

Réka Ágnes Haraszti
Dr. med.

Cytoplasmic polyadenylation binding protein 1 – shaping molecular circadian landscapes

Fach/Einrichtung: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Michael Brunner

Zirkadiane Rhythmen strukturieren die Physiologie zeitlich, was von kritischer Bedeutung für die Gesundheit eines Organismus ist. Ineinander verflochtene Rückkopplungsschleifen auf der Ebene der Transkription definieren in allen Zellen einen molekularen Oszillator, der in Säugetieren die rhythmische Transkription von 10% der Gene bestimmt. Weit weniger verstanden als diese Regulation auf transkriptionaler Ebene ist der molekulare Mechanismus der posttranskriptionalen Komponente der zirkadianen Regulation. So sind in Säugetieren auch die Proteinniveaus von weiteren 10% der Gene rhythmisch, obwohl deren Transkripte keinen Rhythmus zeigen. Der molekulare Mechanismus dieser Regulation ist aber für die Mehrheit dieser Gene unbekannt.

Das zytoplasmatische Polyadenylierungsbindungsprotein 1 (CPEB1) reguliert die mRNA-Stabilität und die Translationseffizienz genomweit. Eine frühere Studie hat impliziert, dass die Transkription von CPEB1 unter der Kontrolle des molekularen Oszillators liegen könnte. In dieser Arbeit untersuchte ich daher, ob CPEB1 und cytoplasmatische Polyadenylierung einen der unbekanntenen Mechanismen bilden könnten, mit dem der molekulare Oszillator die Translation genomweit reguliert.

In der früheren Studie wurde herausgefunden, dass die zentrale Uhrproteine BMAL1 und CLOCK die Isoform 3 von CPEB1 in einer intronischen Region binden. Mit Luciferasereporterexperimenten zeigte ich, dass die intronische Bindung zu einer rhythmischen Regulation führen kann. Zudem habe ich nachgewiesen, dass das Isoform-3-Transkript von CPEB1 mit einer Periode von etwa 24 Stunden oszilliert. Es bleibt unbekannt ob der Proteinspiegel von CPEB1 oszilliert, da kein Antikörper endogenes CPEB1 in der U2OS-Zelllinie erkennen konnte.

Während ich eine Methode entwickelte, um mRNA-Targets von CPEB1 zu untersuchen, markierte ich CPEB1-Isoformen 3 und 4 mit GFP oder FLAG-His und klonierte sie unter Kontrolle eines konstitutiven und eines induzierbaren Promotors. Der Pull-down mit Hilfe des FLAG-His-Tags nach transients Transfektion war effizient und kann eventuell für CLIP-Seq angewendet werden, um CPEB1-Zieltranskripte zu identifizieren.

Zur Evaluierung der CPEB1-Funktion etablierte ich einen PCR-basierten Assay um die Poly(A)-Tail-Länge von mRNAs zu messen. Allerdings ist mehr Ausgangsmaterial erforderlich, um eine robuste Reproduzierbarkeit bei der Messung seltener mRNAs zu erreichen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ich Daten gewonnen und Methoden etabliert habe, die nötig sind zu untersuchen, in welchem Ausmaß der molekulare Oszillator die Translation über CPEB1 reguliert.