies and solutions. *Brief Funct Genomics.* 2011 May 19. [Epub ahead of print]
- Sekerina E, Rahfeld JU, Müller J, Fanghänel J, Rascher C, Fischer G, Bayer P. NMR solution structure of hPar14 reveals similarity to the peptidyl prolyl cis/trans isomerase domain of the mitotic regulator hPin1 but indicates a different functionality of the protein. *J Mol Biol.* 2000 Aug 25;301(4):1003-17.
- Seko Y, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Murayama K, Nagai R. Hypoxia followed by reoxygenation induces secretion of cyclophilin A from cultured rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Apr 23;317(1):162-8.
- Sharma VK, Li B, Khanna A, Sehajpal PK, Suthanthiran M. Which way for drug-mediated immunosuppression? *Curr Opin Immunol.* 1994 Oct;6(5):784-90.
- Shaw PE. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and transcription: is there a twist in the tail? *EMBO Rep.* 2007 Jan;8(1):40-5.
- Shen M, Stukenberg PT, Kirschner MW, Lu KP. The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* 1998 Mar 1;12(5):706-20.
- Shizuya H, Birren B, Kim U-J, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89 (18): 8794–8797.
- Sioud M. Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: a central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses. *Eur J Immunol.* 2006 May;36(5):1222-30.
- Sönnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, Alleaume AM, Artelt J, Bettencourt P, Cassin E, Hewitson M, Holz C, Khan M, Lazik S, Martin C, Nitzsche B, Ruer M, Stamford J, Winzi M, Heinkel R, Röder M, Finell J, Häntschi H, Jones SJ, Jones M, Piano F, Gunsalus KC, Oegema K, Gönczy P, Coulson A, Hyman AA, Echeverri CJ. Full-

genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2005 Mar 24;434(7032):462-9.

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15545-50. Epub 2005 Sep 30.

Surmacz TA, Bayer E, Rahfeld JU, Fischer G, Bayer P. The N-terminal basic domain of human parvulin hPar14 is responsible for the entry to the nucleus and high-affinity DNA-binding. *J Mol Biol*. 2002 Aug 9;321(2):235-47.

Takahashi N, Yanagida M, Fujiyama S, Hayano T, Isobe T. Proteomic snapshot analyses of preribosomal ribonucleoprotein complexes formed at various stages of ribosome biogenesis in yeast and mammalian cells. *Mass Spectrom Rev*. 2003 Sep-Oct;22(5):287-317.

Terada T, Shirouzu M, Fukumori Y, Fujimori F, Ito Y, Kigawa T, Yokoyama S, Uchida T. Solution structure of the human parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase, hPar14. *J Mol Biol*. 2001 Jan 26;305(4):917-26.

Thorpe JR, Rulten SL, Kay JE. Binding of a putative and a known chaperone protein revealed by immunogold labeling transmission electron microscopy: A suggested use of chaperones as probes for the distribution of their target proteins. *J Histochem Cytochem*. 1999 Dec;47(12):1633-40.

Uchida T, Fujimori F, Tradler T, Fischer G, Rahfeld JU. Identification and characterization of a 14 kDa human protein as a novel parvulin-like peptidyl prolyl cis/trans isomerase. *FEBS Lett*. 1999 Mar 12;446(2-3):278-82.

Uchida T, Takamiya M, Takahashi M, Miyashita H, Ikeda H, Terada T, Matsuo Y, Shirouzu M, Yokoyama S, Fujimori F, Hunter T. Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation. *Chem Biol*. 2003 Jan;10(1):15-24.

Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, Tintelnot-Blomley M, Lemasters JJ. Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem*. 2003 Aug;10(16):1485-506.

Watanabe T, Sudoh M, Miyagishi M, Akashi H, Arai M, Inoue K, Taira K, Yoshida M, Kohara M. Intracellular-diced dsRNA has enhanced efficacy for silencing HCV RNA and overcomes variation in the viral genotype. *Gene Ther*. 2006 Jun;13(11):883-92.

Wu B, Li P, Liu Y, Lou Z, Ding Y, Shu C, Ye S, Bartlam M, Shen B, Rao Z. 3D structure of human FK506-binding protein 52: implications for the assembly of the glucocorticoid receptor/Hsp90/immunophilin heterocomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8348-53. Epub 2004 May 24.

Wu X, Rossetini A, Hanes SD. The ESS1 prolyl isomerase and its suppressor BYE1 interact with RNA pol II to inhibit transcription elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2003 Dec;165(4):1687-702.

Wu X, Wilcox CB, Devasahayam G, Hackett RL, Arévalo-Rodríguez M, Cardenas ME, Heitman J, Hanes SD. The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *EMBO J*. 2000 Jul 17;19(14):3727-38.

- Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, Lee SW, Niu T, Petkova V, Lu KP. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J.* 2001 Jul 2;20(13):3459-72.
- Xiao H, Jackson V, Lei M. The FK506-binding protein, Fpr4, is an acidic histone chaperone. *FEBS Lett.* 2006 Aug 7;580(18):4357-64. Epub 2006 Jul 10.
- Xu YX, Hirose Y, Zhou XZ, Lu KP, Manley JL. Pin1 modulates the structure and function of human RNA polymerase II. *Genes Dev.* 2003 Nov 15;17(22):2765-76. Epub 2003 Nov 4.
- Yaffe MB, Schutkowski M, Shen M, Zhou XZ, Stukenberg PT, Rahfeld JU, Xu J, Kuang J, Kirschner MW, Fischer G, Cantley LC, Lu KP. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science.* 1997 Dec 12;278(5345):1957-60.
- Yamada T, Morishita S. Accelerated off-target search algorithm for siRNA. *Bioinformatics.* 2005 Apr 15;21(8):1316-24. Epub 2004 Nov 25.
- Yeh ES, Lew BO, Means AR. The loss of PIN1 deregulates cyclin E and sensitizes mouse embryo fibroblasts to genomic instability. *J Biol Chem.* 2006 Jan 6;281(1):241-51. Epub 2005 Oct 13.
- Yong Zhang, Christa Riesterer, Anne-Marie Ayrall1, Fred Sablitzky, Trevor D. Littlewood and Michael Reth. Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 1996, Vol. 24, No. 4 543–548
- Yurchenko V, Zybarth G, O'Connor M, Dai WW, Franchin G, Hao T, Guo H, Hung HC, Toole B, Gallay P, Sherry B, Bukrinsky M. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *J Biol Chem.* 2002 Jun 21;277(25):22959-65. Epub 2002 Apr 9.
- Zacchi P, Gostissa M, Uchida T, Salvagno C, Avolio F, Volinia S, Ronai Z, Blandino G, Schneider C, Del Sal G. The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature.* 2002 Oct 24;419(6909):853-7. Epub 2002 Oct 2.
- Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, Stoller G, Küllertz G, Stark M, Fischer G, Lu KP. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell.* 2000 Oct;6(4):873-83.

6 Anhang

Tabelle 6.1. Ct-Werte und Schmelztemperaturen von qRT-PCR nach 24 und 72 Std von Transfektion.

nach 24 Std				nach 72 Std			
Target	Probe	Ct-Wert	Tm	Target	Probe	Ct-Wert	Tm
Par17	Kontroll	22,93	84,41	Par17	Kontroll	27,34	83,82
	Kontroll	23,05	84,26		Kontroll	27,67	83,82
	Kontroll	22,81	84,26		Kontroll	27,67	83,82
	Kontroll	23,38	84,26		Kontroll	27,68	83,82
	si5	25,58	84,26		si5	28,94	83,97
	si5	20,94	84,11		si5	28,84	83,82
	si5	24,53	84,11		si5	28,43	83,82
	si5	16,05	84,11		si5	29,08	83,82
	si311	27,50	84,11		si311	31,53	83,67
	si311	24,34	84,11		si311	31,76	83,52
	si311	25,93	83,96		si311	31,98	83,52
	si311	26,29	83,96		si311	32,03	83,37
	si418	28,37	84,11		si418	31,89	83,67
	si418	27,54	84,11		si418	31,80	83,52
	si418	27,87	83,96		si418	32,20	83,37
	si418	27,64	83,96		si418	32,45	83,37
		Tm-Mittelwert	84,13			Tm-Mittelwert	83,67
		Tm-Stabw	0,13			Tm-Stabw	0,20
Gesamt-Par	Kontroll	4,83	81,27	Gesamt-Par	Kontroll	18,59	80,98
	Kontroll	18,44	81,12		Kontroll	20,58	80,98
	Kontroll	19,36	81,12		Kontroll	20,60	80,98
	Kontroll	18,72	81,12		Kontroll	20,32	80,98
	si5	20,11	81,27		si5	20,71	81,13
	si5	19,40	80,97		si5	20,38	80,98
	si5	18,93	81,12		si5	20,58	80,98
	si5	18,45	81,12		si5	20,42	80,98
	si311	25,77	80,52		si311	23,77	80,08
	si311	23,63	80,37		si311	25,28	80,08
	si311	24,39	80,37		si311	25,53	80,08
	si311	24,26	80,37		si311	25,43	80,08
	si418	25,50	80,52		si418	25,01	80,53
	si418	24,67	80,37		si418	24,19	80,53
	si418	24,68	80,37		si418	24,24	80,53
	si418	24,59	80,37		si418	24,14	80,53
		Tm-Mittelwert	80,78			Tm-Mittelwert	80,65
		Tm-Stabw	0,38			Tm-Stabw	0,39
hGAPDH	Kontroll	19,56	84,56	hGAPDH	Kontroll	12,92	84,42
	Kontroll	19,59	84,71		Kontroll	12,89	84,27
	Kontroll	19,49	84,71		Kontroll	13,07	84,12
	Kontroll	19,90	84,86		Kontroll	14,00	83,82
	si5	19,34	84,56		si5	12,49	84,12
	si5	19,36	84,56		si5	13,45	84,12
	si5	19,64	84,71		si5	13,44	84,12
	si5	19,42	84,71		si5	11,42	84,27
	si311	18,82	84,56		si311	13,68	84,42
	si311	18,80	84,56		si311	13,68	84,42
	si311	18,85	84,56		si311	13,55	84,57
	si311	18,82	84,71		si311	12,93	84,57
	si418	19,10	84,41		si418	14,15	84,42
	si418	18,84	84,41		si418	13,29	84,42
	si418	19,03	84,56		si418	13,07	84,57
	si418	19,00	84,71		si418	12,71	84,57

	Tm-Mittelwert	84,61
	Tm-Stabw	0,12

	Tm-Mittelwert	84,33
	Tm-Stabw	0,22

Tabelle 6.2 Die Ergebnisse von der GeneTail-Analyse. Erste Zahl ist eine statistisch erwartete Anzahl der Gene, die zweite Zahl sind praktische Daten. In der Kategorie Gene Ontology sind die Daten angegeben, die bei zwei oder in allen drei Replikaten treffen. Mit Lila sind die Gruppen markiert, die bei allen drei Replikaten statistisch relevant vorkommen.

Parameter	si5	si311	si418
Gene Ontology:			
cytoplasm	2095.58 / 2227	2208.7 / 2345	2193.77 / 2367
endoplasmic reticulum	266.372 / 337	282.298 / 341	282.127 / 340
positive regulation of protein metabolic process	88.669 / 128	-	93.5374 / 119
blood vessel development	83.9254 / 121	-	86.7209 / 121
vasculature development	85.385 / 123	-	88.2357 / 124
regulation of protein metabolic process	185.366 / 239	-	193.134 / 228
positive regulation of cellular protein metabolic process	83.5605 / 120	-	88.2357 / 114
endoplasmic reticulum part	180.622 / 233	191.023 / 237	
ubiquitin-dependent protein catabolic process	95.9669 / 134	-	99.2178 / 124
modification-dependent protein catabolic process	97.7914 / 136	-	101.111 / 125
modification-dependent macromolecule catabolic process	97.7914 / 136	-	101.111 / 125
subsynaptic reticulum	187.19 / 239	199.111 / 246	-
developmental process	761.532 / 853	-	798.287 / 898
negative regulation of cell death	110.563 / 149	-	113.987 / 146
cytoplasmic part	1442.42 / 1551	1520.1 / 1623	1509.85 / 1648
endoplasmic reticulum membrane	161.283 / 206	170.611 / 219	171.17 / 204
anti-apoptosis	64.951 / 94	-	67.4075 / 94
regulation of cellular protein metabolic process	163.107 / 208	-	170.412 / 202
negative regulation of programmed cell death	108.738 / 146	-	112.093 / 143
anatomical structure development	631.265 / 713	-	661.2 / 743
nuclear membrane-endoplasmic reticulum network	164.202 / 209	173.692 / 223	174.199 / 207
negative regulation of apoptosis	107.643 / 144	-	110.957 / 142
epithelium development	83.5605 / 115	-	87.0996 / 114
tissue development	183.541 / 229	-	191.619 / 238
endomembrane system	382.773 / 446	401.68 / 481	400.28 / 457
protein binding	2121.49 / 2227	2231.04 / 2315	2219.9 / 2375
membrane	1462.13 / 1563	-	1542.42 / 1641
proteasomal protein catabolic process	56.5584 / 82	-	58.3189 / 77
negative regulation of biological process	532.014 / 603	-	557.059 / 622
proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	55.0989 / 80	-	56.8041 / 76

membrane fraction	176.973 / 220	-	185.939 / 225
negative regulation of cellular process	497.714 / 566	-	518.432 / 582
organelle membrane	521.067 / 590	-	545.698 / 613
cellular component movement	144.863 / 183	-	155.265 / 186
insoluble fraction	184.636 / 227	-	194.27 / 234
regulation of cellular component movement	58.7478 / 83	-	62.4845 / 89
regulation of locomotion	55.4638 / 79	-	59.0763 / 83
cell migration	105.454 / 137	-	111.336 / 148
positive regulation of metabolic process	270.386 / 319	-	285.157 / 326
vesicle-mediated transport	187.555 / 228	195.259 / 236	
SMAD binding	14.9606 / 27	-	15.1478 / 28
system development	565.219 / 630	-	592.656 / 665
cell division	-	117.849 / 149	115.502 / 142
cell motility	111.657 / 142	-	118.153 / 152
localization of cell	111.657 / 142	-	118.153 / 152
regulation of cell migration	51.085 / 72	-	54.5319 / 77
cellular localization	328.404 / 378	345.074 / 404	-
locomotion	128.807 / 161	-	137.087 / 175
response to chemical stimulus	342.635 / 393	-	361.274 / 425
protein modification by small protein conjugation	103.265 / 132	-	106.413 / 134
cell fraction	242.289 / 285	-	255.24 / 294
anatomical structure morphogenesis	319.646 / 368	-	337.038 / 394
localization	808.603 / 879	-	847.896 / 924
cellular developmental process	420.357 / 474	-	442.693 / 514
cell differentiation	396.639 / 448	-	418.457 / 480
protein ubiquitination	94.8722 / 121	-	97.703 / 127
protein modification by small protein conjugation or removal	118.225 / 147	-	121.939 / 149
blood vessel morphogenesis	72.2488 / 95	-	74.224 / 100
morphogenesis of a branching structure	32.4755 / 48	-	34.0825 / 50
regulation of programmed cell death	237.545 / 277	-	248.045 / 303
multicellular organismal process	877.203 / 945	-	920.984 / 1004
cell development	175.878 / 210	-	187.075 / 224
positive regulation of cellular process	511.945 / 567	-	541.154 / 614
morphogenesis of a branching epithelium	27.7319 / 42	-	29.1594 / 43
regulation of cell death	240.1 / 279	-	250.695 / 305
regulation of apoptosis	235.721 / 274	-	246.151 / 300
intracellular transport	232.072 / 270	246.481 / 297	
regulation of molecular function	276.224 / 317	-	291.973 / 331
Chromosomal Location:			
3	257.686 / 290	266.064 / 294	269.243 / 301
4	172.847 / 202	181.593 / 238	178.888 / 208

5	210.866 / 249	223.642 / 260	220.787 / 268
8	-	165.22 / 187	166.865 / 191
10	179.183 / 208	187.547 / 216	185.446 / 216
Chromosome Arm Location:			
4q	120.864 / 145	126.022 / 170	123.684 / 148
5q	-	181.577 / 211	179.141 / 221
3q	-	139.072 / 160	141.926 / 168
miRNA:			
hsa-miR-513-3p	-	39.6783 / 57	
hsa-miR-363	-	-	42.2677 / 62
hsa-miR-582-3p	-	-	37.4477 / 55

Tabelle 6.3 Die mögliche Interaktions-Partner von Par14 bei der Ribosomenbiogenese (von Fujiyama-Nakamura et al., 2009) mit Ratio Log von der Microarray (Ordner 8 auf DVD).

Gene Name	Gene ID	Probsets	si5	si311	si418
rDNA transcriptionrelated factor					
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), zeta	CEBPZ	203341_at	-	-	-
MYB binding protein (P160) 1a	MYBBP1A	233803_s_at 219098_at	- -	- 0,3	0,3 -
Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	Ssb	201138_s_at	-	-	-
Box C/D snoRNP					
NOP56 ribonucleoprotein homolog (yeast)	Nop56	200875_s_at	-	-0,3	-0,3
Fibrillarin	FBL	211623_s_at	-	-	-0,4
NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	NHP2L1	201077_s_at 201076_at	- -	- 0,3	-0,3 -0,8
UTP11-like, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, (yeast)	Utp11	218235_s_at	-	-	-
Transducin (beta)-like 3	TBL3	209820_s_at	-	-	-
Nucleolar protein family 6 (RNA-associated)	Nol6	218199_s_at	-	-	-
Box H/ACA snoRNP					
Dyskeratosis congenita 1, dyskerin	DKC1	216212_s_at	0,2	-	-
NOP10 ribonucleoprotein homolog (yeast)	Nop10	217962_at	-	-0,5	-
RNA helicase					
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	DHx15	201386_s_at	-	-	-
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	Dhx9	212107_s_at	0,4	-	-
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	Ddx18	208896_at	0,3	-	-
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 56	Ddx56	208152_s_at 224654_at	- -	-0,5 -0,6	0,2 -
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	Ddx24	200702_s_at	-	-	-
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 27	Ddx27	215693_x_at	-	-	-
DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30	Dhx30	204355_at 212674_s_at 230871_at 1556144_at	0,7 0,5 0,5 -	0,6 0,7 -0,6 -	0,7 0,6 - -0,7
Eukaryotic translation initiation factor 4A3	Eif4a3	201303_at	-	-	-0,3
RNA modification enzymes					
FtsJ homolog 3 (<i>E. coli</i>)	Ftsj3	218103_at	-	-	-
WD repeat					
Block of proliferation 1	Bop1	216397_s_at	-	-	-
WD repeat domain 12	Wdr12	218512_at	-	-	-0,3
PWP1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Pwp1	201607_at	-	0,4	-
BRIX family proteins (δ 70-like motif)					
Ribosome production factor 2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	RPF2	225866_at	-	0,3	-
BRX1, biogenesis of ribosomes, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	BRX1	219177_at	-	-	-
Ribosome production factor 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Rpf1	234243_at	-2,0	-	-
Peter pan homolog (<i>Drosophila</i>)	PPAN	221649_s_at	0,4	-	-

RNA-binding protein					
RNA binding motif protein 28	RBM28	218593_at	0,3	-	-
Nucleolin	Ncl	241892_at	-	-	-
Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1	211951_at	-	-0,5	-
MAK16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	MAK16	211686_s_at	-	-	-
RNA binding motif protein 28	Rbm28	218593_at	0,3	-	-
Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	Pabpc1	215823_x_at	-	-	-
MKI67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein	MKI67IP	224714_at	-	-	-
Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NPM1	221691_x_at	-	-	-
Andere					
Ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog)	Rrbp1	201204_s_at 201206_s_at	- -	- -0,5	0,5 -
Nucleolar complex associated 2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Noc2l	1559139_at	-	-	-
Nucleolar complex associated 3 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Noc3l	218889_at	0,5	-0,5	-
GTP binding protein 4	Gtpbp4	217631_at	-	-	-
Guanine nucleotide binding protein-like 2 (nucleolar)	Gnl2	201948_at	-	-	-
Ribosomal L1 domain containing 1	Rsl1d1	213750_at	-	0,4	0,4
RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Rrs1	209567_at	-	-	-
EBNA1 binding protein 2	Ebna1bp2	201323_at	-	-	-
Nuclear import 7 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Nip7	223397_s_at	-	-	-
Pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish)	Pes1	236434_at	-	-	-

Tabelle 6.4 Die Ergebnisse von BLAST-Vergleich der Nukleotidsequenz von siRNA-Konstrukten mit der Datenbank von menschlichen mRNAs.

Sequenz	Ähnlichkeit	Gene ID	Accession	Probeset	Ratio log
si5					
AACAAATGCCTGAAAGCCGCATCTC	25/25	5303 PIN4	NM_006223	204572_s_at	-0,6
AACAAATTCCTGAAAGC	16/17	166815 TIGD2	NM_145715	229983_at	-
ACAAATTCCTGAAAGCC	16/17	130 ADH6	NM_000672	207544_s_at	-
CAAATGCCTGGAAGCCG	16/17	22846 VASH1	NM_014909	239810_at	-
ACAAATGCCTGAAA	14/14	8832 CD84	NM_001184882	211191_at	-
AAATGCCTGAAAGC	14/14	222546 RFX6	NM_173560	1552673_at	-
CAAATGCCTGAAA	13/13	729857 RGPD2	NM_001078170	242712_x_at	-
CCTGAAAGCCGCA	13/13	6522 SLC4A2	NM_001199692	202111_at	-
GAAAGCCGCATCT	13/13	1262 CNGA4	NM_001037329	1562273_at	-
si311					
TTTATCTTCACTATACTGTGCGGCC	25/25	5303 PIN4	NM_006223	204572_s_at	-2,0
TTATCTTCACTACTGT	17/18	57698 KIAA1598	NM_018330	221802_s_at	-1,7
TTATCTTCACTTTACTG	16/17	8161 COIL	NM_004645.2	203653_s_at	-
TTTATCTTCACTAT	14/14	9202 ZMM4	NM_005095	202051_s_at	-0,4
ATCTTCACTATACT	14/14	10428 CFDP1	NM_006324	203166_at	-
TTCCTACTATACTGTG	14/14	378708 API TD1	NM_199294	213454_at	-
TCACTATACTGTGC	14/14	606495 CYB5RL	NM_001031672	229605_at	-
TCACTATACTGTG	13/13	29947 DNMT3L	NM_013369.2	220139_at	-
CACTATACTGTGC	13/13	4817 NIT1	NM_001185092	241395_at	-
si418					
TAAGTGGGATGGATAAGCCTGTGTT	25/25	5303 PIN4	NM_006223	204572_s_at	-2,0
AAGTGGGATGGAAAAGC	16/17	23581 CASP14	NM_012114	231722_at	-
AGTGGGATGGAGAAGCC	16/17	55291 PPP6R3	NM_001164164	232312_at	-
GGATGGAAAAGCCTGTGT	17/18	972 CD74	NM_001025158	209619_at	-
GGATGGATAATCCTGTG	16/17	5892 RAD51D	NR_037712	37793_r_at	-
GGATGAATAAGCCTGTG	16/17	84792 C7orf70	NM_001037163	224452_s_at	-
ATGGATAAGCCTGTGT	16/16	114907 FBX032	NM_001242463	225803_at	-
GTGGGATGGATAAG	14/14	57818 G6PC2	NM_001081686	221453_at	-
TGGATAAGCCTGT	13/13	11013 TMSB15A	NM_021992	205347_s_at	-

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Bayer für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen sowie für die Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken.

Mein größtes Dankeschön gilt Dr. Jonathan W. Müller für die hervorragende und exzellente Betreuung, seine Hilfsbereitschaft und konstruktiven Diskussionen während der Ausführung dieser Arbeit. Und ich wünsche ihm alles Gute, um in dieser ungewissen Zeit seinen Weg zu finden.

Tina Stratmann, Alma Rüppel, Viktoria Zaslavski, Christoph Lederer, Dr. Cristina Hartmann-Fatu, Dr. Anja Matena, Raffaella Maltaner sowie ALLEN Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der AG Bayer danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft, das ausgesprochen nette Arbeitsklima und eine erfolgreiche Zeit. Es war mir eine Freude, mit Euch zu arbeiten.

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Tilman Brummer (Zentrum für Biosystemanalyse, Freiburg) für die Bereitstellung von DT40-Zellen und für viele motivierende Gespräche und bei Dr. Ludger Klein-Hitpass (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) für die Durchführung der Microarray-Analyse.

Ein großes Dankeschön gilt Laetitia Buelens und Stefanie Groß (Werner) für die Hilfe bei dem Southern Blot und allen Kollegen der AG Vortkamp für das Ausleihen einige Chemikalien und gemeinsame Nutzung des Sozialraums.

GRK1431 “Transcription, Chromatin Structure and DNA Repair in Development and Differentiation” danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Der wichtigste und größte Dank geht an meine Mama und Tötja Nina, sowie auch an meine große Familie, an meine ehemaligen Arbeitskollegen (Dr. Anatolij Jakowlev, Dr. Tatjana Jakowleva, Dr. Guzel Danukalova) und an meine Freunde für die moralische Unterstützung, gesunde Kritik und das Vertrauen in mich.

Lebenslauf

Name Andrey A. Eremeev
Geboren 20. September 1979 in Ufa, Russland
Nationalität russisch
Position Doktorand
Familienstand ledig
Dienstanschrift Universität Duisburg-Essen
Fakultät Biologie und Geographie – ZMB
Strukturelle und Medizinische Biochemie
Universitätsstraße 1-5
45141 Essen
0201-183 4678 (Telefon)

andrey.eremeev@uni-due.de
Privat-Adresse Clausthaler Str. 34; 45145 Essen
0163-774 26 25 (Mobil)

Studium und beruflicher Werdegang

06/2008 – heute Doktorand und Wissenschaftlicher Mitarbeiter
Abteilung Strukturelle und Medizinische Biochemie
Universität Duisburg-Essen
Forschungsgebiet: Molekular- und zellbiologische Arbeiten
Referenz: Prof. Dr. Peter Bayer (*peter.bayer@uni-due.de*)

11/2007 – 05/2008 Wissenschaftliche Hilfskraft, Abteilung Strukturelle und
Medizinische Biochemie, Universität Duisburg-Essen
Ref.: Dr. Jonathan W. Mueller (*jonathan.mueller@uni-due.de*)

08/2006 – 07/2007 Forschungsaufenthalt bei Dr. Georg Heumann, Institut für
Paläontologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn
Forschungsgebiet: Mikroskopische Arbeiten am Konfokalen-
Laser-Scanning-Mikroskop (LEICA)

08/2005 – 07/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Forschungszentrum der
Russischen Akademie der Wissenschaften (RAdW) in Ufa,
Russland

08/2004 – 07/2005	Ingenieur im Institut für Geologie im Forschungszentrum (RAdW) in Ufa, Russland
07/2000 – 07/2004	Biologielaborant im Institut für Geologie im Forschungszentrum (RAdW) in Ufa, Russland
09/1999 – 07/2004	Studiengang Lehramt Biologie und Chemie an der Baschkirischen Staatlichen Pädagogischen Universität, Ufa, Russland. Das Diplom wurde am 2. Juli 2004 mit Auszeichnung ausgestellt
07/1996 – 08/1999	Studiengang Bauingenieurwesen an der Baschkirischen Staatlichen Fachhochschule, Ufa, Russland. Das Diplom wurde mit Auszeichnung ausgestellt
07/1986 – 06/1996	Abitur, Schule-Lyzeum №107 in Ufa, Russland

Weiterbildung

04/2011	Weiterbildungskurs „ LightCycler Workshop “, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim. Schwerpunkte: Absolute Quantifizierung
05/2010	Weiterbildungskurs „ Dynamik: Zelltod und Wachstum “, Institut für Molekularbiologie, Homburg / Saar. Schwerpunkte: Zellzyklus und Proliferation , Viability, Toxizität und Apoptose; BrdU und Annexin Färbung
08/2008	Durchflusszytometrie Training mit Schwerpunkt: Messroutine am BD FACSCalibur , Bedienung der BD FACSComp und CellQuestPro Software sowie Bedienung des Sort-Moduls

Kenntnisse

Methodische Schwerpunkte	Durchflusszytometrie am BD FACSCalibur , Zell-Zyklus Analyse (BrdU, 7AAD, PI), Real-time PCR und Datenauswertung , Knockdown mit siRNA , PCR von GC-reichen Sequenzen
Proteine	Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE), Western Blot, Immunostaining
DNA und RNA	Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren, Transfektion DNA-Amplifizierung, Klonierung von Expressionskonstrukten , Transformation von <i>E. coli</i> , Sequenzierung, Sequenzanalyse , PCR, Gelelektrophorese von DNA (Agarose-Gel), Southern Blot

Zellkultur

Zellkultur eukaryontischer **Zelllinien**:
adhärente Zelllinien: HeLa, CHO, HEK;
Suspensionszelllinien: DT40, K562;
Klonierung und Selektion von stabilen Zelllinien,
Fluoreszenzfärbung (DAPI, BrdU, 7AAD, PI),
Fluoreszenzmikroskopie und **Bildanalyse**,
Proliferations Assay, ELISA

Sonstiges

Sprachkenntnisse

Deutsch (sehr gut), Englisch (gut),
Russisch (Muttersprache)

EDV-Kenntnisse

MS Office, Adobe Photoshop, CorelDRAW, BioEdit, Vector
NTI Advance, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool),
ClustalW2, StepOne Software, Cell P, FSC Express,
BD FACSComp und CellQuestPro

Essen, 12.08.2011

Andrey A. Ereemeev

Publikationsliste und Konferenzen

Publikationsliste

Gebel L, Schröder E, Eremeev AA, Morgner J, Grum D, Knauer SK, Bayer P, and Mueller JW. Human PAPS synthase isoforms are dynamically regulated enzymes with access to nucleus and cytoplasm. Submitted.

Konferenzen und Vorträge

09/2009 Functional analysis of parvulins in the chicken cell line DT40. Andrey A. Eremeev, Peter Bayer, Jonathan W. Mueller. **Poster und Abstract**. Graduiertenkollegstreffen GRK1431 “Transcription, Chromatin Structure and DNA Repair in Development and Differentiation”, Dormagen-Zons, Deutschland.

07/2010 Functional analysis of parvulin proteins in the chicken cell line DT40. Andrey A. Eremeev, Jonathan W. Mueller. **Poster und Abstract**. International Meeting GRK1431 “Transcription, Chromatin Structure and DNA Repair in Development and Differentiation”, Zeche Zollverein, Essen Deutschland.

02/2011 A new function of the DNA-binding parvulin protein. Andrey A. Eremeev, Peter Bayer, Jonathan W. Mueller. **Poster**. 4 Halle Conference on Recombinant Protein Production, Halle an der Saale, Deutschland.

08/2011 A new function of the DNA-binding parvulin protein. Andrey A. Eremeev. **Seminarvortrag** am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (Abteilung Physikalische Biochemie), Dortmund, Deutschland.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Funktionale Analyse von Parvulin-Protein Par14“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Andrey A. Eremeev befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

Prof. Dr. Peter Bayer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

Andrey A. Eremeev

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

Andrey A. Eremeev