Analysen zum nukleozytoplasmatischen Transport von Regulatorproteinen des circadianen Rhythmus

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Susanne Loop
aus Elmshorn

Göttingen 2004

D7

Referent: Prof. Dr. T. Pieler

Korreferent: Prof. Dr. I. Feußner

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.04

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Der circadiane Rhythmus in <i>Drosophila</i>.....	1
1.1.1 Der circadiane Rhythmus in <i>Drosophila</i> wird durch eine Transkriptions- Translations-Rückkopplungsschleife reguliert.	1
1.1.2 Posttranslationale Regulation des circadianen Rhythmus in <i>Drosophila</i>	5
1.2 Der circadiane Rhythmus in Säugetieren.....	8
1.2.1 Auch der circadiane Rhythmus in Säugetieren wird durch eine Transkriptions- Translations-Rückkopplungsschleife reguliert.	8
1.2.2 Posttranslationale Regulation des circadianen Rhythmus im Säugetier	12
1.2.3 Die circadiane Photorezeption	14
1.2.4 Der circadiane Rhythmus in peripheren Organen.....	15
1.2.5 Der circadiane Rhythmus und Tumorentwicklung	19
1.3 Ziel der Arbeit.....	21
2 MATERIALIEN UND METHODEN	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Organismen	22
2.1.2 Feinchemikalien.....	22
2.1.3 Antikörper, Enzyme und Proteine	23
2.1.4 Molekulargewichtsstandards	24
2.1.5 Medien und Lösungen	24
2.1.6 Radioisotope	25
2.1.7 Plasmide und Vektoren.....	25
2.1.8 Oligonucleotide.....	26
2.1.9 Chromatographiematrices	28
2.1.10 Computer und Software	28
2.1.11 Geräte.....	28
2.2 Methoden	29

2.2.1	Zellkulturen.....	29
2.2.1.1	Arbeiten mit Bakterien.....	29
2.2.1.1.1	Anzucht von Bakterien in Flüssigmedium.....	29
2.2.1.1.2	Trübungsmessungen	29
2.2.1.1.3	Herstellung von Stammkulturen	29
2.2.1.1.4	Elektrokompetente Zellen.....	30
2.2.1.1.5	Elektrotransformation	30
2.2.1.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	31
2.2.1.2.1	Subkultivierung von Monolayerkulturen.....	31
2.2.1.2.2	Passagieren der Zellen mit Trypsin-EDTA	31
2.2.1.2.3	Auftauen und Einfrieren von adhärenen Zellen.....	32
2.2.1.2.4	Transiente Transfektion von Eukaryonten.....	32
2.2.1.2.5	Stabile Transfektion von NIH3T3 Zellen	33
2.2.1.2.6	Immunfluoreszenz-Detektion	34
2.2.2	DNA- Standardtechniken.....	35
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	35
2.2.2.2	Restriktionsenzymatische Spaltung von Plasmiden:	35
2.2.2.3	Partielle restriktionsenzymatische Spaltung von Plasmiden	35
2.2.2.4	Auffüllen von Restriktionschnittstellen mit der Klenow Polymerase	36
2.2.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	36
2.2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.2.7	Kolonie-PCR.....	37
2.2.2.8	Dephosphorylierung von Vektor-DNA Enden	38
2.2.2.9	Ligation.....	38
2.2.2.10	Plasmidpräparation im analytischen Maßstab (TELT).....	38
2.2.2.11	Plasmidpräparation im präparativen Maßstab	39
2.2.2.12	DNA-Sequenzierung.....	39
2.2.3	Klonierungen	40
2.2.4	RNA-Standardtechniken.....	46
2.2.4.1	Präparation von RNA aus <i>Xenopus leavis</i> Oozyten.....	46
2.2.4.2	RNA-Präparation aus Fibroblasten.....	47
2.2.4.3	Semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	48
2.2.4.4	Quantitative Reverse Transkription mittels real-time PCR	48
2.2.5	Protein-Standardtechniken.....	50

2.2.5.1	<i>In vitro</i> Transkription und Translation (T _N T)	50
2.2.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.2.5.3	Nachweis von Protein-Protein Interaktionen	51
2.2.5.4	Expression und Reinigung von His-Tag Proteinen	52
2.2.5.5	Proteinbestimmung nach Bradford	53
2.2.5.6	Western Blot	54
2.2.6	Mikroinjektion in <i>Xenopus</i> Oozyten und deren Aufarbeitung	55
2.2.6.1	Präparation von Oozyten	55
2.2.6.2	Kollagenasebehandlung der Oozyten	55
2.2.6.3	Mikroinjektion in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	56
2.2.6.4	Kern-Zytoplasma-Trennung	56
2.2.6.5	Immunopräzipitation	57
2.2.6.6	Dephosphorylierung von immunopräzipitierten Proteinen	57
3	ERGEBNISSE	58
3.1	Das nukleäre Importverhalten von Period Proteinen in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	58
3.1.1	mPer3 wird nicht in <i>Xenopus</i> Oozyten importiert, obwohl es über ein Kernlokalisationssignal (NLS) verfügt	58
3.1.2	Für den Import von mPer3 in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten wird eine Komplexbildung mit mPer1 benötigt	61
3.1.3	Das Kernlokalisationssignal in mPer1 ist für den Import des mPer1/mPer3 Heterodimers in <i>Xenopus</i> Oozyten notwendig	64
3.2	Das nukleäre Importverhalten von Period Proteinen in HeLa Zellen	67
3.2.1	Auch in HeLa Zellen wird mPer3 nicht importiert, obwohl es ein Kernlokalisationssignal besitzt	67
3.3	Das nukleäre Exportverhalten von Period Proteinen in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	72
3.3.1	Alle drei Period Proteine werden in <i>Xenopus</i> Oozyten exportiert	72
3.3.2	Sowohl mCry1 als auch mCry2 benötigen eine Komplexbildung mit mPer1, um aus dem Zellkern von <i>Xenopus</i> Oozyten transportiert zu werden	75
3.4	Expression circadianer Gene in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	81

3.4.1	<i>xlPer2</i> und <i>xlClock</i> werden in <i>Xenopus</i> Oozyten nicht rhythmisch exprimiert	
3.5	Der circadiane Rhythmus in kultivierten Maus Fibroblasten.....	82
3.5.1	Überexpression von Transport-defizienten Mutanten in Maus Fibroblasten durch stabile Transfektion	82
3.5.2	Der Export von Cryptochrom Proteinen ist für den circadianen Rhythmus in kultivierten Maus Fibroblasten notwendig	85
3.5.2.1	Analyse des circadianen Rhythmus in kultivierten Maus Fibroblasten durch semiquantitative RT-PCR.....	85
3.5.2.2	Analyse des circadianen Rhythmus in kultivierten Maus Fibroblasten durch real time PCR.....	89
3.5.2.3	Die subzelluläre Lokalisation der überexprimierten mPer1 Mutanten in synchronisierten Maus Fibroblasten	93
4	DISKUSSION	103
4.1	Der Kernimport und Phosphorylierung von Period Proteinen.....	103
4.2	Der Kernexport von Period Proteinen.....	106
4.3	Circadianer Rhythmus in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	108
4.4	Funktion des Kern-Zytoplasma-Transportes im circadianen Rhythmus .	109
4.5	Ausblick	113
5	ZUSAMMENFASSUNG	115
6	LITERATURVERZEICHNIS	117
7	ANHANG	129

Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1	Das Expressionsmuster von circadianen Genen in <i>Drosophila</i> in Verlaufe eines Tages.....	3
Abb.1.2	Der circadiane Rhythmus in <i>Drosophila</i>	4
Abb.1.3	Das Expressionsmuster von circadianen Genen in der Maus in Verlaufe eines Tages.	9
Abb.1.4	Der circadiane Rhythmus in Säugetieren.....	11
Abb.1.5	Darstellung von Faktoren, die an der Regulation des circadianen Rhythmus in peripheren Geweben beteiligt sind.	17
Abb.1.6	Signalwege in der Regulation des circadianen Rhythmus im suprachiasmatischen Nukleus und in peripheren Geweben.....	19
Abb.3.1	MPer3 wird in <i>Xenopus</i> Oozyten nicht in den Zellkern importiert.	59
Abb.3.2	Obwohl mPer3 Wildtyp nicht in <i>Xenopus</i> Oozyten importiert wird, enthält es ein basisches Kernlokalisierungssignal.....	60
Abb.3.3	MPer3 kann sowohl Homo- als auch Heterodimere mit mPer2 und mPer3 bilden.	62
Abb.3.4	Die gesamte PAS Domäne ist für die Bildung des mPer1/mPer3 Heterodimers notwendig.....	63
Abb.3.5	MPer3 wird nur im Komplex mit mPer1 in den Zellkern von <i>Xenopus</i> Oozyten importiert.	64
Abb.3.6	MPer1mutNLSΔC wird nicht mehr in den Zellkern von <i>Xenopus</i> Oozyten importiert.	65
Abb.3.7	MPer3 Frag3mutNLS wird in <i>Xenopus</i> Oozyten nicht mehr importiert.....	66
Abb.3.8	Der Import von mPer3 wird über die Kernlokalisierungssignale von mPer1 vermittelt.....	67
Abb.3.9	Auch in HeLa Zellen wird mPer3 nicht importiert, obwohl es ein basisches Kernlokalisierungssignal besitzt.	68
Abb.3.10	In HeLa Zellen wird mPer3 im Heterodimer mit mPer1 im Zellkern lokalisiert.	71
Abb.3.11	Alle Period Proteine werden aus dem Zellkern von <i>Xenopus</i> Oozyten exportiert.	73
Abb.3.12	MPer1 enthält zwei Leucin- reiche Kernexportsignale.	74

Abb.3.13	Rna1p im Zellkern von <i>Xenopus</i> Oozyten inhibiert den Export von mPer1 und deren Fragmenten 5 und 6.	75
Abb.3.14	MCry1 und mCry2 werden zwar in den Zellkern von <i>Xenopus</i> Oozyten importiert, aber nicht in das Zytoplasma exportiert.....	76
Abb.3.15	Der C-Terminus von mPer1 ist für die Heterodimerisierung mit mCry1 und mCry2 notwendig.	77
Abb.3.16	MCry1 und mCry2 werden nur im Komplex mit mPer1 aus dem Zellkern von <i>Xenopus</i> Oozyten transportiert.....	78
Abb.3.17	Sowohl mCry1 als auch mCry2 werden nicht im Komplex mit mPer2 aus dem Zellkern von <i>Xenopus</i> Oozyten exportiert.	79
Abb.3.18	Der Export und die Bindung an mPer1 ist für den Transport von mCry1 und mCry2 aus dem Zellkern von <i>Xenopus</i> Oozyten notwendig.	80
Abb.3.19	XlPer2 und xlClock weisen keine circadiane Genexpression auf.	81
Abb.3.20	Stabil transfizierte mPer1 Mutanten werden in NIH3T3 Zellen überexprimiert.....	83
Abb.3.21	Die subzelluläre Lokalisation von stabil transfiziertem mPer1 und deren Mutanten in NIH3T3 Zellen.	84
Abb.3.22	Der Serumschock löst in synchronisierten Maus Fibroblasten eine circadiane Genexpression aus.	86
Abb.3.23	Die Überexpression von mPer1 führt zu einem verzögerten circadianen Rhythmus in synchronisierten NIH3T3 Zellen.....	87
Abb.3.24	Die Überexpression von der Import-defizienten Mutante von mPer1 führt nicht zu einer Veränderung der circadianen Genexpression in synchronisierten Maus Fibroblasten.	88
Abb.3.25	Die Überexpression der Export-defizienten Mutante von mPer1 führt zu einer arrhythmischen circadianen Genexpression.	89
Abb.3.26	Der circadiane Rhythmus in synchronisierten NIH3T3 Zellen, die Transport-defiziente Mutanten von mPer1 überexprimieren.	93
Abb.3.27	Die mRNA Konzentration der stabil transfizierten mPer1 Mutanten bleibt während der circadianen Expression konstant.....	94
Abb.3.28	Überexprimiertes mPer1 zeigt in synchronisierten Maus Fibroblasten rhythmische Proteinexpression.	96
Abb.3.29	Überexprimiertes mPer1mutNLSAC zeigt in synchronisierten Maus Fibroblasten rhythmische Proteinexpression.	97

Abb.3.30	Die Proteinexpression von stabil transfiziertem mPer1mutNES1,2 ist in synchronisierten Maus Fibroblasten nicht rhythmisch.	98
Abb.3.31	Überexprimiertes mPer1ΔC zeigt in synchronisierten Maus Fibroblasten rhythmische Proteinexpression.	99
Abb.3.32	Die Proteinexpression von stabil transfiziertem mPer1mutNES1,2ΔC ist in synchronisierten Maus Fibroblasten rhythmisch.	100
Abb.3.33	Zusammenfassung der Proteineigenschaften von mPer1 und deren Mutanten.	102
Abb.4.1	Schematische Darstellung wichtiger Elemente in Period Proteine.....	108
Abb.4.1	Der Kern-Zytoplasma Transport im circadianen Rhythmus.....	113
Abb.7.1	Die Aminosäuresequenzen von mPer1, mPer2 und mPer3 sind als Alignment dargestellt.....	130
Abb.7.2	Vektorkarten der verwendeten Plasmiden	131
Abb.7.3	Schematische Darstellung der verwendeten mPer1 Konstrukte im pCSMT Vektor	132
Abb.7.4	Schematische Darstellung der verwendeten mPer1 Konstrukte im pCSflag und pIRESHyg3 Vektor.....	133
Abb.7.5	Schematische Darstellung der verwendeten mPer2 und mPer3 Konstrukte im pCSMT und pCSflag Vektor	134

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
bHLH	basic helix loop helix
Bmal1	Brain and muscle ARNT-like 1
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CK	Casein Kinase
CREB	cAMP response element binding protein
Cry	Cryptochrom
d	destiliert
DAPI	Diamido-2-Phenylindol
Dbp	albumin D-element binding protein
Dbt	Doubletime
DEPC	Diethylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1 Piperazinethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
LB	Luria-Bertani
λPPase	Lambda Protein Phosphatase

Abkürzungsverzeichnis

MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
mut	mutiert
NES	Kernexportsignal (Nuclear Export Signal)
NLS	Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal)
OD	Optische Dichte
p	Plasmid
p.A.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Per Arnt Sim Proteinbindungsdomäne
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pdp1	PAP domain protein 1
Per	Period
PK2	Prokinectin-2
PPA2	Protein Phosphatase 2
RHT	retinohypothalamic tract
RNase	Ribonuklease
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SCN	suprachiasmatischer Nucleus
TBS	Tris buffered saline (Tris gepufferte Salzlösung)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEL	Tris-EDTA-LiCl-Triton
TGF	transforming growth factor
Tim	Timeless
TPA	12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl-b-D-Galaktosepyranosid

Abkürzungsverzeichnis

Einbuchstabenkode für Aminosäuren:

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1 Einleitung

Als biologische Uhr wird ein rhythmisch ablaufender physiologischer Prozess bezeichnet, der sowohl beim Menschen als auch bei Pflanzen und Tieren vorkommt und Stoffwechselfunktionen im Körper, sowie Verhaltensweisen koordiniert. Die einfachsten Organismen, bei denen bisher ein biologischer Rhythmus beschrieben wurde, sind Cyanobakterien. Neben der Synchronisation von Funktionen im Körper ist dieser Mechanismus für den Organismus wichtig, um sich an täglich wiederholende äußere Bedingungen (z.B. Zeitgeber wie Licht, Temperatur und Nahrung) anzupassen. So ist es z.B. wichtig für tierische Organismen, Veränderungen von Tages- und Jahreszeiten wahrzunehmen, um Nahrung zu finden, oder sozialen Kontakt aufrecht zu erhalten. Auch Pflanzen müssen saisonale Veränderungen erkennen (Photoperiodismus). Eine der am weitesten verbreiteten biologischen Uhren ist der Tag/Nacht Rhythmus. Die meisten Organismen schlafen nur zu bestimmten Tages-/Nachtzeiten, ebenso wie deren Aktivität zu einer bestimmten Tageszeit am höchsten ist. Dieser Rhythmus erfolgt mit einer 24 h Periodizität und wird deshalb auch als circadianer (circa dies, ungefähr ein Tag) Rhythmus bezeichnet.

Der Mechanismus zur Regulation des circadianen Rhythmus erfolgt im wesentlichen über drei Schritte. Der Input, also die Aufnahme eines Signales von außen, die Verarbeitung im zentralen molekularen Oszillator der inneren Uhr, sowie der Output, also die Weitergabe des verarbeiteten Signals an die Peripherie des Organismus, um Stoffwechselleistungen und Verhaltensweisen entsprechend den äußeren Einflüssen anzupassen.

1.1 Der circadiane Rhythmus in *Drosophila*

1.1.1 Der circadiane Rhythmus in *Drosophila* wird durch eine Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife reguliert.

Das erste identifizierte circadiane Gen wurde bereits 1971 von Konopka und Benzer identifiziert, die nach Mutanten in *Drosophila* suchten, die ein verändertes circadianes Verhalten in konstanter Dunkelheit aufwiesen (Konopka and Benzer, 1971). Die identifizierten Mutanten zeigten zwar verschiedene Phänotypen (per^L besaß einen verlängerten, per^S einen verkürzten und per^0 keinen Rhythmus), jedoch waren diese alle

auf einen Genlokus zurückzuführen. Kloniert wurde das als Period bezeichnete Gen schließlich von Crews et al. (1988). Das Per Protein enthält eine PAS Domäne (PER-ARNT-SIM ähnliche Domäne), die wichtig für die Interaktion von Proteinmolekülen ist. Sowohl die mRNA als auch das Protein werden rhythmisch im *Drosophila* Wildtyp exprimiert, während diese Oszillation in *per*⁰ Fliegen blockiert ist (Hardin et al., 1990). Während in *per*^S und *per*^L Fliegen die Mutationen zu Aminosäureaustauschen führten, die den offenen Leserahmen in diesem Gen nicht veränderten, wurde im *per* Gen der *per*⁰ Fliegen eine Base verändert, sodass ein zusätzliches Stopcodon in die Sequenz eingefügt wurde und somit nur ein Proteinfsegment von Per gebildet werden konnte (Baylies et al., 1987).

Als zweites Gen wurde Timeless (*tim*) identifiziert (Sehgal et al., 1994). Die mRNA und das Timeless Protein zeigen einen ähnlichen Rhythmus wie Period, und auch die *tim*⁰ Mutante verhält sich arrhythmisch (Myers et al., 1996). Bei *tim*⁰ Fliegen kann das Tim Protein mit dem Antiserum, das für Wildtyp *Drosophila* verwendet wurde, nicht mehr detektiert werden. Beide Proteine werden in den lateralen Neuronen (LN) exprimiert, die auch als Hauptoszillator in *Drosophila* bezeichnet werden (Kaneko and Hall, 2000; Stanewsky et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteine miteinander interagieren können (Gekakis et al., 1995; Hunter-Ensor et al., 1996). Interessanterweise enthält Tim für die Interaktion mit Per keine PAS Domäne. Es wurde gezeigt, dass drei Armadillo ähnliche Domänen (ALD) in Tim enthalten sind, von denen zwei für die Bindung an Per notwendig sind (Saez and Young, 1996).

Im Rahmen einer negativen Rückkopplungsschleife im circadianen Rhythmus inhibieren Period und Timeless nach dem Import in den Zellkern ihre eigene Transkription. Allerdings fehlt sowohl Per als auch Tim eine DNA Bindungsdomäne. Die gesuchten Interaktionspartner, mClock und Bmal1, die beide eine bHLH-PAS Domäne enthalten, wurden zuerst in Mäusen gefunden (Gekakis et al., 1998; Takahata et al., 1998). Erst durch die Suche nach homologen Proteinen konnten in *Drosophila* Clock und Cycle identifiziert werden (Allada et al., 2001; Darlington et al., 1998). Diese Proteine können ebenfalls Heterodimere bilden und die Transkription von Tim und Per über eine Bindung an E-Box Elemente (CACGTG) aktivieren. Weiterhin konnte in kultivierten *Drosophila* Zellen gezeigt werden, dass die Clock/Cycle vermittelte Aktivierung durch Per und Tim im Zellkern stark reprimiert wird (Darlington et al., 1998). Dieser Effekt wird durch eine direkte Interaktion von Per und Tim mit dem Clock/Cycle Heterodimer erreicht, wobei die Bindung nicht zu einer

Dissoziation des Heterodimers führt, sondern nur die Interaktion mit dem E-Box Element im Promotor des *Per* bzw. *Tim* Gens inhibiert (Lee et al., 1999). Möglicherweise führt die Bindung von Per und Tim an Clock/Cycle zu einer Konformationsänderung der Proteine, die eine verminderte DNA-Affinität des Komplexes zufolge hat, oder die DNA Bindungsdomäne wird durch eine direkte Interaktion mit Per und Tim maskiert. Durch Definition positiver und negativer Regulatorelemente konnte so der Kernmechanismus für den circadianen Rhythmus definiert werden. Die Proteinkonzentrationen von Per und Tim nehmen im Verlauf des Tages leicht verzögert zur mRNA Konzentration zu und erreichen ihren Höhepunkt am frühen Abend. Nach dem Transport in den Zellkern inhibieren Per und Tim dort ihre eigene Clock/Cycle vermittelte Transkription. Bis zum Morgen werden beide Proteine degradiert, so dass ein neuer Zyklus beginnen kann (Dunlap, 1999) (Abb.1.1). Bisher wurde vermutet, dass Per und Tim gemeinsam ihre Transkription inhibieren, aber es konnte in kultivierten *Drosophila* Zellen gezeigt werden, dass Period auch alleine eine Repressoraktivität besitzt (Chang and Reppert, 2003; Rothenfluh et al., 2000).

Abb.1.1 Das Expressionsmuster von circadianen Genen in *Drosophila* im Verlaufe eines Tages.

Aufgrund der lichtabhängigen Degradation von Tim sind die Konzentrationen von Per und Tim am virtuellen Tag sehr niedrig und steigen erst in der Dämmerung an, erreichen ihre maximale Expression in der Dunkelheit und fallen dann zum Ende der Nacht wieder ab. Die Expression von Clock ist entgegengesetzt zum Expressionsmuster von Per und Tim, während die Konzentration von Cycle sich über den gesamten circadianen Tag nicht ändert (nach Dunlap, 1999).

Neben der beschriebenen Rückkopplungsschleife, die den Kernmechanismus zur Regulation des circadianen Rhythmus definiert, gibt es noch eine zweite Rückkopplungsschleife. So wurde *Vrille* (*Vri*), ein basischer Leucin Zipper Transkriptionsfaktor, der auch in der Embryogenese von *Drosophila* eine Rolle spielt, als ein wichtiger Faktor im circadianen Rhythmus identifiziert (Blau and Young, 1999; Cyran et al., 2003; Glossop et al., 2003). Die Analyse des Promotors zeigte, dass *Vrille*

ebenso wie *Period* eine E-Box enthält und die Expression tatsächlich ebenfalls über *Clock/Cycle* reguliert wird. Weiterhin wird *Vrille* in den lateralen Neuronen in einem ähnlichen Rhythmus wie *Per* und *Tim* exprimiert. Durch Promotorstudien konnte gezeigt werden, dass *Vrille* direkt an den Promotor von *Clock* bindet und dessen Transkription inhibiert.

Abb.1.2 Der circadiane Rhythmus in *Drosophila*.

Der Mechanismus besteht aus einer autoregulatorischen Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife, bei der die bHLH-PAS Transkriptionsfaktoren *Clock* (blaugrün) und *Cycle* (hellgrün) die Transkription von *Per*, *Tim*, *Vrille* und *Pdp1* aktivieren. Nach der Translation im Zytoplasma wird *Per* (blau) durch die Kinasen *Doubletime* (*Dbt*, braun) und *Casein Kinase 2* (CK2, hellgrau) phosphoryliert, wodurch Proteindegredation stimuliert wird. Antagonistisch dazu agiert die *Protein Phosphatase 2* (PPA2, orange), die *Per* durch Dephosphorylierung stabilisieren kann. Durch *Shaggy* (*Sgg*, dunkelgrün) wird *Tim* (rot) phosphoryliert. Der Proteinabbau erfolgt nach Ubiquitinylierung durch *Slimb* (dunkelgrau) in Abhängigkeit von Licht. Als Photorezeptor dient dabei *Cryptochrom* (gelb). Für die negative Rückkopplung bildet *Tim* einen Komplex mit *Per* und *Dbt* und stabilisiert *Per* durch seine Bindung. Nach dem Import des Komplexes in den Zellkern inhibieren diese drei Proteine die Transkription von *Per* und *Tim* durch die Bindung an den *Clock/Cycle* Heterodimer, der aber weiterhin an die DNA gebunden bleibt. Eine zweite Rückkopplungsschleife wird durch *Vrille* (hellgelb) und *Pdp1* (violett) gebildet. Zunächst steigt die Konzentration von *Vrille* an und reprimiert die Transkription von *Clock*, während *Pdp1* zeitversetzt zu *Vrille* exprimiert wird und antagonistisch die Transkription von *Clock* aktiviert (entsprechend für *Drosophila* modifiziert nach Fukuda, 2003).

Neben Vrilie konnte noch ein weiterer basischer Leucin Zipper Transkriptionsfaktor identifiziert werden; PAR domain protein 1 (Pdp1) enthält, wie der Name bereits sagt, eine PAR (proline and acidic rich) Domäne, die auch in anderen Transkriptionsaktivatoren wie HLF (hepatic leukemia factor) und TEF (thyroid embryonic factor) vorhanden sind. Pdp1 wird ebenfalls durch Clk/Cyc aktiviert. Es konnte weiter gezeigt werden, dass dieses Protein rhythmisch im Kopf von *Drosophila* exprimiert ist. Im circadianen Rhythmus von *Drosophila* agiert Pdp1 als transkriptionaler Aktivator von Clock und fungiert damit als Antagonist von Vrilie (Cyran et al., 2003). Obwohl die Transkription von *Vrilie* und *Pdp1* über den Clk/Cyc Heterodimer aktiviert wird, weisen sie ein zeitlich differentielles Expressionsmuster auf. Zunächst akkumuliert Vrilie und reprimiert die Expression von Clock. Erst etwa 3 h später steigt die Konzentration von Pdp1 und aktiviert die Transkription von Clock, sodass nach der Degradation von Period neu synthetisiertes Clock wieder zur Verfügung steht. So wird die Expression von Per und Tim noch indirekt über einen zweiten Mechanismus reguliert (Abb. 1.2).

1.1.2 Posttranslationale Regulation des circadianen Rhythmus in *Drosophila*

Neben diesen beschriebenen Proteinen gibt es noch weitere Faktoren, die für posttranskriptionale Regulationsmechanismen in der biologischen Uhr notwendig sind. Phosphoryliert wird Per durch die Kinase Doubletime (Dbt), die zur Casein Kinase I ϵ aus Maus homolog ist (siehe Kap. 1.2.2) (Bao et al., 2001; Kloss et al., 1998; Price et al., 1998). Ist in *Drosophila* Doubletime mutiert, dann ist die Konzentration von Per erhöht und ausschließlich eine hypophosphorylierte Form von Period nachweisbar. Weiterhin konnte eine Interaktion von Dbt sowohl mit Per als Homodimer als auch im Heterodimer mit Tim gezeigt werden, während Tim alleine nicht mit Dbt interagieren kann (Kloss et al., 2001). Obwohl Doubletime keine rhythmische circadiane Expression zeigt, so findet interessanterweise doch eine subzelluläre Lokalisation in Abhängigkeit zum circadianen Rhythmus statt.

Nach einem Modell Kloss et al. (1998) wird zunächst Period synthetisiert; im Zytoplasma findet dann eine Bindung an Doubletime statt und führt zu einer Phosphorylierung und Destabilisierung von Per. Erst nach der Synthese von Tim erfolgt die Bildung des trimeren Komplexes und führt zu einer Inhibition der Dbt-abhängigen Phosphorylierung, und damit zu einer Stabilisierung des Tim/Per/Dbt-Komplexes. Nach dem Import in den Zellkern kann dann die Clk/Cyc vermittelte Transkription inhibiert

werden. Zunächst wurde angenommen, dass Tim auch für den Import des Heterodimers notwendig ist, aber in kultivierten *Drosophila* Zellen kann Period auch ohne Tim importiert werden, sodass Tim wohl primär für die Stabilisierung von Per notwendig zu sein scheint (Chang and Reppert, 2003; Rothenfluh et al., 2000; Saez and Young, 1996; Young, 1998).

Die Casein Kinase 2 (CK2) ist ein weiteres Protein, welches am circadianen Rhythmus in *Drosophila* beteiligt ist. Ist in *Drosophila* CK2 mutiert, so hat das einen verlängerten circadianen Rhythmus und eine verspätete nukleäre Lokalisation von Per zur Folge. In Wildtyp Fliegen zeigt CK2 eine sehr starke Expression in lateralen Neuronen, also im Bereich des Hauptregulators für die biologische Uhr in *Drosophila* (Lin et al., 2002). Durch die Nutzung der RNAi Methode konnte nachgewiesen werden, dass Doubletime, welches ein Phosphoserin in seiner Erkennungssequenz hat, und die Casein Kinase 2 zusammen agieren, um Period zu phosphorylieren und dessen Repressoraktivität zu erhöhen (Nawathean and Rosbash, 2004).

Interessanterweise wurde kürzlich gezeigt, dass neben den beschriebenen Kinasen auch eine Phosphatase (Protein Phosphatase 2A) eine Rolle im circadianen Rhythmus spielt. Die Protein Phosphatase 2A dephosphoryliert Period und führt somit zu einer Stabilisierung des Proteins zu bestimmten Zeitpunkten (Sathyanarayanan et al., 2004). Im Gegensatz zu Doubletime und CK2 zeigt die Protein Phosphatase 2A eine rhythmische Expression im Kopf von *Drosophila*. Mutationen von *PP2A* führen zu einer verringerten Expression von Period und zu einer verlängerten oder arrhythmischen circadianen Oszillation.

Neben Period wird auch Timeless in *Drosophila* phosphoryliert. Martinek et al. (2001) konnten zeigen, dass Timeless durch die Kinase Shaggy (Sgg), die zur Glycogen-Synthase-Kinase 3b homolog ist, phosphoryliert wird. Shaggy scheint eine regulatorische Funktion beim Transport des Per/Tim Heterodimers zu besitzen.

Die Phosphorylierung von Per und Tim führt zur Degradation dieser Proteine durch das Proteasom. Das *Drosophila* Slimb Protein, eine Ubiquitin E3 Ligase, konnte als wichtiger Faktor für diesen Prozess identifiziert werden. Slimb Mutanten verhalten sich arrhythmisch und weisen eine hohe Konzentration von hyperphosphoryliertem Period und Timeless auf (Grima et al., 2002). Die Degradation von Tim erfolgt in Abhängigkeit von Licht und wird über Cryptochrome vermittelt (Naidoo et al., 1999). Cryptochrom gehört zu der Familie der Blaulicht-DNA Photolyasen und besitzt Pterin und Flavin als Chromophore. Allerdings fehlt Cryptochrom die Fähigkeit zur DNA

Reparatur. Es konnte als Photorezeptor im circadianen Rhythmus von *Drosophila* identifiziert werden. Fliegen ohne aktive Cryptochrome zeigen keine Antwort mehr auf einen Lichtimpuls, und auch die lichtabhängige Degradation von Tim ist hier blockiert (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998). Zu Beginn des Tages wird demnach der Lichtreiz von Cryptochrom aufgenommen und die Weiterleitung führt zu einer Ubiquitinylierung von Tim durch die Ubiquitin Ligase Slimb. Nach der Degradation von Tim durch das Proteasom wird nun auch Per destabilisiert und kann ebenfalls auf diesem Weg abgebaut werden.

Tab. 1: Übersicht über die Eigenschaften und Funktionen von circadianen Proteinen in *Drosophila*

<i>Drosophila</i> circadiane Proteine	Eigenschaften	Funktionen
Period (Per)	PAS Domäne, keine DNA Bindungsdomäne	bindet an Tim und inhibiert Clk/Cyc vermittelte Transkription
Timeless (Tim)	Armadillo ähnliche Domäne, aber keine PAS Domäne, keine DNA Bindungsdomäne	dimerisiert mit Per, stabilisiert Per, inhibiert Clk/Cyc vermittelte Transkription und degradiert durch Lichtimpuls
Clock (Clk)	bHLH-PAS Transkriptionsfaktor	bindet an Cyc, aktiviert Transkription im Heterodimer mit Cyc über E-box Elemente und inhibiert eigene Transkription
Cycle (Cyc)	bHLH-PAS Transkriptionsfaktor	bindet an Clk, aktiviert Transkription im Heterodimer mit Clk über E-box Elemente, keine circadiane Expression
Doubletime (Dbt)	Serin/Threonin Protein Kinase	phosphoryliert Per, beschleunigt Per Degradation, Import mit Per in Zellkern
Cryptochrome (Cry)	Flavin Bindeprotein, ähnlich zu DNA Photolyasen	circadianer Photorezeptor, Licht-abhängige Interaktion mit Tim, beschleunigt Tim Degradation
Vrille (Vri)	bZIP Transkriptionsfaktor	Repressor für Clk Transkription
PAR- domain protein 1 (Pdp 1)	bZIP-PAR Transkriptionsfaktor	Aktivator für Clk Transkription
Shaggy (Sgg)	Serin Protein Kinase	phosphoryliert Tim, erleichtert Per/Tim Import
Casein Kinase 2	Serin Protein Kinase	phosphoryliert Per, agiert zusammen mit Dbt
Protein Phosphatase 2	Serin/Threonin Phosphatase	dephosphoryliert Period
Slimb	Ubiquitin E3 Ligase	ubiquitinyliert Period und Timeless

1.2 Der circadiane Rhythmus in Säugetieren

1.2.1 Auch der circadiane Rhythmus in Säugetieren wird durch eine Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife reguliert.

Auch im Säugetiersystem wurde das erste circadiane Gen über die Suche nach Mutanten mit einem Defekt im circadianen Rhythmus nach einer chemischen Mutagenese gefunden; die Mutante zeigte einen verlängerten Rhythmus von 28 h und ein arrhythmisches Verhalten in konstanter Dunkelheit (Gekakis et al., 1998; Vitaterna et al., 1994). Clock ist sehr stark im Gehirn, insbesondere im suprachiasmatischen Nucleus (SCN), angereichert, zeigt aber auch in weiteren Organen wie Herz, Lunge, Leber, Niere, Testis und Ovar eine Expression (King et al., 1997). Da Clock Mitglied der bHLH/PAS Transkriptionsfaktor Familie ist, wurde intensiv nach seinem Interaktionspartner gesucht. In einem Hefe Two-Hybrid System konnten drei bHLH/PAS Proteine identifiziert werden (ARNT, ARNT2 und Bmal1) (Drutel et al., 1996; Gekakis et al., 1998; Ikeda and Nomura, 1997). Allerdings zeigte nur Bmal1 ein mit Clock und mPer1 vergleichbares Expressionsmuster (Gekakis et al., 1998). Im Gegensatz zu Clock wird Bmal1 rhythmisch exprimiert und in Abhängigkeit von Licht im SCN sehr schnell degradiert (Abb.1.3)(Tamaru et al., 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Bmal1 knock-out Mäuse sich arrhythmisch in konstanter Dunkelheit verhalten (Bunger et al., 2000).

Unabhängig voneinander konnten zwei Gruppen im Jahr 1997 ein homologes Protein zu *Drosophila* Period identifizieren (Sun et al., 1997; Tei et al., 1997). MPer1, zuerst als Rigi bzw. Per bezeichnet, ist ebenso wie Clock im SCN und in der Retina angereichert. Im Northern Blot konnte gezeigt werden, dass dieses Protein auch ein sehr breit gestreutes Expressionsmuster (z.B. im Herz, Leber, Niere und Skelettmuskel) hat. Nach Sequenzhomologiesuche konnten noch zwei weitere Period Homologe identifiziert werden, die als Per2 und Per3 bezeichnet wurden (Albrecht et al., 1997; Shearman et al., 1997; Takumi et al., 1998; Zylka et al., 1998b). Alle Period Proteine enthalten wie das *Drosophila* Homolog eine PAS-Domäne, aber keine bHLH DNA-Bindedomäne. *MPer1* knock-out Mäuse zeigen einen verkürzten Rhythmus unter Licht-Dunkel Bedingungen und ein arrhythmisches Verhalten in konstanter Dunkelheit, obwohl sowohl mPer2 als auch mCry1 und Bmal1 weiterhin rhythmisch exprimiert werden (Bae et al., 2001; Zheng et al., 2001). Ebenso wie der Knock-out von *mPer1* führt auch der Knock-out von *mPer2* zu einem verkürzten Rhythmus unter LD (Light-Darkness)

Bedingungen. In konstanter Dunkelheit (DD) ist kein rhythmisches Laufrad-Verhalten mehr zu beobachten. Im Gegensatz zu den *mPer1*^{-/-} Mäusen ist auch die Expression von *mPer1*, *mCry1* und *Bmal1* nicht mehr rhythmisch (Bae et al., 2001; Zheng et al., 2001). So scheinen sich *mPer1* und *mPer2* in ihrer Funktion im circadianen Rhythmus zu unterscheiden. Es konnte auch gezeigt werden, dass *mPer2* die Transkription von *Bmal1* aktivieren kann (Yu et al., 2002). *MPer3* knock-out Mäuse zeigen weiterhin ein rhythmisches Laufrad-Verhalten. Doppelt transgene *mPer1* und *mPer2* Mäuse verhalten sich bereits unter LD Bedingungen arrhythmisch, während *mPer2*^{-/-}, *mPer3*^{-/-} doppelt transgene Mäuse den gleichen Phänotyp wie *mPer2* Mutanten besitzen (Bae et al., 2001; Shearman et al., 2000). *MPer3* scheint also keine essentielle Funktion im circadianen Rhythmus zu besitzen.

Abb.1.3 Das Expressionsmuster von circadianen Genen in der Maus im Verlaufe eines Tages.

Aufgrund der Stimulation durch das Licht werden die Period Proteine Tag am stärksten exprimiert und in der Nacht ist die Konzentration aller Per Proteine sehr niedrig. Antizyklisch dazu zeigt *Bmal1* eine hohe Expression in der Nacht, während *Clock* über den gesamten Tag konstant exprimiert wird (nach Dunlap, 1999).

Neben den Period Proteinen konnte auch aufgrund von EST Sequenzen ein Homolog zu *Drosophila* Tim gefunden werden (Koike et al., 1998; Sangoram et al., 1998; Takumi et al., 1999; Zylka et al., 1998a). Obwohl dieses Protein mit allen Maus Period Proteinen interagieren kann und auch im SCN exprimiert wird, konnte für *mTim* noch keine Funktion im circadianen Rhythmus von Säugetieren nachgewiesen werden.

In der Maus existieren zwei homologe Proteine zu Cryptochrom aus *Drosophila*, *mCry1* und *mCry2*. Auch ihnen fehlt die Fähigkeit zur DNA Reparatur (Hsu et al., 1996). Beide Cryptochrome werden sehr stark im SCN exprimiert, sind aber genauso wie die anderen circadianen Proteine in weiteren Organen und Geweben vorhanden (Kobayashi et al., 1998; Miyamoto and Sancar, 1998). In mutanten Mäusen zeigte sich, dass der Funktionsverlust von *mCry1* zu einer Verkürzung (22,5 h), und der Funktionsverlust von *mCry2* zu einer Verlängerung (24,5 h) des circadianen Rhythmus führt. In

mCry1^{-/-}, *mCry2*^{-/-} doppelt mutanten Mäusen findet hingegen überhaupt kein rhythmisches Verhalten in konstanter Dunkelheit mehr statt (Thresher et al., 1998; van der Horst et al., 1999; Vitaterna et al., 1999). Weiterhin konnte in Luciferase-Experimenten gezeigt werden, dass sowohl *mCry1* als auch *mCry2* sehr kompetente Inhibitoren für die Clock/Bmal1 vermittelte Transkription sind. Dabei ist die Inhibitionseffizienz wesentlich höher als bei den Period Proteinen selbst (Griffin et al., 1999; Kume et al., 1999). Die Cryptochrom Proteine scheinen demnach eine wichtige licht-unabhängige Rolle in der negativen Regulation im circadianen Rhythmus in der Maus zu spielen.

Auch in Säugetieren wird der Kernmechanismus zur Regulation der biologischen Uhr also über eine Translations-Transkriptions-Rückkopplungsschleife erreicht. Dabei aktivieren die zu Clock und Cycle homologen Proteine Clock und Bmal1 die Transkription von Period und Cryptochrom über die Bindung an E-Box Elemente (CACGTG). Die Proteine werden nach der Translation im Zytoplasma in den Zellkern transportiert, um dort ihre eigene Clock/Bmal1 vermittelte Transkription zu inhibieren, und schließen so die negative Rückkopplungsschleife (Abb.1.4). Ebenso wie in *Drosophila* gibt es auch hier eine zweite Rückkopplungsschleife, in der Rev-Erb α , dessen Transkription ebenfalls durch Clock/Bmal1 aktiviert wird, die Transkription von *Bmal1* durch die Bindung an das Rev-Erb/ROR response element (RORE) reprimiert (Preitner et al., 2003; Ueda et al., 2002). Da Bmal1 antizyklisch zu mPer und mCry exprimiert wird, fällt die Konzentration von Bmal1 genau dann, wenn die Konzentrationen von mPer und mCry steigen, die dann wiederum auch die Transkription von Rev-Erb α inhibieren können (Yu et al., 2002). So werden beide Rückkopplungsschleifen im circadianen Rhythmus koreguliert.

Abb.1.4 Der circadiane Rhythmus in Säugetieren.

Der Mechanismus besteht aus einer autoregulatorischen Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife, bei der Clock (hellgrün) und Bmal1 (blaugrün) die Transkription von Per, Cry, Dbp, Rev-erb und weiteren Genen (clock controlled genes, ccg) über die Bindung an E-Boxen aktivieren. Per (blau) wird durch CKIε (braun) im Zytoplasma phosphoryliert und in den Zellkern zurück transportiert. Auch Cry (rot) gelangt nach der Translation zurück in den Zellkern. Dort bilden diese Proteine einen Komplex mit Clock und Bmal1 und inhibieren ihre eigene Transkription, wobei der Clock/Bmal1 Heterodimer weiterhin an die DNA gebunden bleibt. Währenddessen inhibiert Rev-erbα (dunkelgrün) die Transkription von Bmal1 über Bindung an das Rev-erb/ROR response element (RORE). Dbp (gelb) kann im Zellkern über die Bindung an den Promotor von mPer1 dessen Transkription stimulieren und die Transkription von weiteren Genen aus dem circadianen Rhythmus (Clock controlled genes) insbesondere in der Leber aktivieren (modifiziert nach Fukada, 2003).

Eine weitere Komponente zur Regulation der biologischen Uhr ist der PAR-Transkriptionsfaktor Dbp (albumin D-element binding protein), dessen Transkription auch circadian reguliert ist (Lopez-Molina et al., 1997; Ripperger et al., 2000). Durch Dbp kann die Transkription von mPer1 über eine Bindung an die D-Bindungsstelle in dessen Promotor noch weiter stimuliert werden (Yamaguchi et al., 2000). Die Transkription von mPer1 und Dbp erfolgt zwar zur gleichen Zeit, aber Dbp wird sehr viel schneller translatiert, sodass Dbp sofort in den Zellkern transportiert werden kann, um dort die weitere Transkription von mPer1 noch zu stimulieren. Ebenso wie die schnelle Translation erfolgt auch der Abbau von Dbp rapider als bei mPer1. Dbp soll

demnach die Amplitude des mPer1 Transkripts verstärken. Es wurde allerdings bereits früher gezeigt, dass Dbp ein Aktivator für viele Gene in der Leber ist und somit wird eher angenommen, dass dieses Protein bei der Weiterleitung des circadianen Rhythmus in die Peripherie notwendig ist (Lavery et al., 1999; Mueller et al., 1990).

Tab. 2: Übersicht über die Eigenschaften und Funktionen von circadianen Proteinen in Mäusen

circadiane Proteine in Mäusen	Eigenschaften	Funktionen
mPeriod 1, 2, 3 (mPer1, 2, 3)	PAS Domäne	bindet an mPer und mCry, inhibiert Clk/Bmal vermittelte Transkription
mTimeless (mTim)		keine Funktion im circadianen Rhythmus
mClock (mClk)	bHLH-PAS Transkriptionsfaktor	bindet an Bmal1, aktiviert Transkription von im Heterodimer mit Bmal1 über E-box Elemente, keine circadiane Expression
Bmal1	bHLH-PAS Transkriptionsfaktor	bindet an mClk, aktiviert Transkription im Heterodimer mit mClk über E-box Elemente
Casein Kinase Iε	Serin/Threonin Protein Kinase	phosphoryliert mPer, erleichtert mPer Degradation, beeinflusst mPer Lokalisation
mCryptochrome 1,2 (mCry1, 2)	ähnlich zu DNA Photolyasen	bindet an mPer, Repressor für mPer und mCry Transkription
albumin D-element binding protein (DBP)	bZIP-PAR Transkriptionsfaktor	Aktivator für circadiane Expression viele ccg z.B. in Leber, stimuliert mPer1 Transkription
Rev Erb α	Transkriptionsfaktor (orphan nuclear receptor)	reprimiert Bmal1 Transkription

1.2.2 Posttranslationale Regulation des circadianen Rhythmus im Säugetier

Protein Phosphorylierung

Ebenso wie in *Drosophila* scheint auch im Säugetiersystem die Phosphorylierung eine wichtige Rolle in der Regulation des circadianen Rhythmus zu spielen. So weist die tau Goldhamster Mutante, die im Phänotyp einen Rhythmus von 20 h besitzt, eine Mutation im Casein Kinase Iε (CKIε, homolog zur Kinase Doubletime in *Drosophila*) Gen auf (Lowrey et al., 2000). Eine Mutation im humanen Per2 ist mit dem familial advanced

sleep phase Syndrom (FASPS) in Verbindung zu bringen (Toh et al., 2001). Diese autosomal dominante Krankheit führt bei dem Patienten zu einem um 4 h verfrühten Schlafrythmus. Das mutante hPer2 weist einen Basenaustausch auf, sodass ein Glycin an der Stelle eines Serins vorhanden ist. Diese Mutation liegt in der CKIε Bindungsdomäne und führt zu einem hypophosphorylierten hPer2 in diesen Patienten. Sowohl mPer1 als auch mPer2 (mPer3 mit einer deutlich geringeren Effizienz) können von CKIε *in vivo* und *in vitro* phosphoryliert werden (Akashi et al., 2002; Camacho et al., 2001; Lee et al., 2004; Lowrey et al., 2000; Takano et al., 2000; Vielhaber et al., 2000). Diese Phosphorylierung führt zu einer Degradation dieser Proteine, da CKIε die Ubiquitinylierung der Period Proteine fördert (Akashi et al., 2002). Weiterhin scheint diese Kinase auch den Kern-Zytoplasma-Transport zu beeinflussen (siehe unten). Neben CKIε kann auch das Isoenzym CKIδ, das mit CKIε auf Aminosäureebene zu 76 % identisch ist, mPer1, mPer2 sowie beide Cryptochrome und auch Bmal1 phosphorylieren (Akashi et al., 2002; Lee et al., 2001a).

Eine weitere Kinase ist die Mitogen-activated proteine kinase (MAPK), die *in vitro* Bmal1 phosphorylieren kann und im SCN zeitabhängig und durch einen Lichtimpuls aktiviert werden kann (Obrietan et al., 1998; Sanada et al., 2002). Es scheint also möglich zu sein, dass Kinasen aus bestimmten Signaltransduktionswegen auch einer circadianen Regulation im Organismus unterliegen und so die Signale von außen an den suprachiasmatischen Nukleus oder von dort an die peripheren Organe weiterleiten können (siehe Kap. 1.2.4).

Kern-Zytoplasma Transport als Regulationsmechanismus in der biologischen Uhr

Nach der Translation im Zytoplasma werden die inhibitorischen Komponenten des circadianen Rhythmus zu einem bestimmten Zeitpunkt wieder in den Zellkern transportiert, um dort die Transkription ihrer eigenen Gene zu inhibieren. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass Heterodimerisierung und Phosphorylierung wichtige Ereignisse für den Transport in den Zellkern sind. Für Zellen aus Säugetieren konnte 1999 von Kume et al. gezeigt werden, dass mPer3 im Komplex mit mPer1 verstärkt im Zellkern von NIH3T3 Zellen lokalisiert ist und die Anwesenheit von mCry1 oder mCry2 diesen Effekt noch verstärkt (Kume et al., 1999). Während in NIH3T3 Zellen mPer1 also wichtig für den Import von mPer3 zu sein scheint, konnte in COS7 Zellen beobachtet werden, dass mPer3 wichtig für den Import von mPer1/mPer3 und mPer2/mPer3 Heterodimeren nach Serumschock ist (Yagita et al., 2000). In COS1

Zellen hingegen ist mCry1 notwendig für den Import von mPer2 (Miyazaki et al., 2001). Fraglich ist, warum verschiedene Ergebnisse durch diese Studien erzielt werden konnten. Möglicherweise verhalten sich die Proteine zelltypspezifisch, oder es werden durch die Einwirkungen weiterer Signale, z.B. durch einen Serumschock, werden differentielle Verhaltensweisen hervorgerufen.

Wie bereits oben erwähnt, wird auch der CKIε eine wichtige Funktion in der Regulation des Transportes in den Zellkern zugeschrieben. So konnte in HEK293 Zellen gezeigt werden, dass die nukleäre Lokalisation von mPer1 durch eine CKIε abhängige Phosphorylierung inhibiert wird, indem die Bindung von CKIε an mPer1 zu einer Maskierung des Kernlokalisierungssignales führt und somit mPer1 im Zytoplasma der HEK293 Zellen hält (Vielhaber et al., 2000). Allerdings konnte kürzlich in mutanten Mäusen nachwiesen werden, dass die Phosphorylierung von CKIε notwendig für den Import von mPer1 und mPer3 ist (Lee et al., 2004). So bleibt nach wie vor die Frage offen, welche Funktion die Casein Kinase Iε bei dem Transport von circadianen Regulatorproteinen in den Zellkern spielt.

Neben dem Import könnte auch der Export ein wichtiger regulatorischer Mechanismus in der biologischen Uhr sein. Sowohl in mPer1 als auch in mPer2 konnten Leucinreiche Exportsignale identifiziert werden, sodass diese Proteine zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her transportiert werden können (Vielhaber et al., 2001; Yagita et al., 2002). Für mPer2 konnte weiter gezeigt werden, dass nur die Interaktion mit mCry Proteinen zu einer nukleären Akkumulation führt (Yagita et al., 2002). Period Proteine können also zwischen Zellkern und Zytoplasma „shutteln“ und erst durch eine Interaktion mit anderen Protein werden sie in einem Kompartiment gehalten.

So scheint der Transport in den unterschiedlichen Zellsystemen zwar verschiedene Präferenzen zu haben, aber alle Analysen haben bisher gezeigt, dass Heterodimerisierung und Phosphorylierung wichtig für die subzelluläre Verteilung in der Zelle und somit auch für die Regulation des circadianen Rhythmus sind.

1.2.3 Die circadiane Photorezeption

In vielen Vertebraten, mit Ausnahme der Säugetiere, sind circadiane Photorezeptorzellen direkt in einigen Bereichen des Gehirns lokalisiert. So sind die ventralen lateralen Neuronen (in denen auch der Hauptregulator des circadianen Rhythmus lokalisiert ist) in *Drosophila* direkt photosensitiv. Dort spielt Cryptochrom

bei der Übertragung von Lichtreizen auf den circadianen Rhythmus eine wichtige Rolle. Die Retina ist hier für die Synchronisation der biologischen Uhr nicht notwendig (Williams and Sehgal, 2001). In Säugetieren hingegen sind nur die Augen wichtig für die Synchronisation des Tag-/Nacht Rhythmus. Dafür sind spezielle circadiane Photorezeptoren notwendig, denn es hat sich gezeigt, dass die selektive Zerstörung der klassischen Photorezeptoren in der Retina (die Zäpfchen und Stäbchen) von Mäusen nicht zu einer Beeinträchtigung des circadianen Rhythmus führt (Freedman et al., 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass ein kleiner Teil der retinalen Ganglionzellen, die ipRGC (intrinsically photoresponsive retinal ganglion cells), photosensitiv sind (Berson et al., 2002). In weiteren Studien konnte beobachtet werden, dass diese Zellen Melanopsin enthalten (Gooley et al., 2001; Hattar et al., 2002; Provencio et al., 2002). Identifiziert wurde dieses Protein zunächst als photosensitives Pigment in Melanozyten in der Haut von *Xenopus leavis* (Provencio et al., 1998). Allerdings zeigten Untersuchungen an knock-out Mäusen, dass der Verlust von Melanopsin nicht zu einem vollständigen Verlust der lichtabhängigen Regulation des circadianen Rhythmus führt, sondern nur zu einer verminderten Regulierbarkeit (Lucas et al., 2003; Panda et al., 2002b; Ruby et al., 2002). Nun stellt sich die Frage, ob es noch ein weiteres Photopigment gibt, oder ob es möglicherweise ein Zusammenwirken von dem visuellen System mit den Zäpfchen und Stäbchen gibt. Panda et al., (2003) konnten nachweisen, dass es nach einer Zerstörung der visuellen Photorezeption in Melanopsin knock-out Mäusen zu einem vollständigen Verlust von lichtabhängiger circadianer Regulation kommt. Von der Retina wird schließlich das Signal über den RHT (retino-hypothalamic tract) an den SCN weitergeleitet. Als Neurotransmitter spielen dabei Glutamat und PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) eine Rolle (Hannibal and Fahrenkrug, 2004; Hattar, 2003).

1.2.4 Der circadiane Rhythmus in peripheren Organen

Der circadiane Rhythmus ist, wie der Name bereits sagt, an den Tag-Nacht Rhythmus angelehnt und somit ist auch das Licht eines der Hauptzeitgeber in der Regulation der biologischen Uhr. Da nur das Gehirn, bzw. das SCN, das in einen neuronalen Reiz umgewandelte Lichtsignal erhalten und verarbeiten kann, müssen von dort weitere Signale an die peripheren Gewebe im Körper weitergegeben werden, um eine Synchronisation zu erreichen. In peripheren Organen findet man allerdings eine

Verzögerung der circadianen Genexpression um 4 Stunden (Balsalobre, 2002; Balsalobre et al., 1998) und unter isolierten Bedingungen, wie z.B. in Kultur, verlieren sie den Rhythmus bereits nach kurzer Zeit (2-3 Zyklen), während kultivierter SCN seinen Rhythmus über einen Monat hinweg beibehält (Yamazaki et al., 2000). Als mögliche humorale Signalgeber wurden die sekretierten Proteine TGF- α und Prokineticin-2 identifiziert, die beide rhythmisch im SCN exprimiert werden (Cheng et al., 2002; Kramer et al., 2001). TGF α wurde aufgrund einer Suche nach sekretorischen Proteinen, die das Laufradverhalten von Mäusen beeinflussen können, aus einer SCN cDNA Bibliothek identifiziert. Eine konstante Infusion von TGF α in cerebrale Ventrikel für mehrere Tage blockiert die Bewegung der Mäuse im Laufrad. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TGF α EGF Rezeptoren in der subparaventriculären Zone (SPZ), einem kleinen Bereich im Hypothalamus, circadian aktiviert. Prokineticin-2 wird direkt durch Clock und Bmal1 über die im Promotor enthaltenen E-Boxen reguliert und die rhythmische Expression dieses Proteins kann durch Licht induziert werden. Der PK2 Rezeptor ist sowohl im SCN als auch in einigen weiteren angrenzenden Bereichen des Gehirns vorhanden. Die Injektion von PK2 führte nicht zu einem Verlust von Bewegungen im Laufrad, sondern zu einer Verschiebung dieser von der Nacht in den Tag. Diese Resultate deuten darauf hin, dass es sich bei diesen Proteinen tatsächlich um Signalgeber vom SCN zur Peripherie handeln könnte. Allerdings bleibt weiter unklar, wie die peripheren Organe durch diese Proteine circadian reguliert werden. Ein weiterer Zeitgeber für periphere Gewebe ist durch die Gabe von Nahrung zu bestimmten Zeitpunkten (restricted feeding) definiert, was abgekoppelt vom SCN zu einem veränderten Rhythmus führen kann; allerdings dauert die Anpassung hier mehrere Tage (Damiola et al., 2000; Stokkan et al., 2001).

Um den circadianen Rhythmus unabhängig vom gesamten Tier untersuchen zu können, wurde von Balsalobre et al. (1998) ein Zellkultursystem entwickelt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass ein Serumschock circadiane Genexpression in kultivierten rat-1 Fibroblasten induzieren kann. Möglicherweise wird durch den Serumschock ein ähnliches Signal ausgelöst, wie es durch den Licht-vermittelten Reiz gegeben ist, denn die Induktion mit Serum führt zu einem akuten Anstieg von *Per1*, gefolgt von weiterer circadianer Genexpression. Mittlerweile wurden einige weitere Proteine gefunden, die einen ähnlichen Effekt auslösen. Die Induktion mit Forskolin führt ebenfalls zu einem sofortigen Anstieg von *Per1* mRNA und circadianer Genexpression (Yagita and Okamura, 2000). Forskolin aktiviert die Adenylat Cyclase, was in einem intrazellulären

Anstieg von cAMP, gefolgt von einer Proteinkinase A Aktivierung, resultiert. Inhibitoren von cAMP abhängigen Kinasen können diesen Effekt blockieren (Balsalobre et al., 2000b; Motzkus et al., 2000). Zusätzlich konnte in diesen Arbeiten gezeigt werden, dass auch ein Anstieg von intrazellulärem Calcium zu erhöhter *Per1* mRNA Expression führt, so dass wohl auch der Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktionsweg an der Regulation des circadianen Rhythmus in peripheren Geweben beteiligt zu sein scheint. Auch die Behandlung mit TPA (12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate) führt zu einer circadianen Genexpression, die durch einen MAPKK Inhibitor wieder aufgehoben werden kann (Akashi and Nishida, 2000). So scheint zusätzlich die MAPK Kaskade in dem Regulationsmechanismus involviert zu sein. Alle diese Signalwege führen zu einer Erhöhung von phosphoryliertem CREB, das dann an CRE Elemente im *Per1* Promotor binden kann und zur Aktivierung der Transkription führt. So scheint also die *Per1* Induktion eine wichtige Rolle in der Induktion des circadianen Rhythmus in peripheren Geweben zu spielen.

Abb.1.5 Darstellung von Faktoren, die an der Regulation des circadianen Rhythmus in peripheren Geweben beteiligt sind.

Für die circadiane Genexpression in peripheren Geweben gibt es viele verschiedene regulatorisch wirkende Faktoren. Retinsäure kann über die Bindung an ihre Rezeptoren RAR α und RXR α die Aktivität des Clock/Bmal1 Heterodimers beeinflussen, denn die Bindung der Retinsäurenrezeptoren führt zur Inhibition der Clock/Bmal1 vermittelten Transkription. Die Aktivierung von CREB durch mehrere mögliche Ereignisse führt zur sofortigen Expression von *Per1* und zieht ebenfalls eine circadiane Genexpression nach sich. Ebenso können Temperaturunterschiede und eine Erhöhung der Glucocorticoidkonzentration einen circadianen Rhythmus in peripheren Organen induzieren (modifiziert nach Tsuchiya and Nishida, 2003).

Es wurden allerdings auch Mechanismen beschrieben, die keine *Per1* Aktivierung benötigen. So kann eine Behandlung von NIH3T3 Zellen mit Wärme ebenfalls eine

circadiane Genexpression hervorrufen (Tsuchiya et al., 2003). Genauso konnte durch das Glucocorticoid-Analog Dexamethason eine Verschiebung circadianer Genexpression in verschiedenen Geweben, wie Leber, Herz und Niere, hervorgerufen werden (Balsalobre et al., 2000a). Aufgrund fehlender Glucocorticoidrezeptoren im SCN ist dieser Effekt ausschließlich in peripheren Organen zu beobachten. Weiterhin konnte in vaskulären Zellen beobachtet werden, dass Retinsäure ebenfalls eine Verschiebung circadianer Genexpression verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass RAR α (retinoic acid receptor α) und RXR α (retinoic X receptor α) mit dem Clock/Bmal1 Heterodimer interagieren und so die Aktivität inhibieren können (McNamara et al., 2001). Es scheint also sehr viele Mechanismen zu geben, die für die Regulation und Synchronisation circadianer Genexpression notwendig sind und schließlich zu einem dem Tag/Nacht-Rhythmus entsprechendem Verhalten führen (Abb. 1.5).

Um weitere Gene zu identifizieren, die eine Funktion in der biologischen Uhr haben, wurden unter anderem über die Nutzung von DNA-Mikroarrays breit angelegte Suchen durchgeführt (Akhtar et al., 2002; Duffield et al., 2002; Grundschober et al., 2001; Panda et al., 2002a; Storch et al., 2002). Ungefähr 2-10% der Gene zeigten in den untersuchten Geweben ein circadianes Expressionmuster. Weiterhin scheint diese Expression sehr zellspezifisch zu sein, denn nur 5% der identifizierten Gene überlappen in den verschiedenen Geweben. Da wohl nur sehr wenige Gene direkt über Clock und Bmal1 reguliert werden, nimmt man an, dass diese beiden Transkriptionsfaktoren direkt andere Transkriptionsfaktoren aktivieren, die dann weitere Gene regulieren und so eine circadiane Antwort hervorrufen. So kann z.B. Dbp, das direkt über Clock/Bmal1 induziert wird, die Expression von einigen Genen (clock controlled genes) in der Leber aktivieren (Lavery et al., 1999). Antagonistisch zu Dbp agiert der bZIP Transkriptionsfaktor E4BP4 (adenovirus E4 promotor ATF side-binding protein), dessen Expression über Rev-erb α reguliert wird und der zeitversetzt zu Dbp exprimiert wird (Mitsui et al., 2001; Ueda et al., 2002). Dbp zeigt eine zyklische Expression sowohl im SCN als auch in peripheren Organen, sodass die transkriptionale Aktivierung wohl in direkter Abhängigkeit zum SCN geschieht. Da aber die oben beschriebenen Studien gezeigt haben, dass auch SCN-unabhängig circadiane Genexpression möglich ist, z.B. durch Nahrung oder Glucocorticoide, muss es noch weitere Mechanismen geben, um „clock-controlled genes“ zu aktivieren.

Abb.1.6 Signalwege in der Regulation des circadianen Rhythmus im suprachiasmatischen Nucleus und in peripheren Geweben.

Durch den Tag/Nacht Rhythmus wird zu bestimmten Zeitpunkten Licht ausgesendet, das über die Retina aufgenommen wird und der Reiz wird weiter über den retinohypothalamatischen Trakt (RHT) an den suprachiasmatischen Nucleus (SCN) geleitet. Als Hauptkoordinator im circadianen System synchronisiert der SCN die peripheren Oszillatoren über die Aussendung von humoralen und neuronalen Signalen. Periphere Organe können ihren Rhythmus auch in Abhängigkeit von Nahrung verändern. Dort erfolgt die transkriptionale Aktivierung von „clock controlled genes“ (ccg) unterschiedlicher Ordnungen. Es werden einige Gene (wahrscheinlich hauptsächlich weitere Transkriptionsfaktoren wie Dbp) direkt über die Hauptregulatorproteine Clock und Bmal1 angeschaltet, die dann die Expression weiterer Gene induzieren und schließlich zu einer circadianen Regulation von Prozessen in den Zellen wie z.B. Metabolismus und Zellproliferation und zu rhythmischen Verhaltensweisen führen (modifiziert nach Reppert and Weaver, 2002).

1.2.5 Der circadiane Rhythmus und Tumorentwicklung

Bereits 1969 wurde berichtet, dass eine dauerhafte Unterbrechung des circadianen Rhythmus zu einer erhöhten Anzahl von Tumorentwicklungen führt (Hamilton, 1969). Es hat sich gezeigt, dass jegliche Unterbrechung des circadianen Rhythmus, wie z.B. durch Nachtarbeit, zu einem erhöhten Krebsrisiko führt. In einigen epidemiologischen Studien an Krankenschwestern konnte nachgewiesen werden, dass Nachtarbeit unabhängig von der Familiengeschichte zu einer vermehrten Anzahl von Brustkrebserkrankungen führt (Hansen, 2001a; Hansen, 2001b; Schernhammer et al., 2001). Neben dem erhöhten Risiko zur Tumorentstehung zeigt sich auch, dass das Wachstum von Tumoren durch den circadianen Rhythmus beeinflussbar ist. Wurden

Ratten mit einem Sarkomkarzinom unter wechselndem Tag/Nacht Rhythmen gehalten, so nahm das Tumorwachstum zu, und die Überlebensrate der Tiere sank im Vergleich zu den Kontrollratten, die unter konstantem Rhythmus (12 h Tag, 12 h Nacht) gehalten wurden (Li and Xu, 1997). Eine weitere Studie zeigte eine 2-3-fache Wachstumszunahme eines Pankreaskarzinoms in Mäusen, denen der SCN entfernt wurde (Filipski et al., 2002). Auf molekularer Ebene zeigten Fu et al. (2002) als Erste, dass die circadianen Gene eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Zellproliferation und Zelltod in Tumoren spielen. Sie konnten beobachten, dass nach γ -Bestrahlung Mäuse, in denen das mPer2 Gen mutiert war, im Vergleich zum Wildtyp neben schnellerem Haarausfall und Haarergrauung auch vermehrt Lymphome ausbildeten. Weiterhin konnten sie zeigen, dass in den mPer2-mutierten Mäusen die Expression von c-myc dramatisch erhöht ist. Über die vorhandenen E-Boxen in dem Promotor von c-myc kann die Transkription dieses Gens direkt über den Clock/Bmal1 Heterodimer reguliert werden. Neben diesem Onkogen ist auch die Expression von Cyclin D1, Gadd45 α und Mdm2 in Mäusen mit einer Mutation im mPer2 Gen verändert. Da Mdm2 an der posttranskriptionalen Kontrolle von p53 beteiligt ist, wird mPer2 eine mögliche Funktion in der Antwort auf DNA Schädigung zugesprochen.

Eine weitere circadiane Komponente, die einen Einfluss auf die Unterdrückung von Tumoren haben könnte, ist die Casein Kinase I ϵ . Es konnte gezeigt werden, dass β -Catenin durch CKI ϵ stabilisiert wird, so dass die Überexpression von CKI ϵ zu einer Anreicherung von β -Catenin im Zytoplasma führt und dieses Protein schließlich in den Zellkern importiert werden kann, um dort mit TCF (T-cell-specific transkription factor) und LEF (lymphoid-enhancer factor 1) zu interagieren und dessen Zielgene, wie c-Myc und CyclinD1, zu aktivieren (Gao et al., 2002; Lee et al., 2001b; Morin, 1999; Schwarz-Romond et al., 2002; van de Wetering et al., 2002).

Der circadiane Rhythmus ist also an der Regulation des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt, so dass Störungen in der Expression circadianer Gene zu einer Deregulation dieser Prozesse und somit zur Tumorentwicklung führen können.

1.3 Ziel der Arbeit

Um einen Einblick in diese posttranskriptionalen Regulationsmechanismen im circadianen Rhythmus zu bekommen, sollte der Kern-Zytoplasma-Transport von Proteinen, die an der biologischen Uhr beteiligt sind, untersucht werden. Einige mittlerweile publizierte Studien zeigen inzwischen, dass der Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma in der Tat ein wichtiger Regulationsmechanismus zu sein scheint. Es hat sich aber weiterhin gezeigt, dass die Nutzung von unterschiedlichen Zellsystemen nicht immer zu vergleichbaren Ergebnissen führt. So sollte in dieser Arbeit eine systematische Analyse des Kern-Zytoplasma-Transportes von circadianen Proteinen durch Mikroinjektionen in *Xenopus laevis* Oozyten durchgeführt werden. Durch Injektionen in den Zellkern bietet diese Methode im Vergleich zu Transfektionsexperimenten den Vorteil, dass gezielt zwischen Kernimport und Kernexport unterschieden werden kann. In diesem System sollten dominant-negative Transportmutanten definiert werden, die dann stabil in Fibroblasten überexprimiert werden sollten. Durch die Synchronisation dieser Zellen und die Induktion circadianer Genexpression sollte schließlich die Funktion des Kern-Zytoplasma-Transportes im circadianen Rhythmus untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Organismen

Bakterien-Stämme:

Es wurden *Escherichia coli*-Stämme der folgenden Genotypen verwendet (Stratagene GmbH, Heidelberg, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus):

Escherichia coli TG1 ist eine Variante des K12-Stammes, die durch die Mutationen (lac-proAB), supE44, thi, hsdD5 [F' traD36 proAB+lacIq lacZ.M15] gekennzeichnet ist..

XL1-Blue recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacIqZ.M15, Tn10(Tetr)]c

Xenopus leavis

Die afrikanischen Krallenfrösche, die zur Familie der Pipidae, Unterfamilie Xenopinae, gehören, wurden von der Firma Nasco (Fort Atkinson, Wisconsin, USA) und von Dipl. Ing. H. Kähler, Hamburg bezogen. Die Tiere wurden entsprechend den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes behandelt und gehalten.

Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden von der DSMZ (Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) in Braunschweig bezogen:

HeLa humane Zervix Karzinom Zellen, adhärent wachsend, kultiviert in Eagle's MEM mit 10 % FCS

NIH3T3 Schweizer embryonische Maus-Fibroblasten, adhärent wachsend, kultiviert in DMEM mit 10 % FCS

2.1.2 Feinchemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Collagenase	Sigma, Deisenhofen

Coomassie G 250	Serva, Heidelberg
Coomassie R 250	Serva, Heidelberg
DAPI	Linaris, Wertheim
DMEM	Biochrom, Berlin
DMSO	Sigma, Deisenhofen
Dextran Blau	Sigma, Deisenhofen
DTT	Biomol, Hamburg
Eagle's MEM	Biochrom, Berlin
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glycin	Roth, Karlsruhe
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Methylenblau	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Schweiz
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Protease Inhibitor Cocktail (Tabletten)	Roche, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
5-Brom-4-chlor-indoxyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Sigma, Deisenhofen
Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.	

2.1.3 Antikörper, Enzyme und Proteine

Antikörper:

Primärantikörper:

Maus-anti-Myc (9E10)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Kaninchen-anti Myc	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Maus-Anti-Myc-Cy3	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Maus-anti-FLAG M2	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Maus-anti-FLAG M2-FITC	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Sekundärantikörper:

Ziege-anti-Maus-HRP Dianova GmbH, Hamburg

Ziege-anti-Maus-Cy3 Dianova GmbH, Hamburg

Proteine:

BSA: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Trypsin Biochrom, Berlin

Enzyme:

Shrimp alkalische Phosphatase (1 U/μl) Amersham Biosciences, UK

Restriktionsendonukleasen New England Biolabs GmbH, Schwalbach

RNAasin (40U/μl) Promega GmbH, Mannheim

RNase A Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Taq DNA-Polymerase (5 U/μl) Qbiogene, Heidelberg

Pfu turbo DNA-Polymerase (2,5 U/μl) Stratagene GmbH, Heidelberg

T4 DNA-Ligase (1 U/μl) New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Accutase PAA, Cölbe

Kits:

pGEM-T Kit Promega GmbH, Mannheim

PCR purification Kit Qiagen GmbH, Hilden

QIAEX Gel Extraction Kit Qiagen GmbH, Hilden

Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit Stratagene GmbH, Heidelberg

RNeasy Mini Kit Qiagen GmbH, Hilden

RNase free DNase Kit Qiagen GmbH, Hilden

RT-PCR Kit Perkin-Elmer, Weiterstadt

TNT-Coupled Reticulocyte Lysate System Promega GmbH, Mannheim

Wizard *Plus* SV Minipreps Promega GmbH, Mannheim

IscripT cDNA Synthese Kit BioRad Laboratories, München

Sybr Green PCR Supermix BioRad Laboratories, München

2.1.4 Molekulargewichtsstandards

1kb DNA ladder Invitrogen, Karlsruhe

Dual-Color Precision Molekulargewichtsstandard BioRad Laboratories, München

2.1.5 Medien und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Medien und Pufferlösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen mit

doppelt destilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavieren für 20 min bei 110-120°C sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wurden durch Membranfilter (Porendurchmesser 0,2 µm, Sartorius) sterilfiltriert. Nährmedien wurden nach dem Autoklavieren bis auf ca. 50°C abgekühlt und mit den entsprechenden Selektivantibiotika versetzt.

Nährmedien:

LB-Agar: 1,5% (w/v) Agar (DIFCO) in LB-Flüssigmedium
Luria-Bertani (LB)-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton (DIFCO), 0,5% (w/v) Hefeextrakt(DIFCO), 1% (w/v) NaCl, pH 7,5

Nährmedium für die Zellkultur:

Eagle's MEM-Medium: MEM-Trockenpulver 10.4 g/l, HEPES 2,38g/l
NaHCO₃ 2,2 g/l, 10% FCS
Dulbecco's MEM-Medium: DMEM-Trockenpulver, NaHCO₃ 3,8 g/l
10% FCS

Das FCS wurde vor Gebrauch 45 min bei 56°C inaktiviert.

Die Medien wurden grundsätzlich steril angesetzt (Sterilfiltration) und bei 4°C gelagert.

Antibiotika:

Ampicillin: 50 mg/ml in dH₂O, Verdünnung 1:1.000 (Endkonzentration: 50 µg/ml)
Biomol, Hamburg
Tetracyclin: 5 mg/ml in Ethanol, Verdünnung 1: 400 (Endkonzentration: 12.5 µg/ml),
Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Hygromycin B: 50 mg/ml, Endkonzentration für NIH3T3 Zellen 500 µg/ml, Invitrogen,
Karlsruhe

2.1.6 Radioisotope

L-[³⁵S]-Methionin 10 mCi/ml
1000 Ci/mmol spez. Akt

Das Radioisotop wurde von Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK bezogen.

2.1.7 Plasmide und Vektoren

pCS2⁺MT (Rupp et al., 1994)
pCSflag Katja Koebernick, Dissertation 2000
pGEM-T Promega
pIRESHyg3 BD Biosciences

Die Plasmide pAS2.1mPer1, pAS2.1mPer2, pAS2.1mPer3, pAS2.1mCry1, pAS2.1mCry2 wurden von Prof. Eichele, Abteilung Endokrinologie, MPI Hannover zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Plasmide werden in dem Kapitel 2.2.3 Klonierungen beschrieben.

2.1.8 Oligonucleotide

Alle verwendeten Oligonucleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) oder Sigma-Ark (Deisenhofen) synthetisiert.

Folgende Oligonucleotide wurden zum Sequenzieren verwendet:

T7-primer	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
SP6-primer	TTA GGT GAC ACT ATA GAA TAC
3'pCSMT	ACC TGA AAC ATA AAA TGA ATT
mCry1-a	TTT GAT ACA GAT GGC CTG
3'mouse Cry1	ATA CAG TGT ATG TGA AAT
mCry2-a	ATG GAG AGC TGC AGA GCT
3'mouse Cry2	AGC CTT GGG AAC ACA TCA
mPer3-a	TTT TTC TGC AGA ATC TGT
mPer3-b	GAA CAA ATT CAC AAA CTT
mPer3-c	GAA ACA ACT GGA CCA TCC
mPer3-d	TCT TTT CCC CTC CAA GAT
3'mouse Per3	TCC TCA AGA CTG TAT ACA
mPer2-a	AGC GGC TGC AGT AGT GAG CAG
mPer2-b	GAA TGA GAT TCG CTA CCA GCC
mPer2-c	CTA CTG ATG CAG CCT GTC
mPer2-d	GAC AAA AAG CCA CAG CCC
mPer2-e	CCT GAA TTC GCA GTG CAG
3'mouse Per2	GGG TCC TTA TCA GTT CTT
Rigui-a	TGT GCC ATG GAC ATG TCT ACT
Rigui-b	GGG GCT CCA GTA CTT CTC TTT CTA CAT
Rigui-b_c	AAA GTG CGC ACG GCA CCC CTG
Rigui-c	TTC AAA GCC AAA GTC CTT
Rigui-d	ATC ATC ATG ATG GAA GAC
Rigui-E2	CCT AAC TAT CTA TTC CCT ACC CCA
Rigui-e	CCA CCT AGT TAT CCA TAT

Rigui-f	AAG CAA GAC CGG GAG AGG CTC
Rigui-g	GCA TCT CAG CGG AGT TCT CAT
3' mouse Per1	TGG CTC GAG CTG ACT GTT

Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung wiedergegeben.

Zur Analyse der Genexpression in *Xenopus leavis* Oozyten wurden folgende Primer verwendet:

Xl Clock 5	ACA GCA TCT ATT CAG CTC CAG
Xl Clock 3	GCC TTG CAT GGT GAA CTG CGG
Xl Per2 5	GAG CTG CCA TGC CGC TTA GAG
Xl Per2 3	TCT GGA TAC CCG TCC ACA GCG
H4-F	CGG GAT AAC ATT CAG GGA TCA CT
H4-R	ATC CAT GGC GGT AAC TGT CTT CCT

Folgende Primer wurden zur Analyse der Expression in verschiedenen Zelllinien herangezogen:

H4_F_mouse	CAT CAC CAA GCC CGC CAT CCG
H4-R_mouse	CCG CCG AAT CCG TAG AGG CTG
G6PDH_F	GGC AGC GGC AAC TAA ACT CAG
G6PDH_R	CGG GCA AAG AAC TCC TCC AGC
5_RT_Per1_UTR	CCC AGC TTC TCC CAA CAT AGG
3_RT_Per1_UTR	TAA ATA AGT GCA GCC CCA ACC
5_Per2	GCG AGC AGT TCA TTA AGT ACG
3_Per2	CTT TCT CCT CAC TCT CGC AGT
5_Per3	GGA TAG ACA GAG AGA CGA AGC
Per3_Re	TGT GGA TCC AGG AGC GCA TCC
5_Cry1	CTC TAA TGG GAA TGG AGG GCT
3_Cry1	TGA CTA GGA CGC TTC CCA CTG
5_Cry21253	TGT CCT GCA GTG CTT TCT TCC AAC
Cry2_R	TGC TCT GGG GCC TGT GTT GCT GAT
dbp_R	TTC TGT TCC TCA GGC ACC TGG
dbp_F	GCA GGC TTG ACA TCT AGG GAC
5_Clock	GTA TGC CAC AGA ACA GTA CCC
3_Clock	ACC GAT AAT GTC TGT GCC TGC

5_Bma11b	ATG GCG GAC CAG AGA ATG GAC ATT
3_Bma11b	GAC AGA CTC GGA GAC AAA GAG GAT

2.1.9 Chromatographiematrices

Gammabind plus Sepharose	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Ni-NTA Sepharose	Qiagen, Hilden

2.1.10 Computer und Software

Die vorliegende Dissertation wurde mit Hilfe folgender Programme angefertigt: Zur Textverarbeitung und Auswertung der Daten wurde Microsoft Word für Windows 2000 und Microsoft Excel für Windows 2000 verwendet. Die Auswertung von DNA- und Proteinsequenzen erfolgte mit Hilfe des DNA Star Software Pakets. Für die Dokumentation von radioaktiven Proteingelen wurde Image Quant 3.3 und 6.0 als Teil des Dokumentationssystems vom Phosphorimager benutzt. Die Aufnahme von Etidiumbromid gefärbten Agarosegelen erfolgte mit der Gel-Dokumentationsanlage der Firma Bio-Rad. Zur Bildbearbeitung und Erstellung von Graphiken wurde Corel Draw 11.0 verwendet. Für die Auswertung von Real-Time-PCR Daten wurde die Icyler Software benutzt. Die Erstellung des Literaturverzeichnisses erfolgte mit Hilfe von EndNote 6.0.2.

2.1.11 Geräte

Mikroinjektion

Microinjector 5242	Eppendorf, Hamburg
Nadelzieher	Leitz, Wetzlar; Science Products, Hofheim

PCR

T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Icyler	Bio-Rad Laboratories, München

Mikroskope

Stereomikroskop Stemi SV6, Stemi DV4,	
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss, Oberkochen

Zellkultur

Zellzählgerät Casy Counter	Schärfe System Reutlingen
CO ₂ -Inkubator Heraeus BBD 6220	Kendro, Langenselbold
Inverses Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Flüssigstickstoffbehälter Arpege 140	Air Liquide, Düsseldorf

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle weiteren Gebrauchswaren und Geräte von den folgenden Firmen bezogen: Eppendorf (Hamburg), Falcon (Heidelberg), Schütt (Göttingen), Greiner (Frickenhäusen), Heinemann (Duderstadt), Qiagen (Hilden), Sarstedt (Langenhagen), Siemens (Hannover)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

2.2.1.1 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1.1.1 Anzucht von Bakterien in Flüssigmedium

Für die Vorkultur wurde das Anzuchtmedium mit einer Kolonie der Stammkultur in einem 12 ml PPN-Röhrchen oder im Erlenmeyerkolben aus Duranglas bis 100 ml Volumen (Schott, Mainz), die mit 10-15 % des Nennvolumens mit Nährmedium gefüllt wurden, inokuliert. Die Menge der Vorkultur betrug maximal 5 % der Hauptkultur, die im Erlenmeyerkolben bis 1000 ml Volumen inkubiert wurde. Die Anzüchtung aller Kulturen erfolgte bei 37°C und 200 upm in einem Rundsüttelinkubator (Infors, Bottmingen-Basel). Zur Selektion wurden Ampicillin (50 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) zugegeben.

2.2.1.1.2 Trübungsmessungen

Der Wachstumsverlauf einer Kultur wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspension verfolgt. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer (Amersham Biosciences) bei 600 nm in einem Extinktionsbereich von 0-0,6. Es wurde in 1 ml Einmal-Küvetten mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm und gegen einen Leerwert mit unbeimpftem Medium gemessen.

2.2.1.1.3 Herstellung von Stammkulturen

Zur dauerhaften Erhaltung von Kulturen wurde 1 ml einer Zellsuspension nach Wachstum über Nacht 5 min bei 6000 upm in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert und mit 1 ml TM/Glycerol homogenisiert.

TM/Glycerol: 10 mM Tris-HCl pH7,4; 10 mM MgSO₄; 50 % Glycerol

Die Lagerung erfolgte bei -70°C . Bei Bedarf wurden die Bakterienstämme auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert und eine Kolonie davon zum Animpfen einer Flüssigkultur verwendet.

2.2.1.1.4 Elektrokompente Zellen

Für die Präparation von elektrokompenten Zellen wurden *E. coli* TG1 und *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Zellen wurden auf einer selektiven Minimalagarplatte bzw. LB-Agarplatte mit $12,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ Tetracylin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von einer Einzelkolonie wurde eine 25 ml Vorkultur angesetzt und über Nacht bei 200 upm und 37°C geschüttelt. Die 250 ml enthaltende Hauptkultur wurde mit der Vorkultur beimpft und unter gleichen Bedingungen bis zur mid log-Phase (OD_{600} von $0,8-1,0$) inkubiert. Die Zellen wurden in einer Sorvall CL6B-Kühlzentrifuge mit GSA-Rotor (DuPont, Bad Homburg) bei 4°C 10 min bei 6000 upm abzentrifugiert. Mit vorgekühlten Puffern (4°C) wurden die Zellen mehrfach gewaschen und jeweils in folgenden Volumina resuspendiert: $1 \times 1\text{ Vol } 10\% \text{ Glycerin in dH}_2\text{O}$; $1 \times \frac{1}{2} \text{ Vol } 10\% \text{ Glycerin in dH}_2\text{O}$; $1 \times \frac{1}{20} \text{ Vol } 10\% \text{ Glycerin in dH}_2\text{O}$

Das Bakterienpellets wurde $\frac{1}{500}$ bis $\frac{1}{1000}$ des ursprünglichen Volumens resuspendiert. Die Zellen wurden in $90\text{ }\mu\text{l}$ Aliquots in $1,5\text{ ml}$ Eppendorfreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.1.1.5 Elektrotransformation

Zur Elektrotransformation von Plasmid-DNA wurden $40\text{ }\mu\text{l}$ der elektrokompenten Zellen (auf Eis aufgetaut) mit $1,5\text{ }\mu\text{l}$ eines Ligationsansatzes oder 10 ng DNA (bei einer Retransformation) versetzt. Dieser Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette pipettiert, mit einem Deckel verschlossen in das Elektrotransformationsgerät („*E. coli* Pulser“, BIORAD Laboratories GmbH München) gesteckt und mit einem Strompuls von $2,5\text{ kV}$, $25\text{ }\mu\text{F}$ und $200\text{ }\Omega$ versetzt. Die Pulsdauer lag zwischen $4,0$ und $4,9\text{ ms}$. Unmittelbar nach dem Strompuls wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) aufgenommen, in ein PPN-Röhrchen überführt und $15-30\text{ min}$ bei 37°C und 200 upm inkubiert. $20\text{ }\mu\text{l}$ nach einer Retransformation, $20\text{ }\mu\text{l}$ und $200\text{ }\mu\text{l}$ bei einem Ligationsansatz wurden auf einer selektiven LB-Agarplatte mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.1.2.1 Subkultivierung von Monolayerkulturen

Adhärenente Zelllinien wachsen als Monolayer auf dem Boden der Kulturflasche. Die Anheftung ist für ihre Proliferation notwendig. Die meisten Zelllinien, die von Geweben abstammen (mit Ausnahme von Blutzellen), sind adhärenent wachsende Zellen. Wenn die Kulturflasche von den Zellen vollständig eingenommen wurde, so wachsen strikt adhärenente Zellen mit Ausnahme von Tumorzellen nicht mehr weiter. Dies führt zur Abnahme der Proliferation und kann zum Absterben der Zellen führen. Deshalb ist es notwendig die Zellen zu „passagieren“, d.h. die Zellen von der Kulturflasche zu lösen und unter Verdünnung in eine neue zu überführen. Für die Kultivierung werden dem Medium 10% FCS zugesetzt. Die genaue Zusammensetzung des Serums ist nicht bekannt, aber es enthält Wachstums- und Anheftungsfaktoren, die für das Überleben der Zellen notwendig sind.

2.2.1.2.2 Passagieren der Zellen mit Trypsin-EDTA

Das Teilen der Zellen erfolgte, wenn die Zellen zu 80-90% konfluent den Boden der Kulturflasche bewachsen haben. Nach Absaugen des Mediums wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Nach dem Absaugen des PBS wurden bei einer Wachstumsfläche von 175 cm² 3 ml Trypsinlösung aufgebracht. Die Zellen lösten sich während der Inkubation 1 min (NIH3T3) oder 3 min (HeLa) bei 37°C von dem Plastikboden der Kulturflasche ab und wurden mit komplettem Medium (20 ml) aufgenommen und in ein Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (2000 x g, 5 min) sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 20-30 ml komplettem Medium resuspendiert. Die Zelldichte wurde bestimmt, indem die Zellen in einem 100 µl Aliquot mit einem elektronischen Zellzählgerät gezählt wurden. Die Zellen wurden dann in der gewünschten Dichte in eine neue Kulturflasche zur Weiterkultivierung oder in einer Kultur-Platte mit sechs Vertiefungen für weiterführende Versuche ausgesät.

Bei empfindlichen Zelllinien oder zum Ablösen der Zellen aus einer Kulturplatte wurde Accutase laut Protokoll verwendet, welches im Gegensatz zu Trypsin bei längeren Inkubationszeiten nicht zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen führen kann.

PBS-Puffer: 140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 8,0 mM Na HPO₄; 1,5 mM KH PO₄

Trypsin-EDTA-Lösung: 0.05% Trypsin; 0.02% EDTA in PBS

2.2.1.2.3 Auftauen und Einfrieren von adhärennten Zellen

Zelllinien werden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gelagert. Zum Revitalisieren der Zellen wird das Einfrierröhrchen nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter sofort in Methanol getaucht, um mögliche Kontaminationen mit Mycoplasmen zu vermeiden. Das darauffolgende Auftauen erfolgt bei 37°C. Die Zellsuspension wird anschließend steril in die 75 cm² Kulturflasche mit auf 37°C vorgewärmten kompletten Medium gegeben und bis zum Erreichen von 80-90% konfluentem Wachstum kultiviert. Nach dem Anheften der Zellen wird das Medium gewechselt, um Reste von DMSO zu entfernen.

Zur Gefrierkonservierung von adhärennten Zellen wurden diese wie oben beschrieben mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in einer Dichte von $1-3 \times 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert und in 1,8 ml Kryoröhrchen aliquotiert. Damit die Zellen möglichst langsam einfrieren, wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und in einem Styroporkarton bei -70°C über Nacht eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: Medium (DMEM für NIH3T3 und MEM für HeLa)
20% FCS; 10 % DMSO

2.2.1.2.4 Transiente Transfektion von Eukaryonten

Als Transfektion bezeichnet man die Einführung von Makromolekülen in lebende, höhere eukaryontische Zellen. Bei der transienten Transfektion mit Plasmid-DNA kann diese in Zellen exprimiert und das Genprodukt enzymatisch oder immunologisch nach 2 Tagen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden NIH3T3 und HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA transfiziert.

Transfektion der Zellen durch Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Aufnahme von Fremd-DNA in Zellen durch eine kurzzeitige reversible Permeabilisierung der Zellmembran mittels einer angelegten Hochspannung ermöglicht. Folgende Elektroporationsbedingungen für HeLa-Zellen wurden angewendet:

Elektroporationsgerät:

EASYJECT II (Eurogentec): Kapazität: 1350 µF; Spannung: 240 V

Ableitungswiderstand: 156 Ω; Widerstand vor Impuls: 20-40 Ω

Effektive Pulsdauer: 10-40 msec; DNA-Menge: 25 µg in 50 µl H₂O

Zell-Anzahl: 1×10^6 in 500 µl MEM-Medium

Es wurden 4-5 Glasplättchen (10 mm Durchmesser) in eine Gewebekulturschale, die 6 Vertiefungen (pro Vertiefung 10 cm² Wachstumsfläche) enthielt, gelegt und mindestens 30 min unter UV-Bestrahlung sterilisiert. In die Kulturplatte wurde pro Vertiefung 2 ml komplettes Medium vorgelegt. Für die Elektroporation wurden die Zellen in einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml im MEM-Medium resuspendiert. 500 µl dieser Zellsuspension wurden in eine Elektroporationsküvette (Eurogentec) überführt. Die Plasmid-DNA (25 µg in 50 µl H₂O) wurde in die gleiche Küvette gegeben, gemischt und die Elektroporation gestartet. Die Zellen wurden sofort in 1 ml kompletten Medium aufgenommen und in die Kulturplatte überführt und für 24 h im CO₂-Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch frisches MEM-Medium ersetzt. Und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Schließlich erfolgte die Detektion des Genproduktes durch indirekte Immunfluoreszenz.

Transfektion mittels Lipofektion

3×10^5 Zellen wurden pro Vertiefung in einer Kulturplatte mit Glasplättchen (siehe Elektroporation) ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und jede Vertiefung mit 2 ml frischen Komplettmedium gefüllt. Für die transiente Transfektion von HeLa-Zellen wurde 4 µg Plasmid-DNA mit 100 µl MEM ohne Serum gemischt und zu 10 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) ebenfalls in 100 µl MEM ohne Serum gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die entstehende Lipid-DNA-Komplex Bildung wurde durch die Zugabe von 600 µl MEM mit Serum gestoppt. Diese Suspension wurde dann tropfenweise auf die HeLa-Zellen verteilt. Nach 24-48 h Inkubation bei 37°C erfolgte die Detektion der Genexpression durch indirekte Immunfluoreszenz. Für die transiente Transfektion von NIH3T3 Zellen wurden 1,5 µg Plasmid-DNA mit 100 µl DMEM ohne Serum und 7,5 µl Polyfect (Qiagen, Hilden) gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei der Transfektion von HeLa-Zellen.

2.2.1.2.5 Stabile Transfektion von NIH3T3 Zellen

Bei der stabilen Transfektion wird durch das Einsetzen eines Selektionsdruckes erreicht, dass die transfizierte DNA stabil in das Genom integriert wird.

Zunächst wurde wie oben beschrieben eine transiente Transfektion mit NruI linearisiertem Plasmid durchgeführt. Statt der Detektion nach 48 h wurden die Zellen abgelöst und von einer Vertiefung auf 6 Vertiefungen verdünnt. Dem Komplettmedium

wurde 500 µg/ml Hygromycin B zugesetzt und alle 3-4 Tage das Medium mit Hygromycin B gewechselt. Nachdem zunächst die meisten Zellen abgestorben waren, konnte man nach 2 Wochen einzelne Klone erkennen. Zum Vereinzeln dieser Klone wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Pipettenspitze abgeschabt und aufgesaugt und in eine Gewebekulturplatte mit 24 Vertiefungen überführt. Nach konfluentem Wachstum wurde sie in eine Kulturplatte mit 6 Vertiefungen überführt. Schließlich wurden die Klone in eine 75 cm² Gewebekulturflasche und später in eine 175 cm² Kulturflasche überführt und Gefrierkulturen angelegt. Um zu kontrollieren, ob die kultivierten Klone tatsächlich das gewünschte Gen exprimieren, wurde sowohl ein Western Blot als auch eine Detektion der Expression durch Immunfluoreszenz durchgeführt.

2.2.1.2.6 Immunfluoreszenz-Detektion

Die Genexpression nach Transfektion wurde durch Immunfluoreszenz detektiert. Hierzu wurden entsprechende Primärantikörper verwendet, die direkt an ein Fluorochrom gekoppelt waren. Oder die Fluoreszenz wurde durch einen mit einem Fluorochrom gekoppeltem Sekundärantikörper nachgewiesen.

Zur Detektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend folgte eine Fixierung für 15 min bei RT mit Paraformaldehyd (3 % Paraformaldehyd in PBS). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min mit Triton-X 100 (0,5 % Triton-X 100 in PBS) behandelt und nach einem erneuten Waschschrift unspezifische Antikörperbindung durch 15 min Inkubation einer Blocklösung unterbunden. Die Primärantikörperinkubation erfolgte danach für eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer. Falls notwendig wurde nach erneutem Waschen mit PBS mit dem Sekundärantikörper unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, im DAPI-Einbettungsmedium auf einem Objektträger eingebettet und mit Nagellack versiegelt. Die Visualisierung erfolgte dann mit den Fluoreszenzmikroskop.

Blocklösung: 3 % BSA in PBS

Primärantikörper:

Maus-anti-Myc (9E10) 1:500 in PBS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Maus-Anti-Myc-Cy3 1:100 in PBS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
Maus-anti-FLAG M2-FITC 1:100 in PBS	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen

Sekundärantikörper:

Ziege-anti-Maus-Cy3 1:250 in PBS	Dianova GmbH, Hamburg
DAPI-Einbettungsmedium Vectashield	Linaris

2.2.2 DNA- Standardtechniken**2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mittels UV-Spektroskopie bestimmt. Bei 260 nm wurde die UV-Absorption in einem Spektralphotometer gemessen und daraus die Konzentration berechnet.

dsDNA:	$OD_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$
ssDNA:	$OD_{260} = 1$ entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$
Oligonukleotid:	$OD_{260} = 1$ entspricht 33 $\mu\text{g/ml}$
RNA:	$OD_{260} = 1$ entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$

Aus dem Quotienten der Absorption der Probe bei 260 nm und 280 nm lässt sich auf die Reinheit der Probe schließen. Reine DNA besitzt einen Quotienten von $OD_{260}/OD_{280} = 1,8:1$.

2.2.2.2 Restriktionsenzymatische Spaltung von Plasmiden:

200 ng für analytische Zwecke und bis 10 μg für präparative Zwecke wurden in einem 10 μl bzw. in einem 100 μl Ansatz mit 1-10 U Enzym gespalten. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 1 h bis über Nacht (je nach Enzym) in dem enzyspezifischen mitgelieferten Puffer. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und bei einem präparativen Ansatz das entsprechende Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und mit Qiaex II (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers eluiert.

2.2.2.3 Partielle restriktionsenzymatische Spaltung von Plasmiden

Wenn bei einer restriktionsenzymatischen Spaltung eine zusätzliche Schnittstelle von dem genutzten Enzym vorhanden ist, so muss ein Ansatz gewählt werden, bei dem keine vollständige, sondern nur eine partielle Spaltung erfolgt. Es wurden 25 μg Plasmid-DNA mit 12,5 U (0,5 U/ μg DNA) des Restriktionsenzym in einem Volumen von 100 μl bei 37°C gespalten. Nach 10, 15, 20 und 30 min wurden jeweils 25 μl entnommen. 3 μl wurden davon in Auftragspuffer auf Eis gelagert und die verbliebenen

22 µl wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auf einem Agarosegel wurde schließlich kontrolliert, in welcher Probe das gewünschte Fragment vorhanden war. Dieser Ansatz wurde auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und die gewünschte Bande ausgeschnitten und mit Qiaex II eluiert.

2.2.2.4 Auffüllen von Restriktionschnittstellen mit der Klenow Polymerase

Durch die Nutzung der Klenow Polymerase ist es möglich Nucleotidüberhänge, die durch restriktionsenzymatische Spaltung entstanden sind, aufzufüllen und somit glatte Ende zu erzeugen. Für diese Reaktion wurden 5 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 50 µl gespalten und anschließend wurde durch die Zugabe von 0,3 µl 25 mM dNTPs (Qbiogene) und 3 µl Klenow Polymerase (New England Biolabs) die Auffüllreaktion für 15 min bei 25°C durchgeführt. Eine nachfolgende Inkubation von 20 min bei 75°C führt zur Inaktivierung des Enzyms.

2.2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarose wurde in einer Konzentration von 1 % in 1 x TBE-Puffer und in einer 50 ml fassenden Elektrophoresekammer eingesetzt. Die DNA wurde durch 0,5 µg/ml Ethidiumbromid im Gel auf einem UV-Transilluminator (254 nm) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde das Gel-Dokumentationssystem der Firma Bio-Rad verwendet. Auch als Laufpuffer wurden 1 x TBE verwendet.

1 x TBE-Puffer: 89 mM Tris; 2,7 mM EDTA; 89 mM Borsäure

Zum Auftragen wurden die Proben mit ¼ Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt.

DNA-Auftragspuffer: 30 % Glycerin; 10 mM Tris pH7,5; 10 mM EDTA

0,25 % Bromphenol Blau; 0,25 % Xylencyanol FF

Die Elektrophoresen wurden konstant bei 100 V durchgeführt, wobei eine 1 kb DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) als Größenmarker verwendet wurde.

2.2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dieses *in vitro*-Verfahren ermöglicht eine selektive Anreicherung eines DNA-Fragmentes unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide. Die PCR wurde zum Einfügen von neuen Restriktionsschnittstellen eingesetzt, um anschließend eine Subklonierung durchführen zu können. PCR-Ansatz für präparative Zwecke:

10 µl	10 x Taq Polymerase Puffer (Qbiogene)
1 µl	25 mM dNTPs
3 µl	5 µM Primer 1
3 µl	5 µM Primer 2
2 µl	0,1 µg/µl Plasmid-DNA
0,5 µl	5 U/µl Taq DNA-Polymerase (Qbiogene)
<u>80,5 µl</u>	dH ₂ O
100 µl	

In einem Biometra-T3 Thermoblock wurde die Reaktion nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Denaturieren	3 min 94°C	1 x
Denaturieren	1 min 94°C	} 30 x
Anlagern	1 min 56°C	
Extension	1 min 72°C	
Extension	10 min 72°C	1 x

Die Extensionszeit richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (1 min pro 1 kb) und die Anlagerungstemperatur wurde entsprechend der Beschaffenheit des Primers ausgewählt. Es wurden stets eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt. Nach der Reaktion wurden 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen und anhand eines Größenmarkers die ungefähre Größe des amplifizierten Fragmentes abgeschätzt. Zur nachfolgenden Reinigung wurde der PCR Purification Kit der Firma Qiagen laut Anweisung benutzt.

2.2.2.7 Kolonie-PCR

Zum Nachweis von positiven Klonen nach der Transformation wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

<u>1 x PCR</u>		<u>Thermozyklus:</u>
1 µl	10 x Taq Polymerase Puffer	94°C 3 min 1 x
0,08 µl	25 mM 4 dNTPs	94°C 45 s
0,3 µl	5 µM Primer 1	52°C 45 s
0,3 µl	5 µM Primer 2	72°C 2 min
0,05 µl	Taq DNA Polymerase	72°C 10 min 1 x
0,05 µl	10 mg/ml RNase A	
<u>8,22 µl</u>	dH ₂ O	
10 µl		

Mit einer Kristallspitze wurde etwas Koloniematerial abgenommen und die anhaftenden Bakterien in dem 10 µl Ansatz suspendiert. Um gleichzeitig eine Vorkultur anzusetzen, wurde die gleiche Spitze anschließend in eine 3 ml Vorkultur abgeworfen. Die Kultur wurde 8 h bis über Nacht bei 37°C geschüttelt, während mit dem 10 µl Ansatz eine PCR durchgeführt wurde. 5 µl von dem Ansatz wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen, um die positiven Klone zu identifizieren.

2.2.2.8 Dephosphorylierung von Vektor-DNA Enden

Nach der Restriktion von Vektor-DNA muß vor der Ligation eine Dephosphorylierung der geschnittenen Enden durchgeführt werden, um eine Religation und somit eine Erhöhung von falsch positiven Klonen zu vermeiden. Für diese Reaktion wurde die Shrimps Alkalische Phosphatase (Amersham) benutzt. Dazu wurden 10 U SAP zu dem gereinigten Ansatz gegeben und für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C für 45 min. Die DNA wurde über ein Agarosegel gereinigt.

2.2.2.9 Ligation

Die Ligation erfolgte in einem 10 µl Ansatz mit der T4 DNA Ligase und entsprechendem Puffer (NEB). Es wurden 1 µl Vektor-DNA und 7 µl Insert-DNA verwendet. Die Inkubation der Ligation erfolgte über Nacht bei 14°C oder 2-4 h bei 25°C.

2.2.2.10 Plasmidpräparation im analytischen Maßstab (TELT)

Dieses Verfahren wurde angewendet, um Plasmid-DNA nach einer Transformation zu isolieren und durch eine anschließende restriktionsenzymatische Spaltung die Klone auf ihr Insert zu überprüfen. Für die Plasmidpräparation wurden 1,5 ml Kultur (nach 8 h bis über Nacht-Kultur) 5 min bei 6000 upm in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 300 µl TELT Puffer und 15 µl Lysozym-Lösung resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

TELT Puffer: 50mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0; 3,2 M LiCl
0,5% Triton X-100

Lysozym-Lösung: 10 mg/ml Lysozym frisch angesetzt in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

Der Ansatz wurde 2 min bei 100°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Nach einer Zentrifugation von 10-15 min bei 14000 upm in einer Mikrozentrifuge wurde das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Durch die Extraktion mit 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) wurden DNasen (nur bei *E.coli* TG1) entfernt. Nach der Überführung der Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß wurde noch einmal mit 500 µl Chloroform extrahiert und die Oberphase mit 200 µl (0,7 vol) Isopropanol präzipitiert. Der Ansatz wurde 15 min bei 14000 upm zentrifugiert und das Pellet mit 500 µl kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen bei 37°C wurde das Pellet in 20 µl dH₂O gelöst. Um die RNA zu entfernen wurde anschließend 1 µl RNaseA (10 mg/ml) zugegeben.

2.2.2.11 Plasmidpräparation im präparativen Maßstab

Zur Isolierung größerer DNA Mengen (100-200µg) wurden 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit 5 ml Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in zwei 50 ml Plastikgefäßen (Greiner) 15 min bei 6000 upm abzentrifugiert (GSA Rotor). Für die weitere Präparation wurde der Midi-Kit der Firma Qiagen verwendet und das Pellet entsprechend dem Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Die gereinigte DNA wurde in TE-Puffer gelöst und in einer Konzentration von 1 µg/µl bei 4°C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

2.2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Doppelstrang-DNA basiert auf der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) und wurde mit dem Dye-Terminator-Cycle-Sequenzierung-Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. In dem Reaktionsansatz waren die Didesoxyanaloga aller vier dNTPs vorhanden. Die dNTPs sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und führen in der Reaktion zu einem vorzeitigen Kettenabbruch. Die entstehenden unterschiedlichen Abbruchfragmente werden über ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Bandenfarbmuster wird mit einem Laserstrahl abgelesen und kann mit einem Computerprogramm ausgewertet werden.

Folgender Sequenzierungsansatz und Thermozyklus wurde verwendet:

3 µl Dye Terminator Ready Mix	95°C 30 s	} 25 x
2 µl Primer (5 µM)	60°C 15 s	
0,5 µg dsDNA	60°C 4 min	
<u>4,5 µl</u> dH ₂ O		
10 µl		

Der Ansatz wurde in 80 µl dH₂O aufgenommen und mit 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) versetzt. Mit 250 µl 100 % Ethanol und 15 min 14000 upm wurde die DNA präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, in der Speed-Vac für 5 min getrocknet und in 25 µl HPLC-H₂O aufgenommen.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese wurde durch einen Mitarbeiter des Institutes durchgeführt.

2.2.3 Klonierungen

Subklonieren in den pGEM[®]-T Vektor

PCR-Produkte, die nur in sehr geringen Mengen amplifiziert werden konnten, wurden zunächst in den Vektor pGEM[®]-T (pGEM[®]-T Vector System I, Promega) eingefügt, da die Ligationseffizienz in diesem System sehr hoch ist und die Möglichkeit zur Weiterverwendung dieses PCR Produktes gewährleistet.

Die PCR Produkte, die mit der Taq DNA Polymerase (Qbiogene) amplifiziert wurden, tragen zu etwa 50 % 3'überhängende Adenine. Der Vektor ist im Polylinker mit dem Enzym EcoRV linearisiert und die entstandenen stumpfen Enden sind mit einem 5'überhängendem Tyrosin versehen. Das PCR Produkt und der Vektor können durch diese komplementären Enden ligieren.

Ligationsansatz:	Ligase Puffer (5 x)	5 µl
	pGEM [®] -T Vektor (100 ng/µl)	1 µl
	PCR Produkt	2 µl
	dH ₂ O	1 µl
	T4 DNA Ligase (Promega)	<u>1 µl</u>
		10 µl

Die Ligation wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt.

mPer1-Konstrukte:

Ein schematischer Überblick über die verwendeten Konstrukte befindet sich im Anhang (Abb.7.3 und Abb.7.4A). Ebenso ist dort eine graphische Darstellung der Plasmide pCSMT, pCSflag und pIREShyg3 zu finden.

pCSMT-mPer1: Aufgrund des Fehlens geeigneter Restriktionsschnittstellen wurden über PCR am 5'-Ende eine EcoRI Schnittstelle und am 3'-Ende eine XbaI Schnittstelle eingefügt und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCSMT Vektors kloniert. Dieses Konstrukt ist nun an 6 Myc-Epitope fusioniert und konnte mit SP6 RNA Polymerase im *in vitro* Transkription/Translations-System (Promega) eingesetzt werden. Die Amplifikation erfolgte von dem pAS2.1mPer1 Plasmid.

Primer:

5`pCSMT-mPer1 TCC GAG AAT TCA ATG AGT GGT CCC CTA GAA

3`pCSMT-mPer1 TTG ACT TCT AGA CTA GCT GGT GCT GTT TTC

pCSflagmPer1: Um die Myc-Epitope durch ein Flag-Epitop zu ersetzen, wurde unter Nutzung der Restriktionsschnittstellen HindIII und EcoRI der CMV sowie der SP6 Promotor und das Flag-Epitop aus dem pCSflag Vektor ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen im pCSMTmPer1 kloniert, wodurch nur die Epitope ausgetauscht wurden. Alle weiteren Eigenschaften entsprechen dem pCSMTmPer1.

pCSMTmPer1Frag1 - pCSMTmPer1Frag6: Allen Fragmenten von mPer1 wurden über PCR die Restriktionsschnittstellen EcoRI am 5'-Ende und StuI am 3'-Ende eingefügt und diese dann in die entsprechende Schnittstelle im pCSMT Vektor kloniert. Die Amplifikation erfolgte von dem pCSMTmPer1 Plasmid.

Primer:

Frag1: 5`pCSMT-mPer1 TCC GAG AAT TCA ATG AGT GGT CCC CTA GAA

3_Per1_1-323 AAA AGG CCT CTA GGT CAC ATA TGG GGT TAG

Frag2: 5_Per1_324-645 CCG GAA TTC AAT GAA GAT TCG GGT CTC AGA TGG A

3_Per1_324-645 AAA AGG CCT CTA TGT ACT GGG AAT GTT GCA GCT

Frag3: 5_Per1_646-972 CCG GAA TTC AAT GAC CAA GCG TAA ATG TGC CTC C

3_Per1_646-972 AAA AGG CCT CTA CAG TGG GGA GTC TGG GCG GTG

Frag4: 5_Per1_973-1291 CCG GAA TTC AAT GTT CAA CTC GAG ATG CAG CTC C

3_Per1_973-1291 AAA AGG CCT CTA GCT GGT GCT GTT TTC TTC

Frag5: 5`pCSMT-mPer1, 3_Per1_324-645

Frag6: 5_Per1_646-972, 3_Per1_973-1291

pCSflagmPer1Frag1 - pCSflagmPer1Frag6: Die Konstrukte wurden wie pCSMTmPer1Frag1 - pCSMTmPer1Frag6 entsprechend in den pCSflag Vektor kloniert.

pCSMT-GFP-mPer1Frag4a, pCSMT-GFP-mPer1Frag4b: Da sowohl mPer1Frag4a und 4b bereits eine Größe erreicht haben, die Diffusion zwischen Kern und Zytoplasma zulässt, wurden diese Fragmente in einen Vektor kloniert, der zusätzlich zu den Myc-Epitopen noch GFP enthält. Das GFP wurde in den pCSMT Vektor über die NcoI und EcoRI Schnittstellen kloniert, welches zu einem Verlust von einem Myc-Epitop führt. Den Fragmenten mPer1Frag4a und 4b wurde erneut über PCR die Restriktionsschnittstellen EcoRI am 5'-Ende und StuI am 3'-Ende der Fragmente eingefügt und diese dann in die entsprechende Schnittstelle im pCSMT-GFP Vektor kloniert.

Primer:

Frag4a: 5_Per1_973-1291

3_Per1_Frag4a AAA AGG CCT CTA CTC GGA AGA GTC GAT GCT GCC

Frag4b: 5_Per1_Frag4b CCG GAA TTC AAT GGC TGA AGC TGG GGC TGC TCG G

3_Per1_973-1291

pCSMT-mPer1Frag5mutNES1: Aus der NES-Sequenz QIHRLLQ wurden durch Punktmutationen die Leucine ausgetauscht. Für die Veränderung der Basenabfolge wurde der Quick Change Kit (Stratagene) mit folgenden Primern verwendet:

Per1mutNES_5 GAG CTC TCA GAG CAG GCC CAT CGA GCG CTG AAG CAG CCT GTG CAC AGC

Per1mutNES_3 GCT GTG CAC AGG CTG CTT CAG CGC TCG ATG GGC CTG CTC TGA GAG CTC

pCSMT-mPer1flmutNES1: Über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und BglII wurde das mutierte NES aus pCSMT-mPer1Frag5mutNES1 ausgeschnitten und in pCSMTmPer1 eingesetzt.

pCSMT-mPer1Frag6mutNES2: Aus der NES-Sequenz LQLNLLQL wurden durch Punktmutationen die Leucine ausgetauscht. Für die Veränderung der Basenabfolge wurde der Quick Change Kit (Stratagene) mit folgenden Primern verwendet:

5_Per1_nes2 AGA TGC AGC TCC CCA GCC CAG GCC AAT GCG GCG CAG CTT GAG GAG TCC

3_Per1_nes2 GGA CTC CTC AAG CTG CGC CGC ATT GGC CTG GGC TGG GGA GCT GCA TCT

pCSMT-mPer1mutNES2: Über eine partielle Restriktionsspaltung mit EcoRI und BglII wurde ein N-terminales Fragment aus pCSMTmPer1 ausgeschnitten und in pCSMTmPer1Frag6mutNES2 kloniert.

pCSMT-mPer1mutNES1,2: Über eine partielle Restriktionsspaltung mit EcoRI und BglII wurde ein N-terminales Fragment aus pCSMTmPer1mutNES1 ausgeschnitten und in pCSMTmPer1Frag6mutNES2 kloniert.

pCSMT-Per1flmutNLS: Aus der NLS-Sequenz **RRHHCRSKAKR** wurden durch Punktmutationen die Lysine und ein Arginin ausgetauscht. Für die Veränderung der Basenabfolge wurde der Quick Change Kit (Stratagene) mit folgenden Primern verwendet:

Per1mutNLS_5 CAC CAC TGC CGA TCT **GCA** GCA **GCG** GCT TCC CGC CAC CAC CAC

Per1mutNLS_3 GTG GTG GTG GCG GGA AGC **CGC** TGC **TGC** AGA TCG GCA GTG GTG

pCSMT-mPer1Frag6mutNLS: Aus der NLS-Sequenz wurden durch Punktmutationen die Lysine und ein Arginin ausgetauscht entsprechend dem pCSMT-Per1flmutNLS.

pGEM-T-mPerΔC(Δ4b): Dem Fragment mPerΔC wurde erneut über PCR die Restriktionsschnittstelle EcoRI am 5'-Ende und StuI am 3'-Ende der Fragmente eingefügt und diese zunächst ungerichtet in den pGEM-T Vektor kloniert.

Primer: 5`pCSMT-mPer1, 3_Per1_Frag4a

pCSMT-mPerΔC(Δ4b): Über die Nutzung der eingefügten Schnittstellen im pGEM-T-mPerΔC(Δ4b) wurde das Fragment wieder aus dem pGEM-T Vektor ausgeschnitten und in den pCSMT Vektor kloniert.

pCSMT-mPerΔC(Δ4b)mutNLS: Aus der NLS-Sequenz wurden durch Punktmutationen die Lysine und ein Arginin ausgetauscht entsprechend wie im pCSMT-Per1flmutNLS.

pCSflag- mPerΔC(Δ4b): Das Fragment mPer1ΔC wurde aus pCSMTmPerΔC mit EcoRI und StuI ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen im pCSflag kloniert.

pCSflag- mPerΔC(Δ4b)mutNLS: Das Fragment mPer1ΔCmutNLS wurde aus pCSMTmPerΔCmutNLS mit EcoRI und StuI ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen im pCSflag kloniert.

Eine schematische Darstellung dieser Konstrukte befindet sich im Anhang (Abb.7.4B).

pIREShyg3mPer1, pIREShyg3mPer1ΔC, pIREShyg3mPer1ΔCmutNLS, pIREShyg3mPer1mutNES1,2: Diese Konstrukte wurden alle aus dem entsprechenden pCSMT Konstrukten unter Nutzung der HindIII und StuI Restriktionsschnittstellen ausgeschnitten. Die HindIII Schnittstelle wurde mit der Klenow Polymerase aufgefüllt und in die StuI Schnittstelle im pIREShyg3 kloniert.

pIREShyg3mPer1mutNES1,2ΔC: Der C-Terminus von pIREShyg3mPer1DC wurde mit BstXI ausgeschnitten und in die entsprechende Schnittstelle in pIREShyg3mPer1mutNES1,2 kloniert und somit wurde dessen C-Terminus ausgetauscht.

mPer2-Konstrukte:

Eine schematische Darstellung dieser Konstrukte befindet sich im Anhang (Abb.7.5A).

pCSMTmPer2: Das mPer2 Gen wurde aus dem pAS2.1mPer2 mit NcoI ausgeschnitten und in die entsprechende Restriktionsschnittstelle im pCSMT Vektor kloniert. Die Nutzung der NcoI Schnittstelle führt zu einem Verlust von einem Myc-Epitop.

pCSMTmPer2Frag1 – pCSMTmPer2Frag4: Allen Fragmenten von mPer2 wurden über PCR die Restriktionsschnittstellen NcoI am 5'-Ende und XhoI am 3'-Ende eingefügt und diese dann in die entsprechende Schnittstelle im pCSMT Vektor kloniert. Die Amplifikation erfolgte von dem pCSMTmPer2 Plasmid.

Primer:

Frag1: 5_Per2_1-314	GAC CAT GCC ATG GAT GGA TAC GTG GAC TTC
3_Per2_1-314	ATA CCG CTC GAG TTA CTC TGC CAG CAG CAG GCA
Frag2: 5_Per2_315-628	AGA CAT GCC ATG GTA CAC TCG GGC TAT GAA GCG
3_Per2_315-628	ATA CCG CTC GAG TTA GTG CAG CCC GGG GCT GAC TGT
Frag3: 5_Per2_629-942	ATA CAT GCC ATG GAT TCT GGA GAG GCA GCG CGG CCC
3_Per2_629-942	ATA CCG CTC GAG TTA CTC AGC CTG GGA GGC AGG AGT
Frag4: 5_Per2_943-1257	CAG CAT GCC ATG GAG TTC CCT AGT CGG ACC TCG
3`pCSMT-Per2	TTA AAC TCG AGA TTA CGT CTG GGC CTC TAT CCT

mPer3-Konstrukte:

Eine schematische Darstellung dieser Konstrukte befindet sich im Anhang (Abb.7.5B).

pCSMTmPer3: Über PCR wurde das mPer3 Gen aus pAS2.1mPer3 amplifiziert und am 5'-Ende und 3'-Ende eine XbaI Schnittstelle eingefügt und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCSMT Vektors kloniert. Aufgrund einer Leserahmenverschiebung musste am 5'-Ende des mPer3 Gens die XbaI Schnittstelle

erneut geschnitten mit Klenow Polymerase aufgefüllt und religiert werden, welches zu einem Verlust der XbaI Schnittstelle führte.

Primer:

5`pCSMT-mPer3 TCC GAG TCT AGA ATG GAT CCC TGT GGA GAC

3`pCSMT-mPer3 TTG ACT TCT AGA TCA ACT GGT GTC TTC TGC

pCSflagPer3: Über PCR wurde das mPer3 Gen aus pAS2.1mPer3 amplifiziert und am 5`-Ende und 3`-Ende eine XbaI Schnittstelle eingefügt und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCSMT Vektors kloniert.

pCSMT-mPer3Frag1: Über PCR wurde das Fragment aus pCSMTmPer3 amplifiziert und am 5`-Ende StuI und am 3`-Ende eine XbaI Schnittstelle eingefügt und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCSMT Vektors kloniert.

Primer:

5_Per3_Frag1 AAA AGG CCT ATG GAT CCC TGT GGA GAC CCG

3_Per3_Frag1 GCT CTA GAG CTC TCA AAA CAC ACA TCC TGG AGT GTG

pCSMT-mPer3Frag2 und pCSMT-mPer3Frag4: Beiden Fragmenten von mPer3 wurden über PCR die Restriktionsschnittstellen EcoRI am 5`-Ende und StuI am 3`-Ende eingefügt und diese dann in die entsprechende Schnittstelle im pCSMT Vektor kloniert. Die Amplifikation erfolgte von dem pCSMTmPer3 Plasmid.

Primer:

5_Per3_Frag2 CGG AAT TCC ATG CTT GAA GTA GAT GAA AGA GCA GTG

3_Per3_Frag2 AAA AGG CCT TCA TGT GCA GGA GAT GCA CTT TCT

5_Per3_Frag4 CGG AAT TCC ATG TTG ATG ACC ATC TTC CTG CAC

3_Per3_Frag4 AAA AGG CCT TCA ACT GGT GTC TTC TGC TGG

pCSMT-mPer3Frag3: Über PCR wurde das Fragment aus pCSMTmPer3 amplifiziert und am 5`-Ende EcoRI und am 3`-Ende eine XbaI Schnittstelle eingefügt und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCSMT Vektors kloniert.

Primer:

5_Per3_Frag3 CGG AAT TCC ATG AAC ACA TCT TCA TCC TCA GAA

3_Per3_Frag3 GCT CTA GAG CTC TCA AGT ATC CAC GTA AGC GGA GGG

pCSMT-mPer3Frag3mutNLS, pCSMT-mPer3mutNLS: Aus der NLS-Sequenz RQKHKRRKK wurden durch Punktmutationen die Lysine und ein Arginin ausgetauscht. Für die Veränderung der Basenabfolge wurde der Quick Change Kit (Stratagene) mit folgenden Primern verwendet:

Primer:

Per3mutNLS_5 GAG AGG CAG AAG CAC **GCA GCA** AAG **GCG** TTG CCA GCA CCT
GTG

Per3mutNLS_3 CAC AGG TGC TGG CAA **CGC** CTT **TGC TGC** GTG CTT CTG CCT CTC

Cryptochrome- Konstrukte

pCSMTmCry1: Über PCR wurde das mCry1 Gen aus pAS2.1mCry1 amplifiziert und am 5'-Ende eine EcoRI und am 3'-Ende eine XbaI Schnittstelle eingefügt und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCSMT Vektors kloniert.

Primer:

5`pCSMT-mCry1 TAA TAG AAT TCA ATG GGG GTG AAC GCC GTG

3`pCSMT-mCry1 TTG ACT TCT AGA TCA GTT ACT GCT CTG CCG

pCSflagmCry1: Entsprechend dem pCSflagmPer1 wurde die Myc-Epitope aus pCSMTmCry1 mit dem Flag-Epitop ausgetauscht.

pCSMTmCry2: Über PCR wurde das mCry2 Gen aus pAS2.1mCry2 amplifiziert und am 5'-Ende eine NcoI und am 3'-Ende eine XbaI Schnittstelle eingefügt und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCSMT Vektors kloniert. Die Nutzung der NcoI Schnittstelle führt zu einem Verlust von einem Myc-Epitop.

Primer:

5`pCSMT-mCry2 ATA ATT ACC ATG GCG GCG GCT GCT GTG GCA

3`pCSMT-mCry2 TTG ACT TCT AGA TCA GGA GTC CTT GCT TGC

pGEM-TmCry2: Über PCR wurde das mCry2 Gen aus pCSMTmCry2 amplifiziert und die Restriktionsschnittstelle XbaI am 5'-Ende und 3'-Ende eingefügt und zunächst ungerichtet in den pGEM-T Vektor kloniert.

5`Cry2-XbaI CAT ATT CTA GAC ATG GCG GCG GCT GCT GTG

3`pCSMT-mCry2 TTG ACT TCT AGA TCA GGA GTC CTT GCT TGC

pCSflagmCry2: Über die Nutzung der eingefügten Schnittstellen im pGEM-T-mCry2 wurde mCry2 wieder aus dem pGEM-T Vektor ausgeschnitten und in den pCSMT Vektor kloniert.

2.2.4 RNA-Standardtechniken

2.2.4.1 Präparation von RNA aus *Xenopus leavis* Oozyten

Zur Isolation von gesamter RNA wurden 5 Oozyten in Extraktionspuffer mit einer blauen Pipettenspitze und einer 5 ml Spritze mit verschiedenen Kanülen (Durchmesser 0,8-0,2 mm) homogenisiert und für 45 min bei 45°C inkubiert. Anschließend wurde 3 x eine Extraktion mit ungepuffertem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol durchgeführt.

Um Phenolreste zu entfernen, folgte eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion. Mit gleichem Volumen 8M LiCl wurde die RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 14000 upm wurde das nicht getrocknete Pellet in 100 μl DEPC- H_2O aufgenommen und erneut durch die Zugabe von 10 μl 10 M Ammoniumacetat und 250 μl 100 % Ethanol für 30 min bei -20°C gefällt. Es folgte eine Zentrifugation von 30 min bei 14000 upm. Nach einem Waschschriff mit 70 % Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 40 μl DEPC- H_2O aufgenommen. Zur Entfernung genomischer und mitochondrialer DNA wurde die Probe mit DNase I behandelt, die schließlich über eine Säule nach dem RNeasy clean up Protokoll (Qiagen) erneut aufgereinigt wurde. Aus 5 Oozyten konnten etwa 20 mg total RNA gewonnen werden.

DEPC- H_2O : 0,1 % Diethylpyrocarbonat in dH_2O , Inkubation 4-12 h bei 37°C und autoklavieren 20 min bei 121°C

Extraktionspuffer: 5 ml 2 x Präparationspuffer; 4 ml DEPC- H_2O ; 2 ml Proteinase K (Roche)

2 x Präparationspuffer: 1 % SDS; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM NaCl

10 x DNase Puffer: 400 mM Tris-HCl pH 8,0, 60 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 in DEPC- H_2O

DNase I Behandlung: 40 μl RNA, 5 μl 10x DNase Puffer; 20 μl 20 mM DTT; 1 μl RNasin (Promega); 1,5 μl DNase I (Roche)

2.2.4.2 RNA-Präparation aus Fibroblasten

Die NIH3T3 Zellen wurden direkt in die Vertiefungen einer Gewebekulturplatte durch die Zugabe von 600 μl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) mit β -Mercaptoethanol lysiert, in ein Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C gelagert. Nach dem Auftauen für 10 min bei 37°C wurden die Zellen mit dem Qiasredder (Qiagen) durch eine Zentrifugation von 2 min bei 13000 upm zerstört und weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem RNeasy Mini Protokoll (Qiagen). Zur Entfernung genomischer DNA wurde zusätzlich eine Inkubation von 45 min bei 32°C mit DNaseI in entsprechendem Puffer (Qiagen) auf der Säule durchgeführt. Nach der Elution mit 30 μl RNase-freiem dH_2O wurde die gereinigte RNA in 10 μl Aliquots bei -70°C gelagert.

2.2.4.3 Semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Zur reversen Transkription von RNA wurden bis auf den RNase Inhibitor alle Komponenten von Applied Biosystems genutzt:

RT-Reaktion:

2 µl 10×PCR-Puffer II

4 µl 25 mM MgCl₂

2 µl 10 mM dATP

2 µl 10 mM dCTP

2 µl 10 mM dGTP

2 µl 10 mM dTTP

1 µl RNase Out (40 U/µl)

1 µl Random Hexamers (50 µM)

1 µl Reverse Transkriptase (50 U/µl)

3 µl RNA (100ng/µl)

20µl

PCR-Reaktion:

8,0 µl 10×PCR-Puffer II

2,0 µl 25 mM MgCl₂ (Endkonz. 1.5 mM)

1,0 µl 15 µM vorwärts Primer

1,0 µl 15 µM rückwärts Primer

0,5 µl 5 U/µl *Taq*-Polymerase (Qbiogene)

67,5 µl dH₂O

100 µl

Nach Mischen des Ansatzes erfolgte die RT-Reaktion im T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen): 10 min 25°C, 30 min 42°C, 5 min 99°C

Für die PCR-Reaktion wurden anschließend die Komponenten, die unter PCR-Reaktion beschrieben sind, noch hinzugefügt. Die PCR wurde wie unter 2.2.2.6 beschrieben durchgeführt. Um zu kontrollieren, dass keine DNA-Kontaminationen vorhanden waren, wurden Reaktionen ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

2.2.4.4 Quantitative Reverse Transkription mittels real-time PCR

Zur Analyse von Genexpressionen durch real-time PCR wurden alle Komponenten von der Firma Bio-Rad Laboratories, München verwendet.

Zur reversen Transkription wurde der iscript cDNA Synthese Kit mit folgendem Ansatz verwendet:

4 µl 5x iscript Mix

1 µl Reverse Transkriptase

5 µl RNA (100 ng/µl)

10 µl RNase-freies dH₂O

20 µl

Nach Mischen des Ansatzes erfolgte die RT-Reaktion im T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen). 15 min 25°C, 30 min 42°C, 5 min 85°C

2 µl der cDNA wurde in die folgende PCR-Reaktion eingesetzt

4,4 µl	5x Iqycler Sybr Green Supermix
0,44 µl	15 µM vorwärts Primer
0,44 µl	15 µM rückwärts Primer
<u>14,72 µl</u>	HPLC-H ₂ O
22 µl	

Nach Mischen des Ansatzes erfolgte die PCR im Iqycler:

95°C 3min	
95°C 15s	} 40x (in diesem Schritt erfolgte die Fluoreszenzmessung)
60°C 15s	
72°C 30s	
95°C 15s	
55-95°C	Schmelzkurvenanalyse

Durch die Schmelzkurven wurde kontrolliert, ob tatsächlich nur ein spezifisches Produkt gebildet wurde. Ebenso wie bei der semiquantitativen Methode wurde eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Um die absolute Kopienzahl zu ermitteln, wurde eine Standardkurve von 1×10^6 - 1×10^2 Kopien genutzt. Für die Standardkurve wurde Plasmid-DNA mit dem zu amplifizierenden Genabschnitt linearisiert und aus der DNA-Konzentration die Kopienzahl berechnet. Die weitere Auswertung erfolgte durch die für das Gerät vorhandene Software.

Linearisierung: 5 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl); 5 µl NEB-Puffer 2; 1 µl NcoI;
39 µl dH₂O

Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C erfolgte die Reinigung der DNA mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden).

Alle Konstrukte für die Standardkurven wurden in den pGEM-T easy Vektor (Promega) kloniert. Für die Amplifikation wurden die gleichen Primer genutzt, die auch für die Expressionanalyse verwendet wurden. G6PDH und DBP wurden von der cDNA aus NIH3T3 Fibroblasten und alle weiteren Gene von den entsprechenden pCSMT Konstrukten amplifiziert.

2.2.5 Protein-Standardtechniken

2.2.5.1 *In vitro* Transkription und Translation (T_NT)

Das T_NT Coupled Reticulocyte Lysate System der Firma Promega ermöglicht die Transkription und Translation in einem Ansatz. Durch die Verwendung von radioaktiv markierten Aminosäuren läßt sich das entstehende Protein gleichzeitig radioaktiv markieren.

<u>Ansatz:</u>	T_NT Retikulozytenlysat	12,5 μ l
	T_NT Reaktionspuffer	1 μ l
	RNasin (40 U/ μ l)	0,5 μ l
	Aminosäurenmix ohne Methionin	0,5 μ l
	Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l)	0,5 μ l
	SP6 Polymerase	1 μ l
	35 S-Methionin (10 μ Ci/ml)	2 μ l
	dH ₂ O	<u>7 μl</u>
		25 μ l

Die Inkubation erfolgte 2 h bei 30°C. Anschließend wurde 1 μ l des Ansatzes abgenommen, mit 10 μ l SDS-Auftragspuffer versetzt und eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt, um die Translationseffizienz zu überprüfen. Die Proben wurden bei –20°C gelagert. Zur Translation von mehreren Genen für Protein-Protein Interaktionsstudien (siehe Kap. 2.2.5.3) wurden die Plasmid-DNAs entsprechend ihrer Translationseffizienz gemischt und in einem Ansatz translatiert.

2.2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der unterschiedlichen Proteine wurde eine SDS-PAGE nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden 6% oder 8%-ige SDS-Gele benutzt, wobei das Trenngel und das Sammelgel wie folgt zusammengesetzt waren:

<u>Trenngel:</u>	0,375 M Tris, pH 8,8	<u>Sammelgel:</u>	0,125 M Tris, pH 6,8
	0,1 % SDS		0,1 % SDS
	6 oder 8 % Acrylamid		3,4 % Acrylamid

Durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED fand die Polymerisation statt.

Die Proben wurden mit SDS-Auftragspuffer versetzt und vor dem Auftragen 5 min aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 37 mA in 1 x Laemmli-Laufpuffer.

SDS-Auftragspuffer:

10 % SDS	4 ml
Glycerol	2 ml
1 M Tris, pH6,8	1,2 ml
0,1 % Bromphenolblau	1 ml
ad dH ₂ O auf	10 ml

10 x Laemmli-Laufpuffer:

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
ad dH ₂ O	auf 1 l

Nach der Auftrennung wurden die radioaktiven Gele direkt auf Whatman-Papier transferiert, mit Frischhaltefolie bedeckt und unter Vakuum bei 70°C auf dem Gelrockner (Bio-Rad) getrocknet. Die Exposition erfolgte mit einem Phosphorimager Screen (Amersham Biosciences).

Nicht radioaktive Gele wurden 15 min in Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend die unspezifische Färbung mit 10 % Essigsäure und 35 % Methanol wieder herausgewaschen. Die Trocknung dieser Gele erfolgte im Gelrockner der Firma Bio-Rad nach deren Anweisung.

2.2.5.3 Nachweis von Protein-Protein Interaktionen

Die Interaktion von Proteinen kann über eine Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden, wobei ein Protein über einen an eine Matrix gekoppelten spezifischen Antikörper gebunden und sein Bindungspartner durch direkte Interaktion mit immunopräzipitiert wird. Für die Präparation von Immunopellets wurden 15 µl Gammabind Sepharose (Amersham) pro Pellet 4 x mit NET-2 Puffer gewaschen und dann mit 1 µl Myc-Antikörperlösung (Sigma) pro Pellet (0,5 µl Flag M2-Antikörper (Sigma)) 2 h bei Raumtemperatur in NET-2 Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Pellets erneut 4 x mit NET-2 gewaschen und bei 4°C gelagert.

NET-2: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05% NP-40

Für die Bindungsreaktion wurde 2 µl der *in vitro* translatierten Proteine (siehe Kap. 2.2.5.1) zu 500 µl NET-2 Puffer gegeben und 1 h bei 4°C rotiert. Zur Entfernung unspezifischer Bindung wurde anschließend 4 x mit 700 µl NET-2 Puffer gewaschen.

Nach der Zugabe von 12 µl 2 x SDS-Auftragspuffer wurden die Proben 5 min auf 95°C erhitzt und über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

2.2.5.4 Expression und Reinigung von His-Tag Proteinen

Zur Expression und Reinigung von His-Tag Proteinen wurde das System „The QIAexpressionist“ der Firma Qiagen verwendet. Die Expression von Rna1p wurde in dem *E. coli*-Stamm SG13009 durchgeführt.

Eine Hauptkultur (300 ml LB mit 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin) wurde mit 10 ml Vorkultur beimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} = 0,8 inkubiert. Dann erfolgte eine Induktion mit 1 mM IPTG für 4 h bei 30°C. Vor und nach der Induktion wurden jeweils 500 µl Medium abgenommen, 5 min bei 6000 upm in der Mikrozentrifuge abzentrifugiert und das Pellet in 40 µl SDS-Auftragspuffer aufgenommen. 10 µl davon wurden zur Überprüfung des Expressionslevels auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen.

Nach der Induktion wurden die Zellen in 100 ml Aliquots 15 min bei 6000 upm in der Sorvall CL6B Zentrifuge mit dem GSA Rotor abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml (pro 100 ml Kultur) Resuspensionspuffer homogenisiert und bei –20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen auf Eis wird das Pellet mit 1 mg/ml Lysozym, welches frisch in einer Konzentration von 10 mg/ml angesetzt wurde, 30 min auf Eis inkubiert. Die Sonifikation erfolgte mit dem Branson Sonifier 450 in 15 ml Falcon Röhrchen bei einem Puls von 60 und einer Leistung von 3 (30 s sonifizieren, 30 s kühlen) auf mit Ethanol versetztem Eis bis die Probe durchscheinend war. Die Suspension wurde anschließend in PPN-Röhrchen überführt und 30 min bei 10000 upm in der Sorvall CL6B mit dem SS34 Rotor zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde 500 µl 4,1 M Ammoniumsulfat tropfenweise hinzugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand auf 2 ml 50 % Ni-NTA Agarose (Qiagen) gegeben, die zuvor 3x mit Ni-NTA Waschpuffer mit 10 mM Imidazol gewaschen wurde. Der Ansatz wurde 1 h bei 4 °C rotiert.

Nach der Bindung wurde die Agarose 8x mit Ni-NTA Waschpuffer mit 30 mM Imidazol gewaschen und in die Säule (Poly-Prep® Chromatography Column 0,8 x 4 cm, Bio-Rad) geschlemmt. Die Elution erfolgte in einem Gradienten von 500 µl 0,1-0,5 M Imidazol in Ni-NTA Waschpuffer. Jeweils 5 µl Eluat wurden für eine SDS-PAGE und eine Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) abgenommen. Die

Eluate wurden umdialysiert mit Centricon 30 (Millipore) in Ran Storage Puffer. Die Lagerung des Proteins erfolgte bei -70°C .

Resuspensionspuffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM NaCl;
10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin; 1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin; 1 μM Pepstatin

Ni-NTA Waschpuffer: 50 mM NaH_2PO_4 ; 300 mM NaCl; pH 8,0

Umdialysieren und Konzentrieren von Proteinen

Nach der Reinigung von Proteinen müssen diese in einen anderen Puffer überführt werden, der für die Lagerung und die Injektion in Oozyten geeignet ist. Mit dem Centricon System der Firma Millipore wurden die Proteine umdialysiert. Das Eluat wurde auf die Membran des Centricon Gefäßes gegeben und mit 1,5 ml Ran Storage Puffer 1 h bei 6000 upm in der Sorvall CL6B mit dem SS34 Rotor zentrifugiert. Es wurde 4 x 1,5 ml Puffer zugegeben. Anschließend wurden die Proteine in 10 x 50 μl Aliquots bei -70°C eingefroren.

Um eine Aggregatbildung der Proteine bei hohen Konzentrationen zu vermeiden, wurden diese erst direkt vor dem Gebrauch mit den Microcon 30 (Millipore) auf die gewünschte Konzentration eingeeengt. Anschließend wurde 1 μl abgenommen und in einer Proteinbestimmung nach Bradford gemessen.

Ran Storage Puffer: 50 mM HEPES, pH 7,6; 100 mM NaCl; 2 mM MgCl_2
0,5 mM EDTA; 1 mM DTT

2.2.5.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode eignet sich zur schnellen Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen (Protein Methods, 1996). Zunächst wurde eine Eichkurve mit 1 mg/ml BSA als Standard angefertigt. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe von 0-20 μg BSA mit einer jeweiligen Erhöhung um 2,5 μg Protein angefertigt. Das BSA wurde mit dem entsprechenden Puffer verdünnt, indem sich auch die zu bestimmende Probe befindet. Zu diesen Ansätzen wurde jeweils 1 ml Bradford Reagenz zugegeben und die Extinktion in einem Spektralphotometer bei 595 nm nach 2 min bis 1 h gemessen. Aus der Eichkurve konnte dann die Konzentration der Probe errechnet werden. Alle Messungen wurden immer in einer Doppelbestimmung durchgeführt.

Bradford Stammlösung: 100 ml 95 % Ethanol; 200 ml 88 % Phosphorsäure
350 mg Coomassie G250

Bradford Reagenz: 425 ml dH₂O; 15 ml 95 % Ethanol; 30 ml 88 % Phosphorsäure; 30 ml Bradford Stammlösung

2.2.5.6 Western Blot

Nach einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können die Proteine aus dem Gel auf eine positiv geladene Membran transferiert werden, um ein bestimmtes Protein spezifisch durch einen Antikörper nachzuweisen. Bei der verwendeten „Semi-Dry“-Methode wurde ein Schnellblot-Gerät der Firma Biometra (Göttingen) verwendet. Sowohl die Nitrocellulosemembran (0,45µm, BA85; Schleicher & Schuell) als auch die Filterpapiere (Whatman) wurden in Transferpuffer getränkt. Der Western Blot wurde im „Sandwich“-Verfahren aufgebaut, d.h. zwischen jeweils 3 Lagen Filterpapier wurden die Membran und das Gel luftblasenfrei platziert, wobei die Membran auf der Seite der Anode und das Gel auf die Seite der Kathode gelegt wurde. Der Transfer wurde für 1-2 h bei 150 mA durchgeführt. Als Proteinmarker wurde der vorgefärbte Dual Color Precision Standard (Bio-Rad, München) mitgeführt, der neben der Proteingröße auch den erfolgten Transfer anzeigt. Unspezifische Proteinbindung wurde durch eine über Nacht Inkubation bei 4°C auf einer Wippe in Blockierungspuffer unterbunden. Der erste Antikörper (Kaninchen-anti-Myc-Antikörper, Verdünnung 1:750 in Blockierungspuffer) wurde für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde durch 3 mal waschen mit TBS/Tween für 10 min entfernt. Die zweite Antikörper-Inkubation (Ziege anti-Kaninchen-HRP 1:10000 in Blockierungspuffer) wurde ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einem erneuten Waschschrift wurde mit ECL plus (Amersham Bioscience) detektiert. 5 ml Lösung A wurde 1:40 mit Lösung B vermischt und für 5 min auf dem Blot inkubiert. Überschüssige Lösung wurde durch ein Tuch abgesaugt, die Membran in einen Plastikbeutel eingeschweißt und für 1 min auf einem Hyperfilm (Amersham Bioscience) exponiert. Entwickelt wurde der Film schließlich im Röntgenfilmentwicklungsgerät Optimax Typ TR (MS-Laborgeräte, Wiesloch).

Transferpuffer: 39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,037% SDS; 20% Methanol

TBS/Tween: 20 mM Tris/HCl (pH6,8); 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20

Blockierungspuffer: 20 mM Tris/HCl (pH6,8); 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20;
5 % Milchpulver

2.2.6 Mikroinjektion in *Xenopus* Oozyten und deren Aufarbeitung

2.2.6.1 Präparation von Oozyten

Die Oozyten wurden durch eine partielle Ovariectomie gewonnen (Terns and Goldfarb, 1998). Zunächst wurde das *Xenopus* Weibchen mit 0,15 % Tricaine (3-Aminobenzoessäureethylester) in Leitungswasser narkotisiert bis das Tier sich nicht mehr bewegt (ca. 15 min). Der Frosch wurde mit dem Rücken auf Eis gelegt, um den Stoffwechsel des Tieres zu senken. In die Oberhaut des Abdomen über einem der Hinterbeine wurde auf einer Seite ein kleiner 0,5 cm langer Schnitt gemacht. Ebenso wurde die darunter liegende Muskelschicht durchtrennt. Mit Pinzetten wurden einige der Ovarienlobi herausgezogen und mit einer Schere abgetrennt. Die Muskelschicht wurde anschließend mit 2 Stichen und die Oberhaut mit 3 Stichen zugenäht. Als Nahtmaterial wurde Katzendarm verwendet. Der Frosch wurde zum Aufwachen und zur Überwachung über Nacht in 0,6 %-iger NaCl-Lösung gehalten, bevor das Weibchen wieder in das Aquarium zurückgesetzt wurde. Nach 6 Monaten ist mit einer Regeneration des Ovars zu rechnen.

2.2.6.2 Kollagenasebehandlung der Oozyten

Um die Oozyten zu vereinzeln und um die Follikelzellen zu entfernen, wurde eine Kollagenasebehandlung durchgeführt. In einer 1 mg/ml Kollagenase (Type 1A, Sigma) enthaltenden Pufferlösung wurden die Oozyten 2 h bei Raumtemperatur bei 33 upm rotiert.

Kollagenase-Puffer: 82,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 1 mM MgCl₂
5 mM HEPES, pH 7,5; 1 mg/ml Kollagenase

Eine zu lange Kollagenasebehandlung kann zu einer Herabsetzung der Lebensfähigkeit und zu einer Verringerung der Proteinsynthese führen. Um die Kollagenase zu entfernen, wurden die Oozyten 3 x mit 1 x MBSH gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese dann bei 18°C in einer Petrischale gehalten.

5 x MBSH: 440 mM NaCl; 12 mM NaHCO₃; 5 mM KCl; 50 mM HEPES, pH 7,6;
4,1 mM MgSO₄; 2,05 mM CaCl₂; 3,3 mM KNO₃

Für die Mikroinjektionen wurden Oozyten des Stadiums V und des Stadiums VI ausgesucht. Bei der Entwicklung der Oozyten wurden sechs verschiedene Stadien definiert (Dumont, 1972), die sich in der Größe und der äußeren Färbung unterscheiden.

Die Oozyten des Stadiums V sind 1000 bis 1200 μm groß und weisen eine animale Hemisphäre (braun oder schwarz) und eine vegetale Hemisphäre (weiß oder gelblich) auf, die deutlich voneinander abgetrennt sind. Die Oozyten des Stadiums VI werden bis 1300 μm groß und weisen zusätzlich zu den getrennten Hemisphären noch ein weißes äquatoriales Band auf.

2.2.6.3 Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Mikroinjektion wurde mit einem entsprechenden Gerät der Firma Eppendorf durchgeführt. Die Injektionsnadeln wurden aus Glaskapillaren mit einem 1 mm Durchmesser mit einem Nadelpuller der Firma Leitz gezogen und die Spitze unter dem Binokular abgebrochen, so daß eine Öffnung von etwa 10 μm entstand. Mit einem Microloader der Firma Eppendorf wurden die Nadeln von der Rückseite beladen und in den Mikromanipulator eingeschraubt.

Die Oozyten wurden auf ein GazeNetz in eine kleine Petrischale mit 1 x MBSH gelegt und für zytoplasmatische Injektionen mit der vegetalen Seite nach oben angeordnet. Für Injektionen in den Zellkern wurden die Oozyten mit der animalen Hälfte nach oben gelegt, da sich der Kern direkt unter dem animalen Pol befindet.

Die Mikroinjektion wurde mit einem Haltedruck von 8-15 hPa und einem Injektionsdruck von 300-1500 hPa durchgeführt. In das Zytoplasma wurden pro Oozyte 30 nl injiziert, während in den Kern nur etwa 10 nl injiziert wurden. Um sicherzustellen, daß auch wirklich in den Kern injiziert wurde, enthielt der Injektionsmix bei RNA-Injektionen 2 μl 100 mg/ml Dextran Blau, welches den Kern blau färbt und auch noch nach 24 h dort sichtbar ist. Bei Proteininjektionen wird der Kern durch die Anwesenheit von Retikulozytenlysat rot gefärbt und diese Färbung ist auch noch nach 24 h sichtbar und ermöglicht so zwischen Injektionen in den Zellkern oder in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten zu unterscheiden.

2.2.6.4 Kern-Zytoplasma-Trennung

Direkt nach der Injektion wurde eine t_0 -Wert-Bestimmung durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die Probe auch vollständig in dem richtigen Kompartiment der Zelle befindet. Nach der Injektion von Proteinen wurden für jeden Zeitpunkt 10 Oozyten gesammelt. Die Kerne wurden manuell vom Zytoplasma getrennt und aufgearbeitet. Während der Inkubationsphase wurden die Oozyten in der Injektionsschale bei 18°C aufbewahrt.

2.2.6.5 Immunopräzipitation

Die injizierten Proteine wurden über ihren Myc-Tag mit dem Myc-Antikörper (9E10) oder über ihren Flag-Tag mit dem Flag-Antikörper (M2) der Firma Sigma in einer Immunopräzipitation nachgewiesen.

Nach der Kern-Zytoplasma-Trennung wurden Kerne und Zytoplasmen in 500 µl NET-2 mit einer blauen Pipettenspitze homogenisiert und 5 min bei 14000 upm in der Mikrozentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein Immunopellet (siehe Kap. 2.2.5.3) gegeben und 1 h bei 4°C rotiert. Nach der Inkubation wurde das Pellet 3 x mit 700 µl NET-2 gewaschen, der überschüssige Puffer vollständig entfernt und durch 10 µl 2 x SDS-Auftragspuffer ersetzt.

Die Proben wurden 5 min bei 100°C gekocht, 1 min zentrifugiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.2.6.6 Dephosphorylierung von immunopräzipitierten Proteinen

Phosphorylierungen von Proteinen führen zu einer Erhöhung des Molekulargewichts, welches sich je nach Anzahl der Phosphorylierungen in einem veränderten Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel zeigen kann. Um diesen Effekt zu verhindern, wurde vor der Beladung des Gels eine Dephosphorylierung der Proteine durchgeführt. Zu dem gewaschenen Immunopellet (40 µl) wurde 5 µl 10x Lambda Phosphatase Puffer, 5 µl 20 mM MnCl₂ und 0,5 µl (200U) Lambda Protein Phosphatase (New England Biolabs) gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde sämtlicher Puffer entfernt und durch 12 µl 2x SDS-Auftragspuffer ersetzt, 5 min aufgeköcht, 1 min abzentrifugiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

3 Ergebnisse

3.1 Das nukleäre Importverhalten von Period Proteinen in *Xenopus laevis* Oozyten

Der Mechanismus zur Regulation der biologischen Uhr erfolgt über eine autoregulatorische Transkriptions-Translations-Rückkopplung, bei der zunächst eine Stimulation der Transkription der Period Gene im Zellkern erfolgt. Nach der Translation im Zytoplasma ist es für eine negative Rückkopplung notwendig, dass die Per Proteine zurück in den Zellkern transportiert werden, um dann ihre eigene Transkription zu inhibieren. Um den Transport der Period und Cryptochrom Proteine zu untersuchen, gibt es verschiedene methodische Ansätze. Die Injektion von Proteinen in das Zytoplasma oder den Zellkern von *Xenopus laevis* Oozyten bietet den Vorteil, dass nicht nur die subzelluläre Verteilung der Proteine beobachtet werden kann, sondern auch die Möglichkeit besteht, zwischen Import und Export zu unterscheiden.

3.1.1 MPer3 wird nicht in *Xenopus* Oozyten importiert, obwohl es über ein Kernlokalisationssignal (NLS) verfügt

Um zu analysieren, wie sich das Transportverhalten der einzelnen Proteine darstellt, wurden zunächst die *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten Maus Period Proteine alleine in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten injiziert und nach 3 und 6 Stunden der Transport in den Zellkern untersucht. Sowohl mPer1 als auch mPer2 werden nach zytoplasmatischer Injektion in den Zellkern transportiert, während mPer3 im Zytoplasma verbleibt (Abb.3.1). Neben dem Import von mPer1 und mPer2 ist auch zu beobachten, dass diese beiden Proteine insbesondere in der Kernfraktion ein verändertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese zeigen. Es ist bereits bekannt, dass diese Serin-reichen Proteine phosphoryliert werden können (Akashi et al., 2002; Lee et al., 2004; Toh et al., 2001). Um nachzuweisen, dass die verringerte Mobilität im Gel auf eine Phosphorylierung zurückzuführen ist, wurde eine Dephosphorylierungsreaktion durchgeführt. Nach der Immunopräzipitation wurden die an die Sepharosematrix gebundenen Proteine in einem spezifischen Phosphatasepuffer aufgenommen und mit Lambda Protein Phosphatase, die Serin, Threonin und Tyrosin Reste dephosphoryliert,

inkubiert. Diese Phosphatasebehandlung führte in der Tat zu einem einheitlichen Laufverhalten von mPer1 und mPer2. Sowohl mPer1 als auch mPer2 werden also in *Xenopus* Oozyten phosphoryliert. Mit der Phosphorylierung korreliert auch die Stabilität dieser Proteine. MPer3 zeigt über die Zeit kaum eine Veränderung in der Proteinmenge, während bei mPer1 und mPer2 mit gesteigerter Phosphorylierung auch der Proteinabbau zunimmt. 24 Stunden nach der Injektion ist mPer2 komplett und mPer1 zum größten Teil degradiert, während mPer3 weiterhin stabil bleibt (Abb.3.1 linker Teil). Ebenso wie der Proteinabbau korreliert auch die Importfähigkeit mit der Phosphorylierung.

Abb.3.1 MPer3 wird in *Xenopus* Oozyten nicht in den Zellkern importiert.

Alle drei Period Proteine wurden an 6 Myc-Epitope fusioniert und durch *in vitro* Transkription und Translation mit ^{35}S markiert. Diese Fusionsproteine wurden in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten injiziert. Sofort, oder 3, 6 bzw. 24 Stunden nach der Injektion wurden von jeweils 10 Oozyten die Zellkerne und die Zytoplasmen manuell getrennt, die Per Proteine über eine Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper aufgereinigt und auf einem 6 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach zytoplasmatischer Injektion wurden mPer1 und mPer2 in den Zellkern importiert, während mPer3 im Zytoplasma verbleibt. Um die Phosphorylierung zu analysieren, wurden die Immunopräzipitate mit Lambda Protein Phosphatase (λPPase) behandelt. MPer1 und mPer2 werden in *Xenopus* Oozyten phosphoryliert.

Um Kernlokalisierungssignale in Period Proteinen zu identifizieren, wurden 6 Myc-Epitope (bei mPer2 durch die Nutzung der NcoI Schnittstelle nur 5 Myc-Epitope) mit verschiedenen Fragmenten von mPer1, mPer2 und von mPer3 fusioniert (Abb.3.2A). Diese *in vitro* translatierten und radioaktiv markierten Proteine wurden ebenfalls in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten injiziert und nach 6 Stunden der Transport in den Zellkern analysiert (Abb.3.2B). Die Fragmente 3 und 4 von mPer1 werden in den Zellkern importiert, während die Fragmente 1 und 2 im Zytoplasma verbleiben. Neben dem basischen Kernlokalisierungssignal in mPer1 Frag 3 konnte ein neues nicht-basisches NLS in mPer1 Frag 4 gefunden werden. Durch eine weitere Teilung des

Fragmentes 4 in mPer1 Frag 4a und mPer1 Frag 4b konnte das Kernlokalisierungssignal weiter auf einen Bereich von 186 Aminosäuren eingegrenzt werden. In diesem Bereich befindet sich kein klassisches basisches Motiv für ein Kernlokalisierungssignal. Die Fragmente mPer1 Frag 4a und mPer1 Frag 4b wurden zusätzlich zum Myc-Epitop noch an GFP fusioniert, um die kritische Größe für passive Diffusion in den Zellkern nicht zu unterschreiten.

Ebenso wie das Fragment 3 von mPer1 wird auch mPer2 Frag 3 nach zytoplasmatischer Injektion in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten transportiert. Das Fragment 1 von mPer2 wurde wie das entsprechende Fragment von mPer1 nicht importiert. Über das Fragment 2 konnte keine Aussage getroffen werden, da das Protein in Oozyten instabil ist und bereits nach 6 Stunden nicht mehr nachweisbar war. Nach der Injektion von mPer2 Frag 4 in das Zytoplasma konnte nach 6 Stunden ein schwaches Signal im Zellkern detektiert werden, doch im Vergleich zu dem entsprechenden Fragment von mPer1 (mPer1 Frag 4) ist die Effizienz sehr gering (vgl. Abb.3.9). MPer3 Frag 4 zeigt keinen sichtbaren Import, während man nach Injektion von mPer3 Frag 1 einen schwachen Transport in den Zellkern findet. Doch im Vergleich zu mPer1 Frag 4 ist das detektierte Signal im Zellkern von mPer3 Frag 1 nur minimal (vgl. Abb.3.9). Interessanterweise wurde mPer3 Frag 3 ebenso wie mPer1 Frag 3 und mPer2 Frag 3 in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten transportiert, obwohl das Wildtyp mPer3 Protein nicht importiert wurde.

Es konnte also für mPer1 ein zusätzliches Kernlokalisierungssignal am C-Terminus definiert werden. Ebenso besitzen alle Period Proteine ein basisches NLS, das aber in mPer3 Wildtyp Protein keine Aktivität in *Xenopus* Oozyten zeigt.

Abb.3.2 Obwohl mPer3 Wildtyp nicht in *Xenopus* Oozyten importiert wird, enthält es ein basisches Kernlokalisierungssignal.

(A) In einer graphischen Darstellung sind die injizierten Fragmente und deren Importfähigkeit dargestellt. Alle Konstrukte wurden an 6 Myc-Epitope fusioniert. MPer1 Frag 4a und mPer1 Frag 4b enthalten zusätzlich noch GFP, um passive Diffusion zu unterbinden. In Rot sind die Positionen der Kernlokalisierungssignale dargestellt, dabei ist das NLS2, das nur in mPer1 vorhanden ist, fett gedruckt. (B) Das Fragment 3 von allen drei Period Proteinen wird in *Xenopus* Oozyten importiert. Zusätzlich definieren die 186 C-terminalen Aminosäuren in mPer1 ein zweites Kernlokalisierungssignal (mPer1 Frag 4b). Die *in vitro* translatierten und ³⁵S markierten Proteine wurden in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten injiziert und deren Import nach 6 Stunden Inkubation bei 18°C analysiert. Die injizierten Proteine wurden aus den Zellkernen und Zytoplasmen von jeweils 10 Oozyten durch eine Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper aufgereinigt und über ein 10 % SDS-Gel aufgetrennt. Die Aminosäuren der injizierten Fragmente sind in Klammern angegeben. (Importeffizienzen: mPer1 Frag 1: 0,5 %, mPer1 Frag 2: 0,2 %, mPer1 Frag 3: 28 %, mPer1 Frag 4: 31 %, mPer1 Frag 4a: 3 %, mPer1 Frag 4b: 29 %, mPer2 Frag 1: 1 %, mPer2 Frag 2: nicht stabil (n.d.), mPer2 Frag 3: 47 %, mPer2 Frag 4: 8 %, mPer3 Frag 1: 6 %, mPer3 Frag 2: 0,7 %, mPer3 Frag 3: 37 %, mPer3 Frag 4: 7 %)

3.1.2 Für den Import von mPer3 in *Xenopus laevis* Oozyten wird eine Komplexbildung mit mPer1 benötigt

Aus *Drosophila* ist bereits bekannt, dass eine Heterodimerisierung von Period mit Timeless notwendig ist, um einen Transport in den Zellkern zu ermöglichen (Saez and Young, 1996). Möglicherweise könnte also eine Komplexbildung von mPer3 mit weiteren am circadianen Rhythmus beteiligten Proteinen zu einem Import von mPer3 in *Xenopus* Oozyten führen. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst ein Bindungsexperiment durchgeführt. An ein Flag-Epitop fusioniertes mPer3 wurde mit myc-mPer1, myc-mPer2, myc-mPer3 oder myc-mPer1mutNLSΔC (eine detaillierte Beschreibung dieses Proteins erfolgt in Kap. 3.1.3) im Retikulozytenlysat kotranslatiert, und anschließend wurden die Proteine über den an eine Sepharosematrix gekoppelten Flag-Antikörper koimmunopräzipitiert (Abb.3.3). Alle kotranslatierten Proteine konnten einen Komplex mit flag-mPer3 bilden. Als negative Kontrolle wurden myc-mPer1,

myc-mPer2, myc-mPer3 und myc-mPer1mutNLS Δ C alleine translatiert und ebenfalls mit dem Flag-Antikörper immunopräzipitiert. Die mit Myc-Epitopen fusionierten Proteine wurden nicht durch den an Sepharose gekoppelten Flag-Antikörper immunopräzipitiert. MPer3 kann also Homodimere und sowohl mit mPer1 als auch mit mPer2 Heterodimere bilden. Für die Erzeugung von Komplexen ist es notwendig, dass die Proteine zusammen in einem Ansatz im Retikulozytensystem translatiert wurden, denn nach einer Translation in separaten Ansätzen und nachfolgender Koinkubation konnte keine Bindung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Abb.3.3 MPer3 kann sowohl Homo- als auch Heterodimere mit mPer2 und mPer3 bilden.

An 6 Myc-Epitope fusionierte mPer1, mPer2 (nur 5 Myc-Epitope), mPer3 oder mPer1mutNLS Δ C Proteine wurden mit Flag Epitop fusioniertem mPer3 *in vitro* kotranslatiert (rechter oberer Teil) und mit dem Flag Antikörper koimmunopräzipitiert (rechter unterer Teil). Als negative Kontrolle wurden myc-mPer1, myc-mPer2, myc-mPer3 und myc-mPer1mutNLS Δ C in Abwesenheit von flag-mPer3 *in vitro* translatiert (linker oberer Teil) und mit dem Flag Antikörper immunopräzipitiert (linker unterer Teil). Für den Input wurde nur die Hälfte des für die Bindungsreaktion eingesetzten Translatats auf das 6 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Weiterhin wurde analysiert, ob die PAS Domäne tatsächlich, wie bereits veröffentlicht, für die Dimerisierung verantwortlich ist (Gekakis et al., 1995; Yagita et al., 2000). Die beschriebenen an Myc fusionierten mPer1 Fragmente wurden erneut mit flag-mPer3 kotranslatiert und in diesem Experiment mit dem Myc-Antikörper koimmunopräzipitiert (Abb.3.4). Nur mPer1 Frag 5 kann von mPer3 gebunden werden; somit ist also die gesamte PAS Domäne notwendig für die Bildung von Per1 Heterodimeren mit mPer3.

Abb.3.4 Die gesamte PAS Domäne ist für die Bildung des mPer1/mPer3 Heterodimers notwendig.

(A) Die graphische Darstellung zeigt die verwendeten Fragmente und deren Bindungsfähigkeit an mPer3. In gelb ist die PAS Domäne, in Rot die Kernlokalisierungssignale von mPer1 dargestellt. Die Zahlen geben den Aminosäurebereich der entsprechenden Fragmente an. Alle Fragmente von mPer1 wurden an 6 Myc-Epitope fusioniert. (B) Nur mPer1 Frag 5 bindet an mPer3. Das an ein Flag-Epitop fusionierten mPer3 wurde mit den verschiedenen Fragmenten von mPer1 *in vitro* kotranslatiert und mit einem Myc-Antikörper koimmunopräzipitiert. Als negative Kontrolle wurde nur flag-mPer3 *in vitro* translatiert und mit dem Myc-Antikörper immunopräzipitiert. Für den Input wurde nur die Hälfte des für die Bindungsreaktion eingesetzten Translatats auf das 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Diese *in vitro* erzeugten Heterodimere wurden nun auf ihre Importfähigkeit in *Xenopus* Oozyten untersucht (Abb.3.5). MPer1 im Komplex mit mPer2 wird weiterhin in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten importiert. Ein Unterschied konnte allerdings nach der Injektion von dem mPer1/mPer3 Heterodimer in das Zytoplasma beobachtet werden. MPer3 wurde in einem Komplex mit mPer1 in den Zellkern importiert. In einem Heterodimer aus mPer2 und mPer3 wurde mPer3 hingegen nicht in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten importiert, während ein Transport von mPer2 weiterhin stattfinden

konnte. Betrachtet man diese Injektionen ohne Lambda Protein Phosphatase-Behandlung, so werden sowohl mPer1 und mPer2 genauso wie nach alleiniger Injektion in *Xenopus* Oozyten phosphoryliert. Interessanterweise ist nach der Injektion von mPer3 mit mPer1 eine schwache zusätzliche Bande oberhalb von mPer3 in der Zytoplasmafraktion und eine unscharfe Bande in der Kernfraktion zu beobachten, die nur ohne eine Behandlung mit Lambda Protein Phosphatase sichtbar ist (Abb.3.5 linker Teil). Dieses Resultat könnte ein Hinweis darauf sein, dass mPer3 im Heterodimer mit mPer1 phosphoryliert werden kann.

Abb.3.5 MPer3 wird nur im Komplex mit mPer1 in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten importiert. MPer1 und mPer2 können weiterhin importiert werden, während mPer2 den Transport von mPer3 in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten nicht vermitteln kann. Die mit 6 (5 bei mPer2) Myc-Epitopen versehenen *in vitro* kotranslatierten und ^{35}S markierten Period Proteine wurden in den beschriebenen Kombinationen in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten injiziert und sofort oder nach 3 bzw. 6 Stunden Inkubation bei 18°C über eine Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper aufgereinigt. Vor der Auftrennung auf einem 6 % SDS-Gel wurde bei den Analysen +λPPase eine Dephosphorylierung mit Lambda Protein Phosphatase durchgeführt.

3.1.3 Das Kernlokalisierungssignal in mPer1 ist für den Import des mPer1/mPer3 Heterodimers in *Xenopus* Oozyten notwendig

Um zu analysieren, ob das Kernlokalisierungssignal aus mPer1 für den Import des Heterodimers mit mPer3 benötigt wird, oder ob alternativ eine Maskierung des NLS im mPer3 Wildtyp Protein im Heterodimer mit mPer1 aufgehoben wird, wurden Importdefiziente Mutanten von mPer1 und mPer3 konstruiert.

Zur Mutation des ersten Kernlokalisierungssignals in mPer1 wurden drei basische Aminosäuren (zwei Lysine und ein Arginin) in Alanine umgewandelt. Nach zyto-

plasmatischer Injektion dieses Konstruktes (mPer1mutNLS1 oder mPer1Frag6mutNLS) konnte nur eine geringe Reduktion des Importes beobachtet werden, während die C-terminale Deletion des zweiten Kernlokalisationsignales in mPer1 (mPer1 Δ C) zu einer stärkeren, wenn auch nicht kompletten Inhibition des Importes führt (Abb.3.6). Nach 6 Stunden konnte weiterhin ein Transport in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten festgestellt werden. Erst die Inaktivierung beider Kernlokalisationsignale in mPer1 führte zu einem vollständigen Verlust der Importfähigkeit. Im Vergleich zum mPer1 Wildtyp Protein wird mPer1 Frag 6 sogar noch effizienter in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten transportiert.

Abb.3.6 MPer1mutNLS Δ C wird nicht mehr in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten importiert.

Die Mutation von NLS1 in mPer1mutNLS1 bzw. mPer1Frag 6mutNLS1 und NLS2 in mPer1 Δ C führt nur zu einer Reduktion des Importes, nicht aber zu einer vollständigen Blockade. Die in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten injizierten an 6 Myc-Epitope fusionierten Proteine sind schematisch gezeigt. In Rot sind die Kernlokalisationsignale in mPer1 dargestellt. Die Zahlen geben den Aminosäurebereich der Proteine an. Im mutierten NLS1 wurden 3 basische Aminosäuren durch Alanine ersetzt (RRHHCRSKAKRSR). Sofort, oder nach 3 bzw. 6 Stunden Inkubation bei 18°C erfolgte die Aufreinigung der Proteine aus dem Zellkern und Zytoplasma über eine Immunopräzipitation mit dem Myc Antikörper und die Auftrennung über ein 6 % SDS-Gel (bei mPer1 Frag6 und mPer1 Frag6mutNLS1 ein 8% SDS-Gel). Alle injizierten Proteine wurden durch Lambda Protein Phosphatase dephosphoryliert (Importeffizienzen: mPer1: 3 h 31 % 6 h 33 %; mPer1mutNLS1: 3 h 14 %, 6 h 10 %; mPer1 Δ C: 3 h 3 %, 6 h 17 %; mPer1mutNLS Δ C: 3 h 1 %, 6 h 0.7 %; mPer1 Frag 6: 3 h 42 %, 6 h 43 %; mPer1 Frag 6 mutNLS1: 3 h 10 % 6 h 15 %).

Ebenso wie für mPer1 wurden auch in mPer3 drei basische Aminosäuren des Kernlokalisationsignals gegen Alaninen ausgetauscht. Da das mPer3 Wildtyp Protein nicht in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten importiert werden kann, wurde nur das Fragment 3 mit ebenfalls entsprechend verändertem NLS auf seine Transportfähigkeit

hin überprüft (Abb.3.7). Nach zytoplasmatischer Injektion von mPer3 Frag 3mutNLS wurde der Import im Vergleich zum Transport von mPer3 Frag3 sehr stark inhibiert.

Abb.3.7 MPer3 Frag3mutNLS wird in *Xenopus* Oozyten nicht mehr importiert.

Eine schematische Darstellung zeigt die an Myc fusionierten in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten injizierten Fragmente von mPer3. Die Zahlen zeigen den verwendeten Aminosäurenbereich von mPer3 an. In Rot ist das Kernlokalisationsignal markiert. In mPer3 Frag 3mutNLS wurden 3 basische Aminosäuren zu Alaninen mutiert (KHKRKK). Der Import von mPer3 Frag 3 und mPer3 Frag 3mutNLS wurde nach 3 und 6 Stunden Inkubation bei 18°C untersucht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper durch eine 10 % SDS-Gelelektrophorese.

Diese Import-defizienten Mutanten wurden mit mPer1 bzw. mPer3 Wildtyp kotranslatiert, um Heterodimere zu bilden. Wurde mPer1 im Komplex mit mPer3mutNLS in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten injiziert, so konnte dieser Komplex weiterhin in den Zellkern importiert werden (Abb.3.8).

Interessanterweise scheint mPer3mutNLS nicht im Komplex mit mPer1 phosphoryliert zu werden. Das Kernlokalisationsignal in mPer3 wird also nicht für den Import des mPer1/mPer3 Heterodimers gebraucht. In einem Komplex mit der Import-defizienten Mutante mPer1mutNLSΔC kann mPer3 nicht in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten transportiert werden. MPer3 kann zwar mit diesem Protein einen Heterodimer bilden (siehe Abb.3.3) und wird scheinbar auch in diesem Komplex phosphoryliert. Jedoch führt dies nicht zu einer Demaskierung oder Aktivierung des Kernlokalisationssignals in mPer3. Für den Import des Heterodimers aus mPer1 und mPer3 sind also ausschließlich die Kernlokalisationssignale in mPer1 notwendig.

Abb.3.8 Der Import von mPer3 wird über die Kernlokalisierungssignale von mPer1 vermittelt.

Trotz der Mutation des Kernlokalisierungssignals in mPer3mutNLS erfolgt weiterhin der Transport in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten im Komplex mit mPer1. Nach der Deletion der Kernlokalisierungssignale von mPer1 (myc-mPer1mutNLSΔC) wird mPer3 nicht mehr importiert. In mPer3mutNLS wurden 3 basische Aminosäuren zu Alaninen mutiert (KHKRKK). In mPer1mutNLSΔC wurde das NLS1 durch den Austausch von 3 basischen Aminosäuren mutiert (RRHHCRSKAKRSR) und das NLS2 am C-Terminus deletiert. Nach zytoplasmatischer Injektion wurde der Import nach 6 und 24 Stunden Inkubation bei 18°C untersucht. Myc-mPer1 koinjiziert mit myc-mPer3mutNLS wurden über eine Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper aufgereinigt. Myc-mPer1mutNLSΔC und flag-mPer3 wurden als Heterodimere in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten injiziert und über eine Immunopräzipitation sowohl mit dem Myc- als auch mit dem Flag-Antikörper aufgereinigt. Vor der Auftrennung auf einem 6 % SDS-Gel wurde bei den entsprechend markierten Proteinen eine Behandlung mit Lambda Protein Phosphatase durchgeführt.

3.2 Das nukleäre Importverhalten von Period Proteinen in HeLa Zellen

3.2.1 Auch in HeLa Zellen wird mPer3 nicht importiert, obwohl es ein Kernlokalisierungssignal besitzt

Es hat sich gezeigt, dass sich das Transportverhalten von Proteinen aus der biologischen Uhr in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich darstellt (siehe Einleitung). Um zu analysieren, ob die beobachteten Resultate nur spezifisch für *Xenopus* Oozyten sind, oder ob sie auch in anderen Zellsystemen gültig sind, wurden Transfektionen in HeLa Zellen durchgeführt.

Wie auch in dem Oozytensystem zu beobachten war, wurden nur mPer1 und mPer2 in den Zellkern von HeLa Zellen importiert, während mPer3 im Zytoplasma verbleibt (Abb.3.9). Allerdings findet man mPer1 in HeLa Zellen ausschließlich im Zellkern lokalisiert, während mPer2 in beiden Kompartimenten gefunden werden konnte. Zwar

zeigen über die Hälfte der transfizierten Zellen eine ausschließlich nukleäre oder nukleäre und zytoplasmatische Färbung, aber in etwa ein Drittel der transfizierten HeLa Zellen konnte auch eine vorwiegende zytoplasmatische Lokalisation beobachtet werden (für eine exakte Quantifizierung vgl. Abb.3.10). MPer3 hingegen wurde nur im Zytoplasma gefunden.

Das Fragment 3, welches in allen drei Period Proteinen ein basisches Kernlokalisierungssignal enthält, wurde sowohl für mPer1 als auch für mPer2 und mPer3 in den Zellkern transportiert. Auch nach der Transfektion von Fragment 4 stellt sich ein vergleichbares Bild zu den Resultaten aus den zytoplasmatischen Injektionen in *Xenopus* Oozyten dar. MPer1 Frag 4 ist ausschließlich im Zellkern von HeLa Zellen lokalisiert, während nach der Transfektion von mPer3 Frag 4 nur eine zytoplasmatische Lokalisation beobachtet wurde. Ebenso wie in *Xenopus* Oozyten wurde mPer2 Frag 4 in HeLa Zellen schwach importiert. Dieses C-terminale Fragment von mPer2 war nach Transfektion in beiden Kompartimenten lokalisiert. Vergleicht man mPer2 Frag 4 und mPer1 Frag 4 miteinander, so ist jedoch zu erkennen, dass das C-terminale Fragment von mPer1 eine wesentlich höhere Importaktivität besitzt als das entsprechende Fragment von mPer2. Die Transfektionen von mPer1 Frag 4a und mPer1 Frag 4b zeigen weiterhin, dass die 186 Aminosäuren am C-Terminus von mPer1 für die nukleäre Lokalisation nicht nur in *Xenopus* Oozyten, sondern auch in HeLa Zellen ausreichend sind.

Abb.3.9 Auch in HeLa Zellen wird mPer3 nicht importiert, obwohl es ein basisches Kernlokalisierungssignal besitzt.

(A) In einer graphischen Darstellung sind die transfizierten Fragmente und deren Lokalisation dargestellt. Alle Konstrukte wurden an 6 Myc-Epitope fusioniert. MPer1 Frag 4a und mPer1 Frag 4b enthalten zusätzlich noch GFP, um passive Diffusion zu unterbinden. In Rot sind die Positionen der Kernlokalisierungssignale dargestellt, dabei ist das NLS2, das nur in mPer1 vorhanden ist, fett gedruckt. (B) Das Fragment 3 von allen drei Period Proteinen wird in HeLa Zellen importiert. Zusätzlich definieren die 186 C-terminalen Aminosäuren in mPer1 ein zweites Kernlokalisierungssignal (mPer1 Frag 4b). Die beschriebenen Fragmente wurden mittels Lipofektion in HeLa Zellen transfiziert und nach 24 Stunden deren subzelluläre Lokalisation über den an den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelten Myc-Antikörper (rot) nachgewiesen. Durch die DAPI (blau) Färbung wurden die Zellkerne dargestellt.

Neben der Überprüfung der Kernlokalisationselemente der einzelnen Period Proteine wurde in HeLa Zellen auch der Import von Heterodimeren in diesem System überprüft. Nach der Transfektion von flag-mPer1 und myc-mPer2 werden beide Proteine in den Zellkern importiert. Im Vergleich zu der Transfektion von mPer1 wurde mPer2 nicht ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Abb.3.10). Mit 47 % der transfizierten Zellen zeigt die größte Anzahl eine ausschließlich nukleäre Lokalisation von mPer2, aber in 34 % der transfizierten Zellen ist mPer2 auch nur im Zytoplasma vorhanden. Eine zytoplasmatische und nukleäre Anfärbung konnte in 19 % der transfizierten Zellen beobachtet werden.

Bei der Kotransfektion dieser beiden Proteine wurde eine nukleäre Lokalisation bestätigt. Werden hingegen myc-mPer2 und flag-mPer3 zusammen transfiziert, so findet man eine differentielle Lokalisation vor. Myc-mPer2 wurde in den Zellkern von HeLa Zellen importiert, während flag-mPer3 im Zytoplasma verbleibt. Nach einer Kotransfektion von myc-mPer3 und flag-mPer1 wurden sowohl flag-mPer1 als auch myc-mPer3 in den Zellkern importiert, während mPer3 alleine im Zytoplasma lokalisiert ist. Wurde hingegen myc-mPer3 mit der Import-defizienten Mutante flag-mPer1mutNLSΔC kotransfiziert, so wurde mPer3 nicht mehr in den Zellkern transportiert. Der Komplex aus mPer3 und mPer1mutNLSΔC verbleibt im Zytoplasma der transfizierten HeLa Zelle.

Ebenso wie in *Xenopus* Oozyten ist also mPer1 für die Lokalisation von mPer3 im Zellkern der HeLa Zellen erforderlich. Ein Import von mPer3 findet nur im Heterodimer mit mPer1 statt.

Abb.3.10 In HeLa Zellen wird mPer3 im Heterodimer mit mPer1 im Zellkern lokalisiert.

Mittels Lipofektion wurden die genannten Konstrukte (ko)-transfiziert. MPer2 zeigte in 34 % eine zytoplasmatische, zu 19% eine nukleäre und zytoplasmatische und zu 47 % eine ausschließlich nukleäre Verteilung. Die subzelluläre Verteilung in HeLa Zellen wurde bei an Myc fusionierten Proteinen durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem myc-Cy3 Antikörper (rot) nachgewiesen. Die an Flag fusionierten Proteine wurden durch Nutzung des an FITC gekoppelten Flag-Antikörper (grün) dargestellt. Durch die Verwendung von DAPI (blau) werden die Zellkerne der HeLa Zellen gezeigt.

3.3 Das nukleäre Exportverhalten von Period Proteinen in *Xenopus laevis* Oozyten

3.3.1 Alle drei Period Proteine werden in *Xenopus* Oozyten exportiert

Für die Aufrechterhaltung des circadianen Rhythmus ist es natürlich notwendig, dass nach dem Kernimport von Period Proteinen und der daraus folgenden Inhibition der eigenen Transkription die negative Rückkopplung wieder ausgeschaltet wird, damit die Transkription erneut beginnen kann. Neben der Phosphorylierung und sukzessiven Degradation von Period Proteinen ist möglicherweise auch der Export dieser Proteine aus dem Zellkern ein effektiver Mechanismus, um die transkriptionsinhibierende Funktion im Zellkern aufzuheben. Durch die Injektion von *in vitro* translatierten Period Proteinen in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten wurde der Export untersucht.

Für mPer1 wurde bereits ein Leucin reiches NES beschrieben (Vielhaber et al., 2001). In mPer2 konnten sogar drei Kernexportsignale gefunden werden (Yagita et al., 2002). Dass diese Signale auch in *Xenopus* Oozyten aktiv sind, zeigen die Exportanalysen. Sowohl mPer1, als auch mPer2 und mPer3 wurden nach nukleärer Injektion aus dem Zellkern in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten exportiert (Abb.3.11). Entsprechend der Analyse des Importes wurden die Injektionsexperimente sowohl mit als auch ohne Phosphatasebehandlung betrachtet. Auch nach der Injektion in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten zeigten nur mPer1 und mPer2 ein verändertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese, während mPer3 bereits in dem nicht mit Lambda Protein Phosphatase behandeltem Experiment eine scharfe Bande aufweist. Wie schon die zytoplasmatischen Injektionen gezeigt haben, befindet sich auch nach nukleärer Injektion die phosphorylierte Form von mPer1 und mPer2 verstärkt im Zellkern. Es kann möglich sein, dass entweder nur die dephosphorylierte Form von mPer1 und mPer2 exportiert wird, oder beide Proteine werden exportiert, im Zytoplasma phosphoryliert und wieder in phosphorylierter Form reimportiert, so dass die sichtbare phosphorylierte Form im Zellkern reimportierte mPer1 oder mPer2 Proteine zeigt. Da nach mPer3 Injektion keine Phosphorylierung dieses Proteins sichtbar ist, aber trotzdem ein Export stattfinden kann, scheint eine Phosphorylierung nicht generell für den Transport von Period Proteinen aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten notwendig zu sein.

Abb.3.11 Alle Period Proteine werden aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten exportiert.

Alle drei Period Proteine wurden an 6 Myc-Epitope fusioniert und durch *in vitro* Transkription und Translation mit ^{35}S markiert. Diese Fusionsproteine wurden in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten injiziert. Sofort, oder 3 bzw. 6 Stunden nach der Injektion wurden von jeweils 10 Oozyten die Zellkerne und die Zytoplasmen manuell getrennt, über eine Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper aufgereinigt und auf einen 6 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Um die Phosphorylierung zu analysieren, wurden die Immunopräzipitate mit Lambda Protein Phosphatase behandelt, bevor das SDS-Gel gestartet wurde. Auch nach nukleärer Injektion werden mPer1 und mPer2 in *Xenopus* Oozyten phosphoryliert.

Zur Erzeugung einer Export-defizienten Mutante von mPer1 wurde zunächst das bereits zuvor beschriebene Exportsignal nach deren Protokoll mutiert (Vielhaber et al., 2001). Während mPer1 Frag 5 nach nukleärer Injektion sehr effizient aus dem Zellkern transportiert wird, wird der Export des Fragmentes mit dem mutierten NES (mPer1 Frag 5 mutNES) inhibiert (Abb.3.12). Nach der Injektion von mPer1mutNES1 zeigte sich allerdings, dass dieses Konstrukt weiterhin (mit etwas geringerer Effizienz) exportiert wurde. Ebenso wurde mPer1 Frag 6 aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten exportiert. Nach der Mutation einer Leucin-reichen konservierten Sequenz in mPer1 (NES2) wurde der Transport in das Zytoplasma inhibiert (mPer1 Frag 6 mutNES). Allerdings führt die Mutation dieses Signals in dem Wildtyp kaum zu einer Verringerung des Exportes. Erst nachdem beide Exportsignale in mPer1 mutiert wurden, konnte der Transport aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten vollständig blockiert werden (mPer1mutNES1,2).

Abb.3.12 MPer1 enthält zwei Leucin- reiche Kernexportsignale.

Die in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten injizierten an 6 Myc-Epitope fusionierten Proteine sind schematisch gezeigt. In rot sind die Kernimportsignale und in grün die Kernexportsignale in mPer1 dargestellt. Die Zahlen geben den Aminosäurebereich der Proteine an. Im NES1 (IQELSEQIHRLLL) und NES2 (LQLNLLQL) wurden 3 bzw. 4 Leucine zu Alaninen mutiert. Sofort, oder nach 3 bzw. 6 Stunden Inkubation bei 18°C erfolgte die Auf

Oozyten transportiert. Wurden kleinere Fragmente injiziert, so konnte nur noch eine passive Diffusion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Abb.3.13 Rna1p im Zellkern von *Xenopus* Oozyten inhibiert den Export von mPer1 und deren Fragmenten 5 und 6.

(A) Die injizierten Proteine sind in schematischer Darstellung gezeigt. Die Kernexportsignale sind grün und die Kernimportsignale sind rot unterlegt. Die Zahlen geben den Aminosäurebereich der an 6 Myc-Epitope fusionierten Proteine an. (B) Sowohl der Export von mPer1 als auch von mPer1 Frag 5 und mPer1 Frag 6 wird durch die Koinjektion von Rna1p inhibiert. Die *in vitro* translatierten und ^{35}S markierten Proteine mPer1, mPer1 Frag 5 und mPer1 Frag 6 wurden ohne (linker Teil) oder mit $1\ \mu\text{M}$ Rna1p (rechter Teil) in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten injiziert. Sofort, oder nach 3 bzw. 6 Stunden Inkubation bei $18\ ^\circ\text{C}$ wurden Zellkern und Zytoplasma von jeweils 10 Oozyten manuell getrennt und über eine Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper aufgearbeitet. Die Dephosphorylierung der Proteine wurde vor der Auftrennung über ein 8 % SDS-Gel durch eine Inkubation mit Lambda Protein Phosphatase erreicht. (Exporteffizienzen: mPer1 (-Rna1p): 3 h 42 %, 6 h 31 %; mPer1 (+Rna1p): 3 h 8 %, 6 h 5 %; mPer1 Frag 5 (-Rna1p): dieses Experiment wurde aus Abb. 3.12 eingefügt; mPer1 Frag 5 (+Rna1p): 3 h 2 %, 6 h 5 %; mPer1 Frag 6 (-Rna1p): 3 h 30 % 6 h 33 %; mPer1 Frag 6 (+Rna1p): 3 h 8 % 6 h 10 %)

3.3.2 Sowohl mCry1 als auch mCry2 benötigen eine Komplexbildung mit mPer1, um aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten transportiert zu werden

Neben den Period Proteinen sind die Cryptochrom-Proteine ebenfalls an der negativen Rückkopplung bei der Regulation der biologischen Uhr beteiligt. Sie wurden bereits in verschiedenen Zellsystemen als Kerntransport-aktive Proteine beschrieben (Kume et al., 1999; Yagita et al., 2002). Nach der Injektion von mCry1 und mCry2 in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten wurden beide Proteine in den Zellkern importiert (Abb.3.14). Die Analyse des Exportes durch die Injektionen von *in vitro* translatierten mCry1 und

mCry2 Proteinen in den Zellkern zeigte, dass diese Proteine nicht alleine in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten transportiert werden können. Sie verbleiben nach nukleärer Injektion im Zellkern.

Abb.3.14 mCry1 und mCry2 werden zwar in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten importiert, aber nicht in das Zytoplasma exportiert.

Myc-mCry1 und myc-mCry2 wurden durch *in vitro* Translation mit ^{35}S markiert und in das Zytoplasma (linker Teil) oder in den Zellkern (rechter Teil) von *Xenopus* Oozyten injiziert. Sofort, nach 6 und 24 Stunden Inkubation bei 18°C wurden die Zellkerne und Zytoplasmen über eine Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper aufgereinigt und über ein 10 % SDS-Gel aufgetrennt.

Da sich bei der Analyse des Importes von Period Proteinen gezeigt hatte, dass mPer1 als Transportadapter für den Import von mPer3 fungiert, wurde weiterhin analysiert, ob mPer1 eine ähnliche Funktion bei einem Export von mCry1 und mCry2 einnehmen könnte. Zunächst wurde in Koimmunopräzipitationsexperimenten überprüft, ob Cryptochrome auch mit mPer1 Heterodimere bilden können. Die an myc bzw. mycGFP fusionierten Konstrukte von mPer1 wurden alleine (als negative Kontrolle), mit flag-mCry1 oder mit flag-mCry2 im Retikulozytenlysat kotranslatiert und unter Nutzung des Flag-Antikörpers koimmunopräzipitiert (Abb.3.15). MPer1 bindet sowohl an mCry1 als auch an mCry2. Im Unterschied zur Heterodimerisierung mit anderen Period Proteinen ist für die Bindung an die Cryptochrome die PAS Domäne nicht notwendig, denn das C-terminale Fragment 4 von mPer1 kann ebenfalls noch an mCry1 und mCry2 binden. Interessanterweise überlappt die Bindungsdomäne genau mit den 186 Aminosäuren, die auch das zweite Kernlokalisationssignal enthalten. Neben mPer1 binden auch mPer2 und mPer3 mit ihrer C-terminalen Domäne an mCry1 und mCry2 (Akashi et al., 2002; Miyazaki et al., 2001).

Abb.3.15 Der C-Terminus von mPer1 ist für die Heterodimerisierung mit mCry1 und mCry2 notwendig.

(A) Die graphische Darstellung zeigt die verwendeten Fragmente und deren Bindungsfähigkeit an mPer3. In gelb ist die PAS Domäne, in rot die Kernimportsignale und in grün die Kernexportsignale von mPer1 dargestellt. Die Zahlen geben den Aminosäurebereich der entsprechenden Fragmente an. Alle Fragmente von mPer1 wurden an 6 Myc-Epitope fusioniert. (B) Neben mPer1 binden nur mPer1 Frag 4 und mPer1Frag 4b an mCry1 und mCry2. MPer1 Wildtyp oder die verschiedenen Fragmente von mPer1 wurden mit dem an ein Flag-Epitop fusionierten mCry1 (mittlerer Teil) und mCry2 (rechter Teil) *in vitro* kotranslatiert und mit einem Flag-Antikörper koimmunopräzipitiert. Als negative Kontrolle wurden nur mPer1 Wildtyp bzw. die mPer1 Fragmente *in vitro* translatiert und mit dem Flag-Antikörper immunopräzipitiert (linker Teil). Für den Input wurde nur die Hälfte des für die Bindungsreaktion eingesetzten Translatats auf das 8 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Zur Analyse des Exportes von Heterodimeren wurden die *in vitro* kotranslatierten Proteine als Komplex in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten injiziert (Abb.3.16). Nach einer Injektion von mCry1 oder mCry2 im Komplex mit mPer1 konnten beide Cryptochrome aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten transportiert werden. Im Heterodimer mit mPer2 konnten weder mCry1 noch mCry2 exportiert werden. Auch die

Injektion von mPer3 mit mCry1 und mCry2 in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten führt nicht zu einem Export der Cryptochrom Proteine. Nach der Injektion von mPer3 mit mCry1 und mCry2 konnte ein Teil des mPer3 Proteins bereits nach 0 Stunden, also sofort nach der Injektion, im Zytoplasma nachgewiesen werden. Dass es sich hierbei um eine fehlerhafte Injektion handelte, konnte ausgeschlossen werden, denn in diesem Fall müsste auch ein Teil von dem koinjiziertem Protein im Zytoplasma des 0 Stunden Wertes zu finden sein. Das koinjizierte Protein wurde direkt nach nukleärer Injektion nur im Zellkern detektiert.

Abb.3.16 mCry1 und mCry2 werden nur im Komplex mit mPer1 aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten transportiert.

Die angegebenen an 6 Myc-Epitope fusionierten Proteine wurden *in vitro* kotranslatiert und in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten koinjiziert. Sofort, oder nach 3 bzw. 6 Stunden (bei Injektionen mit mPer1 nach 6 und 24 Stunden) wurden die Zellkerne und Zytoplasmen getrennt über eine Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper aufgearbeitet und auf 8 % SDS-Gelen aufgetrennt. Alle Proteine wurden vor der Elektrophorese mit Lambda Protein Phosphatase behandelt.

Da die Degradationsbanden von mPer2 auf einer Höhe mit mCry1 und mCry2 im SDS-Gel laufen, wurde diese Exportanalyse mit an unterschiedliche Epitope fusionierten Proteinen verifiziert (Abb.3.17). Nach der Koinjektion von myc-mPer2 mit flag-mCry1 oder flag-mCry2 wurde mPer2 zunächst über den Myc-Antikörper aufgereinigt. Die

Überstände der Immunopräzipitationen wurden anschließend auf die Flag-gekoppelten Sepharosepellets gegeben und dadurch die Cryptochrom Proteine aus dem Homogenat gereinigt. Es konnte dadurch verifiziert werden, dass sowohl mCry1 als auch mCry2 nicht im Komplex mit mPer2 exportiert werden. mCry1 und mCry2 werden also nur als Heterodimer mit mPer1 aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten transportiert.

Abb.3.17 Sowohl mCry1 als auch mCry2 werden nicht im Komplex mit mPer2 aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten exportiert.

Myc-mPer2 wurde mit flag-mCry1 bzw. flag-mCry2 *in vitro* kotranslatiert und in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten injiziert. Sofort, nach 3 und 6 Stunden wurden die Zellkerne und Zytoplasmen von jeweils 10 Oozyten erst durch eine Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper und danach durch eine Immunopräzipitation mit dem Flag-Antikörper aufgereinigt und über ein 8 % SDS-Gel aufgetrennt. Vor der Elektrophorese erfolgte eine Lambda Protein Phosphatase Behandlung.

Wurde eine Mutante von mPer1 (mPer1 Δ C), an die mCry1 und mCry2 nicht mehr binden kann, zusammen mit den mCry Proteinen auf ihren Export hin untersucht, so zeigte sich, dass kein Transport der beiden Cryptochromen aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten stattfand (Abb.3.18). MPer1 Δ C, dem nur die Bindungsdomäne für mCry1 und mCry2 und somit auch das Kernlokalisationsignal 2 fehlte, konnte allerdings weiterhin exportiert werden. Der *in vitro* erzeugte Komplex aus der Exportdefizienten Mutante mPer1mutNES1,2 und mCry1 oder mCry2 wurde nach nukleärer Injektion ebenfalls nicht exportiert. MPer1mutNES1,2 kann allerdings wie das Wildtyp Protein einen Heterodimer mit mCry1 und mCry2 bilden (Daten nicht gezeigt).

Auch eine quantitative Auswertung des Koexportes von mCry1 und mCry2 bestätigt, dass der Export der Cryptochrom Proteine nur nach Koinjektion mit mPer1 signifikant stimuliert wird (Abb.3.18C).

Abb.3.18 Der Export und die Bindung an mPer1 ist für den Transport von mCry1 und mCry2 aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten notwendig.

(A) Die graphische Darstellung zeigt die verwendeten Fragmente und deren Bindungsfähigkeit an mPer3. In rot sind die Kernimportsignale und in grün die Kernexportsignale von mPer1 dargestellt. Die Zahlen geben den Aminosäurebereich der entsprechenden Fragmente an. Beide mPer1 Mutanten wurden an 6 Myc-Epitope fusioniert. (B) MPer1ΔC und mPer1mutNES1,2 wurden mit myc-mCry1 bzw. myc-mCry2 nach *in vitro* Kotranslation in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten injiziert und nach 3 und 6 Stunden der Export analysiert. Nach der Immunopräzipitation mit dem Myc-Antikörper und Dephosphorylierung mit Lambda Protein Phosphatase erfolgte die Auftrennung der Proteine über eine 8 % SDS-Gelelektrophorese. (C) Beide Cryptochrom Proteine werden nur mit mPer1 zusammen exportiert. Die quantitative Analyse gibt die Exporteffizienz von mCry1 und mCry2 nach Koinjektion mit mPer1 und mPer1 Mutanten, sowie mit mPer2 und mPer3 an.

3.4 Expression circadianer Gene in *Xenopus laevis* Oozyten

3.4.1 *xlPer2* und *xlClock* werden in *Xenopus* Oozyten nicht rhythmisch exprimiert

Da in Zebrafisch Oozyten eine rhythmische Expression circadianer Gene beobachtet werden konnte, wurde untersucht, ob auch in *Xenopus* Oozyten ein circadianer Rhythmus vorhanden ist (Delaunay et al., 2000). Die Oszillation endogener Proteine könnte möglicherweise einen Einfluss auf den analysierten Kern-Zytoplasma-Transport haben.

Nach der Präparation der *Xenopus* Oozyten wurden jeweils zu den angegebenen Zeitpunkten manuell einige Oozyten aus den Ovarienlobi entfernt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach der RNA Präparation wurde die Genexpression über eine nicht radioaktive semiquantitative RT-PCR ermittelt. Weder *xlPer2* noch *xlClock* zeigen in dieser Analyse eine rhythmische Expression (Abb.19). Allerdings weist *mClock* auch in anderen Geweben keine circadiane Genexpression auf (siehe Abb.1.3). Das *Histon H4* wird in *Xenopus* Oozyten gleichmäßig exprimiert und wurde als Kontrolle für die eingesetzten RNA Mengen verwendet.

Xenopus Oozyten besitzen also unter diesen Bedingungen keinen circadianen Rhythmus und können somit auch keinen weiteren Einfluss auf den analysierten Kern-Zytoplasma-Transport haben.

Abb.3.19 *xlPer2* und *xlClock* weisen keine circadiane Genexpression auf.

Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden jeweils 5 *Xenopus* Oozyten manuell von dem Ovar getrennt und nach der RNA Präparation in der nicht radioaktiven semiquantitativen RT-PCR analysiert. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA Menge wurden das *Histon H4*, das gleichmäßig exprimiert wird, eingesetzt. Die Zeitskala gibt die Stunden nach der Präparation der Oozyten durch Ovariectomie an.

3.5 Der circadiane Rhythmus in kultivierten Maus Fibroblasten

3.5.1 Überexpression von Transport-defizienten Mutanten in Maus Fibroblasten durch stabile Transfektion

Durch einen Serum Schock ist es möglich, in kultivierten Maus Fibroblasten rhythmische circadiane Genexpression zu induzieren (Balsalobre et al., 1998). Um zu analysieren, welche Funktion der Koimport von mPer1 mit mPer3, sowie der Koexport der Heterodimere mPer1/mCry1 und mPer1/mCry2 im circadianen Rhythmus haben, wurden synchronisierte Maus Fibroblasten verwendet. Sowohl Import- als auch Export-defiziente Mutanten von mPer1 wurden in NIH3T3 Zellen stabil überexprimiert. Für die stabile Transfektion wurde ein System verwendet, das sicherstellt, dass alle überlebenden Zellen tatsächlich das gewünschte Konstrukt exprimieren. MPer1 Wildtyp und die Mutanten von mPer1 wurden über eine IRES (internal ribosomal entry site) Domäne an das als Selektionsmarker verwendete Hygromycin B Resistenzgen fusioniert, so dass nur eine mRNA, aber schließlich zwei Proteine gebildet werden. Als Promotor wurde der konstitutiv aktive CMV Promotor verwendet. Nach der Transfektion und Kultivierung einzelner Klone wurden diese auf ihre Expression hin im Western Blot untersucht (Abb.3.20). Da alle mPer1 Konstrukte ebenso wie bei den Injektionsexperimenten in *Xenopus* Oozyten an 6 Myc-Epitope fusioniert waren, wurde der Myc-Antikörper zu Detektion benutzt. Über 95 % der im Western Blot getesteten Klone exprimierten das gewünschte Gen. Obwohl für jeden Klon jeweils die gleiche Anzahl an Zellen aufgetragen wurde, sind deutliche Unterschiede in der Proteinkonzentration der überexprimierten Konstrukte sichtbar. So wird z.B. in den Klonen 22b und 23b mPer1mutNLSΔC nur sehr schwach exprimiert, während die Klone 4b und 7b ein sehr hohes Expressionsniveau von mPer1mutNES1,2 besitzen. Durch dieses System kann nicht sichergestellt werden, dass die Insertion der transfizierten Konstrukte an der gleichen Position im Genom geschieht. Es ist deshalb möglich, dass die Differenzen in der Proteinkonzentration durch die Integration in transkriptional unterschiedlich aktive Regionen im Genom erfolgen. Zur weiteren Analyse wurden zum einen Klone ausgewählt, die über ein vergleichbares Expressionsniveau verfügen und zum anderen möglichst ein vergleichbares Wachstumsverhalten wie die nicht-transfizierte Zellen zeigen. Allerdings war in allen

getesteten Klonen von mPer1 und mPer1mutNES1,2 ein leicht verlangsamtes Zellwachstum zu beobachten. Interessanterweise findet man wie in dem *Xenopus* Oozytensystem ebenfalls eine veränderte Mobilität der überexprimierten Proteine im SDS-Gel. Das könnte darauf hindeuten, dass auch in Maus Fibroblasten eine Phosphorylierung von mPer1 stattfindet.

Abb.3.20 Stabil transfizierte mPer1 Mutanten werden in NIH3T3 Zellen überexprimiert.

Die beschriebenen an 6 Myc-Epitope fusionierten Konstrukte von mPer1 wurden stabil in NIH3T3 Zellen mittels Lipofektion transfiziert. 10 µg Gesamtprotein von jedem Klon (die Zahlen geben die Klonnummer an) wurden auf einem 6 % SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot durch den Myc-Antikörper nachgewiesen. Als negative Kontrolle wurde die gleiche Proteinmenge von nicht transfizierten NIH3T3 Zellen aufgetragen.

Neben der Analyse der Transfektanden im Western Blot wurde auch deren subzelluläre Lokalisation in diesen Zellen überprüft. In den verschiedenen Klonen einer mPer1

Mutante konnte keine unterschiedliche Lokalisation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). MPer1 Wildtyp ist ebenso wie in HeLa Zellen im Zellkern der transfizierten NIH3T3 Zellen zu finden, während mPer1mutNLS Δ C, worin beide Kernlokalisierungssignale mutiert sind, ausschließlich im Zytoplasma zu finden ist (Abb.3.21). MPer1mutNES1,2 fehlen zwar beide Kernexportsignale, aber da weiterhin die Importsignale vorhanden sind, ist diese Mutante den Erwartungen entsprechend im Zellkern lokalisiert. Sowohl in mPer1 Δ C, als auch in mPer1mutNES1,2 Δ C, ist das zweite Kernlokalisierungssignal deletiert, aber durch das Vorhandensein des einen Importsignales ist ein Transport in den Zellkern weiterhin möglich. Alle untersuchten Klone dieser Mutanten zeigen eine nukleäre Lokalisation.

Abb.3.21 Die subzelluläre Lokalisation von stabil transfiziertem mPer1 und deren Mutanten in NIH3T3 Zellen.

Bis auf die Import-defiziente Mutante mPer1mutNLS Δ C sind alle überexprimierten Proteine im Zellkern von Maus Fibroblasten lokalisiert. Die verschiedenen Zelllinien wurden auf Glasplättchen kultiviert und deren Überexpression durch eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem myc-Cy3 (rot) Antikörper nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Raute gibt die Klonnummer an. Als negative Kontrolle wurde eine Immunfluoreszenzfärbung auf nicht transfizierten NIH3T3 Zellen mit Myc-Cy3 durchgeführt.

3.5.2 Der Export von Cryptochrom Proteinen ist für den circadianen Rhythmus in kultivierten Maus Fibroblasten notwendig

3.5.2.1 Analyse des circadianen Rhythmus in kultivierten Maus Fibroblasten durch semiquantitative RT-PCR

Zur Analyse des circadianen Rhythmus in den stabil transfizierten Zelllinien (als Kontrolle dienen nicht transfizierte NIH3T3 Zellen) wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen auf 10 cm^2 Wachstumsfläche ausgesät und 4 Tage unter verringerter Serumkonzentration (5%) bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Zum Zeitpunkt 0 Stunden wurden die Zellen durch Zugabe von 50% Pferdeserum geschockt. Die Inkubation in hoher Serumkonzentration führt zur Synchronisation der Zellen und zu einer Induktion rhythmischer Genexpression (Yagita and Okamura, 2000). Nach 2 Stunden wurde das Serum durch serumfreies Medium ersetzt. Um weiterhin eine Überexpression zu gewährleisten, ist es notwendig, dass dem Medium weiterhin das selektive Antibiotikum zugesetzt wird. Zu allen angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach der RNA Präparation wurde die Genexpression über eine nicht radioaktive semiquantitative RT-PCR ermittelt.

In den Kontrollzellen findet eine rhythmische Expression von *mPer1*, *mPer2*, *mCry1* und *mDbp* statt. *MPer1* wird durch den Serumschock induziert (Abb.3.22). Nach 1 Stunde und insbesondere nach 2 Stunden ist eine erhöhte Expression dieses Gens zu beobachten, die bereits nach 4 Stunden wieder abnimmt und nach 8, 12 und 16 Stunden kaum noch nachweisbar ist. Nach 20 und 24 h kehrt die Expressionserhöhung wieder zurück. Ein zweiter Zyklus ist bei 44 h sichtbar. Während das erste Expressionsmaximum bei *mPer1* bereits nach 2 Stunden erreicht ist, so wird *mPer2* erst etwas später induziert und zeigt nach 4 Stunden maximale Expression. Aber entsprechend *mPer1* nimmt die Expression ab und kehrt erst nach 24 Stunden bzw. 44 Stunden zurück. Der Rhythmus von *mCry1* ist vergleichbar mit demjenigen von *mPer2*. *MCry1* wird am stärksten nach 4 und 24 Stunden exprimiert, allerdings konnte hier kein erneutes Maximum nach 44 Stunden festgestellt werden. Die Expression von *Dbp* allerdings ist bereits zum Zeitpunkt 0 hoch und nimmt dann kontinuierlich ab. Nach 20, 24 und 28 Stunden wird dieses Gen wieder sehr stark exprimiert und nimmt dann erneut wieder ab. Die Expression von *Bmal1* wird nur sehr schwach nach 2 Stunden induziert und nimmt dann langsam mit einem Minimum nach 28 Stunden wieder ab. Bereits nach

32 Stunden nimmt die Expression wieder zu. Alle weiteren untersuchten circadianen Gene wurden nicht rhythmisch exprimiert. Als Kontrolle, für die zu jedem Zeitpunkt gleichmäßig eingesetzte RNA Menge, wurden *Histon H4* und *Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)* verwendet.

Abb.3.22 Der Serumschock löst in synchronisierten Maus Fibroblasten eine circadiane Genexpression aus.

mPer1, *mPer2*, *mCry1* und *mDbp* werden in synchronisierten Maus Fibroblasten rhythmisch exprimiert. *mPer3*, *mCry2* und *mClock* zeigen während des gesamten Verlaufes eine gleichmäßige Expression. Die unter 5 % Serum konfluent gewachsenen NIH3T3 Zellen wurden zur Induktion des circadianen Rhythmus für 2 Stunden (Zeitpunkt 0 – 2 Stunden) mit 50 % Pferdeserum im Medium geschockt. Die weitere Inkubation erfolgte in serumfreiem Medium. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen von 10 cm² Wachstumsfläche lysiert und nach der RNA Präparation in der nicht radioaktiven semiquantitativen RT-PCR analysiert. Zur Kontrolle der eingesetzten RNA Menge wurden das *Histon H4* und *Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)*, die gleichmäßig exprimiert werden, eingesetzt. Als negative Kontrolle und zur Überprüfung von DNA Kontaminationen in den RNA Präparationen wurde eine PCR mit Primern für H4 ohne reverse Transkription durchgeführt.

In allen weiteren Analysen wurden nur die rhythmisch exprimierten Gene untersucht. Durch die stabile Transfektion von *mPer1* findet man das Protein zwar in einer erhöhten Konzentration im Zellkern (vgl. Abb.21), aber nach wie vor ist ein Import von *mPer3* und ein Export von beiden Cryptochromen im Komplex mit *mPer1* möglich. Die Überexpression von *mPer1* Wildtyp führt zu einer verringerten rhythmischen Aktivität (Abb.3.23). Sowohl *mPer2* als auch *mCry1* werden durch den Serumschock aktiviert, aber man findet keine den Kontrollzellen entsprechende Wiederkehr der Expression nach 24 Stunden. Die Expression von *mPer2* wird erst nach 28 Stunden erhöht, während *mCry1* nach 36 Stunden eine starke Expression zeigt. *Dbp* ist allerdings nach wie vor

zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden stark exprimiert. Der circadiane Rhythmus wird durch die Überexpression von mPer1 verzögert.

Abb.3.23 Die Überexpression von mPer1 führt zu einem verzögerten circadianen Rhythmus in synchronisierten NIH3T3 Zellen.

MBmal1 zeigt keine circadiane Genexpression, während *mPer2* und *mCry1* weiterhin schwach rhythmisch exprimiert werden. Die Analyse erfolgte wie unter Abb.3.22 beschrieben. Unter der RT-PCR Analyse ist das überexprimierte Protein in einer schematischen Darstellung gezeigt. Grün sind die Kernexportsignale und rot die Kernimportsignale von mPer1 unterlegt. Die Zahlen geben die Aminosäuren an.

Durch die Überexpression von mPer1mutNLSΔC sollte das endogene mPer3, aber auch andere Heterodimerisierungspartner im Zytoplasma verbleiben. Zur Detektion von *mPer1* wurden Primer verwendet, die in der 3'untranslatierten Region von *mPer1* binden und somit nur das endogene *mPer1* nachweisen. Die Expression von mPer1 wird wie in den Kontrollzellen bereits nach 2 Stunden aktiviert, fällt nach 4 Stunden kontinuierlich ab und ist nach 20 und 40 Stunden wieder hoch (Abb.3.24). Ebenso wie *mPer1* zeigen auch *mPer2* und *mCry1* entsprechend wie in den Kontrollzellen eine rhythmische Expression. *Dbp* ist zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden am stärksten vorhanden. Die Überexpression von mPer1mutNLSΔC im Zytoplasma von Maus Fibroblasten hat also keinen signifikanten Einfluß auf den circadianen Rhythmus in diesen Zellen.

Abb.3.24 Die Überexpression von der Import-defizienten Mutante von mPer1 führt nicht zu einer Veränderung der circadianen Genexpression in synchronisierten Maus Fibroblasten.

Endogenes *mPer1*, *mPer2*, *mCry1* und *mDbp* werden in *mPer1mutNLSΔC* überexprimierten NIH3T3 Zellen weiterhin rhythmisch exprimiert. Die Analyse erfolgte wie unter Abb.3.22 beschrieben. Unter der RT-PCR Analyse ist das überexprimierte Protein in einer schematischen Darstellung gezeigt. Grün sind die Kernexportsignale und rot das Kernimportsignal, das durch den Austausch 3 basischer Aminosäuren mutiert wurde (RRHHCRSKAKRSR), von *mPer1mutNLSΔC* unterlegt. Das zweite Kernlokalisierungssignal am C-Terminus wurde deletiert. Die Zahlen geben die Aminosäuren an.

Die stabile Transfektion von *mPer1mutNES1,2* führt zu einem Verlust der Exportfunktion für *mCry1* und *mCry2*. Die Analyse der circadianen Genexpression in dieser Zelllinie zeigt, dass keine rhythmische Expression unter diesen Bedingungen mehr stattfinden kann (Abb.3.25). *MPer2* und *mCry1* werden gleichmäßig über den gesamten Untersuchungszeitraum exprimiert. *MPer1* wird zwar nach 1 Stunde noch leicht induziert und nach 8 Stunden ist nach wie vor eine Reprimierung zu beobachten, doch eine erneute zyklische Aktivierung bleibt aus. Ebenso wird die Expression von *Dbp* dramatisch verändert, da in dieser Zelllinie keine Repression dieses Gens mehr stattfinden kann. *Dbp* bleibt auf einem hohen Expressionslevel konstant. Die Überexpression von *mPer1mutNES1,2* im Zellkern und die daraus resultierende Exportinhibition der Cryptochrom Proteine führt zu einem Verlust des circadianen Rhythmus in kultivierten Fibroblasten.

Abb.3.25 Die Überexpression der Export-defizienten Mutante von *mPer1* führt zu einer arrhythmischen circadianen Genexpression.

Keines der analysierten circadianen Gene wird in *mPer1*mutNES1,2 überexprimierenden synchronisierten Fibroblasten rhythmisch synthetisiert. Die Analyse erfolgte wie unter Abb.3.22 beschrieben. Unter der RT-PCR Analyse ist das überexprimierte Protein in einer schematischen Darstellung gezeigt. Grün sind die Kernexportsignale, die durch den Austausch von 3 bzw. 4 Leucinen mutiert wurden (NES1: IQELSEQIHRLLL und NES2: LQLNLLQL), und rot die Kernimportsignale von *mPer1* unterlegt. Die Zahlen geben die Aminosäuren an.

3.5.2.2 Analyse des circadianen Rhythmus in kultivierten Maus Fibroblasten durch real time PCR

Da in der semiquantitativen RT-PCR Methode geringe Expressionsunterschiede nur sehr schwierig herausgearbeitet werden können, wurde als zweite Methode die fluoreszenzbasierte quantitative PCR (real time PCR) eingesetzt. Die Probennahme erfolgte entsprechend der semiquantitativen Methode. Für die Synthese der cDNA wurde ein System verwendet, das es erlaubt, die cDNA ohne weitere Aufreinigung direkt in der real time PCR Reaktion einzusetzen. Weiterhin wird die eingesetzte RNA in diesem System sehr gleichmäßig umgeschrieben, so dass auch der Einsatz von geringen cDNA Mengen in der quantitativen PCR zu vergleichbaren Ergebnissen führt (Daten nicht gezeigt).

Nach der Analyse der nicht transfizierten Kontrollzellen durch die semiquantitative RT-PCR zeigte sich, dass nicht alle am circadianen Rhythmus beteiligten Gene oszillatorisch in Maus Fibroblasten exprimiert werden, so dass in der real time PCR nur die endogenen *mPer1*, *mPer2* und *mCry1* Gene untersucht wurden. Auch mit dieser Methode zeigen diese Gene eine rhythmische Expression (Abb.3.26B). *MPer1* wird mit einem ersten Expressionsmaximum nach 2 Stunden vor *mPer2* und *mCry1* induziert, die

ihr Maximum erst nach 4 Stunden erreichten (vgl. Einleitung). Nach einer minimalen Expression bei 8 Stunden erreicht *mPer1* nach 24 Stunden erneut ein Maximum, fällt wieder und steigt nach 44 Stunden nochmals an. Die Expression von *mPer2* wird erst nach 16 Stunden minimal und ist wie *mPer1* nach 24 Stunden sehr hoch. *MCry1* folgt einer verlagerten Expressionskurve. Ebenso wie *mPer2* ist die Expression nach 16 Stunden sehr niedrig, aber das Expressionsmaximum wird von *mCry1* erst nach 28 h erreicht. *G6PDH* als Kontrolle zeigt zu allen analysierten Zeitpunkten ein gleichmäßiges Expressionsniveau.

Die Überexpression von mPer1 führt zu einer leicht veränderten circadianen Expression. MPer1 enthält sowohl Kernimport- als auch Kernexportsignale und kann demnach zwischen Zellkern und Zytoplasma „shutteln“. Weiterhin wird mPer3 durch mPer1 in den Zellkern importiert und mCry1 und mCry2 aus dem Zytoplasma exportiert. Durch die Immunfluoreszenzfärbung konnte überexprimiertes mPer1 vermehrt im Zellkern nachgewiesen werden (Abb.3.21). Durch die real time PCR Analyse konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Konzentration von mPer1 im Zellkern zu einem leicht veränderten circadianen Rhythmus führt (Abb.3.26C). Die Expression von endogenem *mPer1* wird nach wie vor aktiviert, zeigt wie in den Kontrollzellen auch ein Minimum nach 8 Stunden und steigt bis zum Zeitpunkt 24 Stunden zwar wieder an, bleibt aber dann relativ konstant. *MPer2* und *mCry1* werden ebenfalls wie in den Kontrollzellen induziert und zeigen auch eine weiterhin rhythmische Expression. Allerdings scheint der Rhythmus verschoben zu sein. Das Expressionsmaximum wird erst nach 28 Stunden bei *mPer2* und nach 32 Stunden bei *mCry1* erreicht. Der Rhythmus ist also um 4 Stunden verschoben.

MPer1mutNLSΔC besitzt kein funktionsfähiges Kernlokalisationsignal und wird ausschließlich im Zytoplasma der NIH3T3 Zellen überexprimiert. Weiterhin sind für den Import von mPer3 die Kernlokalisationssignale in mPer1 notwendig, so dass mPer3 ebenfalls im Zytoplasma verbleiben sollte. Ein circadianer Rhythmus kann aber in diesen Zellen weiterhin stattfinden (Abb.3.26D). Sowohl *mPer1* als auch *mPer2* und *mCry1* werden wie in den Kontrollzellen durch den Serumschock induziert und zeigen ein Expressionsminimum nach 12 bzw. 16 und 36 Stunden. Eine hohe Expression wird zwischen 20 und 28 Stunden erreicht. MPer1mutNLSΔC besitzt also keinen dominant-negativen Effekt.

In mPer1mutNES1,2 sind beide Kernexportsignale mutiert, so dass dieses Protein zwar noch in den Zellkern importiert werden kann, aber der Export in das Zytoplasma von

NIH3T3 Zellen blockiert ist. Da mPer1 für den Transport der Cryptochrom Proteine aus dem Zellkern mPer1 notwendig ist, sollte in der Zelllinie, in der mPer1mutNES1,2 überexprimiert wird, kein Export von mCry1 und mCry2 mehr stattfinden. Die circadiane Genexpression verläuft in diesen Zellen arrhythmisch (Abb.3.26E). Die Expression von *mCry1* bleibt über den gesamten Analysezeitraum konstant, während *mPer1* und *mPer2* zwar noch induziert werden können, aber keine weitere rhythmische Expression mehr zeigen (vgl. Kontrolle, mPer1mutNES1,2ΔC). Für den circadianen Rhythmus in kultivierten Maus Fibroblasten ist also der Export von mCry1 und mCry2 notwendig.

Weiterhin wurde eine mPer1ΔC überexprimierende Zelllinie als Kontrolle untersucht, um zu analysieren, ob die Bindung von mPer1 an mCry1 und mCry2 für den dominant-negativen Effekt von mPer1mutNES1,2 verantwortlich ist. MPer1ΔC kann aufgrund der C-terminalen Deletion nicht mehr an die Cryptochrom Proteine binden, kann allerdings über das Kernlokalisierungssignal 1 noch immer in den Kern transportiert werden (vgl. Abb. 21). Durch die real time PCR Analyse konnte in dieser Zelllinie weiterhin eine rhythmische circadiane Genexpression nachgewiesen werden (Abb.3.26F). *MPer1*, *mPer2* und *mCry1* werden in dieser Zelllinie oszillatorisch exprimiert, während die als Kontrolle verwendete Expression von *G6PDH* konstant bleibt. Die C-terminale Cryptochrom Bindungsdomäne in mPer1mutNES1,2 ist also die entscheidende Domäne für die arrhythmische Genexpression in dieser Zelllinie.

Da mPer1ΔC zwischen Zellkern und Zytoplasma „shutteln“ kann und mPer1mutNES1,2 im Vergleich dazu im Zellkern verbleibt, wurde eine weitere Mutante von mPer1 zu Kontrollzwecken analysiert. MPer1mutNES1,2ΔC kann weder exportiert werden (wie mPer1mutNES1,2) noch an mCry1 und mCry2 binden und deren Transport aus dem Zellkern vermitteln (wie mPer1ΔC). Wenn die Bindung an mCry1 und mCry2 für das arrhythmische Verhalten verantwortlich ist, dann sollte die Überexpression von mPer1mutNES1,2ΔC im Zellkern von NIH3T3 keinen Effekt haben. In der Tat werden in dieser Zelllinie weiterhin alle circadianen Gene rhythmisch exprimiert (Abb.3.26G). Der Export der Cryptochrom Proteine ist also ein wichtiger Faktor für die Regulation des circadianen Rhythmus.

Abb.3.26 Der circadiane Rhythmus in synchronisierten NIH3T3 Zellen, die Transport-defiziente Mutanten von mPer1 überexprimieren.

(A) Die schematische Darstellung zeigt die in den Maus Fibroblasten überexprimierten mPer1 Mutanten und deren Effekt auf den circadianen Rhythmus. Grün unterlegt wurden die Kernexportsignale, die in mPer1mutNES1,2 und mPer1mutNES1,2ΔC durch den Austausch von jeweils 3 Leucinen mutiert wurden (NES1: IQELSEQIHRLLL und NES2: LQLNLLQL). Rot sind die Kernimportsignale markiert. In mPer1mutNLSΔC wurde das NLS1 durch den Austausch von 3 basischen Aminosäuren mutiert (RRHHCRSKAKRSR). In mPer1ΔC, mPer1mutNLSΔC und mPer1mutNES1,2ΔC wurde das NLS2 bzw. die Cryptochrom Bindungsdomäne deletiert. (B) Die unter 5 % Serum konfluent gewachsenen NIH3T3 Zellen wurden zur Induktion des circadianen Rhythmus für 2 Stunden (Zeitpunkt 0 – 2 Stunden) mit 50 % Pferdeserum im Medium geschockt. Die weitere Inkubation erfolgte in serumfreiem Medium mit selektivem Antibiotikum. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen von 10 cm² Wachstumsfläche lysiert und nach der RNA Präparation in der Fluoreszenz-basierten real time PCR analysiert. Zur Ermittlung des mRNA Expressionsniveaus wurde durch Mitführung einer Standardkurve (Verdünnungsreihe des amplifizierten Produkts mit bekannter Konzentration) die Kopienanzahl ermittelt und durch einen logarithmischen Graphen dargestellt (dunkelblauer Diamant *G6PDH*, rotes Quadrat *mCry1*, grünes Dreieck *mPer2* und hellblaues Kreuz endogenes *mPer1*). Zur Kontrolle der eingesetzten RNA Menge wurde *Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase*, die gleichmäßig exprimiert wird, eingesetzt.

3.5.2.3 Die subzelluläre Lokalisation der überexprimierten mPer1 Mutanten in synchronisierten Maus Fibroblasten

Um sicherzustellen, dass in allen stabil transfizierten Zelllinien nach dem Serumschock auch weiterhin mPer1 Wildtyp bzw. die mPer1 Mutanten exprimiert werden, wurde das Expressionsniveau der transfizierten Konstrukte mittels real time PCR bestimmt. Es wurden dafür Primer verwendet, die nicht das endogene *mPer1* detektieren können, sondern nur spezifisch die Expression von transfiziertem *mPer1* und deren Mutanten nachweist. Alle Zelllinien exprimieren zu jedem Zeitpunkt das stabil transfizierte Gen (Abb.3.27). Aus der real time PCR Analyse konnte die Anzahl der mRNA Moleküle bestimmt werden. Zum Zeitpunkt 0 ist mRNA-Konzentration von transfiziertem *mPer1* bzw. der transfizierten *mPer1* Mutanten um ein 20-faches höher als endogenes *mPer1* in den nicht transfizierten Zellen. Interessanterweise führt allerdings der Serumschock zu einer leicht erhöhten Genexpression. Da dieser Effekt in allen Zellen zu beobachten ist, kann ausgeschlossen werden, dass dieses Phänomen eine Ursache für das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Mutanten ist.

Abb.3.27 Die mRNA Konzentration der stabil transfizierten mPer1 Mutanten bleibt während der circadianen Expression konstant.

Die unter 5 % Serum konfluent gewachsenen NIH3T3 Zellen wurden zur Induktion des circadianen Rhythmus für 2 Stunden (Zeitpunkt 0 – 2 Stunden) mit 50 % Pferdeserum im Medium geschockt. Die weitere Inkubation erfolgte in serumfreiem Medium mit selektivem Antibiotikum. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen von 10 cm² Wachstumsfläche lysiert und nach der RNA Präparation in der Fluoreszenz-basierten real time PCR analysiert. Zur Ermittlung des mRNA Expressionsniveaus wurde durch Mitführung einer Standardkurve (Verdünnungsreihe des amplifizierten Produktes mit bekannter Konzentration) die Kopienanzahl ermittelt und durch einen logarithmischen Graphen dargestellt. Die verwendeten Primer (SP6 und 3'mPer1) detektieren spezifisch nur die stabil transfizierten mPer1 Mutanten (rotes geschlossenes Quadrat *mPer1*, grünes Dreieck *mPer1mutNES1,2*, hellblaues Kreuz *mPer1mutNLSΔC*, rotes offenes Quadrat *mPer1ΔC*, dunkelblauer Kreis *mPer1mutNES1,2ΔC*).

Neben der mRNA Menge wurde auch analysiert, wie die entsprechenden Proteine exprimiert werden und in welchem Kompartiment diese lokalisiert sind. MPer1 Wildtyp enthält zwar sowohl Kernimport- als auch Kernexportsignale, wird aber in nicht synchronisierten Zellen vorwiegend im Zellkern von NIH3T3 Zellen lokalisiert (Abb.3.28). So ist auch zum Zeitpunkt 0, also direkt vor dem Serumschock, nur nukleäre Färbung sichtbar. Nach der Zugabe des Serums nimmt die Fluoreszenzintensität im Zellkern leicht zu (Zeitpunkt 2 Stunden). Nach 12 Stunden konnte mPer1 nur noch schwach im Zellkern detektiert werden. Die Proteinkonzentration von mPer1 steigt allerdings nach 16 Stunden wieder an und ist zum Zeitpunkt 20 und 24 h sehr hoch. Interessanterweise wird mPer1 nach 28 Stunden nicht nur sehr schwach exprimiert, sondern anstatt im Zellkern ist mPer1 zu diesem Zeitpunkt vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Bis zum nächsten Expressionsmaximum nach 44 und 48 Stunden steigt neben der Proteinkonzentration

auch die Lokalisation im Zellkern wieder an. In dem mit mPer1 Wildtyp stabil transfizierten Zellen findet also ein circadianer Rhythmus statt und auch die überexprimierten Proteine werden in diesen Zyklus integriert. Obwohl die mRNA Menge in diesen Zellen konstant bleibt, unterliegt die Proteinkonzentration dem circadianen Rhythmus. Ebenso wie die Proteindegradation ist auch die Lokalisation des überexprimierten mPer1 in den synchronisierten Fibroblasten reguliert.

In mPer1mutNLSΔC wurden beide Kernlokalisierungssignale deletiert, so dass dieses Protein zwar aufgrund seiner PAS Domäne weiterhin Homo- und Heterodimere bilden kann, aber nicht mehr in den Zellkern transportiert werden kann (Abb.3.33). Es ist somit ausschließlich im Zytoplasma von synchronisierten Fibroblasten detektierbar. Ebenso kann mPer1mutNLSΔC den Import von mPer3 nicht mehr vermitteln. In der real time und in der RT-PCR Analyse konnte im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen keine Veränderung in der circadianen Genexpression gefunden werden. Obwohl mPer1mutNLSΔC nur im Zytoplasma lokalisiert ist, wird dieses Protein auch in die circadianen Veränderungen der synchronisierten Zellen integriert (Abb.3.29). Trotz der konstant bleibenden mRNA Konzentration findet man eine stark erhöhte zytoplasmatische Färbung zum Zeitpunkt 2 und 4 Stunden. Nach 8 Stunden ist die Proteinkonzentration sehr gering und steigt dann sukzessiv bis zu einem Maximum nach 20 bzw. 24 Stunden wieder an. Zwischen 28 und 40 Stunden nach dem Serumschock ist die Proteinkonzentration von mPer1mutNLSΔC erneut sehr gering. Erst nach 40 bzw. 44 Stunden zeigt sich wieder eine sehr intensive zytoplasmatische Färbung. Wie die mRNA Analyse bereits zeigte, wird der circadiane Rhythmus durch die Überexpression von mPer1mutNLSΔC nicht beeinträchtigt.

Abb.3.28 Überexprimiertes mPer1 zeigt in synchronisierten Maus Fibroblasten rhythmische Proteinexpression.

Die unter 5 % Serum konfluent auf Glasdeckgläschen gewachsenen NIH3T3 Zellen wurden zur Induktion des circadianen Rhythmus für 2 Stunden (Zeitpunkt 0 – 2 Stunden) mit 50 % Pferdeserum im Medium geschockt. Die weitere Inkubation erfolgte in serumfreiem Medium mit selektivem Antibiotikum. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem myc-Cy3 Antikörper (rot) durchgeführt. Die Zellkerne sind durch eine DAPI (blau) Färbung dargestellt.

Abb.3.29 Überexprimiertes mPer1mutNLSΔC zeigt in synchronisierten Maus Fibroblasten rhythmische Proteinexpression.

Die unter 5 % Serum konfluent auf Glasdeckgläschen gewachsenen NIH3T3 Zellen wurden zur Induktion des circadianen Rhythmus für 2 Stunden (Zeitpunkt 0 – 2 Stunden) mit 50 % Pferdeserum im Medium geschockt. Die weitere Inkubation erfolgte in serumfreiem Medium mit selektivem Antibiotikum. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem myc-Cy3 Antikörper (rot) durchgeführt. Die Zellkerne sind durch eine DAPI (blau) Färbung dargestellt.

Abb.3.30 Die Proteinexpression von stabil transfiziertem mPer1mutNES1,2 ist in synchronisierten Maus Fibroblasten nicht rhythmisch.

Die unter 5 % Serum konfluent auf Glasdeckgläschen gewachsenen NIH3T3 Zellen wurden zur Induktion des circadianen Rhythmus für 2 Stunden (Zeitpunkt 0 – 2 Stunden) mit 50 % Pferdeserum im Medium geschockt. Die weitere Inkubation erfolgte in serumfreiem Medium mit selektivem Antibiotikum. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem myc-Cy3 Antikörper (rot) durchgeführt. Die Zellkerne sind durch eine DAPI (blau) Färbung dargestellt.

Abb.3.31 Überexprimiertes mPer1ΔC zeigt in synchronisierten Maus Fibroblasten rhythmische Proteinexpression.

Die unter 5 % Serum konfluent auf Glasdeckgläsern gewachsenen NIH3T3 Zellen wurden zur Induktion des circadianen Rhythmus für 2 Stunden (Zeitpunkt 0 – 2 Stunden) mit 50 % Pferdeserum im Medium geschockt. Die weitere Inkubation erfolgte in serumfreiem Medium mit selektivem Antibiotikum. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem myc-Cy3 Antikörper (rot) durchgeführt. Die Zellkerne sind durch eine DAPI (blau) Färbung dargestellt.

Abb.3.32 Die Proteinexpression von stabil transfiziertem mPer1mutNES1,2ΔC ist in synchronisierten Maus Fibroblasten rhythmisch.

Die unter 5 % Serum konfluent auf Glasdeckgläschen gewachsenen NIH3T3 Zellen wurden zur Induktion des circadianen Rhythmus für 2 Stunden (Zeitpunkt 0 – 2 Stunden) mit 50 % Pferdeserum im Medium geschockt. Die weitere Inkubation erfolgte in serumfreiem Medium mit selektivem Antibiotikum. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem myc-Cy3 Antikörper (rot) durchgeführt. Die Zellkerne sind durch eine DAPI (blau) Färbung dargestellt.

Durch die Mutation beider Kernexportsignale in mPer1mutNES1,2 kann dieses Protein zwar noch importiert, aber nicht mehr exportiert werden. Ebenso wird der mPer1 vermittelte Transport von mCry1 und mCry2 aus dem Zellkern durch die Überexpression blockiert (für die Eigenschaften dieser Mutante siehe auch Abb.3.33). Die Analyse der circadianen Genexpression in synchronisierten Maus Fibroblasten zeigte, dass die Überexpression von mPer1mutNES1,2 in diesen Zellen zu einem Verlust des circadianen Rhythmus führt. Die mRNA von mPer1mutNES1,2 wird in vergleichbaren Mengen wie alle anderen mPer1 Mutanten synthetisiert. Die Fluoreszenzfärbung der synchronisierten Zellen zeigt wie erwartet eine nukleäre Lokalisation des mPer1mutNES1,2 Proteins. Allerdings ist in dieser Zelllinie keine Veränderung in der Proteinkonzentration zu beobachten (Abb.3.30). In allen analysierten Zeitpunkten zeigt sich eine gleichmäßig intensive Anfärbung der Zellkerne. Die Fluoreszenzintensität und damit die Proteinkonzentration bleibt allerdings über den gesamten Zeitraum im Vergleich zu mPer1mutNLSΔC und mPer1mutNES1,2ΔC relativ schwach. Im Western Blot konnte eine Induktion von mPer1mutNES1,2 nach 1 Stunde beobachtet werden, aber eine weitere rhythmische Proteinexpression konnte im Gegensatz zur Kontrolle mPer1mutNES1,2ΔC nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die zu Kontrollzwecken verwendete mPer1ΔC Mutante kann zwar zwischen Zellkern und Zytoplasma transportiert werden, aber aufgrund der fehlenden Cryptochrom Bindungsdomäne kann diese Mutante den Export von mCry1 und mCry2 nicht mehr vermitteln (Abb.3.33). Die Genexpressionsanalyse zeigte keinen veränderten circadianen Rhythmus im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb.3.31). Ebenso wie mPer1 Wildtyp ist mPerΔC vermehrt im Zellkern lokalisiert. Das mPer1ΔC Protein ist 2 bzw. 4 Stunden nach dem Serumschock sehr stark im Zellkern exprimiert, während die Konzentration zwischen 8 und 16 Stunden sehr gering ist. Erst nach 20 bzw. 24 Stunden ist eine intensive nukleäre Färbung wieder sichtbar. Nach 28 Stunden ist mPer1ΔC kaum noch nachweisbar und steigt dann wieder auf ein Maximum nach 40 bzw. 44 Stunden. Vergleichbar mit mPer1 Wildtyp ist diese Deletionsmutante zu Zeitpunkten mit geringem Expressionsniveau zu einem großen Teil zytoplasmatisch lokalisiert. Das mPer1ΔC Protein wird also ebenfalls in den circadianen Rhythmus der synchronisierten Fibroblasten integriert, während deren mRNA Menge konstant bleibt. mPer1ΔC besitzt keinen dominant negativen Effekt auf die oszillatorische Expression wie mPer1mutNES1,2.

Zusätzlich zu mPer1 Δ C wurde als Kontrolle mPer1mutNES1,2 Δ C eingesetzt, um zu verifizieren, dass nur die Cryptochrom Bindungsdomäne für den dominant negativen Effekt von mPer1mutNES1,2 verantwortlich ist. MPer1mutNES1,2 kann also nicht mehr an mCry1 und mCry2 binden und wird nicht aus dem Zellkern exportiert (Abb.3.33). Wie schon die real time PCR Analyse gezeigt hat, ist der circadiane Rhythmus in dieser Zelllinie nicht verändert. Auch dieses Protein wird trotz konstanter mRNA Mengen in den Rhythmus eingebaut und besitzt wie erwartet zu den Zeitpunkten 1-4 Stunden, 20 und 24 Stunden und 40 und 48 Stunden eine sehr hohe Expression, während die Proteinkonzentration zu den weiteren analysierten Zeitpunkten sehr gering ist (Abb.3.32). Interessanterweise findet man auch in dieser Zelllinie zu den Zeitpunkten, die eine geringe Proteinkonzentration aufweisen, eine zytoplasmatische Färbung. Da mPer1mutNES1,2 Δ C nicht aus dem Zellkern exportiert werden kann, muss es sich hier um neu synthetisierte Proteine handeln, und die Expressionsdifferenz zwischen 24 und 28 Stunden kann nur durch Proteindegradation im Zellkern erreicht werden.

Der dominant negative Effekt von mPer1mutNES1,2 wird also nur durch die Cryptochrom Bindungsdomäne erreicht. Der Export von mCry1 und mCry2 durch mPer1 ist somit ein wichtiges Element für die Regulation des circadianen Rhythmus.

				Imp	Exp	Cry Bindung	Effekt	Protein- expression
mPer1 WT	myc-		1291	+	+	+	schwach	rhythmisch
mPer1mutNLS1 Δ C	myc-		1104	-	+	-	kein	rhythmisch
mPer1 mutNES1,2	myc-		1291	+	-	+	stark	arrhythmisch
mPer1 Δ C	myc-		1104	+	+	-	kein	rhythmisch
mPer1mutNES1,2 Δ C	myc-		1104	+	-	-	kein	rhythmisch

Abb.3.33 Zusammenfassung der Proteineigenschaften von mPer1 und deren Mutanten.

Die schematische Darstellung zeigt die in den Maus Fibroblasten überexprimierten mPer1 Mutanten und deren Transport- und Bindungsfähigkeiten, deren Effekt auf den circadianen Rhythmus sowie deren Proteinexpression in NIH3T3 Zellen. Alle genannten Proteine können mPer3 binden. Grün unterlegt wurden die Kernexportsignale, die in mPer1mutNES1,2 und mPer1mutNES1,2 Δ C durch den Austausch von jeweils 3 Leucinen mutiert wurden (NES1: IQELSEQIHRLLL und NES2: LQLNLLQL). Rot sind die Kernimportsignale markiert. In mPer1mutNLS Δ C wurde das NLS1 durch den Austausch von 3 basischen Aminosäuren mutiert (RRHHCRSKAKRSR). In mPer1 Δ C, mPer1mutNLS Δ C und mPer1mutNES1,2 Δ C wurde das NLS2 bzw. die Cryptochrom Bindungsdomäne deletiert.

4 Diskussion

Im Zentrum des circadianen Rhythmus steht eine Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife, bei der regulierter nukleozytoplasmatischer Transport eine wichtige Rolle spielt.

Ziel dieser Arbeit war es, unter Nutzung der Mikroinjektion in *Xenopus* Oozyten eine systematische Analyse des Kernimportes und insbesondere des Kernexportes von Proteinen, die an der Regulation der biologischen Uhr beteiligt sind, durchzuführen. In diesen Analysen konnte mPer1 eine besondere Funktion als Transportadapter zugeschrieben werden. So findet ein Kernimport von mPer3 nur im Heterodimer mit mPer1 statt. Ebenso werden die beiden vorwiegend nukleären Proteine mCry1 und mCry2 nur im Komplex mit mPer1 wieder aus dem Zellkern exportiert. In der anschließenden funktionellen Analyse durch die konstitutive Expression von Transportdefizienten mPer1 Mutanten in kultivierten Maus Fibroblasten konnte nachgewiesen werden, dass der Export von mCry1 und mCry2 eine wichtige Funktion bei der Regulation der biologischen Uhr besitzt.

4.1 Der Kernimport und Phosphorylierung von Period Proteinen

Nach zytoplasmatischen Injektionen wurden nur mPer1 und mPer2 in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten importiert, während mPer3 im Zytoplasma verblieb. Neben dem unterschiedlichen Transportverhalten dieser Proteine konnten in diesen Injektionsexperimenten auch differentielle Phosphorylierungen der Period Proteine nachgewiesen werden. Nur mPer1 und mPer2, die beide importiert werden können, werden auch in *Xenopus* Oozyten phosphoryliert (Abb.3.1). Wird in deren Sequenzen nach Motiven von Proteinkinasen gesucht, so findet man unter Nutzung des frei zugänglichen Programms Net.Phos des Zentrums für biologische Sequenzanalysen der technischen Universität Dänemarks (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), das aufgrund von konsensus Sequenzmotiven mögliche Phosphorylierungstellen in Proteinen angibt, über 100 mögliche Phosphorylierungstellen durch 10 verschiedene Kinasen. Während der Anfertigung dieser Arbeit konnte der Casein Kinase I ϵ eine wichtige Rolle im circadianen Rhythmus zugeschrieben werden. So zeigten Vielhaber et al., (2000), dass CKI ϵ den Kernimport von mPer1 durch die Maskierung des

Kernlokalisierungssignale in HEK 293 Zellen inhibiert. Allerdings wurde im Gegensatz dazu in mehreren unabhängigen Studien nachgewiesen, dass die nukleäre Akkumulation von Period Proteinen durch eine CKIε abhängige Phosphorylierung stimuliert wird (Akashi et al., 2002; Lee et al., 2004; Takano et al., 2000). Auch in *Xenopus* Oozyten wird die phosphorylierte Form von mPer1 und mPer2 vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Man findet also in *Xenopus* Oozyten eine Korrelation zwischen der Fähigkeit in den Zellkern transportiert zu werden und der Phosphorylierung. Nur die beiden phosphorylierten Proteine mPer1 und mPer2 werden importiert, während nicht phosphoryliertes mPer3 im Zytoplasma verbleibt. Allerdings ist im Gegensatz dazu in Proteinen mit mutierten Kernlokalisierungssignalen keine verringerte Phosphorylierungsrate zu beobachten. NLS-defiziente Mutanten von mPer1 werden nach wie vor sehr effizient im Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten phosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Die Phosphorylierung könnte auch für die Proteinstabilität von Bedeutung sein, denn sowohl mPer1 als auch mPer2 werden in *Xenopus* Oozyten sehr schnell degradiert, während mPer3 über 24 Stunden stabil bleibt. Akashi et al., (2002) konnten zeigen, dass CKIε in COS7 Zellen die Ubiquitinierung und somit den Proteinabbau der Period Proteine fördert.

Zur Identifikation von Importsignalen wurde eine systematische Analyse in *Xenopus* Oozyten durchgeführt. Durch die Injektion von Deletionsmutanten konnte in mPer1 ein basisches Kernlokalisierungssignal (NLS1) und ein weiterer nicht basischer C-terminaler Bereich (NLS2) als notwendige Sequenzen für den Import dieses Proteins in *Xenopus* Oozyten nachgewiesen werden (Abb.3.2). Die Funktionalität des NLS1 wurde in HEK 293 Zellen ebenfalls bereits von Vielhaber et al., (2000) gezeigt. Interessanterweise überlappt das hier neu identifizierte NLS2 mit der Cryptochrom Bindungsdomäne in mPer1. Die Mutation des NLS1 oder des NLS2 führt zwar, wie erwartet, nicht zu einem vollständigen Importverlust, der erst durch die Mutation von beiden Kernlokalisierungssignalen erreicht wird, aber die Effizienz des Importes ist deutlich reduziert. Für einen schnellen Import sind also beide Signale notwendig. Die NLS enthaltenden Fragmente 3 und 4 werden zwar in den Zellkern importiert, aber nicht phosphoryliert. In diesen Proteinen ist keine vollständige CKIε Bindungsdomäne mehr vorhanden. Interessanterweise wird das Fragment 6, das auch keine komplette CKIε Bindungsdomäne besitzt, bereits während der Translation im Retikulozytenlysat phosphoryliert (Daten nicht gezeigt). Es gibt also demnach noch mindestens eine

weitere Proteinkinase, die Period Proteine phosphorylieren kann. Daraufhin stellt sich nun die Frage, warum nur mPer1Frag 6 und nicht auch mPer1 Wildtyp im Retikulozytenlysate phosphoryliert wird. Eine Möglichkeit wäre, dass diese Phosphorylierungsstelle in dem Wildtyp Protein maskiert ist und *in vivo* erst nach einer Konformationsänderung z.B. durch die Bindung an andere Proteine, aktiviert werden kann.

Ebenso wie mPer1 besitzt auch mPer2 ein in *Xenopus* Oozyten aktives basisches Kernlokalisationssignal, das bereits in zwei weiteren Studien beschrieben wurde (Miyazaki et al., 2001; Yagita et al., 2002). Sowohl in *Xenopus* Oozyten, als auch in HeLa Zellen, findet man eine schwache nukleäre Lokalisation des C-terminalen Fragmentes von mPer2 (Abb.3.2 und Abb.3.9). Im Gegensatz zu mPer1 ist die Transporteffizienz dieses Fragmentes aber wesentlich geringer. Bei einem Sequenzvergleich der beiden Proteine (siehe Anhang) fällt auf, dass sich der Größenunterschied von 34 Aminosäuren besonders in dem C-terminalen Bereich bemerkbar macht. Möglicherweise sind gerade diese Aminosäuren entscheidend für die unterschiedliche Transporteffizienz dieser beiden Proteine. Nicht nur die Proteinfragmente von mPer1 und mPer2 werden unterschiedlich lokalisiert. MPer2 Wildtyp wird zwar wie mPer1 in *Xenopus* Oozyten importiert, aber nach Transfektion in HeLa Zellen findet man eine differentielle Lokalisation von mPer1 und mPer2. MPer1 befindet sich nahezu ausschließlich im Zellkern, während mPer2 zu einem großen Anteil auch zytoplasmatisch lokalisiert ist (Abb.3.10). Auch in COS1 Zellen wurde mPer2 fast ausschließlich im Zytoplasma gefunden (Miyazaki et al., 2001).

Interessanterweise wird mPer3 Wildtyp nicht in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten importiert, obwohl ein Subfragment dieses Proteins Kerntransportaktivität besitzt (Abb.3.2). Dieses Fragment 3 enthält, wie auch die entsprechenden Fragmente von mPer1 und mPer2, ein basisches Sequenzmotiv. Analysen in COS7 Zellen zeigten, dass mPer3 auch dort nur zytoplasmatisch lokalisiert ist (Akashi et al., 2002). Allerdings führte in diesen Zellen eine Kotransfektion von mPer3 mit der Casein Kinase I ϵ zu einer nukleären Akkumulation von mPer3, die nach der Mutation des basischen Sequenzmotivs in mPer3 wieder aufgehoben werden konnte. Diese Studie, sowie weitere unabhängige Untersuchungen zeigten, dass phosphoryliertes mPer3 verstärkt im Zellkern der analysierten Zellen zu finden ist (Lee et al., 2004; Takano et al., 2000).

Interessanterweise wird mPer3 im Heterodimer mit mPer1 in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten und auch HeLa Zellen transportiert (Abb.3.5 und Abb.3.10). Auch in NIH3T3 Zellen konnte von Kume et al., (1999) eine verstärkte Akkumulation von mPer3 in Anwesenheit von mPer1 im Zellkern beobachtet werden. In Leberzellen ist mPer3 nur in Anwesenheit von mPer1 im Zellkern lokalisiert, während in Leberzellen von mPer1 knock-out Mäusen mPer3 vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert ist (Lee et al., 2004). In *Xenopus* Oozyten scheint die NLS Funktion von mPer1 sowohl notwendig als auch ausreichend zu sein, um den mPer1/mPer3 Heterodimer in den Zellkern zu transportieren, denn mPer3 wird auch mit mutiertem NLS nach wie vor im Komplex mit mPer1 importiert (Abb.3.8). Die Import-defiziente Mutante von mPer1 (mPer1mutNLSΔC) kann zwar noch einen Komplex mit mPer3 bilden, aber dennoch verbleibt dieser Heterodimer im Zytoplasma. Wäre eine Phosphorylierung von mPer3 ausreichend, um das Kernlokalisierungssignal zu aktivieren, so sollte auch der mPer3/mPer1mutNLSΔC Heterodimer in den Zellkern transportiert werden. Die Phosphorylierung von mPer3 in diesem Komplex reicht nicht aus, um mPer3 und mPer1mutNLSΔC in den Zellkern zu bringen.

4.2 Der Kernexport von Period Proteinen

Die Mikroinjektion in *Xenopus* Oozyten bietet im Vergleich zur Transfektion den Vorteil, eine systematische Analyse des Kernexportes zu erlauben. Alle drei Period Proteine werden nach nukleärer Injektion aus dem Zellkern transportiert (Abb.3.11). Obwohl mPer3 in *Xenopus* Oozyten nicht phosphoryliert wird, kann dieses Protein in Abwesenheit anderer Per Proteine in das Zytoplasma transportiert werden. Eine Phosphorylierung scheint also nicht für den Export der Period Proteine notwendig zu sein. Die phosphorylierte Form von mPer1 und mPer2 findet man allerdings weiterhin vorwiegend im Zellkern. Es lässt sich hier nicht unterscheiden, wo diese beiden Proteine phosphoryliert werden, da sie in *Xenopus* Oozyten sowohl importiert als auch exportiert werden. Mehrere unabhängige Studien haben gezeigt, dass die Casein Kinase Iε nach Transfektionen zytoplasmatisch lokalisiert ist (Akashi et al., 2002; Takano et al., 2000; Vielhaber et al., 2000). Sollte die Phosphorylierung von mPer1 und mPer2 demnach nur im Zytoplasma stattfinden, so würde es sich bei der phosphorylierten

Form im Zellkern von *Xenopus* Oozyten um Proteine handeln, die exportiert und bereits wieder importiert wurden.

Vielhaber et al., (2001) definierten in mPer1 zwischen den Aminosäuren 486-498 ein CRM1 abhängiges Exportsignal, das in dieser Arbeit funktionell bestätigt werden konnte. Zusätzlich konnte noch ein weiteres NES zwischen den Aminosäuren 981-988 (NES2) identifiziert werden (Abb.3.12). Nach der Mutation des NES1 ist die Exporteffizienz zwar reduziert, aber eine vollständige Inhibition des Transportes aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten kann erst nach einer zusätzlichen Mutation des NES2 erreicht werden. Das NES2 wurde inzwischen auch in mPer2 nachgewiesen. In diesem Protein konnte außerdem noch ein drittes NES zwischen den Aminosäuren 109-118 identifiziert werden (Yagita et al., 2002).

Die nukleären Proteine mCry1 und mCry2 werden zwar sehr effektiv in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten importiert, können aber nach nukleärer Injektion nicht in das Zytoplasma transportiert werden (Abb.3.14). Interessanterweise werden sowohl mCry1 als auch mCry2 im Heterodimer mit mPer1 aus dem Zellkern exportiert. MPer2 und mPer3 sind nicht in der Lage diese Funktion zu erfüllen (Abb.3.16 und Abb.3.17). Das eine direkte Interaktion von mPer1 mit den Cryptochromen für den Transport aus dem Zellkern notwendig ist, zeigt die Mutante mPer1 Δ C, die zwar selbst noch exportiert werden kann, aber aufgrund der Deletion der Cryptochrom Bindungsdomäne verbleiben mCry1 und mCry2 im Zellkern *Xenopus* Oozyten (Abb.3.18). Interessanterweise überlappt die Cryptochrom Bindungsdomäne mit dem neu identifizierten Kernlokalisationssignal 2 in mPer1. Möglicherweise liegt gerade in dieser Domäne die differentielle Funktion von mPer1 als Importadapter für mPer3 und als Exportadapter für mCry1 und mCry2. Für den Import von mPer3 findet eine Heterodimerisierung über die PAS Domäne, die außerhalb der Importsignale liegt, statt. Nach dem Transport in den Zellkern könnte der Importkomplex dissoziieren, und ein Repressor- bzw. Exportkomplex kann gebildet werden. Durch die Bindung von mCry1 und mCry2 wird das Kernlokalisationssignal 2 maskiert und dieser Komplex kann dann aus dem Zellkern exportiert werden. Beide Cryptochrome werden mit der Export-defizienten mPer1 Mutante nicht in das Zytoplasma von *Xenopus* Oozyten transportiert. Die Effizienz des Exportes der Cryptochrome mit mPer1 ist nicht sehr hoch. Allerdings betrachtet man bei der Mikroinjektion in *Xenopus* Oozyten immer nur das Gleichgewicht zwischen

dem Import und dem Export der Proteine. Sowohl mCry1 als auch mCry2 werden in *Xenopus* Oozyten sehr stark importiert, sodass die Proteine möglicherweise nach dem Export im Heterodimer mit mPer1 sofort wieder reimportiert werden. MPer1 erfüllt also im circadianen Rhythmus eine wichtige Funktion als Transportadapter für den Import von mPer3 und für den Export von mCry1 und mCry2.

Abb.4.1 Schematische Darstellung wichtiger Elemente in Period Proteine

Die Period Proteine sind graphisch durch Querbalken dargestellt. Die Zahlen geben die Aminosäuren an. In Boxen sind wichtige Domänen der Proteine gezeigt. Gelb sind die PAS Domänen, die notwendig für die Homo- und Heterodimerisierung von Period Proteinen sind. Die Kernimportsignale sind durch rote und die Kernexportsignale durch grüne Färbung gekennzeichnet. In Grau ist die CKIε Bindungsdomänen dargestellt, die wichtig für die Proteinphosphorylierung ist, und Schwarz gibt die Cryptochrom Bindungsdomänen der Period Proteine an.

4.3 Circadianer Rhythmus in *Xenopus laevis* Oozyten

Für die Analyse von Transportmechanismen in *Xenopus* Oozyten ist es wichtig, das rhythmisch exprimierte endogene Proteine keinen Einfluss auf das Transportverhalten der injizierten Proteine haben. Sowohl *xlPer2* als auch *xlClock* werden in *Xenopus*

Oozyten nicht circadian exprimiert (Abb.3.19). Im Gegensatz dazu konnte allerdings in einer Studie mit Zebrafisch Oozyten eine oszillatorische Expression von *zPer3* nachgewiesen werden (Delaunay et al., 2000). In dieser Arbeit wurden die Oozyten zu jedem analysierten Zeitpunkt direkt aus dem Zebrafisch entnommen, sodass die Oozyte bis zur Präparation in Verbindung zum adulten Tier gestanden hatte. Möglicherweise wird die Erhaltung des circadianen Rhythmus nur durch Signale aus dem Weibchen erreicht. Die *Xenopus* Oozyten hingegen wurden durch Ovariectomie gewonnen und während der Probenentnahmen in einer Pufferlösung kultiviert. Es bestand also während des gesamten Analysezeitraumes keine Verbindung zum adulten *Xenopus* Weibchen, das durch die Weiterleitung von humoralen Signalen eine Synchronisation des circadianen Rhythmus erreichen könnte. Vorstellbar wäre also rhythmische Expression in Oozyten nur so lange ein Kontakt zum Muttertier besteht und dass ein circadianer Rhythmus erst dann wieder erreicht wird, wenn Organe soweit entwickelt sind, dass Reize wie Licht von der Umwelt aufgenommen und verarbeitet werden können, die ausreichend sind, um einen circadianen Rhythmus zu induzieren.

4.4 Funktion des Kern-Zytoplasma-Transportes im circadianen Rhythmus

Es wurde bereits von mehreren Gruppen gezeigt, dass sich ein circadianer Rhythmus durch einige Komponenten wie z.B. TPA, Forskolin oder eine hohe Serumkonzentration (das in dieser Arbeit verwendet wurde) in kultivierten Zellen induzieren lässt (Akashi and Nishida, 2000; Balsalobre et al., 1998; Yagita and Okamura, 2000; Yagita et al., 2001). Derartige Behandlungen führen zu einem sofortigen Anstieg der Konzentration von mPer1 in diesen Zellen, gefolgt von circadianer Genexpression weiterer an der biologischen Uhr beteiligten Proteine (siehe Einleitung). Nach der Überprüfung der circadianen Gene mittels nicht radioaktiver RT-PCR zeigte sich, dass nicht alle untersuchten Gene eine rhythmische Expression aufweisen (Abb.3.22). Dieses Phänomen konnte auch in einer weiteren Studie beobachtet werden (Yagita et al., 2001). Möglicherweise werden nicht alle Gene über den gleichen Mechanismus induziert. So können z.B. Temperaturunterschiede oder Glucocorticoide auch eine rhythmische Expression hervorrufen, ohne eine vorherige extrem starke mPer1 Aktivierung (siehe Einleitung). Ebenso scheinen die Expressionsmuster auch in den verschiedenen

Gewebe unterschiedlich zu sein. So konnten Kume et al., (1999) nur für *mCry1* eine rhythmische Expression im suprachiasmatischen Nukleus nachweisen. Lee et al., (2001) beobachteten sowohl für *mCry1* als auch für *mCry2* circadiane Genexpression in der Leber, während *Clock* in keiner der untersuchten Gewebe eine rhythmische Expression zeigt.

Um die Funktion des Kern-Zytoplasma-Transportes zur posttranskriptionalen Regulation des circadianen Rhythmus zu untersuchen, wurden Transport-defiziente Mutanten von mPer1 stabil unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors exprimiert. Die Überexpression der Import-defizienten Mutante mPer1mutNLSΔC sollte dazu führen, dass mPer3 im Zytoplasma dieser Zellen festgehalten wird. Allerdings zeigte diese Mutante keinen Einfluss auf die circadiane Genexpression (Abb.3.24 und Abb.3.26D). Da in diesen Zellen nach wie vor endogenes mPer1 vorhanden ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Proteinmenge ausreichend ist, um weiterhin mPer3 in den Zellkern zu transportieren. Allerdings weisen mPer3 knock-out Mäuse auch nur ein geringfügig verändertes circadianes Verhalten auf. So ist bei diesen Mäusen der Rhythmus zwar um 0,5 h Stunden verkürzt, aber die Expression von *mPer1*, *mPer2* und *mCry1* bleibt unverändert (Shearman et al., 2000). MPer3 scheint also keine wichtige Rolle in der Regulation des circadianen Rhythmus zu spielen. Nicht nur auf der RNA-Ebene findet man in diesen Zellen eine rhythmische Expression, auch das überexprimierte mPer1mutNLSΔC wird, wie die Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, in die Regulation des circadianen Rhythmus aufgenommen. Allerdings kann man mit dieser Methode nicht zwischen dem Volllängenprotein und N-terminalen Degradationsprodukten unterscheiden, da die Proteinexpression mit einem Antikörper gegen das Myc Epitop am N-Terminus nachgewiesen wurde. In Western Blot Analysen konnten sehr viele Degradationprodukte detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Überexpression der Export-defizienten Mutante mPer1mutNES1,2 führt im Gegensatz zu der Import-defizienten Mutante mPer1mutNLSΔC zu einem Verlust circadianer Genexpression in NIH3T3 Zellen (Abb.3.25 und Abb.3. 26E). Wie die Injektionen in *Xenopus* Oozyten gezeigt haben, können mCry1 und mCry2 in Anwesenheit von mPer1mutNES1,2 nicht aus dem Zellkern exportiert werden. Die Überexpression dieser dominant-negativen mPer1 Mutante führt zu einer erhöhten Cryptochromkonzentration im Zellkern. Ein mPer1/Cry Repressorkomplex könnte also

konstitutiv im Zellkern den Ablauf der Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife stören und somit zu einer arrhythmischen Genexpression führen. Dass die Funktion der Cryptochrome zur Regulation des circadianen Rhythmus essentiell ist, konnte bereits durch knock-out Mäuse nachgewiesen werden. Während in *mCry1*^{-/-} Mäusen der Rhythmus um eine Stunde verlängert ist und im Gegensatz dazu der Rhythmus in *mCry2*^{-/-} Mäusen um eine Stunde verkürzt ist, führt ein knock-out von beiden Genen zu einem arrhythmischen Verhalten (Thresher et al., 1998; van der Horst et al., 1999; Vitaterna et al., 1999). Da mPer1 sowohl für den Export von mCry1 als auch für den Transport von mCry2 aus dem Zellkern notwendig ist, werden durch die Überexpression der dominant-negativen Mutante ebenfalls gleich beide Cryptochrome in ihrer Funktion verändert. Der Export von mCry1 und mCry2 ist also ein wichtiger Mechanismus zur Regulation des circadianen Rhythmus.

Um zu überprüfen, ob in der Tat der Export der Cryptochrome die entscheidene Rolle spielt, wurde eine Mutante von mPer1 eingesetzt, die nicht mehr an mCry1 und mCry2 binden kann. Die Überexpression von mPer1 Δ C führte den Erwartungen entsprechend nicht zu einer veränderten rhythmischen Expression (Abb.3.26F). Da nach der Injektion von mPer1 Δ C mit mCry1 oder mCry2 in *Xenopus* Oozyten kein Export der Cryptochrome stattfinden kann, könnte man annehmen, dass diese Proteine auch in NIH3T3 Zellen nicht mehr in das Zytoplasma transportiert werden können. Doch da mPer1 Δ C im Gegensatz zu mPer1mutNES1,2 nicht mit mCry1 und mCry2 interagieren kann, werden die Cryptochrome nicht im Komplex im Zellkern gehalten. Diese Proteine werden nach dem Serumschock in ihrer Funktion nicht beeinflusst und ein Transport kann weiterhin wie in nicht transfizierten Zellen mit dem endogenen mPer1 stattfinden.

Da mPer1 Δ C im Gegensatz zu der dominant-negativen Mutante mPer1mutNES1,2 sowohl importiert als auch exportiert werden kann und deshalb nicht im Zellkern akkumuliert, wurde eine weitere Zelllinie zu Kontrollzwecken eingesetzt. MPer1mutNES1,2 Δ C besitzt, bis auf die Fähigkeit Cryptochrome zu binden, die gleichen Eigenschaften wie die dominant-negative Mutante mPer1mutNES1,2. Da auch die Expression dieser Mutante keinen Einfluss auf die circadiane Genexpression in NIH3T3 Zellen hat, kann ausgeschlossen werden, dass die Akkumulation im Zellkern über andere Eigenschaften, wie z.B. eine Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt

über die PAS Domäne, entscheidend für das arrhythmische Verhalten von mPer1mutNES1,2 stabil transfizierten Zellen sind (Abb.3.26G).

Wurde mPer1 Wildtyp in NIH3T3 Zellen überexprimiert, konnte ein schwacher Effekt auf circadiane Genexpression beobachtet werden (Abb.3.23 und Abb.3.26C). MPer1 kann sowohl importiert als auch exportiert werden und bindet wie die dominant-negative Mutante mPer1mutNES1,2 an Cryptochrom. Da die Konzentration von mPer1 im Zellkern zunimmt, ist anzunehmen, dass im Zellkern auch vermehrt der mPer1/Cry Repressorkomplex gebildet wird. Im Gegensatz zur Überexpression von mPer1mutNES1,2 kann dieser Komplex aber in das Zytoplasma exportiert und auch degradiert werden. Die Analyse des überexprimierten Proteins durch Immunfluoreszenz zeigt auch, dass nach starker Expression mit nukleärer Lokalisation eine Phase (möglicherweise nach dem Export) mit geringer Expression und primär zytoplasmatischer Lokalisation folgt (Abb.3.28). Nach Betrachtung der Zykluslänge scheint die Überexpression von mPer1 eine Verlängerung des Rhythmus um 4 Stunden hervorzurufen. Interessanterweise zeigen im Gegensatz dazu mPer1 knock-out Mäuse einen verkürzten Rhythmus unter Licht:Dunkel Bedingungen und ein arrhythmisches Verhalten in konstanter Dunkelheit (Bae et al., 2001; Zheng et al., 2001).

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen lässt sich folgendes Modell postulieren (Abb.4.2). Die Expression der Period sowie der Cryptochrom Gene wird durch die Transkriptionsfaktoren Clock und Bmal1 aktiviert. Nach der Translation im Zytoplasma werden die Cryptochrome in den Zellkern transportiert. MPer1 und mPer2 werden zunächst im Zytoplasma phosphoryliert und ebenso wie mCry1 und mCry2 in den Zellkern importiert. MPer3 kann nicht alleine in den Zellkern gelangen. Der Kernimport von mPer3 kann ausschließlich im Heterodimer mit mPer1 erfolgen. Im Zellkern wird ein Repressorkomplex gebildet und inhibiert die Clock/Bmal1 vermittelte Transkription. Während am Ende der inhibitorischen Phase alle Period Proteine alleine bzw. als Homodimere in das Zytoplasma transportiert werden können, erfolgt der Export der Cryptochrome nur im Komplex mit mPer1. MCry1 und mCry2 können den Zellkern alleine nicht verlassen. Im Zytoplasma kann schließlich die Degradation der Proteine erfolgen.

Abb.4.1 Der Kern-Zytoplasma Transport im circadianen Rhythmus

Der Mechanismus in der biologischen Uhr besteht aus einer autoregulatorischen Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife, bei der Clock (hellgrün) und Bmal1 (blaugrün) die Transkription der inhibitorischen Komponenten Period und Cryptochrom über die Bindung an E-Boxen aktivieren. Per1 (blau) und Per2 (dunkelgrün) werden im Zytoplasma phosphoryliert und in den Zellkern zurück transportiert. Per3 (gelb) kann nur im Komplex mit Per1 importiert werden und der Transport dieses Heterodimers erfolgt über die NLS Funktion in mPer1. Auch mCry1/2 (rot) gelangt nach der Translation zurück in den Zellkern. Dort bilden Period und Cryptochrom Proteine einen Komplex mit Clock und Bmal1 und inhibieren ihre eigene Transkription. Während alle Period Proteine den Zellkern alleine bzw. Homodimere wieder verlassen können, werden beide Cryptochrome ausschließlich im Komplex mit mPer1 exportiert, wo eine Degradation der Proteine erfolgen kann.

4.5 Ausblick

Durch diese Arbeit konnte ein neuer Einblick in die Transportprozesse zur Regulation des circadianen Rhythmus gewonnen werden. Insbesondere dem Kernexport der Cryptochrome im Komplex mit mPer1 konnte dabei eine wichtige Rolle zugesprochen werden, so dass zusammen mit den Kenntnissen aus der Literatur ein Modell über den Kern-Zytoplasma-Transport in der biologischen Uhr entworfen werden konnte. Dennoch bleiben einige Fragen unklar.

Es besteht zwar eine enge Korrelation zwischen Phosphorylierung und Kernimport, aber dennoch stellt sich die Frage, ob eine Phosphorylierung absolut notwendig ist, um den Transport in den Zellkern zu ermöglichen. Ist dies der Fall, sollte weiterhin untersucht

werden, ob neben der Casein Kinase Iε noch weitere Proteinkinasen eine Rolle für den Kern-Zytoplasma Transport spielen. So beeinflusst z.B in *Drosophila* Shaggy, ein Homolog zur Glycogen-Synthase Kinase 3β, ebenfalls den Import in den Zellkern (Martinek et al., 2001). Durch Sequenzanalyse konnten mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für GSK3β in dem mPer1 Gen identifiziert werden. Weiterhin wurde kürzlich in *Drosophila* gezeigt, dass eine Protein Phosphatase ebenfalls eine Rolle im circadianen Rhythmus spielt (Sathyanarayanan et al., 2004). Da der Export der Period Proteine wohl keine Phosphorylierung benötigt, könnte weiterhin untersucht werden, ob eine Phosphorylierung diese Proteine im Zellkern hält und der Transport in das Zytoplasma nur in einer nicht phosphorylierten Form stattfinden kann.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde die Regulation des Kern-Zytoplasma Transportes bisher möglicherweise durch die Nutzung unterschiedlicher Zellsysteme nicht immer auf die gleiche Weise dargestellt. In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse zwar in verschiedenen Systemen verifiziert werden, aber dennoch wäre es interessant, wenn man den Transport im lebenden Organismus unter Licht:Dunkel Bedingungen verfolgen könnte, um so auch analysieren zu können, zu welcher Tageszeit der Import oder der Export stattfindet.

In dieser Arbeit wurde mPer1 als Transportadapter für den Import von mPer3 und für den Export der Cryptochrom Proteine identifiziert. Neben dieser Funktion konnte für mPer1 aber auch für die anderen Period Proteinen eine Repressoraktivität für die Clock/Bmal1 vermittelte Transkription nachgewiesen werden. Allerdings wirkten sowohl mCry1 als auch mCry2 in Luziferaseanalysen als wesentlich stärkere Repressoren (Griffin et al., 1999; Kume et al., 1999). Da ebenfalls auch alle diese Proteine miteinander interagieren können, stellt sich weiterhin die Frage, welche Komplexe nun tatsächlich *in vivo* die Clock/Bmal1 vermittelte Transkription inhibieren.

5 Zusammenfassung

Der circadiane Rhythmus reguliert viele biochemische und physiologische Prozesse mit einer 24 h Periodizität. Der molekulare Mechanismus der Regulation der biologischen Uhr liegt in einer autoregulatorischen Transkriptions- und Translations- Rückkopplung begründet, bei der positive Elemente die Transkription der negativen Komponenten aktivieren, die dann nach der Translation im Zytoplasma in den Zellkern zurückkehren, um ihre eigene Transkription wieder zu inhibieren. Da der Transportprozeß dabei eine wichtige regulatorische Ebene definieren könnte, wurde der nukleozytoplasmatische Transport in dieser Arbeit näher untersucht.

In dem ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde unter zur Hilfenahme der Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Oozyten und der Transfektion in HeLa Zellen der Import circadianer Proteine untersucht. So konnte in beiden Systemen nachgewiesen werden, daß mPer1 und mPer2 bereits alleine oder als Homodimere in den Zellkern gelangen, während mPer3 nur im Heterodimer mit mPer1 importiert wird. Für den Transport in den Zellkern konnte in allen drei Period Proteinen die Existenz eines basischen Kernlokalisierungssignals, welches in mPer3 nur in einem Subfragment aktiv ist, funktionell verifiziert werden. Zusätzlich wurde in mPer1 ein neues nicht basisches Kernlokalisierungssignal identifiziert, welches sowohl in *Xenopus* Oozyten als auch in HeLa Zellen aktiv ist.

Für den Transport aus dem Zellkern von *Xenopus* Oozyten konnte gezeigt werden, daß alle drei Period Proteine alleine bzw. als Homodimere exportiert werden können. Zwei Leucin-reiche konservierte Exportsignale konnten in mPer1 bestätigt werden. Als Heterodimerisierungsdomäne mit beiden Cryptochrom Proteinen konnte ein C-terminaler Bereich in mPer1 identifiziert werden, der mittlerweile auch in mPer2 nachgewiesen wurde. Weiterhin wurde gezeigt, dass mCry1 und mCry2 zwar als Homodimere in den Zellkern von *Xenopus* Oozyten gelangen, aber nur im Heterodimer mit mPer1 exportiert werden können.

Für die funktionelle Analyse des nukleozytoplasmatischen Transports im circadianen Rhythmus wurden Import- sowie Export-defiziente mPer1 Mutanten erstellt, die in

Maus Fibroblasten stabil transfiziert wurden. Der circadiane Rhythmus wurde in den synchronisierten Zellen mittels semiquantitative RT-PCR und real time PCR untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der mPer1 vermittelte Export von mCry1 und mCry2 aus dem Zellkern von Maus Fibroblasten entscheidend für die Regulation des circadianen Rhythmus in diesen Zellen ist.

6 Literaturverzeichnis

- Akashi, M. and Nishida, E. (2000) Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev*, **14**, 645-649.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T. and Nishida, E. (2002) Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 1693-1703.
- Akhtar, R.A., Reddy, A.B., Maywood, E.S., Clayton, J.D., King, V.M., Smith, A.G., Gant, T.W., Hastings, M.H. and Kyriacou, C.P. (2002) Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol*, **12**, 540-550.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G. and Lee, C.C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell*, **91**, 1055-1064.
- Allada, R., Emery, P., Takahashi, J.S. and Rosbash, M. (2001) Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1091-1119.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2001) Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, **30**, 525-536.
- Balsalobre, A. (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*, **309**, 193-199.
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schutz, G. and Schibler, U. (2000a) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, **289**, 2344-2347.
- Balsalobre, A., Damiola, F. and Schibler, U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, **93**, 929-937.
- Balsalobre, A., Marcacci, L. and Schibler, U. (2000b) Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Curr Biol*, **10**, 1291-1294.
- Bao, S., Rihel, J., Bjes, E., Fan, J.Y. and Price, J.L. (2001) The *Drosophila* double-timeS mutation delays the nuclear accumulation of period protein and affects the feedback regulation of period mRNA. *J Neurosci*, **21**, 7117-7126.
- Baylies, M.K., Bargiello, T.A., Jackson, F.R. and Young, M.W. (1987) Changes in abundance or structure of the per gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature*, **326**, 390-392.

- Berson, D.M., Dunn, F.A. and Takao, M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, **295**, 1070-1073.
- Blau, J. and Young, M.W. (1999) Cycling vrille expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell*, **99**, 661-671.
- Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenin, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S. and Bradfield, C.A. (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, **103**, 1009-1017.
- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D.M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z. and Keesler, G.A. (2001) Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Lett*, **489**, 159-165.
- Chang, D.C. and Reppert, S.M. (2003) A novel C-terminal domain of drosophila PERIOD inhibits dCLOCK:CYCLE-mediated transcription. *Curr Biol*, **13**, 758-762.
- Cheng, M.Y., Bullock, C.M., Li, C., Lee, A.G., Bermak, J.C., Belluzzi, J., Weaver, D.R., Leslie, F.M. and Zhou, Q.Y. (2002) Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, **417**, 405-410.
- Crews, S.T., Thomas, J.B. and Goodman, C.S. (1988) The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell*, **52**, 143-151.
- Cyran, S.A., Buchsbaum, A.M., Reddy, K.L., Lin, M.C., Glossop, N.R., Hardin, P.E., Young, M.W., Storti, R.V. and Blau, J. (2003) vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, **112**, 329-341.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F. and Schibler, U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, **14**, 2950-2961.
- Darlington, T.K., Wager-Smith, K., Ceriani, M.F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T.D., Weitz, C.J., Takahashi, J.S. and Kay, S.A. (1998) Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science*, **280**, 1599-1603.
- Delaunay, F., Thisse, C., Marchand, O., Laudet, V. and Thisse, B. (2000) An inherited functional circadian clock in zebrafish embryos. *Science*, **289**, 297-300.
- Drutel, G., Kathmann, M., Heron, A., Schwartz, J.C. and Arrang, J.M. (1996) Cloning and selective expression in brain and kidney of ARNT2 homologous to the Ah receptor nuclear translocator (ARNT). *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 333-339.

- Duffield, G.E., Best, J.D., Meurers, B.H., Bittner, A., Loros, J.J. and Dunlap, J.C. (2002) Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol*, **12**, 551-557.
- Dumont, J.N. (1972) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*, **136**, 153-179.
- Dunlap, J.C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, **96**, 271-290.
- Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C. and Rosbash, M. (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, **95**, 669-679.
- Filipski, E., King, V.M., Li, X., Granda, T.G., Mormont, M.C., Liu, X., Claustrat, B., Hastings, M.H. and Levi, F. (2002) Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst*, **94**, 690-697.
- Freedman, M.S., Lucas, R.J., Soni, B., von Schantz, M., Munoz, M., David-Gray, Z. and Foster, R. (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*, **284**, 502-504.
- Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P. and Lee, C. (2002) The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, **111**, 41-50.
- Fukada, Y. (2003) Molecular oscillation behind the clockface. *J Biochem (Tokyo)*, **134**, 773-775.
- Gao, Z.H., Seeling, J.M., Hill, V., Yochum, A. and Virshup, D.M. (2002) Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the beta-catenin degradation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1182-1187.
- Gekakis, N., Saez, L., Delahaye-Brown, A.M., Myers, M.P., Sehgal, A., Young, M.W. and Weitz, C.J. (1995) Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science*, **270**, 811-815.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S. and Weitz, C.J. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, **280**, 1564-1569.
- Glossop, N.R., Houl, J.H., Zheng, H., Ng, F.S., Dudek, S.M. and Hardin, P.E. (2003) VRILLE feeds back to control circadian transcription of Clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron*, **37**, 249-261.
- Gooley, J.J., Lu, J., Chou, T.C., Scammell, T.E. and Saper, C.B. (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci*, **4**, 1165.
- Griffin, E.A., Jr., Staknis, D. and Weitz, C.J. (1999) Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science*, **286**, 768-771.

- Grima, B., Lamouroux, A., Chelot, E., Papin, C., Limbourg-Bouchon, B. and Rouyer, F. (2002) The F-box protein slimb controls the levels of clock proteins period and timeless. *Nature*, **420**, 178-182.
- Grundschober, C., Delaunay, F., Puhhofer, A., Triqueneaux, G., Laudet, V., Bartfai, T. and Nef, P. (2001) Circadian regulation of diverse gene products revealed by mRNA expression profiling of synchronized fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 46751-46758.
- Hamilton, T. (1969) Influence of environmental light and melatonin upon mammary tumour induction. *Br J Surg*, **56**, 764-766.
- Hannibal, J. and Fahrenkrug, J. (2004) Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res*, **316**, 99-113.
- Hansen, J. (2001a) Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. *Epidemiology*, **12**, 74-77.
- Hansen, J. (2001b) Light at night, shiftwork, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1513-1515.
- Hardin, P.E., Hall, J.C. and Rosbash, M. (1990) Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, **343**, 536-540.
- Harmar, A.J. (2003) An essential role for peptidergic signalling in the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nuclei. *J Neuroendocrinol*, **15**, 335-338.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M. and Yau, K.W. (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, **295**, 1065-1070.
- Hsu, D.S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R.P., Todo, T., Wei, Y.F. and Sancar, A. (1996) Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry*, **35**, 13871-13877.
- Hunter-Ensor, M., Ousley, A. and Sehgal, A. (1996) Regulation of the *Drosophila* protein timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell*, **84**, 677-685.
- Ikeda, M. and Nomura, M. (1997) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 258-264.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. and Gorlich, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J*, **16**, 6535-6547.

- Kaneko, M. and Hall, J.C. (2000) Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *J Comp Neurol*, **422**, 66-94.
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, **89**, 641-653.
- Kloss, B., Price, J.L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C.S. and Young, M.W. (1998) The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase epsilon. *Cell*, **94**, 97-107.
- Kloss, B., Rothenfluh, A., Young, M.W. and Saez, L. (2001) Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period, and timeless in the *Drosophila* clock. *Neuron*, **30**, 699-706.
- Kobayashi, K., Kanno, S., Smit, B., van der Horst, G.T., Takao, M. and Yasui, A. (1998) Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res*, **26**, 5086-5092.
- Koebernick, K. (2000) Identifikation und funktionelle Analyse von Elementen der Hedgehog Signaltransduktionskaskade in *Xenopus laevis*. Dissertation, Universität Göttingen
- Koike, N., Hida, A., Numano, R., Hirose, M., Sakaki, Y. and Tei, H. (1998) Identification of the mammalian homologues of the *Drosophila* timeless gene, Timeless1. *FEBS Lett*, **441**, 427-431.
- Konopka, R.J. and Benzer, S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 2112-2116.
- Kramer, A., Yang, F.C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T.E., Davis, F.C. and Weitz, C.J. (2001) Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science*, **294**, 2511-2515.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H. and Reppert, S.M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, **98**, 193-205.
- Lavery, D.J., Lopez-Molina, L., Margueron, R., Fleury-Olela, F., Conquet, F., Schibler, U. and Bonfils, C. (1999) Circadian expression of the steroid 15 alpha-hydroxylase (Cyp2a4) and coumarin 7-hydroxylase (Cyp2a5) genes in mouse liver is regulated by the PAR leucine zipper transcription factor DBP. *Mol Cell Biol*, **19**, 6488-6499.
- Lee, C., Bae, K. and Edery, I. (1999) PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/dBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol Cell Biol*, **19**, 5316-5325.

- Lee, C., Etchegaray, J.P., Cagampang, F.R., Loudon, A.S. and Reppert, S.M. (2001a) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, **107**, 855-867.
- Lee, C., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (2004) Direct association between mouse PERIOD and CKIepsilon is critical for a functioning circadian clock. *Mol Cell Biol*, **24**, 584-594.
- Lee, E., Salic, A. and Kirschner, M.W. (2001b) Physiological regulation of [beta]-catenin stability by Tcf3 and CKIepsilon. *J Cell Biol*, **154**, 983-993.
- Li, J.C. and Xu, F. (1997) Influences of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin. *Biol Signals*, **6**, 77-89.
- Lin, J.M., Kilman, V.L., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M. and Allada, R. (2002) A role for casein kinase 2alpha in the Drosophila circadian clock. *Nature*, **420**, 816-820.
- Lopez-Molina, L., Conquet, F., Dubois-Dauphin, M. and Schibler, U. (1997) The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior. *Embo J*, **16**, 6762-6771.
- Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M. and Takahashi, J.S. (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, **288**, 483-492.
- Lucas, R.J., Hattar, S., Takao, M., Berson, D.M., Foster, R.G. and Yau, K.W. (2003) Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science*, **299**, 245-247.
- Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A.S. and Young, M.W. (2001) A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the Drosophila circadian clock. *Cell*, **105**, 769-779.
- McNamara, P., Seo, S.P., Rudic, R.D., Sehgal, A., Chakravarti, D. and FitzGerald, G.A. (2001) Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: a humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell*, **105**, 877-889.
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y. and Okamura, H. (2001) Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev*, **15**, 995-1006.
- Miyamoto, Y. and Sancar, A. (1998) Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6097-6102.

- Miyazaki, K., Mesaki, M. and Ishida, N. (2001) Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. *Mol Cell Biol*, **21**, 6651-6659.
- Morin, P.J. (1999) beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays*, **21**, 1021-1030.
- Motzkus, D., Maronde, E., Grunenberg, U., Lee, C.C., Forssmann, W. and Albrecht, U. (2000) The human PER1 gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett*, **486**, 315-319.
- Mueller, C.R., Maire, P. and Schibler, U. (1990) DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally. *Cell*, **61**, 279-291.
- Myers, M.P., Wager-Smith, K., Rothenfluh-Hilfiker, A. and Young, M.W. (1996) Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the Drosophila circadian clock. *Science*, **271**, 1736-1740.
- Naidoo, N., Song, W., Hunter-Ensor, M. and Sehgal, A. (1999) A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science*, **285**, 1737-1741.
- Nawathean, P. and Rosbash, M. (2004) The doubletime and CKII kinases collaborate to potentiate Drosophila PER transcriptional repressor activity. *Mol Cell*, **13**, 213-223.
- Obrietan, K., Impey, S. and Storm, D.R. (1998) Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci*, **1**, 693-700.
- Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S. and Hogenesch, J.B. (2002a) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, **109**, 307-320.
- Panda, S., Provencio, I., Tu, D.C., Pires, S.S., Rollag, M.D., Castrucci, A.M., Pletcher, M.T., Sato, T.K., Wiltshire, T., Andahazy, M., Kay, S.A., Van Gelder, R.N. and Hogenesch, J.B. (2003) Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. *Science*, **301**, 525-527.
- Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio, I. and Kay, S.A. (2002b) Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science*, **298**, 2213-2216.
- Preitner, N., Brown, S., Ripperger, J., Le-Minh, N., Damiola, F. and Schibler, U. (2003) Orphan nuclear receptors, molecular clockwork, and the entrainment of peripheral oscillators. *Novartis Found Symp*, **253**, 89-99; discussion 99-109.
- Price, J.L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B. and Young, M.W. (1998) double-time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*, **94**, 83-95.

- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W.J., Hayes, W.P. and Rollag, M.D. (1998) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 340-345.
- Provencio, I., Rollag, M.D. and Castrucci, A.M. (2002) Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature*, **415**, 493.
- Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, **418**, 935-941.
- Ripperger, J.A., Shearman, L.P., Reppert, S.M. and Schibler, U. (2000) CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. *Genes Dev*, **14**, 679-689.
- Rothenfluh, A., Young, M.W. and Saez, L. (2000) A TIMELESS-independent function for PERIOD proteins in the Drosophila clock. *Neuron*, **26**, 505-514.
- Ruby, N.F., Brennan, T.J., Xie, X., Cao, V., Franken, P., Heller, H.C. and O'Hara, B.F. (2002) Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science*, **298**, 2211-2213.
- Rupp, R.A., Snider, L. and Weintraub, H. (1994) Xenopus embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev*, **8**, 1311-1323.
- Saez, L. and Young, M.W. (1996) Regulation of nuclear entry of the Drosophila clock proteins period and timeless. *Neuron*, **17**, 911-920.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (Hrsg.) Molekular cloning. A laboratory manual. CSH press (1989)
- Sanada, K., Okano, T. and Fukada, Y. (2002) Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. *J Biol Chem*, **277**, 267-271.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (12), 5463-7.
- Sangoram, A.M., Saez, L., Antoch, M.P., Gekakis, N., Staknis, D., Whiteley, A., Fruechte, E.M., Vitaterna, M.H., Shimomura, K., King, D.P., Young, M.W., Weitz, C.J. and Takahashi, J.S. (1998) Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron*, **21**, 1101-1113.
- Sathyanarayanan, S., Zheng, X., Xiao, R. and Sehgal, A. (2004) Posttranslational Regulation of Drosophila PERIOD Protein by Protein Phosphatase 2A. *Cell*, **116**, 603-615.
- Schernhammer, E.S., Laden, F., Speizer, F.E., Willett, W.C., Hunter, D.J., Kawachi, I. and Colditz, G.A. (2001) Rotating night shifts and risk of breast cancer in

- women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1563-1568.
- Schwarz-Romond, T., Asbrand, C., Bakkers, J., Kuhl, M., Schaeffer, H.J., Huelsken, J., Behrens, J., Hammerschmidt, M. and Birchmeier, W. (2002) The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase Iepsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes Dev*, **16**, 2073-2084.
- Sehgal, A., Price, J.L., Man, B. and Young, M.W. (1994) Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science*, **263**, 1603-1606.
- Shearman, L.P., Jin, X., Lee, C., Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2000) Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol*, **20**, 6269-6275.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F., Jr. and Reppert, S.M. (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, **19**, 1261-1269.
- Stanewsky, R., Frisch, B., Brandes, C., Hamblen-Coyle, M.J., Rosbash, M. and Hall, J.C. (1997) Temporal and spatial expression patterns of transgenes containing increasing amounts of the *Drosophila* clock gene period and a lacZ reporter: mapping elements of the PER protein involved in circadian cycling. *J Neurosci*, **17**, 676-696.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbash, M. and Hall, J.C. (1998) The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, **95**, 681-692.
- Stokkan, K.A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. and Menaker, M. (2001) Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, **291**, 490-493.
- Storch, K.F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F.C., Wong, W.H. and Weitz, C.J. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, **417**, 78-83.
- Sun, Z.S., Albrecht, U., Zhuchenko, O., Bailey, J., Eichele, G. and Lee, C.C. (1997) RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell*, **90**, 1003-1011.
- Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N. and Fujii-Kuriyama, Y. (1998) Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun*, **248**, 789-794.
- Takano, A., Shimizu, K., Kani, S., Buijs, R.M., Okada, M. and Nagai, K. (2000) Cloning and characterization of rat casein kinase Iepsilon. *FEBS Lett*, **477**, 106-112.

- Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yagita, K., Maebayashi, Y., Sakakida, Y., Okumura, K., Takashima, N. and Okamura, H. (1998) A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells*, **3**, 167-176.
- Takumi, T., Nagamine, Y., Miyake, S., Matsubara, C., Taguchi, K., Takekida, S., Sakakida, Y., Nishikawa, K., Kishimoto, T., Niwa, S., Okumura, K. and Okamura, H. (1999) A mammalian ortholog of *Drosophila* timeless, highly expressed in SCN and retina, forms a complex with mPER1. *Genes Cells*, **4**, 67-75.
- Tamaru, T., Isojima, Y., Yamada, T., Okada, M., Nagai, K. and Takamatsu, K. (2000) Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J Neurosci*, **20**, 7525-7530.
- Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose, M. and Sakaki, Y. (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature*, **389**, 512-516.
- Terns, M.P. and Goldfarb, D.S. (1998) Nuclear transport of RNAs in microinjected *Xenopus* oocytes. *Methods Cell Biol*, **53**, 559-589.
- Thresher, R.J., Vitaterna, M.H., Miyamoto, Y., Kazantsev, A., Hsu, D.S., Petit, C., Selby, C.P., Dawut, L., Smithies, O., Takahashi, J.S. and Sancar, A. (1998) Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science*, **282**, 1490-1494.
- Toh, K.L., Jones, C.R., He, Y., Eide, E.J., Hinz, W.A., Virshup, D.M., Ptacek, L.J. and Fu, Y.H. (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, **291**, 1040-1043.
- Tsuchiya, Y., Akashi, M. and Nishida, E. (2003) Temperature compensation and temperature resetting of circadian rhythms in mammalian cultured fibroblasts. *Genes Cells*, **8**, 713-720.
- Tsuchiya, Y. and Nishida, E. (2003) Mammalian cultured cells as a model system of peripheral circadian clocks. *J Biochem (Tokyo)*, **134**, 785-790.
- Ueda, H.R., Chen, W., Adachi, A., Wakamatsu, H., Hayashi, S., Takasugi, T., Nagano, M., Nakahama, K., Suzuki, Y., Sugano, S., Iino, M., Shigeyoshi, Y. and Hashimoto, S. (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, **418**, 534-539.
- van de Wetering, M., de Lau, W. and Clevers, H. (2002) WNT signaling and lymphocyte development. *Cell*, **109 Suppl**, S13-19.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. and Yasui, A. (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, **398**, 627-630.

- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.H. and Virshup, D.M. (2000) Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol*, **20**, 4888-4899.
- Vielhaber, E.L., Duricka, D., Ullman, K.S. and Virshup, D.M. (2001) Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. *J Biol Chem*, **276**, 45921-45927.
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W. and Takahashi, J.S. (1994) Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science*, **264**, 719-725.
- Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E.M., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., Takahashi, J.S. and Sancar, A. (1999) Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 12114-12119.
- Williams, J.A. and Sehgal, A. (2001) Molecular components of the circadian system in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol*, **63**, 729-755.
- Yagita, K. and Okamura, H. (2000) Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett*, **465**, 79-82.
- Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G.T. and Okamura, H. (2001) Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science*, **292**, 278-281.
- Yagita, K., Tamanini, F., Yasuda, M., Hoeijmakers, J.H., van der Horst, G.T. and Okamura, H. (2002) Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *Embo J*, **21**, 1301-1314.
- Yagita, K., Yamaguchi, S., Tamanini, F., van Der Horst, G.T., Hoeijmakers, J.H., Yasui, A., Loros, J.J., Dunlap, J.C. and Okamura, H. (2000) Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. *Genes Dev*, **14**, 1353-1363.
- Yamaguchi, S., Mitsui, S., Yan, L., Yagita, K., Miyake, S. and Okamura, H. (2000) Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol*, **20**, 4773-4781.
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G.D., Sakaki, Y., Menaker, M. and Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, **288**, 682-685.
- Young, M.W. (1998) The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *Drosophila*. *Annu Rev Biochem*, **67**, 135-152.
- Yu, W., Nomura, M. and Ikeda, M. (2002) Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem Biophys Res Commun*, **290**, 933-941.

-
- Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z.S., Eichele, G., Bradley, A. and Lee, C.C. (2001) Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell*, **105**, 683-694.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Levine, J.D., Jin, X., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1998a) Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron*, **21**, 1115-1122.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R. and Reppert, S.M. (1998b) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, **20**, 1103-1110.

7 Anhang

	1					60
mPer1	MSGPLEGADG	GGDPRPGEPF	CPGGVPSPGA	PQHRPCPGPS	LADDTDANSN	GSSGNESNGP
mPer2		MNG	YVDFSPS-PT	SP--TKEPGA	PQ----PTQA	VLQEDVDMSS
mPer3						GSSGNENCS-
	61					120
mPer1	ESRGASQRSS	HSSSSGNGKD	SALLETTESS	KSTNSQSPSP	PSSSIAYSL	SASSEQDNPS
mPer2	----TGRDSQ	GSDCDDNGKE	LRML--VESS	NTH-----	PSPDDAFRLM	MTEAEH-NPS
mPer3			MD	PCGDPAPVGG	DCPQTRGPGL	QGASGQEGPL
	121					180
mPer1	TSGC---SS	EQSARARTQK	ELMTALRELK	LRLPPERRGK	GRSGTLATLQ	YALACVKQVQ
mPer2	TSGC---SS	EQSAKADAHK	ELIRTLKELK	VHLPADKKAK	GKASTLATLK	YALRSVKQVK
mPer3	QGTCDVSSH	EHEDNRMSE	ELIMVVQEMK	KYFPAERHTK	--PSTLDALN	YALRCVHSVQ
			NES in mPer2			
	181					240
mPer1	ANQEYYQWS	LEEGEPCAMD	MSTYTLLEE	HITSEYTLRN	QDTFSVAVSF	LTGRIVYISE
mPer2	ANEYYQLLM	SSESQPCSV	VPSYSMEQVE	GITSEYIVKN	ADMFAVAVSL	VSGKILYISN
mPer3	ANSDFQSLG	PRGAHQ--D	VTVYSLEDLT	ALASEHTSKN	TDTFAAVFSF	LSGRLVHISE
					PAS A	
	241					300
mPer1	QAGVLLRCKR	DVFRGARFSE	LLAPQDVGVF	YGSTTPSRLP	TWGTGTSAGS	GLKDFTQEK
mPer2	QVASIFHCKK	DAFSDAKFVE	FLAPHDVSVF	HSYTTPYKLP	PWSVCSGLDS	FTQECMEKS
mPer3	QAALILNSKR	GFLKSVHFVD	LLAPQDVRAF	YAHTAPTQLP	FWNNTQTRAS	-QYECAPAKP
	301					360
mPer1	VFCRIRGGPD	RDGPRIYQPF	RLTPYVTKIR	VSDGAPAPQC	CLLIAERIHS	GYEAPRIPPD
mPer2	FFCRVSVGKH	HENEIRYQPF	RMTPLYLVKVQ	EQQGAESQLC	CLLLAERVHS	GYEAPRIPE
mPer3	FFCRICGGD	REKR-HYSPF	RILPYLVHVH	SSAQPEPEPC	CLTLVEKIH	GYEAPRIPVD
	361					420
mPer1	KRIFTTRHTP	SCLFQDVDER	AAPLLGYLPQ	DLGAPVLLF	LHPEDRPLML	AIHKILQLA
mPer2	KRIFTTHTP	NCLFQAVDER	AVPLLGYLPQ	DLIETPVLVQ	LHPSDRPLML	AIHKILQAG
mPer3	KRIFTTHTP	GCVFLEVDER	AVPLLGYLPQ	DLIGTSILTY	LHPEDRPLMV	AIHQVLYKYA
			PAS B			
	421					480
mPer1	GQP-FDHSPI	RFCARNGEYV	TMDTSWAGFV	HPWSRKVAFV	LGRHKVRTAP	LNEDVFTPPA
mPer2	GQP-FDYSPI	RFRTRNGEYI	TLDTSWSSFI	NPWSRKISFI	IGRHKVRVGP	LNEDVFAAPP
mPer3	GHPPFEHSPV	RFCQNGEYV	ILDSSWSSFV	NPWSRKVSFI	IGRHKVRTSP	LNEDVFAT-R
	481					540
mPer1	PSPAPSLDSD	IQELSEQIHR	LLLQPVHSSS	PTGLCGVGPL	MSPGPLHSPG	SSSDSNGGDA
mPer2	CPEEKTPHPS	VQELTEQIHR	LLMQPVPHSG	SSGYGSLGSN	GSHEHLMSQT	SSSDSNGQEE
mPer3	IKKAASNDKD	IAELSEQIHK	LLLQPVHASA	SSGYGSLGSS	GSQEQHVSIT	SSSESSGHCP
		NES				
	541					600
mPer1	EGPGPPAPVT	FQQICKDVHL	VKHQGGQLFI	ESRAKPPPRP	RLLATGTFFKA	KVLPCQSPNP
mPer2	SHRRRSGIFK	TSGKIQTKSH	VSHESGGQKE	ASVAEMQSSP	-----PA	QVKAVTTIER
mPer3	E-EGQHEQMT	LQQVYASVNK	IKNVGQQLYI	ESMARSSVKP	----VAETCV	EPQGGDEQKD
	601					660
mPer1	ELEVAPVPDQ	ASLALAPEEP	ERKETSGCSY	QQINCLDSIL	RYLESCNIPS	TTKRKCASSS
mPer2	DSSGASLPK-	---ASFPEEL	AYKNQPPCSY	QQISCLDSVI	RYLESCSEAA	TLKRKCEFP
mPer3	FSSSQTLKNK	STTDTGSGGN	LQQEQPSSSY	QQMNCIDSVI	RYLTSYSLPA	-LKRKCISCT
	661					720
mPer1	SYTASSASDD	DKQRAGPVPV	GAKKDPSSAM	LSGEGATPRK	EPVVGGLTSP	LALANKAESV
mPer2	NIPSRKATVS	PGLHSGEAA	PSK-----	-----VTSHT	E--VSAHLSS	LTLPKGAESV
mPer3	NTSSSSEAK	PIPEVDSSQR	DTEQLLDIRK	QETTGPSTDI	EGGAARTLST	AAL-----SV
			CKI & binding domain			

	721						780
mPer1	VSVTSQCSFS	STIVHVGDKK	PPESDIIMME	DLPGLAPGPA	PSPAPSPTVA	PDPTPDAYRF	
mPer2	VSLTSQCSYS	STIVHVGDKK	PQPE----LE	TVEDMASGPE	SLDGAAGGLS	QEKGP--LQK	
mPer3	ASGISQCSCS	STSGHA----	PP-----	-LQSESVAVA	CKPWALRTKA	SHLAAGGFKH	
	781						840
mPer1	VGLTKAVLSL	HTQKEEQAFI	NRFRDLGRLR	GL-----	-DTSSVAPSA	PGCHH-GPI	
mPer2	LGLTKAVLSL	HTQKEEQGFL	QRFREVSRLS	ALQAHCQNYL	QERSRAQASD	RGLRNTSGLE	
mPer3	VGLTAAVLSA	HTQKEEQNYV	DRFREKILTS	PYGCYL----	-QQESNRRAQ	YSCVQAGSTA	
	841						900
mPer1	PGRRHCRSK	AKRSRHHHQ	TPRPETPCY-	-VSHPSVP-	-SSGPWPPP	AT-----TP	
mPer2	SSWKKTGKNR	KLKSKRVKTR	DSSESTGSGG	PVSHRPPLMG	LNATAWSPD	TSQSSCPSAP	
mPer3	KHSRCAGSER	QKHKKKLPA	PVDTSSPGAH	LCPHVTGLLP	-DEQHWGSA	SPSPLGAGLA	
		NLS					
	901						960
mPer1	FAMVQPYPL	PVFSRPG---	--GPQPLPPA	PT-----	-----S	VSPATFPSPL	
mPer2	FPTAVPAYPL	PVFQAPGIVS	TPGTVVAPPA	ATHTGFTMPV	VPMGTQPEFA	VQPLPFAAPL	
mPer3	FPSALVVP SQ	TPYLLPSFPL	QDMASQGVGV	SAAWGAAAGC	PPLSAGPQ--	-AVAAFPSAY	
	961						1020
mPer1	VTFMVALVLP	NYLFP--TP-	-----PSY	YGVSQAPVEG	PPTPASHSPS	PS----LPPP	
mPer2	A-PVMAFMLP	SYPFPPATPN	LPQAFLPSQP	HFPAPHTLAS	EITPASQAEF	PSRTSTLRQP	
mPer3	VDLTMTIFLH	NAPLFPLWPP	-----SFSP	YPSLGAAGSS	ELAPLVPA	PNPEPTTSGH	
	1021						1080
mPer1	---PLSPPH-	-----RPDSP	LFNSRCSPL	QLNLLQLEES	PRTEGGAAA-	-GGPGSSAGP	
mPer2	CACPVTPPAG	TVALGRASPP	LFQSRGSSPL	QLNLLQLEEA	PEGSTGAAGT	LGTTGTAASG	
mPer3	SQRRVEENWE	A---HSEELP	FISSRSSSPL	QLNLLQ-EEM	PAPSESADAV	RRGAGPDAKH	
			NES				
	1081						1140
mPer1	LPPSEETA--	-EPEARLV--	EVTESSNQDA	LSGSSDLLEL	LLQEDSRSGT	GSAASGSLGS	
mPer2	LDCTSGTSDR	RQPKAPPTCN	EPSDTQNSDA	ISTSSDLLNL	LLGEDLCSAT	GSAASRSGAS	
mPer3	-----	-----	-----	-----	-----HCVT	GPSGSRSRHC	
	1141						1200
mPer1	GLGSGSGSGS	HEGGSTSASI	TRSSQSSTHS	KYFGSIDSSE	AEAGAARAR-	TEPGDQVIKC	
mPer2	ATSDSLGSSS	L-GFGTSQSG	AGSDTSHTS	KYFGSIDSSE	NNHKAKMIPD	TEESEQFIKY	
mPer3	TSGELATATA	H-----QES	AAASGSSASS	IYFSSTDYAS	EVSENRQRPQ	DRQRDEALPG	
	1201						1260
mPer1	VLQDPIWLLM	ANADQVRVMT	YQVPSRDAAS	VLKQDRERLR	AMQKQPRFS	EDQRRELGA	
mPer2	VLQDPIWLLM	ANTDSDIMMT	YQLPSRDLQA	VLKEDQEKLK	LLQRSQPRFT	EGQRRELREV	
mPer3	AAEESIWRMI	ERTPECVLMT	YQVPERGREE	VLKQDLEKLQ	SMEQQQLFS	PAQREELAKV	
			Cry binding domain/NLS2 in mPer1				
	1261						1320
mPer1	HSWVRKGQLP	RALDVMACVD	CGSSVQDPGH	SDDPLFSELD	GLGLEPMEEG	GGEGGGCGVG	
mPer2	HPWVHTGGLP	TAIDVTGCVY	CES--EEKGN	ICLPYEEDSP	SPGLCDTSEA	KEEEGEQLTG	
mPer3	RSWIHSHTAP	QEGHLQSCVA	C----EDRGS	VGDTAEVLEQ	RPAEDTS		
	1321						1368
mPer1	GGGGDGGEEA	QTQIGAKGSS	SQDSAMEEEE	QGGGSSSPAL	PAEENSTS		
mPer2	PR-----IEA	QT					
mPer3							

Abb.7.1 Die Aminosäuresequenzen von mPer1, mPer2 und mPer3 sind als Alignment dargestellt.

Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren an. Rot sind die Aminosäuren, die in allen Period Proteinen konserviert sind. Grau unterlegt wurden bereits publizierte wichtige Domänen in diesen Proteinen (PAS Domäne: Takumi et al. 1998; NES in mPer2: Yagita et al. 2002; NES1 in mPer1: Vielhaber et al. 2001; NLS1 und CKIε Bindungsdomäne in mPer1, Vielhaber et al. 2000; NLS und mCry1 Bindungsdomäne in mPer2: Miyazaki et al. 2001 NLS und CKIε und Cry Bindungsdomäne in mPer3: Akashi et al. 2002). Darunter in kursiv ist die Funktion dieser Sequenz beschrieben. In gelb sind die Sequenzen unterlegt, deren Funktion in dieser Arbeit identifiziert wurde.

Abb.7.2 Vektorkarten der verwendeten Plasmiden

(A) Schematische Darstellung des pCSMT Vektors (Rupp et al. 1994). Rot zeigt die Position der 6 Myc-Epitope. Zwischen Epitope 5 und 6 befindet sich eine NcoI Schnittstelle, sodass die Nutzung dieser Restriktionsendonuklease zu einem Verlust eines Myc-Epitopes führt. Die Immunopräzipitationseffizienz ist dadurch nicht beeinträchtigt. (B) Graphische Darstellung des pCSflag Vektors (Katja Koebernick, Dissertation, 2000). Durch die Nutzung des BamHI und der EcoRI Schnittstelle wurden die Myc-Epitope durch ein Flag-Epitop ersetzt (grün). Dabei wurde die BamHI Schnittstelle zerstört. (C) Der pIRESHyg3 Vektor in schematischer Darstellung (BD Biosciences).

Abb.7.3 Schematische Darstellung der verwendeten mPer1 Konstrukte im pCSMT Vektor

Durch die Nutzung des pCSMT Vektors sind alle Konstrukte an 6 Myc-Epitope fusioniert (Rupp et al., 1994). Die Restriktionsendonukleasen geben die zum Subklonieren genutzten Schnittstellen an. Grün unterlegt wurden die Kernexportsignale an. In Plasmiden mit durchkreuztem NES wurden jeweils 3 Leucinen gegen Alanine ausgetauscht (NES1: IQELSEQIHRLLL und NES2: LQLNLLQL). Rot sind die Kernimportsignale markiert. In Konstrukten mit durchkreuztem Kernlokalisationssignal wurde das NLS1 durch den Austausch von 3 basischen Aminosäuren mutiert (RRHHCRSKAKRSR).

A

B

Abb.7.4 Schematische Darstellung der verwendeten mPer1 Konstrukte im pCSflag und pIRESHyg3 Vektor

(A) Durch die Nutzung des pCSflag Vektors sind alle Konstrukte an ein Flag-Epitop fusioniert (Katja Koebernick, Dissertation, 2000). Die Restriktionsendonukleasen geben die zum Subklonieren genutzten Schnittstellen an. (B) Im pIRESHyg3 Plasmid (BD Biosciences) sind mPer1 und deren Mutanten über eine internal ribosomal entry site (IRES) an den Selektionsmarker Hygromycin B fusioniert. Die verwendete StuI Schnittstelle wurde beim Klonieren zerstört. Grün unterlegt wurden die Kernexportsignale an. In Plasmiden mit durchkreuztem NES wurden jeweils 3 Leucinen gegen Alanine ausgetauscht (NES1: IQELSEQIHRLLL und NES2: LQLNLLQL). Rot sind die Kernimportsignale markiert. In Konstrukten mit durchkreuztem Kernlokalisierungssignal wurde das NLS1 durch den Austausch von 3 basischen Aminosäuren mutiert (RRHHCRSKAKRSR).

Abb.7.5 Schematische Darstellung der verwendeten mPer2 und mPer3 Konstrukte im pCSMT und pCSflag Vektor

(A) Durch die Nutzung der NcoI Schnittstelle im pCSMT Vektor sind alle Konstrukte an nur 5 Myc-Epitope fusioniert. (B) Alle mPer3 Konstrukte sind im pCSMT Vektor an 6 Myc-Epitope und im pCSflag Vektor an ein Flag-Epitop fusioniert. Die Restriktionsendonukleasen geben die zum Subklonieren genutzten Schnittstellen an. Grün unterlegt wurden die von Yagita et al. (2002) identifizierten Exportsignale in mPer2. Rot sind die Kernimportsignale markiert. In Konstrukten von mPer3 mit durchkreuztem Kernlokalisierungssignal wurden 3 basische Aminosäuren zu Alaninen mutiert (KHKRKK).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Tomas Pieler für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Abteilung und für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Prof. Dr. I. Feußner danke ich für die sofortige Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Für die Überlassung der Plasmide danke ich Prof. Dr. G. Eichele.

Den Mitarbeitern der Abteilung von Prof. Dr. D. Doenecke möchte ich für die technische Hilfe in der Zellkultur danken.

Katja Horvay, Marion Sölter, Maike Claußen, Jörg Wischnewski, Gudrun Kracht und Katja Ditter danke ich für die gute Zusammenarbeit und die ständige Motivation. Für das nette Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Entwicklungsbiochemie bedanken.

Für die Unterstützung während der gesamten Studienzeit möchte ich mich ganz herzlich bei Robert Koch, meinen Eltern und meiner Schwester bedanken.

Lebenslauf

Name: Susanne Loop
Geburtsdatum: 19.06.1973
Geburtsort: Elmshorn
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Kattenbühl 74
34346 Hann. Münden

Ausbildung

1979-1983 Grundschole an der Timm-Kröger-Schole in Elmshorn
1983-1992 Gymnasium an der Bismarckschole in Elmshorn
Abitur am 23. Mai 1992
1992-1994 Ausbildung zur medizinisch-technischen
Laboratoriumsassistentin am Forschungsinstitut Borstel
Staatliche Prüfung am 01. September 1994
1994 Beginn des Studiums der Biologie an der Georg-August
Universität Göttingen
1996 Diplomvorprüfung am 03. Juli 1996
1998-1999 Diplomarbeit am Zentrum für Biochemie, Abteilung
Entwicklungsbiochemie, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. T. Pieler.
Titel der Diplomarbeit: Analyse der Funktion der GTPase Ran
bei dem Export von 5S ribosomaler RNA aus dem Zellkern
1999 Diplom am 08. November 1999
seit 2000 Promotionsarbeit am Zentrum für Biochemie, Abteilung
Entwicklungsbiochemie, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. T. Pieler.

Göttingen, den 24.05.2004