



Analyse der wechselseitigen Regulation zwischen Hitze-  
schockantwort und der zirkadianen Uhr in Säugetieren

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Rebecca Schneider**

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Februar 2014

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Hans Reinke

Korreferent: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2014

**MEINER FAMILIE**

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary .....	III
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die zirkadiane Uhr .....	1
1.1.1 Der Suprachiasmatische Nukleus – Hauptschrittmacher in Säugetieren.....	4
1.1.2 Zirkadiane Uhren in peripheren Organen.....	5
1.1.3 Der molekulare Mechanismus der zirkadianen Uhr.....	9
1.1.3.1 Regulation des zirkadianen Oszillators durch posttranslationale Modifikationen .....	12
1.1.3.2 Nicht-transkriptionelle Rhythmen.....	14
1.2 Die Hitzeschockantwort .....	16
1.2.1 Hitzeschock-Faktor 1 – Hauptregulator der Hitzeschockantwort .....	17
1.2.1.1 Funktionelle Domänen von HSF1 .....	18
1.2.1.2 Aktivierungsmechanismen von HSF1 .....	19
1.2.1.3 Regulation des HSF1-Aktivierungszyklus.....	20
1.2.1.4 HSF1 ist in nukleären Stresskörperchen lokalisiert .....	22
1.2.2 Hitzeschock-Proteine als molekulare Chaperone.....	23
1.2.2.1 Der HSP90-Chaperon-Komplex .....	24
1.2.2.1.1 Struktur und Konformationsdynamik von HSP90 .....	26
1.2.2.1.2 Regulation von HSP90 durch Co-Chaperone und posttranslationale Modifikationen .....	27
1.2.2.1.3 HSP90 führt zur Stabilisierung und Degradation von Client-Proteinen .....	28
1.2.2.2 Die Hitzeschockantwort und der zirkadiane Oszillator .....	29
1.3 Zielsetzung und Konzeption der Arbeit.....	31
<b>2 Material .....</b>	<b>33</b>
2.1 Bakterienstämme und Nährmedien für Bakterienkulturen.....	33
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> Stamm: .....	33
2.1.2 Nährmedium für Bakterienkulturen .....	33
2.2 Zelllinien .....	34
2.2.1 Humane adhärenente Zelllinien .....	34
2.2.2 Murine adhärenente Zelllinien .....	34
2.3 Versuchstiere.....	35
2.4 Nukleinsäuren.....	36

---

2.4.1	Plasmide.....	36
2.4.2	Oligonukleotide.....	37
2.4.3	Sonstige Nukleinsäuren .....	38
2.5	Mediumgrundlagen, Lösungen und Antibiotika für die Zellkultur.....	39
2.5.1	Zellkulturmedien.....	39
2.6	Proteine .....	40
2.6.1	Antikörper.....	40
2.6.1.1	Primäre Antikörper.....	40
2.6.1.2	Sekundäre Antikörper .....	41
2.6.2	Enzyme.....	41
2.6.3	Sonstige Proteine.....	41
2.7	Säulenmaterialien und magnetische <i>beads</i> .....	42
2.8	Puffer und Stocklösungen .....	42
2.9	Chemikalien und Reagenzien .....	43
2.10	Verbrauchsmaterialien und Kits.....	44
2.11	Geräte.....	44
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>46</b>
3.1	Zellkultur.....	46
3.1.1	Kultivierung humaner und muriner adhärenter Zellen .....	46
3.1.2	Transfektion und Selektion von Zellen .....	46
3.1.3	siRNA Transfektion von murinen Zellen .....	47
3.1.4	Kryokonservierung von Zellen .....	47
3.1.5	Echtzeit-Biolumineszenz-Messung.....	48
3.2	Proteinanalytische Methoden.....	48
3.2.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....	48
3.2.2	Analyse von Proteinlevel und Halbwertszeit.....	49
3.2.3	Immunpräzipitation .....	49
3.2.4	Tandem-Affinitätsaufreinigung von Proteinkomplexen (TAP).....	50
3.2.4.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten für die Tandem-Affinitätsaufreinigung .....	51
3.2.4.2	Affintätsaufreinigung über IgG-Sepharose .....	52
3.2.4.3	Elution durch TEV Proteolyse.....	52
3.2.4.4	Affinitätsaufreinigung über Calmodulin-Sepharose.....	53
3.2.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	53

---

3.2.6	Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen .....	54
3.2.7	Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Kang .....	54
3.2.8	Western Blot Analysen .....	55
3.2.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford.....	56
3.3	Mikroskopie .....	56
3.3.1	Epifluoreszenzmikroskopie .....	56
3.4	Klonierung.....	57
3.4.1	Restriktionshydrolyse von Nukleinsäuren .....	57
3.4.2	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	57
3.4.3	Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	58
3.4.4	Ligation von Nukleinsäuren .....	58
3.5	Mikrobiologische Arbeiten .....	58
3.5.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen .....	58
3.5.2	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen nach Inoue .....	59
3.5.3	Transformation von <i>E. coli</i> .....	59
3.5.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	60
3.6	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	60
3.6.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	60
3.6.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	60
3.6.3	Isolierung von RNA aus Zellen .....	61
3.6.4	cDNA Synthese aus RNA durch Reverse Transkription.....	62
3.6.5	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	62
3.7	Arbeiten mit Versuchstieren .....	64
3.7.1	Tierhaltung.....	64
3.7.2	Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen.....	64
3.7.3	Intraperitoneale Injektion von Mäusen mit 17-DMAG und Cyclophosphamid .....	64
3.7.4	Generierung einer konditional <i>Hsf1</i> -TAP exprimierenden <i>Knock-In</i> Maus .....	65
3.7.5	Gesamtzellproteinextrakte aus Mausebern .....	66
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
4.1	Analyse der Interaktion zwischen Hitzeschock-Protein 90 und der zirkadianen Uhr in Säugetieren .....	68
4.1.1	Analyse der Funktion des zirkadianen Oszillators nach HSP90-Inhibition durch Reporter-gen-Messungen .....	69
4.1.2	Analyse der BMAL1-Halbwertszeit nach Inhibition von HSP90.....	74

---

4.1.3	Zytosolisches HSP90 ist an der Stabilisierung von BMAL1 beteiligt.....	78
4.1.4	Beeinträchtigung der Halbwertszeit des Proteins CLOCK durch HSP90-Inhibition	80
4.1.5	Untersuchung der Interaktion von HSP90 mit den Uhrproteinen BMAL1 und CLOCK.....	81
4.1.6	Analyse der Expression von BMAL1/CLOCK-Zielgenen nach HSP90-Inhibition.....	83
4.1.7	Untersuchung des Effekts der Inhibition von HSP90 auf die tageszeitabhängige Toxizität von Cyclophosphamid in Mäusen .....	85
4.2	Analyse der Funktionalität von TAP-gekoppeltem HSF1 für die Generierung einer transgenen HSF1-TAP <i>Knock-in</i> Maus .....	88
4.2.1	Generierung transgener HSF1-TAP exprimierender Zelllinien .....	88
4.2.1.1	Analyse der Funktionalität von TAP-gekoppeltem HSF1.....	89
4.2.1.1.1	Untersuchung der Expression von <i>Hsf1</i> -TAP in transgenen Zelllinien .....	89
4.2.1.1.2	Analyse der subzellulären Lokalisation von TAP-fusioniertem HSF1 .....	91
4.2.1.1.3	Analyse der Expression des HSF1 Zielgens <i>Hspa1b</i> in transgenen Zelllinien .....	93
4.2.1.1.4	Untersuchung der Zusammensetzung von HSF1-TAP-enthaltenden Proteinkomplexen .....	94
4.3	Generierung einer konditional <i>Hsf1</i> -TAP exprimierenden <i>Knock-in</i> Maus..	100
4.3.1	Isolation HSF1-enthaltender Proteinkomplexe aus transgenen Mäusen .....	102
4.3.2	HSF1-TAP kann endogenes HSF1 funktionell ersetzen.....	104
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>105</b>
5.1	HSP90 nimmt über die Regulation der Stabilität der Proteine BMAL1 und CLOCK Einfluss auf den zirkadianen Oszillator .....	105
5.1.1	Inhibition von HSP90 führt zu einer Beeinträchtigung des zirkadianen Oszillators in Mausfibroblasten.....	105
5.1.2	HSP90-Inhibition reduziert die Stabilität der Proteine BMAL1 und CLOCK.....	107
5.1.3	Die zytoplasmatischen Isoformen HSP90 $\alpha$ und HSP90 $\beta$ sind an der Stabilisierung von BMAL1 beteiligt.....	110
5.1.4	Inhibition von HSP90 beeinflusst die Expression der Zielgene des BMAL1/CLOCK Heterodimers .....	112
5.1.5	Inhibition von HSP90 kann die Toxizität von Cyclophosphamid in tageszeitabhängiger Weise modulieren .....	113
5.1.5.1	17-DMAG weist eine tageszeitabhängige Zytotoxizität auf .....	114
5.1.5.2	17-DMAG verstärkt die Zytotoxizität von CP an ZT4.....	115
5.1.5.3	17-DMAG erhöht nicht die Sensitivität auf CP an ZT16 .....	115
5.1.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	117
5.2	Generierung einer transgenen HSF1-TAP exprimierenden Maus auf Grundlage der Untersuchung der Funktionalität von TAP-gekoppeltem HSF1 .....	119

5.2.1	Überexpression von HSF1-TAP führt zu <i>Silencing</i> des Transgens .....	120
5.2.2	TAP-gekoppeltes HSF1 akkumuliert unter Hitzeschock im Nukleus .....	121
5.2.3	HSF1-TAP kann die Expression seiner Zielgene aktivieren .....	122
5.2.4	HSF1-TAP wird unter Stress posttranslational modifiziert und bindet an bekannte Interaktionspartner.....	123
5.2.5	Identifizierung neuer Interaktionspartner von HSF1 ins Säugetieren.....	125
5.2.6	HSF1-TAP enthaltende Komplexe können aus Mausleber isoliert werden und endogenes HSF1 funktionell ersetzen .....	129
5.2.7	Zusammenfassung und Ausblick.....	131
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>133</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>160</b>
7.1	Analyse des Zellüberlebens .....	160
7.2	Vektorkarten.....	161
7.3	Genotypisierung der HSF1-TAP exprimierenden <i>Hsf1</i> <sup>-/-</sup> Maus .....	163
	Eigene Veröffentlichungen.....	i
	Danksagung .....	ii
	Lebenslauf .....	ii
	Eidesstattliche Erklärung.....	iv

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Terminologie der Chronobiologie.....	3
Abbildung 1.2: Molekularer Mechanismus der zirkadianen Uhr in Säugetieren.....	11
Abbildung 1.3: Überblick über die funktionellen Domänen und posttranslationalen Modifikationen von HSF1 .....	18
Abbildung 1.4: Der HSF1-Aktivierungszyklus .....	21
Abbildung 1.5: Kristallstruktur von HSP90 .....	26
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des <i>Hsf1</i> -TAP enthaltenden ROSA26-Lokus.....	66
Abbildung 4.1: Echtzeit-Biolumineszenz-Analyse von NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen nach 17-AEP- GA Behandlung.....	70
Abbildung 4.2: Echtzeit-Biolumineszenz-Messung und mRNA-Analyse von NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen nach Vorbehandlung mit 17-AEP-GA .....	72
Abbildung 4.3: Biolumineszenz-Analysen von NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen nach Behandlung mit Geldanamycin, 17-AAG oder Radicol.....	73
Abbildung 4.4: Analyse der Proteinstabilität von endogenem BMAL1 in NIH3T3-Zellen .....	76
Abbildung 4.5: Kinetik der Proteinstabilität von c-Myc-BMAL1 in NIH3T3-Zellen .....	77
Abbildung 4.6: Analyse der BMAL1-Stabilität nach <i>Knock-down</i> von HSP90-Isoformen .....	79
Abbildung 4.7: Kinetik der Proteinstabilität von c-Myc-CLOCK in NIH3T3-Zellen .....	81
Abbildung 4.8: Immunpräzipitation von CLOCK-, BMAL1- und HSP90-enthaltenden Proteinkomplexen .....	82
Abbildung 4.9: Zirkadiane mRNA-Expression von Uhrgenen nach 17-AEP-GA Inkubation .....	84
Abbildung 4.10: Analyse der HSP90- Inhibition durch 17-DMAG auf die Zytotoxizität von Cyclophosphamid in tageszeitabhängiger Weise.....	87
Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der TAP-fusionierten <i>Hsf1</i> Varianten.....	89
Abbildung 4.12: Analyse der mRNA Expression von <i>Hsf1</i> in stabil transfizierten Zelllinien ....	90
Abbildung 4.13: Analyse der subzellulären Lokalisation von HSF1.....	92
Abbildung 4.14: Analyse der mRNA Expression von <i>Hspa1b</i> in stabil transfizierten Zelllinien	93
Abbildung 4.15: Analyse der mHSF1-TAP Proteinexpression transgener Zelllinien .....	95
Abbildung 4.16: Analyse der HSF1 Expression transgener Zelllinien.....	96

---

Abbildung 4.17: Isolation HSF1-TAP-enthaltender Proteinkomplexe aus transgenen HEK293 Zellen und gelelektrophoretische Analyse.....	97
Abbildung 4.18: Schematische Darstellung des <i>Hsf1</i> -TAP enthaltenden ROSA26-Lokus.....	101
Abbildung 4.19: Analyse der Expression von endogenem und TAP-fusioniertem HSF1 transgener Mäuse .....	102
Abbildung 4.20: Isolation HSF1-TAP-enthaltender Proteinkomplexe aus Mausleber und gelelektrophoretische Analyse.....	103
Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Interaktionen von Proteinen HSF1-TAP-enthaltender Komplexe.....	129

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Primer für Klonierung von Vektoren .....	37
Tabelle 2.2: Primer für Real Time Polymerasekettenreaktion.....	37
Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper .....	40
Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper.....	41
Tabelle 2.5: Puffer und Stocklösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden .....	42
Tabelle 3.1: Reaktionsbedingungen für die Polymerasekettenreaktion .....	61
Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen für die Real Time Polymerasekettenreaktion.....	63
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der MS-Ergebnisse der drei HSF1-TAP Aufreinigungen aus HEK293 Zellen.....	99

## Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-N-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin
17-AEP-GA	17-[2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl]aminno-17-demethoxygeldanamycin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AD	Aktivierungsdomäne
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH-PAS	<i>basic helix-loop-helix; Per-Arnt-Single-minded</i>
BMAL1	<i>Muscle Arnt-like-1</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	zirka
CBP	CREB-Bindungsprotein
CHX	Cycloheximid
CK1 $\delta$	Casein Kinase 1 delta
CK1 $\epsilon$	Casein Kinase 1 epsilon
Cl	Chlorid
clk	<i>Clock</i>
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycle Kaput</i>
CMV	Cytomegalievirus
CO-IP	Co-Immunopräzipitation
CP	Cyclophosphamide
CRY	<i>Cryptochrom</i>
CTD	C-terminale Dimerisierungsdomäne
CTR	C-terminale Region
cyc	<i>Cycle</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton (g/mol)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-bindende Domäne
Dbp	<i>Albumin D-binding protein</i>
Dbt	<i>Doubletime</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>

---

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEf1A	Eukaryotischen Elongationsfaktor 1a
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-Tetraacetat
engl.	Englisch
EtOH	Ethanol
Exp.	Experiment
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
GA	Geldanamycin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gr.	griechisch
GRP94	<i>94 kDa glucose-regulated protein</i>
GSK-3	Glykogen Synthase Kinase 3
h	Stunde(n)
HDAC6	Histondeacetylase 6
Hlf	<i>Hepatocyte Leukemia Factor</i>
hnRNP	heterogenen Ribonukleoproteinen
HR	Heptad-Repeat
HSC	<i>Heat Shock Cognate Proteins</i>
HSE	Hitzeschock-Element(e)
HSF	Hitzeschock-Faktor
HSP	Hitzeschock-Protein
HSR-1	Hitzeschock-RNA-1
IgG	Immunglobulin G
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
lat.	lateinisch
M	Molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD	Mitteldomäne
MeOH	Methanol
Mg	Magnesium
min	Minute(n)
Mn	Mangan
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
MW	Molekulargewicht
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NaOH	Natronlauge
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NPAS2	PAS-Domänen Protein 2
NR1D1	<i>nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1</i>
nSK	nukleäre(s) Stresskörperchen
nt	Nukleotide
NTD	N-terminale ATP-Bindedomäne
NTS	N-terminales Sequenz
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

---

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDSM	Phosphorylierungs-abhängiges Sumoylierungsmotif
PER	<i>Period</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTM	posttranslationale Modifikation(en)
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S.	Seite
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>
<i>S. elongatus</i>	<i>Synechococcus elongatus</i>
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Sam68	<i>Src-activated during mitosis</i>
Sat III	Satellit III
SDS	Natriumdodecylsulfat
sHSP	kleine Hitzeschock-Proteine
siRNA	<i>small interfering Ribonucleic Acid</i>
SIRT1	Sirtuin-1
snRNP	<i>small nuclear Ribonucleoprotein Particle</i>
SR	Serin-Arginin-reichen
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TAP	<i>Tandem Affinity Purification</i>
Tef	<i>Thyrotroph Embryonic Factor</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Tim	<i>Timeless</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	<i>tetratricopeptide repeat</i>
U	<i>Unit</i>
vgl.	vergleiche
VHL	<i>Von Hippel-Lindau disease tumour suppressor</i>
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZT	„Zeitgeber“-Zeit
FCS	Fötales Kälberserum

## Zusammenfassung

Zirkadiane Oszillationen biologischer Prozesse konnten bei allen bisher untersuchten lichtsensitiven Organismen gefunden werden. Diese zirkadianen Rhythmen stellen nicht einfach eine direkte Antwort auf rhythmische Umweltveränderungen dar, sondern werden durch endogene biologische Uhren hervorgerufen. Das zirkadiane System ist eng an den zellulären Metabolismus peripherer Organe gebunden und befähigt Organismen dazu physiologische Prozesse an die jeweilige Tageszeit anzupassen. Beeinträchtigungen zirkadianer Regulationsmechanismen können schwerwiegende Einflüsse auf diverse Schutzfunktionen von Zellen haben. Zu den wichtigsten Schutzfunktionen von Zellen gehört unter anderem die Antwort auf proteotoxischen Stress. Durch verschiedene physiologische und pathophysiologische Faktoren, wie erhöhte Temperatur, Schwermetalle, freie Radikale, Entzündungsfaktoren und oxidativer Stress, wird der Transkriptionsfaktor Hitzeschock-Faktor 1 (HSF1) aktiviert und schützt die Zellen von Organismen durch die Initiierung der Transkription von Hitzeschock-Proteinen. Hitzeschock-Proteine gehören zu den molekularen Chaperonen, die für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase essentiell notwendig sind. Studien geben Hinweise darauf, dass die Hitzeschockantwort in enger Wechselwirkung mit der zirkadianen Uhr von Zellen steht. Über die genauen molekularen Regulationsmechanismen und den Einfluss von Hitzeschock-Proteinen auf die zirkadiane Uhr ist bisher jedoch nur wenig bekannt.

Aus diesem Grund sollte im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluss des molekularen Chaperons HSP90 auf die zirkadiane Uhr in Zellen von Säugetieren untersucht werden. HSP90 ist sowohl als Regulator des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors HSF1 bekannt, als auch direkt von diesem reguliert. Es konnte bereits in einigen Studien mit der zirkadianen Uhr in Zusammenhang gebracht werden. Über seinen Einfluss auf die Regulation des zirkadianen Oszillators in Säugetieren war bis zu diesem Zeitpunkt jedoch nichts bekannt.

Um den Einfluss von HSP90 auf die zirkadiane Uhr zu untersuchen, wurde die Aktivität von HSP90 in murinen Fibroblasten pharmakologisch inhibiert. Die Inhibition von HSP90 führte zu einer signifikanten Änderung von Phase und Amplitude der zirkadianen Oszillation. Diese Änderung schien zumindest teilweise auf einer Reduktion der Stabilität der Proteine BMAL1 und CLOCK zu beruhen, die als Heterodimer die Expression der negativen Regulatoren in der zirkadianen Rückkopplungsschleife aktivieren. Die reduzierte Halbwertszeit der Proteine BMAL1 und CLOCK nach Inhibition von HSP90 resultierte in einer verringerten Expression

ihrer Zielgene. Durch siRNA (*small interfering RNA*)-Experimente wurde anschließend nachgewiesen, dass ausschließlich die zytoplasmatischen Isoformen von HSP90 (HSP90 $\alpha$  und HSP90 $\beta$ ) an der Stabilisierung des Proteins BMAL1 beteiligt sind. Unter Verwendung eines etablierten Mausmodells für Chronotoxizität konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Aktivität von HSP90 auch im Tiermodell Einfluss auf Prozesse nimmt, die durch die zirkadiane Uhr reguliert werden. Zusammengefasst haben die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen nachgewiesen, dass HSP90 für die korrekte Funktion des zirkadianen Oszillators in Säugetieren notwendig ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine transgene Maus hergestellt, die ein Fusionsprotein aus HSF1 und dem TAP (*tandem affinity purification*)-Tag konditional exprimiert und die Aufreinigung HSF1-enthaltender Proteinkomplexe aus Mausorganen ermöglicht. In *proof of principle* Experimenten mit transgenen HSF1-TAP exprimierenden Zelllinien wurde zunächst gezeigt, dass sich C-terminal TAP-gekoppeltes HSF1 hinsichtlich seiner Regulation und transkriptionellen Aktivität wie endogenes HSF1 verhält. Unter Stressbedingungen bildete HSF1-TAP Trimere, akkumulierte im Nukleus und aktivierte die Transkription seines Zielgens *Hspa1b*. Es war ebenfalls in der Lage mit bekannten Interaktionspartnern zu interagieren. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte noch eine Reihe neuer HSF1-Bindungspartner identifiziert werden. Auf der Grundlage dieser Befunde wurde eine transgene HSF1-TAP *Knock-in* Maus generiert. Erste Analysen haben gezeigt, dass HSF1-TAP endogenes HSF1 in *Hsf1*<sup>-/-</sup> Mäusen funktionell ersetzen kann, und dass HSF1 enthaltende Proteinkomplexe aus der transgenen Mauslinie gereinigt werden können. Die neue Mauslinie kann somit für zukünftige Analysen der zirkadianen Regulation von HSF1 und seiner Auswirkungen auf den molekularen Oszillator verwendet werden.

## Summary

Circadian oscillations of biological processes are found in virtually all known light-sensitive organisms. These circadian rhythms represent not simply a direct response to rhythmic environmental changes but are caused by endogenous biological clocks. The circadian system is closely linked to the cellular metabolism of peripheral organs and enables organisms to adapt physiological processes to the respective time of day. Impairments of circadian regulatory mechanisms can result in deleterious effects on protective cellular mechanisms. One of the most important protective mechanisms of cells is the response to proteotoxic stress. Physiological and pathophysiological factors, such as increased temperature, heavy metals, free radicals, inflammatory factors and oxidative stress activate the transcription factor heat shock factor 1 (HSF1) which exerts its protective role by transcriptional activation of heat shock genes. Heat shock proteins belong to the family of molecular chaperones which are essential for the maintenance of cellular homeostasis. Previous studies provide evidence that the heat shock system interacts closely with the circadian oscillator. However, little is known about the precise molecular regulatory mechanisms and the influence of heat shock proteins on the circadian clock.

In the first part of this work, the role of the molecular chaperone HSP90 in the mammalian circadian clock was examined. HSP90 is a regulator of the heat shock transcription factor HSF1, but it is also under direct transcriptional control of HSF1. Various studies in other model organisms provided evidence that HSP90 is connected to cellular circadian clocks. However, nothing is known about its influence on the circadian oscillator in mammals. In order to investigate the function of HSP90 in the mammalian circadian clock, HSP90 activity was at first inhibited pharmacologically. The inhibition of HSP90 in murine fibroblasts resulted in a significant phase delay and in an amplitude reduction of the circadian oscillator. This impairment seemed at least in part to be due to a reduced stability of the proteins BMAL1 and CLOCK, which activate the expression of genes of the negative arm of the circadian feedback loop. The reduced half-life of BMAL1 and CLOCK resulted in a decreased expression of their target genes. Furthermore, it could be shown in siRNA (*small interfering RNA*)-mediated knockdown studies that the cytoplasmic isoforms of HSP90 (HSP90 $\alpha$  and HSP90 $\beta$ ) are involved in the stabilization of BMAL1. By using an established mouse model of chronotoxicity it was demonstrated that inhibition of HSP90 also affects processes that are

regulated by the circadian clock in animals. In summary, this work has shown that the function of cytoplasmic HSP90 is required for the correct functioning of the circadian oscillator in mammals.

In the second part of this thesis, a transgenic conditionally C-terminally TAP (*tandem affinity purification*)-tagged HSF1 expressing mouse was generated. In proof of principle experiments using stable transgenic cell lines expressing HSF1-TAP it was demonstrated that regulation and transcriptional activation potential of HSF1-TAP showed the same regulation and function as were comparable to endogenous HSF1. Under stress conditions HSF1-TAP was able to trimerize, to bind to known interaction partners, to translocate to the nucleus and to activate the transcription of its target gene *Hspa1b*. In addition to these findings several novel binding partners of HSF1 could be identified. Based on these results a transgenic conditionally HSF1-TAP expressing *knock-in* mouse was generated. First analyses showed that HSF1-TAP could functionally replace endogenous HSF1 in *Hsf1*<sup>-/-</sup> mice and that HSF1 containing protein complexes can be purified efficiently from the transgenic mice. Thus the new mouse line can be used for future analyses of the circadian regulation of HSF1 and its effects on the molecular oscillator in mammals.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die zirkadiane Uhr

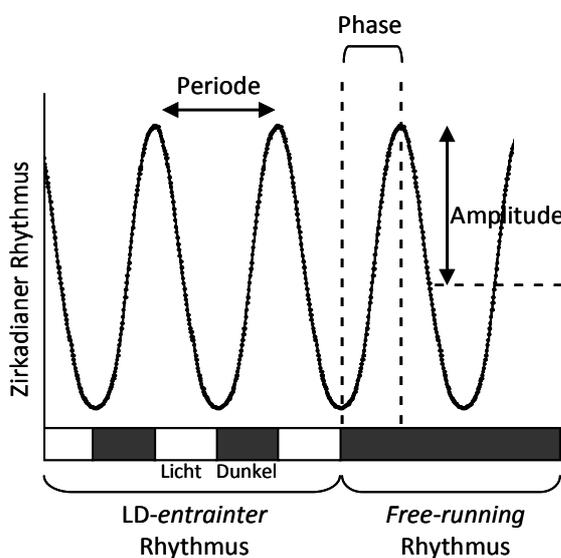
Die Rotation der Erde um ihre eigene Achse führt zu einem wiederkehrenden Tag/Nacht-Zyklus, der auf die Physiologie der meisten Organismen Einfluss nimmt. Die Tageszeit-abhängigen Rhythmen in Verhalten und Physiologie dieser Lebewesen sind jedoch nicht einfach eine Reaktion auf zyklische Veränderungen ihrer Umgebung, sondern werden durch einen endogenen biologischen Mechanismus hervorgerufen. Dieser Mechanismus, auch zirkadiane Uhr (lateinisch *circa* „ungefähr“ und *dies* „Tag“) genannt, erlaubt Organismen Umweltveränderungen, die mit dem Tag/Nacht-Rhythmus assoziiert sind, zu antizipieren, sowie ihre physiologischen Prozesse und entsprechend ihr Verhalten anzupassen. Zirkadiane Uhren generieren Oszillationen mit einer Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden. Diese Oszillationen sind genetisch determiniert und treten auch unter konstanten Umweltbedingungen mit einer ihnen eigenen Frequenz auf (*free-running* Rhythmen). Durch Lichteinfluss wird der zirkadiane Oszillator mit der geophysikalischen Zeit synchronisiert. Die Photoperiode ist der dominanteste äußere Stimulus (Zeitgeber) in allen bisher untersuchten Spezies für die Synchronisierung der Phase des zirkadianen Oszillators an die Umgebung (Dibner *et al.*, 2007).

Die Ursprünge der Untersuchungen von biologischen Rhythmen reichen bis in das 18. Jahrhundert zurück. Der französische Wissenschaftler Jean Jacques d'Ortous de Mairan zeigte 1729, dass die zyklische Blattbewegung von Mimosen nicht von externen Lichteinflüssen gesteuert wird, sondern sich auch in völliger Dunkelheit in einem 24-Stunden-Rhythmus über viele Tage fortsetzt (De Mairan, 1729). Ein Jahrzehnt später führte der Schweizer Botaniker Alphonse de Candolle weitere Untersuchungen über die Blattbewegungen von Mimosen durch und stellte fest, dass die Bewegungsrhythmen der Blätter in konstanter Dunkelheit jeden Tag ein wenig früher stattfanden (de Candolle, A.P., 1832). Dies war der erste Beleg für *free-running* Rhythmen endogener zirkadianer Uhren. Auch Charles Darwin beobachtete, dass die tageszeitliche Bewegung von Blättern bei Pflanzen auf einen endogenen Mechanismus zurückzuführen sei (Darwin, C., 1880).

Einer der Pioniere der modernen Chronobiologie war der deutsche Pflanzenphysiologe Erwin Bünning. Im Jahre 1928 begann er seine Untersuchung zum Thema der zirkadianen Rhythmik und konnte schon kurze Zeit später Hinweise erbringen, die auf eine endogene biologische Uhr für die Messung der Tageszeit in Organismen hindeuteten. In seinen Experimenten mit Pflanzen und Insekten zeigte er, dass diese sich, unabhängig von konstantem Licht oder Dunkelheit, entsprechend einer zirkadianen Rhythmik verhielten. In seinem Schlüsselexperiment kreuzte er Bohnen unterschiedlicher Periodenlänge und konnte zeigen, dass die Nachkommen dieser Pflanzen intermediäre Periodenlängen aufwiesen. Dies erbrachte den ersten Beweis, dass zirkadiane Rhythmen im Erbgut festgelegt sein müssen (Bünning, 1932). Durch Untersuchungen an Insekten, Vögeln und Menschen definierten die Wissenschaftler Colin Pittendrigh und Jürgen Aschoff das einzigartige Konzept und die Schlüsselprinzipien von biologischen Uhren und trugen grundlegend zum Verständnis von zirkadianen Rhythmen bei (Aschoff, 1965; Pittendrigh, 1967). Zusammen mit Erwin Bünning gelten sie als Begründer der modernen chronobiologischen Wissenschaft. 1971 beschrieben Seymour Benzer und Ron Konopka die ersten zirkadianen *Drosophila melanogaster* Mutanten mit veränderter Periodenlänge. Die beobachteten Phänotypen konnten alle auf Mutationen in Allelen desselben Gens zurückgeführt werden, welches Benzer *Period* nannte (Konopka und Benzer, 1971). Durch neu entwickelte molekularbiologische Methoden war es in den letzten Jahrzehnten möglich weitere Gene in *D. melanogaster* zu identifizieren, die zur zirkadianen Rhythmik beitragen. Zu diesen Genen gehören *Clock (clk)*, *Cycle (cyc)*, *Doubletime (dbt)*, *Cryptochrome (cry)* und *Timeless (tim)* (Myers *et al.*, 1995; Rutila *et al.*, 1998; Kloss *et al.*, 1998). Durch verschiedene Studien konnten zu diesen Genen Orthologe in Säugetieren gefunden werden (Sun *et al.*, 1997; Albrecht *et al.*, 1997; Tei *et al.*, 1997; Zylka *et al.*, 1998). Säugetiere besitzen die Cryptochrom-Gene *Cry1* und *Cry2*, drei unterschiedliche Period-Gene, *Per1*, *Per2* und *Per3*, sowie die Gene *Clock (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput)* und *Bmal1 (Muscle Arnt-like-1; oder auch MOP3 genannt; entspricht Cycle in D. melanogaster)* (Hogenesch *et al.*, 1998; Kume *et al.*, 1999; Gekakis *et al.*, 1998; Bunger *et al.*, 2000).

Die Kriterien, die ein biologischer Rhythmus erfüllen muss, um als zirkadian zu gelten, wurden unter anderem von den Wissenschaftlern Pittendrigh, Aschoff und Bünning postuliert (Johnson *et al.*, 2003). Sie umfassen folgende Merkmale:

- 1) Die zirkadiane Rhythmik muss über viele Zyklen unter konstanten Temperaturen, konstantem Licht oder konstanter Dunkelheit mit einer Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden bestehen (*free-running* Rhythmen).
- 2) Die Periodenlänge des zirkadianen Rhythmus bleibt unter verschiedenen Temperaturen konstant. Sie ist also temperaturkompensiert.
- 3) Der zirkadiane Rhythmus wird durch äußere Stimuli (Zeitgeber), wie Licht/Dunkel-Zyklen, Temperaturzyklen oder andere Signale, mit der Umwelt synchronisiert (*Entrainment*).



**Abbildung 1.1: Terminologie der Chronobiologie**

Weitere Erläuterungen siehe Text (nach Kuhlmann et. al., 2007)

Zu den Eigenschaften, die zur Beschreibung von Oszillationen zirkadianer Rhythmen verwendet werden, gehören die Phase, Amplitude und Periode (vgl. Abb. 1.1). Die Phase bezeichnet die zeitliche Lage eines Punktes auf der Oszillationskurve im Verhältnis zum Zeitgeber. Eine Veränderung der Phase wird durch nach rechts oder links verschobene Hoch- und Tiefpunkte der Oszillationskurven deutlich. Als Amplitude einer Oszillation wird die maximale Auslenkung von der mittleren Oszillation verstanden. Die Periodenlänge der

zirkadianen Uhr definiert das Zeitintervall, das der Oszillator benötigt, um einen vollständigen Zyklus zu durchlaufen.

### 1.1.1 Der Suprachiasmatische Nukleus – Hauptschrittmacher in Säugetieren

Viele physiologische und biochemische Prozesse, sowie das Verhalten unterliegen in Säugetieren zirkadianer Kontrolle. Zu diesen Prozessen gehören zum Beispiel der Schlaf/Wach-Rhythmus, die Körpertemperatur oder die Melatoninsekretion (Deguchi, 1978; Takahashi *et al.*, 1980; Nuesslein und Schmidt, 1990). Fast alle Zellen in Säugetierorganismen weisen autarke, zellautonome zirkadiane Oszillatoren auf (Nagoshi *et al.*, 2004). Dies wirft die Frage auf, wie Licht die Phasen-Kohärenz (oder auch Phasengleichheit) zwischen einzelnen Oszillatoren peripherer Organe in Organismen herstellen kann.

Colin Pittendrigh entwickelte 1960 die Idee eines speziellen lichtsensitiven Oszillators, der als Hauptschrittmacher fungieren würde (Pittendrigh, 1960). Während in Pilzen und Pflanzen bis zu diesem Zeitpunkt kein übergeordneter Regulator zirkadianer Rhythmen identifiziert werden konnte, konnte die Existenz eines Hauptschrittmachers der zirkadianen Uhr in Invertebraten wie Gastropoden und Arthropoden nachgewiesen werden. In Mollusken konnte der primäre Schrittmacher in großen basalen Retina-Neuronen der Augen gefunden werden, während der Hauptschrittmacher in Insekten in Neuronen der optischen oder cerebralen Loben des Gehirns identifiziert wurde. Retinale und extraretinale Photorezeptoren liefern diesen Strukturen Lichtsignale für das Entrainment an lokale Umweltbedingungen (Jacklet und Colquhoun 1983; Helfrich-Forstser 1995; Blumenthal *et al.*, 2001).

Durch Läsionsexperimente im Gehirn von Ratten konnte 1972 eine paarige Struktur im Hypothalamus oberhalb des *Chiasma opticum* identifiziert werden. Diese Struktur wurde als Suprachiasmatischer Nukleus (SCN) bezeichnet und schien eine wichtige Rolle in der Rhythmizität der Corticosteroidsekretion und der Bewegungsaktivität zu spielen (Moore und Eichler, 1972; Stephan und Zucker 1972). In Transplantationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass SCN-Transplantate von Hamstern mit verkürzter Periodenlänge den zirkadianen Rhythmus von Hamstern mit SCN-Läsionen wiederherstellen konnten. Transplantierte Tiere wiesen die gleiche verkürzte Periodenlänge auf wie die Spendertiere zuvor (Ralph *et al.*, 1990). Ähnliche Experimente wurden mit genetisch arrhythmischen Mäusen durchgeführt, bei denen SCN-Transplantate von Wildtyp-Mäusen zu einem regulären zirkadianen Rhythmus führten (Sujino *et al.*, 2003). Diese Experimente demonstrierten eine markante Rolle des SCN in der zirkadianen Rhythmizität von Säugetieren. Die Kultivierung von SCN-Neuronen *in vitro* zeigte, dass die elektrische Aktivität dieser Zellen ein zirkadianes Muster

aufwies. Diese zirkadiane Aktivität blieb auch über mehrere Wochen in *in vitro* Kulturen erhalten (Inouye und Kawamura, 1979; Green und Gillette, 1982; Groos und Hendriks, 1982; Shibata *et al.*, 1982; Bos und Mirmiran, 1990). Die metabolische Aktivität und Glukoseaufnahme sowie die Expression von zirkadianen Genen und Proteinen in SCN-Neuronen erwiesen sich außerdem als tageszeitabhängig (Schwartz und Gainer, 1977; Sun *et al.*, 1997; Tei *et al.*, 1997; Hastings *et al.*, 1999). Dies illustrierte deutlich die zirkadiane Aktivität des SCN auf physiologischer und metabolischer Ebene.

Anhand dieser und ähnlicher Experimente wurde der SCN als Hauptschrittmacher der zirkadianen Uhr in Säugetieren identifiziert. Die SCN-Neuronen erhalten Lichtsignale von der Retina durch synaptische Transmissionen über Axone des Retinohypothalamischen Trakts. Diese elektrischen Informationen werden anschließend in chemische Signale umgewandelt und führen zu einer Änderung der zirkadianen Phase von SCN-Neuronen. Der SCN übermittelt daraufhin rhythmische Informationen an Zellen anderer Gehirnareale und an periphere Organe. Diese Informationsweiterleitung wird über neuronale Verbindungen, endokrine Signale, Körpertemperaturrhythmen oder indirekte Signale, wie Verhaltensrhythmen, an die peripheren Organe weitergegeben. Aktivität/Ruhe-Zyklen oder rhythmische Nahrungsaufnahme agieren zum Beispiel als dominante Zeitgeber für periphere Organe wie Leber, Herz und Nieren (Welsh *et al.*, 2010).

### **1.1.2 Zirkadiane Uhren in peripheren Organen**

Kurz nach der Entdeckung der ersten Uhrgene in Säugetieren wurde deutlich, dass zirkadiane Uhren nicht nur in den Neuronen des SCN vorhanden sind, sondern ebenfalls in fast allen peripheren Geweben des Körpers (Balsalobre *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 2000).

Kultivierte Zellen und Explantate peripherer Gewebe von Leber, Herz, Lunge, Niere und weiteren Organen zeigten robuste zirkadiane Oszillationen in ihrer Genexpression (Yamamoto *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2004; Yamazaki *et al.*, 2009). Zirkadiane Oszillationen scheinen jedoch in unreifen und sich differenzierenden Zellen nicht ordnungsgemäß zu funktionieren oder fehlen vollständig (Alvarez und Sehgal, 2005; Liu *et al.*, 2007). Als deutliches Beispiel dienen embryonale Stammzellen, die keinerlei zirkadiane Rhythmen zu generieren scheinen (Yagita *et al.*, 2010).

Ursprünglich wurde angenommen, dass nur die Oszillatoren in Neuronen des SCN autark funktionieren würden, während sich die Oszillationen peripherer Uhren nach einigen Zyklen abschwächen würden. Balsalobre *et al.* demonstrierten 1998, dass immortalisierte Rat-1 Fibroblasten, eine Zelllinie, die zu diesem Zeitpunkt schon mehrere Jahrzehnte in Laboratorien Verwendung fand, robuste zirkadiane Oszillationen aufwies. Von diesem Zeitpunkt an wurde die Existenz zirkadianer Genexpression in einer Vielzahl von immortalisierten und primären Zelllinien detektiert. Einzelzell- und Biolumineszenzuntersuchungen von Fibroblasten zeigten, dass diese Zellen autarke, zellautonome Oszillatoren besitzen (Nagoshi *et al.*, 2004, Welsh *et al.*, 2004), jedoch unter normalen Kulturbedingungen desynchronisiert vorliegen. Yoo *et al.* konnten 2004 in Experimenten mit Lungen- und Leberexplantaten nachweisen, dass zirkadiane Uhren in diesen Geweben ohne Steuerung durch das SCN mehr als 20 Zyklen unter *in vitro* Kulturbedingungen generieren. Periphere Uhren weisen den gleichen molekularen Aufbau wie zirkadiane Uhren im SCN auf. Sowohl im SCN, als auch in Zellen peripherer Gewebe basiert der Rhythmen-generierende molekulare Kreislauf auf einer transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleife (*feedback loop*), die identische molekulare Uhrkomponenten enthält (Yagita *et al.*, 2001).

Die Phasen einzelner peripherer Oszillatoren zeigen in SCN-defizienten Tieren allerdings große Verschiebungen. Ein intakter SCN ist zum Beispiel für die Beibehaltung der Phasenkohärenz zwischen Oszillatoren einzelner Hepatozyten der Leber nötig (Guo *et al.*, 2006). Bereits diffusible Signale des SCN reichen für die Synchronisierung der Phasen in Leber und Niere aus (Guo *et al.*, 2005). Der SCN kann aus diesen Gründen weiter als Hauptschrittmacher der zirkadianen Uhr betrachtet werden, während zirkadiane Uhren in peripheren Organen als untergeordnete Oszillatoren gelten.

Wie bereits erwähnt, wird der SCN für die Generierung von Phasenkohärenz durch die Synchronisierung der Zellen in allen peripheren Geweben benötigt. Diese Synchronisierung erfolgt über eine Vielzahl verschiedener Wege. Hierunter fallen Nahrungsaufnahmerhythmen, die durch Ruhe/Aktivitäts-Zyklen entstehen und als dominante Zeitgeber für viele Gewebe dienen (Yamazaki *et al.*, 2000). Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren die Aufnahme von Nahrung oder Nahrungsmetaboliten in regulatorische Signale für die Genexpression umsetzen. Zu diesen Faktoren gehören zum Beispiel nukleäre Rezeptoren wie PPAR $\alpha$  (Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor alpha), die in der Regulation von Kom-

ponenten der zirkadianen Uhr eine Rolle spielen. PPAR $\alpha$  ist ein Schlüsselregulator des zellulären Lipidmetabolismus. Dieser Transkriptionsfaktor wird durch die Bindung verschiedener Liganden wie z.B. Fettsäuren aktiviert und initiiert unter Hungerzuständen die Ketogenese (Rakhshandehroo *et al.*, 2010). Die Expression von *Ppara* unterliegt in Mausleber außerdem einer zirkadianen Rhythmik (Oishi *et al.*, 2005) und ist wiederum in der transkriptionellen Regulation essentieller zirkadianer Gene wie *Bmal1* involviert (Inoue *et al.*, 2005; Canaple *et al.*, 2006).

Die Proteinkinase AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) stellt eine weitere wichtige Komponente in der Verbindung zwischen zirkadianem und metabolischem Regulationsnetzwerk dar. Ein Abfall des zellulären Energiestatus geht immer mit einem Anstieg im AMP (Adenosinmonophosphat):ATP (Adenosintriphosphat)-Verhältnis einher, was zu einer Aktivierung von AMPK führt. Unter metabolischem Stress initiiert AMPK katabolische Wege, die ATP generieren und führt zu einer Inhibierung von Prozessen, die ATP verbrauchen (Hardie *et al.*, 2006). AMPK stellt somit einen Sensor des zellulären Energiestatus dar und ist an der Wiederherstellung der Energiebalance beteiligt. Es nimmt außerdem direkten Einfluss auf die Regulation der zirkadianen Uhr, indem es das zentrale Uhrprotein CRY1 phosphoryliert (Lamia *et al.*, 2009), was zu einer Degradation dieses Proteins führt. Desweiteren phosphoryliert AMPK die Proteinkinase CK1 $\epsilon$  (Casein Kinase 1 epsilon), die wiederum an Phosphorylierungsprozessen verschiedener Uhrproteine beteiligt ist (Um *et al.*, 2007).

Die Aktivierung von AMPK führt außerdem zu ansteigenden Levels von NAD<sup>+</sup> (Nicotinamidadenindinukleotid) (Canto *et al.*, 2009). NAD<sup>+</sup> ist ein Co-Faktor für über 300 Redoxreaktionen. Im Metabolismus spielen Redoxreaktionen eine wichtige Rolle in der Freisetzung von Energie aus Nährstoffen. Diese Energie wird während der Glykolyse und des Zitronensäurezyklus auf NAD<sup>+</sup> durch Reduktion zu NADH übertragen (Belenky *et al.*, 2007). In Leberzellen und Mausfibroblasten weisen NAD<sup>+</sup> Level ein zirkadianes Oszillationsmuster auf, welches durch das Enzym NAMPT (Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase) hervorgerufen wird. NAMPT ist für die NAD<sup>+</sup> Biosynthese verantwortlich und unterliegt einer direkten rhythmischen Regulation durch die zirkadiane Uhr (Nakahata *et al.*, 2009; Ramsey *et al.*, 2009). Die Aktivität verschiedener Enzyme, wie zum Beispiel Sirtuine, sind vom intrazellulären NAD<sup>+</sup>/NADH Verhältnis abhängig. Die Histondeacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) stellt in Zellen einen Energiesensor dar, da seine Aktivität durch NAD<sup>+</sup> an den Energiestatus von Zellen gekoppelt ist. Die Oszillation von NAD<sup>+</sup> führt zu einer zyklischen Aktivierung von SIRT1. SIRT1 ist jedoch nicht nur in die Deace-

tylierung von Histonen involviert, sondern deacetyliert ebenfalls die Uhrproteine BMAL1 und PER2, was zu einer verringerten Stabilität dieser Proteine führt (Asher *et al.*, 2008; Nakahata *et al.*, 2008). SIRT1 stellt somit eine wichtige Verbindung zwischen zirkadianem und metabolischem Transkriptionsnetzwerk dar.

Ebenso spielen Körpertemperaturrhythmen, die direkt durch den SCN oder durch Aktivitätszyklen gesteuert werden, eine wichtige Rolle für die Koordinierung peripherer Uhren (Liu *et al.*, 1998; Rensing und Ruoff, 2002; Glaser und Stanewsky, 2005; Lahiri *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2009). Temperaturrhythmen, die zirkadiane Schwankungen der Körperkerntemperatur simulieren, können *in vitro* eine zirkadiane Rhythmik in Zellen peripherer Gewebe induzieren und zum *Entrainment* der zirkadianen Uhr in der Leber von Mäusen führen (Brown *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass der Einfluss von Temperatur auf periphere Oszillatoren unter anderem über den Transkriptionsfaktor Hitzeschock-Faktor 1 (HSF1) vermittelt wird (Reinke *et al.*, 2008; Saini *et al.*, 2012).

Der SCN bedient sich außerdem humoraler oder neuronaler Signale, um die Phasen peripherer Uhren zu synchronisieren (Vujovic *et al.*, 2008; Cailotto *et al.*, 2009). Glucocorticoid-Hormonlevel von Nagern und Menschen weisen im Blut robuste zirkadiane Rhythmen auf (Oster *et al.*, 2006). Rezeptoren für diese Hormone werden in nahezu allen Zelltypen exprimiert, interessanterweise mit Ausnahme der Neuronen des SCN. Glucocorticoidrezeptor-Agonisten, wie zum Beispiel Dexamethason, können als starker Zeitgeber für periphere Gewebe *in vivo* und *in vitro* fungieren (Balsalobre *et al.*, 2000).

Eine Vielzahl wichtiger physiologischer Funktionen in peripheren Organen steht unter zirkadianer Kontrolle. Zu diesen Funktionen gehören zum Beispiel Detoxifikationsmechanismen in Leber und Nieren (Gachon *et al.*, 2006), Kohlenhydrat- und Lipid-Metabolismus in Leber, Muskeln und Fettgewebe (Lamia *et al.*, 2008; Le Martelot *et al.*, 2009), Urinproduktion, sowie Blutdruck und Herzschlagrate (Gachon *et al.*, 2004). Damit diese Prozesse reibungslos ablaufen können, ist die Synchronisierung der zirkadianen Uhr mit dem zellulären Stoffwechsel von großer Bedeutung (Green *et al.*, 2008). Detoxifikation und Metabolismus werden von der zirkadianen Uhr gesteuert, welche jedoch wiederum von metabolischen Parametern beeinflusst wird. Gemäß der momentan vorherrschenden Meinung führt diese gegenseitige Steuerung zu einer individuellen Anpassung der einzelnen Organe an wechselnde Umweltbedingungen. Die Steuerung peripherer Uhren durch metabolische Signale bewirkt aber

auch, dass unter speziellen Umständen verschiedene Zeitgebersignale in Konflikt miteinander geraten können. Eine besondere Rolle spielen hierbei Nahrungsaufnahmerhythmen, die dominante Zeitgeber für periphere Uhren darstellen. Die zirkadiane Uhr der Leber kann durch antizyklische Nahrungsaufnahme sogar vollständig von der zentralen Uhr im SCN entkoppelt werden (Damiola *et al.*, 2000). Diese Entkopplung bietet den Vorteil, dass zum Beispiel Detoxifikationsprozesse nicht zu Zeitpunkten stattfinden, die der vom SCN vermittelte Licht-Dunkel-Rhythmus vorgibt, sondern in der Zeitspanne nach der Nahrungsaufnahme, in der sie tatsächlich benötigt werden.

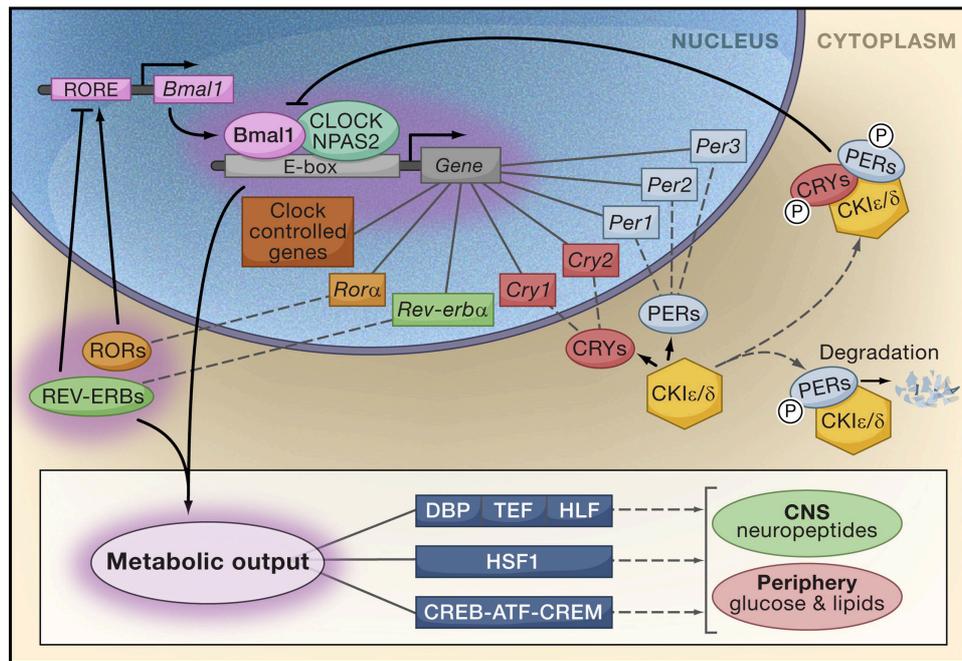
### 1.1.3 Der molekulare Mechanismus der zirkadianen Uhr

Zirkadiane Uhren existieren in einer Vielzahl von Organismen wie Cyanobakterien, Pilzen, Pflanzen, Insekten und Säugetieren. Der grundlegende molekulare Mechanismus in all diesen Organismen basiert auf der Interaktion positiv und negativ regulierter Gene, die durch Rückkopplungsschleifen funktionell miteinander verbunden sind (Brown *et al.*, 2012). Die Zusammensetzung der Komponenten dieser Rückkopplungsschleifen ist in den einzelnen Organismen jedoch sehr unterschiedlich. Während in Cyanobakterien lediglich eine posttranslationale Rückkopplungsschleife durch Expression der drei Gene *kaiA*, *kaiB* und *kaiC* gebildet wird (Golden und Canales, 2003; Johnson, 2004), ist der molekulare Mechanismus der zirkadianen Uhr in Eukaryoten wesentlich komplexer. In *Drosophila* wird eine transkriptionelle/translationale Rückkopplungsschleife durch die positiv und negativ regulierte Expression der Gene *Period (per)*, *Timeless (tim)*, *Clock (clk)* und *Cycle (cyc)* gebildet (Hardin, 2005), die dem zirkadianen Oszillator in Säugetieren bereits recht ähnlich ist.

In Säugetieren sind die bHLH-PAS Proteine (*basic helix-loop-helix; Per-Arnt-Single-minded*) CLOCK und BMAL1 die prinzipiellen Transkriptionsaktivatoren im positiv regulierenden Arm der Rückkopplungsschleife (Gekakis *et al.*, 1998; Bunger *et al.*, 2000). CLOCK und BMAL1 bilden ein Heterodimer, das durch die Bindung spezifischer DNA-Elemente, E-Boxen mit der Konsensussequenz 5'-CACGTG-3' und E'-Boxen mit der Sequenz 5'-CACGTT-3', in den Promotoren von Zielgenen bindet (Yoo *et al.*, 2005; Ohno *et al.*, 2007). Diese Bindung führt zur Initiation der Transkription der *Period- (Per1, Per2, Per3)* und *Cryptochrom-Gene (Cry1,*

*Cry2*), die den negativ regulierenden Arm des *feedback loops* bilden. PER- und CRY-Proteine werden anschließend im Zytoplasma der Zellen translatiert und lagern sich zu Heterodimeren zusammen (Hogenesch *et al.*, 1998; Kume *et al.*, 1999; vgl. Abb. 1.2). Diese Heterodimere werden in den Zellkern transportiert und inhibieren dort die transkriptionelle Aktivität von BMAL1/CLOCK durch direkte Bindung an die Heterodimere (Sangoram *et al.*, 1998; Field *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2006). Bei diesem Prozess spielen im Besonderen Cryptochrome eine wichtige Rolle, da sie als potente Repressoren der BMAL1/CLOCK-Aktivität fungieren (Tamanini *et al.*, 2007). Durch die Inhibition von BMAL1/CLOCK hemmen PER- und CRY-Proteine ihre eigene Transkription. Die Degradation der inhibierenden PER- und CRY-Proteine ist für die Beendigung der Repressionsphase erforderlich, wodurch ein neuer Transkriptionszyklus gestartet werden kann.

Die BMAL1/CLOCK-Heterodimere aktivieren ebenfalls die Transkription einer zweiten Rückkopplungsschleife durch Bindung an E-Boxen in den Promotoren der nukleären Rezeptorgene *Rev-Erba/β* (*Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1/2*, oder auch *Nr1d1/2*) und *Rora/β* (*RAR-Related Orphan Receptor A/B*) (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004; Guillaumond *et al.*, 2005). REV-ERB- und ROR-Proteine konkurrieren dann um die Bindung an ROR-Elemente (*Retinoic acid-related Orphan receptor Response Element*), die sich in der Promotorregion von *Bmal1* befinden. Während ROR-Proteine die Transkription von *Bmal1* aktivieren, wirken REV-ERB-Proteine inhibierend auf diese (Preitner *et al.*, 2002; Guillaumond *et al.*, 2005; vgl. Abb. 1.2). Durch die Repression des eigenen Aktivators hemmen REV-ERB-Proteine somit indirekt die Transkription ihrer eigenen Gene. Die PER/CRY-vermittelte Inhibition der aktivierenden BMAL1/CLOCK-Komplexe hemmt ebenfalls die Transkription der Gene *Rev-Erba/β*, wodurch es durch Degradation und fehlende Neusynthese von REV-ERB-Proteinen zu einer Reduktion der Hemmung von *Bmal1* kommt. Man nennt diesen Mechanismus, der effektiv die transkriptionelle Regulation der positiven und negativen Rückkopplungsschleifen verbindet, auch die stabilisierende Rückkopplungsschleife.



**Abbildung 1.2: Molekularer Mechanismus der zirkadianen Uhr in Säugetieren**

Der Mechanismus der zirkadianen Uhr beruht auf positiv und negativ regulierten transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleifen, die zelluläre Oszillationen mit einer Periodenlänge von 24 Stunden generieren. Die Proteine BMAL1 und CLOCK bzw. NPAS2 lagern sich zu Heterodimeren zusammen und aktivieren die Transkription von *Per*-, *Cry*-, *Ror*- und *Rev-Erb*-Genen. PER- und CRY-Proteine werden durch CK1ε und CK1δ phosphoryliert und hemmen durch Inhibition des BMAL1/CLOCK-Heterodimers sowohl ihre eigene Transkription, als auch die der *Ror*- und *Rev-Erb*-Gene. Während ROR-Proteine aktivierend auf die Transkription von *Bmal1* wirken, hemmen REV-ERBs diese. Dadurch entstehen zwei ineinander greifende Rückkopplungsschleifen, die außerdem zur Aktivierung einer Vielzahl weiterer Gene führen und zirkadiane Rhythmen im gesamten Organismus hervorrufen (Green *et al.*, 2008).

Ein weiteres wichtiges Protein für die Regulation der zirkadianen Uhr ist das neuronale PAS-Domänen Protein 2 (NPAS2). Es weist eine ähnliche Aktivität wie CLOCK auf, unterscheidet sich aber im gewebespezifischen Expressionsmuster. NPAS2 wurde zunächst im Vorderhirn von Säugetieren gefunden und ist für die Verarbeitung sensorischer Signale nötig. Es konnte jedoch auch in einigen peripheren Geweben nachgewiesen werden. Wie CLOCK ist es in der Lage mit BMAL1 zu dimerisieren, an E-Box-Sequenzen zu binden und die Expression zirkadianer Gene zu aktivieren. *Npas2*-defiziente Mäuse weisen robuste zirkadiane Aktivitätsrhythmen auf. Ähnlich wie in *Clock knock-out* Mäusen zeigen *Npas2*<sup>-/-</sup> Mäuse eine leicht verkürzte zirkadiane Periode. Dieser zirkadiane Phänotyp ist möglicherweise auf eine unterbrochene Kommunikation zwischen Vorderhirn und SCN zurückzuführen (Reick *et al.*, 2001; DeBruyne *et al.*, 2007).

Die rhythmische Expression der beschriebenen Gene führt nicht nur zur Ausbildung der zirkadianen Rückkopplungsschleife, sondern nimmt Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung einer Vielzahl von Genen. BMAL1/CLOCK binden rhythmisch an E-Boxen in den Promotoren so genannter *clock output genes*, zu denen zum Beispiel *Dbp* (*Albumin D-binding protein*), *Tef* (*Thyrotroph Embryonic Factor*) und *Hlf* (*Hepatocyte Leukemia Factor*) gehören (Gachon *et al.*, 2006). Die exprimierten Proteine dieser Gene sind nicht direkt an der Generierung der zirkadianen Rückkopplungsschleife beteiligt, sondern aktivieren die Expression von *clock-controlled genes* über die Bindung an D-Boxen in ihren Promotoren (Ueda *et al.*, 2005; Bozek *et al.* 2009). Die Expression dieser Gene führt zur Generierung rhythmischer biologischer Prozesse.

### 1.1.3.1 Regulation des zirkadianen Oszillators durch posttranslationale Modifikationen

Die hier beschriebenen autoregulatorischen Rückkopplungsschleifen benötigen ungefähr 24 Stunden, um einen vollständigen Zyklus zu durchlaufen. Ein rein transkriptionell regulierter *feedback loop* würde allerdings in einer sehr viel kürzeren Periodenlänge resultieren. Aus diesem Grund beinhalten zirkadiane Oszillatoren sogenannte retardierende Elemente, wie posttranslationale Modifikationen durch Phosphorylierung, Acetylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung.

Die Enzyme CK1 $\delta$  (Casein Kinase 1 delta) und CK1 $\epsilon$  sind für die Phosphorylierung zirkadianer Uhrproteine erforderlich. Die Funktion von CK1 $\epsilon$  in der Regulation der zirkadianen Uhr wurde erstmals durch die Untersuchung eines Hamsters mit ungewöhnlich kurzer *free-running* Periodenlänge (ca. 20 Stunden) identifiziert (Ralph und Menaker, 1988). Diese verkürzte Periodenlänge wurde durch eine Mutation von CK1 $\epsilon$  hervorgerufen. CK1 $\epsilon$  ist unter anderem für die Phosphorylierung der PER-Proteine erforderlich (Lowrey *et al.*, 2000). PER-Proteine können außerdem durch CK1 $\delta$  phosphoryliert werden. Die Phosphorylierungen durch CK1 $\delta$  und CK1 $\epsilon$  sind sowohl für die nukleäre Lokalisation der PER/CRY-Heterodimere nötig, als auch für eine spätere Ubiquitinierung, die zu einem proteasomalen Abbau dieser Proteine führt (Eide *et al.*, 2005; Shirogane *et al.*, 2005; Vanselow *et al.*, 2006). Die Stabilität/Degradations-Rate der PER- und CRY-Proteine ist ein Schlüsselfaktor für die Regulation der Periodenlänge der

zirkadianen Uhr (Chen *et al.*, 2009). CK1 $\epsilon$  wird außerdem für die Phosphorylierung von CRY-Proteinen benötigt (Eide *et al.*, 2002). CRY1 wird zusätzlich durch die Kinase AMPK1 (*5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1*) phosphoryliert (Lamia *et al.*, 2009), während Phosphorylierung von CRY2 durch die Kinasen DYRK1A (*Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*) und GSK-3 (*Glycogen synthase kinase 3*) vermittelt wird. In einigen Fällen führt das Phosphorylierungssignal zum Proteinabbau. FBXL3 (*F-box/LRR-repeat protein 3*) beispielsweise ist an der phosphorylierungsabhängigen Ubiquitinierung von CRY-Proteinen beteiligt (Siepka *et al.*, 2007; Godinho *et al.*, 2007).

Es wurden ebenso zahlreiche regulatorische Mechanismen beschrieben, die die zellulären Mengen von BMAL1 und CLOCK beeinflussen. BMAL1 und CLOCK können durch die Kinase GSK-3 phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von CLOCK ist außerdem vom Phosphorylierungsstatus von BMAL1 abhängig (Spengler *et al.*, 2009). BMAL1 wird, ebenso wie PER- und CRY-Proteine, durch die Kinase CK1 $\epsilon$  phosphoryliert (Eide *et al.*, 2002). Auch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) ist an der Phosphorylierung von BMAL1 beteiligt. Es wird vermutet, dass diese Modifikationen sowohl für die Translokation des Heterodimers in den Nukleus, als auch für seine Transaktivierungsaktivität notwendig sind (Sanada *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von BMAL1 durch die Kinase GSK-3 führt außerdem zu Ubiquitin-vermittelter proteasomaler Degradation von BMAL1, was in einer signifikanten Änderung der Amplitude der zirkadianen Genexpression resultiert (Sahar *et al.*, 2010).

Sowohl BMAL1 als auch CLOCK werden im Tagesverlauf rhythmisch durch N-Acetylglucosamin kovalent modifiziert, was zur Inhibition der Ubiquitinierung und der darauf folgenden Degradation führt (Ma *et al.*, 2013).

Eine weitere wichtige posttranslationale Modifikation von BMAL1 ist die Sumoylierung, welche vom BMAL1-Interaktionspartner CLOCK abhängig ist. Wird BMAL1 sumoyliert, verstärkt dies die transkriptionelle Aktivität des BMAL1/CLOCK-Heterodimers (Lee *et al.*, 2008). Diese Modifikation führt jedoch ebenfalls zur Ubiquitinierung von BMAL1 und einer darauf folgenden proteasomalen Degradation (Cardone *et al.*, 2005).

CLOCK besitzt außerdem eine intrinsische Histon-Acetyltransferase-Aktivität. Diese enzymatische Funktion führt zu *Chromatin-Remodeling* und ist für die Transaktivierung von BMAL1/CLOCK-Zielgenen nötig (Doi *et al.*, 2006). CLOCK ist zusätzlich in der Lage seinen direkten Interaktionspartner BMAL1 zu acetylieren. Diese Acetylierung folgt in Mausleber einem zirkadianen Muster und ist für die Interaktion des Heterodimers BMAL1/CLOCK mit

CRY1 notwendig (Hirayama *et al.*, 2007). Während CLOCK für die Acetylierung von BMAL1 eine wichtige Rolle spielt, ist die Histondeacetylase SIRT1, welche selbst unter zirkadianer Kontrolle steht, an der Deacetylierung von BMAL1 beteiligt.

Für die präzise Steuerung der zirkadianen Uhr spielen jedoch nicht nur posttranslationale Modifikationen eine wichtige Rolle, sondern ebenfalls die regulierte Translokation zwischen Zytoplasma und Nukleus. Es wird vermutet, dass BMAL1 die zirkadiane Translokation von CLOCK in den Nukleus herbeiführt (Kondratov *et al.*, 2003), da CLOCK keine eigene nukleäre Lokalisationssequenz besitzt (Kwon *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu BMAL1 folgt außerdem die mRNA- und Proteinsynthese von CLOCK keinem rhythmischen Muster (Oishi *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2006). Eine BMAL1-vermittelte Translokation von CLOCK könnte einen zusätzlichen Mechanismus für die Regulation des zirkadianen Rhythmus darstellen, da es dadurch zu einer periodischen Verfügbarkeit des heterodimeren Transaktivierungskomplexes aus BMAL1 und CLOCK kommt.

Studien demonstrierten den scheinbar paradoxen Befund, dass BMAL1-Proteinlevel ihren Tiefpunkt erreichen, wenn BMAL1 seine stärkste transkriptionelle Aktivität aufweist (Tamaru *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Torres-Farfan *et al.*, 2006). Die Transaktivierung durch BMAL1/CLOCK scheint somit eng an Degradationsprozesse gekoppelt zu sein. Dieses Szenario entspricht dem so genannten „*black widow model*“, in dem postuliert wird, dass instabile Transkriptionsfaktoren Transaktivierungsdomänen aufweisen, die funktionell mit ihren Degradationssignalen überlappen (Muratani und Tansey, 2003). Die Transkription ihrer Zielgene wird somit durch das Ubiquitin-Proteasomen-System kontrolliert. Diese schnelle und kontrollierte Degradation des Heterodimers BMAL1/CLOCK erlaubt eine enge Kontrolle der Periodizität des zirkadianen Rhythmus.

### 1.1.3.2 Nicht-transkriptionelle Rhythmen

Einige spezifische Beispiele zeigen, dass zirkadiane Rhythmen existieren, die nicht auf einem transkriptionellen/translationalen *feedback loop* basieren. In *in vitro* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass das Protein KaiC aus dem Cyanobakterium *S. elongatus* eine zirkadiane Phosphorylierung aufweist, wenn die Proteine KaiA, KaiB und KaiC zusammen mit

ATP isoliert in einem Reaktionsröhrchen vorliegen (Nakajima *et al.*, 2005). Es konnten außerdem zirkadiane Rhythmen identifiziert werden, die unabhängig von der Transkription in diversen Organismen, wie Algen und Menschen, auftreten. In der Alge *Ostreococcus tauri* stoppt die Transkription in der Abwesenheit von Licht. Der 24-stündige Oxidationszyklus der antioxidanten Peroxiredoxin-Proteine bleibt jedoch auch unter konstanter Dunkelheit erhalten (O'Neill *et al.*, 2011a). In humanen kernlosen Erythrozyten konnte dieser zirkadiane Oxidationszyklus von Peroxiredoxinen ebenfalls detektiert werden (O'Neill *et al.*, 2011b). Diese transkriptionsunabhängigen Oszillationen zeigten Temperaturkompensation und waren durch Temperaturzyklen synchronisierbar. In Zellen, die einen Zellkern enthalten, beeinflusst die transkriptionell regulierte zirkadiane Uhr jedoch die zytoplasmatische Peroxiredoxin-Uhr (O'Neill *et al.*, 2011b). Die Oszillation der Peroxiredoxin-Oxidation liegt hoch konserviert in allen bisher untersuchten Organismen vor (Edgar *et al.*, 2012). Es ist daher wahrscheinlich, dass noch weitere molekulare Rhythmen existieren, die unabhängig vom transkriptionell regulierten Oszillator funktionieren.

## 1.2 Die Hitzeschockantwort

Im Jahre 1962 entdeckte der italienische Wissenschaftler Ferruccio Ritossa erstmals Temperatur-induzierte Aufblähungen, die so genannten „Puffs“, in den polytenen Riesenchromosomen der Larven der Taufliege *D. melanogaster* (Ritossa, 1962). Ein Jahrzehnt später konnten diese „Puffs“ mit der Aktivierung der Gene korreliert werden, die für Hitzeschock-Proteine (HSPs) kodieren, welche als molekulare Chaperone fungieren (Lindquist, 1986). Die Hitzeschockantwort ist ein Mechanismus, der in allen Organismen, von der Hefe bis zum Menschen, hoch konserviert vorliegt. Proteotoxische Stresssignale wie Hitze, oxidativer Stress, Schwermetalle, Toxine und bakterielle oder virale Infektionen führen dazu, dass die Hitzeschockantwort induziert wird. Die Konservierung dieses Systems zwischen verschiedenen Eukaryoten legt nahe, dass die Hitzeschockantwort für das Überleben dieser Organismen essentiell ist (Åkerfelt *et al.*, 2010).

Die Hitzeschockantwort wird auf transkriptioneller Ebene durch cis-regulatorische Sequenzen, die so genannten Hitzeschock-Elemente (HSEs), vermittelt. Diese Elemente liegen in den Promotoren von Hitzeschock-Proteinen, sind hoch konserviert und bestehen aus invertierten Wiederholungen der pentamerischen Sequenz nGAAn (Pelham, 1982). Durch DNA-Protein-Interaktionsstudien an isolierten Zellkernen von *D. melanogaster* Zellen konnten erstmals Hinweise für einen spezifischen transkriptionellen Regulator der Hitzeschockantwort, einen Hitzeschock-Transkriptionsfaktor, gefunden werden (Wu, 1984; Parker und Topol, 1984). Anders als bei Invertebraten, werden in Pflanzen- und Vertebraten-Zellen verschiedene Hitzeschock-Faktoren exprimiert (Wu, 1995; Nover *et al.*, 2001; Åkerfelt *et al.*, 2007).

Die Familie der Hitzeschock-Faktoren in Säugetieren umfasst 4 Mitglieder: HSF1, HSF2, HSF3 und HSF4. Diese einzelnen Hitzeschock-Faktoren weisen sowohl unterschiedliche, als auch sich überlappende Funktionen auf, werden gewebespezifisch exprimiert, posttranslational modifiziert und interagieren mit verschiedenen Proteinp Partnern (Åkerfelt *et al.*, 2007; Ankar und Sistonen, 2007; Fujimoto *et al.*, 2010). Sowohl posttranslationale Modifikationen, als auch das Zusammenspiel und die funktionelle Interaktion verschiedener Hitzeschock-Faktoren regulieren spezifisch die Hitzeschockantwort in Säugetierzellen. Die Identifikation neuer Zielgene und physiologischer Funktionen zeigte, dass HSFs nicht nur die Hauptrolle in der Antwort auf Hitzeschock in Zellen spielen, sondern ebenfalls wichtige Rollen in verschiedenen Funktionen von Zellen und Geweben übernehmen. Deletionsexperimente von HSF-

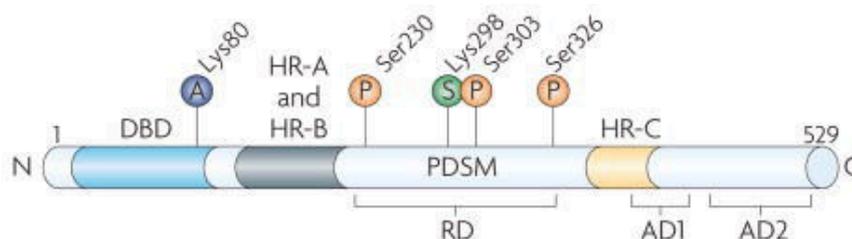
Genen in *D. melanogaster* wiesen nach, dass Hitzeschock-Faktoren essentiell für die Entwicklung der Taufliegen-Larven sind (Jedlicka *et al.*, 1997). HSF1, HSF2 und HSF4 werden außerdem für Wachstum, Lebensdauer, Gehirnentwicklung, Augenfunktion, Fertilität und Spermatogenese in Säugetieren benötigt (Christians *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2004; Mendell, 2008). Verschiedene HSFs scheinen zusätzlich eine Rolle in humanen Krankheiten und Alterungsprozessen spielen (Calderwood *et al.*, 2009). In neurodegenerativen Erkrankungen wie Huntington und Parkinson wird die Stress-Antwort nur unvollständig induziert, was zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine führt (Prahlad und Morimoto, 2009). Erhöhte Mengen an HSF1 konnten außerdem in verschiedenen Formen humaner Karzinome, wie zum Beispiel Brust- oder Prostatakrebs nachgewiesen werden (Tang *et al.*, 2005; Khaleque *et al.*, 2008).

### **1.2.1 Hitzeschock-Faktor 1 – Hauptregulator der Hitzeschockantwort**

Aufgrund seiner essentiellen und evolutionär konservierten Funktion in der zellulären Antwort auf Hitzestress ist der Transkriptionsfaktor HSF1 das am besten charakterisierte Mitglied der HSF-Familie. HSF1 ist in vielen Geweben und Zelltypen konstitutiv exprimiert und wird hauptsächlich durch posttranslationale Modifikationen reguliert (Wu, 1995). In der Abwesenheit von Stressfaktoren liegt HSF1 in einer inaktiven monomeren Form im Zytoplasma und Zellkern vor. Unter proteinschädigenden Stressbedingungen wird HSF1 aktiviert und initiiert die Transkription von Hitzeschock-Proteinen (Zou *et al.*, 1998; Ankar und Sistonen, 2007). Nach Abnahme der Stresssignale wird die transkriptionelle Aktivität von HSF1 abgeschwächt und es kehrt in seinem monomeren Zustand zurück (Zou *et al.*, 1998; Ankar und Sistonen, 2011).

### 1.2.1.1 Funktionelle Domänen von HSF1

Hitzeschock-Faktor 1 besitzt wie andere Transkriptionsfaktoren auch unterschiedliche funktionelle Domänen (vgl. Abb. 1.3). Die DNA-bindende Domäne (DBD) ist eine der evolutionär am besten konservierten Strukturen und gehört zu der Familie der *winged Helix-turn-Helix*-DBD (Damberger *et al.*, 1994; Harrison *et al.*, 1994; Vuister *et al.*, 1994). Die DBD kann Bindungen zu anderen Faktoren vermitteln, die für die Transaktivierung von HSF1 nötig sind (Bulman *et al.*, 2001). Die Trimerisierung von HSF1 wird durch die Heptad-Repeats HR-A und HR-B vermittelt. Die spontane Trimerisierung von HSF1-Molekülen wird durch das Heptad-Repeat HR-C supprimiert (Chen *et al.*, 1993; Rabindran *et al.*, 1993; Nakai *et al.*, 1997). Am äußeren Ende des Carboxyl-Terminus liegt die Transaktivierungsdomäne von HSF1, welche aus zwei Einheiten gebildet wird – AD1 und AD2. Diese Domäne ist reich an hydrophoben und sauren Resten, die zusammen eine schnelle und lang anhaltende Antwort auf Stresssignale gewährleisten (Green *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 1996).



**Abbildung 1.3: Überblick über die funktionellen Domänen und posttranslationalen Modifikationen von HSF1**  
Die DNA-bindende Domäne (DBD), Heptad-Repeats A, B und C (HR-A, HR-B, HR-C), die regulatorische Domäne (RD) und die Aktivierungsdomänen 1 und 2 (AD1, AD2) sind hier aufgezeigt. Einige der identifizierten Positionen für Acetylierung (A), Phosphorylierung (P) und Sumoylierung (S), sowie die für das Phosphorylierungs-abhängige Sumoylierungsmotif (PDSM) wurden kenntlich gemacht (Akerfelt *et al.*, 2010).

### 1.2.1.2 Aktivierungsmechanismen von HSF1

Für die Aktivierung und den thermosensorischen Mechanismus von HSF1 wurden verschiedene Modelle postuliert. Die genauen Prozesse, die zur Aktivierung von HSF1 führen sind jedoch immer noch nicht vollständig aufgeklärt.

Ein Modell umfasst die Theorie des klassischen Chaperon-Dislokationsmechanismus, bei dem HSF1 von Chaperonen, wie zum Beispiel HSP90, inaktiv gehalten wird. Tritt in Zellen proteotoxischer Stress auf, führt dies zur Neuassoziation von HSP90 mit fehlgefalteten Proteinen. HSF1 wird dabei freigesetzt und kann anschließend trimerisieren (Nadeau *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2001).

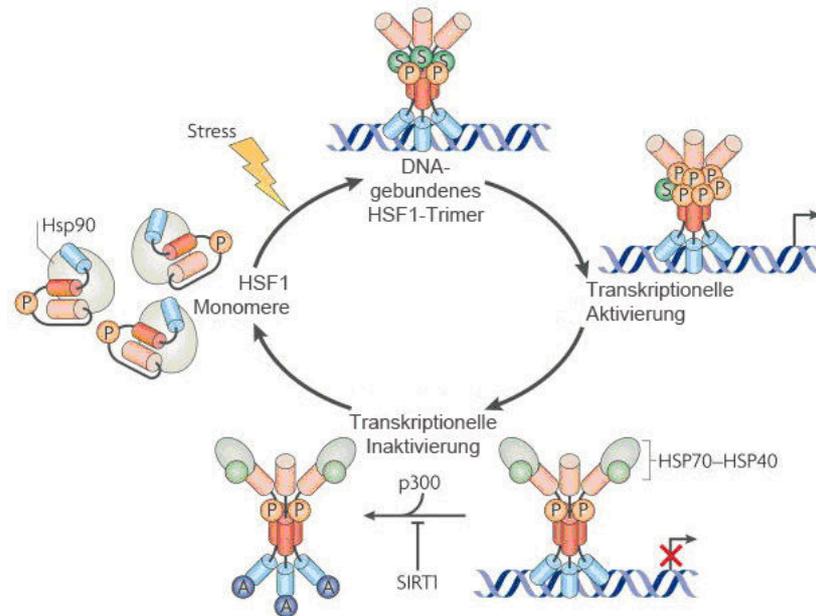
Eine andere Theorie besagt, dass HSF1 in einem temperatursensorischen Ribonukleoproteinkomplex mit dem Eukaryotischen Elongationsfaktor 1a (eEF1A) und der nicht kodierenden Hitzeschock-RNA-1 (HSR-1) vorliegt. Es wird vermutet, dass HSR-1 unter Hitzeschock-Bedingungen ihre Konformation ändert, wodurch sie an eEF1A bindet. Dieser Komplex ermöglicht daraufhin die Trimerisierung von HSF1 (Shamovsky *et al.*, 2006). Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass HSR-1 bakteriellen Ursprungs sein könnte und somit möglicherweise eine Kontamination in den vorhergehenden Analysen darstellte (Kim *et al.*, 2010). Im „Intrinsischen Antwort-Modell“ für die HSF1-Aktivierung wird vermutet, dass HSF1 selbst eine sensorische Funktion besitzt, die es erlaubt, proteotoxische Stimuli wahrzunehmen, was zu einer Trimerisierung von HSF1 führt. Diese Vermutungen wurden durch *in vitro* Studien untermauert, die zeigten, dass isolierte HSF1-Proteine durch einen *in vitro* Hitzeschock oder andere Stressoren Trimere bilden können (Mosser *et al.*, 1990; Goodson und Sarge, 1995; Farkas *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 2003).

Ein viertes Modell legt nahe, dass die Hitzeschock-Antwort unter neuronaler Kontrolle steht. Hinweise hierauf wurden in *Caenorhabditis elegans* gefunden. In diesen Versuchen war die hitzesensorische Funktion von AFD Neuronen oder postsynaptischen AIY Neuronen der Würmer mutiert, was zu einer Inhibition der Hitzeschockantwort im gesamten Organismus führte (Pralhad *et al.*, 2008). Die mechanistische Basis der neuronal gesteuerten Hitzeschockantwort ist bis jetzt jedoch noch nicht geklärt. Gemäß einer Hypothese wird die HSF1-Aktivität nicht-neuronal gesteuerter Zellen durch neuroendokrine Signale, stimulatorischer oder inhibitorischer Natur, moduliert (Pralhad *et al.*, 2008, Anckar und Sistonen, 2011).

### 1.2.1.3 Regulation des HSF1-Aktivierungszyklus

In der Abwesenheit von Stress liegt HSF1 als inaktives Monomer im Zytoplasma und Nukleus vor. Unter proteinschädigenden Bedingungen wird HSF1 innerhalb weniger Minuten aktiviert. Die Aktivierung von HSF1 besteht aus einem mehrstufigen Prozess, bei dem inaktive, monomere HSF1 Proteine in hoch affin DNA-bindende HSF1-Trimere überführt werden. Während des Aktivierungsprozesses wird die Translokation von HSF1 zwischen dem Zytoplasma und Nukleus inhibiert, wodurch es zu einer Akkumulation von HSF1-Trimeren im Zellkern kommt (Mercier *et al.*, 1999). HSF1-Trimere binden an HSEs in den Promotoren von Hitzeschock-Proteinen und aktivieren ihre Transkription (vgl. Abb. 1.4). HSF1 ist jedoch nicht nur in der Lage Homotrimere zu bilden, sondern kann außerdem mit HSF2-Molekülen trimerisieren (Sandqvist *et al.*, 2009). Die Bildung von Heterotrimeren mit HSF2 scheint die HSF1-vermittelte Expression von HSPs zu modulieren. Experimente mit *Hsf2 knock-out* Mäusen wiesen nach, dass sich unter Hitzeschock das HSP-Expressionsmuster von dem in Wildtyp-Mäusen unterscheidet.

Während des Aktivierungsprozesses unterliegen HSF1-Trimere erheblicher Hyperphosphorylierung, welche an Serin-Seitenketten, vornehmlich in der regulatorischen Domäne, stattfindet. Die Phosphorylierung der Serine 230 und 326 führt nach der Akkumulation im Nukleus zu einer verstärkten Transaktivierung von HSF1 (Holmberg *et al.*, 2001; Guettouche *et al.*, 2005). Wird jedoch HSF1 am Serin303 phosphoryliert, resultiert dies in einer Phosphorylierungs-abhängigen Sumoylierung von HSF1 am Lysin298, welches im Phosphorylierungs-abhängigen Sumoylierungsmotif (PDSM) liegt (Knauf *et al.*, 1996; Kline und Morimoto, 1997). Die Sumoylierung führt dazu, dass die Transaktivierungsfunktion von HSF1 beeinträchtigt wird. Diese posttranslationale Modifikation wird entfernt, sobald die maximale HSF1-Aktivität, wie zum Beispiel unter starkem Hitzeeinfluss, benötigt wird. Unter moderaten Stresskonditionen kann diese Sumoylierung jedoch die HSF1-Aktivität modulieren (Hietakanagas *et al.*, 2003). Aktivierte HSF1-Trimere können außerdem mit HSP70 und dem Co-Chaperon HSP40 interagieren. Diese Interaktion inhibiert ebenfalls die Transaktivierungsfunktion von HSF1 (Baler *et al.*, 1992; Abravaya *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1998).



**Abbildung 1.4: Der HSF1-Aktivierungszyklus**

Unter normalen Bedingungen liegt HSF1 als inaktives Monomer im Zytoplasma und Zellkern vor. Durch proteotoxischen Stress wird HSF1 aktiviert, bildet Trimere und bindet an Hitzeschock-Elemente (HSE) in den Promotoren von Hitzeschock-Genen im Zellkern. Verschiedene posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung und Sumoylierung, regulieren die Transaktivierungskapazität von HSF1. In der Abschwächungsphase führt die Bindung durch Hitzeschock-Proteine zu einer Verringerung der Transaktivierung, während Acetylierung durch p300 zur Inhibition der DNA-Bindung führt. HSF1 kehrt daraufhin in das Zytoplasma zurück und wird erneut durch HSP90 gebunden (Åkerfelt *et al.*, 2010 (modifiziert)).

Während Phosphorylierung und Sumoylierung unverzüglich während des Hitzeschocks stattfinden, tritt die Acetylierung von HSF1 verspätet und im Zusammenhang mit der Abschwächungsphase der Hitzeschock-Antwort auf. Stress-induzierte Acetylierung von HSF1 wird durch den Proteinkomplex p300-CBP (CREB-Bindungsprotein) vermittelt, während die Deacetylierung durch SIRT1 erfolgt. Gesteigerte Expression und Aktivität von SIRT1 verstärkt und verlängert die DNA-Bindungsaktivität von HSF1 (Westerheide *et al.*, 2009). Derzeitige wissenschaftliche Erkenntnisse zeigen, dass die Abschwächungsphase des HSF1-Zyklus durch zwei Mechanismen reguliert wird. Zum einem ist dies von der zellulären Menge an HSPs abhängig, die durch die Bindung an HSF1 eine negative Rückkopplung verursachen, zum anderen von der SIRT1-abhängigen Kontrolle der DNA-Bindungsaktivität von HSF1 (Åkerfelt *et al.*, 2010). Nach der Inaktivierung von HSF1 kehrt es in seinen monomeren Zustand zurück.

#### 1.2.1.4 HSF1 ist in nukleären Stresskörperchen lokalisiert

Nukleäre Stresskörperchen (nSK) konnten bereits in den späten 1980er Jahren in Zellen, welche proteotoxischem Stress unterlagen, detektiert werden (Mahl *et al.*, 1989). Sie stellen einzigartige subnukleäre Organellen dar, welche sich klar von anderen nukleären Granula abgrenzen und deren Bildung durch die direkte Interaktion zwischen HSF1 und perizentrischen Tandemwiederholungen von Satellit III (Sat III) Sequenzen initiiert wird. Diese Sequenzen korrespondieren mit aktiven Transkriptionssequenzen der nicht-kodierenden Sat III Gene. nSKs konnten bisher ausschließlich in Zellen von Primaten oder Menschen gefunden werden und scheinen an der schnellen und transienten Veränderung der Genexpression in Stress-unterliegenden Zellen beteiligt zu sein (Denegri *et al.*, 2002). Zu ihren Hauptfunktionen gehört es, Chromatin-*Remodeling* und die Rekrutierung von Transkriptions- und Splicing-Faktoren zu ermöglichen (Jolly *et al.*, 2004; Biamonti und Vourch, 2010).

Neben HSF1 konnten eine Reihe weiterer Faktoren in nSK identifiziert werden. Alastalo *et al.* (2003) zeigten, dass HSF2 zusammen mit HSF1 in nukleären Stresskörperchen unter Stressbedingungen lokalisiert ist. Die Translokation von heterogenen Ribonukleoproteinen (hnRNP) und anderen RNA-prozessierenden Faktoren in nSK konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Zu diesen Faktoren gehören das hnRNP A1-assoziierte Protein (HAP), hnRNP M, Sam68 (*Src-activated during mitosis*) und eine Reihe von SR (Serin-Arginin-reichen) Splicing-Faktoren (Weighardt *et al.*, 1999; Jolly *et al.*, 1999; Denegri *et al.*, 2001). Die Rekrutierung dieser Proteine wird durch die Anwesenheit der Sat III Transkripte in nSK vermittelt (Denegri *et al.*, 2001; Metz *et al.*, 2004). Die Lokalisation von Splicing- und Transkriptionsfaktoren in nukleären Stresskörperchen könnte durch die Notwendigkeit von stressinduzierter alternativer Prozessierung spezifischer Transkripte gesteuert werden. Trotz intensiver Untersuchungen ist die genaue Funktion HSF1-enthaltender nukleärer Stresskörperchen jedoch immer noch unklar.

## 1.2.2 Hitzeschock-Proteine als molekulare Chaperone

Generell beinhalten Polypeptidketten von Proteinen alle nötigen Informationen, um ihre benötigte funktionelle Konformation zu erlangen (Crick, 1958; Anfinsen, 1973). Obwohl dieser Grundsatz für die meisten Proteine gilt, ist die Information in einigen Polypeptidketten jedoch nicht vollständig genug, um die Bildung einer funktionell aktiven dreidimensionalen Struktur zu garantieren. Viele dieser Proteine können sich nicht spontan falten und benötigen die Hilfe molekularer Chaperone. Molekulare Chaperone sind zelluläre Proteine, die sicherstellen, dass die Faltung spezifischer Polypeptidketten und ihre Anordnung in Oligomerstrukturen korrekt erfolgt (Ellis, 1987). Sie stellen einen wichtigen Teil des zellulären Qualitätskontrollsystems dar, halten die komplexe Balance zwischen Proteinsynthese und Degradation und schützen Zellen vor den Konsequenzen unkontrollierter Proteinaggregation (Ellis, 1987; Bukau *et al.*, 2006; Westerheide *et al.*, 2012). Der Mechanismus, mit dem Chaperone Fehlfaltung und Proteinaggregation entgegen wirken, kann in drei Klassen eingeteilt werden: Prävention, Umkehrung und Eliminierung. Auf der Ebene der Prävention binden Chaperone an ungefaltete Polypeptidketten und halten diese in einem faltungskompetenten Zustand, welcher Proteinaggregation verhindert. Während des Umkehrmechanismus lösen Chaperone Proteinaggregate, so dass fehlgefaltete Proteine sich erneut in ihre funktionelle Konformation falten können. Bei der Eliminierung binden Chaperone Proteinaggregate und führen sie der Degradation über das Ubiquitin-Proteasom- oder Autophagie-Lysosomen-System zu (Westerheide *et al.*, 2012).

Hitzeschock-Proteine besitzen Chaperon-Aktivität und können anhand ihrer molekularen Masse in sechs hoch konservierte Klassen eingeteilt werden: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 und kleine Hitzeschock-Proteine (sHSPs) (Katschinski, 2004). Hitzeschock-Proteine sind im Zytosol, Nukleus, Mitochondrien und Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die Lokalisation variiert jedoch zwischen den einzelnen Hitzeschock-Proteinen (Kregel, 2002). „Faltungs“-Chaperone, zu denen HSP60, HSP70 und HSP90 in Eukaryoten gehören, unterliegen ATP-abhängigen Konformationsänderungen, um die Neufaltung oder Entfaltung ihrer Substrate zu gewährleisten. „Haltungs“-Chaperone wie HSP33 oder HSP25 binden partiell gefaltete Proteine und halten ihre Substrate an ihrer Oberfläche, um sie „Faltungs“-Chaperonen zu präsentieren. Die „Disaggregations“-Chaperone, wie zum Beispiel HSP104 in Eukaryoten, fördern die Solubilisierung von Proteinen, die aufgrund von Stressbedingungen

Aggregate gebildet haben (Westerheide *et al.*, 2012). Aufgrund ihres Expressionsmechanismus werden Chaperone entweder als induzierbar oder konstitutiv exprimiert klassifiziert. Beide Chaperon-Klassen binden selektiv exponierte hydrophobe Segmente nichtgefalteter Polypeptide und führen durch multiple Bindungszyklen zur Faltung dieser Proteine (Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Bukau *et al.*, 2006).

Die Konzentration induzierbarer Chaperone, auch Hitzeschock-Proteine genannt, steigt als eine Antwort auf Stressbedingungen an. Diese Chaperone verhindern Fehlfaltungen und Proteinaggregation unter proteotoxischen Bedingungen (Lindquist, 1986; Lindquist und Craig 1988). Konstitutiv exprimierte Chaperone, auch als Hitzeschock-verwandte Proteine (*Heat Shock Cognate Proteins*, HSCs) bekannt, ermöglichen Proteintranslation, falten neu synthetisierte Proteine, fördern die Anordnung funktioneller Proteinkomplexe und sind in der Translokation von Proteinen in zelluläre Kompartimente, wie zum Beispiel Mitochondrien, involviert (Young *et al.*, 2004).

### 1.2.2.1 Der HSP90-Chaperon-Komplex

HSP90 ist von Prokaryoten bis hin zu Säugetieren eines der evolutionär am stärksten konservierten molekularen Chaperone und vermittelt fundamentale zelluläre Prozesse, wie Zellzyklus-Kontrolle, Zellüberleben, Hormonsignalwege und Schutz gegen proteotoxischen Stress (Borkovich *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2005; Wandering *et al.*, 2008; Dezwaan und Freeman, 2008; Richter *et al.*, 2010). Die Funktion von HSP90 ist somit eine Schlüsselkomponente in der Aufrechterhaltung zellulärer Homöostase.

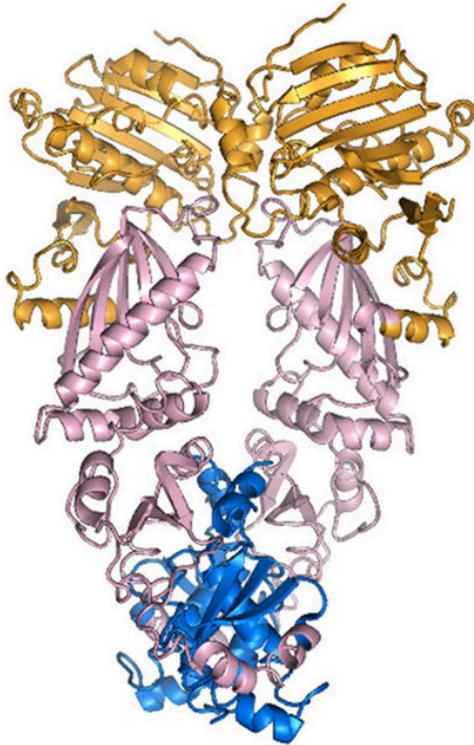
In Eukaryoten ist HSP90 sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleus und Zellorganellen lokalisiert und macht 1-2% der Gesamtmenge aller löslichen Proteine der Zelle aus (Borkovich *et al.*, 1998). Da HSP90 keine nukleäre Lokalisationssequenz besitzt, wird vermutet, dass es durch den Co-Transport mit seinen Zielproteinen in den Zellkern gelangt (Taipale *et al.*, 2010). Nukleär lokalisiertes HSP90 stellt somit eine kleine Fraktion des zytosolischen HSP90 dar (Langer *et al.*, 2003).

In Säugetieren existieren zwei zytosolische HSP90-Isoformen: eine induzierbare Form (HSP90 $\alpha$ ), kodiert durch das Gen HSP90AA1 und eine konstitutiv exprimierte Form (HSP90 $\beta$ ), welches durch das Gen HSP90AB1 kodiert wird (Csermely *et al.*, 1998). Organell-spezifische

HSP90-Formen existieren sowohl in Mitochondrien (TRAP1), als auch in Chloroplasten und dem Endoplasmatischen Reticulum (GRP94) (Shiu *et al.*, 1977; Felts *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2001). Wechselwirkungen mit ausschließlich zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen konnten jedoch für GRP94 und TRAP1 ebenfalls beschrieben werden (Csermely *et al.*, 1996). Alle HSP90-Isoformen scheinen außerdem zu einem gewissen Anteil im Nukleus zu existieren (Welch *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1996).

In Eukaryoten ist HSP90 an der Bildung der korrekten Konformation und Aktivierung von über 200 Zielproteinen, auch HSP90-Clients genannt, beteiligt (Pratt und Toft, 1997; Zhao *et al.*, 2005; McClellan *et al.*, 2007). Frühe Arbeiten über HSP90-Clients fokussierten sich fast ausschließlich auf zwei Klassen von Proteinen: Proteinkinasen und nukleäre Rezeptoren (Ziemięcki *et al.*, 1986; Howard *et al.*, 1990; Xu und Lindquist, 1993). In den letzten Jahren wurden jedoch weitere Client-Proteine identifiziert, die in fast allen physiologischen Abläufen eine Rolle spielen, wie zum Beispiel in der Signaltransduktion, Tumorgenese, angeborenen Immunität, viralen Infektion, Muskelkontraktion, Zellbewegungen und Kalzium- und Stickstoffsignalgebung (Soroka und Buchner, 2012). Für die Rekrutierung und Bindung von Client-Proteinen an HSP90 in Eukaryoten, ist eine Interaktion von HSP90 mit Hitzeschock-Protein 70 (HSP70) und verschiedenen Co-Chaperonen erforderlich (Smith, 1993; Pratt und Toft, 2003).

### 1.2.2.1.1 Struktur und Konformationsdynamik von HSP90



**Abbildung 1.5: Kristallstruktur von HSP90**  
(Silva und Ramos, 2012)

HSP90 gehört zu der Familie der GHKL (Gyrase, Hsp90, Histidine Kinase, MutL) ATPasen, welche untereinander eine hoch konservierte strukturelle Homologie der ATP-Bindestelle aufweisen (Pearl und Prodromou, 2006). Es bildet ein flexibles Homodimer, in welchem jedes Protomer eine N-terminale ATP-Bindedomäne (NTD; Abb. 1.5, gelbe Struktur), gefolgt von einer geladenen Region variabler Länge, einer Mitteldomäne (MD; Abb. 1.5, violetter Bereich) für die Bindung von Client-Proteinen und Co-Chaperonen und eine C-terminale Dimerisierungsdomäne (CTD; Abb. 1.5, blaue Struktur) besitzt (Prodromou, 1997; Pearl und Prodromou, 2006; Hainzl *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2003). Die C-terminale Domäne enthält das so genannte MEEVD-Motif (Met-Glu-Glu-Val-Asp),

welches zusätzlich die Bindung an Co-Chaperone von HSP90 vermittelt (Young *et al.*, 1998).

Für die Erkennung des umfangreichen Client-Repertoires sind hoch dynamische Konformationsänderungen von HSP90 erforderlich. Biochemische Studien weisen darauf hin, dass die ATP-Bindung an die N-terminale Domäne den Übergang von einer offenen in eine geschlossene Konformation fördert (Csermely *et al.*, 1993; Sullivan *et al.*, 1997). Die Hydrolyse von ATP scheint außerdem an weitere strukturelle Umlagerungen von HSP90 gekoppelt zu sein (Chadli *et al.*, 2000; Prodromou *et al.*, 2000). Diese strukturellen Umlagerungen, auch HSP90-ATPase-Zyklus oder Chaperon-Zyklus genannt, sind für die Reifung von Client-Proteinen durch HSP90 essentiell. Die ATPase-Aktivität von HSP90 wird durch die Bindung von Client-Proteinen und speziellen Co-Chaperonen zusätzlich beeinflusst (Nadeau *et al.*, 1992, 1993).

### 1.2.2.1.2 Regulation von HSP90 durch Co-Chaperone und posttranslationale Modifikationen

In eukaryotischen Zellen wurden bis zu diesem Zeitpunkt mehr als 20 Co-Chaperone von HSP90 identifiziert (Li *et al.*, 2012). Die biologische Funktion dieser Proteine ist jedoch noch weithin unverstanden. Co-Chaperone, deren Funktion näher untersucht wurde, modulieren die Funktion von HSP90 auf vier verschiedene Weisen: sie koordinieren die Interaktion von HSP90 und anderen Chaperonen, wie zum Beispiel HSP70; sie stimulieren oder inhibieren die ATPase-Aktivität von HSP90; sie rekrutieren spezifische Klassen von HSP90-Clients; sie tragen zu verschiedenen Schritten des Chaperon-Zyklus von HSP90 bei (Taipale *et al.*, 2010).

Die größte Gruppe von Co-Chaperonen umfasst Proteine, die eine so genannte TRP (*tetratricopeptide repeat*) Domäne (eine helikale Haarnadelstruktur) aufweisen. Diese Co-Chaperone binden mit ihrer TRP-Domäne an das MEEVD-Motif der C-terminalen Domäne von HSP90 (Young *et al.*, 1998). Ihre Aufgabe liegt in der Rekrutierung spezifischer Proteine oder Multiproteinkomplexe an HSP90 (Smith *et al.*, 1993; Silverstein *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1998; Jascur *et al.*, 2005). Andere Co-Chaperone, die an die Mitteldomäne und den N-terminalen Bereich von HSP90 binden, sind in die Inhibierung oder Aktivierung der ATPase-Aktivität von HSP90 involviert (Hessling *et al.*, 2009).

Die Funktion und Konformation von HSP90 wird jedoch nicht nur durch die Bindung an seine Co-Chaperone reguliert, sondern darüber hinaus auch durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Zu den am häufigsten auftretenden posttranslationalen Modifikationen von HSP90 gehört die Phosphorylierung. HSP90 wird sowohl an Serinresten, als auch an Tyrosin- und Threoninresten phosphoryliert (Scroggins und Neckers, 2007). Der Effekt einzelner Phosphorylierungen von HSP90 auf seine Funktionen wird derzeit noch untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass Phosphorylierungen für eine Reihe von HSP90-Funktionen notwendig sind. So werden unter anderem die ATPase-Funktion, Bindung an Co-Chaperone und Client-Proteine und die Dimerisierung von HSP90 beeinflusst (Li *et al.*, 2011). HSP90 wird außerdem in einer Isoform-spezifischen Weise phosphoryliert. Die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) ist an der Phosphorylierung zweier spezifischer Threoninreste in HSP90 $\alpha$  beteiligt, phosphoryliert HSP90 $\beta$  jedoch nicht (Lees-Miller und Anderson, 1989). Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, dass die beiden HSP90-Isoformen im zellulären Kontext nicht vollständig redundant sind.

Acetylierung ist eine weitere wichtige posttranslationale Modifikation von HSP90. Die Acetyltransferase p300 ist an der Acetylierung von HSP90 beteiligt, während die Histondeacetylase 6 (HDAC6) HSP90 deacetyliert (Kovacs *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Neckers und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass die Änderung im Acetylierungsstatus einen Schlüsselregulator in der Funktion von HSP90 im Menschen und der Hefe darstellt und die Bindung von Co-Chaperonen und Client-Proteinen steuert (Scroggins *et al.*, 2007).

HSP90 wird zudem durch S-Nitrosylierung und NO-Modifizierung von Cysteinresten der C-terminalen Domäne von humanem HSP90 $\alpha$  reguliert. Diese posttranslationale Modifikation beeinflusst die Chaperonfunktion von HSP90 (Garcia-Cardena *et al.*, 1998). Weitere Studien sind jedoch erforderlich, um die Effekte von S-Nitrosylierung auf HSP90 im Detail zu klären.

#### **1.2.2.1.3 HSP90 führt zur Stabilisierung und Degradation von Client-Proteinen**

Die Interaktion von HSP90 mit Client-Proteinen führt zur korrekten Faltung, Aktivierung, Transport und/oder Degradation dieser Proteine (Picard *et al.*, 1990; Pratt *et al.*, 1990; Young *et al.*, 2003; Whittier *et al.*, 2004). Genauso wie zelleigene Proteine scheinen auch virale Proteine von der Faltung durch HSP90 abhängig zu sein (Geller *et al.*, 2007; Ujino *et al.*, 2009; Shim *et al.*, 2011). Bakterielle Toxine, wie zum Beispiel das Diphtherie-Toxin, konnten ebenfalls als HSP90-Clients identifiziert werden (Dmochewitz *et al.*, 2011).

Die Frage nach der molekularen Basis der Erkennung von Client-Proteinen durch HSP90 konnte bisher noch nicht eindeutig beantwortet werden. Bis zu diesem Zeitpunkt ist keine gemeinsame Proteinsequenz oder spezielle Bindungsstelle zwischen den einzelnen Clients für die Bindung von HSP90 identifiziert worden. Der  $\alpha$ C- $\beta$ 4-Loop in Kinasedomänen konnte als wichtiger Interaktionspunkt zwischen HSP90 und Clients nachgewiesen werden. Diese Stelle ist jedoch nicht der einzige bestimmende Faktor für die Interaktion, da auch angrenzende Regionen in Kinasedomänen die Bindung an HSP90 beeinflussen können (Li *et al.*, 2006; Citri *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass die Bindung von HSP90 an Clients vielmehr durch deren Konformation und Stabilität und nicht primär durch deren Struktur vermittelt wird (Falsone *et al.*, 2004). Darüber hinaus tragen Co-Chaperone zum Prozess der Client-Selektion und Erkennung bei (Vaughan *et al.*, 2006).

Die strukturelle Analyse der HSP90/Client-Interaktion gestaltet sich als überaus schwierig, da viele dieser Komplexe sehr instabil und daher kurzlebig sind. Strukturelle Untersuchungen ergaben, dass Clients asymmetrisch an die N- oder M-Domäne von HSP90 gebunden werden. Diese Bindungen führen zu einer partiell geschlossenen Konformation von HSP90 und verstärken seine ATPase-Aktivität (Street *et al.*, 2011).

Neben seiner stabilisierenden Funktion auf Clients kann HSP90 ebenfalls zur Destabilisierung von Client-Proteinen führen. HSP90 wird zum Beispiel für die Degradation des Proteins VHL (*Von Hippel-Lindau disease tumour suppressor*) benötigt, ist jedoch nicht an seiner Faltung *in vivo* beteiligt (McClellan *et al.*, 2005 A). Andere Proteine, die nach mehreren Runden der Proteinfaltung weiterhin fehlgefaltet vorliegen, werden durch HSP90 dem proteasomalen Degradationssystem zugeführt (McClellan *et al.*, 2005 B).

#### **1.2.2.2 Die Hitzeschockantwort und der zirkadiane Oszillator**

Eines der grundlegenden Merkmale des zirkadianen Oszillators, die Temperaturkompensation, ist die Eigenschaft mit einer unveränderten Periodenlänge über einen weiten Temperaturbereich zu funktionieren. Bereits 1987 vermuteten Rensing *et al.* dass eine Erhöhung der Temperatur über einen Prozess, der der Hitzeschock-Antwort zugehörig ist, Einfluss auf zirkadiane Rhythmen nehmen kann. Verschiedene Analysen der letzten Jahrzehnte erbrachten, dass Temperaturoszillationen vom Einzeller bis zum Säugetier als starke Zeitgeber-Signale für periphere zirkadiane Oszillatoren wirken (Zimmerman *et al.* 1968; Francis und Sargent, 1979; Underwood und Calaban, 1987; Brown *et al.*, 2002; Herzog und Huckfeldt, 2003; Boothroyd *et al.*, 2007). Im Jahre 2008 konnte erstmals gezeigt werden, dass ein Hitzeschock-Faktor in direkter Verbindung mit der zirkadianen Uhr von Säugetieren steht. Hitzeschock-Faktor 1, der Hauptregulator der Hitzeschock-Antwort, konnte in Experimenten mit Mäusen als zirkadianer Transkriptionsfaktor und Modulator der zirkadianen Uhr identifiziert werden. Während seine Protein- und mRNA-Level im Tagesverlauf nicht oszillieren, erwies sich der Import von HSF1 in den Nukleus von Mausleberzellen jedoch als hoch rhythmisch. Experimente mit HSF1-defizienten Mäusen zeigten darüber hinaus, dass die zirkadiane Uhr in Abwesenheit von HSF1 stark beeinträchtigt ist. Die Periodenlänge des zirkadianen Rhythmus von *Hsf1*

*knock-out* Mäusen ist unter konstanten Bedingungen um ca. 40 Minuten länger als in Wildtyp-Mäusen (Reinke *et al.*, 2008).

Die pharmakologische Inhibition der Hitzeschock-Antwort führt außerdem zu einer Veränderung der Periodenlänge von SCN Neuronen und beeinträchtigt die Temperaturkompensation und das *Entrainment* peripherer Uhren (Buhr *et al.*, 2010). HSF1 scheint zusätzlich an der Synchronisierung der Phase von Mausfibroblasten an physiologische Temperaturzyklen beteiligt zu sein (Saini *et al.*, 2012). Tamaru *et al.* wiesen schließlich 2011 erstmals eine direkte Interaktion von HSF1 und dem Heterodimer BMAL1/CLOCK nach.

Die zirkadiane Regulation von Hitzeschock-Faktor 1 lässt vermuten, dass auch die Expression seiner Zielgene ein zirkadianes Muster aufweisen. Die Expressionslevel verschiedener Hitzeschockgene, wie zum Beispiel HSP90, erwiesen sich in Mausleber als hoch zirkadian (Kornmann *et al.*, 2007). HSP90 $\alpha$  und HSP90 $\beta$  besitzen im SCN von Mäusen ebenfalls ein zirkadianes Expressionsmuster (Fukuyama *et al.*, 2008). Experimente in *Arabidopsis thaliana* erbrachten, dass das mit der zirkadianen Uhr assoziierte F-Box-Protein ZEITLUPE durch HSP90 im Zytoplasma stabilisiert wird. Inhibition von HSP90 führte zu reduzierten Proteinlevels von ZEITLUPE und zu einer verlängerten Periodenlänge der molekularen Uhr (Kim *et al.*, 2011). HSP90 scheint außerdem an der Verbindung zwischen zirkadianer Uhr und Verhalten von *D. melanogaster* beteiligt zu sein, ist jedoch für die Funktion der molekularen Rückkopplungsschleife nicht essentiell notwendig (Hung *et al.*, 2009).

Sowohl Hitzeschock-Faktoren als auch Hitzeschock-Proteine scheinen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der zirkadianen Rhythmik von Organismen einzunehmen und dieser wiederum selber unterliegen. Jedoch sind die genauen Wechselwirkungen von Hitzeschock-Faktoren und Hitzeschock-Proteine mit der zirkadianen Uhr auf molekularer Ebene immer noch nicht genau charakterisiert und bedürfen weiterer intensiver Forschung.

### 1.3 Zielsetzung und Konzeption der Arbeit

Viele physiologische Funktionen in Organismen werden durch die zirkadiane Uhr gesteuert, die wiederum durch metabolische Signale beeinflusst wird. Diese wechselseitige Steuerung ist von großer Bedeutung für den reibungslosen Ablauf des zellulären Stoffwechsels. Zu einer der wichtigsten Schutzfunktionen im zellulären Stoffwechsel gehört die Hitzeschockantwort. Diese hoch konservierte Stressantwort steht in enger Wechselwirkung mit der zirkadianen Uhr von Organismen. In diese Interaktion scheinen sowohl Hitzeschock-Faktoren als auch Hitzeschock-Proteine involviert zu sein. Die genauen molekularen Interaktionswege zwischen Hitzeschockantwort und zirkadianer Uhr sind jedoch noch weitgehend unverstanden. Ein Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, die Verbindung des Hitzeschock-Proteins HSP90 mit der zirkadianen Uhr auf molekularer Ebene näher zu beleuchten. HSP90 ist ein direkter Regulator des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors HSF1 und wird wiederum von diesem reguliert (Nadeau *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1998). Seine Expression in der Leber und im SCN von Mäusen unterliegt zirkadianer Kontrolle (Kornmann *et al.*, 2007; Fukuyama *et al.*, 2008). Über die Funktion von HSP90 in der zirkadianen Uhr von Säugetieren war bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nichts bekannt. HSP90 schien somit ein Kandidat für die weiterführende Analyse der Interaktion von Hitzeschockantwort und zirkadianer Uhr zu sein.

Um eine potentielle Verbindung zwischen HSP90 und der zirkadianen Uhr herauszustellen, sollte in dieser Arbeit HSP90 in murinen Fibroblasten durch spezifische Inhibitoren gehemmt oder durch siRNA herunterreguliert werden. Der Effekt dieser Inhibition auf die Expression zirkadian regulierter Gene der Rückkopplungsschleife sollte mittels Biolumineszenz-Messungen und Analysen der mRNA- und Proteinlevel untersucht werden. Anschließend sollte durch pharmakologische Inhibition von HSP90 in Mäusen der Effekt auf die zirkadiane Uhr *in vivo* näher beleuchtet werden.

Um die systemischen Signale zu identifizieren, die zur zirkadianen Oszillation der HSF1-Aktivität führen, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, eine transgene Maus herzustellen, die eine TAP-fusionierte Variante von Hitzeschock-Faktor 1 exprimiert. Im ersten Schritt sollte deshalb in *proof of principle* Experimenten gezeigt werden, dass TAP-fusioniertes HSF1 sich in seiner Regulation und Aktivierung von Zielgenen nicht von endogenem HSF1 unterscheidet. Für diese Experimente sollten murine Hsf1 *knock-out* Fibroblasten stabil mit verschiedenen Vektoren transfiziert werden, die TAP-fusionierte Varianten von Hsf1 enthalten. Der

Transport von HSF1 in den Nukleus, die Aktivierung von Zielgenen, sowie die Bindung an bekannte Interaktionspartner sollte anschließend untersucht werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte eine transgene Maus generiert werden, die TAP-fusioniertes HSF1 exprimiert. Diese Mauslinie kann in der Zukunft dann zur Aufreinigung von HSF1-Komplexen zu unterschiedlichen Zeitpunkten verwendet werden und damit zur Identifizierung neuer Interaktionspartner und posttranslationaler Modifikationen beitragen, die in der zirkadianen Regulation von HSF1 eine Rolle spielen.

## 2 Material

### 2.1 Bakterienstämme und Nährmedien für Bakterienkulturen

#### 2.1.1 *Escherichia coli* Stamm:

DH5alpha: Genotyp: *supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Hanahan, 1983)

#### 2.1.2 Nährmedium für Bakterienkulturen

LB-Medium            10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, pH 7,0 (mit NaOH)

LB-Agar                10 g Agar in 1000 ml LB Medium  
für Selektionen wurden 50 µg/ml Ampicillin hinzugefügt

TB-Medium            12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin wurden in  
900 ml H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. 100 ml steriler Phosphatpuffer  
(0.17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) wurde nach dem Autoklavieren  
hinzugefügt

TB-Puffer              10 mM Pipes, 250 mM KCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 6,7

## 2.2 Zelllinien

### 2.2.1 Humane adhärenente Zelllinien

HEK 293: Humane, embryonale Nierenzellen (Graham et al., 1977),  
# DSM ACC 305, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und  
Zellkulturen, Braunschweig

HEK 293 T2 HEK293 Zellen, stabil transfiziert mit einer C-terminal TAP-  
gekoppelten humanen Hsf1 cDNA, unter der Kontrolle des CMV-  
Promoters (Labor-intern generierte Zelllinie aus HEK293 Zellen)

HEK 293 E3 HEK293 Zellen, stabil transfiziert mit einem TAP-exprimierenden  
Vektor (Labor-intern generierte Zelllinie aus HEK293 Zellen)

### 2.2.2 Murine adhärenente Zelllinien

NIH3T3 Murine, embryonale Fibroblasten (Todaro und Green, 1962),  
#DSM ACC 59, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und  
Zellkulturen, Braunschweig

Wt Tail Immortalisierte Mausschwanz-Fibroblasten (Zhang et al., 2002)  
Fibroblasten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. U. Schibler, Universität Genf  
(Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Hsf1 KO Tail Immortalisierte *Hsf1*<sup>-/-</sup> Mausschwanz-Fibroblasten (Zhang et al., 2002)  
Fibroblasten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. U. Schibler, Universität Genf  
(Schweiz) zur Verfügung gestellt.

---

NIH3T3- c-Myc-BMAL1	NIH3T3 Zellen, stabil transfiziert mit einer C-terminal c-Myc-gekoppelten <i>Bmal1</i> cDNA, unter der Kontrolle des CMV-Promoters (Labor-intern generierte Zelllinie aus NIH3T3 Zellen)
NIH3T3- c-Myc-CLOCK	NIH3T3 Zellen, stabil transfiziert mit einer C-terminal c-Myc-gekoppelten <i>Clock</i> cDNA, unter der Kontrolle des CMV-Promoters (Labor-intern generierte Zelllinie aus NIH3T3 Zellen)
Bmal1-Luc Fibroblasten	NIH3T3 Zellen, stabil transfiziert mit einem Luciferase-Gen (aus Leuchtkäfer) unter der Kontrolle des <i>Bmal1</i> -Promoters (Nagoshi <i>et al.</i> , 2004). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. U. Schibler, Universität Genf (Schweiz) zur Verfügung gestellt.

## 2.3 Versuchstiere

C57BL/6	Erstmalige Generierung des C57BL-Mausstammes 1921 durch C. C. Little am Bussey Institute for Research in Applied Biology, Harvard University, USA. Versuchstiere wurden über Janvier Labs (CS 4105 Le Genest Saint Isle, Saint Berthevin Cedex 53941 Frankreich) bezogen.
Tap-Hsf1 KI	Konditionale HSF1-TAP <i>knock-in</i> Maus im genetischen Hintergrund einer C57BL/6NTac Maus. Generiert durch TaconicArtemis (Köln, Deutschland).

## 2.4 Nukleinsäuren

### 2.4.1 Plasmide

Die Vektoren, die für die Expression von humanem oder murinem HSF1 verwendet wurden, basierten entweder auf den Plasmiden pMC-PATevCBP-EYFPP-N, pMC-EYFP-CBPTevPA-P, welche freundlicherweise von Prof. Dr. Boege (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden (Christensen et al. 2002, Mielke et al. 2000, vgl. Anhang Abb. 7.3 A und B) oder pcDNA3.1-Hygro (vgl. Anhang Abb. 7.2 A). In den Vektoren pMC-PATevCBP-EYFPP-N und pMC-EYFP-CBPTevPA-P wird das Puromycin-Resistenzgen für die Puromycin-N-Acetyltransferase (PAC) im zweiten Cistron einer bicistronischen mRNA kodiert. Die Initiation der Translation des zweiten Cistrons wird durch eine interne Ribosomenbindestelle (IRES) des Poliovirus gewährleistet. Das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40) bildet den Abschluss der gebildeten mRNA. Das erste Cistron enthält die Sequenzen für den TAP-Tag (engl. *tag* = Anhängsel) und EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*). EYFP ist die verstärkte Form des YFP, welches eine genetische Mutation des GFP (*green fluorescent protein*) ist, das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt (Shimomura et al., 1962; Shimomura 2006). Die cDNA des murinen *Hsf1* Gens wurde in die MCS (multiple cloning site) des ersten Cistrons kloniert, so dass entweder eine N-terminal (pRS-TAP-EYFP-N-P-mHsf1) oder C-terminal (pRS-mHsf1-EYFP-TAP-P) gekoppelte Version von *Hsf1* entstand. Das erste und zweite Cistron standen unter Kontrolle eines CMV-Promoters. Die Plasmide pcDNA3.1-TAP-Hygro und pcDNA3.1-mHsf1-TAP-Hygro (vgl. Anhang Abb. 7.2 A und B) wurden freundlicherweise von Dr. Sang-Gun Ahn (Department of Pathology, Chosun University College of Dentistry, Gwangju 501-759, Korea) zur Verfügung gestellt. Im Vektor pcDNA3.1-TAP-mHsf1-Hygro befindet sich die C-terminal TAP-Tag gekoppelte *Hsf1* cDNA unter der Kontrolle eines CMV Promoter. Für die Generierung von stabilen Zelllinien mit HEK293 Zellen wurde die murine *Hsf1* cDNA aus dem pcDNA3.1-TAP-mHsf1-Hygro Vektor durch Restriktionshydrolyse entfernt und durch die cDNA-Sequenz des humanen *Hsf1* Gens ersetzt, so dass der Vektor pcDNA3.1-hHsf1-TAP-Hygro (vgl. Anhang Abb. 7.2 C) entstand. Die in diesem Vektor kodierte Hygromycin B-Phosphotransferase war nicht durch eine IRES-Sequenz mit dem TAP-gekoppelten Hsf1 verbunden, sondern wurde separat durch einen Promoter reguliert.

## 2.4.2 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer für Sequenzierungen, Polymerasekettenreaktion und *Real Time* Polymerasekettenreaktion wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bezogen. Im Folgenden sind Primer für die Klonierungen der oben beschriebenen Konstrukte (vgl. Kapitel 2.4.1) aufgeführt, sowie Primer, die in Real Time PCR Analysen verwendet wurden (siehe Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2). Bei allen hier verwendeten Oligonukleotiden wurde darauf geachtet, dass die äußeren Basen aus einem Guanin oder Cytosin bestanden. Dies war jedoch nicht bei allen Primern möglich. Wenn nicht das TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen für Klonierungen verwendet wurde, dann wurde an das 5'-Ende der Primer ein Platzhalter (GGCGC) für die Bindung von Restriktionsenzymen gesetzt. Für Amplifikationen von 5'-Bereichen von Genen wurde, wenn möglich, die so genannte „Kozak-Sequenz“ (CC-A/G-CC-ATG-G) berücksichtigt, die die optimale Konsensussequenz für die Initiation der Translation darstellt.

**Tabelle 2.1: Primer für Klonierung von Vektoren**

Vektor	Primer	Sequenz
pRS-TAP-EYFP-N-P-mHsf1	1) MluI-mHsf1-Fwd-N	5'-ACGCGTATGGATCTGGCCGTGGGCCCCG-3'
	2) EcoRI-mHsf1-Rev-N	5'-CAAGGACCCCACTGTCTCCTAGGAATTC-3'
pRS-mHsf1-EYFP-TAP-P	1) MluI-mHsf1-Fwd-C	5'-GCGGCCGCAAGATGGATCTGGCCGTGGGCCC-3'
	2) NotI-mHsf1-Fwd-C	5'-CCAAGGACCCCACTGTCTCCGGACGCGT-3'
pcDNA3.1-hHsf1-TAP-Hygro	1) KpnI-hHsf1-Fwd	5'-GGCGCGGTACCGCCACCATGGATCTGCCCCGTTGGGCCC-3'
	2) NotI-hHsf1-Rev	5'-CCAAGGACCCCACTGTCTCCGCGGCCGCGCCGCGG-3'

**Tabelle 2.2: Primer für Real Time Polymerasekettenreaktion**

Gen	Primer*	Sequenz
<i>mBmal1</i>	F	5'-CCAAGAAAGTATGGACACAGACAAA-3'
	R	5'-GCATTCTTGATCCTTCCTTGGT-3'
	P	5'-TGACCCTCATGGAAGGTTAGAATATGCAGAA-3'
<i>mClock</i>	F	5'-CGGCGAGAAGTGGCATT-3'
	R	5'-TGATACGATTGTCAGACCCAGAA-3'
	P	5'-TCCTGAGACAGCTGCTGACAAAAGCCA-3'
<i>mCry1</i>	F	5'-TGGCGTGGAAAGTCATCGT-3'
	R	5'-CTGTCCGCCATTGAGTTCTATG-3'
	P	5'-CGCATTTCACATACACTGTATGACCTGGACA-3'

<i>mCry2</i>	F R P	5'-TGTCCCTTCCTGTGTGGAAGA-3' 5'-GCTCCCAGCTTGGCTTGA-3' 5'-CAGTCACCCTGTGGCAGAGCCTGG-3'
<i>mDbp</i>	F R P	5'-TGGCCCGAGTCTTTTTGC-3' 5'-GCGTCCAGGTCCACGTATTC-3' 5'-CCGCTGCTGTGGGAACGCACT-3'
<i>mEef1a</i>	F R P	5'-TCCAATTGGTCGCTTTGCT-3' 5'-CTTCTTGTCCACAGCTTTGATGA-3' 5'-TTCGTGACATGAGGCAGACAGTTGCTG-3'
<i>mHsf1</i>	F R P	5'-GGACACAGACGCGCTCAT-3' 5'-CCTGGTCAAACACGTGGAAG-3' 5'-GAGCCCGAGTGGGAACAG-3'
<i>mHspb1</i>	F R P	5'-CTCCGGAGGAGCTCACAGT-3' 5'-CTTTCTTCGTGCTTGCCAGT-3' 5'-GAAGACCAAGGAAGGCGTG-3'
<i>mHspa1b</i>	F R P	5'-GGTGA ACTACAAGGGCGAGA-3' 5'-CTTCATCTTCGTGTCAGCACCA-3' 5'-GTTCTTCCCGGAGGAGATCT-3'
<i>mNr1d1</i>	F R P	5'-TGCAGGCTGATTCTTCACACA-3' 5'-AGCCCTCCAGAAGGGTAGGA-3' 5'-ACACTCTCTGCTCTTCCCATGCAAATCAG-3'
<i>mPer1</i>	F R P	5'-ACCAGCGTGTGTCATGATGACATAC-3' 5'-CTCTCCCGGTCTTGCTTCAG-3' 5'-CCGTCCAGGGATGCAGCCTCTG-3'
<i>mPer2</i>	F R P	5'-ATGCTCGCCATCCACAAGA-3' 5'-GCGGAATCGAATGGGAGAAT-3' 5'-ATCCTACAGGCCGGTGGACAGCC-3'
<i>mRora</i>	F R P	5'-CCCCTACTGTTCTTCACCA-3' 5'-CCAGGTGGGATTTGGATATG-3' 5'-CGTGTCCATGGCAGAACTAG-3'

\*F=Vorwärtsprimer; R=Rückwärtsprimer; P=Probe (Probe-Modifikation: 5' 6-FAM; 3' TAMRA)

### 2.4.3 Sonstige Nukleinsäuren

Molekulargewichtsmarker „1 kb Plus“

Invitrogen, Carlsbad, USA

## 2.5 Mediumgrundlagen, Lösungen und Antibiotika für die Zellkultur

Wenn nicht anders beschrieben, wurden ausschließlich die im Folgenden aufgelisteten Produkte der Firma Gibco/Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM High Glucose + GlutaMAX-I)

CO<sub>2</sub> unabhängiges, Phenolrot-freies Medium (DMEM High Glucose + L-Glutamine + 25mM HEPES)

Fötale Kälberserum (FCS)

D-PBS (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> frei)

Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)

Trypsin-EDTA (0,5%) Lösung

Puromycin Sigma, St. Louis, USA

Hygromycin Sigma, St. Louis, USA

DMSO Sigma, St. Louis, USA

Luciferin Sigma, St. Louis, USA

### 2.5.1 Zellkulturmedien

Wachstumsmedium DMEM high glucose, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Selektionsmedium 1 DMEM high glucose, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml Hygromycin

Selektionsmedium 2 DMEM high glucose, 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 µg/ml Puromycin

CO <sub>2</sub> -unabhängiges Medium	DMEM high glucose (ohne Phenolrot), 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,1mM Luciferin
Serumfreies Medium	DMEM high glucose 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Antibiotikum-freies Medium	DMEM high glucose, 10% FCS

## 2.6 Proteine

### 2.6.1 Antikörper

#### 2.6.1.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Ursprung	WB/IP	Bezugsquelle
Anti-BMAL1	BMAL1	Kaninchen (polyklonal)	WB/IP	Santa Cruz
Anti-CLOCK	CLOCK	Kaninchen (monoklonal)	WB	Cell Signaling
Anti-CLOCK	CLOCK	Kaninchen (polyklonal)	WB/IP	Abcam
Anti-GFP	GFP	Kaninchen (polyklonal)	WB	Abcam
Anti-HSF1	HSF1	Kaninchen (po- lyklonal)	WB	Abcam
Anti-HSF1	HSF1	Kaninchen (polyklonal)	WB	Assay Designs
Anti-HSF1	HSF1	Ratte (monoklonal)	WB	Thermo Scientific
Anti-HSP25	HSP25	Kaninchen (polyklonal)	WB	Assay Designs
Anti-HSP70	HSP70	Maus (monoklonal)	WB	Abcam
Anti-HSP90	HSP90	Maus (monoklonal)	WB/IP	Abcam
Anti-U2AF	U2AF65	Maus (monoklonal)	WB	Sigma

Anti-c-Myc-HRP	C-Myc	Maus (monoklonal)	WB	Miltenyi
Anti-HA-HRP	Hämagglutinin	Maus (monoklonal)	WB	Miltenyi

### 2.6.1.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Bezugsquelle
ECL Anti-Kaninchen IgG, mit Meerrettich Peroxidase gekoppelt	Esel	1:10000	Amersham, Little Chalfont, England
ECL Anti-Maus IgG, mit Meerrettich Peroxidase gekoppelt	Schaf	1:40000	Amersham, Little Chalfont, England
ECL Anti-Ratte IgG, mit Meerrettich Peroxidase gekoppelt	Ziege	1:20000	Amersham, Little Chalfont, England
Cy2™-gekoppelter Anti-Ratte IgG Antikörper	Ziege	1:3000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England

### 2.6.2 Enzyme

DNase I	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Proteinase K	Sigma, St. Louis, USA

### 2.6.3 Sonstige Proteine

Ziegenserum (GS)	Sigma, St. Louis, USA
Pferdeserum	Invitrogen, Carlsbad, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, St. Louis, USA
ColorPlus Protein Leiter <i>prestained</i>	NEB, Ipswich, USA
AcTEV Protease	Invitrogen, Carlsbad, USA

## 2.7 Säulenmaterialien und magnetische *beads*

Protein G Sepharose	Amersham, Little Chalfont, England
Protein A Sepharose	Amersham, Little Chalfont, England
Calmodulin Sepharose	Amersham, Little Chalfont, England
IgG-Sepharose	Amersham, Little Chalfont, England
Mobicol-Filterröhrchen	MoBiTec, Goettingen, Deutschland

## 2.8 Puffer und Stocklösungen

Tabelle 2.5: Puffer und Stocklösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x Biotinylierungspuffer	100 mM Tris (pH 7,4), 10 mM EDTA
10x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
10x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)	24.2 g Tris, 80g NaCl, pH 7.6 (mit HCl eingestellt), mit dH <sub>2</sub> O auf 1 L aufgefüllt
2x Bindungspuffer	10 mM Tris 7,4, 1 mM EDTA, 2 M NaCl
2x NUN	50 mM HEPES-NaOH (pH 7,6), 600 mM NaCl, 2% NP-40, 2 M Urea, 2 mM DTT, 1:50 Complete Protease Inhibitor Cocktail
6x Agarose Probenpuffer	15% Ficoll type 400, 40 mM Tris-HCl (pH 8.5), 40 mM Eisessig, 2 mM EDTA, 0.25% Bromphenolblau
50x TAE	2 M Tris-HCl (pH 8,5), 2 M Essigsäure, 0.1 M EDTA
5x SDS-Probenpuffer	0,2 M Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerin, 10% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 10 mM DTT
Calmodulin-Bindungspuffer	10 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 50 mM NaCl, 10 mM Beta-Mercaptoethanol, 1 mM MgOAc, 1 mM Imidazol, 0,1% NP-40, 2 mM CaCl <sub>2</sub>
Calmodulin-Waschpuffer	50 mM Ammoniumbicarbonat pH 8.0, 75 mM NaCl, 1 mM Imidazol, 2mM CaCl <sub>2</sub>
PBND Puffer	10 mM Tris (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 mg/ml Gelatine, 0,45% NP-40, 0,45% Tween20
PBS-T	1x PBS, 0,1% Tween20
RIPA Puffer	50 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS, 1mM DTT, 1:50 Complete Protease Inhibitor Cocktail
SDS-Laufpuffer	6 g/l Tris, 28,8 g/l Glycin, 1 g/l SDS
TAP-Lysierungspuffer	50 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 100 mM KCl, 10%

	Glycerin, 2 mM EDTA, 0,1% NP-40, 2 mM, 10 mM NaF, 1:50 Complete Protease Inhibitor Cocktail
TBS-T	1x TBS, 0,1% Tween20
TEV Puffer	10 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,1% NP-40, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT
Western Blot Puffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS (0,0375%), 20% Methanol, pH 9,2

## 2.9 Chemikalien und Reagenzien

Tween20 (Polysorbate 20)	Sigma, St. Louis, USA
Polyacrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS (Amoniumperoxidsulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidium bromide solution (1%) (EtBr)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Geldanamycin	Invivogen, Toulouse, Frankreich
17-AAG	Invivogen, Toulouse, Frankreich
17-AEP-GA	Invivogen, Toulouse, Frankreich
17-DMAG	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Radicicol	Sigma, St. Louis, USA
Cycloheximid	Sigma, St. Louis, USA
Cyclophosphamid	Sigma, St. Louis, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
EZ-Link HPDP-Biotin	Pierce Biotechnology, Illinois, USA
Dexamethason	Sigma, St. Louis, USA
TriFast	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
LightCycler480 „Master Mix“	Roche, Mannheim, Deutschland

## 2.10 Verbrauchsmaterialien und Kits

Immobilon-P (PVDF) Transfermembran	Millipore, Bedford, USA
Gel Kassetten Novex, 1 mm	Invitrogen, Carlsbad, USA
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden, Deutschland
ECL Prime Western Blotting Reagents	Amersham, Little Chalfont, England
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St Leon-Roth, Deutschland
1 Kb plus DNA Leiter	Invitrogen, Carlsbad, USA
ProteoSilver ProteoSilver Plus Kit	Sigma, St. Louis, USA
MaXtract „High Density“ Röhrchen	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
8 well $\mu$ -Slide Kammerobjektträger	Ibidi, München, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
GenJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St Leon-Roth, Deutschland
Phusion High Fidelity PCR MasterMix	NEB, Ipswich, USA
TopTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Maus Exon Microarrays	Agilent, Waldbronn, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Quick Ligation Kit	NEB, Ipswich, USA

## 2.11 Geräte

Autoklav „V 150“	Systemec, Wetttenberg
CO <sub>2</sub> -Inkubator „Hera Cell“	Heraeus, Hanau
Einfrierbehälter „Cryo 1 °C Freezing Container“	Nalge Nunc, Rochester
Feinwaage „AE-166“	Mettler Toledo, Giessen
Gelelektrophorese System „Horizon 11-14“ (für horizontale Agarosegele)	Whatman, Biometra, Göttingen

Gelelektrophorese System „Novex Mini-Cell“ (für vertikale Polyacrylamidgele)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Inkubator	Heraeus, Hanau
Magnet Rack „Dynal MPC-M“	Invitrogen, Carlsbad, USA
Epifluoreszenzmikroskop „Axiovert 100“	Zeiss, Oberkochen
63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv	Zeiss, Oberkochen
Filtersätze	AHF Analysentech., Tübingen
Inkubationseinheit „ΔTC3“	Bioprotechs, Butler, USA
Digitale Kamera „Spot-RT SE Monochrom“	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
PCR Cycler „Mastercycler“	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter „Calimatic 766“	Knick, Berlin
Photometer „Biophotometer“	Eppendorf, Hamburg
Rotor für Reaktionsgefäße	Labor-Brand, Gießen
Schüttelinkubator „SM-30“	Edmund Bühler, Tübingen
Sterilbank „Hera Safe“	Heraeus, Hanau
Thermomixer „ThermoStat plus“	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall Homogenisator „Sonopuls“	Bandelin, Berlin
Ultraschallwandler UW 2070	Bandelin, Berlin
Sonotrode Mikrospitze MS 72	Bandelin, Berlin
Wasserbad „WB20“	Medingen, Dresden
Zentrifuge „Centrifuge H-401“	Kontron, Heraeus, Hanau
Rotor „A 8.24“ (für 50 ml Gefäße)	Kontron, Heraeus, Hanau
Rotor „A 6.14“ (für 250 ml Gefäße)	Kontron, Heraeus, Hanau
Zentrifuge „Centrifuge 5417R“	Eppendorf, Hamburg
Rotor „FA 45-30-11“ (für 1,5-2 ml Gefäße)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Rotixa / P“	Hettich, Tuttlingen
Ausschwingrotor (für 15-50 ml Gefäße)	Hettich, Tuttlingen
LightCycler480 Real-Time PCR System	Roche, Mannheim, Deutschland
Lumicycle 32	Actimetrics, Illinois, USA

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Kultivierung humaner und muriner adhärenter Zellen

Die verwendeten humanen und murinen Zelllinien (vgl. Kapitel 2.2.1 und 2.2.2) wurden in Nährmedium (vgl. Kapitel 2.5.1) bei 37 °C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden dreimal in der Woche passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit D-PBS gewaschen und anschließend mit 0,5% Trypsin/EDTA von der Kultivierungsfläche abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Medium resuspendiert. 1/2 bis 1/10 der Zellsuspension oder eine spezifische Zellzahl, die mit dem Countess<sup>®</sup> Cell Counter ermittelt wurde, wurde daraufhin in neue Zellkulturgefäße überführt.

#### 3.1.2 Transfektion und Selektion von Zellen

Konfluente Zellen (80-90% des Zellkulturgefäßbodens bedeckt) wurden 24 Stunden vor der Transfektion abgelöst und die Zellzahl mit dem Countess<sup>®</sup> Cell Counter ermittelt. Entsprechend der Größe des Zellkulturgefäßes wurden die Zellen so ausplattiert, dass sie am folgenden Tag 50-80% Konfluenz erreicht hatten. Die Zellen wurden mit „Effectene“, „Attractene“ oder „Dharmafect“ entsprechend der Herstellerangaben transfiziert.

Transient transfizierte Zellen wurden 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion entweder für Biolumineszenz-Messungen verwendet (vgl. Kapitel 3.1.2) oder geerntet und Proteinextrakte hergestellt (vgl. Kapitel 3.2). Für die Generierung von stabil transfizierten Zellen wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion in Selektionsmedium überführt. Stabile Zellklone wurden 2 bis 4 Wochen nach der Transfektion isoliert und in Selektionsmedium weiter kultiviert.

### 3.1.3 siRNA Transfektion von murinen Zellen

Für die Transfektion von siRNAs wurden  $2 \times 10^5$  NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen 24 Stunden vor der Transfektion in 3,5 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Am Tag der Transfektion wurden die gelösten siRNAs in RNase-freiem Wasser so verdünnt, dass eine 5  $\mu$ M Stocklösung entstand. Die erhaltende 5  $\mu$ M Stocklösung wurde in serumfreiem Medium 1:50-1:500 verdünnt, so dass pro Zellkulturschale 10-100 nM der jeweiligen siRNAs eingesetzt wurden. Für die siRNA Transfektion von NIH3T3 wurde Dharmafect 1 verwendet, welches 1:40 in serumfreiem Medium verdünnt wurde. Die Transfektion erfolgte entsprechend des Dharmacon siRNA Transfektionsprotokolls. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 24 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde die Biolumineszenz der transfizierten Zellen in Echtzeit im Lumicycle 32 für 72 Stunden gemessen. Um die Herunterregulierung der Zielproteine zu überprüfen, wurden anschließend Proteinextrakte mit 2xNUN-Puffer (vgl. Kapitel 2.8) hergestellt und durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot (vgl. Kapitel 3.2.5 und 3.2.8) analysiert.

### 3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden Zellen mit 0,5% Trypsin/EDTA vom Kultivierungsboden abgelöst und bei 300xg für 3 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen, das aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplementiert mit 30% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), bestand. Je ein Milliliter der Zellsuspension wurde auf 1,8 ml Kryokonservierungsröhrchen verteilt und in isopropanolgefüllte Kryo-Einfrierbehälter überführt. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei -80°C gelagert und anschließend in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt. Für die Rekultivierung der Zellen wurden die entsprechenden Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und pelletiert, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert, in Zellkulturgefäße überführt und, wie oben beschrieben, kultiviert.

### 3.1.5 Echtzeit-Biolumineszenz-Messung

Für die Messung der Echtzeit-Biolumineszenz wurden NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen, die stabil ein Luziferase-Gen unter der Kontrolle des *Bmal1*-Promoters exprimieren, verwendet.

Da *Bmal1* ein Schlüsselement der zirkadianen Uhr ist, ist es durch die Kopplung des *Bmal1*-Promoters an ein Leuchtkäfer-Luziferase-Gen möglich, die zirkadiane Rhythmizität von Zellen oder Geweben in Echtzeit zu messen.

Für Echtzeit-Biolumineszenz-Messungen wurden die Zellen in 35 mm Zellkulturschalen ausplattiert. Am Tag des Beginns der Biolumineszenz-Messung wurden die Zellen entweder mit 100 nM Dexamethason für 30 Minuten oder 50% Pferdeserum für zwei Stunden synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen mit D-PBS gewaschen. Für die Messung erhielten die Zellen CO<sub>2</sub>-unabhängiges Medium, das mit 0,1 mM Luziferin supplementiert war. Wurde der Einfluss von Chemikalien auf die zirkadiane Uhr untersucht, wurde das Medium der Zellen vor Beginn der Biolumineszenz-Messung zusätzlich mit den entsprechenden Chemikalien versetzt. Die Kulturschalen wurden anschließend mit Parafilm abgedichtet und in ein 32-Kanal Luminometer (Lumicycle 32), das sich in einem lichtdichten Inkubator (37 °C) befand, gestellt. Die Messung der Echtzeit-Biolumineszenz der Zellen erfolgte über drei bis sechs Tage. Die Auswertung der gesammelten Daten wurde mit dem LumiCycle Analysis Programm vorgenommen.

## 3.2 Proteinanalytische Methoden

### 3.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden murine oder humane adhärenente Zellen mit kaltem D-PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes gelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Das Pelletieren der Zellen erfolgte für drei Minuten bei 300xg in einer 2°C gekühlten Zentrifuge. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in dreifachem Volumen RIPA Puffer oder 2xNUN Puffer aufgenommen. Wenn ein 2xNUN Puffer verwendet wurde, dann wurden die Zellen zuvor in D-

PBS resuspendiert und das gleiche Volumen an 2xNUN Puffer hinzugegeben. Die Suspension wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Zellen effektiver aufzuschließen, wurde die Zellsuspension mehrfach gevortext und danach zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung durch Ultraschall (10 Sekunden, 70% Power). Die Proteinextrakte wurden für 10 Minuten bei 17000xg zentrifugiert, um zurückgebliebene Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Für gelelektrophoretische Analysen wurden in der Regel 50 µg des Proteinextraktes pro Gelspur aufgetragen. Dafür wurden die Extrakte mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend direkt aufgetragen.

### **3.2.2 Analyse von Proteinlevel und Halbwertszeit**

Für die Analyse der Proteinlevel und der Halbwertszeit der Proteine BMAL1 und CLOCK wurden NIH3T3 Zellen verwendet, die entweder mit c-Myc-gekoppeltem BMAL1 oder CLOCK stabil transfiziert waren. Für die Experimente wurden jeweils  $3,75 \times 10^5$  Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch Wachstumsmedium ersetzt, das mit 0,8 µM 17-AEP-GA versetzt war. Zellen, die als Kontrolle dienten, erhielten ausschließlich Wachstumsmedium. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit Wachstumsmedium, das 10 µg/ml Cycloheximid enthielt, für 2, 4 und 8 Stunden behandelt. Zellen, die zuvor 17-AEP-GA erhalten hatte, erhielten zusätzlich 0,8µM 17-AEP-GA in ihrem Medium. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt.

### **3.2.3 Immunpräzipitation**

Für die Immunpräzipitation von Proteinen wurden entweder Zellkernextrakte aus Mausleber oder NIH3T3 Zellen benutzt, die stabil mit c-Myc-gekoppeltem CLOCK oder BMAL1 oder Hämagglutinin (HA)-gekoppeltem HSP90 transfiziert waren.

24 Stunden vor der Immunpräzipitation wurden die Zellen so in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, dass sie am nächsten Tag 80-90% Konfluenz erreicht hatten. Die Zellen wurden mit D-PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes abgelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Das Pelletieren der Zellen erfolgte für drei Minuten bei 300xg in einer 2°C gekühlten Zentrifuge. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in dreifachem Volumen RIPA Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zweimal 30 Minuten bei 17000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 5 bis 10% des Proteinextraktes wurden als Kontrollfraktion separat in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Der Rest des Proteinextraktes wurde mit 5 µl anti-CLOCK, anti-BMAL1 oder anti-HSP90 Antikörper versetzt und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Für die Immunpräzipitation der Antikörper-gekoppelten Proteine wurden Protein A- oder Protein G-gekoppelte Sepharose-beads benutzt. Jeweils 20 µl der Sepharose-beads wurden dreimal mit 1 ml D-PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 750 µl PBS und 250 µl 1mg/ml BSA geblockt. Nach 24 Stunden wurden die Sepharose-beads erneut dreimal mit 1 ml D-PBS gewaschen, zu den Proteinextrakten hinzugegeben und für zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-beads bei 600xg für 3 Minuten bei 2°C zentrifugiert und viermal mit D-PBS gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Sepharose-beads wurden in jeweils 25 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Denaturierung der Proteine erfolgte bei 95°C für 10 Minuten.

### 3.2.4 Tandem-Affinitätsaufreinigung von Proteinkomplexen (TAP)

Die Tandem-Affinitätsaufreinigung (*tandem affinity purification*; TAP) ist ein Zwei-Schritt-System für die Aufreinigung von Proteinkomplexen unter relativ nativen Salzbedingungen. Die mit dem Zielprotein isolierten Proteine sollten *in vivo* reale Interaktionspartner darstellen und somit Rückschlüsse auf die native Zusammensetzung der Proteinkomplexe zulassen. Außerdem bietet dieses Aufreinigungssystem den Vorteil, dass isolierte Proteinkomplexe sehr rein sind und für massenspektrometrische Analysen verwendet werden können.

Für diese spezielle Form der Proteinaufreinigung wurden ein Calmodulin-Bindungspeptid, eine Erkennungsstelle für die *Tobacco Etch Virus* Protease (TEV Protease) und ein Protein A

fusioniert. Protein A ist ein Protein aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das eine hohe Affinität zu vielen IgG (Immunglobulin G) aufweist. Diese Affinität wird im ersten Aufreinigungsschritt ausgenutzt, indem IgG-gebundene Sepharose-*beads* benutzt wurden. Die Erkennungsstelle der TEV-Protease erlaubt eine proteolytische Elution der Proteine nach dem ersten Aufreinigungsschritt. Hierfür wurde die AcTEV Protease verwendet, welche eine optimierte Form der *Tobacco Etch Virus* Protease darstellt. Sie zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für ihre Erkennungsstelle aus (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly), in der sie zwischen den Aminosäuren Glutamin (Gln) und Glycin (Gly) schneidet. Das Calmodulin-Bindungspeptid besitzt eine hohe Affinität zu Calmodulin, welches ein kalziumbindendes, regulatorisches Protein in Eukaryoten ist. Calmodulin bindet Proteine hauptsächlich durch lipophile Wechselwirkungen an durch Kalziumbindung exponierten Stellen. Für den zweiten Schritt der Aufreinigung wurden aus diesem Grund Calmodulin-Sepharose-*beads* verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde der beschriebene TAP-Tag C- oder N-terminal an Hitzeschock-Faktor 1 gekoppelt. Dies erlaubte die direkte Aufreinigung von HSF1 und seiner Interaktionspartner.

#### **3.2.4.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten für die Tandem-Affinitätsaufreinigung**

Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten für die Tandem-Affinitätsaufreinigung wurden murine oder humane Zellen 48 Stunden vor der Aufreinigung in 100 mm Zellkulturplatten oder 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausplattiert. Am Tag der Affinitätsaufreinigung hatten die Zellen 90% Konfluenz erreicht. Die Zellen erhielten einen Hitzeschock für eine Stunde bei 42°C. Anschließend wurde das Wachstumsmedium entfernt und die Zellen wurden mit kaltem D-PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1-5 ml D-PBS mit einem Zellkulturschaber vom Plattenboden gelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Für die Pelletierung der Zellen, wurden sie für 3 Minuten bei 300xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in zweifachem Volumen TAP-Lysierungspuffer aufgenommen, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Um auch DNA-gebundene HSF1-Proteinkomplexe isolieren zu können, wurde die DNA mit 50 U/ml DNase I für 60 Minuten verdaut. Da DNase I

Kalzium- und Magnesium-abhängig ist, wurden dem Puffer zusätzlich 3mM CaCl<sub>2</sub> und 10 mM MgCl<sub>2</sub> hinzugefügt. Die Reaktion wurde anschließend mit 5 mM EGTA abgestoppt.

Die Proteinextrakte wurden für 10 Minuten bei 17000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Bradford-Assay (siehe Kapitel 3.2.9) für die Analyse der Proteinkonzentration durchgeführt. Für den ersten Schritt der Tandem-Affinitätsaufreinigung wurden gleiche Mengen der Proteinextrakte eingesetzt. 20 µl des Proteinextraktes wurden abgenommen und mit RNase für 30 min und Proteinase K für 2 Stunden verdaut. Anschließend wurden die Proben auf ein 1% Agarosegel geladen, um die Fragmentierung der DNA zu überprüfen.

#### **3.2.4.2 Affinitätsaufreinigung über IgG-Sepharose**

Für den ersten gegen den Protein *A-Tag* gerichteten Aufreinigungsschritt wurden IgG-Sepharose-*beads* verwendet. Es wurde ein Mikroliter der Sepharose-*beads* pro Milligramm des Proteinextraktes verwendet, jedoch mindestens 15 µl und maximal 150µl der IgG-*beads*. Die IgG Sepharose-*beads* wurden dreimal mit jeweils 1 ml kaltem TAP-Lysierungspuffer gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte von Sepharose-*beads* erfolgten bei 600xg für 4 Minuten bei 2°C. Anschließend wurden die Proteinextrakte mit den IgG-Sepharose-*beads* für 4 Stunden bei 2°C über Kopf rotiert.

#### **3.2.4.3 Elution durch TEV Proteolyse**

Nach der oben beschriebenen Inkubationszeit wurden die IgG-Sepharose-*beads* zentrifugiert und der Überstand für Kontrollanalysen aufgehoben. Die *beads* wurden daraufhin dreimal mit je 1 ml kaltem TAP-Lysierungspuffer und dreimal mit TEV Puffer gewaschen. Ein Aliquot der Sepharose-*beads* (1/20) wurde für Kontrollanalysezwecke aufbewahrt. Für die Elution der gebundenen HSF1 Moleküle und interagierender Proteine von den IgG-Sepharose-*beads* wurde eine Proteolyse mit der TEV-Protease durchgeführt. Hierfür wurden die IgG-*beads* in TEV-Puffer aufgenommen (3 µl TEV Puffer pro 1 µl *beads*). Für die Proteolyse wurde 1 Unit

AcTEV-Protease pro 1  $\mu$ l IgG-Sepharose-*beads* eingesetzt. Die Proteolyse erfolgte über Nacht bei 4°C unter Rotation.

#### **3.2.4.4 Affinitätsaufreinigung über Calmodulin-Sepharose**

Die über Nacht eluierten Proteinextrakte wurden zentrifugiert, um die IgG-Sepharose-*beads* zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Calmodulin-Bindungspuffer versetzt. Anschließend wurde diese Prozedur zweimal wiederholt, um sicherzustellen, dass die IgG-Sepharose-*beads* vollständig entfernt wurden. Da die Bindung von Calmodulin an das Calmodulin-Bindungspeptid Kalzium-abhängig ist, wurde 1/250 1M CaCl<sub>2</sub> zu den Proteinextrakten hinzugegeben. Die Calmodulin-Sepharose-*beads* wurden dreimal mit Calmodulin-Bindungspuffer gewaschen und anschließend mit den vorbereiteten Proteinextrakten 90 Minuten bei 4°C über Kopf rotierend inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Calmodulin-*beads* zentrifugiert und in Mobicol-Filterröhrchen überführt. Der Überstand wurde für weitere Analysen eingefroren. Die Calmodulin-*beads* wurden dreimal mit Calmodulin-Bindungspuffer und anschließend erneut dreimal mit Calmodulin-Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Ein Aliquot der Calmodulin-*beads* (1/10) wurde für weitere Analysen eingefroren. Um die Proteinkomplexe von den Calmodulin-*beads* zu eluieren, wurden die *beads* in 50  $\mu$ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Für die gelelektrophoretische Analyse wurden von allen eingefrorenen Fraktionen Proben entnommen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf ein SDS-Gel geladen. Anschließend wurde eine Silber- oder Coomassiefärbung (vgl. Kapitel 3.2.6 und 3.2.7) vorgenommen.

#### **3.2.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von isolierten Proteingemischen durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli durchgeführt (Laemmli,

1970). Hierfür wurde ein so genanntes Trenngel, das je nach Bedarf 8 bis 12% Acrylamid (37,5:1 - Acrylamid:Bisacrylamid) in eine Novex Gel-Kassette gegossen und mit einem Sammelgel (5% Acrylamid) überschichtet. Bevor die Proteinproben aufgetragen wurden, wurden sie mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer in „Novex Mini-Cell“-Gelkammern bei 50 bis 150 V. Anschließend wurden die Gele für Silber- oder Coomassie-Färbungen verwendet oder für Western Blot Analysen benutzt.

### **3.2.6 Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen**

Für die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde das ProteoSilver Plus Silver Stain Kit der Firma Sigma verwendet. Die Gele wurden über Nacht in jeweils 50 ml Fixierer (50% Ethanol, 10% Essigsäure) bei 30 rpm fixiert. Am nächsten Tag wurde die Fixierlösung verworfen und die Gele mit 30% Ethanol für 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurde ein Waschschriff mit doppelt destilliertem Wasser für 10 Minuten durchgeführt. Um das Signal zu verstärken wurden die Gele für 10 Minuten in jeweils 50 ml 1:100 verdünnter „Sensitizer Solution“ inkubiert. Daraufhin wurden die Gele zweimal für 10 Minuten mit Wasser gewaschen und anschließend mit 1:100 verdünnter Silbernitratlösung für 10 Minuten inkubiert. Es folgte ein einminütiger Waschschriff mit 50 ml Wasser. Für die Entwicklung wurden die SDS-Gele für 5-10 Minuten in Entwicklerlösung (5 ml „ProteoSilver Developer 1“ und 0,1 ml „ProteoSilver Developer 2“ mit doppelt destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt) geschwenkt. War die gewünschte Bandenintensität erreicht, wurden 5 ml „ProteoSilver Stop Solution“ hinzugegeben und für 5 Minuten bei 20 rpm inkubiert. Die Lagerung der Gele erfolgte in Wasser bei 4°C.

### **3.2.7 Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Kang**

Die Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen wurden nach Kang durchgeführt (Kang *et al.*, 2002). Die Färbung von Proteinen mittels dieser Methode resultiert nicht

nur in einer geringeren Färbung des Gelhintergrundes, sondern soll die Nachweisgrenze durch Coomassie an die 1 ng pro Proteinbande einer Silberfärbung annähern. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach dem Gellauf dreimal für 10 Minuten mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen, um die Färbung des Hintergrundes zu verringern. Anschließend wurden die Gele über Nacht in der Färbelösung (0,02% Coomassie Brilliant Blue G250, 2% Phosphorsäure, 5% Aluminiumsulfat, 10% Ethanol) bei 20 rpm inkubiert. Um den Kontrast zwischen Gelbanden und Hintergrund zu erhöhen, wurden die Gele für 10 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Lagerung der Gele erfolgte in Wasser bei 4°C. Für massenspektrometrische Analysen wurden die Gelbanden ausgeschnitten, in Reaktionsgefäße mit Wasser überführt und für weitere Analysen an das Zentrallabor für Proteinanalytik der Universität München geschickt.

### **3.2.8 Western Blot Analysen**

Mit Hilfe des „BioRad TransBlot SemiDry“ Western Blot Systems wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Für diese Methode wurden zwei Filterpapiere (je 1mm dick), getränkt in Western Blot Puffer auf die Anodenseite der Western Blot Kammer gelegt. Die PVDF-Membran wurde mit Methanol aktiviert, mit Western Blot Puffer gewaschen und auf die beiden zuvor platzierten Filterpapiere gelegt. Das SDS-Polyacrylamid-Gel, das zuvor für 20 Minuten in Western Blot Puffer equilibriert worden war, wurde auf die Membran gelegt. Anschließend folgten zwei weitere Filterpapiere, die zuvor mit Western Blot Puffer versetzt worden waren. Die Kammer wurde mit dem Kathoden-Deckel verschlossen. Die Elektrophorese erfolgte mit 5,5 mA/cm<sup>2</sup> für 14-20 Minuten (je nach Proteingröße). Anschließend wurden die PVDF-Membranen für 1 bis 2 Stunden in 5% fettfreiem Milchpulver, das in TBS gelöst war, geblockt. Der primäre Antikörper wurde in 2% BSA (gelöst in TBS) verdünnt und über Nacht auf der Membran bei 20 rpm und 4°C inkubiert. Es folgten drei zwanzigminütige Waschschrte mit TBS-T bei 50 rpm auf Raumtemperatur. Der sekundäre Antikörper wurde entweder in 2% BSA oder 2,5% Milchpulver (gelöst in TBS) verdünnt. Die Inkubation der Membran erfolgte für eine Stunde bei 20 rpm auf Raumtemperatur. Anschließend folgten wieder drei zwanzigminütige Waschschrte mit TBS-T. Alle sekundären Antikörper waren mit einer aus Meerrettich stammenden Peroxidase

gekoppelt. Mit Hilfe des ECL Prime Kits und dem Kamerasystem ImageQuant LAS-4000 konnten die durch die Antikörper erkannten Proteinbanden visualisiert werden. Die Lagerung der Membranen erfolgte in TBS-T bei 4°C.

### **3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf dem Prinzip, dass sich bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung das Absorptionsmaximum der Farbe quantitativ von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Zur Beurteilung der Abhängigkeit von Absorptionshöhe zur Proteinkonzentration wurde zunächst eine Eichgerade mit BSA-Lösungen von 1 bis 20 µg/ml erstellt. Dafür wurden je 20 µl der Eichlösungen mit je 1 ml Bradford Reagenz versetzt. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend spektralphotometrisch bei 595 nm vermessen. Um die Proteinkonzentration von Proteinlösungen zu ermitteln, wurde das gleiche Verfahren angewandt. Es wurde 1 bis 5 µl der Proteinlösungen mit destilliertem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 1 ml Bradford Reagenz versetzt. Nach 10minütiger Inkubation wurden die Lösungen spektralphotometrisch gemessen und die Konzentrationen anhand der Eichgeradengleichung berechnet.

## **3.3 Mikroskopie**

### **3.3.1 Epifluoreszenzmikroskopie**

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden die Zellen über Nacht auf 8-well Kammerobjektträgern kultiviert. Anschließend wurde das Medium von den Zellen vorsichtig abgesaugt und zwei Waschschriffe mit 37°C warmem PBS vorgenommen. Für die Fixierung der Zellen wurde 4% Formaldehyd in PBS verwendet. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten auf Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit 0.5% Triton-X-100 für 15 Minuten permeabilisiert. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit PBS. Die Zellen wurden mit 5% Ziegen-Serum für eine Stunde auf Raumtemperatur geblockt, bevor

sie für eine Stunde mit dem primären HSF1-Antikörper (Herkunft aus Ratte), verdünnt in 0,1% Ziegen-Serum in PBS, inkubiert wurden. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein Cy2™-gekoppelter anti-Ratte IgG Fcγ-Fragment-spezifischer Antikörper, verdünnt in 0.1% Ziegen-Serum in PBS, verwendet. Die Zellen wurden eine Stunde in der Antikörper-Lösung inkubiert und anschließend dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit „Mounting“-Medium (1.5% N-Propylgallat, 60% Glycerol, 80 ng/ml 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) überschichtet. Epifluoreszenzmikroskopische Bilder wurden an einem entsprechend ausgestatteten „Axiovert 100“-Mikroskop aufgenommen. Die maximale Anregung von Cy2™ (Cyanin) liegt bei einer Wellenlänge von 492 nm, während das emittierte Licht eine Wellenlänge von 510 nm besitzt und somit im grünen Bereich des Lichtspektrums liegt. Das Absorptionsmaximum von DAPI liegt bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emmissionsmaximum bei 461 nm (blauer Bereich des Lichtspektrums). Da DAPI die Eigenschaft besitzt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA zu binden, wird hiermit eine Färbung der DNA im Nukleus der Zellen erreicht.

## 3.4 Klonierung

### 3.4.1 Restriktionshydrolyse von Nukleinsäuren

Für die Restriktionshydrolyse von PCR-Produkten oder Plasmid-DNA wurden ausschließlich Restriktionsenzyme des Typs II verwendet. Bei Enzymen des Typs II korrelieren die Erkennungsstellen mit ihren Schnittstellen. Die Restriktionshydrolysen wurden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Für die analytische und präparative Auftrennung von Nukleinsäuren wurden 1-2% Agarose-Gele in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat pH 7,5, 2,5 mM EDTA) verwendet. Die Gele wurden mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) oder 5µl/100ml Midori-Green Farbstoff versetzt. Die

Fluoreszenz der in die DNA interkalierten Farbstoffe wurde auf einem UV-Transilluminator detektiert.

### **3.4.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen**

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit laut Herstellerangaben verwendet. Die DNA-Banden wurden zunächst mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, mit dem Extraktions-Kit aufgereinigt und die isolierte DNA, die mit 10 mM Tris-Cl (pH 8,0) eluiert worden war, bei -20°C gelagert.

### **3.4.4 Ligation von Nukleinsäuren**

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde das Rapid DNA Ligation Kit von Roche benutzt. Die Ligation der Vektoren pRS-TAP-EYFP-N-P-mHsf1 und pRS-mHsf1-EYFP-TAP-P wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen und dem Quick Ligation Kit von NEB entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die Reaktionen wurden entsprechend der Herstellerangaben in einem Reaktionsvolumen von 30 µl auf Raumtemperatur vorgenommen und anschließend auf Eis inkubiert oder auf -20°C gelagert.

## **3.5 Mikrobiologische Arbeiten**

### **3.5.1 Kultivierung von *E. coli* Stämmen**

Für die Anzucht von *E. coli* Stämmen wurden jeweils 2 ml TB-Medium mit einer Einzelkolonie der Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Für Plasmidpräparationen im großen Maßstab wurden 2,5 ml TB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die wachsende Bakterienkultur 1:50 in 2,5 ml verdünnt und für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurde eine über Nacht wachsende Bakterienkultur angesetzt. Hierfür wurden die 2,5 ml der wach-

senden Bakterienkultur in 200 ml TB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Für die kurzfristige Haltung von Bakterienstämmen wurden die Bakterienzellen mit einer Impföse auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Waren Einzelkolonien sichtbar, wurden die Platten für 4 Wochen bei 4°C gelagert.

### **3.5.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen nach Inoue**

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen zur Plasmidtransformation erfolgte nach Inoue (Inoue et al., 1990). Hierfür wurden *E. coli* in 1 L SOB Medium bei 18°C bis zu einer OD600 (optische Dichte bei 600 nm) von 0,5-0,8 angezogen und anschließend durch Zentrifugation bei 4000xg und 4°C für 20 Minuten geerntet. Die Zellen wurden in 40 ml eiskaltem Transformationspuffer (TB-Puffer) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4000xg und 4°C für 20 Minuten. Die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Daraufhin wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurden 200 µl Aliquots der Bakterien in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.5.3 Transformation von *E. coli***

Für die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterien langsam aufgetaut und auf Eis gelagert. 5-10 ng der Plasmid-DNA wurden zu den Zellen hinzugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein 45sekündiger Hitzeschock bei 42°C. Der Transformationsansatz wurde anschließend mit 1 ml warmem LB-Medium versetzt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 1500xg für 5 Minuten. Die pelletierten Bakterien wurden in 100 µl LB-Medium resuspendiert und anschließend auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 3.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde das GenJET Plasmid Miniprep Kit von Fermentas verwendet. 2 ml TB-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Nach der Isolation wurde die Plasmid-DNA für restriktionshydrolytische Analysen (siehe Kapitel 3.4.1) verwendet und anschließend bei -20°C gelagert.

Sollte eine Aufreinigung von Plasmid-DNA im großen Maßstab erfolgen, wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit benutzt. Nach der Isolation, die entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt wurde, wurde die Plasmid-DNA für Transfektionen von humanen und murinen Zelllinien (siehe Kapitel 3.1.2) verwendet.

## 3.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 3.6.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von gelösten Nukleinsäuren wurde spektralphotometrisch über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Für die Bestimmung der Reinheit diente der Quotient  $E_{260}/E_{280}$ . Für reine DNA-Lösungen wurden Werte  $\geq 1,8$  erwartet.

### 3.6.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde eingesetzt, um gezielt Gene oder Genabschnitte aus Vektoren oder genomischer DNA zu amplifizieren. Hierfür wurde der Phusion High Fidelity PCR MasterMix eingesetzt. Die Phusion DNA Polymerase besitzt eine 3'-5' Exonukleaseaktivität (*Proofreading*), die laut Herstellerangaben eine 50-fach geringere Fehlerrate besitzt, als die gewöhnliche Taq DNA Polymerase. Zusätzlich wurde die Polymerasekettenreaktion in dieser Arbeit für die Genotypisierung von Mäusen verwendet. Hierfür wurde das TopTaq Mastermix Kit von Qiagen benutzt. Die PCR Kits wurden entsprechend der Herstellerangaben

verwendet. Für die Amplifizierung von Genen aus Plasmid-DNA wurden 10 ng Plasmid-DNA als Template eingesetzt. Wenn genomische DNA verwendet wurde, dann wurden 2-5 µl der in 200 µl Tris-Cl pH 8.0 gelösten DNA pro Reaktion eingesetzt. Für alle Reaktionen wurden 25 pmol/µl der Primer benutzt. Folgende Reaktionsbedingungen wurden für die Polymerasekettenreaktion verwendet (vgl. Tabelle 3.1). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und isoliert.

**Tabelle 3.1: Reaktionsbedingungen für die Polymerasekettenreaktion**

Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
3 Minuten	94°C	1
30 Sekunden	94°C	35-45
30 Sekunden	55-64°C*	
1-3 Minuten**	72°C	
10 Minuten	72°C	1

\* Die Temperatur wurde entsprechend der mittleren Schmelztemperatur der Primer (T<sub>m</sub>-Wert) variiert.

\*\*Die Elongationszeit wurde entsprechend der Größe des zu erwartenden PCR-Produktes variiert.

### 3.6.3 Isolierung von RNA aus Zellen

Für die Isolation von RNA (Ribonukleinsäure) wurden murine Zellen für 24 bis 48 Stunden in Zellkulturgefäße ausplattiert, so dass sie am Tag der Isolation eine Konfluenz von 90% erreicht hatten. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Die Pelletierung der Zellen erfolgte für 3 Minuten bei 300xg. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml TriFast resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Trizol enthält Guanidiniumthiocyanat, das Zellen lysiert und gleichzeitig RNasen und Enzyme inaktiviert. Nach der Inkubation wurden 200 µl Chloroform hinzugefügt, gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 Minuten auf 17000xg bei 4°C, um eine Trennung der wässrigen und organischen Phase zu erreichen. Die obere wässrige Phase enthielt die zu isolierende RNA, die Interphase DNA und die darunter liegende organische Phase enthielten Proteine. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die

Präzipitation der RNA wurden 400-500 µl Isopropanol hinzugefügt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 10 Minuten auf 17000xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das RNA-Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 17000xg bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 10 Minuten auf Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die pelletierte RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

### **3.6.4 cDNA Synthese aus RNA durch Reverse Transkription**

Für die Generierung von cDNA aus isolierter RNA wurde das QuantiTect Reverse Transkription Kit der Firma Qiagen verwendet. Es wurden jeweils 500-1000 ng RNA pro Reaktion in cDNA umgeschrieben. Um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA zu beseitigen, wurde im ersten Schritt „gDNA Wipeout Buffer“ verwendet. Im zweiten Schritt der Reaktion erfolgte die Umschreibung von RNA in kodierende DNA. Hierfür wurde das Enzym Reverse Transkriptase verwendet, welches ursprünglich aus Retroviren stammt. Die Umschreibung erfolgte für 30 Minuten bei 42°C. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **3.6.5 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)**

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (oder auch Real Time Polymerasekettenreaktion) ist eine Methode, die eine Quantifizierung der gewonnenen cDNA zulässt. Während der PCR-Zyklen, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion beruhen, wird entstehende Fluoreszenz in Echtzeit erfasst. Die Fluoreszenz entsteht proportional zur Menge des PCR-Produktes. Für diese Art der Polymerasekettenreaktion sind spezielle Sonden nötig. Die hier verwendeten TaqMan-Sonden, oder auch Hydrolyse-Sonden genannt, sind an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (6-FAM) und an ihrem 3'-Ende mit dem Quencher-Farbstoff 6-Carboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA) gekoppelt. Das Enzym Taq-Polymerase, das in dieser Methode eingesetzt wird, enthält eine 5'-Exonukleaseaktivität, die bei der Synthese der DNA den Reporterfarbstoff 6-FAM von der DNA ablöst. Nach vollständiger Synthese des PCR-Produktes wird auch der Quencher-

Farbstoff frei. Die räumliche Trennung der beiden Farbstoffe führt dazu, dass der Quencher TAMRA nach Anregung des Farbstoffes 6-FAM mit 488 nm, dessen Fluoreszenz nicht mehr unterdrücken kann. Die so entstehende Fluoreszenz kann durch die Real Time PCR-Maschine in Echtzeit gemessen werden.

Für die PCR-Reaktion wurden in jedes Well einer 96-Well Platte jeweils 10 ng cDNA, gelöst in 5 µl Wasser, 5 pmol der Primer und Sonde, sowie 10 µl 2x LightCycler480 „Master Mix“ pipettiert. Die 96-well Platte wurde mit einer Folie verschlossen und die Messung im LightCycler480 Real-Time PCR System vorgenommen. Folgende Reaktionsbedingungen wurden für die Real Time Polymerasekettenreaktion verwendet (vgl. Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen für die Real Time Polymerasekettenreaktion**

Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
2 Minuten	50°C	1
10 Minuten	95°C	1
15 Sekunden	95°C	40
1 Minute	60°C	
30 Minuten	40°C	1

Die Analysefunktion der Software wurde für die Auswertung der gewonnenen Daten verwendet. Die CT-Wert-Ermittlung (engl. *Cycle Threshold* für Schwellenwert-Zyklus) wurde anhand der zweiten Ableitung ermittelt. Um die Transkriptlevel der untersuchten Gene zu bestimmen, wurde die Differenz ( $\Delta Ct$ ) der CT-Werte des konstitutiv exprimierten Gens (*Housekeeper Gen*) und der Zielgene gebildet. Die ermittelten Werte wurden in die Gleichung  $2^{-\Delta Ct}$  eingesetzt.

## 3.7 Arbeiten mit Versuchstieren

### 3.7.1 Tierhaltung

Die hier verwendeten Mäuse waren in der Tierversuchsanlage des Leibniz-Instituts für Umweltmedizinische Forschung (IUF) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf untergebracht. Die Tiere wurden unter speziellen pathogenfreien und standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 55% in einem 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Die Durchführung von Tierversuchen erfolgte nach der Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV).

### 3.7.2 Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen wurden je 2 mm der Schwanzspitzen mit einer Schere abgeschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es wurden jeweils 200 µl PBDN-Puffer und 10 µl 10 mg/ml Proteinase K für die Lyse zu den Mausschwanzspitzen hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 56°C im Thermoerschüttelblock bei 600 rpm. Anschließend wurden die Lysate für 10 Minuten bei 17000xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit jeweils 200 µl Isopropanol gefällt und die genomische DNA für 10 Minuten bei 17000xg pelletiert. Die DNA wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei 17000xg für 10 Minuten zentrifugiert. Die isolierte genomische DNA wurde danach in 100 µl 10 mM Tris-Cl pH 8,0 gelöst und bei 56°C für eine Stunde inkubiert.

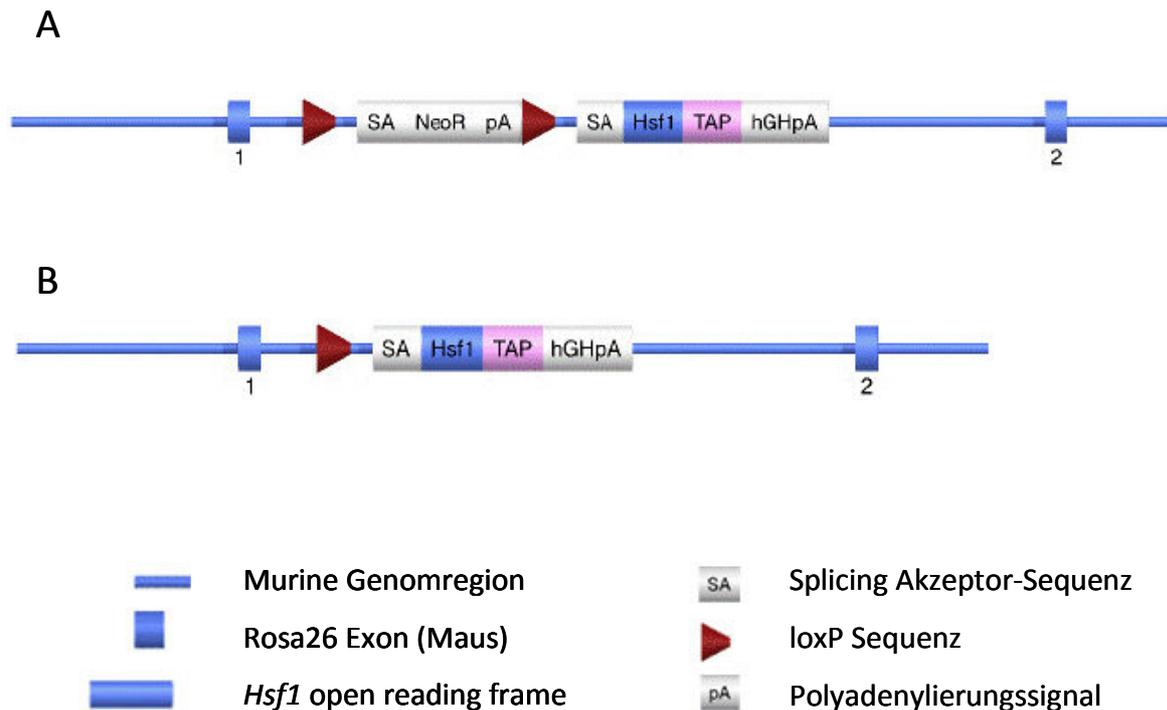
### 3.7.3 Intraperitoneale Injektion von Mäusen mit 17-DMAG und Cyclophosphamid

Für die Untersuchung des Einflusses des Geldanamycin-Derivates 17-DMAG auf die zirkadiane Uhr in peripheren Organen von Säugetieren, wurden männliche Mäuse im Alter von 12-14 Wochen verwendet. Für diese Untersuchung wurde den Mäusen 7 Tage lang an ZT4 (10

Uhr morgens) oder ZT16 (22 Uhr abends) das Geldanamycin-Derivat 17-DMAG intraperitoneal (lat. intra „innen“ und peritoneum „Bauchfell“) injiziert. Um die maximal tolerierbare Dosis (MTD) von 17-DMAG festzustellen, wurden den Mäusen im ersten Versuch 5, 10, 20 oder 40 mg/kg Körpergewicht 17-DMAG, gelöst in PBS, intraperitoneal injiziert. In den folgenden Versuchen wurden die Mäuse mit einer Kombination aus 40 mg/kg 17-DMAG und 150 mg/kg Cyclophosphamid, gelöst in PBS, zu den oben genannten Zeitpunkten behandelt. Injektionen mit PBS wurden für Kontrollanalysen zusätzlich vorgenommen. Während 17-DMAG nur die ersten 7 Tage verabreicht wurde, wurde Cyclophosphamid an Tag 3, 7 und 9 intraperitoneal injiziert. Das Körpergewicht der Mäuse wurde über den gesamten Versuchszeitraum (Tag 1 bis 14) dokumentiert.

### **3.7.4 Generierung einer konditional *Hsf1*-TAP exprimierenden *Knock-In* Maus**

Die Generierung der konditional-*Hsf1*-TAP exprimierenden *Knock-In* Maus wurde von der Firma TaconicArtemis durchgeführt. Hierfür wurde die cDNA des murinen Hitzeschock-Faktor 1 (*Hsf1*), gekoppelt an die Sequenz des Tandem-Affinitätsaufreinigungskomplexes (TAP), in Intron 1 des Rosa26-Lokus von C57BL/6NTac Mäusen eingefügt. Die vor dem *Hsf1*-TAP liegende Neomycin-Kassette wurde von zwei loxP Sequenzen flankiert (siehe Abb. 3.1 A). Die konstitutive Expression von *Hsf1*-TAP wurde durch eine Cre-vermittelte Exzision der Neomycin-Kassette erreicht (vgl. Abb. 3.1 B). Hierfür war eine Verpaarung mit Mäusen nötig, die die Cre-Rekombinase exprimierten. Nach der Exzision der Neomycin-Kassette steuerte der Rosa26 Promoter die Expression des TAP-gekoppelten *Hsf1*.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des *Hsf1*-TAP enthaltenden ROSA26-Lokus**

(A) Die Sequenz des TAP-fusionierten murinen *Hsf1* wird durch eine Splicing Akzeptor-Sequenz (SA) und eine Sequenz, die Informationen für ein Polyadenylierungssignal enthält (hGHpA) im ROSA26-Lokus auf Chromosom 6 flankiert. Upstream dieser Sequenz liegt eine Sequenz-Kassette, deren Expression eine Neomycin-Resistenz (NeoR) vermittelt. Diese wird ebenfalls durch eine Splicing Akzeptor-Sequenz und das Gen für ein Polyadenylierungssignal, sowie durch 2 loxP Sequenzen flankiert. (B) Nach Rekombination durch das Cre-Enzym steht *Hsf1*-TAP unter direkter Kontrolle des ROSA26-Promotors.

### 3.7.5 Gesamtzellproteinextrakte aus Mauslebern

Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten aus Mausleberzellen für die Tandem-Affinitätsaufreinigung wurden Versuchstiere durch zervikale Dislokation euthanasiert und Lebern nach Perfusion mit PBS entnommen. Für eine kurzzeitige Lagerung wurden die Lebern in PBS auf Eis in 15 ml Reaktionsröhrchen aufbewahrt. Um Gesamtzellproteinextrakte zu erstellen, wurden Lebern in 1 ml TAP-Lysierungspuffer aufgenommen und homogenisiert. Anschließend wurden 5 ml TAP-Lysierungspuffer hinzugegeben und eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis vorgenommen. Um die Zellen und den Zellkern noch effizienter aufzuschließen zu können, wurde die Zellsuspension bei 70% für 20 Sekunden einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Da auch DNA-gebundene HSF1-Proteinkomplexe isoliert werden sollten, wurde anschließend die DNA mit 50 U/ml DNase I für 60 Minuten verdaut. Da DNase I Kalzium- und Magnesium-abhängig ist, wurden dem Puffer zusätzlich 3mM CaCl<sub>2</sub> und 10 mM MgCl<sub>2</sub> hinzu-

gefügt. Die Proteinextrakte wurden zweimal für 30 Minuten bei 17000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein Bradford-Assay für die Analyse der Proteinkonzentration durchgeführt. Anschließend konnten die Gesamzellproteinextrakte für TAP-Tag Aufreinigungen verwendet werden (vgl. Kapitel 3.2.4).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse der Interaktion zwischen Hitzeschock-Protein 90 und der zirkadianen Uhr in Säugetieren

Ein Gegenstand der Untersuchung der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Interaktion von HSP90 und der zirkadianen Uhr in Säugetieren. HSP90 ist sowohl als Regulator von HSF1 bekannt, als auch direkt durch HSF1 reguliert (Nadeau *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1998). Die Expression von HSP90 in der Leber und dem SCN von Mäusen erwies sich als hoch rhythmisch (Kornmann *et al.*, 2007; Fukuyama *et al.*, 2008). Bis zu diesem Zeitpunkt ist jedoch keine Funktion von HSP90 in der zirkadianen Uhr von Säugetieren beschrieben worden. Für die Untersuchung dieses Zusammenhangs wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion von HSP90 durch spezifische Inhibitoren in Mausfibroblasten gehemmt und der Effekt auf die molekulare Uhr dieser Zellen analysiert. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Mitglieder des positiv regulierenden Arms der molekularen Uhr gelegt, da bereits gezeigt werden konnte, dass *in vitro* translatiertes BMAL1 und HSP90 miteinander interagieren (Hoggenesch *et al.*, 1997). Ein *Knock-down* von BMAL1 führte in humanen U2OS Zellen außerdem zu einer Verminderung der zirkadianen Amplitude bis hin zur Arrhythmizität (Baggs *et al.*, 2009).

In ersten Versuchen wurde durch Echtzeit-Biolumineszenz-Messungen die Auswirkung der pharmakologischen Inhibition von HSP90 auf die zirkadiane Uhr von NIH3T3 Zellen untersucht. Durch Analysen der mRNA-Level der Gene der molekularen Rückkopplungsschleife und der Untersuchung der Proteinstabilität und Halbwertszeit der Proteine BMAL1 und CLOCK wurde die Verbindung zwischen HSP90 und dem zirkadianen Oszillator mechanistisch charakterisiert. In Experimenten mit Mäusen sollte *in vivo* die Auswirkung der HSP90-Inhibition auf die tageszeitabhängige Zytotoxizität des Chemotherapeutikums Cyclophosphamid untersucht werden.

#### 4.1.1 Analyse der Funktion des zirkadianen Oszillators nach HSP90-Inhibition durch Reporter-gen-Messungen

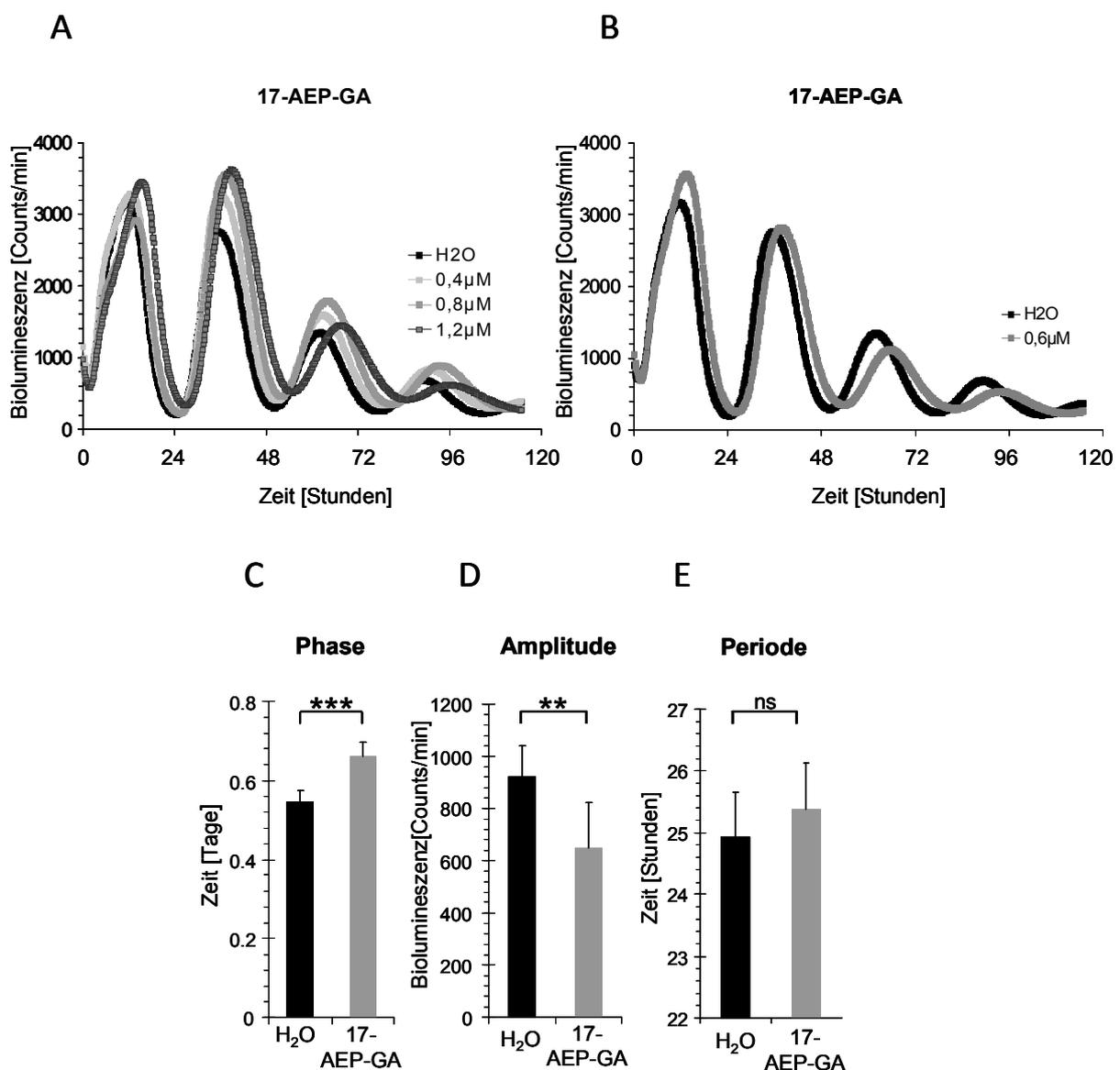
Die Untersuchung der Auswirkung der pharmakologischen Inhibition von HSP90 auf die zirkadiane Uhr wurde in NIH3T3-Mausfibroblasten vorgenommen. Die hier verwendete Zelllinie (NIH3T3-Bmal1-Luc) exprimiert stabil ein Luziferase-Gen, welches unter der Kontrolle des zirkadian regulierten *Bmal1*-Promotors steht (Nagoshi *et al.*, 2004). Durch Echtzeit-Biolumineszenz-Messungen ist es möglich, die rhythmische Aktivität der endogenen zirkadianen Uhr dieser Zellen zu analysieren, da die zirkadiane Aktivierung des Luziferase-Gens der des molekularen Rückkopplungsschleifen-Gens *Bmal1* entspricht.

Die Aktivität von HSP90 wurde durch die Behandlung der Mausfibroblasten mit dem benzo-chinoiden Ansamycin 17-AEP-GA, einem Geldanamycin-Derivat, inhibiert. Geldanamycin und seine Derivate binden an die ATP-Bindetasche in der N-terminalen Domäne von HSP90. Geldanamycin verhindert somit die Bindung von ATP an HSP90 und die darauf folgende Konformationsänderung von einer offenen in eine geschlossene Form des HSP90-Dimers. Client-Proteine können daraufhin nicht mehr von HSP90 gebunden werden und werden durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (Taldone *et al.*, 2009). Das Derivat 17-AEP-GA weist eine geringe Zytotoxizität und hohe Wasserlöslichkeit auf und bindet *in vitro* mit einem K<sub>d</sub>-Wert von 0,4 µM an HSP90 (Tian *et al.*, 2004).

Für die Echtzeit-Biolumineszenz-Analysen wurden die verwendeten Mausfibroblasten an Tag 0 mit 50% Pferdeserum für 2 Stunden inkubiert. Die Behandlung mit Pferdeserum führt durch die Aktivierung von *immediate-early* Genen, wie *Per1*, *Per2* und *c-fos* zu einer Neueinstellung der Phase und daraus resultierenden Synchronisierung der zirkadianen Oszillatoren der Zellen (Balsalobre *et al.*, 1998). Anschließend wurde HSP90 in den Zellen durch die Behandlung mit 17-AEP-GA inhibiert.

Die Analysen in Abbildung 4.1 A zeigen, dass mit steigender Konzentration von 17-AEP-GA (0,4 – 1,2 µM) eine zunehmende Veränderung der Phase und der Amplitude der zirkadianen Oszillation der NIH3T3-Zellen beobachtet werden konnte. Durch die Behandlung der Zellen mit 0,6 µM 17-AEP-GA (vgl. Abb. 4.1 B) betrug die Phasenverschiebung der zirkadianen Oszillation durchschnittlich 2,75 Stunden im Vergleich zur Phase unbehandelter Kontrollzellen (H<sub>2</sub>O: 13,1 ± 1,1 h; 17-AEP-GA: 15,8 ± 1,1 h; Abb. 4.1 B und C). Zellen, die mit 17-AEP-GA behandelt wurden, wiesen außerdem eine reduzierte Amplitude der zirkadianen Oszillation auf. Diese Veränderung wird im Besonderen nach 72- bis 96-stündiger Inkubation deutlich

(Abb. 4.1 A und B). Bei Zellen, die mit 0,6  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA behandelt worden waren, konnte nach 72 Stunden eine signifikante Amplitudenreduktion von ca. 30% ( $\text{H}_2\text{O}$ :  $921 \pm 122$  Counts/min; 17-AEP-GA:  $649 \pm 173$  Counts/min) verzeichnet werden (vgl. Abb. 4.1 D). Die Periodenlänge der zirkadianen Uhr war unter diesen Bedingungen durch die HSP90-Inhibition nicht signifikant beeinträchtigt ( $\text{H}_2\text{O}$ :  $24,9 \pm 0,7$  h; 17-AEP-GA:  $25,4 \pm 0,8$  h; Abb. 4.1 E).

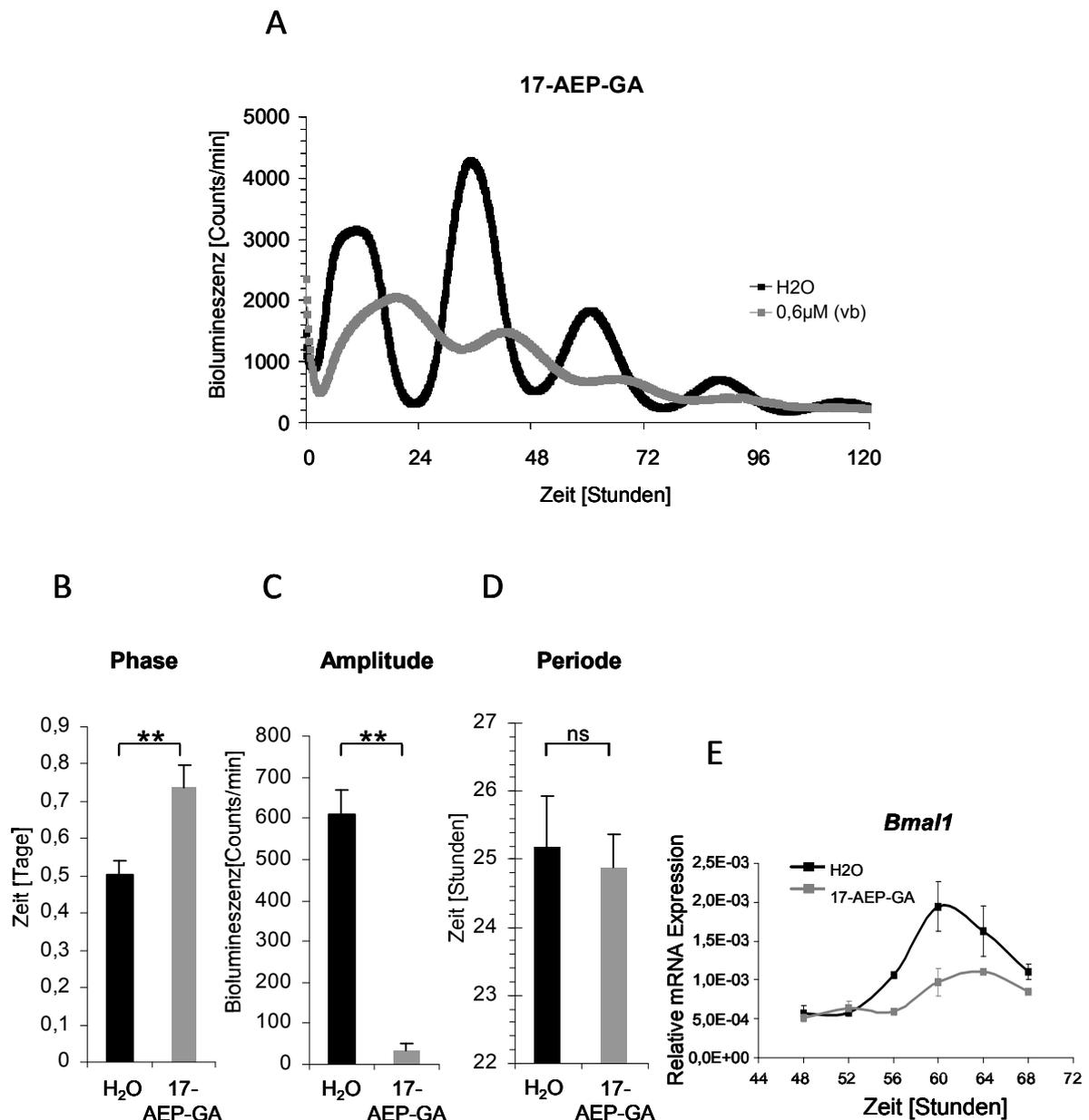


**Abbildung 4.1: Echtzeit-Biolumineszenz-Analyse von NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen nach 17-AEP-GA Behandlung**  
Synchronisierte NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen wurden mit 0,4, 0,8, 1,2  $\mu\text{M}$  (A), 0,6  $\mu\text{M}$  (B) oder Wasser als Lösungsmittelkontrolle an Tag 0 versetzt. Die Biolumineszenz (Counts/Minute) wurde in Echtzeit über 120 Stunden gemessen. Die Mittelwerte der Veränderungen der Phase (C), der Amplitude (D) und der Periodenlänge (E) acht unabhängiger Replikate ( $n=8$ ) wurden nach 72-stündiger Behandlung mit 0,6  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA analysiert. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. ns = nicht signifikant; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$  (zweiseitiger T-Test)

Für alle folgenden Experimente wurden 17-AEP-GA Konzentrationen von 0,6 oder 0,8  $\mu\text{M}$  verwendet, da bei diesen Konzentrationen keinerlei zytotoxischer Effekt zu beobachten war (siehe Anhang Abb. 7.1 C), die zirkadiane Uhr der Zellen jedoch signifikant beeinträchtigt wurde.

Da die stärksten Effekte der HSP90-Inhibition auf die zirkadiane Uhr nach 72 bis 96 Stunden detektiert werden konnten, wurden für weitere Analysen NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen für 3 Tage in 0,6  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA enthaltendem Medium vorinkubiert. Die Zellen wurden an Tag 0 synchronisiert, erneut mit 0,6  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA versetzt und die Biolumineszenz in Echtzeit über 5 Tage gemessen. Die Vorbehandlung (vb) der NIH3T3-Zellen mit 17-AEP-GA führte zu einem verstärkten Effekt auf die zirkadiane Uhr. Die Zellen wiesen ein verändertes Oszillationsmuster ihres zirkadianen Rhythmus auf (Abb. 4.2 A (0,6 $\mu\text{M}$  vb)). Entsprechend der Beobachtungen zuvor, konnte in diesem Experiment ebenfalls ein signifikanter Effekt auf die Amplitude ( $\text{H}_2\text{O}$ :  $610 \pm 58$  Counts/min; 17-AEP-GA:  $34 \pm 18$  Counts/min; Abb. 4.2 C) und die Phase ( $\text{H}_2\text{O}$ :  $12,1 \pm 0,87$  h; 17-AEP-GA:  $17,7 \pm 1,4$  h; Abb. 4.2 B) verzeichnet werden, während die Periodenlänge ( $\text{H}_2\text{O}$ :  $25,2 \pm 0,7$  h; 17-AEP-GA:  $24,8 \pm 0,5$  h; Abb. 4.2 D) unbeeinflusst blieb.

Um ausschließen zu können, dass der detektierte Effekt auf Phase und Amplitude durch 17-AEP-GA Behandlung ausschließlich durch einen Nebeneffekt auf die Luziferase-Reporter-genaktivität hervorgerufen wurde, wurden die mRNA-Level von endogenem *Bmal1* in unbehandelten Kontrollzellen und 0,6  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA-behandelten NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen untersucht. Die Zellen wurden nach 48 Stunden während eines Zeitraums von 24 Stunden alle 4 Stunden geerntet, um die mRNA-Expression von *Bmal1* in einem vollständigen zirkadianen Zyklus untersuchen zu können. Die endogene *Bmal1* Genexpression spiegelte sowohl die zuvor beobachtete veränderte Phase, als auch die reduzierte Amplitude wider (vgl. Abb. 4.2 E).

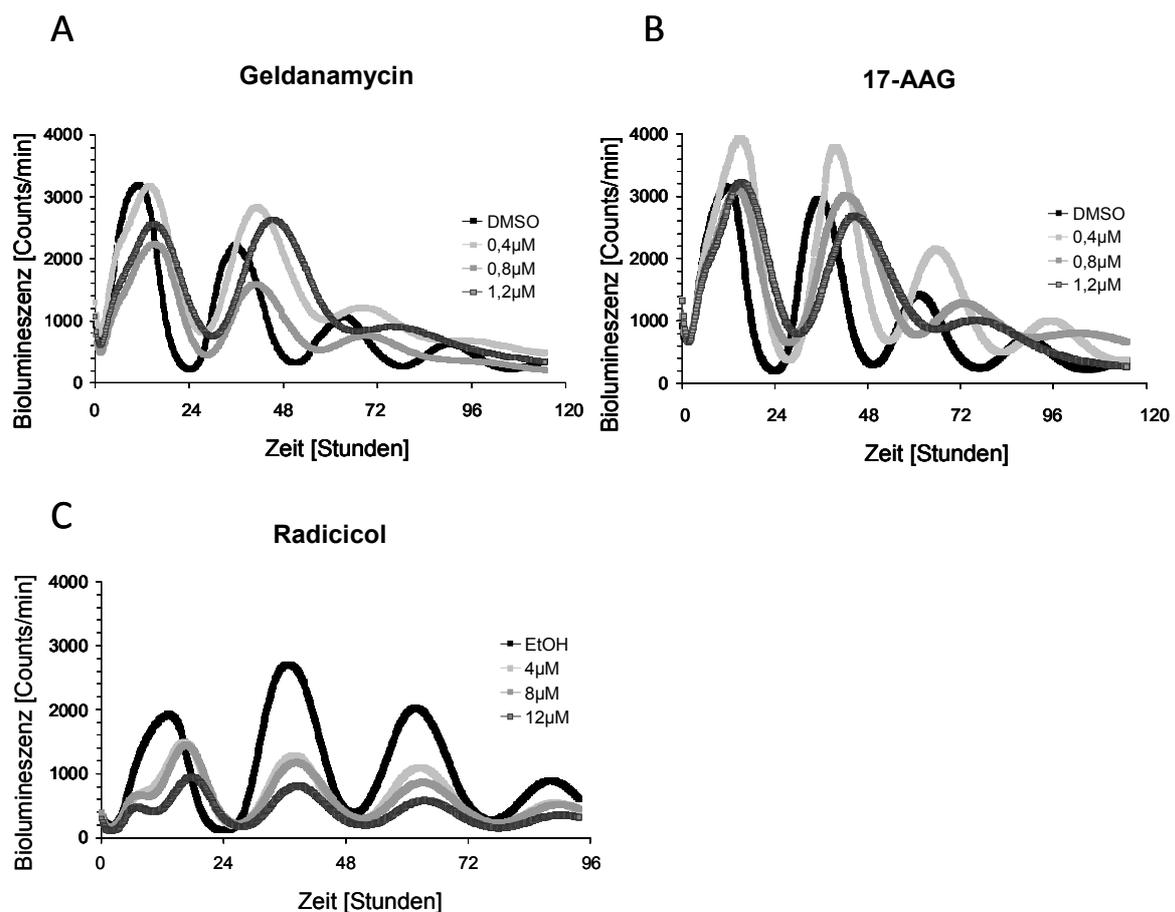


**Abbildung 4.2: Echtzeit-Biolumineszenz-Messung und mRNA-Analyse von NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen nach Vorbehandlung mit 17-AEP-GA**

(A) NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen wurden für 3 Tage mit 0,6  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA in Medium vorinkubiert (0,6 $\mu\text{M}$  (vb)) und nach der Synchronisierung an Tag 0 erneut mit 0,6  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA versetzt. Die Biolumineszenz (Counts/Minute) wurde in Echtzeit über 120 Stunden gemessen. Die Mittelwerte der Veränderungen der Phase (B), der Amplitude (C) und der Periodenlänge (D) drei unabhängiger Replikate ( $n=3$ ) wurden in NIH3T3-Bmal1-Luc nach 72-stündiger Behandlung mit 0,6  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA analysiert. (F) Endogene *Bmal1* mRNA-Level von unbehandelten und von 3-Tage 17-AEP-GA vorinkubierten NIH3T3-Bmal1-Luc, normalisiert auf die mRNA-Expression des *Housekeeper*-Gens *Eef1a*, wurden verglichen ( $n=2$ ). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. ns = nicht signifikant; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$  (zweiseitiger T-Test)

Wie bereits erwähnt, sind die Mitglieder der HSP90-Chaperonfamilie die vorherrschenden direkten Zielproteine von Geldanamycin-Derivaten in Säugetieren. Die pharmakologische Inhibition von Proteinen in Zellen kann jedoch auch unspezifische Auswirkungen auf andere Proteine zur Folge haben, die möglicherweise einen Einfluss auf die zirkadiane Uhr der Zellen

nehmen. Um solche unspezifische Effekte weitestgehend ausschließen zu können, wurde der Effekt zweier weiterer Geldanamycin-Derivate (Geldanamycin und 17-AAG) und der des HSP90-Inhibitors Radicicol auf die zirkadiane Uhr von Mausfibroblasten im gleichen Assay analysiert. Radicicol ist strukturell nicht mit benzochinoiden Ansamycinen verwandt und weist hohe HSP90-Bindungsaffinität, jedoch geringere Substratspezifität als Geldanamycin-Derivate auf (Delmotte und Delmotte-Plaquet, 1953; Schulte *et al.*, 1998).



**Abbildung 4.3: Biolumineszenz-Analysen von NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen nach Behandlung mit Geldanamycin, 17-AAG oder Radicicol**

Synchronisierte NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen wurden nach der Synchronisierung an Tag 0 mit H<sub>2</sub>O, 0,4, 0,8, 1,2 µM (A) Geldanamycin, (B) 17-AAG oder (C) Radicicol inkubiert und die Biolumineszenz in Echtzeit (Counts/Minute) über 96 bis 120 Stunden gemessen.

Die Analyse der rhythmischen Expression der durch den *Bmal1*-Promotor getriebenen Luziferase zeigte, dass alle drei Substanzen in konzentrationsabhängiger Weise Einfluss auf die zirkadiane Uhr der verwendeten NIH3T3-Zellen nehmen (vgl. Abb. 4.3 A-C). Wie zuvor durch die Behandlung mit 17-AEP-GA beobachtet werden konnte, führte auch hier die Hemmung von HSP90 durch Geldanamycin zu einer Veränderung der Phase und einer Reduktion der

Amplitude der Oszillationen bei allen verwendeten Konzentrationen (vgl. Abb. 4.3 A). Ein Effekt auf die Amplitude konnte mit dem Geldanamycin-Derivat 17-AAG erst ab einer Konzentration von 0,8  $\mu\text{M}$  beobachtet werden (vgl. Abb. 4.3 B). Geldanamycin, 17-AAG und in geringerem Maße 17-AEP-GA schienen bei höheren Konzentrationen zu einer Periodenlängenveränderung zu führen (Abb. 4.1 A und Abb. 4.3 A und B). Die Behandlung der Zellen mit hohen Konzentrationen von Geldanamycin und 17-AAG führte jedoch auch zu verstärkter Zytotoxizität. So war mit Konzentrationen ab 0,8  $\mu\text{M}$  eine Zellmortalität von bis zu 50% zu verzeichnen (vgl. Anhang Abb. 7.1 A und B).

Die Behandlung der NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen mit dem strukturell unverwandten HSP90-Inhibitor Radicicol resultierte ebenfalls in einer Reduktion der Amplitude der Oszillation, während nur ein geringer Einfluss auf die Phase zu beobachten war (vgl. Abb. 4.3 C). Auch mit dieser Substanz konnte bei hohen Konzentrationen ein verstärkter Zytotoxizitätseffekt verzeichnet werden (vgl. Anhang Abb. 7.1 D).

Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Inhibition von HSP90 durch benzochinoide Ansamycine und Radicicol einen Effekt auf die zirkadiane Uhr von NIH3T3-Fibroblasten hat. Die Amplitude und Phase der transkriptionellen Oszillationen wurden signifikant beeinflusst. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, welcher mechanistische Hintergrund zu den beobachteten Veränderungen in der Oszillatorfunktion der zirkadianen Uhr der Mausfibroblasten durch HSP90-Inhibition führt.

#### **4.1.2 Analyse der BMAL1-Halbwertszeit nach Inhibition von HSP90**

Wie bereits in Kapitel 1.1.3.1 erwähnt, nehmen die Aktivität und Stabilität sowie posttranslationale Modifikationen von Uhrproteinen starken Einfluss auf die Regulation der transkriptionellen/translationalen Rückkopplungsschleife der zirkadianen Uhr in Säugetieren. HSP90 ist unter anderem an der Kontrolle zellulärer Mengen verschiedener Client-Proteine beteiligt und beeinflusst diese entweder durch direkte Bindung oder indirekt durch Änderung der Aktivität oder Stabilität von Regulatorproteinen (vgl. Kapitel 1.2.2.1.3).

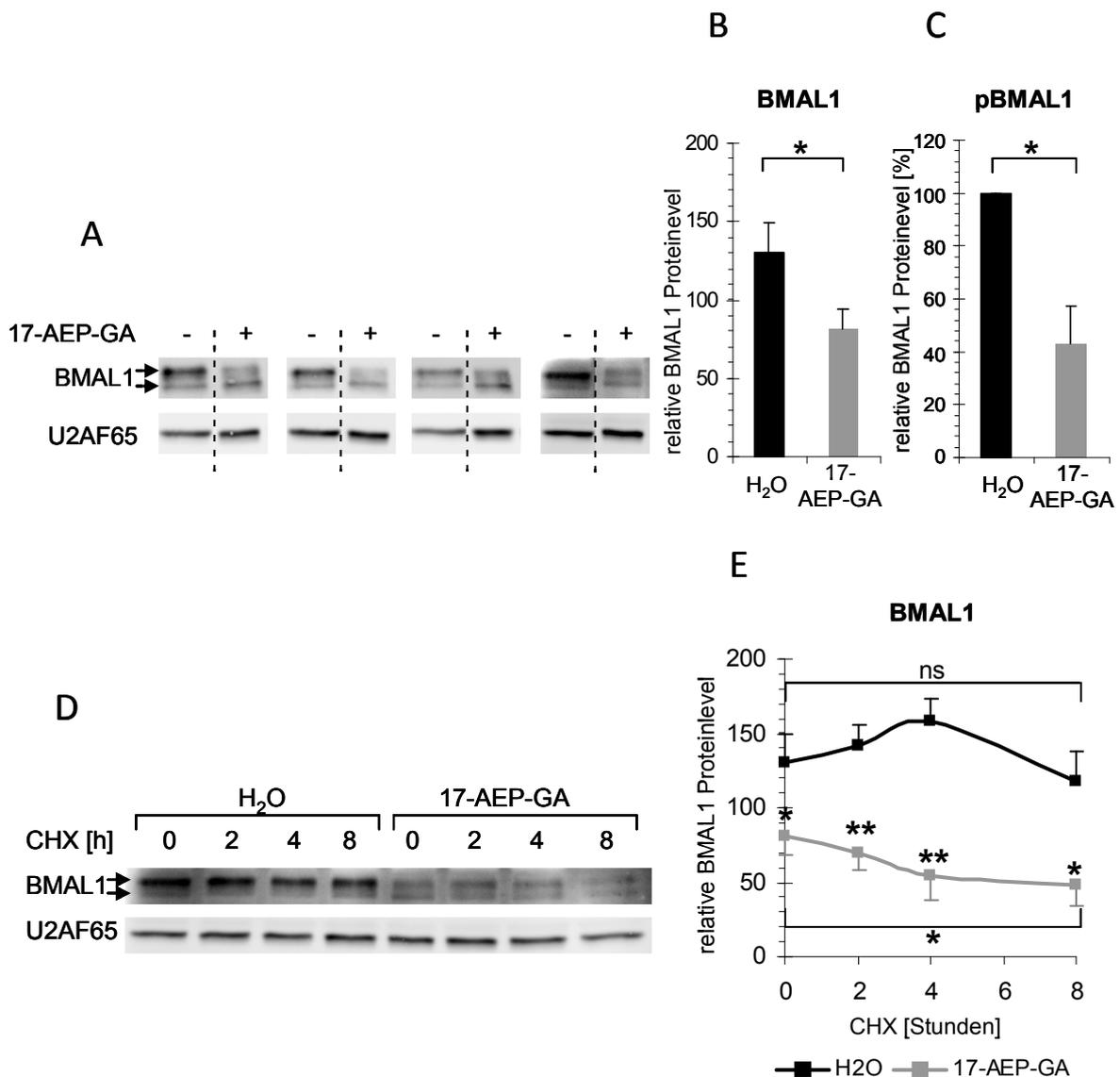
Um zu untersuchen, ob HSP90 für die Aufrechterhaltung der Proteinlevel von zirkadianen Uhrproteinen essentiell ist, wurde im folgenden Abschnitt die Stabilität des Uhrproteins BMAL1 nach Inhibition von HSP90 analysiert. BMAL1 war ein naheliegender Kandidat für ein

Zielgen von HSP90, da bereits gezeigt wurde, dass die *in vitro* translatierten Proteine BMAL1 und HSP90 interagieren (Hogenesch et al., 1997), und der *Knock-down* von BMAL1 zu einer Verminderung der zirkadianen Amplitude bis hin zur Arrhythmizität führt (Baggs et al., 2009).

Die Proteinlevel von BMAL1 wurden nach 24-stündiger Inkubation von NIH3T3-Zellen mit 0,8  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA im Vergleich zu unbehandelten Zellen untersucht (vgl. Abb. 4.4 A). Wie aus Abbildung 4.4 A und B zu entnehmen ist, war die absolute BMAL1-Proteinmenge in 17-AEP-GA-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant reduziert. Die Reduktion des BMAL1-Levels lag bei durchschnittlich 35% (vgl. Abb. 4.4 A und B).

BMAL1 erscheint in Western Blot Analysen als Doppelbande (vgl. Abb. 4.4 A). Diese Doppelbande wird wahrscheinlich durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen des Proteins hervorgerufen. Die langsamer migrierende Proteinbande stellt wahrscheinlich hyperphosphoryliertes BMAL1-Protein (pBMAL1) dar, was bereits 2001 durch Lee et al. gezeigt werden konnte. Die Proteinmenge dieser hyperphosphorylierten BMAL1-Form war nach 17-AEP-GA-Behandlung signifikant um durchschnittlich ca. 40% reduziert (Abb. 4.4 C).

Um die Proteinstabilität von BMAL1 weiter zu analysieren, wurde die Kinetik der BMAL1-Proteindegradation in An- oder Abwesenheit von 17-AEP-GA untersucht. Für diese Analyse wurden NIH3T3-Zellen für 24 Stunden mit 0,8  $\mu\text{M}$  17-AEP-GA oder dem Lösungsmittel Wasser behandelt und anschließend die Proteintranslation durch Cycloheximid (CHX) für 2, 4 und 8 Stunden inhibiert (Abb. 4.4 D). Die Ergebnisse in Abbildung 4.4 D zeigen, dass die Behandlung mit 17-AEP-GA zu einer signifikant schnelleren Abnahme der BMAL1-Proteinmenge im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen führte. Während nach 8-stündiger Inhibition der Proteintranslation die relative Proteinmenge von BMAL1 in unbehandelten Zellen noch bei ca. 91% lag, wiesen mit 17-AEP-GA behandelte Zellen eine durchschnittliche Abnahme von ca. 35% des BMAL1-Proteinlevels im Vergleich zu CHX-unbehandelten Zellen auf.



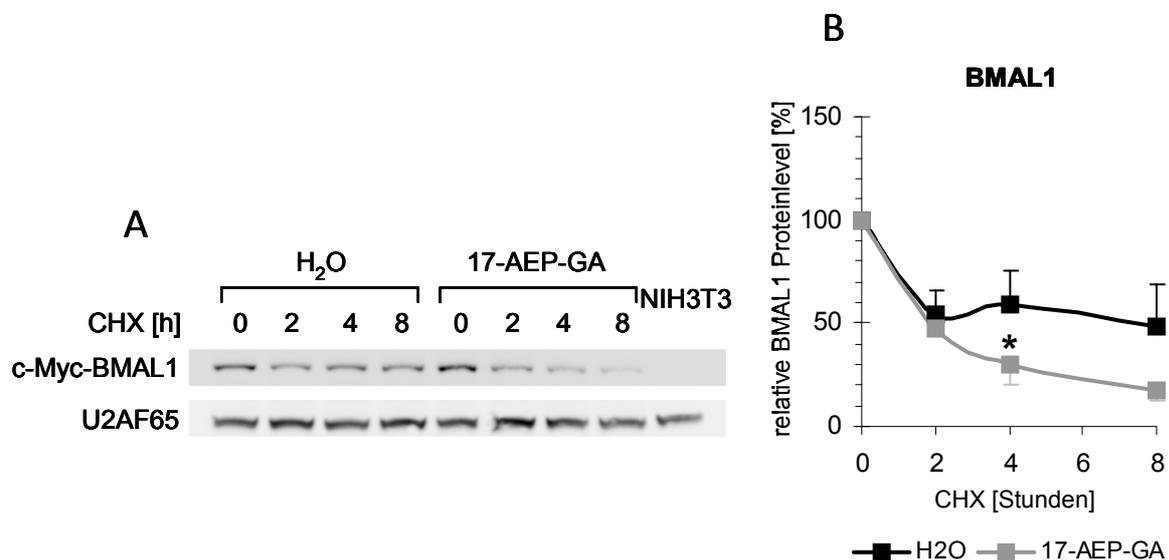
**Abbildung 4.4: Analyse der Proteinstabilität von endogenem BMAL1 in NIH3T3-Zellen**

(A) Analyse der zellulären Level von endogenem BMAL1 (anti-BMAL1 Antikörper) in NIH3T3-Zellen durch *Western Blotting* nach Behandlung der Zellen für 24 Stunden mit 0,8  $\mu$ M 17-AEP-GA im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Das Protein U2AF65 (anti-U2AF65 Antikörper) dient als Kontrolle für gleichmäßige Proteinbeladung. BMAL1-Proteindoppelbanden sind durch Pfeile markiert. Nebeneinander gesetzte Spuren sind durch gestrichelte Linien markiert (n=4). (B) Quantifizierung der BMAL1-Proteinlevel aus (A) nach Behandlung mit Wasser (schwarz) oder 17-AEP-GA (grau), normalisiert auf den Mittelwerte aller Proteinintensitätswerte. (C) Quantifizierung der BMAL1-Level der oberen Proteinbande (pBMAL1: hyperphosphoryliertes BMAL1) der BMAL1-Doppelbanden, normalisiert auf den zugehörigen BMAL1-Wert der Wasserkontrolle. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. (D) NIH3T3-Zellen wurden für 2, 4 und 8 Stunden mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) nach 24-stündiger Inkubation mit H<sub>2</sub>O oder 0,8  $\mu$ M 17-AEP-GA behandelt und ihre BMAL1-Expression immunologisch nachgewiesen. (E) Quantifizierung der BMAL1-Proteinlevel aus (D) nach Behandlung mit Wasser (schwarz) oder 17-AEP-GA (grau), normalisiert auf den Mittelwerte aller Proteinintensitätswerte (n=3). Sterne über den grauen Datenpunkten beziehen sich auf die Signifikanzlevel zwischen 17-AEP-GA und H<sub>2</sub>O. ns = nicht signifikant; \* p<0,05; \*\* p<0,005 (zweiseitiger T-Test)

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde in einem unabhängigen experimentellen System die Halbwertszeit von c-Myc-gekoppeltem BMAL1 untersucht. Für diese Analysen wurden NIH3T3-Zellen verwendet, die c-Myc-BMAL1 stabil unter der Kontrolle eines Zytomegalovirus-Promotors (CMV-Promotor) exprimieren. Der CMV-Promotor unterliegt nicht der direkten Regulation der zirkadianen Rückkopplungsschleife und führt zu einer konstitutiven Expression von BMAL1.

Entsprechend der Ergebnisse mit endogenem BMAL1 zeigte auch c-Myc-gekoppeltes BMAL1-Protein eine deutlich kürzere Halbwertszeit in der Anwesenheit von 17-AEP-GA, verglichen mit unbehandelten Zellen (vgl. Abb. 4.5 A und B). Nach 8-stündiger Inhibition der Proteinsynthese durch CHX wiesen mit 17-AEP-GA behandelte Zellen eine Reduktion ihres c-Myc-BMAL1 Proteinlevels um ca. 80% im Vergleich zur Ausgangsmenge auf, während die relative BMAL1 Proteinmenge in unbehandelten Zellen noch bei über 50% lag (Abb. 4.5 B).

Die Inhibition von HSP90 in NIH3T3-Zellen durch die Behandlung mit dem Geldanamycin-Derivat 17-AEP-GA führt folglich zu einer Reduktion der Halbwertszeit des zirkadianen Rückkopplungsschleifen-Proteins BMAL1.



**Abbildung 4.5: Kinetik der Proteininstabilität von c-Myc-BMAL1 in NIH3T3-Zellen**

(A) NIH3T3-Zellen, die stabil c-Myc-BMAL1 exprimieren, wurden für 2, 4 und 8 Stunden mit dem Translationssinhibitor Cycloheximid (CHX) nach 24-stündiger Inkubation mit H<sub>2</sub>O oder 0,8  $\mu$ M 17-AEP-GA behandelt. Die Proteinlevels von c-Myc-BMAL1 wurden durch einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten anti-c-Myc Antikörper immunologisch nachgewiesen. Das Protein U2AF65 (anti-U2AF65 Antikörper) dient als Kontrolle für gleichmäßige Proteinbeladung. NIH3T3-Zellen, die kein c-Myc-BMAL1 exprimieren, dienen als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindung (Spur 9). (B) Quantifizierung der c-Myc-BMAL1 Proteinlevel mit (grau) und ohne (schwarz) Behandlung von 17-AEP-GA aus (A), normalisiert auf den zugehörigen 0h CHX-Wert (n=3). Sterne über den grauen Datenpunkten beziehen sich auf die Signifikanzlevel zwischen 17-AEP-GA und H<sub>2</sub>O.\* p<0,05 (zweiseitiger T-Test)

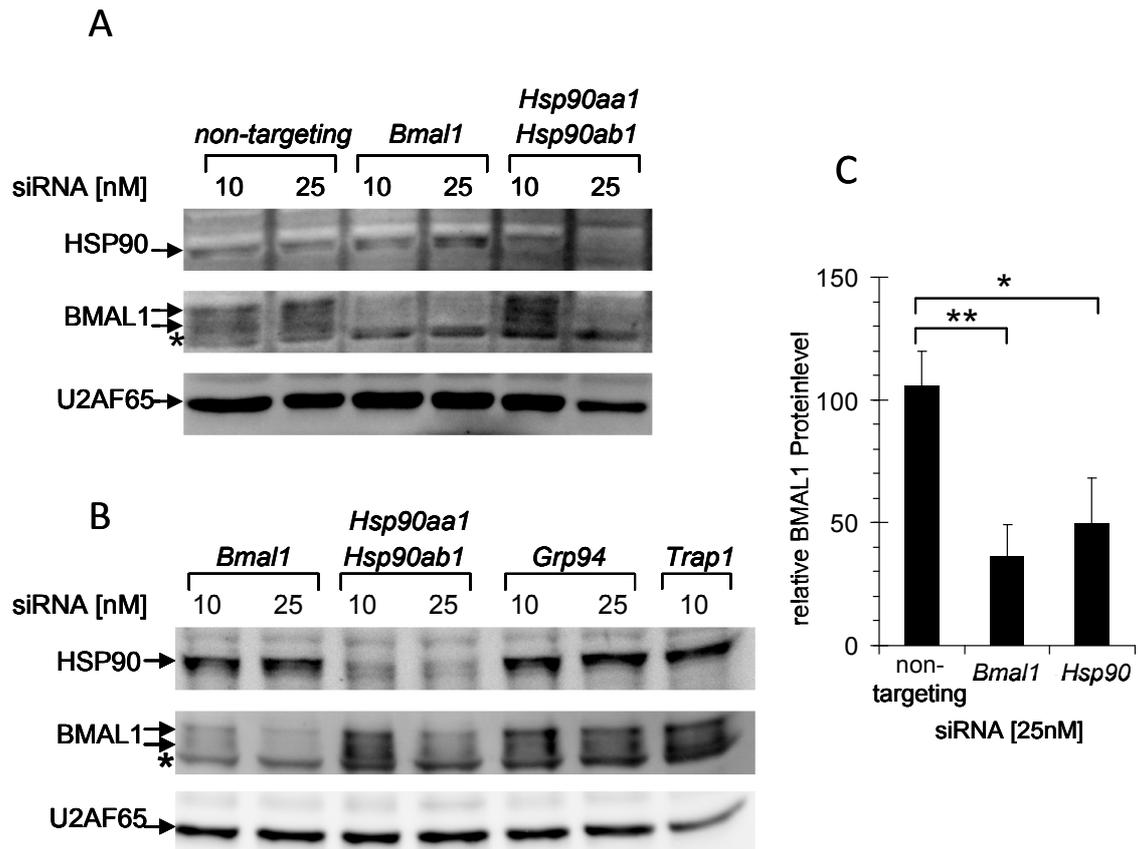
### 4.1.3 Zytosolisches HSP90 ist an der Stabilisierung von BMAL1 beteiligt

Wie bereits erwähnt wurde, können chemische Proteininhibitoren unerwünschte Nebeneffekte (*off target effects*) auf andere Proteine haben. Um weiter zu untermauern, dass der Effekt von 17-AEP-GA auf die Stabilität von BMAL1 spezifisch durch die Inhibition der Aktivität von HSP90 hervorgerufen wird, wurden im Folgenden alle Varianten von HSP90 (HSP90 $\alpha$ , HSP90 $\beta$ , GRP94 und TRAP1) durch siRNA in NIH3T3-Fibroblasten herunterreguliert. Eine *non-targeting* siRNA, die an keine bekannten murinen Genprodukte binden kann, wurde als Negativkontrolle verwendet, während eine direkte Herunterregulierung durch siRNA gegen *Bmal1* als Positivkontrolle für reduzierte BMAL1-Proteinlevel diente.

Die Proteinmengen von BMAL1 und HSP90 wurden nach *Knock-down* mit 10 oder 25 nM der oben erwähnten siRNAs durch *Immunoblotting* analysiert. U2AF65 diente als Kontrolle für gleichmäßige Proteinbeladung (vgl. Abb. 4.6 A und B).

Während ein simultaner *Knock-down* der beiden zytoplasmatischen Isoformen HSP90 $\alpha$  und HSP90 $\beta$  in NIH3T3-Zellen mit 10 nM siRNA keinen Effekt auf das Proteinlevel von BMAL1 erbrachte, führte die Verwendung von 25 nM siRNA zu einer signifikanten Reduktion von endogenem BMAL1-Protein. Diese Reduktion von BMAL1 war annähernd genauso stark, wie eine direkte Herunterregulierung von BMAL1 selbst durch siRNA (vgl. Abb. 4.6 A und B). Eine direkte Herunterregulierung von BMAL1 durch 25 nM siRNA resultierte in einer Proteinreduktion von ca. 70% (vgl. Abb. 4.6 C). Durch den *Knock-down* von HSP90 konnte nahezu kein HSP90-Protein durch *Western Blotting* detektiert und eine signifikante Reduktion des BMAL1-Proteinlevels um durchschnittlich 50% verzeichnet werden (vgl. Abb. 4.6 A und C).

Während der *Knock-down* der zytoplasmatischen HSP90-Isoformen zu einer signifikanten BMAL1-Reduktion führte, konnte durch die Herunterregulierung der HSP90-Isoformen GRP94 oder TRAP1 weder mit 10 noch mit 25 nM ein Effekt auf das Proteinlevel von BMAL1 verzeichnet werden (vgl. Abb. 4.6 B). Die Behandlung von Zellen mit 25 nM siRNA gegen *Trap1* war zudem hoch zytotoxisch und führte innerhalb kürzester Zeit zum Absterben der Zellen.



**Abbildung 4.6: Analyse der BMAL1-Stabilität nach *Knock-down* von HSP90-Isoformen**

(A) HSP90, BMAL1 und U2AF65 Proteinlevel wurden nach Transfektion von NIH3T3-Fibroblasten mit 10 oder 25 nM *non-targeting* siRNA oder siRNAs gegen *Bmal1* oder *Hsp90aa1/Hsp90ab1* mittels *Western Blotting* analysiert. (B) Analyse der Proteinlevel von HSP90, BMAL1 und U2AF65 nach Transfektion der NIH3T3-Zellen mit siRNA gegen *Bmal1*, *Hsp90aa1/Hsp90ab1*, *Grp94* oder *Trap1*. (C) Quantifizierung der BMAL1-Proteinlevel nach *Knock-down* von *Bmal1* oder *Hsp90aa1/Hsp90ab1* mit 25 nM (n=3), normalisiert auf die Expression von U2AF65. Pfeile kennzeichnen spezifische Proteinbanden, während Sterne unspezifische Banden, detektiert durch den anti-BMAL1 Antikörper, markieren. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. \* p<0,05; \*\* p<0,005

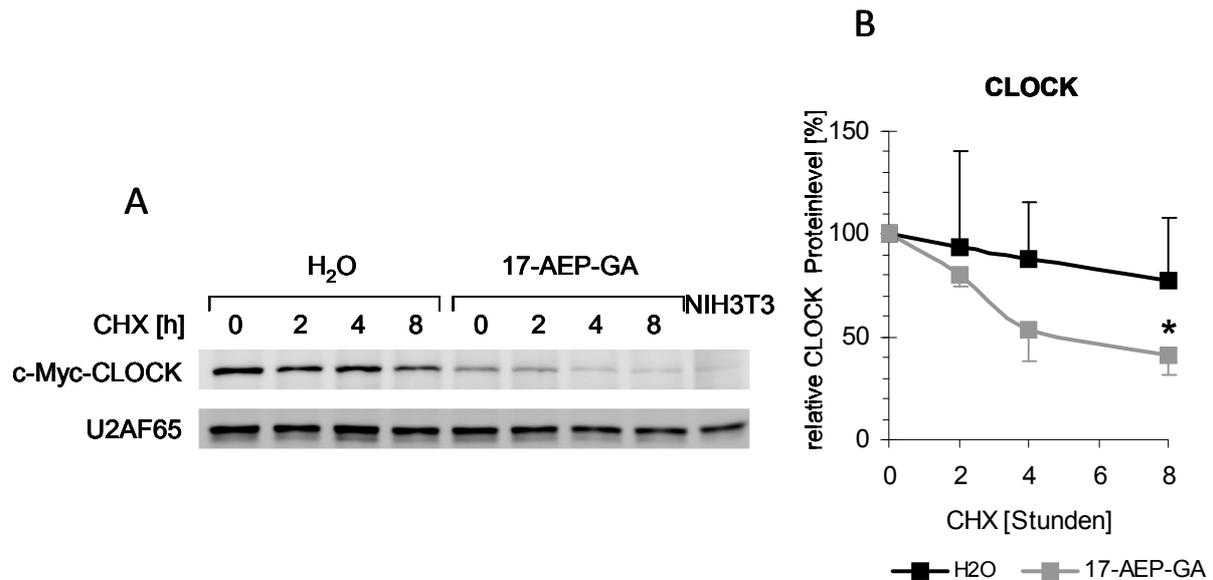
Die Analysen in Abbildung 4.6 weisen darauf hin, dass die Herunterregulierung der im Endoplasmatischen Reticulum lokalisierten HSP90-Isoform GRP94 und die der mitochondrialen Form TRAP1 keinerlei Effekt auf das Proteinlevel von BMAL1 hat, während die zytosmatischen Isoformen HSP90 $\alpha$  und/oder HSP90 $\beta$  an der Stabilisierung des Proteins BMAL1 beteiligt sind.

#### 4.1.4 Beeinträchtigung der Halbwertszeit des Proteins CLOCK durch HSP90-Inhibition

Zu den Mitgliedern des positiv regulierenden Arms der zirkadianen Rückkopplungsschleife gehört neben BMAL1 auch das Protein CLOCK. Die Interaktion zwischen CLOCK und BMAL1, die zusammen ein Heterodimer bilden, ermöglicht die Translokation von CLOCK aus dem Zytoplasma in den Nukleus. Darüber hinaus unterliegt das Heterodimer aus CLOCK und BMAL1 einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen, wie zum Beispiel der Phosphorylierung, die unter anderem zur proteasomalen Degradation des Heterodimers führen (vgl. Kapitel 1.1.3.1). Eine Beeinflussung der Stabilität, Regulation und Modifikation von BMAL1 könnte aus diesem Grund zu einer möglichen Beeinflussung der Stabilität seines Interaktionspartners CLOCK führen.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden in den folgenden Analysen NIH3T3-Zellen, die stabil c-Myc-gekoppeltes CLOCK exprimierten, für 24 Stunden mit 0,8  $\mu$ M 17-AEP-GA oder dem Lösungsmittel Wasser behandelt und anschließend die Proteintranslation durch CHX für bis zu 8 Stunden inhibiert. Die c-Myc-CLOCK Proteinlevel wurden durch *Immunoblotting* analysiert (vgl. Abb. 4.7 A). 17-AEP-GA-behandelte Zellen zeigten eine deutlich kürzere CLOCK-Halbwertszeit als unbehandelte Kontrollen. Nach 8-stündiger Inhibition der Proteinsynthese durch CHX wiesen die mit 17-AEP-GA behandelten Zellen eine Reduktion ihres c-Myc-CLOCK Proteinlevels um ca. 60% im Vergleich zur Ausgangsmenge auf, während die relative CLOCK Proteinmenge in unbehandelten Zellen noch bei über 70% lag (vgl. Abb. 4.7 B).

Diese Ergebnisse belegen, dass die Inhibition von HSP90 durch das Geldanamycin-Derivat 17-AEP-GA nicht nur das Proteinlevel und die Halbwertszeit von BMAL1 reduziert, sondern ebenfalls die Proteinstabilität seines Interaktionspartners CLOCK beeinträchtigt.



**Abbildung 4.7: Kinetik der Proteinstabilität von c-Myc-CLOCK in NIH3T3-Zellen**

(A) NIH3T3-Zellen, die stabil c-Myc-CLOCK exprimieren, wurden für 2, 4 und 8 Stunden mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) nach 24-stündiger Inkubation mit H<sub>2</sub>O oder 0,8 µM 17-AEP-GA behandelt. Die Proteinlevels von c-Myc-CLOCK wurden durch einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten anti-c-Myc Antikörper immunologisch nachgewiesen. Das Protein U2AF65 (anti-U2AF65 Antikörper) dient als Kontrolle für gleichmäßige Proteinbeladung. NIH3T3-Zellen, die kein c-Myc-CLOCK exprimieren, dienen als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindung (Spur 9). (B) Quantifizierung der c-Myc-CLOCK Proteinlevel mit (grau) und ohne (schwarz) Behandlung von 17-AEP-GA aus, normalisiert auf den zugehörigen 0h CHX-Wert (n=3). Sterne über den grauen Datenpunkten beziehen sich auf die Signifikanzlevel zwischen 17-AEP-GA und H<sub>2</sub>O. p<0,05 (zweiseitiger T-Test)

#### 4.1.5 Untersuchung der Interaktion von HSP90 mit den Uhrproteinen BMAL1 und CLOCK

Da die vorangegangenen Ergebnisse hervorheben, dass die Hemmung von HSP90 durch 17-AEP-GA zu einer Destabilisierung der Proteine BMAL1 und CLOCK führt, warf dies die Frage auf, ob HSP90 durch direkte Interaktion mit BMAL1 und/oder CLOCK oder durch einen indirekten Signalweg zur Stabilisierung dieser Uhrproteine führt.

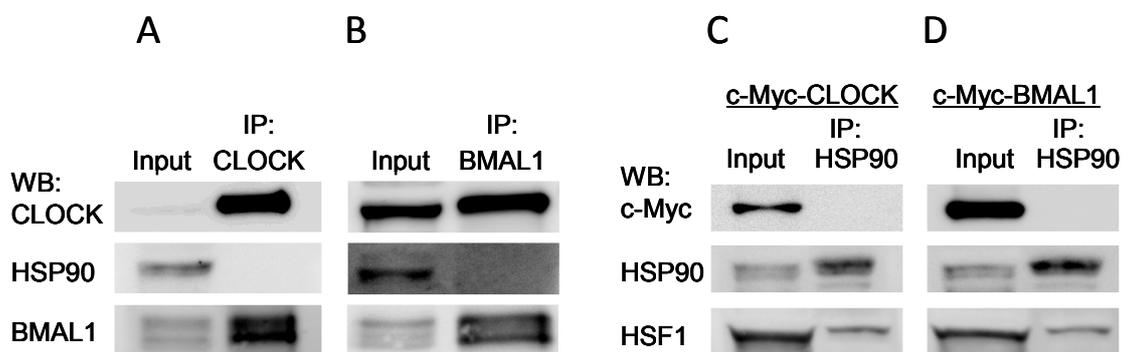
Um eine direkte Bindung zwischen HSP90, BMAL1 und CLOCK zu untersuchen, wurden Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) dieser Proteine durchgeführt. Für die Aufreinigung von HSP90-enthaltenden Komplexen dienten Proteinextrakte aus c-Myc-CLOCK oder c-Myc-BMAL1 exprimierenden NIH3T3-Zellen. CLOCK und seine interagierenden Proteine wurden aus c-Myc-CLOCK-NIH3T3 Proteinextrakten isoliert. BMAL1-enthaltende Proteinkomplexe wurden aus nukleären Extrakten von Mausleberzellen aufgereinigt, da BMAL1 in diesen Extrakten

stark angereichert vorlag und möglicherweise nur aktives, nukleär lokalisiertes BMAL1 mit HSP90 interagiert.

Die Analyse der isolierten Proteinkomplexe wurde mittels *Western Blotting* durchgeführt. Als Positivkontrolle in der Aufreinigung von CLOCK oder BMAL1 diente jeweils der andere Interaktionspartner des Heterodimers (vgl. Abb. 4.8 A und B), während HSF1 als Nachweis der erfolgreichen Co-IP von HSP90 verwendet wurde (vgl. Abb. 4.8 C und D).

Weder in der Aufreinigung von CLOCK aus Mausfibroblasten, noch in der Immunpräzipitation von BMAL1 aus Mauseberextrakten konnte HSP90 als interagierendes Protein isoliert werden (Abb. 4.8 A und B). Die Isolation von HSP90 aus c-Myc-CLOCK oder c-Myc-BMAL1 exprimierenden Zellen wies ebenfalls keinerlei Bindung von HSP90 an BMAL1 oder CLOCK nach (Abb. 4.8 C und D).

Es muss daher die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass HSP90 nicht in direkter Interaktion mit den Uhrproteinen BMAL1 und CLOCK steht.



**Abbildung 4.8: Immunpräzipitation von CLOCK-, BMAL1- und HSP90-enthaltenden Proteinkomplexen**

Immunpräzipitation von CLOCK aus c-Myc-CLOCK exprimierenden NIH3T3-Zellen (A), BMAL1 aus nukleären Mauseberextrakten (B) oder HSP90 aus c-Myc-CLOCK (C) oder c-Myc-BMAL1 (D) exprimierenden NIH3T3-Zellen. Proteine wurden mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. In der Aufreinigung von CLOCK oder BMAL1 dienten die Proteine gegenseitig als Positivkontrolle. HSF1 wurde als Positivkontrolle in der IP von HSP90 verwendet.

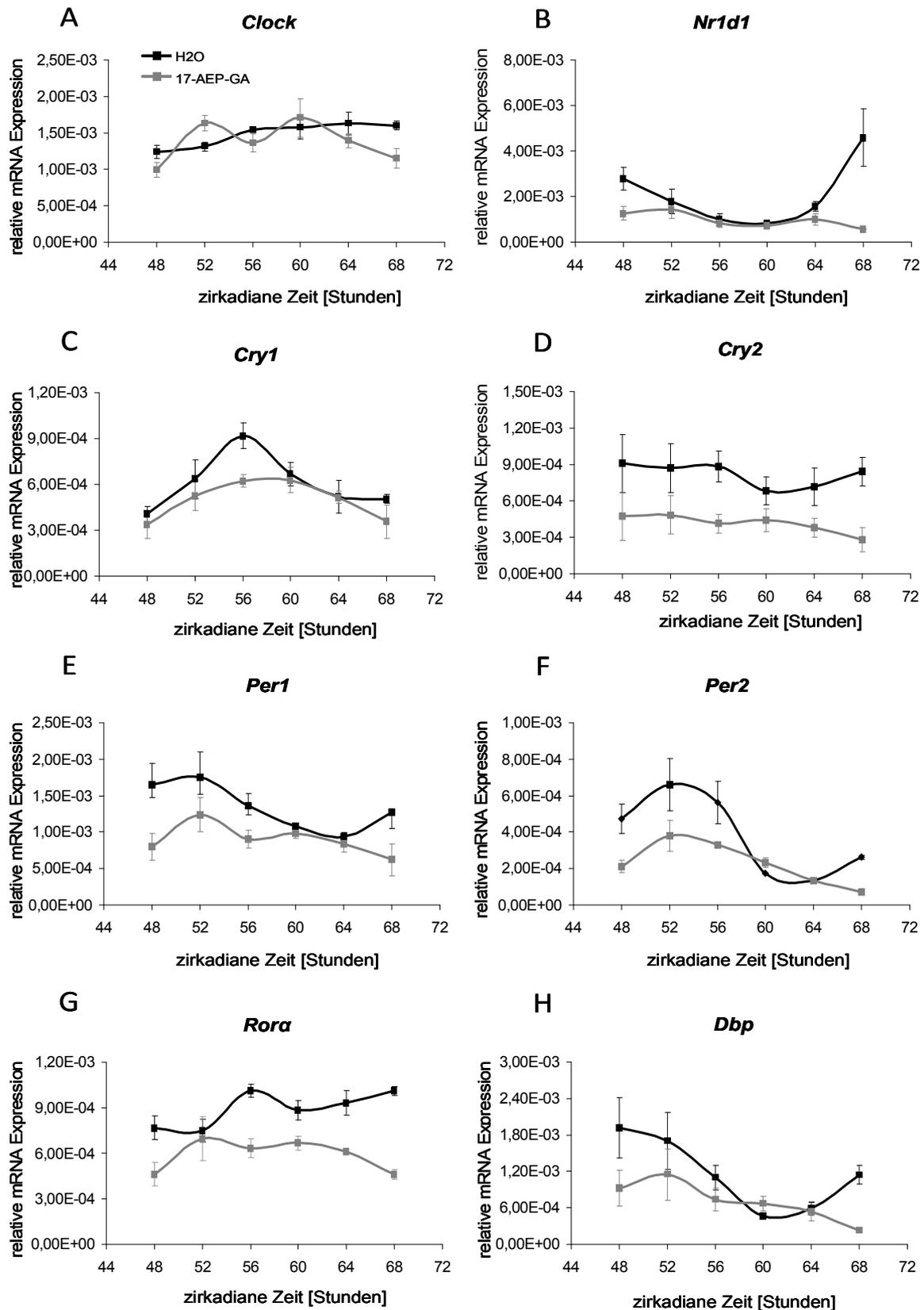
#### 4.1.6 Analyse der Expression von BMAL1/CLOCK-Zielgenen nach HSP90-Inhibition

Da sowohl die Proteinlevel von BMAL1 als auch CLOCK durch die Hemmung von HSP90 durch das Geldanamycin-Derivat 17-AEP-GA beeinflusst werden, stellte sich die Frage, inwieweit der Effekt dieser Inhibition Einfluss auf die Expression von CLOCK/BMAL1 Zielgenen nahm.

Für die Analyse dieser Fragestellung wurden NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen 3 Tage mit 0,8  $\mu$ M 17-AEP-GA behandelt und anschließend synchronisiert. Nach der Synchronisierung erfolgte eine weitere Inkubation mit 17-AEP-GA für 48 Stunden. Um einen vollständigen zirkadianen Zyklus abdecken zu können, wurden die Zellen anschließend alle 4 Stunden über einen zirkadianen Zyklus geerntet, ihre mRNA isoliert und mit Hilfe von quantitativer *Real-Time*-PCR ausgewertet.

Die Analyse der mRNA-Expressionen erbrachte, dass die nicht-zirkadiane und nicht direkt von BMAL1/CLOCK aktivierte mRNA Expression von *Clock* durch die Behandlung mit 17-AEP-GA unverändert blieb (Abb. 4.9 A), während die direkt durch CLOCK/BMAL1-regulierten Gene *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per2*, *Rora*, *Nr1d1* und *Dbp* einen deutlichen Effekt auf ihre mRNA-Expression aufwiesen. Die mRNA-Expressionslevel der zirkadianen Maxima dieser Gene wurde durch die Hemmung von HSP90 erheblich verringert (vgl. Abb. 4.9 B-H). Während die maximale Expression von *Per2* an CT52 (CT=circadian time; zirkadiane Zeit) durch 17-AEP-GA um etwa die Hälfte reduziert wurde (Abb. 4.9 F), konnte bei der maximalen mRNA-Expression des Gens *Nr1d1* an CT68 eine 8-fache Reduktion verzeichnet werden (Abb. 4.9 B). Die Mitglieder des molekularen *feedback loops* *Cry1*, *Cry2* und *Per1*, der *Bmal1*-Aktivator der zweiten Rückkopplungsschleife *Rora*, sowie das *clock output*-Gen *Dbp* wiesen ebenfalls eine deutliche Verringerung ihrer mRNA-Expressionslevel durch die Behandlung mit 17-AEP-GA auf (vgl. Abb. 4.9 C, D, E, G, H).

Diese Ergebnisse belegen, dass die Inhibition von HSP90 durch 17-AEP-GA Einfluss auf die Expression von BMAL1/CLOCK-regulierten Genen nimmt.



**Abbildung 4.9: Zirkadiane mRNA-Expression von Uhrgenen nach 17-AEP-GA Inkubation**

Analyse der mRNA-Expression der zirkadianen Uhrgene *Clock* (A), *Nr1d1* (B), *Cry1* (C), *Cry2* (D), *Per1* (E), *Per2* (F), *Rora* (G) und *Dbp* (H) in NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit (grau) und ohne (schwarz) 0,8  $\mu$ M 17-AEP-GA (n=2), normalisiert auf die Expression des *Housekeepers Eef1a*. Die Zellen wurden nach 3-tägiger 17-AEP-GA Inkubation synchronisiert und nach 48 Stunden über 20 Stunden alle 4 Stunden geerntet. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

#### 4.1.7 Untersuchung des Effekts der Inhibition von HSP90 auf die tageszeitabhängige Toxizität von Cyclophosphamid in Mäusen

Da Geldanamycin-Derivate in der Behandlung humaner maligner Erkrankungen eingesetzt werden, war es im Folgenden von Interesse zu analysieren, ob es durch die Inhibition von HSP90 durch Geldanamycin auch im Tiermodell zur Beeinflussung von Prozessen kommt, die mit der zirkadianen Uhr im Zusammenhang stehen.

Für diese Untersuchung wurde ein etabliertes Mausmodell der Chronotoxizität verwendet, in welchem Versuchstiere in tageszeitabhängiger Weise eine verstärkte Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Cyclophosphamid (CP) aufweisen (Gorbacheva *et al.*, 2005). Gorbacheva *et al.* konnten 2005 zeigen, dass die Toxizität von Cyclophosphamid vom funktionellen Status des Heterodimers BMAL1/CLOCK abhängig ist. CLOCK- oder BMAL1-defiziente Mäuse reagierten hypersensitiv auf die Behandlung mit Cyclophosphamid im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen, während die Deletion von CRY1 und CRY2, die die CLOCK/BMAL1-Aktivität hemmen, zu einer erhöhten Resistenz der Mäuse gegen das Chemotherapeutikum führte.

Aus diesem Grund sollte die folgende Untersuchung aufzeigen, ob die Inhibition von HSP90 durch das Geldanamycin-Derivat 17-DMAG das zirkadiane Toxizitätsprofil von Cyclophosphamid modulieren kann. 17-DMAG wurde verwendet, da bereits Daten über die Zytotoxizität dieses Derivates in Mäusen vorhanden waren (Glaze *et al.*, 2005).

Die erste Analyse bestand in der Ermittlung der maximal tolerierbaren Dosis (MTD) von 17-DMAG. Mäuse wurden über 7 Tage mit Konzentrationen zwischen 5 und 40 mg/kg Körpergewicht 17-DMAG oder dem Lösungsmittel PBS durch intraperitoneale Injektion an ZT4 (ZT=Zeitgeber-Zeit) behandelt und der Verlust des Körpergewichtes über 14 Tage dokumentiert. Bis zu einer Konzentration von 20 mg/kg konnte kein signifikanter Gewichtsverlust beobachtet werden. Mäuse die mit einer 17-DMAG Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht behandelt worden waren, verloren jedoch bis zu 5% ihres Körpergewichtes nach 7 bis 9 Tagen (vgl. Abb. 4.10 A).

Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob der durch 17-DMAG vermittelte Gewichtsverlust der Mäuse vom zirkadianen Zeitpunkt der Behandlung abhängig war. Im Folgenden wurde deshalb der Effekt der Behandlung der Mäuse mit 17-DMAG an ZT4 (Lichtphase) mit dem an ZT16 (Dunkelphase) verglichen. Die Behandlung der Mäuse mit 17-DMAG an ZT4 führte im

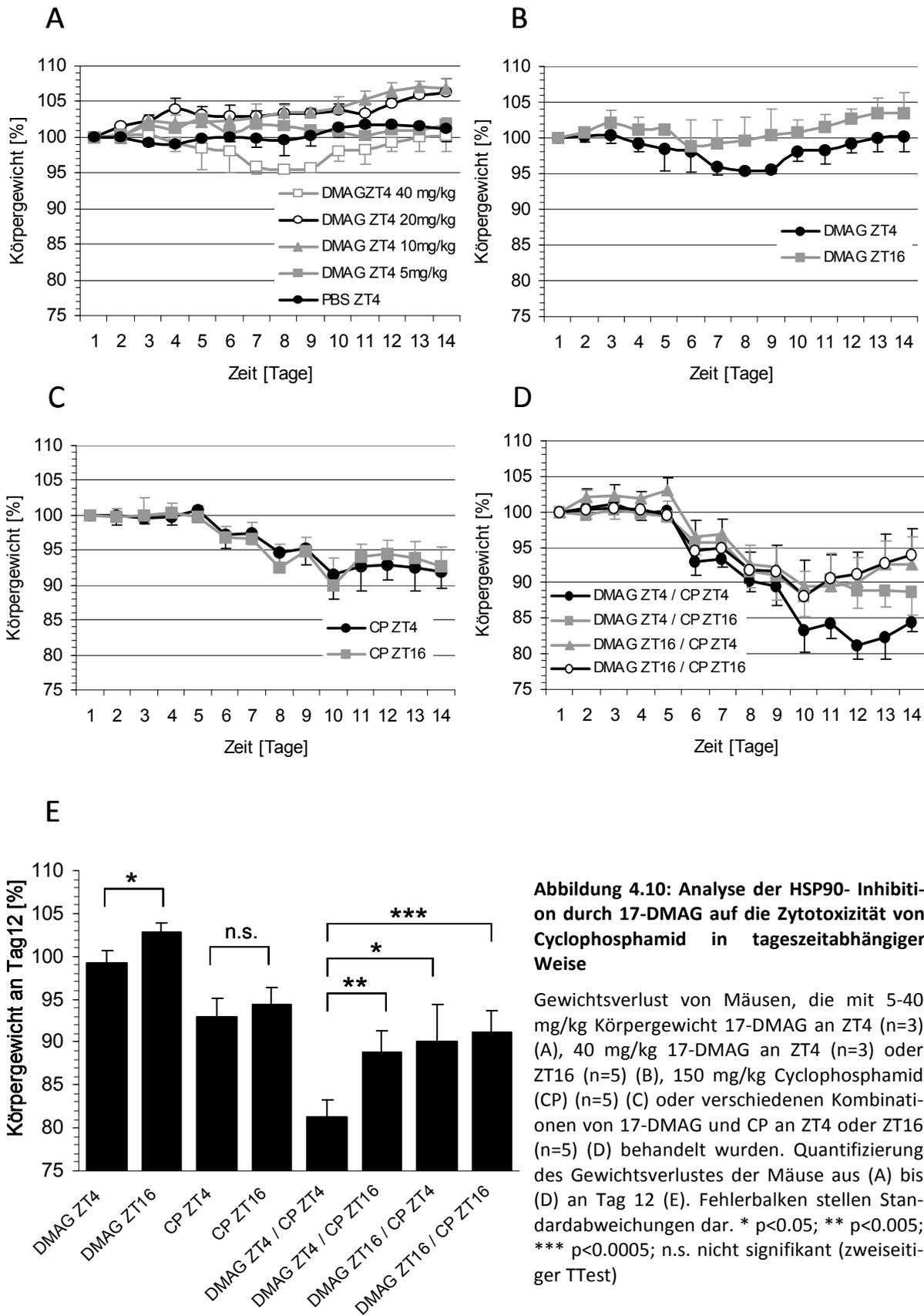
Vergleich zu Mäusen, die an ZT16 17-DMAG Injektionen erhalten hatten, zu einem signifikanten Gewichtsverlust (vgl. Abb. 4.10 B und E).

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung von 17-DMAG auf das Toxizitätsprofil von Cyclophosphamid untersucht. Den Versuchstieren wurde zusätzlich zur 7-tägigen Behandlung mit 17-DMAG, an Tag 5, 7 und 9 CP injiziert, da in diesem Bereich der stärkste Effekt von 17-DMAG auf das Körpergewicht der Versuchstiere zu verzeichnen war. 17-DMAG und CP wurden entweder gemeinsam an ZT4 oder ZT16 oder jeweils 12 Stunden zeitversetzt verabreicht (Abb. 4.10 D).

Die Behandlung mit CP allein (150 mg/kg) führte zu einem Gewichtsverlust von fast 10% an Tag 10, jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Injektion an ZT4 oder ZT16 festgestellt werden (vgl. Abb. 4.10 C). Dieses Ergebnis steht im klaren Gegensatz zu den Resultaten, die durch Gorbacheva *et al.* 2005 beschrieben worden waren. In den von ihnen durchgeführten Experimenten führte die Behandlung mit CP an ZT2 oder ZT6 zu einem verstärkten Gewichtsverlust und einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate im Vergleich zu Mäusen, die an ZT10-14 behandelt worden waren.

Die simultane Verabreichung von 17-DMAG und CP an ZT4 resultierte jedoch in einer signifikanten Gewichtsabnahme von durchschnittlich 20% an Tag 12 im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen. Der durch CP hervorgerufene Gewichtsverlust an ZT4 (vgl. Abb. 4.10 C) wurde durch die Verabreichung von 17-DMAG an ZT16 nicht verstärkt. Die Kombination aus 17-DMAG an ZT4 und CP an ZT16 führte ebenfalls zu keinem signifikant stärkeren Gewichtsverlust an Tag 12 (Abb. 4.10 D und E).

Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass die Inhibition von HSP90 durch Geldanamycin in tageszeitabhängiger Weise eine erhöhte Toxizität aufzuweisen scheint und das zirkadiane Toxizitätsprofil von Cyclophosphamid modulieren kann.



## 4.2 Analyse der Funktionalität von TAP-gekoppeltem HSF1 für die Generierung einer transgenen HSF1-TAP *Knock-in* Maus

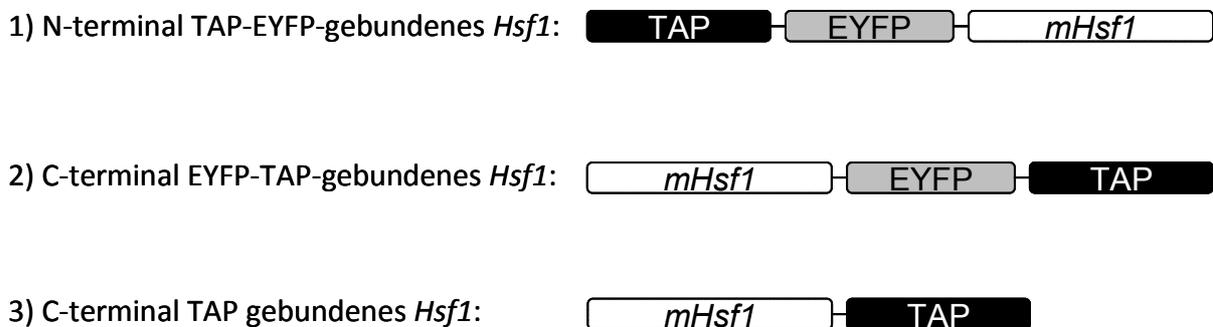
Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Grundlagen für ein Mausmodell zu schaffen, das für die Untersuchung der Verbindung zwischen HSF1 und dem zirkadianen Oszillator in Säugetieren verwendet werden sollte. Es sollte eine transgene Maus geschaffen werden, die eine TAP-fusionierte Variante von HSF1 exprimiert. Aus peripheren Organen dieser Maus sollen zukünftig zu unterschiedlichen Zeitpunkten HSF1-enhaltende Proteinkomplexe aufgereinigt werden und interagierende Proteine, sowie posttranslationale Modifikationen von HSF1 näher analysiert werden. Um zu gewährleisten, dass TAP-fusionierte HSF1 sich in Zellen wie endogenes HSF1 verhält, wurden in Experimenten dieser Arbeit stabile Zelllinien geschaffen, die TAP-gekoppelte Varianten von HSF1 exprimierten. Anschließend wurde untersucht, ob HSF1-TAP während einer Hitzeschock-Behandlung der Zellen in der Lage ist im Zellkern zu akkumulieren und Zielgene von HSF1 zu aktivieren. Durch erste Aufreinigungen von HSF1-TAP sollte die Bindung des TAP-fusionierten HSF1 an bekannte Interaktionspartner nachgewiesen werden.

### 4.2.1 Generierung transgener HSF1-TAP exprimierender Zelllinien

Um zu untersuchen, ob TAP-fusioniertes HSF1 sich hinsichtlich seiner transkriptionellen Aktivität und Regulation genauso wie endogenes HSF1 verhält, wurden *Hsf1*-defiziente (*Hsf1*<sup>-/-</sup>) Mausfibroblasten mit TAP-fusionierten Varianten von HSF1 stabil transfiziert. Da nicht klar war, ob eine Kopplung des TAP-Tag an den N- oder C-Terminus von HSF1 zu einer Veränderung der HSF1-Aktivität führen könnte, wurden beide HSF1-TAP Varianten generiert. Hierfür wurde durch Klonierungsschritte die cDNA von murinem *Hsf1* in Vektoren eingebracht, die die kodierende Sequenz des TAP-Tag, gebunden an EYFP enthielten (vgl. Kapitel 2.4.1; Abb. 4.11 (1) und (2)). EYFP ist die verstärkte Form des fluoreszierenden Proteins YFP, einer genetische Variation des GFP, welches ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* stammt (Shimomura *et al.*, 1962; Shimomura 2006). Der *Hsf1*-EYFP-TAP *open reading frame* (ORF) war über eine IRES Sequenz mit der Sequenz der Puromycin-N-Acetyltransferase, die eine Puromycin-Resistenz vermittelt, verbunden. Der Vektor pcDNA3.1-mHsf1-TAP-Hygro mit der

Sequenz für C-terminal gekoppeltes *Hsf1*-TAP (Abb. 4.11 (3)) und der entsprechende Kontrollvektor pcDNA3.1-TAP-Hygro wurden ebenfalls für die Generierung von stabilen Zelllinien verwendet. Die Expression der HSF1-Fusionsproteine unterlag der Kontrolle des CMV-Promotors.

Die beschriebenen Plasmide wurden in *Hsf1*<sup>-/-</sup> Zellen transfiziert und durch Selektion mit Puromycin oder Hygromycin B stabile Zellklone generiert. Die gelb-grüne EYFP-Fluoreszenz erleichterte die Isolation von *mHsf1*-EYFP-TAP-exprimierenden Zellklonen. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Vektoren ohne *Hsf1*-Gen stabil in die *Hsf1*-defizienten Zellen transfiziert.



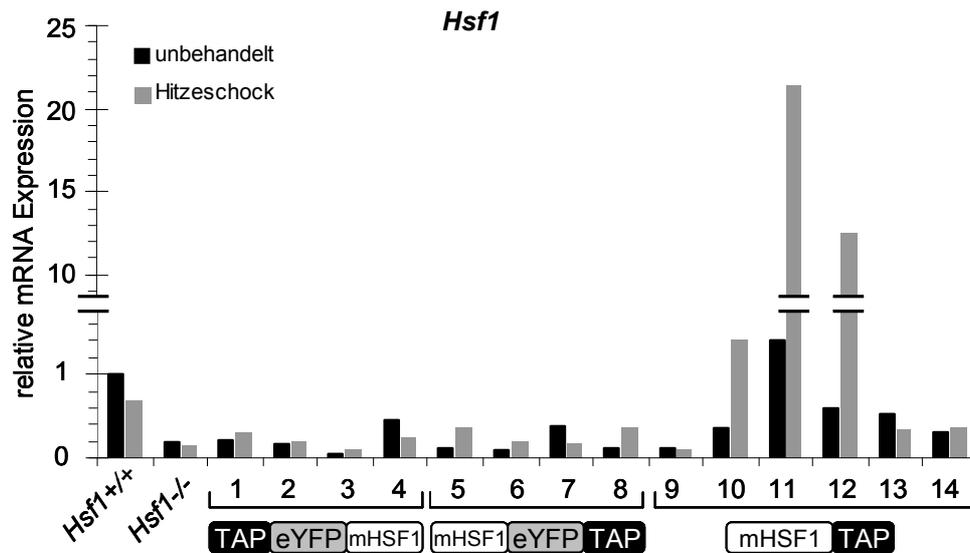
**Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der TAP-fusionierten *Hsf1* Varianten.**

Dargestellt sind die mit TAP oder TAP-EYFP gebundenen Varianten von *Hsf1*. N-terminale (1) oder C-terminale (2) Kopplung von murinem *Hsf1* (*mHsf1*) an einen TAP-Tag, der mit der Sequenz des Fluoreszenzproteins EYFP verbunden ist. (3) *mHsf1* ist C-terminal an die Sequenz des TAP-Tags gekoppelt.

#### 4.2.1.1 Analyse der Funktionalität von TAP-gekoppeltem HSF1

##### 4.2.1.1.1 Untersuchung der Expression von *Hsf1*-TAP in transgenen Zelllinien

Um nachzuweisen, dass TAP-fusioniertes HSF1 in Mausfibroblasten exprimiert wird, wurde die mRNA-Expression von *Hsf1* untersucht. Für diese Analyse wurde die mRNA transgener Zellklone vor und nach einstündiger Hitzeschock-Behandlung isoliert und die Expression von *Hsf1* analysiert. Als Positivkontrolle dienten Wildtyp-Mausfibroblasten (*Hsf1*<sup>+/+</sup>), während die *Hsf1*-defiziente Ausgangszelllinie (*Hsf1*<sup>-/-</sup>) als Negativkontrolle für die Analyse der *Hsf1*-Expression verwendet wurde.



**Abbildung 4.12: Analyse der mRNA Expression von *Hsf1* in stabil transfizierten Zelllinien**

Die relative mRNA Expression von *Hsf1* wurde in Wildtyp-Fibroblasten (*Hsf1*<sup>+/+</sup>), *Hsf1*-Knock-out Fibroblasten (*Hsf1*<sup>-/-</sup>) und transgenen *Hsf1*-Knock-out Fibroblasten (1-14) mittels qRT-PCR untersucht. Die mRNA Expression wurde auf das *Housekeeper*-Gen *Eef1a* normalisiert und auf die *Hsf1*-Expression in Wildtyp-Fibroblasten vor Hitzeschock bezogen. Unter den transgenen Zelllinien ist das jeweilige HSF1-Fusionsprotein skizziert. Durch waagerechte Linien wird die Unterbrechung der Y-Achse angezeigt.

Wie zu erwarten war, zeigte die mRNA-Expression von *Hsf1* in Wildtyp-Fibroblasten durch die Hitzeschock-Behandlung von 42°C für eine Stunde keine Veränderung (Abb. 4.12 *Hsf1*<sup>+/+</sup>). Es ist bekannt, dass die Expression von *Hsf1* unter proteotoxischem Stress nicht ansteigt, sondern HSF1 einer massiven Regulation durch posttranslationale Modifikationen und Bindung an Hitzeschock-Proteine unterliegt. Die Expression von *Hsf1* in *Knock-out* Maus-fibroblasten wies nicht detektierbare Mengen an *Hsf1* mRNA auf (vgl. Abb. 4.12 *Hsf1*<sup>-/-</sup>).

Die Analyse in Abb 4.12 zeigt, dass auch eine Vielzahl der transgenen Zelllinien *Hsf1* nur in sehr geringem Maße oder unter der Detektionsgrenze exprimierten. Die *Hsf1*-Expression in den Zelllinien 1, 2, 3, 6 und 9 entsprach der Expression in *Hsf1* *Knock-out* Fibroblasten. Bis auf die Zelllinien 10, 11 und 12 wiesen alle anderen stabil transfizierten Zellklone eine sehr geringe *Hsf1*-Expression auf, die deutlich unter der Expression der Wildtyp-Fibroblasten lag und diese zu maximal 60% erreichte. Die transgenen Zelllinien 10, 11 und 12, die C-terminal TAP-gekoppeltes HSF1 ohne EYFP exprimierten, zeigten unter Hitzeschock-Behandlung ein unerwartetes Expressionsmuster. Zelllinie 10 exprimierte *Hsf1* unter normalen Bedingungen sehr schwach und erreichte eine Wildtyp-entsprechende Expression dieses Gens erst nach Hitzeschock-Behandlung. Zelllinien 11 und 12 wiesen vor Hitzeschock eine *Hsf1*-Expression auf, die der in Wildtyp-Zellen sehr ähnlich war. Unter Stressbedingungen wurde *Hsf1* in die-

sen Zelllinien jedoch 10- bis 20-fach überexprimiert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Hitzeinduzierbarkeit des CMV-Promoters sein (Pshenichkin *et al.*, 2011).

#### 4.2.1.1.2 Analyse der subzellulären Lokalisation von TAP-fusioniertem HSF1

HSF1-Monomere liegen unter normalen Bedingungen inaktiv im Zytoplasma und Nukleus vor (Mercier *et al.*, 1999). Unterliegt die Zelle jedoch proteotoxischem Stress, wird HSF1 aktiviert, bildet Trimere und akkumuliert im Nukleus. Dort bindet es an Hitzeschock-Elemente in den Promotoren von Hitzeschock-Proteinen und führt zur Aktivierung ihrer Transkription (vgl. Kapitel 1.2.1.3).

Die sofortige Akkumulation von HSF1 im Nukleus unter Stressbedingungen stellt somit einen wichtigen Faktor in der Antwort der Zelle auf proteotoxische Ereignisse dar.

Um zu untersuchen, ob TAP-fusioniertes HSF1 sich wie das endogene Protein verhält, wurde im Folgenden durch indirekte Immunfluoreszenz-Analysen die subzelluläre Lokalisation von HSF1-TAP vor und nach Hitzeschock-Bedingungen untersucht und mit der von endogenem HSF1 verglichen.

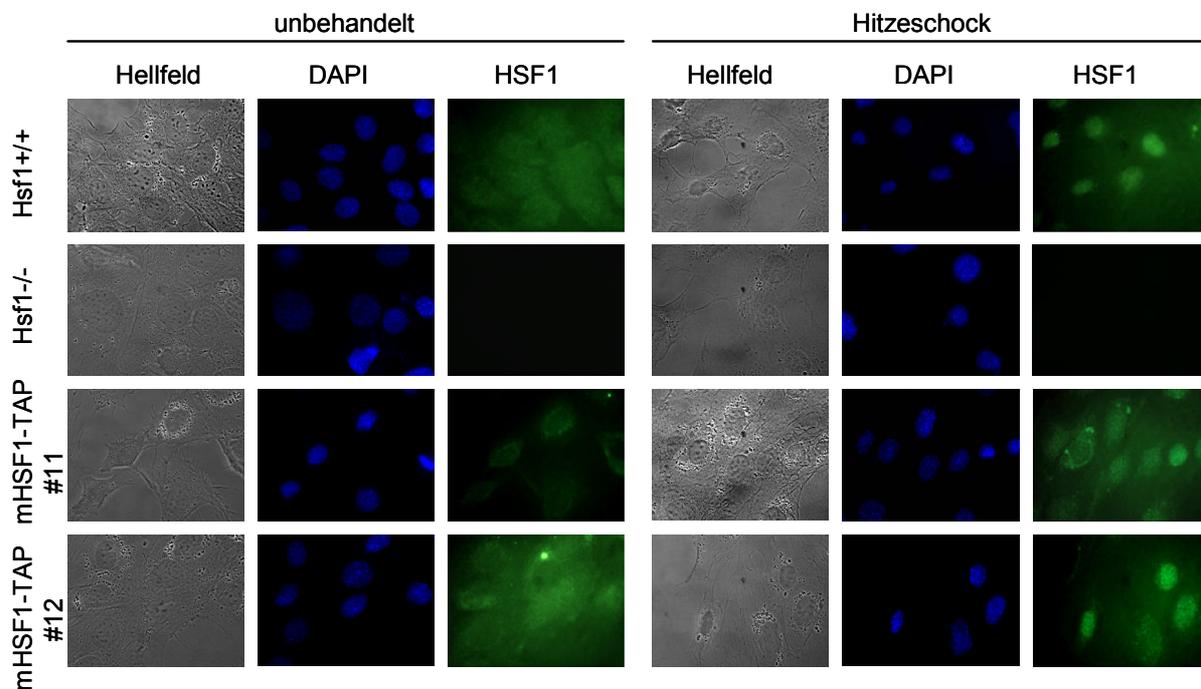
Für diese Analysen wurden die zuvor näher beschriebenen Zelllinien 11 und 12 verwendet, die eine C-terminal TAP-gekoppelte Variante von HSF1 exprimieren. Als Kontrolle dienten Wildtyp- und *Hsf1-Knock-out* Fibroblasten. Die Färbung von HSF1 wurde mit einem anti-HSF1 Antikörper, der anschließend durch die Bindung eines Cy2™-gekoppelten sekundären Antikörpers erkannt wurde, vorgenommen. Cy2™ emittiert nach Anregung durch blaues Licht bei einer Wellenlänge von 492 nm sichtbares Licht von 510 nm im grünwelligen Bereich. Um den Nukleus vom Zytoplasma eindeutig unterscheiden zu können, wurde die DNA durch DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) angefärbt. DAPI emittiert Licht im blauen Wellenlängenbereich von 461 nm.

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von HSF1 in Wildtyp-Zellen zeigt, dass HSF1 unter normalen Bedingungen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern diffus verteilt vorliegt (Abb. 4.13 Zeile 1, Spalte 3).

Wie in Abbildung 4.13 (Zeile 1, Spalte 6) durch die verstärkte grüne Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns deutlich zu sehen ist, führte die Hitzeschock-Behandlung der Wildtyp-Zellen zu einer Akkumulation von HSF1 im Nukleus. In *Hsf1-Knock-out* Zellen konnte hingegen weder

vor noch nach Hitzeschock-Behandlung ein HSF1-Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 4.13 *Hsf1*<sup>-/-</sup>).

Die Fluoreszenz-Analyse erbrachte außerdem, dass in beiden transgenen Zelllinien HSF1-TAP exprimiert wird. HSF1 lag, ähnlich wie in Wildtyp-Fibroblasten, auch in diesen Zellen unter normalen Bedingungen diffus im Zytoplasma und Nukleus verteilt vor (Abb. 4.13, Zeilen 3 und 4, Spalte 3). Wurden die Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt, führte dies zu einer Akkumulation der grünen Fluoreszenz im Nukleus (Abb. 4.13 HSF1-TAP #11 und #12). Dies weist darauf hin, dass auch TAP-fusioniertes HSF1 unter Stressbedingungen im Nukleus akkumulieren kann.



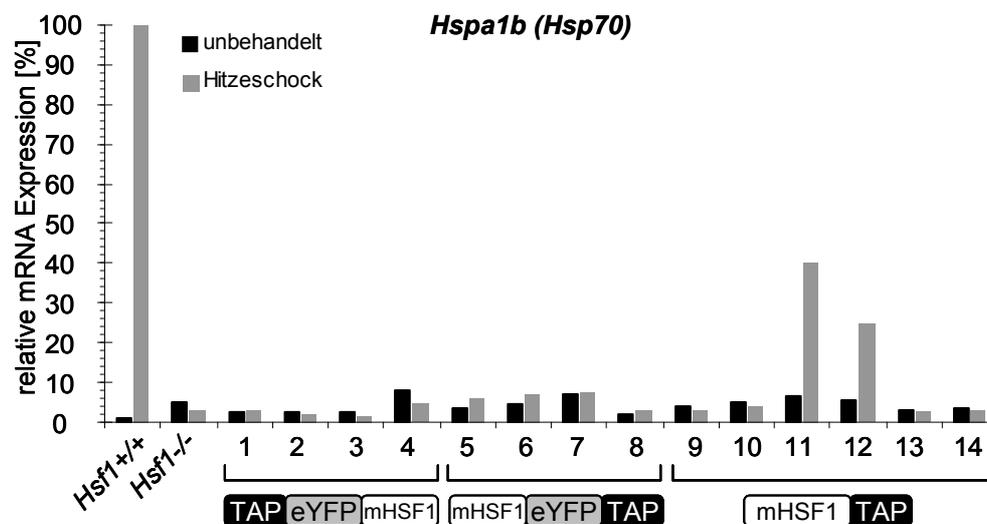
**Abbildung 4.13: Analyse der subzellulären Lokalisation von HSF1**

Die subzelluläre Lokalisation von HSF1 in Wildtyp (*Hsf1*<sup>+/+</sup>) Fibroblasten, *Hsf1*-Knock-out (*Hsf1*<sup>-/-</sup>) Zellen und HSF1-TAP exprimierenden Zellen (mHSF1-TAP #11 und #12) wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse mit einem Antikörper gegen HSF1 und einem sekundären Cy2<sup>™</sup>-gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Die DNA des Zellkerns wurde durch Färbung mit DAPI sichtbar gemacht. Hellfeld-Abbildungen zeigen die vollständigen Zellen im Durchlicht.

#### 4.2.1.1.3 Analyse der Expression des HSF1 Zielgens *Hspa1b* in transgenen Zelllinien

Um zu untersuchen, ob die zum Teil sehr schwache Expression von TAP-gekoppeltem HSF1 zu einer Aktivierung des HSF1-Zielgens *Hspa1b*, einem Mitglied der HSP70-Chaperonfamilie (Sistonen *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1999), unter Hitzeschock-Bedingungen führen kann, wurde die Expression der mRNA dieses *Hsf1*-Zielgens ebenfalls vor und nach Hitzeschock-Behandlung analysiert (vgl. Abb. 4.14). Wildtyp und *Knock-out* Fibroblasten dienten erneut als Kontrollen.

Da eine hohe Expression von *Hspa1b* in Wildtyp-Fibroblasten nach Hitzeschock die normale Reaktion der Zelle auf proteotoxischen Stress widerspiegelt, wurde die *Hspa1b* Expression aller untersuchten Zelllinien auf diese bezogen.



**Abbildung 4.14: Analyse der mRNA Expression von *Hspa1b* in stabil transfizierten Zelllinien**

Die relative mRNA Expression in Prozent von *Hspa1b* wurde in Wildtyp-Fibroblasten (*Hsf1*<sup>+/+</sup>), *Hsf1*-*Knock-out* Fibroblasten (*Hsf1*<sup>-/-</sup>) und transgenen *Hsf1*-*Knock-out* Fibroblasten (1-14) mittels qRT-PCR untersucht. Die mRNA Expression wurde auf das *Housekeeper*-Gen *Eef1a* normalisiert und auf die *Hspa1b*-Expression in Wildtyp-Fibroblasten nach Hitzeschock bezogen. Unter den transgenen Zelllinien ist das jeweilige HSF1-Fusionsprotein skizziert.

Wie zu erwarten war, konnten *Hsf1*-defiziente Zellen unter proteotoxischen Stressbedingungen das HSF1-Zielgen *Hspa1b* nicht aktivieren. Transgene Zelllinien, die mit N- oder C-terminal TAP-EYFP-fusioniertem *Hsf1* stabil transfiziert worden waren, wiesen ebenfalls keine Hochregulation der Expression von *Hspa1b* nach Hitzeschock-Behandlung auf. Lediglich

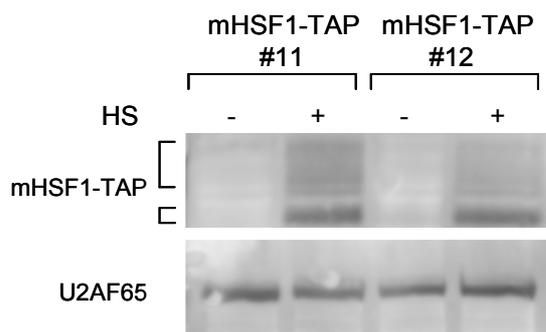
die Zelllinien 11 und 12, die das Fusionsprotein HSF1-TAP exprimieren, aktivierten *Hspa1b* unter Hitzeschock-Bedingungen. Ihre *Hspa1b*-Expression war jedoch um 60-75% schwächer als in Wildtyp-Fibroblasten.

Die durchgeführten Analysen in Abbildung 4.12 und 4.14 zeigen, dass die generierten transgenen Zelllinien eine sehr heterogene Expression von TAP-gekoppeltem HSF1 aufwiesen. Eine Vielzahl der Zellen exprimierte *Hsf1* nur sehr schwach oder gar nicht. Hierzu gehören vor allem Zelllinien die mit N- oder C-terminal TAP-EYFP-gekoppelten *Hsf1* transfiziert waren. Lediglich die Zelllinien 11 und 12, die *Hsf1* nach Hitzeschock-Behandlung verstärkt exprimierten, sind in der Lage die Transkription des HSF1-Zielgens *Hspa1b* zu aktivieren. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass sich HSF1-TAP in seinen wesentlichen Eigenschaften wie endogenes HSF1 verhält und das Fusionsprotein sich aufgrund der bisherigen Ergebnisse durchaus zur Herstellung einer transgenen Maus eignen sollte.

#### **4.2.1.1.4 Untersuchung der Zusammensetzung von HSF1-TAP-enthaltenden Protein-komplexen**

In der Regulation von HSF1 spielen nicht nur posttranslationale Modifikationen eine entscheidende Rolle, sondern ebenso die Bindung verschiedener Interaktionspartner, wie zum Beispiel Hitzeschock-Proteine.

Um zu analysieren, ob TAP-fusioniertes HSF1 in der Lage ist an bekannte Interaktionspartner zu binden, wurden erste TAP-Aufreinigungsversuche mit den Zelllinien 11 und 12 unternommen. Zuvor wurde die Expression von HSF1-TAP vor und nach Hitzeschock-Behandlung (HS) durch Western Blot Analysen nachgewiesen (vgl. Abb. 4.15). Die transgenen Zelllinien 11 und 12 zeigten vor der Hitzeschock-Behandlung keine nachweisbare Expression von HSF1-TAP. Erst eine einstündige Inkubation bei 42°C führte dazu, dass HSF1 detektierbar war. Das Bandenmuster lässt vermuten, dass verschiedene posttranslational modifizierte Varianten, wie zum Beispiel hyperphosphoryliertes HSF1 detektiert wurden. Posttranslationale Modifikationen führen zu veränderten Größen der zu detektierenden Proteine, so dass es folglich zu einer langsameren Migration dieser Proteine durch das SDS-Trenngel kommt, wodurch viele einzelne übereinander liegende Banden detektiert werden können (vgl. Abb. 4.15).



**Abbildung 4.15: Analyse der mHSF1-TAP Proteinexpression transgener Zelllinien**

Die HSF1-Expression der mHSF1-TAP-exprimierenden transgenen Zelllinien 11 und 12 wurde vor und nach Hitzeschock-Behandlung (HS) durch *Western Blotting* untersucht. TAP-fusioniertes HSF1 wurde mit Hilfe des anti-HSF1 Antikörpers nachgewiesen. U2AF65 dient als Kontrolle für gleichmäßige Proteinbeladung.

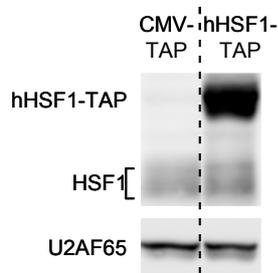
Da TAP-gekoppeltes HSF1 in beiden Zelllinien erst nach Hitzeschock-Behandlung nachweisbar war, wurden TAP-Tag Aufreinigungen nur mit Zellen durchgeführt, die eine Hitzeschock-Behandlung erhalten hatten. TAP-Tag Aufreinigungen bestehen aus einem Zwei-Schritt-System, das eine sehr spezifische Isolation von Proteinkomplexen gewährleistet (Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001).

Trotz der in Abbildung 4.15 nachgewiesenen Expression von HSF1-TAP, war es nicht möglich HSF1-enhaltende Proteinkomplexe in ausreichender Menge aus den Zelllinien 11 und 12 zu isolieren, um sie weiter analysieren zu können. Möglicherweise wurde HSF1-TAP zu schwach exprimiert und/oder die eingesetzten Ausgangsmengen waren zu gering.

Um jedoch trotzdem HSF1-enhaltende Proteinkomplexe untersuchen und die Bindung von HSF1-TAP an bekannte Interaktionspartner nachweisen zu können, wurden neue transgene Zelllinien generiert. Für diese Generierung wurden HEK293 Zellen verwendet. Es ist bekannt, dass diese humanen embryonalen Nierenzellen sehr leicht zu transfizieren sind, künstlich eingebrachte Gene schnell in ihr eigenes Genom einbauen und diese in hohem Maße exprimieren (Shein und Enders, 1962). Um transgene Zellen zu generieren, wurde durch Klonierungsschritte die cDNA des murinen *Hsf1* im Vektor pcDNA3.1-mHsf1-TAP-Hygro durch die cDNA des humanen *Hsf1* (*hHsf1*) ersetzt. HEK293 Zellen wurden mit dem *hHsf1*-enthaltenden Vektor oder dem Kontrollvektor pcDNA3.1-TAP-Hygro transfiziert und stabile Zellklone nach Inkubation mit Hygromycin B isoliert.

Für die HSF1-TAP Aufreinigung sollte eine transgene Zelllinie verwendet werden, die hHSF1-TAP in hohem Maße exprimiert. In Abbildung 4.16 ist die Expression von endogenem HSF1 und seiner TAP-fusionierte Variante der ausgewählten transgenen Zelllinie und ihrer zugehörigen Kontrollzelllinie dargestellt. Im Vergleich zu endogenem HSF1 wird die TAP-fusionierte

HSF1-Variante, die unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht, deutlich überexprimiert. In der CMV-TAP Kontrollzelllinie konnte ausschließlich endogenes HSF1 detektiert werden. Aufgrund ihrer hohen HSF1-TAP Expression erschienen Proteinextrakte dieser Zelllinie als ideales Ausgangsmaterial für Isolationen von HSF1-TAP-enthaltenden Proteinkomplexen.

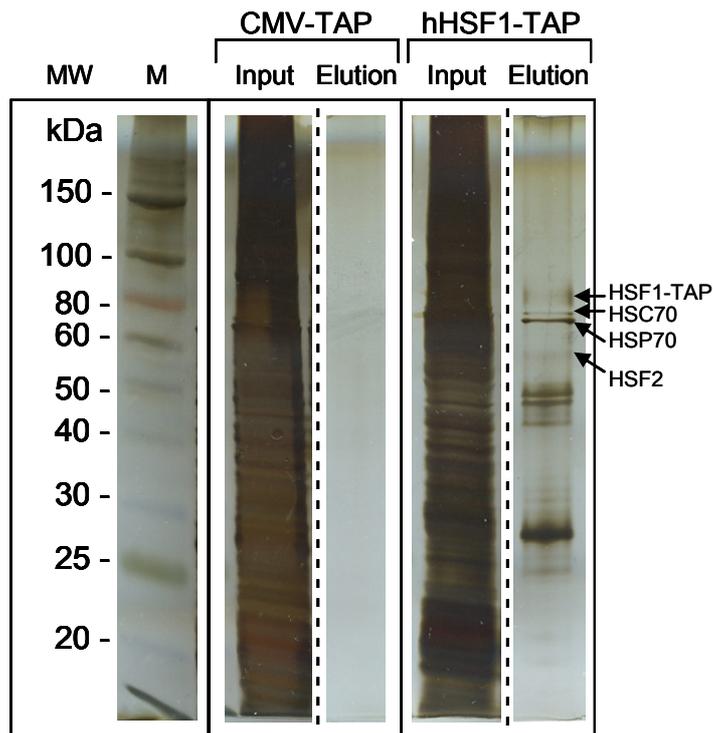


**Abbildung 4.16: Analyse der HSF1 Expression transgener Zelllinien**

Die HSF1-Expression der hHSF1-TAP-exprimierenden transgenen Zelllinie und der CMV-TAP Kontrollzelllinie wurde durch *Western Blotting* untersucht. TAP-fusioniertes und endogenes HSF1 wurde mit Hilfe des anti-HSF1 Antikörpers nachgewiesen. U2AF65 dient als Kontrolle für gleichmäßige Proteinbeladung.

Um TAP-Aufreinigungen HSF1-enthaltender Proteinkomplexe vorzunehmen, wurden die hHSF1-TAP- und die Kontroll-Zelllinie einem einstündigen Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Dieser führte zur Aktivierung von endogenem und TAP-gekoppeltem HSF1 und einer damit verbundenen Trimerisierung und Akkumulation an den Promotoren von Zielgenen im Nukleus. Um sowohl lösliches, als auch DNA-gebundenes HSF1-TAP isolieren zu können, wurden die lysierten Zellen nach der Hitzeschock-Behandlung einem DNA-Verdau mit DNase I unterzogen. DNase I ist eine Endonuklease, die DNA an Phosphodiesterbindungen benachbart zu Pyrimidin-Nukleotiden schneidet. Diese Fragmentierung der DNA erhöht die Effizienz der Isolation von DNA-gebundenem HSF1-TAP (Lambert *et al.*, 2009).

Um HSF1-bindene Proteine nach der HSF1-TAP Isolation analysieren zu können, wurden die Proteine des Ausgangsmaterials (Input) sowie die aufgereinigten Proteine (Elution) in einem 4-20% SDS-Gradientengel ihres Molekulargewichtes (MW) entsprechend elektrophoretisch aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Das repräsentative Ergebnis eines der drei durchgeführten Experimente ist in Abbildung 4.17 dargestellt.



**Abbildung 4.17: Isolation HSF1-TAP-enthaltender Proteinkomplexe aus transgenen HEK293 Zellen und gelelektrophoretische Analyse**

Proteinextrakte von CMV-TAP und HSF1-TAP exprimierenden Zellen wurden als Ausgangsmaterial für eine TAP-Tag Aufreinigung verwendet. Das Ausgangsmaterial (Input), sowie die isolierten Proteinkomplexe (Elution) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Silberfärbung analysiert. MW: Molekulargewicht; kDa: Kilo-dalton; M: Marker

Die Elution der TAP-Aufreinigung aus hHSF1-TAP exprimierenden Zellen zeigt eine Vielzahl von Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht, während in der Elution CMV-TAP exprimierender Zellen keine sichtbaren Banden zu detektieren waren. Durch die Isolation von TAP-fusioniertem HSF1 wurden offensichtlich HSF1-interagierende Proteine sehr spezifisch aufgereinigt.

Durch massenspektrometrische Analysen (MS; vgl. Tabelle 4.1) konnte die Bande bei ca. 80 kDa als humanes HSF1 identifiziert werden. Aufgrund der Größe kann davon ausgegangen werden, dass es sich um die TAP-gekoppelte Variante von HSF1 handelt, da endogenes HSF1 eine berechnete molekulare Masse von 54 kDa hat, durch posttranslationale Modifikationen jedoch in Analysen mit einer Größe von 70 kDa identifiziert werden kann. Durch das nach dem TEV-Verdau weiter an HSF1 verbleibende Calmodulin-Bindeprotein des TAP-Tag nimmt die molekulare Masse von HSF1 auf über 80 kDa zu. Die beiden bei ca. 70 kDa detektierten Banden wurden eindeutig als die HSF1-interagierenden Chaperone HSC70 und HSP70 identifiziert. HSF2, welches in der Lage ist mit HSF1 Heterotrimere zu bilden, konnte ebenfalls eindeutig bei einer Größe von ca. 60 kDa nachgewiesen werden.

Durch die Isolation von HSF1-enhaltenden Proteinkomplexen wurden nicht nur die zuvor erwähnten Proteine detektiert, sondern ebenfalls eine Reihe weiterer Proteine identifiziert. In Tabelle 4.1 sind Proteine aufgelistet, die in drei unabhängig voneinander durchgeführten HSF1-TAP Isolationen durch massenspektrometrische Analysen detektiert werden konnten. Zu den hier isolierten bekannten HSF1-Interaktionspartnern gehören zum Beispiel die Mitglieder der HSP70 Chaperonfamilie (Abravaya *et al.*, 1992; Nunes und Calderwood, 1995; Shi *et al.*, 1998, Ahn *et al.*, 2005; Havugimana *et al.*, 2012). Zusätzlich konnten die HSF1-interagierenden Proteine HSF2 (Loison *et al.*, 2006), der SWI/SNF-verwandte Matrix-assoziierte Aktin-abhängige Regulator der Chromatinunterfamilie B Mitglied 1 (SMARCB1) (Sullivan *et al.*, 2001) und HSF1 selbst in den durchgeführten Isolationen detektiert werden. Es ist außerdem bekannt, dass Mitglieder der Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) zusammen mit HSF1 in Stresskörperchen im Nukleus unter proteotoxischen Stressbedingungen lokalisiert sind (Weighardt *et al.*, 1999; Jolly *et al.*, 1999; Denegri *et al.*, 2001). Drei der Mitglieder dieser Familie, hnRNP A0, hnRNP U und hnRNP R, konnten zusammen mit HSF1-enhaltenden Komplexen aufgereinigt werden. Diese Proteine sind an Splicing-Mechanismen von mRNA beteiligt (Krecic und Swanson, 1999).

Zusätzlich zu diesen Proteinen konnten noch weitere Splicing-Faktoren identifiziert werden. Zu diesen Proteinen gehören das 100 kDa DNA-*pairing* Protein (SFPQ; Patton *et al.*, 1993), der AAR2 Splicing Faktor (AAR2; Gottschalk *et al.*, 2001), der Pre-mRNA-prozessierender Faktor 8 (PRP8; Luo *et al.*, 1999) und die beiden U5 snRNP (*small nuclear Ribonucleoprotein Particle*) Proteine 116 (EFTUD2; Fabrizio *et al.*, 1997) und 200 (snRNP200; Laggerbauer *et al.*, 1998). Die Isolation von HSF1-enhaltenden Komplexen erbrachte außerdem die Detektion des Faktors RuvB-like 1 (RUVBL1), der ATP-abhängigen DNA Helikase A (DHX9) und des HuR mRNA-Bindeprotein (ELAVL1). RUVBL1 gehört zu den DNA-bindenden Helikasen, die für die Entwindung und Stabilisierung von DNA verantwortlich sind (Jeronimo *et al.*, 2007). DHX9 ist hingegen eine RNA-Helikase, die für die Entwindung doppelsträngiger RNA benötigt wird (Zhang und Grosse, 1997), während ELAVL1 an der Bindung von mRNA beteiligt ist (Izquierdo, 2008; Mukherjee *et al.*, 2011). Diese Faktoren konnten bisher nicht als HSF1-Interaktionspartner oder Proteine nukleärer Stresskörperchen identifiziert werden.

**Tabelle 4.1: Zusammenfassung der MS-Ergebnisse der drei HSF1-TAP Aufreinigungen aus HEK293 Zellen**

Es wurden die Proteine aufgelistet, die massenspektrometrisch nach HSF1-TAP Aufreinigung detektiert wurden. Für alle Proteine sind die Funktion, das Molekulargewicht (MW), die Peptidhäufigkeit (P) und die prozentuale Sequenzabdeckung (%), mit der das Protein identifiziert wurde, dargestellt. Grau unterlegte Proteine wurden in mindestens zwei Experimente (Exp.) detektiert. Die Abkürzungen der Proteinnamen sind in Klammern hinter den identifizierten Proteinen aufgeführt.

Identifiziertes Protein	Funktion	MW (kDa)	Exp.1		Exp.2		Exp.3	
			P	%	P	%	P	%
100 kDa DNA- <i>pairing</i> Protein (SFPQ)	Splicing	66	2	4,3	/	/	/	/
AAR2 Splicing-Faktor (AAR2)	Splicing	45	/	/	2	5,8	4	16
ATP-abhängige DNA-Helikase A (DHX9)	Helikase	141	2	2	/	/	/	/
heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein A0 (hnRNPA0)	Splicing	31	/	/	2	13	/	/
heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein R (hnRNPR)	Splicing	68	3	5,4	/	/	/	/
heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein U (hnRNPU)	Splicing	89	/	/	7	11	/	/
Hitzeschock 105kDa/110kDa Protein 1 (HSP105)	Chaperon	98	14	20	/	/	19	25
Hitzeschock-70kDa Protein 1A/1B (HSPA1A/B)	Chaperon	70	/	/	40	74	36	73
Hitzeschock-70kDa Protein 1L (HSPA1L)	Chaperon	70	3	34	/	/	/	/
Hitzeschock-70kDa Protein 2 (HSPA2)	Chaperon	70	/	/	1	13	2	20
Hitzeschock-70kDa Protein 4 (HSPA4)	Chaperon	94	/	/	/	/	20	30
Hitzeschock-70kDa Protein 5 (HSPA5)	Chaperon	72	/	/	16	36	18	39
Hitzeschock-70kDa Protein 8 (HSPA8, HSC70)	Chaperon	71	/	/	27	55	26	49
Hitzeschock-70kDa-verwandtes Protein 4 (HSPA4L)	Chaperon	95	9	9,9	/	/	12	23
Hitzeschock-Faktor 1 (HSF1)	Transkriptionsfaktor	54	/	/	27	50	28	50
Hitzeschock-Faktor 2 (HSF2)	Transkriptionsfaktor	58	7	21	7	11	8	18
HuR mRNA-Bindeprotein (ELAVL1)	Splicing	36	/	/	2	8,3	/	/
Mitochondriales Hitzeschock-75kDa Protein 9 (HSPA9)	Chaperon	74	17	28	15	28	26	43
Pre-mRNA-prozessierender Faktor 8 (PRP8)	Splicing	252	14	7,8	14	7,2	5	2,1

RuvB-like 1 (RUVBL1)	Helikase	50	3	7,7	/	/	/	/
SWI/SNF-verwandter Matrix-assoziierter Actin-abhängiger Regulator der Chromatinunterfamilie B Mitglied 1 (SMARCB1)	Chromatin-remodeling	47	2	6,3	/	/	/	/
U5 snRNP-116kDa Protein (EFTUD2)	Splicing	108	9	7	13	19	15	19
U5 snRNP-200kDa Protein (snRNP200)	Splicing	216	22	13	/	/	14	7,2

snRNP: kleines nukleäres Ribonukleoprotein; Poly(A): Polyadenylierung

Die Isolation HSF1-enhaltender Komplexe aus transgenen Zelllinien, die stabil TAP-fusioniertes HSF1 exprimieren, konnte zeigen, dass HSF1-TAP in der Lage ist an bekannte Interaktionspartner, wie zum Beispiel Hitzeschock-Proteine, zu binden. Es konnten außerdem Proteine identifiziert werden, die bislang nicht als Interaktionspartner von HSF1 bekannt waren.

Die vorangegangenen Ergebnisse belegen, dass TAP-gekoppeltes HSF1 in der Lage ist unter Hitzeschock-Bedingungen Homo- oder Heterotrimere zu bilden, im Kern zu akkumulieren (vgl. Abb. 4.13), die Transkription des Zielgens *Hspa1b* zu aktivieren (vgl. Abb. 4.14) und an bekannte Interaktionspartner zu binden (vgl. Abb. 4.17 und Tabelle 4.1). Dies lässt den Schluss zu, dass HSF1-TAP sich in seiner Regulation und transkriptionellen Aktivität nicht von endogenem HSF1 unterscheidet.

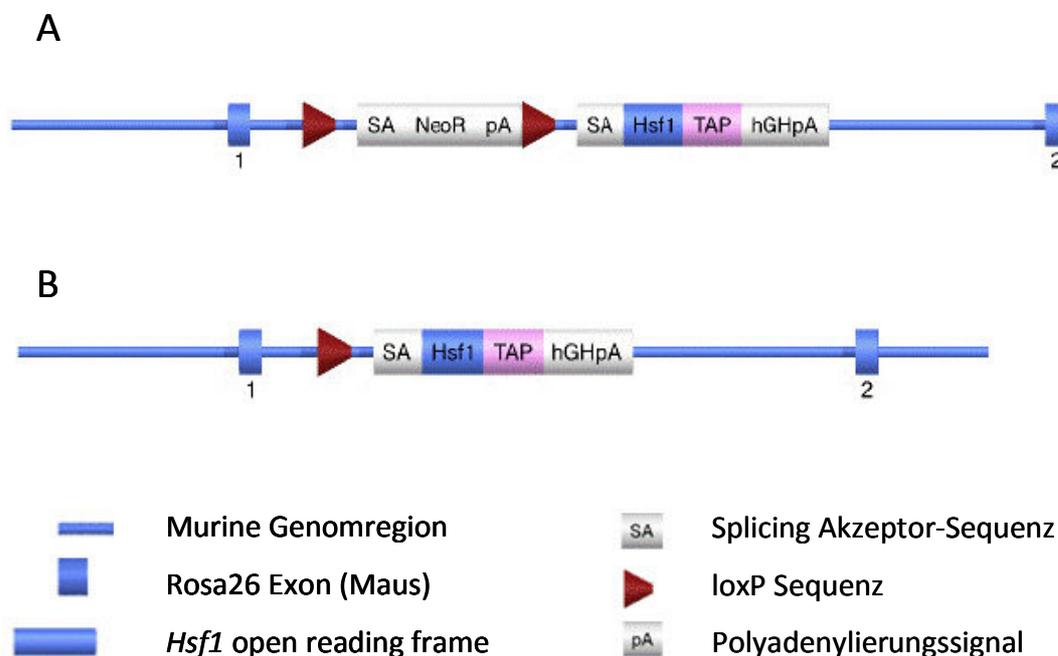
Für die Identifizierung der Signale, die in der zirkadianen Regulation von HSF1 eine Rolle spielen, konnte auf der Basis der gewonnenen Ergebnisse eine transgene Maus generiert werden, die TAP-fusioniertes HSF1 exprimiert. Die Generierung dieser transgenen Maus wurde von der Firma TaconicArtemis durchgeführt.

### 4.3 Generierung einer konditional *Hsf1*-TAP exprimierenden *Knock-in* Maus

Für die Generierung einer konditional HSF1-TAP exprimierenden Maus wurde die cDNA von murinem *Hsf1*, C-terminal fusioniert an die Sequenz des TAP-Tags, in Intron 1 des Rosa26-

Lokus auf Chromosom 6 von C57BL/6N Mäusen eingefügt. Die vor dem *Hsf1*-TAP liegende Neomycin-Kassette wurde von zwei loxP Sequenzen flankiert (Abb. 4.18 A). Eine konstitutive Expression von *Hsf1*-TAP wird durch Cre (*cyclization recombination*)-vermittelte Exzision der Sequenz der Neomycin-Kassette erreicht (vgl. Abb. 4.18 B). Hierfür war eine Verpaarung mit Mäusen nötig, die die Cre-Rekombinase exprimieren. Das Cre-Enzym ist in der Lage loxP-Sequenzen zu erkennen und die Sequenz herauszuschneiden, die sich zwischen den beiden loxP-Sequenzen befindet. Nach der Exzision der Neomycin-Kassette steuert der Rosa26 Promoter die Expression des TAP-gekoppelten *Hsf1*. Steht die Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, ermöglicht dies eine gezielte Expression von HSF1-TAP in einzelnen Geweben. Hierdurch kann in Mäusen mit genetischem *Hsf1*<sup>-/-</sup> Hintergrund eine gewebespezifische Komplementation des *Hsf1* Knock-outs durchgeführt werden.

Durch Kreuzungen wurde der *Hsf1*-TAP-enthaltende Lokus in heterozygot *Hsf1*-exprimierende (*Hsf1*<sup>+/-</sup>) Mäuse gebracht. Diese Mäuse besitzen nur ein Allel des endogenen *Hsf1*-Gens. Die Einbringung des *Hsf1*-TAP-Gens führte somit nicht zu einer erhöhten *Hsf1*-Gendosis in diesen Mäusen.



**Abbildung 4.18: Schematische Darstellung des *Hsf1*-TAP enthaltenden ROSA26-Lokus**

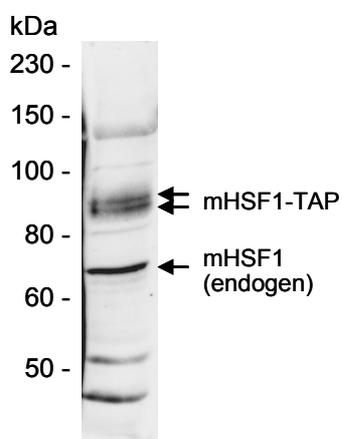
(A) Die Sequenz des TAP-gekoppelten murinen *Hsf1* wird durch eine Splicing Akzeptor-Sequenz (SA) und eine Sequenz, die Informationen für ein Polyadenylierungssignal enthält (hGHpA) im ROSA26-Lokus auf Chromosom 6 flankiert. *Upstream* dieser Sequenz liegt eine Sequenz-Kassette, deren Expression eine Neomycin-Resistenz (NeoR) vermittelt. Diese wird ebenfalls durch eine Splicing Akzeptor-Sequenz und das Gen für ein Polyadenylierungssignal, sowie durch 2 loxP Sequenzen flankiert. (B) Nach Rekombination durch das Cre-Enzym steht *Hsf1*-TAP unter direkter Kontrolle des ROSA26-Promotors.

### 4.3.1 Isolation HSF1-enthaltender Proteinkomplexe aus transgenen Mäusen

Um zu überprüfen, ob TAP-fusioniertes HSF1 in transgenen Mäusen nach der Exzision der Neomycin-Kassette exprimiert wird, wurden Proteinextrakte aus Lebern von Mäusen (*Hsf1+/+*) isoliert und die Expression von HSF1-TAP durch *Western Blotting* analysiert.

TAP-gekoppeltes HSF1, welches durch den TAP-Tag ca. 20 kDa größer ist als endogenes HSF1, konnte als Doppelbande bei ca. 90 kDa durch einen anti-HSF1 Antikörper nachgewiesen werden. Die hier detektierte Doppelbande wird sehr wahrscheinlich durch unterschiedliche posttranslationale Modifikationen von HSF1-TAP hervorgerufen (vgl. Abb. 4.19).

Endogenes HSF1 konnte als einzelne Bande bei ca. 70 kDa detektiert werden. Es wird zu ca. 30% schwächer exprimiert als TAP-fusioniertes HSF1. HSF1-TAP zeigt somit keine starke Überexpression im Vergleich zu endogenem HSF1, wenn nur ein Allel des *Hsf1-TAP* Gens vorhanden ist. Wird es im genetischen Hintergrund von *Hsf1-/-* Mäusen exprimiert, sollte es die Expression des fehlenden *Hsf1*-Gens ausgleichen können.



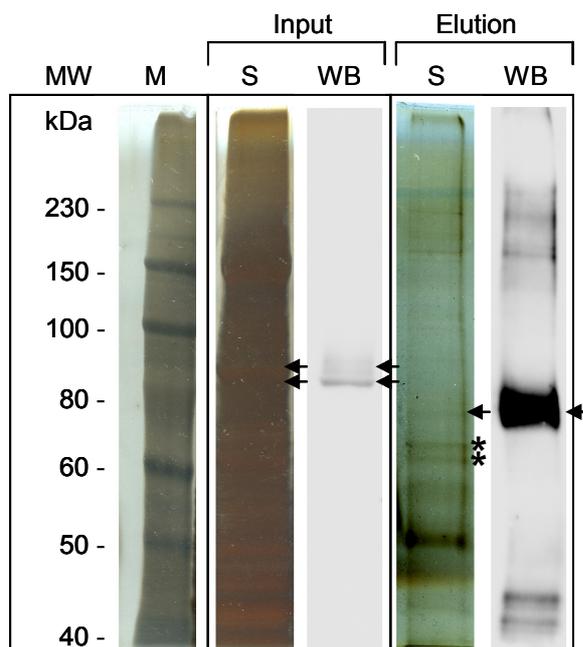
**Abbildung 4.19: Analyse der Expression von endogenem und TAP-fusioniertem HSF1 transgener Mäuse**

Für den Vergleich der Expressionsstärke von endogenem HSF1 und HSF1-TAP wurden Proteinextrakte aus Mausleber hergestellt und die Expression von HSF1 durch *Western Blotting* analysiert. Pfeile zeigen HSF1-Banden an, die spezifisch durch den anti-HSF1 Antikörper erkannt wurden. Die molekulare Masse der Proteine ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

Um nachweisen zu können, dass TAP-gekoppeltes HSF1 und interagierende Proteine spezifisch aus transgenen Mäusen isoliert werden können, wurde im Folgenden eine erste TAP-Tag Aufreinigung vorgenommen (vgl. Abb. 4.20). Für diese Isolation wurden Proteinextrakte aus Mausleber hergestellt. Um auch DNA-gebundenes HSF1 isolieren zu können, wurden die Extrakte zuvor mit DNase I inkubiert. Die Proteine des Ausgangsmaterials (Input), sowie die aufgereinigte HSF1-TAP Fraktion (Elution) wurden anschließend durch *Western Blotting* (WB) und Silberfärbung (S) des SDS-Gels analysiert. HSF1-TAP wurde spezifisch durch einen anti-

TAP Antikörper, der sowohl ungeschnittenes als auch TEV-verdautes TAP binden kann, detektiert.

TAP-fusioniertes HSF1 (durch Pfeile markiert) konnte vor der Aufreinigung auf einer Höhe von ca. 90 kDa im Silbergel und Western Blot nachgewiesen werden. Nach der Isolation HSF1-enhaltender Komplexe konnte HSF1-TAP ebenfalls als Bande im Silbergel (Pfeil) detektiert werden. Die Spezifität dieser Bande wurde durch Western Blot Analysen bestätigt.



**Abbildung 4.20: Isolation HSF1-TAP-enthaltender Proteinkomplexe aus Mausleber und gelelektrophoretische Analyse**

Proteinextrakte von CMV-TAP und HSF1-TAP exprimierenden Zellen wurden als Ausgangsmaterial für eine TAP-Tag Aufreinigung verwendet. Das Ausgangsmaterial (Input), sowie die isolierten Proteinkomplexe (Elution) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Silberfärbung (S) und Western Blot (WB) analysiert. MW: Molekulargewicht; kDa: Kilodalton; M: Marker

HSF1-TAP wies nach der Elution eine Größe von ca. 80 kDa auf. Diese Größenreduktion von ca. 10 kDa resultiert aus dem Fehlen des Protein A-Teils des TAP-Tags, welches durch den Verdau mit der TEV-Protease von HSF1-TAP abgespalten wurde.

Die Elutionsfraktion des Silbergels zeigt neben HSF1-TAP noch weitere Banden. Die beiden mit Sternchen markierten Banden auf der Höhe von ca. 70 kDa könnten HSC70 und HSP70 darstellen, die auch schon in vorherigen Isolationen spezifisch nachgewiesen werden konnten.

Die Analysen in Abbildung 4.19 und 4.20 zeigen, dass HSF1-TAP in transgenen Mäusen endogenen Expressionsleveln ähnelnd exprimiert wird und HSF1-enthaltende Proteinkomplexe aus Mausleber aufgereinigt werden können.

### 4.3.2 HSF1-TAP kann endogenes HSF1 funktionell ersetzen

In Kreuzungsexperimenten wurde TAP-fusioniertes HSF1 in den genetischen Hintergrund von *Hsf1*-defizienten Mäusen gebracht, um zu untersuchen, ob HSF1-TAP zur Komplementation des *Hsf1* *Knock-out* Phänotyps führt. Weibliche *Hsf1*-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage lebensfähige Embryos zu bilden (Xiao *et al.*, 1999; Metchat *et al.*, 2009). Durch die Expression von HSF1-TAP in *Hsf1*<sup>-/-</sup> Mäusen war es den Tieren jedoch möglich lebensfähige Nachkommen zu generieren. Die Analyse des endogenen *Hsf1*- und *Hsf1*-TAP Genotyps der Elterntiere und ihrer Nachkommen sind in Abbildung 7.4 im Anhang aufgeführt.

Da HSF1-TAP enthaltende Komplexe aus Mäusen isoliert werden können und HSF1-TAP endogenes HSF1 funktionell zu ersetzen scheint, können somit in der Zukunft HSF1-TAP exprimierende Mäuse für Analysen der zirkadianen Regulation von HSF1 verwendet werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 HSP90 nimmt über die Regulation der Stabilität der Proteine BMAL1 und CLOCK Einfluss auf den zirkadianen Oszillator

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Interaktionswege zwischen dem Hitzeschock-System und der zirkadianen Uhr in Säugetieren näher zu charakterisieren. Für diese Analyse wurde die Funktion des Hitzeschock-Proteins HSP90 in der zirkadianen Uhr untersucht.

In den Experimenten dieser Arbeit wurde deshalb die Aktivität von HSP90 pharmakologisch inhibiert und der Effekt auf den molekularen Oszillator analysiert. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Stabilität der beiden Mitglieder des positiv regulierenden Arms der molekularen Rückkopplungsschleife BMAL1 und CLOCK und der Expression ihrer Zielgene. Darüber hinaus wurde analysiert, welche HSP90-Isoform in der Stabilisierung von Uhrproteinen eine Rolle spielt. Unter Verwendung eines Mausmodells der Chronotoxizität konnte anschließend *in vivo* die Einflussnahme von HSP90 auf Prozesse, die von der zirkadianen Uhr abhängig sind, aufgezeigt werden.

#### 5.1.1 Inhibition von HSP90 führt zu einer Beeinträchtigung des zirkadianen Oszillators in Mausfibroblasten

Um zu untersuchen, ob HSP90 an der Regulation der zirkadianen Uhr von Säugetieren beteiligt ist, wurde durch Echtzeit-Biolumineszenz-Analysen der Effekt der HSP90-Inhibition auf den molekularen Oszillator von NIH3T3-Zellen näher analysiert.

Die Inhibition von HSP90 durch das Geldanamycin-Derivat 17-AEP-GA führte zu einer signifikanten Veränderung der Phase und einer Reduktion der Amplitude des molekularen Oszillators der Mausfibroblasten. Diese Effekte konnten auch mit Geldanamycin, seinem Derivat 17-AAG und dem strukturell nicht verwandten Inhibitor Radicol detektiert werden. Der Einfluss auf den zirkadianen Oszillator scheint somit nicht durch unspezifische Effekte chemischer Inhibitoren auf andere Proteine hervorgerufen zu werden, sondern auf der spezifischen Hemmung von HSP90 zu beruhen.

Durch die Analyse der endogenen mRNA-Expression von *Bmal1* mit und ohne 17-AEP-GA Behandlung konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der HSP90-Inhibition um einen unspezifischen Nebeneffekt auf die Luziferase-Reportergenaktivität handelte. Endogene *Bmal1*-mRNA Level wiesen eine vergleichbare Verschiebung der Phase und Verringerung der Amplitude nach 17-AEP-GA Behandlung auf, wie sie zuvor im Luziferase-Reportergenassay detektiert werden konnte. Die hier gewonnen Ergebnisse weisen darauf hin, dass HSP90 Einfluss auf die Regulation der zirkadianen Uhr nimmt.

Dass die korrekte Funktion von HSP90 für den molekularen Oszillator von Mausfibroblasten unverzichtbar ist, wird zusätzlich durch die Vorbehandlung von NIH3T3-Zellen mit 17-AEP-GA untermauert. Eine Vorinkubation der Zellen mit 17-AEP-GA über drei Tage führte zu einem verstärkten Effekt auf die zirkadiane Oszillation der Zellen. Nach 96-stündiger Messung der Biolumineszenz konnte beinahe keine Oszillation mehr detektiert werden. Dies basierte jedoch nicht auf einem Absterben der Zellen, sondern wahrscheinlich vielmehr auf einer verstärkten Beeinflussung des zirkadianen Oszillators durch verlängerte HSP90-Inhibition. Führt die Hemmung von HSP90 zum Beispiel zu einer Destabilisierung von Uhrproteinen, könnte ein starker Effekt auf den Oszillator erst nach einigen Tagen detektierbar sein, da wahrscheinlich eine gewisse Zeitspanne benötigt wird, bis die Proteinmengen so stark vermindert sind, dass die Oszillation fast völlig zum Erliegen kommt.

Die beobachteten Effekte auf den transkriptionellen Oszillator stellen unter Umständen nicht den Endpunkt der HSP90 Inhibition dar. Die Aktivität von HSP90 könnte unter den verwendeten Bedingungen nicht vollständig gehemmt worden sein. Eine Verwendung höherer Konzentrationen und eine verlängerte Behandlung der Zellen mit HSP90-Inhibitoren könnte zu einem vollständigen Zusammenbruch der Rhythmizität führen. Einen ersten Hinweis darauf liefern die verlängerte Periodenlänge der Oszillation unter der Verwendung erhöhter Konzentrationen der Inhibitoren und die signifikant verringerte Amplitude nach Vorbehandlung der Zellen mit dem Inhibitor 17-AEP-GA. Aufgrund der verstärkten Zytotoxizität bei erhöhten Inhibitor-Konzentrationen ist die Untersuchung dieser Hypothese jedoch kaum durchführbar. Studien belegen, dass die Zytotoxizität durch die Behandlung von Zellen mit erhöhten Geldanamycin- oder Derivat-Konzentrationen durch eine verstärkte Generierung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies hervorgerufen wird (Lee *et al.*, 2012). Zusätzlich dazu kommt es durch die Behandlung von Zellen mit Geldanamycin zu einer Bildung von Glutathi-

onkonjugaten, welche ebenfalls einen erhöhten zytotoxischen Effekt mit sich bringen (Guo *et al.*, 2008).

### 5.1.2 HSP90-Inhibition reduziert die Stabilität der Proteine BMAL1 und CLOCK

In den hier durchgeführten Analysen zur Proteinstabilität wurde das Hauptaugenmerk auf das zentrale Uhrprotein BMAL1 gelegt. Da CLOCK in peripheren Geweben einen wichtigen Interaktionspartner von BMAL1 darstellt und seine zirkadiane nukleäre Translokation und Degradation durch BMAL1 reguliert wird, wurden zusätzlich Analysen zur Proteinstabilität von CLOCK durchgeführt.

Die Inhibition der Funktion von HSP90 durch das Geldanamycin-Derivat 17-AEP-GA führte zu verringerten zellulären Proteinmengen von BMAL1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zusätzlich zu den reduzierten BMAL1-Mengen konnte in Analysen zur Kinetik der BMAL1-Degradation festgestellt werden, dass die Halbwertszeit von BMAL1 in Zellen, deren HSP90-Funktion inhibiert wurde, deutlich kürzer war als in unbehandelten Zellen. Dieses Ergebnis konnte in einem unabhängigen experimentellen System unter Verwendung von c-Myc-BMAL1 exprimierenden Zellen bestätigt werden. In diesen Zellen wurde jedoch keine Reduktion der *steady state* c-Myc-BMAL1 Proteinlevel nach 17-AEP-GA Behandlung detektiert. Dies könnte unter anderem durch die konstitutive Expression von c-Myc-BMAL1 über den CMV-Promoter hervorgerufen werden. Kommt es durch die Inhibition von HSP90 zu einem Abbau von c-Myc-BMAL1, wird dieser Effekt möglicherweise durch die durch den CMV-Promotor hervorgerufene Überexpression verdeckt und kann somit nicht detektiert werden. Der CMV-Promotor steht außerdem nicht direkt unter dem Einfluss der molekularen Rückkopplungsschleife, wie der Promoter des endogenen *Bmal1* Gens. BMAL1 beeinflusst durch eine reduzierte Stabilität nicht nur die Aktivierung seiner Zielgene, sondern nimmt durch den molekularen *feedback loop* auch auf seine eigene Aktivierung und Expression Einfluss. C-Myc-BMAL1 Proteinlevel beeinflussen ihre eigene Expression jedoch nicht, so dass dies ein weiterer Grund für die hier detektierten stabilen Proteinlevel nach HSP90-Inhibition sein könnte. Wurde die Überexpression von c-Myc-BMAL1 jedoch durch den Translationsinhibitor Cycloheximid inhibiert, konnte eine deutlich verkürzte Halbwertszeit des Proteins nach der Be-

handlung mit 17-AEP-GA beobachtet werden. Eine Verringerung der Halbwertszeit nach Inhibition von HSP90 wurde auch in Untersuchungen der Proteinstabilität von CLOCK detektiert.

Die Stabilität von BMAL1 und CLOCK wird durch eine Vielzahl von Prozessen beeinflusst. Zu diesen Prozessen gehören posttranslationale Modifikationen, die Translokation zwischen Zytoplasma und Nukleus und die Bindung an Chromatin (vgl. Kapitel 1.1.3.1). Es ist bekannt, dass das Heterodimer aus BMAL1 und CLOCK zu den Transkriptionsfaktorkomplexen gehört, die durch die Bindung an Chromatin und der damit verbundenen Transaktivierung von Zielgenen für den sofortigen Abbau markiert werden („black widow model“, vgl. Kapitel 1.1.3.1). Die Inhibition der Funktion von HSP90 könnte zu einer verstärkten Degradation führen. Diese Hypothese wird durch die bekannte Interaktion zwischen BMAL1 und HSF1 gestützt. Es konnte nachgewiesen werden, dass HSF1 an das Heterodimer von BMAL1/CLOCK binden kann (Tamaru *et al.*, 2011). Da HSP90 ebenfalls einen Interaktionspartner von HSF1 darstellt, könnte HSF1 für die Rekrutierung von HSP90 an das Heterodimer verantwortlich sein.

Es ist außerdem möglich, dass HSP90 direkt mit BMAL1 und CLOCK im Zytoplasma interagiert und diese Bindung zur Stabilisierung der Proteine beiträgt. Eine direkte Interaktion zwischen BMAL1 und HSP90 konnte mit *in vitro* translatierten Proteinen gezeigt werden (Hogenesch *et al.*, 1997). Die Interaktionsstudien durch Co-Immunpräzipitation von BMAL1, CLOCK oder HSP90 aus NIH3T3-Fibroblasten oder Zellkernextrakten aus Mausleber wiesen in dieser Arbeit jedoch keine direkte Bindung zwischen BMAL1 oder CLOCK mit HSP90 nach. Es ist bekannt, dass HSP90 mit einer Vielzahl von Client-Proteinen transiente schwach-affine Komplexe bildet (Shames und Minna, 2008). Möglicherweise war aus diesem Grund der Nachweis einer Interaktion zwischen HSP90 und BMAL1/CLOCK nicht durchführbar, da eine Bindung von HSP90 an BMAL1 oder CLOCK nur von kurzer Dauer oder sehr schwach ausgeprägt sein könnte.

Es sollte jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass HSP90 über indirektere Wege zu einer Stabilisierung von BMAL1 und CLOCK beiträgt. Beide Proteine werden in hohem Maße durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Zu diesen Modifikationen gehört zum Beispiel die O-GlcNAcylierung. BMAL1 und CLOCK werden rhythmisch O-GlcNAcyliert, was zu einer Inhibition ihrer Ubiquitinierung führt und somit den proteasomalen Abbau verhindert (Ma *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Inhibition von HSP90 zu einer Destabilisierung der O-GlcNAc-Transferase (OGT) führt (Zhang *et al.*, 2012).

Die daraus resultierende Verminderung der O-GlcNAcylierung könnte den Abbau von BMAL1 und CLOCK beschleunigen.

Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass das Protein CLOCK nicht direkt durch HSP90 stabilisiert wird, sondern seine hier detektierte Destabilisierung durch die erhöhte BMAL1 Proteindegradation hervorgerufen wird. BMAL1 besitzt nukleäre Lokalisations- und Exportsequenzen in seiner N-terminalen Domäne, wodurch seine Translokation zwischen Zytoplasma und Zellkern gewährleistet wird. CLOCK besitzt jedoch keine eigenen nukleären Lokalisationssequenzen (Kwon *et al.*, 2006). BMAL1 ist für den nukleären Import seines Interaktionspartners CLOCK verantwortlich und beeinflusst dessen Stabilität. In Untersuchungen führte die Co-Expression von BMAL1 und CLOCK zu reduzierten Proteinlevels von CLOCK im Zytoplasma, jedoch konnte kein Anstieg von CLOCK im Nukleus verzeichnet werden (Kondratov *et al.*, 2003, Kwon *et al.*, 2006). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Translokation von CLOCK durch BMAL1 in den Nukleus eine schnelle Degradation beider Transkriptionsfaktoren nach sich zieht (vgl. „black widow model“, Kapitel 1.1.3.1). Wird die Proteinstabilität vom BMAL1 durch die Inhibition von HSP90 beeinträchtigt, kann dies somit ebenfalls Einfluss auf die Stabilität, posttranslationale Modifikation und subzellulären Lokalisation seines Interaktionspartners CLOCK haben.

In Analysen der BMAL1-Proteinstabilität stellte sich ebenfalls heraus, dass nicht nur die Gesamtmenge des BMAL1-Proteins durch die Hemmung von HSP90 vermindert wurde, sondern möglicherweise auch der Phosphorylierungsstatus von BMAL1 verändert vorlag. In 17-AEP-GA behandelten Zellen konnte die langsamer migrierende Bande von BMAL1 signifikant reduziert detektiert werden. Diese Bande stellt wahrscheinlich phosphoryliertes BMAL1 dar.

Es gibt Hinweise darauf, dass BMAL1 zusammen mit seinem Interaktionspartner CLOCK für die Translokation in den Nukleus und Transaktivierungsprozesse phosphoryliert vorliegen muss (Sanada *et al.*, 2002, Kondratov *et al.*, 2003). An diesen Phosphorylierungsprozessen ist unter anderem die Proteinkinase MAPK beteiligt. Eine Inhibition von HSP90 durch Geldanamycin inhibiert den MAPK-Aktivator RAF-1, was in einer Hemmung der Aktivität von MAPK resultiert (Bedin *et al.*, 2004). Die Phosphorylierung von BMAL1 ist außerdem von der Kinase GSK-3 $\beta$  abhängig. Phosphorylierungen von BMAL1 durch GSK-3 $\beta$  führen zu Ubiquitin-vermittelter proteasomaler Degradation von BMAL1 (Sahar *et al.*, 2010). GSK-3 $\beta$  ist ein Client-Protein von HSP90, dessen Reifung durch die Inhibition der Funktion von HSP90 gehemmt wird (Zeng *et al.*, 2010). Stellt die langsamer migrierende Bande von BMAL1 seine

phosphorylierte Form dar, könnte die Inhibition der Proteinkinasen MAPK und GSK-3 $\beta$  durch die Hemmung der Aktivität von HSP90 eine direkte Ursache für die signifikante Reduktion der BMAL1 Menge sein. In zukünftigen Experimenten muss jedoch durch die Behandlung der verwendeten Proteinextrakte mit dem Enzym Phosphatase abgesichert werden, da es sich bei dieser Proteinbande um phosphoryliertes BMAL1 und nicht um andere posttranslationale Modifikationen handelt.

Die in dieser Arbeit detektierten reduzierten Proteinlevel von BMAL1, der mögliche veränderte Phosphorylierungsstatus von BMAL1 und die verminderte Halbwertszeit von BMAL1 und CLOCK nach Inhibition von HSP90 legen nahe, dass BMAL1 und möglicherweise sein Interaktionspartner CLOCK von der Aktivität des Chaperons HSP90 abhängig sind. Ob HSP90 durch eine direkte Bindung oder über indirekte Wege Einfluss auf die Stabilität und posttranslationale Modifikationen dieser Proteine nimmt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die hier nicht nachweisbare Interaktion des Heterodimers mit HSP90 und der veränderte posttranslationale Zustand von BMAL1 geben jedoch Hinweise darauf, dass HSP90 möglicherweise Regulatorproteine von BMAL1 beeinflusst. Da die Stabilität von BMAL1 durch die Inhibition von HSP90 eindeutig vermindert wird, sind detektierte reduzierte mRNA-Expressionslevel von *Bmal1* in dieser Arbeit wahrscheinlich eher als eine Konsequenz der Destabilisierung als ein Grund für verminderte BMAL1-Proteinmengen zu werten.

### **5.1.3 Die zytoplasmatischen Isoformen HSP90 $\alpha$ und HSP90 $\beta$ sind an der Stabilisierung von BMAL1 beteiligt**

Wie bereits in Kapitel 4.1.1 erwähnt wurde, kann es durch chemische Inhibitoren von Proteinen auch zu unerwünschten Nebeneffekten auf unverwandte Proteingruppen in Zellen kommen. Um zu untermauern, dass der Effekt des Geldanamycin-Derivates 17-AEP-GA auf die Stabilität von BMAL1 spezifisch durch die Inhibition der Funktion von HSP90 hervorgerufen wird, wurden in dieser Arbeit alle Varianten von HSP90 durch siRNA in NIH3T3-Fibroblasten herunterreguliert. HSP90 existiert in verschiedenen Isoformen in der Zelle und diese HSP90-Varianten sind in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert. Zu den beiden hauptsächlich im Zytoplasma lokalisierten Isoformen gehören das induzierbare HSP90 $\alpha$  und das konstitutiv exprimierte Protein HSP90 $\beta$ . Diese beiden HSP90 Varianten konnten je-

doch auch im Nukleus detektiert werden. Da sie keine nukleäre Lokalisationssequenz besitzen, ist es wahrscheinlich, dass die Translokation in den Nukleus durch Interaktion mit Client-Proteinen oder Co-Chaperonen vermittelt wird (Collier und Schlesinger, 1986). Die HSP90-Isoform GRP94 ist hauptsächlich im Lumen des Endoplasmatischen Reticulums lokalisiert und spielt in diesem Kompartiment eine wichtige Rolle in der Faltung von Proteinen (Lee, 1981). TRAP1 stellt eine Isoform von HSP90 in Mitochondrien dar und ist dort in die Aufrechterhaltung mitochondrialer Funktionen durch die Stabilisierung des mitochondrialen Komplexes I und weiterer Proteine involviert (Altieri *et al.*, 2012). Interaktionen mit zytoplasmatischen Proteinen konnten jedoch für alle HSP90 Isoformen nachgewiesen werden und Fraktionen dieser Proteine scheinen auch im Zytoplasma und/oder Nukleus zu existieren (Welch *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1996; Csermely *et al.*, 1998). Alle Isoformen von HSP90 sind etablierte Regulatoren der Proteinstabilität und somit theoretisch in der Lage zelluläre Level von BMAL1 zu kontrollieren.

Durch die hier durchgeführten Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass ausschließlich die simultane Herunterregulierung beider zytoplasmatischer Isoformen von HSP90 die zellulären Proteinlevels von BMAL1 vermindern. Der *Knock-down* von GRP94 oder TRAP1 zeigte keinen Einfluss auf die Proteinstabilität von BMAL1.

Diese Untersuchungen belegen, dass die zuvor detektierte reduzierte BMAL1-Halbwertszeit spezifisch durch die Inhibition von HSP90 hervorgerufen wird. Die zytoplasmatischen Isoformen von HSP90 werden essentiell für der Stabilisierung des Uhrproteins BMAL1 benötigt. Untersuchungen der Regulation posttranslationaler Modifikationen von HSP90 lassen vermuten, dass die beiden zytosolischen Isoformen von HSP90 im zellulären Kontext nicht vollständig redundant sind (Lees-Miller und Anderson, 1989). Es ist daher möglich, dass nur eines dieser Proteine für Stabilisierung der Funktion von HSP90 benötigt wird. HSP90 $\beta$  wird konstitutiv in Zellen exprimiert, während HSP90 $\alpha$  die induzierbare zytoplasmatische Isoform von HSP90 darstellt. Die mRNA Expression von HSP90 $\alpha$  in Mausleberzellen unterliegt außerdem einer zirkadianen Regulation (Kornmann *et al.*, 2007). Möglicherweise führt die rhythmische Expression von HSP90 $\alpha$  zu zirkadian regulierten Stabilisierungsprozessen von BMAL1. Diese Hypothese muss jedoch noch durch weiterführende Untersuchungen belegt werden.

#### 5.1.4 Inhibition von HSP90 beeinflusst die Expression der Zielgene des BMAL1/CLOCK Heterodimers

Da in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, dass die Halbwertszeiten von BMAL1 und CLOCK durch die Hemmung von HSP90 reduziert werden, lag die Vermutung nahe, dass die reduzierte Proteinstabilität des Heterodimers Einfluss auf die Expression ihrer Zielgene nehmen könnte. BMAL1 und CLOCK sind für die Initiation der Transkription der Period- und Cryptochrom-Gene, sowie für die Aktivierung von *Rora*/ $\beta$  und *Rev-Erba*/ $\beta$  über die Bindung an E-Boxen in ihren Promotoren verantwortlich (vgl. Kapitel 1.1.3). Zusätzlich dazu binden sie an E-Boxen in Promotoren so genannter *clock output genes*, zu denen zum Beispiel *Dbp* gehört. Diese Proteine nehmen keinen direkten Einfluss auf die zirkadiane Rückkopplungsschleife, sondern führen durch die Aktivierung sogenannter *clock-controlled genes* zur Generierung rhythmischer biologischer Prozesse (vgl. Kapitel 1.1.3).

Die Analyse der zirkadianen Expression dieser Gene wies nach, dass die Inhibition von HSP90 zu einer reduzierten Expression der BMAL1/CLOCK Zielgene *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rora*, *Rev-Erba* (*Nr1d1*) und *Dbp* führt. Insbesondere wurden die mRNA-Expressionslevel der zirkadianen Maxima dieser Gene durch die Hemmung von HSP90 erheblich verringert. Da die mRNA-Expression von *Clock* unter diesen Bedingungen unbeeinflusst blieb, schien der Mechanismus, durch den HSP90 zelluläre Oszillationen reguliert, keinen generellen Effekt auf die Transkription von Uhrgenen zu haben.

Der beobachtete Effekt auf die Expression der BMAL1/CLOCK-abhängigen Gene wird wahrscheinlich durch eine verminderte transkriptionelle Aktivierung hervorgerufen. Da BMAL1 und CLOCK durch die Inhibition von HSP90 destabilisiert werden, führt dies möglicherweise zu einer reduzierten Bindung der Promotoren ihrer Zielgene. Eine beschleunigte Degradation des DNA-gebundenen Heterodimers durch die HSP90-Inhibition würde ebenfalls in einer verminderten Aktivierung von BMAL1/CLOCK Zielgenen resultieren.

### 5.1.5 Inhibition von HSP90 kann die Toxizität von Cyclophosphamid in tageszeitabhängiger Weise modulieren

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen deuten darauf hin, dass die Inhibition der Funktion von HSP90 Einfluss auf die zelluläre zirkadiane Uhr durch Abschwächung von BMAL1/CLOCK-vermittelten Aktivierungsprozessen nimmt. Es war aus diesem Grund von Interesse zu untersuchen, ob HSP90 ebenso Prozesse in Tiermodellen beeinflusst, die von der zirkadianen Uhr abhängig sind.

Das Geldanamycin-Derivat 17-DMAG zeigt nach intraperitonealer Injektion exzellente biologische Verfügbarkeit und innerhalb von Minuten eine Verteilung in allen Organen bis auf das Gehirn (Egorin *et al.*, 2002). Dieses Geldanamycin-Derivat stellte somit einen idealen Kandidaten für die HSP90-Inhibition in Mäusen dar. Einerseits wurde die Auswirkung der HSP90-Hemmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Mäusen untersucht. Andererseits wurde analysiert, ob HSP90 das tageszeitabhängige Toxizitätsprofil des Chemotherapeutikums Cyclophosphamid (CP) modulieren kann.

Für diese Untersuchungen wurden Injektionen der Substanzen zu den Zeitpunkten ZT4 und ZT16 durchgeführt, da bereits bekannt ist, dass der Komplex aus BMAL1 und CLOCK an ZT4 in peripheren Organen transkriptionell aktiv ist, während er an ZT16 nicht an die regulatorischen Bereiche seiner Zielgene bindet (Ripperger und Schibler, 2006). Gorbacheva *et al.* konnten 2005 in ihren Untersuchungen nachweisen, dass die Toxizität des Chemotherapeutikums Cyclophosphamid vom funktionellen Status des Heterodimers BMAL1/CLOCK abhängt. Mäuse zeigten eine erhöhte Sterblichkeitsrate, wenn CP zu Zeitpunkten appliziert wurde, in denen die meisten BMAL1/CLOCK-abhängigen Gene nicht oder nur schwach exprimiert werden (ZT22-ZT2). Damit einhergehend reagierten BMAL1- und CLOCK-defiziente Mäuse hypersensitiv auf die Behandlung mit CP im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen. Wurde CP jedoch zu Zeitpunkten verabreicht, an denen die Expression BMAL1/CLOCK-abhängiger Gene aktiviert war (ZT10-ZT14), wiesen die Tiere eine erhöhte Resistenz gegenüber CP auf. Ebenso führte die simultane Deletion von CRY1 und CRY2, welche die Aktivität von BMAL1/CLOCK reprimieren, im Vergleich zu Wildtypmäusen zu einer geringeren Mortalitätsrate nach Behandlung mit CP (Gorbacheva *et al.*, 2005).

### 5.1.5.1 17-DMAG weist eine tageszeitabhängige Zytotoxizität auf

Das Geldanamycin-Derivat 17-DMAG scheint eine tageszeitabhängige Zytotoxizität in Mäusen aufzuweisen, welche sich durch einen verstärkten Gewichtsverlust der an ZT4 behandelten Mäuse äußerte. Möglicherweise spielen die Proteine BMAL1 und CLOCK selbst eine Rolle im Schutz von Zellen vor schädlichen Einflüssen, welcher durch die Verminderung ihrer Halbwertszeit reduziert wird. Außerdem könnte die Toxizität von 17-DMAG durch Expressionsprodukte BMAL1/CLOCK-abhängiger Gene beeinflusst werden, die Zellen vor schädlichen Einflüssen dieser Substanz schützen.

Während die Behandlung der Mäuse mit 17-DMAG über einen Zeitraum von 7 Tagen ein tageszeitabhängiges Toxizitätsprofil zeigte, konnte dies für Cyclophosphamid in den hier durchgeführten Analysen nicht nachgewiesen werden. Die Behandlung mit CP an ZT4 hätte im Vergleich zu Injektionen an ZT16 zu einem verstärkten Gewichtsverlust und einer erhöhten Mortalitätsrate der Mäuse führen sollen, wie es durch Gorbacheva *et al.* 2005 beschrieben worden war. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Gewichtabnahme beider Versuchsgruppen verzeichnet werden. Stresslevel, Ernährung und Gesundheitsstatus können Einfluss auf die Funktion der zirkadianen Uhr nehmen (Kohsaka *et al.*, 2007; O'Callaghan *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2013; Eckel-Mahan *et al.*, 2013). Diese Faktoren könnten möglicherweise zu einer Beeinflussung des tageszeitabhängigen zytotoxischen Effekts von CP führen, so dass dieser entweder verstärkt oder abgeschwächt auftritt. Der Unterschied der Zytotoxizität von CP zu den Zeitpunkten ZT4 und ZT16 wurde außerdem von Gorbacheva *et al.* nicht untersucht, sondern nur Zeitpunkte die vor (ZT22; ZT02; ZT06) oder nach (ZT10; ZT14; ZT18) den hier verwendeten Zeitpunkten lagen. Es besteht die Möglichkeit, dass Injektionen an ZT4 und ZT16 keine solch prominenten Ergebnisse gewährleisten, wie die von Gorbacheva *et al.* verwendeten Zeitpunkte. Ein Zusammenspiel der erwähnten Faktoren könnte dazu führen, dass die tageszeitabhängige Zytotoxizität von CP unterschiedlich deutlich hervortritt. Da jedoch in dieser Arbeit keinerlei Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen detektiert werden konnte, muss ein entscheidender Faktor vorgelegen haben, der sich von den Versuchen von Gorbacheva *et al.* deutlich unterscheidet. Dieser konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden.

### 5.1.5.2 17-DMAG verstärkt die Zytotoxizität von CP an ZT4

In den hier durchgeführten Versuchen konnte kein genereller, tageszeitunabhängiger Anstieg der Sensitivität gegenüber CP in 17-DMAG-behandelten Mäusen detektiert werden, welcher erwartet werden würde, wenn ein Uhr-unabhängiger zytoprotektiver Mechanismus durch den verwendeten HSP90-Inhibitor beeinflusst werden würde. Die Behandlung von Mäusen mit 17-DMAG in Kombination mit CP gibt erste Hinweise darauf, dass Geldanamycin-Derivate das Toxizitätsprofil von CP nur tageszeitspezifisch modulieren können.

Wurden die Versuchstiere für 7 Tage an ZT4 mit 17-DMAG behandelt, zeigten sie eine erhöhte Sensitivität auf das Chemotherapeutikum CP, wenn dieses ebenfalls an ZT4 verabreicht wurde. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch die reduzierte Expression von BMAL1/CLOCK Zielgenen hervorgerufen, die aus der Destabilisierung von BMAL1 und CLOCK resultiert. Würde jedoch durch die Behandlung der Versuchstiere mit 17-DMAG eine dauerhafte HSP90-Inhibition und somit eine permanente Verringerung der Proteinstabilität von BMAL1 und CLOCK hervorgerufen werden, hätte auch die Behandlung der Mäuse an ZT16 mit 17-DMAG zu einer erhöhten Sensitivität auf CP an ZT4 führen müssen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dass Mäuse, denen an ZT16 17-DMAG injiziert wurde, keine verstärkte Sensitivität auf die 12 Stunden versetzte CP-Behandlung an ZT4 zeigten, könnte durch einen schnellen Abbau oder zellulären Export von 17-DMAG hervorgerufen werden. Dies würde nur zu einer transienten Inhibition von HSP90 führen, so dass BMAL1/CLOCK-Level ausschließlich für wenige Stunden beeinträchtigt werden würden. Mäuse, die 17-DMAG an ZT16 erhielten, würden somit eine kaum verringerte oder keine veränderte Stabilität von BMAL1 und CLOCK und eine normale Aktivierung ihrer Zielgene an ZT4 aufweisen.

### 5.1.5.3 17-DMAG erhöht nicht die Sensitivität auf CP an ZT16

Die Aktivität von BMAL1/CLOCK und die damit verbundene Initiierung von Zielgenen führt zu einer erhöhten Resistenz gegen CP an ZT10-ZT14 (Gorbacheva *et al.*, 2005). Es könnte somit angenommen werden, dass die Reduktion der Expression von BMAL1/CLOCK-Zielgenen durch HSP90-Inhibition an ZT4 zu einer Verringerung der Resistenz gegen CP an ZT16 führen könnte. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Versuchstiere, die an ZT4 mit 17-DMAG und an ZT16 mit CP behandelt worden waren, zeigten keine verstärkte

Gewichtsabnahme im Vergleich zu Mäusen, die an ZT16 17-DMAG-Injektionen erhalten hatten. Da die Expression von BMAL1/CLOCK Zielgenen durch die Behandlung mit 17-DMAG nicht völlig ausgeschaltet wird, kann der Schutz vor CP durch diese wahrscheinlich aufrecht erhalten werden.

Mäuse, die mit 17-DMAG und CP in Kombination an ZT16 behandelt worden waren, zeigten ebenfalls keine erhöhte Sensitivität auf Cyclophosphamid, da BMAL1 und CLOCK zu dieser Zeit nicht funktionell aktiv waren und die Expression ihrer Zielgene bereits an ZT4 aktiviert worden war.

Die hier durchgeführten Analysen geben erste Hinweise darauf, dass 17-DMAG selbst ein tageszeitabhängiges Toxizitätsprofil aufweist und die Inhibition von HSP90 das Toxizitätsprofil von Cyclophosphamid beeinflussen kann. Um jedoch im Detail klären zu können, ob tatsächlich die durch die Inhibition von HSP90 hervorgerufene Destabilisierung des BMAL1/CLOCK Heterodimers für die verstärkte Toxizität von CP verantwortlich ist, sind weitere Untersuchungen notwendig. Es ist nicht auszuschließen, dass auch ein durch 17-DMAG beeinflusster anderer Mechanismus zu den hier beobachteten verstärkten Effekten von CP geführt haben könnte. Zusätzlich muss in Betracht gezogen werden, dass eine erhöhte Gewichtsabnahme in gleichzeitig behandelten Mäusen auch durch eine verstärkte Belastung der Versuchstiere hervorgerufen werden kann.

Um sicherzustellen, dass die Stabilität von BMAL1 und CLOCK durch die Inhibition von HSP90 mit 17-DMAG beeinflusst wird, müssten Analysen zu ihrer Proteinstabilität in peripheren Organen von Mäusen nach 17-DMAG Behandlung durch zum Beispiel Western Blot Analysen durchgeführt werden. Untersuchungen der mRNA Expression ihrer Zielgene wären ebenfalls von Interesse, da die Expression dieser Gene für die tageszeitabhängige Toxizität von CP essentiell zu sein scheinen. Um nachzuweisen, dass Cyclophosphamid ein von der Tageszeit abhängiges Toxizitätsprofil aufweist, sollten Injektionen möglicherweise zu Zeitpunkten durchgeführt werden, die in Gorbacheva *et al.* verwendet worden waren, da in den hier durchgeführten Analysen keine tageszeitabhängige Toxizität von CP beobachtet werden konnte.

Sowohl Cyclophosphamid, als auch Geldanamycin-Derivate werden aktuell in Therapien gegen maligne Erkrankungen eingesetzt (Byrne *et al.*, 2012; Garcia-Carbonero *et al.*, 2013; Mahanta *et al.*, 2013). Diese Substanzen werden nicht nur einzeln verwendet, sondern finden

auch in Kombinationstherapien Anwendung (Jhaveri *et al.*, 2012; Adenis *et al.*, 2013). Untersuchungen der sich gegenseitig modulierenden, tageszeitabhängigen Effekte von Chemotherapeutika müssen somit essentieller Bestandteil der Forschung werden, um eine bestmögliche Behandlung und eine Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen entgegenwirken zu können.

### 5.1.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass das molekulare Chaperon HSP90 Einfluss auf den zirkadianen Oszillator peripherer Organe von Säugetieren nimmt. Über einen Zusammenhang zwischen HSP90 und der zirkadianen Uhr in Säugetieren war bis zu diesem Zeitpunkt noch nichts bekannt.

Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass HSP90 essentiell für die korrekte Funktion des zirkadianen Oszillators ist und eine Inhibition der Aktivität von HSP90 Phase und Amplitude der zirkadianen Oszillation von Mausfibroblasten signifikant beeinflusst. Die hier detektierte Veränderung der zirkadianen Oszillation beruhte zumindest zum Teil auf einer Beeinträchtigung der Halbwertszeit und einer daraus resultierenden Reduktion der zellulären Proteinmenge von BMAL1 und seines Interaktionspartners CLOCK. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Verringerung der Proteinstabilität der Mitglieder des positiv regulierenden Arms der zirkadianen Uhr zu einer Verminderung der mRNA Expression der Zielgene des BMAL1/CLOCK Heterodimers führte. Da keine direkte Interaktion zwischen den Proteinen HSP90 und BMAL1 oder CLOCK festgestellt werden konnte, muss in Erwägung gezogen werden, dass die Bindung dieser Proteine entweder nur von kurzer Dauer oder sehr schwach ausgeprägt ist oder HSP90 über indirekte Wege zur Aufrechterhaltung der Proteinstabilität von BMAL1 und CLOCK beiträgt. Besteht eine direkte Interaktion zwischen HSP90 und einem oder beiden Mitgliedern des Heterodimers, könnte diese durch die Rekrutierung durch HSF1 vermittelt werden, welches mit BMAL1 und CLOCK zu interagieren scheint (Tamaru *et al.*, 2011). Die Rekrutierung von HSP90 an das BMAL1/CLOCK könnte zur Stabilisierung des Komplexes an Promotoren beitragen.

Es ist jedoch auch möglich, dass HSP90 zur korrekten Faltung von BMAL1 und CLOCK im Zytoplasma führt oder das Heterodimer vor dem Transport in den Nukleus stabilisiert. Da die

Translokation und Stabilität von CLOCK entscheidend durch seinen Interaktionspartner BMAL1 reguliert wird, besteht die Möglichkeit, dass HSP90 ausschließlich mit BMAL1 interagiert und die hier detektierten Effekte auf die Proteinstabilität von CLOCK durch die Beeinträchtigung der Halbwertszeit von BMAL1 hervorgerufen werden. Neben einer direkten Interaktion zwischen HSP90 und dem BMAL1/CLOCK Komplex muss jedoch auch eine indirekte Beeinflussung der Stabilität des Heterodimers durch HSP90 in Betracht gezogen werden. Der BMAL1/CLOCK Komplex unterliegt einer Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen, die eine wichtige Rolle für seine Stabilität und Aktivität spielen. Möglicherweise beeinflusst HSP90 die Stabilität von Enzymen, die an der Modifizierung des Heterodimers beteiligt sind. HSP90 ist zum Beispiel für die Funktion der Proteinkinasen MAPK und GSK-3 $\beta$ , sowie für die Aktivität des Enzyms O-GlcNAc-Transferase essentiell notwendig (siehe Kapitel 1.1.3.1). Diese Enzyme sind unter anderem an posttranslationalen Modifikationen der Proteine BMAL1 und CLOCK beteiligt.

Dass die Inhibition der Funktion von HSP90 nicht nur unter artifiziellen Zellkulturbedingungen Einfluss auf den zirkadianen Oszillator nimmt, sondern ebenfalls *in vivo* Prozesse beeinflusst, die von der zirkadianen Uhr abhängig sind, ergab die Analyse der kombinatorischen Behandlung von Mäusen mit dem HSP90-Inhibitor 17-DMAG und dem Chemotherapeutikum Cyclophosphamid. 17-DMAG wirkt in tageszeitabhängiger Weise toxisch und scheint das Toxizitätsprofil von CP, welches ebenfalls von der Tageszeit abhängig ist, modulieren zu können.

Die hier aufgezeigten Ergebnisse werfen die Frage auf, welche Rolle das Zusammenspiel zwischen HSP90 und der zirkadianen Uhr in der zellulären Homöostase und bei Krankheiten von Säugetieren spielt. Die Expression von HSP90 könnte zum Beispiel in das Temperatur-*Entrainment* der zirkadianen Uhr durch eine tageszeitabhängige Stabilisierung des BMAL1/CLOCK Komplexes involviert sein. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits beschrieben, in welchem die Proteinkinase Cy (PKCy) durch die Stabilisierung von BMAL1 das nahrungsvermittelte *Entrainment* der zirkadianen Uhr reguliert.

HSP90 ist außerdem an der Stabilisierung von Onkoproteinen beteiligt (Neckers *et al.*, 2007), weshalb es ein attraktives Ziel für die Entwicklung von Inhibitoren darstellt. HSP90-Inhibitoren spielen somit eine wichtige Rolle in der Therapie maligner Erkrankungen. Jedoch kann die Herunterregulierung zellulärer Proteinlevel von BMAL1 das Wachstum von Tumoren beschleunigen (Zeng *et al.*, 2007). Da die Inhibition von HSP90 die Stabilität und Halb-

wertszeit von BMAL1 zu beeinträchtigen scheint, könnten HSP90-Inhibitoren wiederum die Tumorentstehung begünstigen. Eine detaillierte Analyse des Zusammenhangs zwischen HSP90 und der zirkadianen Uhr ist somit von großer Wichtigkeit für zukünftige Behandlungen von malignen Erkrankungen.

Es wäre in weiterführenden Analysen von Interesse, die rhythmische Expression von HSP90 und seinen Einfluss auf den zirkadianen Oszillator näher zu untersuchen. Sollte HSP90 Einfluss auf Enzyme nehmen, die an posttranslationalen Modifikationen von Uhrproteinen beteiligt sind, könnte dadurch auch die Stabilität anderer Mitglieder der molekularen Rückkopplungsschleife beeinträchtigt werden. Ebenso könnten weitere Untersuchungen der Änderung posttranslationaler Modifikationen Hinweise darauf geben, welche Enzyme durch eine HSP90-Inhibition beeinträchtigt werden würden. Durch Immunfluoreszenzanalysen könnte näher untersucht werden, ob HSP90 mit BMAL1 und/oder CLOCK im Zytoplasma oder Nukleus co-lokalisiert ist. Dies würde darauf hinweisen, dass HSP90 in direkter Interaktion mit dem BMAL1/CLOCK Heterodimer steht.

## **5.2 Generierung einer transgenen HSF1-TAP exprimierenden Maus auf Grundlage der Untersuchung der Funktionalität von TAP-gekoppeltem HSF1**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Generierung einer HSF1-TAP exprimierenden transgenen Maus, um die Zusammenhänge zwischen dem essentiellen Hitzeschock-Transkriptionsfaktor HSF1 und der molekularen Uhr in Säugetieren näher untersuchen zu können. Durch HSF1 könnten Zellen in der Lage sein die molekulare Uhr an veränderte physiologische Situationen anzupassen. Da über die molekularen Mechanismen, die HSF1 und die zirkadiane Uhr miteinander verknüpfen, bisher noch nichts bekannt ist, könnte die Isolation von HSF1-enthaltenden Komplexen zu unterschiedlichen Tageszeitpunkten Klarheit über seine zirkadiane Regulation und Einflussnahme auf den molekularen Oszillator erbringen.

Um jedoch eine transgene HSF1-TAP exprimierende Maus generieren zu können, musste zuvor in *proof of principle* Experimenten nachgewiesen werden, dass TAP-gekoppeltes HSF1 sich wie endogenes HSF1 in Zellen verhält. Für diesen Nachweis wurde die subzelluläre Lokalisation von HSF1-TAP vor und nach Hitzeschock analysiert. Es wurde außerdem gezeigt, dass

HSF1-TAP in der Lage ist, die Transkription von HSF1-Zielgenen zu aktivieren. In weiteren Analysen wurde anschließend die Bindung von HSF1-TAP an bekannte HSF1-Interaktionspartner nachgewiesen. Auf dieser Grundlage konnte die Generierung einer HSF1-TAP exprimierenden Maus durchgeführt werden.

### 5.2.1 Überexpression von HSF1-TAP führt zu *Silencing* des Transgens

Die Analyse der stabilen Zelllinien ergab, dass TAP-fusionierte Varianten von HSF1 in transgenen Zellen kaum oder gar nicht exprimiert wurden. Im Besonderen konnte dies bei Zelllinien beobachtet werden, deren HSF1-Protein mit einem TAP-Tag und zusätzlich dem Fluoreszenzprotein EYFP gekoppelt war. Es ist bekannt, dass die Überexpression von HSF1 in Zellen zu einem Fehler in der Beendigung der Mitose führt. Die regulatorische Domäne von HSF1 ist in der Lage mit dem Protein CDC20 (*Cell Division Cycle 20*) zu interagieren. Diese Interaktion inhibiert die Bindung zwischen CDC20 und CDC27 (*Cell Division Cycle 27*), die Phosphorylierung von CDC27 und die Ubiquitinierungsaktivität von APC (*Anaphase-promoting complex*). Eine Überexpression von HSF1 hemmt die Beendigung der Mitose und die Degradation von Cyclin B1 und Securin, was in Aneuploidie und mehrkernigen Zellen resultiert (Lee *et al.*, 2008). Dieses Phänomen konnte in dieser Arbeit unter anderem bei der transienten und stabilen Transfektion von Zellen mit *Hsf1*-exprimierenden Vektoren detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Es kann davon ausgegangen werden, dass aus diesem Grund eine Vielzahl der stabil transfizierten Zellen die Expression von HSF1 still legten (*Silencing*), um einen korrekten Ablauf der Mitose zu gewährleisten. Dies stellt wahrscheinlich den Grund dafür dar, dass ausschließlich stabile Zellklone isoliert werden konnten, die keine oder nur eine geringe Expression von TAP-gekoppeltem HSF1 aufwiesen.

Die Zelllinien 10, 11 und 12, welche C-terminal TAP-gekoppeltes HSF1 exprimierten, zeigten nach Hitzeschock-Behandlung eine gesteigerte mRNA-Expression von *Hsf1*. Proteotoxischer Stress führt in der Regel nicht zu einer erhöhten Expression von HSF1, sondern ausschließlich zu einer Aktivierung des Proteins (Ali *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998). Die Regulation von HSF1 wird durch posttranslationale Modifikationen und die Bindung verschiedener Proteine gewährleistet. In den generierten transgenen Zelllinien stand die Expression der TAP-fusionierten *Hsf1*-Varianten jedoch nicht unter der Kontrolle des endogenen *Hsf1*-

Promotors, sondern wurde durch den *Cytomegalovirus-immediate early* (CMV-IE) Promotor gesteuert. Dieser Promotor kann durch Hitze aktiviert werden, obwohl er keine typischen Hitze-reaktionsfähigen Sequenzen besitzt (Pshenichkin *et al.*, 2011). Die Hitzeaktivierung des CMV-Promotors führt somit zu einer starken Überexpression der durch ihn regulierten Gene. Dies könnte der Grund dafür sein, dass in den drei oben erwähnten Zelllinien nach Hitzeschock eine gesteigerte mRNA Expression von *Hsf1* verzeichnet werden konnte. Hierdurch wird die Hypothese bestärkt, dass die Expression des CMV-kontrollierten *Hsf1*-Gens in allen anderen Zelllinien durch epigenetische Veränderungen der DNA stillgelegt wurde, da der CMV-Promotor auch durch Hitzeschock nicht aktiviert werden konnte.

### 5.2.2 TAP-gekoppeltes HSF1 akkumuliert unter Hitzeschock im Nukleus

In weiteren Analysen dieser Arbeit wurde untersucht, ob TAP-fusioniertes HSF1 die gleiche subzelluläre Lokalisation wie endogenes HSF1 vor und nach Hitzeschock aufweist.

HSF1 liegt unter normalen Bedingungen als inaktives Monomer im Zytoplasma und Nukleus vor (Mercier *et al.*, 1999). Proteotoxischer Stress führt dazu, dass HSF1 aktiviert wird. Die genauen Aktivierungswege sind bisher noch nicht im Einzelnen verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass HSF1 unter Stressbedingungen innerhalb von wenigen Minuten Homo- oder Heterotrimere zusammen mit HSF2 bildet und im Zellkern akkumuliert, wo es die Transkription von Hitzeschock-Proteinen aktiviert (vgl. Kapitel 1.2.1.3). Die nukleäre Lokalisation von HSF1 ist somit ein essentieller Schritt in der Antwort auf proteotoxische Ereignisse in Zellen.

HSF1-TAP konnte in den transgenen Zelllinien 11 und 12, entsprechend der Lokalisation von HSF1 in Wildtyp-Zellen, vor Hitzeschock diffus im Zytoplasma und Zellkern detektiert werden. Durch die Behandlung der Zellen mit Hitze akkumulierte HSF1-TAP im Zellkern. Die subzelluläre Lokalisation von C-terminal TAP-gekoppeltem HSF1 entsprach in den Zelllinien 11 und 12 somit der von endogenem HSF1. Diese Untersuchungen lassen darauf schließen, dass der TAP-Tag die Aktivierung von HSF1, die Bildung von Trimeren und die Akkumulation im Nukleus nicht behindert.

### 5.2.3 HSF1-TAP kann die Expression seiner Zielgene aktivieren

Da TAP-fusioniertes HSF1 unter Stressbedingungen im Nukleus akkumulieren konnte, wurde im nächsten Schritt analysiert, ob aktiviertes HSF1-TAP in der Lage ist die Transkription des Zielgens *Hspa1b* zu induzieren. HSPA1B gehört zur Familie der HSP70-Chaperone, dessen Expression unter proteotoxischen Stressbedingungen durch HSF1 aktiviert wird.

Die Untersuchung der mRNA Expression von *Hspa1b* der generierten transgenen Zelllinien zeigte, dass ausschließlich die Zelllinien 11 und 12, in denen das *Hsf1*-TAP Gen exprimiert wurde, die Expression des HSF1 Zielgens *Hspa1b* aktivieren konnten. Die mRNA Expression von *Hspa1b* dieser Zellen nach Hitzeschock entsprach jedoch nur 25-40% der Expression von Wildtyp-Zellen. Die transgenen Zelllinien 11 und 12 exprimierten HSF1, das C-terminal mit dem TAP-Tag gekoppelt war. Am äußeren Ende des Carboxyl-Terminus liegen die beiden Transaktivierungsdomänen AD1 und AD2. Da der TAP-Tag eine Größe von ca. 20 kDa besitzt, könnte diese sehr große Proteinstruktur dazu führen, dass die Transaktivierungsdomänen von HSF1 strukturell beeinträchtigt werden. Möglicherweise wird die Transaktivierungsdomäne von HSF1 durch die TAP-Tag Struktur in Teilen blockiert, so dass eine Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie an Promotoren erschwert wird. Es sollte zusätzlich in Betracht gezogen werden, dass die reduzierte Expression von *Hspa1b* auch durch andere Faktoren vermindert sein könnte. Möglicherweise sind die Promotoren der HSF1 Zielgene in *Hsf1*-defizienten Zellen durch epigenetische Veränderungen schwerer zugänglich, da sie durch fehlendes HSF1 nicht mehr aktiviert werden konnten.

TAP-fusioniertes HSF1 soll in transgenen Mäusen nicht ausschließlich im genetischen *Hsf1*-/- Hintergrund exprimiert werden. Sollte die Struktur des TAP-Tags Einfluss auf die Funktionalität von HSF1 nehmen, könnte durch die Trimerisierung mit endogenem HSF1 möglicherweise die Transaktivierung von Zielgenen gesteigert werden.

#### 5.2.4 HSF1-TAP wird unter Stress posttranslational modifiziert und bindet an bekannte Interaktionspartner

Die zuvor durchgeführten Untersuchungen wiesen nach, dass TAP-gekoppeltes HSF1 in der Lage ist unter proteotoxischen Stressbedingungen aktiviert zu werden, im Zellkern zu akkumulieren und die Expression des Zielgens *Hspa1b* zu aktivieren.

Die Regulation der Aktivität von HSF1 wird vor allem durch posttranslationale Modifikationen und die Bindung an verschiedene Proteine vermittelt (vgl. Kapitel 1.2.1.3). Zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen an HSF1 gehört die Phosphorylierung. Während des Aktivierungsprozesses unterliegt HSF1 massiver Hyperphosphorylierung, die vornehmlich in der regulatorischen Domäne an Serin-Seitenketten durchgeführt wird. Spezifische Phosphorylierungen sind einerseits für eine verstärkte Transaktivierung notwendig und stellen andererseits Markierungen für Sumoylierung dar. Durch Phosphorylierung und Sumoylierung kann die Aktivität von HSF1 moduliert werden (Hietakangas *et al.*, 2003).

Die Analyse der Expression von HSF1-TAP vor und nach Hitzeschock in den transgenen Zelllinien 11 und 12 lässt vermuten, dass TAP-gekoppeltes HSF1 unter Stressbedingungen massiver Hyperphosphorylierung unterliegt. Diese Modifikation führte dazu, dass HSF1 in Western Blot Analysen nicht nur als distinkte Bande zu erkennen war, sondern eine Vielzahl von langsamer migrierenden Banden detektiert werden konnten. Der TAP-Tag scheint somit nicht die regulatorische Domäne von HSF1 zu blockieren, die für posttranslationale Modifikationen benötigt wird.

Die Regulation der Aktivität von HSF1-Trimeren wird außerdem durch die Bindung an verschiedene Proteine kontrolliert. Ein Multichaperonkomplex, bestehend aus HSP90, dem Co-Chaperon p23 und dem Immunophilin FK506-Bindungsprotein 5 kann an die regulatorische Domäne von HSF1 binden und seine Aktivität inhibieren (Pratt *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1998a, 1998b; Bharadwaj *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2001). Ebenso ist eine Interaktion mit HSP70 und HSP40 möglich, die zu einer Hemmung der Transaktivierung von HSF1 führen (Baler *et al.*, 1992; Abravaya *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1998). Diese regulatorische Rückkopplung durch Hitzeschock-Proteine, deren Transkription zuvor durch HSF1 aktiviert worden war, ist ein essentieller Schritt in der Abschwächung der Hitzeschockantwort. Zusätzlich sind noch eine Reihe weiterer Interaktionspartner bekannt, die zu der Gruppe der Proteinkinasen oder mRNA-

prozessierenden Faktoren gehören (Weighardt *et al.*, 1999; Jolly *et al.*, 1999; Denegri *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2013).

Durch die Isolation HSF1-enthaltender Komplexe sollte untersucht werden, ob HSF1-TAP mit bekannten Bindungspartnern interagieren kann. Es war jedoch nicht möglich durch die zwei-stufige Tandemaffinitätsaufreinigung aus den transgenen Zelllinien 11 und 12 HSF1-TAP und interagierende Proteine in ausreichender Menge für Analysen zu isolieren. Es besteht die Möglichkeit, dass die Expression von HSF1-TAP in den verwendeten Zellen auch nach Hitzeschock zu gering war, um ausreichende Ausgangsmengen für eine erfolgreiche TAP-Isolation HSF1-enthaltender Komplexe gewährleisten zu können. Da die Tandemaffinitätsaufreinigung ein Zwei-Stufen-Isolationssystem von Proteinen ist, führt jeder Isolationsschritt zu einem gewissen prozentualen Verlust der zu isolierenden Proteine. Möglicherweise könnte der Einsatz erhöhter Zellmengen zu ausreichenden Ausgangsmengen für eine HSF1-TAP Aufreinigung führen. Da die hier verwendeten Mausfibroblasten sehr große kontaktinhibierte Zellen sind, deren Zellteilung nur einmal in ca. 30 Stunden erfolgt, war es jedoch schwierig eine entsprechend große Menge dieser Zellen zu generieren.

Aus diesem Grund wurde die TAP-Tag Isolation HSF1-enthaltender Proteinkomplexe aus transgenen HEK293 Zellen vorgenommen. Die Isolation von humanem TAP-gekoppeltem HSF1 und seiner interagierenden Proteine wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die massenspektrometrische Analyse der isolierten Proteinkomplexe konnte zeigen, dass HSF1-TAP an bekannte Interaktionspartner binden kann. Die Fragmentierung der DNA durch das Enzym DNase I gewährleistete, dass nicht nur zytoplasmatische HSF1-Komplexe, sondern auch DNA-gebundenes HSF1 und interagierende Protein isoliert werden konnten.

Hitzeschock-Transkriptionsfaktor HSF2, welcher zusammen mit HSF1 unter Stressbedingungen Heterotrimere bildet (He *et al.*, 2003), konnte zusammen mit HSF1-TAP isoliert werden. Ebenso wurde eine Vielzahl von Mitgliedern der HSP70 Chaperon-Familie detektiert. Die hier in HSF1-TAP Aufreinigungen detektierten Proteine Hitzeschock-70kDa Protein 1A/1B (HSPA1A/B), Hitzeschock-70kDa Protein 2 (HSPA2), Hitzeschock-70kDa Protein 4 (HSPA4) und Hitzeschock-70kDa Protein 8 (HSPA8 oder HSC70) sind bekannte direkte Interaktionspartner von HSF1, die unter anderem an der Regulation von HSF1 beteiligt sind (Abravaya *et al.*, 1992; Nunes und Calderwood, 1995; Shi *et al.*, 1998, Ahn *et al.*, 2005). Das Chaperon Hitzeschock-70kDa Protein 1L (HSPA1L), das im ER lokalisierte Hitzeschock-70kDa Protein 5

(HSPA5, GRP78), Hitzeschock-70kDa Protein 4L (HSPA4L) und das mitochondriale Hitzeschock-70kDa Protein 9 (HSPA9, GRP75) wurden ebenfalls zusammen mit HSF1-TAP isoliert. Diese Proteine interagieren wahrscheinlich über die Bindung verschiedener Mitglieder der HSP70- oder HSP90-Chaperonfamilie indirekt mit HSF1 (Havugimana *et al.*, 2012). Hitzeschock 105kDa/110kDa Protein 1, welches ebenfalls zur HSP70 Chaperon-Familie gezählt wird, ist ein Bindungspartner von HSC70 (Yamagishi *et al.*, 2009) und konnte ebenfalls in HSF1-enthaltenden Komplexen gefunden werden. Das in den hier durchgeführten Aufreinigungen detektierte Protein SWI/SNF-verwandte Matrix-assoziierte Aktin-abhängige Regulator der Chromatinunterfamilie B Mitglied 1 (SMARCB1), welches an Chromatin-Remodeling Prozessen für die transkriptionelle Aktivierung von Genen zuständig ist, stellt ebenfalls einen bekannten direkten Bindungspartner von HSF1 dar (Sullivan *et al.*, 2001).

Durch Isolation von HSF1-enthaltenden Proteinkomplexen wurde somit nachgewiesen, dass die Bindung von HSF1 an essentielle Interaktionspartner durch den TAP-Tag nicht gestört wird.

### 5.2.5 Identifizierung neuer Interaktionspartner von HSF1 ins Säugetieren

Die Isolation HSF1-TAP enthaltender Komplexe konnte nicht nur eine Bindung von HSF1 an bekannte Interaktionspartner zeigen, sondern wies eine Bindung von HSF1-TAP an Proteine nach, die bisher nicht als HSF1-Bindungspartner bekannt waren. Eine Vielzahl dieser Proteine spielt eine wichtige Rolle in der Bindung und Prozessierung von mRNA. In Abbildung 5.1 ist die Verbindung zwischen den einzelnen isolierten Proteinen schematisch dargestellt. Hellgelb hinterlegte Proteine stellen dabei Faktoren dar, die in den Experimenten dieser Arbeit nicht isoliert werden konnten, jedoch als Bindungsbrücken zwischen Proteinkomplexen funktionieren könnten.

Wie bereits erwähnt, bindet HSF1 an verschiedene Mitglieder der HSP70-Chaperonfamilie. Einerseits wird die Transkription dieser Gene von HSF1 aktiviert, andererseits sind sie essentiell an der Regulierung der Aktivität von HSF1 beteiligt (Abravaya *et al.*, 1992; Nunes und Calderwood, 1995; Shi *et al.*, 1998). Zu den wichtigsten Bindungspartnern von HSF1 gehört HSC70 (HSPA8). Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von HSF1. HSF1 wird unter anderem von HSC70 unter Hitzeschock-Bedingungen aktiviert und co-transloziert

zusammen mit diesem molekularen Chaperon vom Zytoplasma in den Nukleus (Ahn *et al.*, 2005). HSC70 ist jedoch nicht nur an der Regulation der Aktivität von HSF1 beteiligt, sondern interagiert außerdem mit RuvB-like 1, einer DNA Helikase, die an der transkriptionellen Aktivierung von Genen beteiligt ist (Jeronimo *et al.*, 2007). DHX9 und SMARCB1 gehören ebenfalls zu Proteinen, die für die Entwindung von DNA und RNA nötig sind. Sie tragen dazu bei, dass der transkriptionellen Maschinerie Zugang zur DNA ermöglicht wird (Zhang und Grosse, 1997; Phelan *et al.*, 1999; Ulyanova und Schnitzler, 2005). Diese zusammen mit HSF1-TAP isolierten Proteine scheinen somit an der transkriptionellen Aktivierung von HSF1-Zielgenen unter Hitzeschock-Bedingungen beteiligt zu sein.

HSC70 konnte jedoch nicht nur mit den bereits erwähnten Proteinen in Zusammenhang gebracht werden, sondern spielt außerdem in Splicing-Prozessen von mRNA eine Rolle. Splicing ist ein essentieller Mechanismus der Prozessierung von RNA im Zellkern von Eukaryoten. Durch Splicing-Vorgänge wird unreife prä-mRNA in reife mRNA prozessiert. Für diesen Vorgang wird das Spliceosom benötigt, welches eine hoch dynamische Ribonukleoprotein (RNP) Maschinerie ist. Zu den Hauptbestandteilen des Spliceosoms gehören die snRNPs U1, U2, U4, U5 und U6. Diese RNA/Protein-Komplexe assoziieren zusammen mit nicht-snRNP Splicingfaktoren und prä-mRNA in einer spezifisch geordneten Weise. Die Bildung des Spliceosoms beinhaltet verschiedene Stadien, in denen die Proteine der Komplexe neu geordnet werden. Unter anderem unterliegt der U5 snRNP Komplex während der Bildung des aktiven Spliceosoms einer Neuordnung. Während dieser Neuordnung kommt es zur Bildung des 35S U5 snRNP Komplexes. Dieser Komplex beinhaltet neben anderen Faktoren die hier isolierten Proteine snRNP200, EFTUD2, PRP8 und HSC70 (vgl. Abb. 5.1). PRP19 ist ebenfalls ein Protein dieses Komplexes und bindet direkt an HSC70. Es wird vermutet, dass HSC70 an der Zusammenlagerung der Kernfaktoren des Spliceosoms beteiligt ist (Makarova *et al.* 2006; Roy und Gilbert, 2006; Chen *et al.*, 2006). Obwohl der direkte HSC70-Bindungspartner PRP19 in den hier durchgeführten Analysen nicht isoliert werden konnte, besteht trotzdem die Möglichkeit, dass die Bindung von HSF1 an den U5 snRNP Komplex durch HSC70 vermittelt wurde. Möglicherweise wurde PRP19 zusammen mit HSF1-TAP isoliert, konnte jedoch in den massenspektrometrischen Analysen nicht detektiert werden. HSC70 könnte auch an andere Faktoren des U5 snRNP Komplexes binden und so die Verbindung zwischen HSF1 und den Proteinen dieses Komplexes schaffen. Eine direkte Bindung zwischen HSF1 und den hier isolierten Mitgliedern der Splicing-Familie wäre ebenfalls möglich.

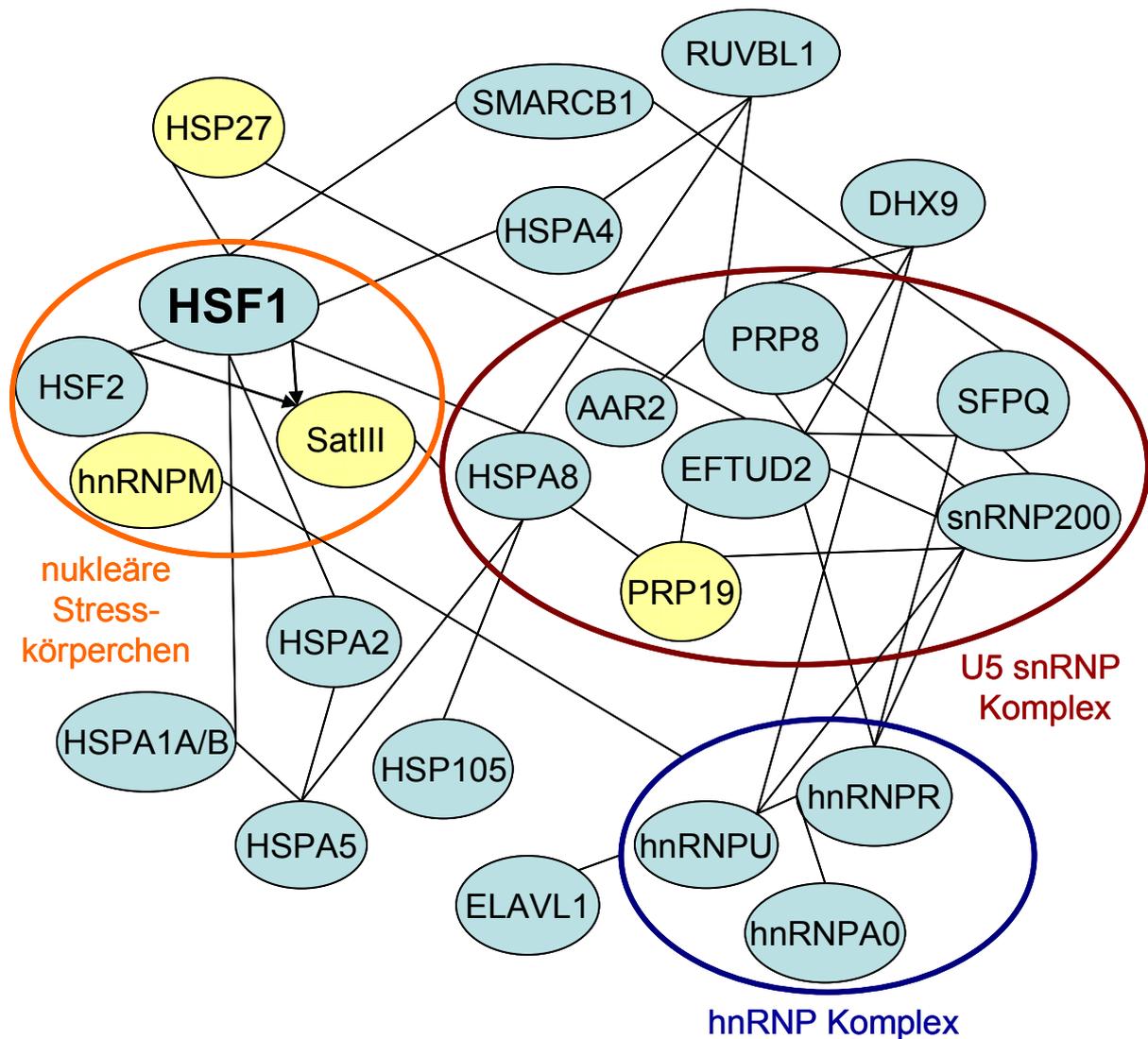
Zusätzlich zu den Faktoren des U5 snRNP Komplexes konnten Mitglieder der Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine zusammen mit HSF1-TAP isoliert werden (vgl. Abb. 5.1). Vor Splicing-Vorgängen wird die prä-mRNA im Nukleus von hnRNPs gebunden. Es gibt viele verschiedene Mitglieder der hnRNPs, die zusammen das sogenannte Ribonucleosom bilden. Diese Proteine scheinen an der Prävention der Ausbildung der Sekundärstruktur von mRNA beteiligt zu sein, interagieren mit dem aktiven Splicing-Apparat und transportieren mRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma der Zellen (Krecic und Swanson, 1999). Die Interaktion der hier isolierten hnRNPs R und U mit Mitgliedern des U5 snRNP ist bereits bekannt (Havugimana *et al.*, 2012). Diese Interaktion könnte der Grund dafür sein, dass hnRNPs zusammen mit HSF1-TAP in dieser Arbeit isoliert werden konnten. Das hier detektierte mRNA-bindende Protein ELAVL1 interagiert ebenfalls mit hnRNPs und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Splicings (Izquierdo, 2008; Mukherjee *et al.*, 2011).

Möglicherweise werden prä-mRNA-bindende Proteine und Faktoren des Splicing-Komplexes entweder direkt oder durch HSC70 oder andere Faktoren im Nukleus an HSF1 rekrutiert, um die HSF1-induzierten RNA-Transkripte, wie zum Beispiel RNA von Hitzeschock-Proteinen, sofort prozessieren zu können. Studien belegen, dass beispielsweise Transkripte des durch HSF1 induzierbaren Gens *Hsp90α* durch Splicing prozessiert werden müssen (Jolly *et al.*, 1999). Alternative Splicing-Vorgänge unter Hitzeschock bewirken außerdem, dass es zur Expression zwei verschiedener Isoformen von HSP105 kommt (Yamagishi *et al.*, 2009). Die schnelle Prozessierung der Transkripte von HSPs ist unter Stressbedingungen für das Überleben von Zellen von zentraler Bedeutung.

Dass bestimmte Splicing-Faktoren unter Hitzeschock in Bereichen lokalisiert werden, in denen eine HSF1/DNA-Bindung stattfindet, konnte bereits in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden (Weighardt *et al.*, 1999; Jolly *et al.*, 1999). Unter Hitzeschock kommt es im Nukleus humaner Zellen zur Bildung von nukleären Stresskörperchen. Die Bildung dieser subnukleären Organellen wird durch die direkte Interaktion zwischen HSF1 und den perizentrischen Tandemwiederholungen von Satellit III (Sat III) Sequenzen initiiert und korrespondiert mit aktiven Transkriptionsbereichen für nicht-kodierende Satellit III Transkripte. Neben HSF1 konnte auch HSF2 in diesen nukleären Strukturen gefunden werden (Denegri *et al.*, 2002; Alastalo *et al.*, 2003). Es ist ebenfalls bekannt, dass eine Reihe RNA-bindender Proteine, wie die hnRNPs HAP (hnRNP A1-interagierendes Protein) und hnRNP M, sowie die Splicing-Faktoren der SR (Serin-Arginin-reichen) Familie SF2, SRp30 und 9G8 in nukleäre

Stresskörpern rekrutiert werden (Weighardt *et al.*, 1999; Jolly *et al.*, 1999; Denegri *et al.*, 2001). Splicing-Faktoren aus der snRNP Familie konnten bisher nicht in nSK detektiert werden. Metz *et al.* wiesen 2004 jedoch nach, dass Sat III Transkripte, ebenso wie Transkripte des Gens Hsp90 $\alpha$ , zusammen mit snRNP-Splicing-Komplexen unter Hitzeschock-Bedingungen interagieren und durch diese prozessiert werden können. Die Splicing-Maschinerie scheint somit in Bereiche des Nukleus rekrutiert zu werden, in denen HSF1 funktionell aktiv ist. Ob neben HAP und hnRNP M noch weitere hnRNP-Mitglieder in nSK rekrutiert werden, ist bis zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt. Da hnRNPs miteinander interagieren, liegt es nahe, dass durch die Lokalisation der bereits bekannten hnRNPs in nSK auch andere Faktoren dieser Proteinfamilie rekrutiert werden könnten. Möglicherweise spielen die hier isolierten Proteine hnRNP R, U und A0 in diesen subnukleären Strukturen ebenfalls eine Rolle und sind durch direkte Interaktion für die Rekrutierung von snRNP-Komplexen verantwortlich.

Die Isolation von Splicing-Faktoren zusammen mit HSF1-TAP in dieser Arbeit gibt neue Hinweise darauf, dass das Hitzeschockantwort in enger Interaktion mit der Splicing-Maschinerie im Nukleus steht. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass Splicing-Faktoren an HSF1 rekrutiert werden, um eine sofortige Prozessierung der Transkripte von Hitzeschock-Proteinen zu gewährleisten, andererseits könnte HSF1 selbst an Splicing-Prozessen beteiligt sein. Für eine spezifische Funktion von HSF1 in Splicing-Vorgängen gibt es bis jetzt jedoch noch keine Hinweise. Im Allgemeinen wurde angenommen, dass Hitzeschock zu einer generellen Inhibition von Splicing in Zellen führt. Die Interaktion von HSF1 mit Splicing-Faktoren legt jedoch ein Modell nahe, in dem die Rekrutierung der Splicing-Maschinerie an HSF1 und HSF1-enthaltende Granula im Nukleus durch Hitzeschock möglicherweise zu einer Feinregulation von Splicing-Prozessen beiträgt. Es besteht die Möglichkeit, dass unter Hitzestress-Bedingungen die allgemeine Splicing-Tätigkeit im Nukleus eingestellt wird und Splicing-Faktoren zu Transkripten rekrutiert werden, deren Expression für die Aufrechterhaltung der zellulären Funktion essentiell sind.



**Abbildung 5.1: Schematische Darstellung der Interaktionen von Proteinen HSF1-TAP-enthaltender Komplexe**  
 Die Interaktion der zusammen mit HSF1-TAP isolierten Proteine wurde schematisch dargestellt. Orange umrandete Proteine sind Mitglieder nukleärer Stresskörperchen, rot umrandete Proteine gehören zum U5 snRNP Komplex und blau umrandete Proteine bilden unter anderem den hnRNP-Komplex (Ribonucleosom). Hellgelb hinterlegte Proteine wurden nicht in den hier durchgeführten Aufreinigungen detektiert, stellen jedoch essentielle Verbindungsbrücken zwischen einzelnen Proteinen dar. HSP: Hitzeschock-Protein; hnRNP: heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein; snRNP: kleines nukleäres Ribonukleoprotein

### 5.2.6 HSF1-TAP enthaltende Komplexe können aus Mausleber isoliert werden und endogenes HSF1 funktionell ersetzen

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnte nachgewiesen werden, dass sich C-terminal TAP-gekoppeltes HSF1 in Zellen funktionell wie endogenes HSF1 verhält. Unter normalen Bedingungen lag HSF1-TAP diffus im Zytoplasma und Nucleus verteilt vor.

Wurden die Zellen einem Hitzeschock unterzogen, bildete HSF1-TAP Homo- oder Heterotrimeren mit endogenem HSF1 und HSF2, war in der Lage posttranslational modifiziert zu werden und akkumulierte im Zellkern. Dort konnte es die Transkription des Zielgens *Hspa1b*, einem Mitglied der HSP70-Chaperonfamilie, aktivieren. Durch die Analyse von HSF1-TAP enthaltenden Komplexen konnte nachgewiesen werden, dass HSF1 durch eine Reihe bekannter Interaktionspartner gebunden wird. Zusätzlich konnten Proteine isoliert werden, die bisher nicht als HSF1-Interaktionspartner bekannt waren und vor allem im Bereich der mRNA-Prozessierung eine wichtige Rolle übernehmen. Anhand dieser Ergebnisse war es möglich durch die Firma TaconicArtemis eine transgene Maus generieren zu lassen, die TAP-fusioniertes HSF1 konditional unter der Kontrolle des *Rosa26*-Promotors exprimiert.

Die Analyse der Expression von HSF1 in Gesamtzellextrakten von Mausleber zeigte, dass HSF1-TAP in Mäusen eine ähnliche Expressionsstärke wie endogenes HSF1 besitzt. Die Tandem-Affinitätsaufreinigung von HSF1 aus Mausleberextrakten erbrachte eine Isolierung von HSF1-TAP zusammen mit interagierenden Proteinen. Die Doppelbanden im Silbergel auf Höhe von ca. 70 kDa lassen vermuten, dass Mitglieder der HSP70-Chaperonfamilie zusammen mit HSF1 isoliert wurden, die zuvor bereits in Aufreinigungen von HSF1-TAP aus Zellen detektiert werden konnten. Das Bandenmuster von HSF1-TAP in Western Blot Analysen wies außerdem nach, dass HSF1-TAP wahrscheinlich hyperphosphoryliert vorlag. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass auch in Mäusen TAP-gekoppeltes HSF1 funktionell aktiv ist, posttranslational modifiziert werden kann und an regulatorische Interaktionspartner bindet.

Aufgrund der Tatsache, dass TAP-fusioniertes HSF1 in Mausleberzellen eine ähnliche Expressionsstärke wie endogenes HSF1 besitzt, wurde durch Kreuzungsexperimente *Hsf1*-TAP in den genetischen Hintergrund *Hsf1*-defizienter Mäuse gebracht.

Weibliche *Hsf1*<sup>-/-</sup> Mäuse sind in der Lage Oozyten zu produzieren, können jedoch keine lebensfähigen Embryos bilden (Xiao *et al.*, 1999). Die induzierbare HSP90-Isoform HSP90 $\alpha$  wird in Oozyten dieser Mäuse nicht exprimiert. Oozyten, denen HSP90 $\alpha$  fehlt, weisen eine partielle Inhibition der Meiose I und einen Defekt der asymmetrischen Zellteilung auf (Metchat *et al.*, 2009). Weibliche Mäuse, die HSF1-TAP im genetischen *Hsf1*<sup>-/-</sup> Hintergrund exprimierten, waren wieder in Lage lebensfähige Nachkommen zu generieren. Diese Beobachtung gibt

einen weiteren Hinweis darauf, dass TAP-fusioniertes HSF1 das endogene Protein funktionell ersetzen kann.

### 5.2.7 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen belegen, dass TAP-gekoppeltes HSF1 in transgenen Zelllinien und Zellen von Mäusen die Funktion von endogenem HSF1 ersetzen kann. HSF1-TAP lag unter normalen Bedingungen diffus im Zytoplasma und Nukleus verteilt vor und konnte durch proteotoxischen Stress aktiviert werden. Die Behandlung transgener Zellen mit erhöhten Temperaturen führte zur Bildung von Homo- oder Heterotrimeren mit endogenem HSF1 oder HSF2 und zu einer Akkumulation im Nukleus. Dort war die Aktivierung des essentiellen HSF1-Zielgens *Hspa1b* durch HSF1-TAP möglich. TAP-gekoppeltes HSF1 war außerdem in der Lage mit bekannten Bindungspartnern zu interagieren. Die Bindung an verschiedene Proteine, wie zum Beispiel Hitzeschock-Faktoren, stellt einen wichtigen Schritt in der Regulation von HSF1 dar.

Dass HSF1-TAP *in vivo* die Funktion von endogenem HSF1 zu ersetzen scheint, wurde durch Verpaarungsexperimente mit *Hsf1*<sup>-/-</sup> Mäusen klar. *Hsf1*<sup>-/-</sup> Mäuse waren durch die Expression von HSF1-TAP wieder in der Lage lebensfähige Nachkommen zu generieren. Obwohl der an HSF1 gekoppelte TAP-Tag eine Größe von ca. 20 kDa besitzt, scheint dieser die Funktion, Modifikation und Bindungskapazität von HSF1 nicht oder kaum zu beeinträchtigen. Durch die Bindung von HSF1 an den TAP-Tag war es möglich, neue Interaktionspartner von HSF1 zu detektieren und neue Hinweise auf eine Interaktion zwischen HSF1 und der Splicing-Maschinerie von Zellen zu geben.

In dieser Arbeit konnte somit die Grundlage geschaffen werden, um den Zusammenhang zwischen HSF1 und der zirkadianen Uhr näher zu beleuchten. In zukünftigen Analysen sollen HSF1-enthaltende Komplexe aus Mauslebern zu unterschiedlichen Uhrzeiten isoliert werden, um dadurch Interaktionspartner identifizieren zu können, die in der zirkadianen Regulation von HSF1 involviert sind. Es sollen Zeitpunkte gewählt werden, die der minimalen bzw. maximalen zirkadianen Aktivität von HSF1 entsprechen. Die Unterschiede in der Zusammensetzung HSF1-assoziiierter Komplexe, sowie posttranslationale Modifikationen, wie Sumoylierung, Phosphorylierung oder Acetylierung sind dabei von besonderem Interesse und stellen

naheliegende Regulationsmechanismen dar, über die HSF1 selbst rhythmisch gesteuert wird und den zirkadianen Oszillator beeinflussen könnte.

## 6 Literatur

- Abravaya K, Myers MP, Murphy SP, Morimoto RI.** (1992) The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev.* 6(7):1153-64
- Acharya P., Kumar R., Tatu U.** (2007). Chaperoning a cellular upheaval in malaria: heat shock proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 153(2):85-94
- Adachi H., Katsuno M., Waza M., Minamiyama M., Tanaka F., Sobue G.** (2009) Heat shock proteins in neurodegenerative diseases: pathogenic roles and therapeutic implications. *Int J Hyperthermia* 25(8):647-54
- Adenis A, Ray-Coquard I, Italiano A, Chauzit E, Bui-Nguyen B, Blay JY, Tresch-Bruneel E, Fournier C, Clisant S, Amela EY, Cassier PA, Molimard M, Penel N.** (2013) A dose-escalating phase I of imatinib mesylate with fixed dose of metronomic cyclophosphamide in targeted solid tumours. *Br J Cancer.* 109(10):2574-8
- Ahn S. G., Thiele D. J.** (2003). Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. *Genes Dev.* 17:516–28
- Ahn SG, Kim SA, Yoon JH, Vaccratsis P.** (2005) Heat-shock cognate 70 is required for the activation of heat-shock factor 1 in mammalian cells. *Biochem J.* 392(Pt 1):145-52
- Åkerfelt M., Morimoto R. I., Sistonen L.** (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:545-55
- Åkerfelt M., Trouillet D., Mezger V., Sistonen, L.** (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1113, 15–27
- 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[7]: 1055-1064
- Ali A., Bharadwaj S., O'Carroll R., Ovsenek N.** (1998) HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4949–4960
- Altieri DC, Stein GS, Lian JB, Languino LR.** (2012) TRAP-1, the mitochondrial Hsp90. *Biochim Biophys Acta.* 1823(3):767-73
- Alvarez J. D., Sehgal A.** (2005). The thymus is similar to the testis in its pattern of circadian clock gene expression. *J. Biol. Rhythms* 20:111–21
- Anckar J., Sistonen L.** (2007). Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594, 78–88
- Anckar J., Sistonen L.** (2011). Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem.* 80:1089-115.

**Anfinsen C.B.** (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181, 223-230

**Aregbe AO, Sherer EA, Egorin MJ, Scher HI, Solit DB, Ramanathan RK, Ramalingam S, Belani CP, Ivy PS, Bies RR.** (2012) Population pharmacokinetic analysis of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) in adult patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 70(1):201-5

**Aschoff, J.** (1965). Circadian rhythms in man. A self-sustained oscillator with inherent frequency underlies human 24-hour periodicity. *Science* 184: 1427-1432

**Asher G., Gatfield D., Stratmann M., Reinke H., Dibner C., Kreppel F., Mostoslavsky R., Alt F.W., Schibler U.** (2008). SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 134, 317–328

**Baggs J.E., Price T.S., DiTacchio L., Panda S., Fitzgerald G.A., Hogenesch J.B.** (2009) Network features of the mammalian circadian clock. *Plos Biology*, 7, e52

**Baler R., Dahl G., Voellmy R.** (1993). Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2486–2496

**Baler R., Welch W. J., Voellmy R.** (1992). Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J. Cell Biol.* 117, 1151–1159

**Balsalobre A., Brown S.A., Marcacci L., Tronche F., Kellendonk C. et al.** (2000). Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289 :2344-47

**Balsalobre A., Damiola F., Schibler U.** (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 12;93(6):929-37

**Barrett R.K., Page T.L.** (1989) Effects of light on circadian pacemaker development. I. The freerunning period. *J Comp Physiol A.* 165(1):41-9

**Bedin M, Gaben AM, Saucier C, Mester J.** (2004) Geldanamycin, an inhibitor of the chaperone activity of HSP90, induces MAPK-independent cell cycle arrest. *Int J Cancer.* 109(5):643-52.

**Belenky P, Bogan KL, Brenner C.** (2007) NAD<sup>+</sup> metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci.* 32(1):12-9

**Bharadwaj S., Ali A., Ovsenek N.** (1999). Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8033–8041

**Biello SM.** (2009) Circadian clock resetting in the mouse changes with age. *Age (Dordr.)* 31(4):293-303

- Blumenthal, E. M., Block G. D., Eskin A.** (2001). Cellular and molecular analysis of molluscan circadian pacemakers. In: Handbook of Behavioral Neurobiology Volume 12: Circadian Clocks, Takahashi J. S., Turek F. W., Moore R. Y. (eds.), pp. 371-394. Kluwer Academic/Plenum, New York
- Boothroyd C.E., Wijnen H., Naef F., Saez L., Young M.W.** (2007). Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in *Drosophila*. PLoS Genet 3:e54
- Borkovich K.A., F.W. Farrelly, D.B. Finkelstein, J. Taulien, S. Lindquist** (1989) Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures, Mol. Cell. Biol. 9:3919–3930
- Bos N. P., Mirmiran M.** (1990). Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. Brain Res. 511:158–62
- Bozek K., Relógio A., Kielbasa S. M., Heine M., Dame C., Kramer A., Herzog H.** (2009) Regulation of clock-controlled genes in mammals. PLoS One 4(3):e4882.
- Brown S.A., Kowalska E., Dallmann R.** (2012) (Re)inventing the circadian feedback loop. Dev Cell. 22(3):477-87.
- Brown S. A., Zimbrunn G., Fleury-Olela F., Preitner N., Schibler U.** (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. Curr. Biol. 12:1574–83
- Buhr E.D., Yoo S.H., Takahashi J.S.** (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. Science 330(6002):379-85
- Bukau B.; Weissman J., Horwich A.** (2006). Molecular chaperones and protein quality control. Cell 125:443-451
- Bulman A. L., Hubl S. T., Nelson H. C. M.** (2001).The DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor independently regulates both the N- and C-terminal activation domains. J. Biol. Chem. 276, 40254–40262
- Bunger M. K., Wilsbacher L. D., Moran S. M., Clendenin C., Radcliffe L. A., Hogenesch J. B., Simon M. C., Takahashi J. S., Bradfield C. A.** (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. Cell 103(7): 1009-1017
- Bünning, E.** (1932). Über die Erbllichkeit des Tageszeitperiodizität bei den Phaseolus Blättern. J.wiss.Bot.; 81: 411-418
- Byrne M, Wingard JR, Moreb JS.** (2013) Continuous infusion cyclophosphamide and low-dose total body irradiation is a safe and effective conditioning regimen for autologous transplant in multiple myeloma. Transplant Proc. 2013 Nov;45(9):3361-5
- Cailotto C., Lei J., van der Vliet J., van Heijningen C., van Eden C. G., et al.** (2009). Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver. PLoS One 4:e5650

- Calderwood S. K., Murshid A., Prince T.** (2009). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology*. 55(5):550-8
- Canaple L., Rambaud J., Dkhissi-Benyahya O., Rayet B., Tan N.S., Michalik L., Delaunay F., Wahli W., Laudet V.** (2006). Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock. *Mol. Endocrinol.* 20, 1715–1727
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J.** (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 458:1056-1060
- Cardone L., Hirayama J., Giordano F., Tamaru T., Palvimo J. J., Sassone-Corsi P.** (2005) Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* 26;309(5739):1390-4
- Cermakian N, Lange T, Golombek D, Sarkar D, Nakao A, Shibata S, Mazzocchi G.** (2013) Crosstalk between the circadian clock circuitry and the immune system. *Chronobiol Int.* 30(7):870-88
- Chadli A. et al.** (2000). Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc. Natl Acad. Sci.* 97, 12524–12529
- Chen CF, Chen Y, Dai K, Chen PL, Riley DJ, Lee WH.** (1996) A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock. *Mol Cell Biol.* (9):4691-9
- Chen CH, Kao DI, Chan SP, Kao TC, Lin JY, Cheng SC.** (2006) Functional links between the Prp19-associated complex, U4/U6 biogenesis, and spliceosome recycling. *RNA*. 12(5):765-74
- Chen R., Schirmer A., Lee Y., Lee H., Kumar V., Yoo S. H., Takahashi J. S., Lee C.** (2009) Rhythmic PER abundance defines a critical nodal point for negative feedback within the circadian clock mechanism. *Mol Cell.* 13;36(3):417-30
- Chen Y., Barlev N. A., Westergaard O., Jakobsen B. K.** (1993). Identification of the C-terminal activator domain in yeast heat shock factor: independent control of transient and sustained transcriptional activity. *EMBO J.* 12, 5007–5018
- Christians E., Davis A. A., Thomas S. D., Benjamin, I. J.** (2000). Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* 407, 693–694
- Citri A., D. Harari, G. Shohat, P. Ramakrishnan, J. Gan, S. Lavi, M. Eisenstein, A. Kimchi, D. Wallach, S. Pietrokovski, Y. Yarden** (2006) Hsp90 recognizes a common surface on client kinases, *J. Biol. Chem.* 281, 14361–14369
- Collier NC, Schlesinger MJ.** (1986) The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *J Cell Biol.* 103(4):1495-507
- Crick F.H.** (1958). On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12,138-163

- Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G.** (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 79(2):129-68
- Csermely P., et al.** (1993) ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J. Biol. Chem.* 268, 1901–1907
- Csermely P., T. Schnaider, C. Soti, Z. Prohaszka, G. Nardai** (1998). The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review, *Pharmacol. Ther.* 79:129–168
- Damberger F. F., Pelton J. G., Harrison C. J., Nelson, H. C. M., Wemmer, D. E.** (1994) Solution structure of the DNA-binding domain of the heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.* 3, 1806–1821
- Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F., Schibler U.** (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* 14:2950–61
- Darwin, C.** (1880). *The power of movement in plants.*
- de Candolle, A.P.** (1832). *Physiologie Végétale.* (Paris: Bechet Jeune).
- De Mairan, J. J.** (1729). *Observation botanique.* L'Histoire de l'Academie Royale Scientifique, pp. 47-48
- DeBoer C., Meulman P.A., Wnuk R.J., Peterson D.H.** (1970) Geldanamycin, a new antibiotic. *J Antibiot (Tokyo).* 9:442-7
- DeBruyne J. P., Weaver D. R., Reppert S. M.** (2007) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature Neurosci.* 10,543–545
- Deguchi T.** (1978) Ontogenesis of circadian rhythm of melatonin synthesis in pineal gland of rat. *J Neural Transm Suppl.* (13):115-28
- Delmotte P., Delmotte-Plaquet J.** (1953). A new antifungal substance of fungal origin. *Nature* 171(4347):344
- Dezwaan D.C., B.C. Freeman** (2008). HSP90: the Rosetta stone for cellular protein dynamics? *Cell Cycle* 7:1006–1012.
- Dibner C., Schibler U., Albrecht U.** (2010). The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu.Rev.Physiol.* 72:517-549

**Dmochewitz L., M. Lillich, E. Kaiser, L.D. Jennings, A.E. Lang, J. Buchner, G. Fischer, K. Aktories, R.J. Collier, H. Barth** (2011) Role of CypA and Hsp90 in membrane translocation mediated by anthrax protective antigen, *Cell. Microbiol.* 13, 359–373

**Doi M., Hirayama J., Sassone-Corsi P.** (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* 125:497–508

**Dudley CA, Erbel-Sieler C, Estill SJ, Reick M, Franken P, Pitts S, McKnight SL.** (2003) Altered patterns of sleep and behavioral adaptability in NPAS2-deficient mice. *Science.* 301(5631):379-83

**Duina A. A., Kalton H. M., Gaber R. F.** (1998). Requirement for Hsp90 and a CyP-40-type cyclophilin in negative regulation of the heat shock response. *J. Biol. Chem.* 273, 18974–18978

**Eckel-Mahan KL, Patel VR2, de Mateo S, Orozco-Solis R, Ceglia NJ, Sahar S, Dilag-Penilla SA, Dyar KA, Baldi P, Sassone-Corsi P.** (2013) Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell.* 155(7):1464-78

**Edgar R. S., Green E. W., Zhao Y., van Ooijen G., Olmedo M., Qin X., Xu Y., Pan M., Valekunja U. K., Feeney K. A., Maywood E. S., Hastings M. H., Baliga N. S., Meroow M., Millar A. J., Johnson C. H., Kyriacou C. P., O'Neill J. S., Reddy A. B.** (2012) Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 485:459–464

**Egorin MJ, Lagattuta TF, Hamburger DR, Covey JM, White KD, Musser SM, Eiseman JL.** (2002) Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 49(1):7-19

**Eide E. J., Woolf M. F., Kang H., Woolf P., Hurst W., Camacho F., Vielhaber E. L., Giovanni A., Virshup D. M.** (2005) Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol Cell Biol.* 25:2795–2807

**Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A. & Virshup, D. M.** (2002). The circadian regulatory protein BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I1 (CKI1). *J. Biol. Chem.* 277, 17248–17254

**Ellis J.** (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 1987, 328, 378-379.

**Falsone S.F., S. Leptihn, A. Osterauer, M. Haslbeck, J. Buchner** (2004) Oncogenic mutations reduce the stability of SRC kinase, *J. Mol. Biol.* 344, 281–291

**Fabrizio P, Laggerbauer B, Lauber J, Lane WS, Lührmann R.** (1997) An evolutionarily conserved U5 snRNP-specific protein is a GTP-binding factor closely related to the ribosomal translocase EF-2. *EMBO J.* 16(13):4092-106.

**Farkas T., Kutsikova Y. A., Zimarino V.** (1998). Intramolecular repression of mouse heat shock factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 18:906–18

- Felts S.J., B.A. Owen, P. Nguyen, J. Trepel, D.B. Donner, D.O. Toft** (2000). The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties, *J. Biol. Chem.* 275:3305–3312
- Field M. D., Maywood E. S., O'Brien J. A., Weaver D. R., Reppert S. M., Hastings M. H.** (2000) Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron.* 25:437–447
- Francis C.D., Sargent M.L.** (1979). Effects of temperature perturbations on circadian conidiation in *neurospora*. *Plant Physiol* 64: 1000–1004
- 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.
- Fujimoto M. et al.** (2010). A novel mouse HSF3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock. *Mol. Biol. Cell* 21, 106–116
- Fukuyama T., Doi M., Matsuo M., Nishinaga H., Miyake S., Okamura H.** (2008). Circadian expression of 86- and 84-kDa heat shock proteins in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Biomed Res.* 29(2):93-8
- Gabai V.L., Meng L., Kim G., Mills T.A., Benjamin I.J., Sherman M.Y.** (2011) Heat Shock Transcription Factor Hsf1 Is Involved in Tumor Progression via Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 and RNA-Binding Protein HuR. *Mol Cell Biol.* 32(5):929-40
- Gachon F., Nagoshi E., Brown S. A., Ripperger J., Schibler U.** (2004). The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma* 113:103–12
- Gachon F., Olela F. F., Schaad O., Descombes P., Schibler U.** (2006). The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab.* 4:25–36
- Garcia-Carbonero R, Carnero A, Paz-Ares L.** (2013) Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol.* 14(9):e358-69
- Garcia-Cardena G., R. Fan, V. Shah, R. Sorrentino, G. Cirino, A. Papapetropoulos, W.C. Sessa** (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90, *Nature* 392:821–824
- Gava L., Ramos C.H.I.** (2009). Human 90 kDa heat shock protein Hsp90 as a target for cancer therapeutics. *Curr Chem Biol.* 3:330–41
- Gekakis N., Staknis D., Nguyen H. B., Davis F. C., Wilsbacher L. D., King D. P., Takahashi J. S., Weitz C. J.** (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280(5369): 1564-1569

- Geller R., M. Vignuzzi, R. Andino, J. Frydman** (2007) Evolutionary constraints on chaperone-mediated folding provide an antiviral approach refractory to development of drug resistance, *Genes Dev.* 21, 195–205
- Glaser FT, Stanewsky R.** (2005) Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Curr Biol.* 15(15):1352-63
- Godinho S. I., Maywood E. S., Shaw L., Tucci V., Barnard A. R., Busino L., Pagano M., Kendall R., Quwailid M. M., Romero M. R., O'neill J., Chesham J. E., Brooker D., Lalanne Z., Hastings M. H., Nolan P. M.** (2007). The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period. *Science* 316:897–900.
- Golden S. S. and Canales, S. R.** (2003) Cyanobacterial circadian clocks--timing is everything. *Nat.Rev.Microbiol.* 1(3): 191-199
- Golden, S., Ishiura M., Johnson C. H., Kondo T.** (1997). Cyanobacterial circadian rhythms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 327-354
- Goodson M. L., Sarge K. D.** (1995). Heat-inducible DNA binding of purified heat shock transcription factor 1. *J. Biol. Chem.* 270:2447–50
- Gorbacheva VY, Kondratov RV, Zhang R, Cherukuri S, Gudkov AV, Takahashi JS, Antoch MP.** (2005) Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(9):3407-12
- Gottschalk A, Kastner B, Lührmann R, Fabrizio P.** (2001) The yeast U5 snRNP coisolated with the U1 snRNP has an unexpected protein composition and includes the splicing factor Aar2p. *RNA.* 7(11):1554-65.
- Graham G., Sharp P.J., Li Q., Wilson P.W., Talbot R.T., Downing A., Boswell T.** (2009) HSP90B1, a thyroid hormone-responsive heat shock protein gene involved in photoperiodic signaling. *Brain Research Bulletin*, 79, 201-207.
- Green D. J., Gillette R.** (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245:198–200
- Green M., Schuetz T. J., Sullivan E. K., Kingston R. E.** (1995) A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3354–3362
- Green CB, Takahashi JS, Bass J.** (2008) The meter of metabolism. *Cell.* 134(5):728-42.
- Groos G., Hendriks J.** (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci. Lett.* 34:283–88
- Guettouche T., Boellmann F., Lane W. S., Voellmy R.** (2005). Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* 6, 4

- Guillaumond F., Dardente H., Giguère V., Cermakian N.** (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*. 2005; 20:391–403
- Guo H., Brewer J. M., Champhekar A., Harris R. B., Bittman E. L.** (2005). Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:3111–16
- Guo H., Brewer J. M., Lehman M. N., Bittman E. L.** (2006). Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *J. Neurosci.* 26:6406–12
- Guo W., Reigan P., Siegel D., Ross D.** (2008) Enzymatic reduction and glutathione conjugation of benzoquinone ansamycin Hsp90 inhibitors: Relevance for toxicity and mechanism of action. *Drug Metab Dispos.* 36(10):2050-7.
- Guo Y., Guettouche T., Fenna M., Boellmann F., Pratt W. B., et al.** (2001). Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J. Biol. Chem.* 276:45791–99
- Hainzl O., Lapina M. C., Buchner J., Richter K.** (2009). The charged linker region is an important regulator of Hsp90 function. *J. Biol. Chem.* 284, 22559–22567
- Hardie D.G., Hawley S.A., Scott J.W.** (2006) AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol.* 574(Pt 1):7-15.
- Hardin P. E** (2005). The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Curr.Biol.*15(17):714-722
- Harrison C. J., Bohm A. A., Nelson H. C. M.** (1994) Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* 263, 224–227
- Hartl F. U., Hayer-Hartl M.** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295:1852-1858
- Hastings M. H., Field M. D., Maywood E. S., Weaver D. R., Reppert S. M.** (1999). Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J. Neurosci.* 19:RC11
- Havugimana PC, Hart GT, Nepusz T, Yang H, Turinsky AL, Li Z, Wang PI, Boutz DR, Fong V, Phanse S, Babu M, Craig SA, Hu P, Wan C, Vlasblom J, Dar VU, Bezginov A, Clark GW, Wu GC, Wodak SJ, Tillier ER, Paccanaro A, Marcotte EM, Emili A.** (2012) A census of human soluble protein complexes. *Cell.* 150(5):1068-81
- He H, Soncin F, Grammatikakis N, Li Y, Siganou A, Gong J, Brown SA, Kingston RE, Calderwood SK.** (2003) Elevated expression of heat shock factor (HSF) 2A stimulates HSF1-induced transcription during stress. *J. Biol. Chem.* 278(37);35465-75

- Helfrich-Forstser, C.** (1995). The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells with the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 612-616
- Herzog E.D., Huckfeldt R.M.** (2003). Circadian entrainment to temperature, but not light, in the isolated suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 90: 763–770
- Hessling M., Richter K., Buchner J.** (2009). Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16, 287–293
- Hietakangas V. et al.** (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2953–2968
- Hietakangas, V. et al.** (2006) PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 45–50
- Hirayama J., Sahar S., Grimaldi B., Tamaru T., Takamatsu K., Nakahata Y., Sassone-Corsi P.** (2007) CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature* 13;450(7172):1086-90
- Hogenesch J. B., Gu Y. Z., Jain S., Bradfield C. A.** (1998) The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci* 95:5474–5479
- Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA.** (1997) Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem.* 272(13):8581-93
- Holmberg C. I. et al.** (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* 20, 3800–3810
- Howard K.J., S.J. Holley, K.R. Yamamoto, C.W. Distelhorst** (1990) Mapping the HSP90 binding region of the glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.* 265:11928–11935
- Hung H.C., Kay S.A., Weber F.** (2009). HSP90, a capacitor of behavioral variation. *J Biol Rhythms.* 24(3):183-92
- Inoue I., Shinoda Y., Ikeda M., Hayashi K., Kanazawa K., Nomura M., Matsunaga T., Xu H., Kawai S., Awata T., et al.** (2005). CLOCK/BMAL1 is involved in lipid metabolism via transactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element. *J. Atheroscler. Thromb.* 12, 169–174
- Inouye S. T., Kawamura H.** (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5962–66

- Izquierdo JM.** (2008) Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition. *J Biol Chem.* 283(27):19077-84
- Jacklet, J. W., Colquhoun W.** (1983). Ultrastructure of photoreceptors and circadian pacemaker neurons in the eye of a gastropod, *Bulla*. *J. Neurocytol.* 12: 373-396
- Jascur T. et al.,** (2005). Regulation of p21WAF1/CIP1 stability by WISp39, a Hsp90 binding TPR protein. *Mol. Cell* 17:237–249
- Jedlicka P., Mortin M. A., Wu, C.** (1997). Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J.* 16, 2452–2462
- Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, Li Q, Chua G, Poitras C, Therien C, Bergeron D, Bourassa S, Greenblatt J, Chabot B, Poirier GG, Hughes TR, Blanchette M, Price DH, Coulombe B.** (2007) Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol. Cell* 27(2);262-74
- Jhaveri K, Miller K, Rosen L, Schneider B, Chap L, Hannah A, Zhong Z, Ma W, Hudis C, Modi S.** (2012) A phase I dose-escalation trial of trastuzumab and alvespimycin hydrochloride (KOS-1022; 17 DMAG) in the treatment of advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2012 Sep 15;18(18):5090-8
- Johnson C. H.** (2004) Precise circadian clocks in prokaryotic cyanobacteria. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6(2): 103-110
- Johnson C.H., Elliott J., Foster R., Honma K., Kronauer R.** (2003). Fundamental properties of circadian rhythms. In *Chronobiology: biological timekeeping*. pp. 67-105, Sinauer Associates, Sanderland, MA
- Johnson V.A., Singh E.K., Nazarova L.A., Alexander L.D., McAlpine S.R.** (2010). Macrocyclic inhibitors of hsp90. *Curr Top Med Chem.* 14:1380-402
- Jolly C, Vourc'h C, Robert-Nicoud M, Morimoto RI.** (1999) Intron-independent association of splicing factors with active genes. *J Cell Biol.* 145(6):1133-43
- Katschinski D. M.** (2004). On heat and cells and proteins. *News Physiol Sci.* 19:11-5
- Khaleque M. A., et al.** (2008). Heat shock factor 1 represses estrogen-dependent transcription through association with MTA1. *Oncogene* 27, 1886–1893
- Kim D. S., Lee Y., Hahn Y.** (2010). Evidence for bacterial origin of heat shock RNA-1. *RNA* 16(2):274-9
- Kim SA, Yoon JH, Lee SH, Ahn SG.** (2005) Polo-like kinase 1 phosphorylates heat shock transcription factor 1 and mediates its nuclear translocation during heat stress. *J Biol Chem.* 280(13):12653-7

- Kim T.S., Kim W.Y., Fujiwara S., Kim J., Cha J.Y., Park J.H., Lee S.Y., Somers DE.** (2011) HSP90 functions in the circadian clock through stabilization of the client F-box protein ZEITLUPE. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(40):16843-8
- Kline M. P., Morimoto R. I.** (1997). Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 17:2107–15
- 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 Iε. *Cell* 94[1]: 97-107
- Knauf U., Newton E. M., Kyriakis J., Kingston R. E.** (1996). Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. *Genes Dev.* 10:2782–93
- Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J.** (2007) High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab.* 6(5):414-21
- Kondratov R. V., Chernov M. V., Kondratova A. A., et al.** (2003) BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system *Genes Dev* 17: 1921-1932
- Konopka, R. J.; Benzer, S.** (1971). Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68 (9): 2112–2116
- Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U.** (2007) System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol.* (2):e34
- Kovacs J.J., P.J. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J.T. Wu, C.V. Nicchitta, M. Yoshida, D.O. Toft, W.B. Pratt, T.P. Yao** (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor, *Mol. Cell* 18:601–607
- Krecic AM, Swanson MS.** (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol.* 11(3):363-71
- Kregel K. C.** (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 5:2177-86
- Krishna P., G. Gloor** (2001). The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Cell Stress Chaperones* 6:238–246
- Kuhlman SJ, Mackey SR, Duffy JF.** (2007) Biological Rhythms Workshop I: introduction to chronobiology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2007;72:1-6.
- Kume K., Zylka M. J., Sriram S., Shearman L. P., Weaver D. R., Jin X., Maywood E. S., Hastings M. H., Reppert S. M.** (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98:193–205

- Kwon I, Lee J, Chang SH, Jung NC, Lee BJ, Son GH, Kim K, Lee KH.** (2006) BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol Cell Biol.* 26(19):7318-30
- Laggerbauer B, Achsel T, Lührmann R.** (1998) The human U5-200kD DEXH-box protein unwinds U4/U6 RNA duplces in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(8):4188-92.
- Lahiri K, Vallone D, Gondi SB, Santoriello C, Dickmeis T, Foulkes NS.** (2005) Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *PLoS Biol.* 3(11):e351. Epub 2005 Sep 27.
- Lambert JP, Mitchell L, Rudner A, Baetz K, Figeys D.** (2009) A novel proteomics approach for the discovery of chromatin-associated protein networks. *Mol Cell Proteomics.* 8(4):870-82.
- Lamia K. A., Sachdeva U. M., DiTacchio L., Williams E. C., Alvarez J. G., Egan D. F., Vasquez D. S., Juguilon H., Panda S., Shaw R. J., Thompson C. B., Evans R. M.** (2009) AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 326:437–440
- Lamia K. A., Storch K. F., Weit C. J.** (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:15172–77
- Langer T., S. Rosmus, H. Fasold** (2003). Intracellular localization of the 90 kDA heat shock protein (HSP90alpha) determined by expression of a EGFP-HSP90alpha-fusion protein in unstressed and heat stressed 3T3 cells, *Cell Biol. Int.* 27:47–52
- Le Martelot G., Claudel T., Gatfield D., Schaad O., Kornmann B., et al.** (2009). REV-ERB $\alpha$  participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol.* 7:e100018
- Lee A.S.** (1981) The accumulation of three specific proteins related to glucose-regulated proteins in a temperature-sensitive hamster mutant cell line K12. *J Cell Physiol.* 106(1):119-25
- Lee C., Etchegaray J. P., Cagampang F. R., Loudon A. S., Reppert S. M.** (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* 107:855–867.
- Lee C.S., Kim Y.J., Lee S.A., Myung S.C., Kim W.** (2012). Combined effect of Hsp90 inhibitor geldanamycin and parthenolide via reactive oxygen species-mediated apoptotic process on epithelial ovarian cancer cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 111(3):173-81
- Lee P, Kim MS, Paik SM, Choi SH, Cho BR, Hahn JS.** (2013) Rim15-dependent activation of Hsf1 and Msn2/4 transcription factors by direct phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 587(22):3648-55
- Lee J, Lee Y, Lee MJ, Park E, Kang SH, Chung CH, Lee KH, Kim K.** (2008) Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Mol Cell Biol.* 28(19):6056-65

- Lee YJ, Lee HJ, Lee JS, Jeoung D, Kang CM, Bae S, Lee SJ, Kwon SH, Kang D, Lee YS.** (2008) A novel function for HSF1-induced mitotic exit failure and genomic instability through direct interaction between HSF1 and Cdc20. *Oncogene*. 27(21):2999-300
- Lees-Miller S.P., C.W. Anderson** (1989). The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 alpha at two NH2-terminal threonine residues, *J. Biol. Chem.* 264:17275–17280.
- Li J., Soroka J., Buchner J.** (2012) The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim Biophys Acta*. 1823(3):624-35
- Li R., J. Soosairajah, D. Harari, A. Citri, J. Price, H.L. Ng, C.J. Morton, M.W. Parker, Y. Yarden, O. Bernard** (2006) Hsp90 increases LIM kinase activity by promoting its homodimerization, *FASEB J.* 20, 1218–1220
- Li Y., Zhang T., Schwartz S. J., Sun D.** (2009). New developments in Hsp90 inhibitors as anti-cancer therapeutics: mechanisms, clinical perspective and more potential. *Drug Resist Updat.* 12(1-2):17-27
- Lindquist S.** (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151–1191
- Lindquist S., Craig E.A.** (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677
- Littlefield O., Nelson H. C. M.** (1999). A new use for the ‘wing’ of the ‘winged’ helix-turn-helix motif in the HSF-DNA cocrystal. *Nature Struct. Biol.* 6, 464–470
- Liu S., Cai Y., Sothorn R. B., Guan Y., Chan P.** (2007). Chronobiological analysis of circadian patterns in transcription of seven key clock genes in six peripheral tissues in mice. *Chronobiol. Int.* 24:793–820
- Liu Y, Merrow M, Loros JJ, Dunlap JC.** (1998) How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science*. 281(5378):825-9.
- Loison F., Debure L., Nizard P., le Goff P., Michel D., le Dréan Y.** (2006) Up-regulation of the clusterin gene after proteotoxic stress: implication of HSF1-HSF2 heterocomplexes. *Biochem J.* 395(1):223-31
- Lowrey P. L., Shimomura K., Antoch M. P., Yamazaki S., Zemenides P. D., Ralph M. R., Menaker M., Takahashi J. S.** (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 288:483–492
- Luo HR, Moreau GA, Levin N, Moore MJ.** (1999) The human Prp8 protein is a component of both U2- and U12-dependent spliceosomes. *RNA*. (7):893-908.
- Ma YT, Luo H, Guan WJ, Zhang H, Chen C, Wang Z, Li JD.** (2013) O-GlcNAcylation of BMAL1 regulates circadian rhythms in NIH3T3 fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 431(3):382-7

- Ma, Y., Luo, H., Guan, W.J., Zhang, H., Chen, C., Wang, Z. and Li, J.D.** (2013) O-GlcNAcylation of BMAL1 regulates circadian rhythms in NIH3T3 fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431, 382-387
- Mahanta S, Pilla S, Paul S.** (2013) Design of novel Geldanamycin analogue hsp90 alpha-inhibitor in silico for breast cancer therapy. *Med Hypotheses.* 81(3):463-9
- Makarova OV, Makarov EM, Urlaub H, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R.** (2006) A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *EMBO J.* 23(12):2381-91
- Matysiak-Scholze, U. and Nehls, M.** (1997) The structural integrity of ROR a isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR a1 and ROR a4. *Genomics,* 43, 78–84
- McClellan A.J., Y. Xia, A.M. Deutschbauer, R.W. Davis, M. Gerstein, J. Frydman** (2007) Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches, *Cell* 131:121–135
- McClellan, A. J., Scott, M. D., Frydman, J.** (2005 A) Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways. *Cell* 121, 739–748
- McClellan, A. J., Tam, S., Kaganovich, D., Frydman, J.** (2005 B) Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nature Cell Biol.* 7, 736–741
- Mendell J. T.** (2008). miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* 133, 217–222
- Mercier P.A., Winegarden N.A., Westwood J.T.** (1999) Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress. *Journal of Cell Science* 112, 2765-2774
- Metchat A, Akerfelt M, Bierkamp C, Delsinne V, Sistonen L, Alexandre H, Christians ES.** (2009) Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates Hsp90alpha expression. *J Biol Chem.* 284(14):9521-8.
- Metz A, Soret J, Vourc'h C, Tazi J, Jolly C.** (2004) A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J Cell Sci.* 117(Pt 19):4551-8
- Meyer, P. et al.** (2003). Structural and functional analysis of the middle segment of Hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol. Cell* 11, 647–658
- Meyer, T., Kneissel, M., Mariani, J. and Fournier, B.** (2000) In vitro and in vivo evidence for orphan nuclear receptor RORa function in bone metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 97, 9197–9202

- Moore R. Y., Eichler V. B.** (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42:201–6
- Mosser D. D., Kotzbauer P. T., Sarge K. D., Morimoto R. I.** (1990). In vitro activation of heat shock transcription factor DNA-binding by calcium and biochemical conditions that affect protein conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3748–52
- Mukherjee N, Corcoran DL, Nusbaum JD, Reid DW, Georgiev S, Hafner M, Ascano M Jr, Tuschl T, Ohler U, Keene JD.** (2011) Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol Cell.* 43(3):327–39
- Muratani, M., Tansey W. P.** (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:192–201
- Myers, M. P., Wager-Smith, K., Wesley, C. S., Young, M. W., and Sehgal, A.** 1995. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, *timeless*. *Science* 270[5237]: 805-808
- Nadeau K., Das A., Walsh C. T.** (1993). Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases. *J. Biol. Chem.* 268:1479–87
- Nadeau K., Sullivan M. A., Bradley M., Engman D. M., Walsh C. T.** (1992). 83-kilodalton heat shock proteins of trypanosomes are potent peptide-stimulated ATPases. *Protein Sci.* 1, 970–979
- Nagoshi E., Saini C., Bauer C., Laroche T., Naef F., Schibler U.** (2004). Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119:693–705
- Nakahata Y., Kaluzova M., Grimaldi B., Sahar S., Hirayama J., Chen D., Guarente L.P., Sassone-Corsi P.** (2008). The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134, 329–340
- Nakahata Y, Sahar S, Astarita G, Kaluzova M, Sassone-Corsi P.** (2009). Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK–SIRT1. *Science* 324: 654–657.
- Nakai A. et al.** (1997). HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* 17, 469–481
- Nakajima M., Imai K., Ito H., Nishiwaki T., Murayama Y., Iwasaki H., Oyama T., Kondo T.** (2005) Reconstitution of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 308:414–415
- Nakamura TJ, Nakamura W, Yamazaki S, Kudo T, Cutler T, Colwell CS, Block GD.** (2011) Age-related decline in circadian output. *J Neurosci.* 31(28):10201-5
- Neckers L.** (2007). Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *J Biosci.* 32:517–30.

- Newton E. M., Knauf U., Green M., Kingston R. E.** (1996) The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol. Cell. Biol.* 16, 839–846
- Nover L. *et al.*** (2001). Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones* 6, 177–189
- Nuesslein B, Schmidt I.** (1990) Development of circadian cycle of core temperature in juvenile rats. *Am J Physiol.* 259(2 Pt 2):R270-6.
- Nunes SL, Calderwood SK.** (1995) Heat shock factor-1 and the heat shock cognate 70 protein associate in high molecular weight complexes in the cytoplasm of NIH-3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213(1);1-6
- O'Neill J. S., Reddy A. B.** (2011b) Circadian clocks in human red blood cells. *Nature.* 2011; 469:498–503
- O'Neill J. S., van Ooijen G., Dixon L. E., Troein C., Corellou F., Bouget F. Y., Reddy A. B., Millar A. J.** (2011a) Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote. *Nature* 469:554–558
- O'Callaghan EK, Anderson ST, Moynagh PN, Coogan AN.** (2012) Long-lasting effects of sepsis on circadian rhythms in the mouse. *PLoS One.* 7(10):e47087
- Ohno T, Onishi Y, Ishida N.** (2007) A novel E4BP4 element drives circadian expression of mPeriod2. *Nucleic Acids Res.* 35:648–655
- Oishi K., Sakamoto K., Okada T., Nagase T., Ishida N.** (1998) Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;253(2):199-203
- Oishi K, Shirai H, Ishida N.** (2005) CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J.* 386(Pt 3):575-81.
- Oster H., Damerow S., Kiessling S., Jakubcakova V., Abraham D., *et al.*** (2006) The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab.* 4:163-173
- Parker C. S., Topol J.** (1984). A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp70 gene. *Cell* 37, 273–283
- Patton JG, Porro EB, Galceran J, Tempst P, Nadal-Ginard B.** (1993) Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev.* (3):393-406.
- Pearl L. H., Prodromou C.** (2006). Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 271–294

- Pearl L. H., Prodromou C., Workman P.** (2008). The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J.* 410:439–53
- Pelham H. R. B.** (1982). A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell* 30, 517–528
- Phelan ML, Sif S, Narlikar GJ, Kingston RE.** (1999) Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell.* 3(2):247-53
- Picard D., B. Khursheed, M.J. Garabedian, M.G. Fortin, S. Lindquist, K.R. Yamamoto** (1990) Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo, *Nature* 348, 166–168
- Pittendrigh C. S.** (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25:159–84
- Pittendrigh, C. S.** (1967). Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A;* 58[4]: 1762-1767
- Prahlad V., Cornelius T., Morimoto R.I.** (2008). Regulation of the cellular heat shock response in *Caenorhabditis elegans* by thermosensory neurons. *Science* 320:811–14
- Prahlad V., Morimoto R. I.** (2009). Integrating the stress response: lessons for neurodegenerative diseases from *C. elegans*. *Trends Cell Biol.* 19, 52–61
- Pratt W. B., D.O. Toft** (2003). Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery, *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 228:111–133
- Pratt W. B., Toft D. O.** (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* 18, 306–360
- Pratt W.B., F.C. Dalman, S. Meshinchi, L.C. Scherrer** (1990) The relationship between glucocorticoid receptor binding to Hsp90 and receptor function, *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 66, 1185–1197
- Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U., Schibler U.** (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251–260
- Prodromou C. et al.** (2000). The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular ‘clamp’ via transient dimerization of the N-terminal domains. *EMBO J.* 19, 4383–4392
- Prodromou C., Roe S. M., Piper P. W., Pearl L. H.** (1997). A molecular clamp in the crystal structure of the N-terminal domain of the yeast Hsp90 chaperone. *Nature Struct. Biol.* 4, 477–482
- Pshenichkin S, Surin A, Surina E, Klauzińska M, Grajkowska E, Luchenko V, Dolińska M, Wroblewska B, Wroblewski JT.** (2011) Heat shock enhances CMV-IE promoter-driven

metabotropic glutamate receptor expression and toxicity in transfected cells. *Neuropharmacology*. 60(7-8):1292-300

**Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B.** (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*. 24(3):218-29.

**Rabindran S. K., Haroun R. I., Clos J., Wisniewski J., Wu C.** (1993). Regulation of heat shock factor trimerformation: role of a conserved leucine zipper. *Science* 259, 230–234

**Rakhshandehroo M., Knoch B., Müller M., Kersten S.** (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Res.* 10.1155/2010/612089

**Ralph M. R., Foster R. G., Davis F. C., Menaker M.** (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975–78

**Ralph M. R., Menaker M.** (1988). A mutation of the circadian system in golden hamsters. *Science* 241:1225–1227

**Ramsey KM, Yoshino J, Brace CS, Abrassart D, Kobayashi Y, Marcheva B, Hong HK, Chong JL, Buhr ED, Lee C, et al.** (2009). Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD<sup>+</sup> biosynthesis. *Science* 324: 651–654.

**Reick M., Garcia J. A., Dudley C., McKnight S. L.** (2001) NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* 293, 506–509

**Reinke H., Saini C., Fleury-Olela F., Dibner C., Benjamin I.J., Schibler U.** (2008). Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes Dev.* 22(3):331-45

**Rensing L., Bos A., Kroeger J., Cornelius G.** (1987). Possible link between circadian rhythm and heat shock response in *Neurospora crassa*. *Chronobiol Int.* 4:543-9

**Rensing L, Ruoff P.** (2002) Temperature effect on entrainment, phase shifting, and amplitude of circadian clocks and its molecular bases. *Chronobiol Int.* 19(5):807-64.

**Richter K., M. Haslbeck, J. Buchner** (2010). The heat shock response: life on the verge of death, *Mol. Cell* 40:253–266

**Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B.** (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* 1999 Oct;17(10):1030-2.

**Ripperger JA, Schibler U.** (2006) Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nat Genet.* (3):369-74. Epub 2006 Feb 12

- Ritossa F.** (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571–573
- Roe S.M., Prodromou C., O'Brien R., Ladbury J.E., Piper P.W., Pearl L.H.** (1999). Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem.* 42(2):260-6
- Roy SW, Gilbert W.** (2006) The evolution of spliceosomal introns: patterns, puzzles and progress. *Nat Rev Genet.* 7(3):211-21
- Rutila, J. E., Suri, V., Le, M., So, W. V., Rosbash, M., and Hall, J. C.** 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93[5]: 805-814
- Sahar S., Zocchi L., Kinoshita C., Borrelli E., Sassone-Corsi P.** (2010). Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation. *PLoS One.* 1;5(1):e8561
- Saini C., Morf J., Stratmann M., Gos P., Schibler U.** (2012). Simulated body temperature rhythms reveal the phase-shifting behavior and plasticity of mammalian circadian oscillators. *Genes Dev.* 26(6):567-80
- Sanada, K., Okano, T. & 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
- Sandqvist A., Björk J. K., Akerfelt M., Chitikova Z., Grichine A., et al.** (2009). Heterotrimerization of heatshock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol. Biol. Cell* 20:1340–47
- 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., 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
- Santos S. D., Saraiva M. J.** (2004) Enlarged ventricles, astrogliosis and neurodegeneration in heat shock factor 1 null mouse brain. *Neuroscience* 126, 657–663
- Sarge K. D., Murphy S. P., Morimoto R. I.** (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1392–1407
- Sato T. K., Panda S., Miraglia L. J., Reyes T. M., Rudic R. D., McNamara P., Naik K. A., FitzGerald G. A., Kay S. A., Hogenesch J. B.** (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron.* 43:527–537

- Sato T. K., Yamada R. G., Ukai H., Baggs J. E., Miraglia L. J., Kobayashi T. J., Welsh D. K., Kay S. A., Ueda H. R., Hogenesch J. B.** (2006) Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nat Genet.* 38:312–319
- Schulte T.W., Akinaga S., Soga S., Sullivan W., Stensgard B., Toft D., Neckers L.M.** (1998). Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell Stress Chaperones.* 3(2):100–108
- Schwartz W. J., Gainer H.** (1977). Suprachiasmatic nucleus: use of <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197:1089–91
- Scroggins B.T., K. Robzyk, D. Wang, M.G. Marcu, S. Tsutsumi, K. Beebe, R.J. Cotter, S. Felts, D. Toft, L. Karnitz, N. Rosen, L. Neckers** (2007). An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function, *Mol. Cell* 25:151–159
- Scroggins B.T., L. Neckers** (2007). Post-translational modification of heat-shock protein 90: impact on chaperone function, *Expert Opin. Drug Discov.* 2
- Shames D.S., Minna J.D.** (2008) IP6K2 is a client for HSP90 and a target for cancer therapeutics development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(5):1389-90
- Shamovsky I., Ivannikov M., Kandel E. S., Gershon D., Nudler E.** (2006). RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. *Nature* 440:556–60
- Shein H.M., Enders J.F.** (1962) Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 15;48:1164-72
- Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI.** (1998) Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12(5);654-66
- Shibata S., Oomura Y., Kita H., Hattori K.** (1982). Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res.* 247:154–58
- Shim H.Y., X. Quan, Y.S. Yi, G. Jung** (2011) Heat shock protein 90 facilitates formation of the HBV capsid via interacting with the HBV core protein dimers, *Virology* 410, 161–169
- Shimomura O.** (2006) Discovery of green fluorescent protein. *Methods Biochem Anal.* 47:1-13.
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y.** (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.* 59:223-39.
- Shirogane T., Jin J., Ang X. L., Harper J. W.** (2005) SCF $\beta$ -TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein. *J Biol Chem.* 280:26863–26872

- Shiu R. P., J. Pouyssegur, I. Pastan** (1977). Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:3840–3844
- Siepkas S. M., Yoo S. H., Park J., Song W., Kumar V., Hu Y., Lee C., Takahashi J. S.** (2007). Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell* 129:1011–1023
- Silverstein A. M. et al.** (1997). Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor-hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J. Biol. Chem.* 272, 16224–16230
- Sistonen L, Sarge KD, Morimoto RI.** (1994) Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. *Mol Cell Biol.* (3):2087-99.
- Smith D. F. et al.** (1993). Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol. Cell. Biol.* 13, 869–876
- Smith D.F.** (1993). Dynamics of heat shock protein 90-progesterone receptor binding and the disactivation loop model for steroid receptor complexes, *Mol. Endocrinol.* 7:1418–1429
- Smith D.F., B.A. Stensgard, W.J. Welch, D.O. Toft** (1992) Assembly of progesterone receptor with heat shock proteins and receptor activation are ATP mediated events, *J. Biol. Chem.* 267 1350–1356
- Spengler M. L., Kuropatwinski K. K., Schumer M., Antoch M. P.** (2009). A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation. *Cell Cycle* 15;8(24):4138-46
- Stephan F. K., Zucker I.** (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1583–86
- Stravopodis D.J., Margaritis L.H., Voutsinas G.E.** (2007). Drug-mediated targeted disruption of multiple protein activities through functional inhibition of the Hsp90 chaperone complex. *Curr Med Chem.* 14(29):3122-38
- Street T.O., L.A. Lavery, D.A. Agard** (2011) Substrate binding drives large-scale conformational changes in the hsp90 molecular chaperone, *Mol. Cell* 42, 96–105
- Sujino M., Masumoto K. H., Yamaguchi S., van der Horst G. T., Okamura H., Inouye S. T.** (2003). Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. *Curr. Biol.* 13:664–68
- Sullivan EK, Weirich CS, Guyon JR, Sif S, Kingston RE.** (2001) Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human SWI/SNF. *Mol Cell Biol.* 21(17):5826-37

- Sullivan W. *et al.*** (1997). Nucleotides and two functional states of hsp90. *J. Biol. Chem.* 272, 8007–8012
- 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[6]: 1003-1011
- Supko J.G., Hickman R.L., Grever M.R., Malspeis L.** (1995) Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36(4):305–315
- Taipale M., Jarosz D. F., Lindquist S.** (2010). HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(7):515-28
- Takahashi JS, Hamm H, Menaker M.** (1980) Circadian rhythms of melatonin release from individual superfused chicken pineal glands in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(4):2319-22.
- Takahashi K, Yamada T, Tsukita S, Kaneko K, Shirai Y, Munakata Y, Ishigaki Y, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Sawada S, Oka Y, Katagiri H.** (2013) Chronic mild stress alters circadian expressions of molecular clock genes in the liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 304(3):E301-9
- Taldone T., Sun W., Chiosis G.** (2009). Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 17(6):2225-35
- Tamanini F., Chaves I., Bajek M. I., van der Horst G. T.** (2007) Structure function analysis of mammalian cryptochromes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 72:133-9
- Tamaru T., Hattori M., Honda K., Benjamin I., Ozawa T., Takamatsu K.** (2011). Synchronization of circadian *Per2* rhythms and HSF1-BMAL1:CLOCK interaction in mouse fibroblasts after short-term heat shock pulse. *PLoS One* 6(9):e24521
- Tamaru, T., Isojima Y., Yamada T., Okada M., Nagai K., Takamatsu K.** (2000). Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J. Neurosci.* 20:7525–7530
- Tang D., *et al.*** (2005). Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma in vitro and in tumors in vivo. *Cell Stress Chaperones* 10, 46–58
- 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[6650]: 512-516
- Tian Z.Q., Liu Y., Zhang D., Wang Z., Dong S.D., Carreras C.W., Zhou Y., Rastelli G., Santi D.V., Myles D.C.** (2004) Synthesis and biological activities of novel 17-aminogeldanamycin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12, 5317-5329

- Torres-Farfan C., Seron-Ferre M., Dinet V., Korf H. W.** (2006). Immunocytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein levels in the murine adrenal gland: differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. *J. Pineal Res.* 40:64–70
- Ueda, H.R., Hayashi, S., Chen, W., Sano, M., Machida, M., Shigeyoshi, Y., Ino, M. and Hashimoto, S.** (2005) System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat. Genet.*, 37, 187–192
- Ujino S., S. Yamaguchi, K. Shimotohno, H. Takaku** (2009) Heat-shock protein 90 is essential for stabilization of the hepatitis C virus nonstructural protein NS3, *J. Biol. Chem.* 284, 6841–6846
- Ulyanova NP, Schnitzler GR.** (2005) Human SWI/SNF generates abundant, structurally altered dinucleosomes on polynucleosomal templates. *Mol Cell Biol.* (24):11156-70
- Um JH, Yang S, Yamazaki S, Kang H, Viollet B, Foretz M, Chung JH.** (2007) Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iε-dependent degradation of clock protein mPER2. *J Biol Chem.* 282:20794-20798.
- Underwood H., Calaban M.** (1987). Pineal melatonin rhythms in the lizard *Anolis carolinensis*: I. Response to light and temperature cycles. *J Biol Rhythms* 2: 179–193
- 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., et al.** (1999) Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398, 627–630
- Vanselow K., Vanselow J. T., Westermarck P. O., Reischl S., Maier B., Korte T., Herrmann A., Herzog H., Schlosser A., Kramer A.** (2006) Differential effects of *PER2* phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes Dev.* 20:2660–2672
- Vaughan C.K., U. Gohlke, F. Sobott, V.M. Good, M.M. Ali, C. Prodromou, C.V. Robinson, H.R. Saibil, L.H. Pearl** (2006) Structure of an Hsp90–Cdc37–Cdk4 complex, *Mol. Cell* 23. 697–707
- Vozzolo L., Loh B., Gane P.J., Tribak M., Zhou L., Anderson I., Nyakatura E., Jenner R.G., Selwood D., Fassati A.** (2010). Gyrase B inhibitor impairs HIV-1 replication by targeting Hsp90 *J Biol Chem.* 10;285(50):39314-28
- Vuister G. W. et al.** (1994) Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Nature Struct. Biol.* 1, 605–614
- Vujovic N., Davidson A. J., Menaker M.** (2008). Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295:R355–60

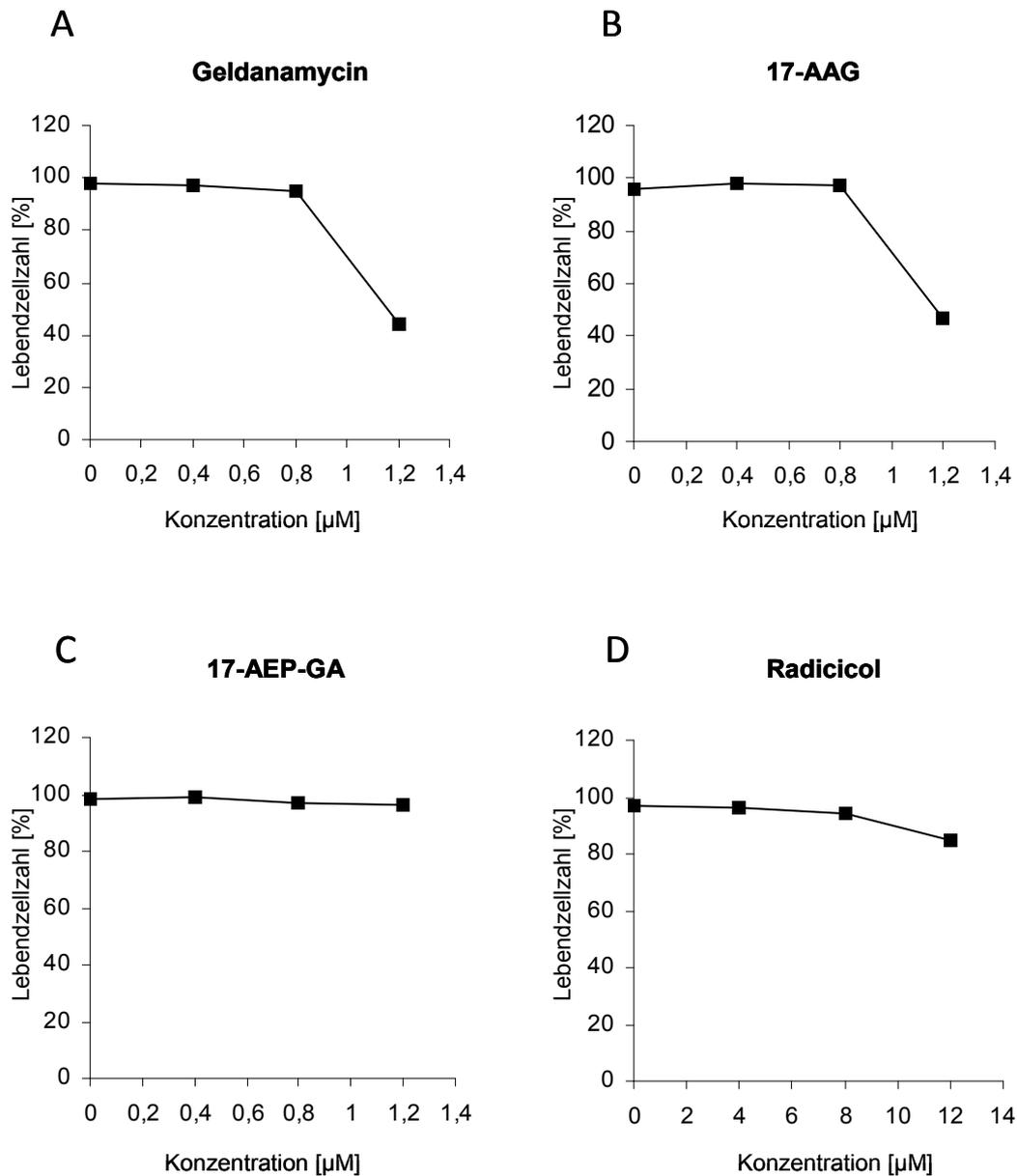
- Wandinger S.K., K. Richter, J. Buchner** (2008). The Hsp90 chaperone machinery, *J. Biol. Chem.* 283:18473–18477
- Wang X, Khaleque MA, Zhao MJ, Zhong R, Gaestel M, Calderwood SK.** (2006) Phosphorylation of HSF1 by MAPK-activated protein kinase 2 on serine 121, inhibits transcriptional activity and promotes HSP90 binding. *J Biol Chem.* 281(2):782-91
- Welch WJ, Garrels JI, Thomas GP, Lin JJ, Feramisco JR.** (1983) Biochemical characterization of the mammalian stress proteins and identification of two stress proteins as glucose- and Ca<sup>2+</sup>-ionophore-regulated proteins. *J Biol Chem.* 258(11):7102-11
- Welsh D. K., Yoo S. H., Liu A. C., Takahashi J. S., Kay S. A.** (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr. Biol.* 14:2289–95
- Welsh D. K., Takahashi J. S., Kay S. A.** (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.* 72:551–77
- Westerheide S. D., Anckar J., Stevens S. M., Sistonen, Jr. L., Morimoto R. I.** (2009) Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323, 1063–1066
- Westerheide S. D., Raynes R., Powell C., Xue B., Uversky V. N.** (2012). HSF transcription factor family, heat shock response, and protein intrinsic disorder. *Curr Protein Pept Sci.* 13(1):86-103
- Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM.** (1994). Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci.* 91:8324–8
- Whittier J.E., Y. Xiong, M.C. Rechsteiner, T.C. Squier** (2004) Hsp90 enhances degradation of oxidized calmodulin by the 20 S proteasome, *J. Biol. Chem.* 279, 46135–46142
- Workman P.** (2004). Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Lett.* 206:149–57
- Wu C.** (1984). Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature* 311, 81–84
- Wu C.** (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 441–469
- Xiao X, Zuo X, Davis AA, McMillan DR, Curry BB, Richardson JA, Benjamin IJ.** (1999) HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J.* (21):5943-52.
- Xu Y., S. Lindquist** (1993). Heat-shock protein hsp90 governs the activity of pp 60v-src kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 7074–7078

- Y., Huang L., Zhang J., Moskophidis D., Mivechi N. F.** (2002). Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J. Cell. Biochem.* 86, 376–393
- Yagita K., Tamanini F., van der Horst G. T., Okamura H.** (2001). Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. *Science* 292:278–81
- Yagita K., Horie K., Koinuma S., Nakamura W., Yamanaka I., Urasaki A., Shigeyoshi Y., Kawakami K., Shimada S., Takeda J., Uchiyama Y.** (2010). Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *PNAS* 107:3846–3851
- Yamagishi N., Fujii H., Saito Y., Hatayama T.** (2009) Hsp105beta upregulates hsp70 gene expression through signal transducer and activator of transcription-3. *FEBS J.* 276(20):5870–80
- Yamamoto T., Nakahata Y., Soma H., Akashi M., Mamine T., Takumi T.** (2004) Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol. Biol.* 5:18
- Yamazaki S., Numano R., Abe M., Hida A., Takahashi R., et al.** (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288:682–85
- Yamazaki S., Yoshikawa T., Biscoe E. W., Numano R., Gallsapy L. M., et al.** (2009). Ontogeny of circadian organization in the rat. *J. Biol. Rhythms* 24:55–63
- Yang Y., R. Rao, J. Shen, Y. Tang, W. Fiskus, J. Nechtman, P. Atadja, K. Bhalla** (2008). Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90alpha in tumor cell invasion, *Cancer Res.* 68:4833–4842
- Yoo S. H., Ko C. H., Lowrey P. L., Buhr E. D., Song E. J., Chang S., Yoo O. J., Yamazaki S., Lee C., Takahashi J. S.** (2005). A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 102:2608–2613
- Yoo S. H., Yamazaki S., Lowrey P. L., Shimomura K., Ko C. H., et al.** (2004). PERIOD2::LUCIFERASE realtime reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:5339–46
- Yoshida T, Murayama Y, Ito H, Kageyama H, Kondo T.** (2009) Nonparametric entrainment of the in vitro circadian phosphorylation rhythm of cyanobacterial KaiC by temperature cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(5):1648-53.
- Young J. C., Obermann W. M., Hartl F. U.** (1998). Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J. Biol. Chem.* 273, 18007–18010
- Young J.C., Agashe V.R., Siegers K., Hartl F.U.** (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 781-791

- Young J.C., N.J.Hoogenraad, F.U.Hartl** (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70, *Cell* 112, 41–50
- Yu W., Zheng H., Hou J. H., Dauwalder B., Hardin P. E.** (2006) PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes Dev.* 20, 723–733
- Zeng ZL, Wu MW, Sun J, Sun YL, Cai YC, Huang YJ, Xian LJ.** (2010) Effects of the biological clock gene Bmal1 on tumour growth and anti-cancer drug activity. *J Biochem.* 148(3):319-26
- Zhang F, Snead CM, Catravas JD.** (2012) Hsp90 regulates O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine transferase: a novel mechanism of modulation of protein O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine modification in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302(12):C1786-96
- Zhang S, Grosse F.** (1997) Domain structure of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *J Biol Chem.* 272(17):11487-94
- Zhao R., Houry W.A.** (2007) Molecular interaction network of the Hsp90 chaperone system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594,27–36
- Zhao R., M. Davey, Y.C. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A.B. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt, C. Boone, A. Emili, W.A. Houry** (2005). Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone, *Cell* 120:715–727
- Zhong M., Orosz A., Wu C.** (1998). Direct sensing of heat and oxidation by Drosophila heat shock transcription factor. *Mol. Cell* 2:101–8
- Ziemięcki A., M.G. Catelli, I. Joab, B. Moncharmont** (1986). Association of the heat shock protein hsp90 with steroid hormone receptors and tyrosine kinase oncogene products, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138:1298–1307
- Zimmerman W.F., Pittendrigh C.S., Pavlidis T.** (1968). Temperature compensation of the circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* and its entrainment by temperature cycles. *J Insect Physiol* 14: 669–684
- Zou J., Guo Y., Guettouche T., Smith D. F., Voellmy R.** (1998a). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471–480
- Zou J., Salminen W. F., Roberts S. M., Voellmy R.** (1998b) Correlation between glutathione oxidation and trimerization of heat shock factor 1, an early step in stress induction of the Hsp response. *Cell Stress Chaperones* 3, 130–141
- Zylka, M. J., Shearman, L. P., Levine, J. D., Jin, X., Weaver, D. R., and Reppert, S. M.** (1998) Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron* 21[5]: 1115-1122

## 7 Anhang

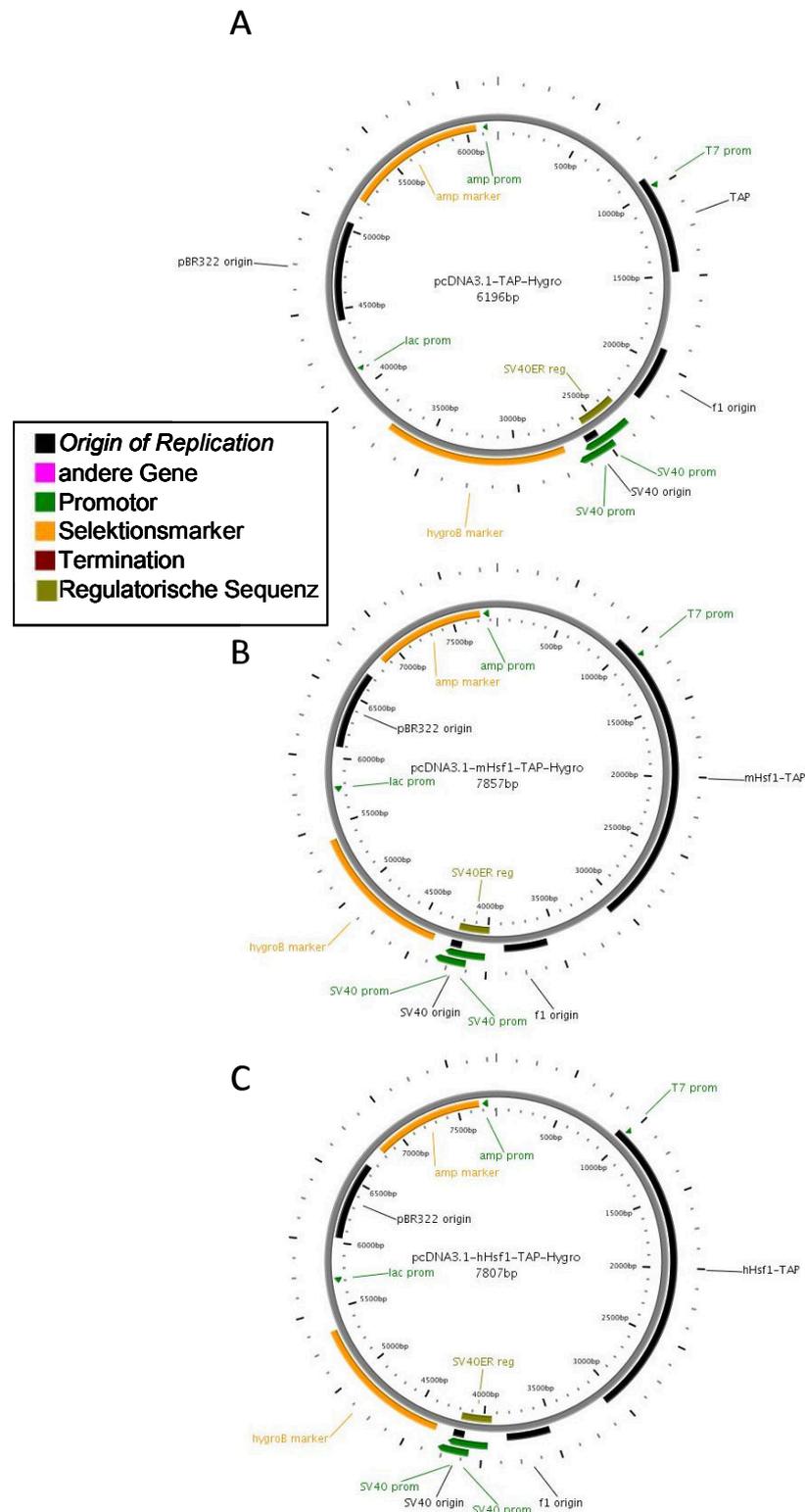
### 7.1 Analyse des Zellüberlebens



**Abbildung 7.1: Analyse der Vitalität der Zellen aus Echtzeit-Biolumineszenz-Messungen**

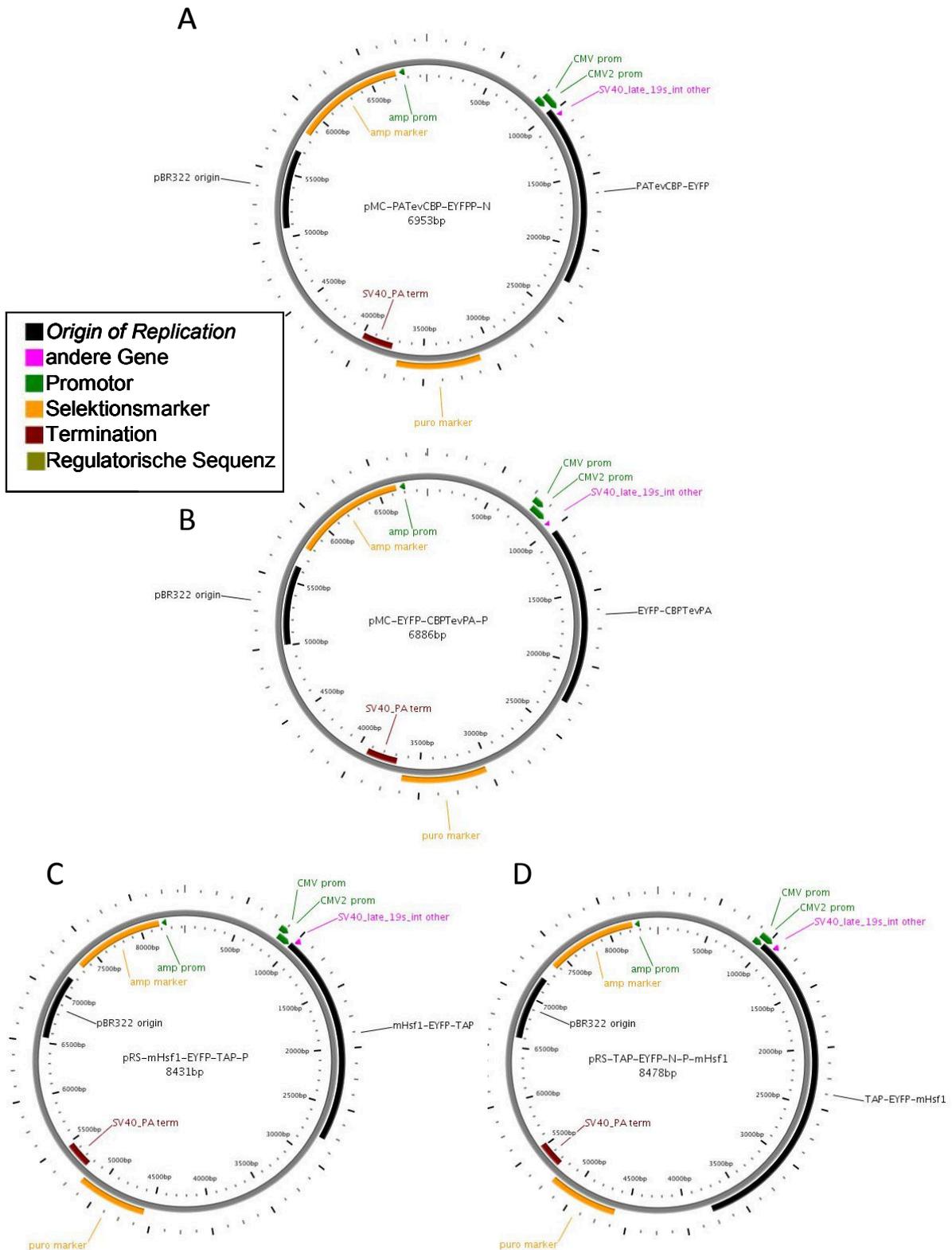
Das zelluläre Überleben der synchronisierten NIH3T3-Bmal1-Luc Zellen (siehe Abb. 3.1 und 3.2), die mit verschiedenen Konzentrationen von Geldanamycin (GA) (A), 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) (B), 17-[2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl]aminno-17-demethoxygeldanamycin (C) oder Radicicol (D) behandelt worden waren, wurde nach 4tägiger (Radicicol) oder 5tägiger (GA, 17-AAG, 17-AEP-GA) Echtzeit-Biolumineszenz-Messung analysiert.

## 7.2 Vektorkarten



**Abbildung 7.2: Vektorkarten der verwendeten pcDNA3.1-Plasmide für die Generierung transgener Zellen**

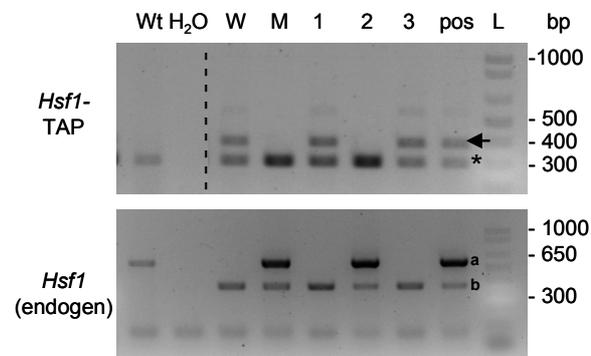
Die Plasmide pcDNA3.1-TAP-Hygro (A) und pcDNA3.1-mHsf1-TAP-Hygro (B) wurden freundlicherweise von Dr. Sang-Gun Ahn (Chosun University College of Dentistry, Gwangju, Korea) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid aus (A) wurde für die Generierung des Plasmids pcDNA3.1-hHsf1-TAP-Hygro (C) verwendet.



**Abbildung 7.3: Vektorkarten der verwendeten pMC-Plasmide für die Generierung transgener Zellen**

Die Plasmide pMC-PATevCBP-EYFP-N (A) und pMC-EYFP-CBPTevPA-P (B) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Boege (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt und dienen als Grundlage für die Vektoren pRS-mHsf1-EYFP-TAP-P (C) und pRS-TAP-EYFP-N-P-mHsf1 (D).

### 7.3 Genotypisierung der HSF1-TAP exprimierenden *Hsf1*<sup>-/-</sup> Maus



**Abbildung 7.4: Genotypisierung der *Hsf1*-TAP exprimierenden *Hsf1*<sup>-/-</sup> Maus und ihrer Nachkommen**

Die hier dargestellte Genotypisierung zeigt den Genotypen der weiblichen *Hsf1* knock-out Maus (W), die heterozygot *Hsf1*-TAP in ihrem Genom trägt. Zusätzlich ist der Genotyp des der Verpaarung zugehörigen männlichen Tieres (M) und der Genotypen ihrer Nachkommen (1-3) abgebildet. In der Analyse des *Hsf1*-TAP Genotyps wurden Primer gegen *Hsf1*-TAP (markiert mit Pfeil) und den Wildtypbereich des ROSA26 Locus (markiert mit Asterisk) verwendet. In der Untersuchung des endogenen *Hsf1* Genotyps wurden Primer gegen das *Hsf1*-Wildtyp Gen (markiert mit a) und gegen die Neomycin-Sequenz (markiert mit b) verwendet, die für den *Knock-out* des *Hsf1*-Gens verwendet wurde. Wt: Wildtyp-Kontrolle; pos: Positivkontrolle; L: DNA-Leiter; bp: Basenpaare

## Eigene Veröffentlichungen

**2014, Journal of Biological Rhythms (im Druck)**

### **HSP90 Affects the Stability of BMAL1 and Circadian Gene Expression**

**Rebecca Schneider**, René M. Linka and Hans Reinke

#### **ABSTRACT**

The mammalian circadian clock comprises a system of interconnected transcriptional and translational feedback loops. Proper oscillator function requires the precisely timed synthesis and degradation of core clock proteins. The heat shock protein HSP90, an ATP-dependent molecular chaperone, has important functions in many cellular regulatory pathways by controlling the activity and stability of its various client proteins. Despite accumulating evidence for interplay between the heat shock response and the circadian system, the role of HSP90 in the mammalian core clock is not known. The results of this study suggest that inhibition of the ATP-dependent chaperone activity of HSP90 impairs circadian rhythmicity of cultured mouse fibroblasts whereby amplitude and phase of the oscillations are predominantly affected. Inhibition of HSP90 shortened the half-life of BMAL1 which resulted in reduced cellular protein levels and blunted expression of rhythmic BMAL1/CLOCK target genes. Furthermore, the HSP90 isoforms HSP90AA1 and HSP90AB1 and not HSP90B1/GRP94 or TRAP1 are responsible for maintaining proper cellular levels of BMAL1 protein. In summary these findings provide evidence for a model in which cytoplasmic HSP90 is required for transcriptional activation processes by the positive arm of the mammalian circadian clock.

## Danksagung

Mein erster Dank gilt selbstverständlich meinem Chef, Herrn Professor Dr. Hans Reinke, der mir die Möglichkeit gab, an diesem sehr spannenden Thema zu arbeiten. Ich möchte mich besonders für die stetige Unterstützung, die vielen Freiheiten während meiner Arbeit, konstruktive Gespräche und eine durchgehend tolle Betreuung bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. Martin möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Herrn Professor Dr. Boege danke ich für die Bereitstellung von Laborräumen und Geräten und die zusätzliche Finanzierung.

Ein großer Dank gilt natürlich all meinen Kollegen. Was hätte ich nur ohne euch gemacht!? Danke für die wundervolle Zusammenarbeit, die Unterstützung und den vielen Spaß im Labor und in der Altstadt!

Ich danke Linda für die netten Gespräche, die konstruktiven Anmerkungen zu meiner Arbeit und unseren gemeinsamen Unfug. Denk immer daran: Man muss alles mit fünf multiplizieren!

Vielen Dank an Gabi für die Betreuung der Mäuse, die Unterstützung in den Versuchen, die durchgehend lieben Worte und den ganzen Spaß.

Danke an Britta, die mir eine ganze Reihe an Methoden beibrachte und stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke René für unterhaltsame und verrückte Momente im Labor.

Vielen Dank an Kerstin für die stets aufmunternden Worte und die lieben Gespräche.

Danke an Beatrice und Stefan für viele unterhaltsame Momente im Labor, tolle Gespräche und jede Menge gemeinsame Mensa-Trips.

Vielen Dank an Faiza, die geduldig jede meiner Fragen beantwortete und immer einen Rat wusste.

Danke an Birgit und Elke, die auch in den frühen Morgenstunden immer Zeit für ein Schwätzchen hatten.

Vielen Dank an meine Freunde, die auch nach 200 fluchbeladenen Nachrichten das Handy nicht gegen die Wand warfen, sondern immer ein offenes Ohr und aufmunternde Worte für mich hatten.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre ständige Unterstützung in jeder Lebenslage. Danke an Rike für die ganzen Besuche im Labor, unsere Aracaden-Touren und den gemeinsamen Blödsinn! Vielen Dank für die konstruktive Kritik an meiner Arbeit, die für dich wahrscheinlich immer noch aus „BlaBla Bla, Bla Bla“ besteht. Danke an meine beiden Brüder Julian und Sebastian, die immer an mich geglaubt haben. Ein großer Dank geht an meine Eltern, die mir jederzeit zur Seite standen und mir mein Studium ermöglichten.

Im Speziellen möchte ich aber Alex danken, der immer für mich da war und meine Launen stets mit großer Ruhe, Verständnis und Liebe ertrug. Danke, dass es dich gibt!

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

### Name

Rebecca Schneider

### Anschrift

Am Langen Weiher 35  
40589 Düsseldorf

### Geburtsdatum

18.07.1985

### Geburtsort

Düsseldorf

### Familienstand

ledig

## Ausbildung

### Studium

#### Seit 09/2009

**Promotion (Dr.rer.nat.)**, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik  
Betreuer: Prof.Dr.Hans Reinke

**Thema:** Analyse der wechselseitigen Regulation zwischen Hit-  
zeschockantwort und der zirkadianen Uhr

#### 10/2004 - 05/2009

**Studium (Dipl.-Biol.)**, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Studiengang: Biologie (1,3)

**Diplomarbeit**, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika  
Betreuer: Priv.-Doz.Dr.med.Michael Punzel

**Thema:** Isolierung und Aktivierung von alloreaktiven natürlichen  
Killerzellen unter „Good Manufacturing Practice“ (GMP)-  
Bedingungen zur adoptiven Zelltherapie

## **Schulische Ausbildung**

**08/1995 - 07/2004**

Städtisches Görres-Gymnasium Düsseldorf  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur; 2,6)

**08/1991 - 07/1995**

Katholische Grundschule, Marienschule Düsseldorf

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ich habe diese Dissertation in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 17.02.2014

Rebecca Schneider