



Die Regulation der Autophagie durch die zirkadiane Uhr und
der Einfluss des Alterns in Säugetierzellen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Linda Janke

aus Neuss

Düsseldorf, Januar 2015

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: 29. April 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	VIII
Summary	X
<u>1. Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1 Zirkadiane Rhythmen	1
1.1.1 Der suprachiasmatische Nucleus als Hauptschrittmacher	3
1.1.2 Der suprachiasmatische Nucleus als Hauptschrittmacher	3
1.1.3 Zirkadiane Uhren in peripheren Organen	4
1.1.4 Die zirkadiane Uhr auf molekularer Ebene.....	6
1.1.5 Regulationsebenen der zirkadianen Uhr	9
1.1.6 Zirkadiane Oszillationen und Phasenverschiebungen.....	12
1.2 Autophagie – der kontrollierte Selbstverdau	16
1.2.1 Die Makroautophagie.....	17
1.2.2 Die Mikroautophagie	20
1.2.3 Die Chaperon-vermittelte Autophagie	21
1.2.4 Allgemeine und selektive Autophagie	22
1.2.5 Die Bedeutung der Autophagie im humanen Alterungs- und Krankheitsprozess ...	24
1.2.6 Autophagie, die zirkadiane Uhr und Alterungsprozesse.....	26
1.3 Zielsetzung und Konzeption der Arbeit.....	31
<u>2. Material</u>	<u>33</u>
2.1 Chemikalien & Reagenzien	33
2.2 Geräte.....	36
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	38
2.4 Molekularbiologische Kits	39
2.5 Bakterienstämme und Nährmedien für Bakterienkulturen.....	40
2.5.1 <i>Escherichia coli</i> Stamm	40
2.5.2 Nährmedien für Bakterienkulturen	40

2.6. Zelllinien.....	41
2.6.1. Humane primäre Zelllinien	41
2.6.2 Murine adhärenente Zelllinien.....	41
2.6.3 Mediumgrundlagen, Lösungen und Antibiotika für die Zellkultur	42
2.7 Puffer und Lösungen	43
2.8 Nukleinsäuren	44
2.8.1 Plasmide.....	44
2.8.2 Oligonukleotide.....	44
2.8.3 Sonstige Nukleinsäuren	55
2.9 Proteine.....	55
2.9.1 Antikörper	55
2.9.1.1 Primäre Antikörper.....	55
2.9.1.2 Sekundäre Antikörper	57
2.9.2 Enzyme	57
2.9.3 Sonstige Proteine	57
2.10 Software.....	58
<u>3. Methoden</u>	<u>59</u>
3.1 Zellkultur	59
3.1.1 Kultivierung muriner adhärenenter Zellen	59
3.1.2 Kultivierung humaner adhärenenter Zellen.....	59
3.1.3 Ermittlung der Lebendzellzahl.....	60
3.1.4 Kryokonservierung von Zellen	60
3.1.5 Transfektion und Selektion von Zellen.....	61
3.1.6 siRNA Transfektion von murinen Zellen	61
3.1.7 Transfektion humaner primärer Fibroblasten mittels Elektroporation	62
3.1.8. UVA Bestrahlung von Zellen	62
3.1.9 Echtzeit-Biolumineszenz-Messung.....	63
3.2 Proteinanalytische Methoden	64

3.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....	64
3.2.2 Immunpräzipitation.....	64
3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford	65
3.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	65
3.2.5 Western Blot Analysen	66
3.3 Mikroskopie.....	67
3.3.1 Epifluoreszenzmikroskopie.....	67
3.4 Klonierung.....	68
3.4.1 Restriktionshydrolyse von Nukleinsäuren	68
3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	68
3.4.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen.....	68
3.4.4 Ligation von Nukleinsäuren.....	69
3.5 Mikrobiologische Arbeiten.....	69
3.5.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen.....	69
3.5.2 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen nach Inoue.....	69
3.5.3 Transformation von <i>E. coli</i>	70
3.5.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	70
3.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	71
3.6.1 Isolierung von RNA aus Zellen	71
3.6.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	71
3.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	72
3.6.4 cDNA Synthese aus RNA durch Reverse Transkription	73
3.6.5 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	73
3.7 Statistische Analysen.....	74
<u>4. Ergebnisse</u>	<u>75</u>
4.1 Potentielle Regulation der zirkadianen Uhr durch Autophagie beeinflussende Substanzen	75

4.2 Die Korrelation der Autophagie und der zirkadianen Uhr in Abhängigkeit vom Zellwachstum.....	83
4.2.1 Ermittlung des Einflusses der Passagenzahl auf die Uhr in immortalisierten murinen Fibroblasten.....	83
4.2.2 Einfluss von Wachstumsstadium und Zelldichte auf die Expression von Autophagiegenen und zirkadianen Genen in murinen Fibroblasten.....	85
4.2.3 UV-Strahlung hat in murinen Fibroblasten einen quantitativen Einfluss auf die Autophagie.....	89
4.3 Die Regulation der Autophagielevel durch den zirkadianen Oszillator in murinen Fibroblasten	91
4.3.1 In murinen Fibroblasten unterliegt die Autophagie der zirkadianen Kontrolle.....	91
4.3.2 Die Expressionslevel der Uhr gene reduzieren die Autophagielevel auf Proteinebene	95
4.4 Cryptochrome- <i>Knockout</i> Zellen weisen erhöhte Autophagielevel auf.....	99
4.5 Der Einfluss des Alterns auf Uhr gene und die Autophagie in humanen Fibroblasten.	102
4.5.1 In gealterten humanen primären Fibroblasten korreliert eine deregulierte zirkadiane Uhr mit reduziertem autophagischen Flux.....	102
4.5.2 In gealterten humanen primären Fibroblasten erhöht die Überexpression eines einzelnen zirkadianen Gens die Autophagie.....	108
4.6 Die metabolische Regulation der Autophagie über die zirkadiane Uhr	111
4.6.1 Die zirkadiane Uhr reguliert die Autophagie über den AMPK Signalweg.....	111
4.6.2 <i>Per2</i> verbindet den zirkadianen Oszillator und die Autophagie über den AMPK Signalweg.....	113
<u>5. Diskussion.....</u>	<u>117</u>
5.1 Die Regulation der zirkadianen Uhr und der Autophagie in Fibroblasten.....	117
5.1.1 Fibroblasten zeigen eine koordinierte Regulation der Autophagie und der zirkadianen Genexpression	118
5.1.2 Die zirkadiane Uhr reguliert die Autophagielevel in Fibroblasten	120
5.2 <i>Cry1/2</i> -defiziente Zellen haben erhöhte Autophagielevel.....	123

5.3 Alterungsprozesse beeinflussen die Expression von Uhrgenen und die Autophagie in humanen primären Fibroblasten	124
5.4 <i>Per2</i> verbindet die zirkadiane Uhr mit dem AMPK Signalweg.....	126
5.5 Ausblick.....	128
<u>6. Literatur.....</u>	<u>131</u>
<u>7. Anhang.....</u>	<u>183</u>
7.1 Vektorkarten	183
Danksagung.....	185
Eidesstattliche Erklärung.....	187

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Der molekulare Mechanismus der zirkadianen Uhr in Säugetieren.....	8
Abbildung 1.2: Parameter des zirkadianen Oszillators	13
Abbildung 1.3: Der molekulare Mechanismus der Autophagie in Säugetieren.....	19
Abbildung 1.4: Formen der Autophagie	24
Abbildung 4.1 Applikationsschema bei der Echtzeit-Biolumineszenzmessung von NIH3T3- <i>Bmal1</i> -Luc-Zellen	76
Abbildung 4.2: Echtzeit-Biolumineszenz-Analyse der Periode und Phase von NIH3T3- <i>Bmal1</i> -Luc-Zellen	79
Abbildung 4.3: Echtzeit-Biolumineszenz-Analyse der Amplitude von NIH3T3- <i>Bmal1</i> -Luc-Zellen.....	81
Abbildung 4.4: Auswirkungen der Arsenitkonzentrationen auf die Amplitude bei ZT26 und ZT38 von NIH3T3- <i>Bmal1</i> -Luc-Zellen nach Phasenverschiebungsexperimenten	82
Abbildung 4.5: Echtzeit-Biolumineszenz-Analyse von NIH3T3- <i>Bmal1</i> -Luc-Zellen mit steigenden Passagenzahlen.....	84
Abbildung 4.6: Durchflusszytometrische Zellzyklusphasenanalyse und Analyse der zellulären LC3-II Level in NIH3T3- <i>Bmal1</i> -Luc-Zellen	85
Abbildung 4.7: mRNA Expression von Autophagie- und Uhrgenen in Abhängigkeit vom Zellwachstum	87
Abbildung 4.8: Analyse der zellulären LC3-II Level und mRNA Expression von Autophagie- und Uhrgenen in Abhängigkeit vom Zellwachstum nach UV-Bestrahlung	90
Abbildung 4.9: Die zirkadianen LC3-II-Proteinlevel und der Einfluss eines siRNA-vermittelten <i>Bmal1 Knock-downs</i> auf die Autophagie.....	92
Abbildung 4.10: Zirkadiane Expressionsmuster von Autophagiegenen	94
Abbildung 4.11: Einfluss der <i>Knock-downs</i> auf die Expression von Uhrgenen und <i>Cebpβ</i> ... 95	
Abbildung 4.12: Einfluss der <i>Knock-downs</i> der Uhrgene auf die Autophagie	97
Abbildung 4.13: Expressionsmuster von Autophagie assoziierten Genen nach spezifischen <i>Knock-downs</i>	98
Abbildung 4.14: Zirkadiane Expression von Uhrgenen in Wildtyp und <i>Cry1/2</i> ^{-/-} MEFs	99
Abbildung 4.15: Einfluss des <i>Cry1/2</i> ^{-/-} <i>Knockouts</i> auf die Autophagielevel.....	100
Abbildung 4.16: Einfluss des <i>Cry1/2-Knockouts</i> auf die Expression von Autophagie assoziierten Genen.....	101
Abbildung 4.17: Zirkadiane Expression von Uhrgenen in humanen primären Fibroblasten. 103	

Abbildung 4.18: Einfluss des Alterungsprozesses auf die Expression von Uhrgenen.....	104
Abbildung 4.19: Der Einfluss von Alterungsprozessen auf die zirkadiane Uhr und die Autophagie	105
Abbildung 4.20: Expression der Autophagiegene und Korrelationsanalysen in Abhängigkeit vom Spenderalter.....	106
Abbildung 4.21: Korrelationsanalysen der Autophagielevel mit einigen Uhrgenen in Abhängigkeit vom Spenderalter.....	107
Abbildung 4.22: PER2-GFP Expressionslevel in gealterten humanen primären Fibroblasten	109
Abbildung 4.23: Einfluss der PER2-GFP Überexpression auf die Expression von Uhr- und Autophagiegengen.....	110
Abbildung 4.24: Einflüsse des mTor- und des AMPK Signalweges auf die autophagischen LC3-II Proteinlevel	112
Abbildung 4.25: Einfluss des <i>Knock-downs</i> von Uhrgenen auf den AMPK Signalweg	114
Abbildung 4.26: Einfluss des <i>Per2-Knock-downs</i> auf den AMPK Signalweg	115
Abbildung 7.1: Vektorkarte des verwendeten pMC3-EGFP-cMYC.H-C-Plasmids für die Überexpression von GFP in den humanen primären Fibroblasten	183
Abbildung 7.2: Vektorkarte des verwendeten pMC3-hPer2-EGFP-cMYC.H-C-Plasmids für die Überexpression von PER2-GFP in humanen primären Fibroblasten.....	184

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Puffer und Stocklösungen	43
Tabelle 2.2: Primer für die Klonierung von Vektoren	44
Tabelle 2.3: ON-TARGETplus Maus SMARTpool siRNAs für die Transfektionen	45
Tabelle 2.4: Murine Primer für Real Time Polymerasekettenreaktion	47
Tabelle 2.5: Humane Primer für Real Time Polymerasekettenreaktion	52
Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten primären Antikörper.....	55
Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper.....	57
Tabelle 3.1: Reaktionsbedingungen für die Polymerasekettenreaktion.....	72
Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen für die Real Time Polymerasekettenreaktion	74
Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Metabolite und pharmakologischen Substanzen.....	78

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
3-MA	3-Methyladenin
5HT	5-Hydroxytryptamin
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AICAR	5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazol-4-carboxamid
AMBRA1	<i>autophagy/ beclin-1 regulator 1</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arntl	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i>
Atg	<i>autophagy-related</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary unit(s)</i> [unskalierte Einheit(en)]
AVP	Arginin-Vasopressin
bHLH-PAS	<i>basic helix-loop-helix; Per-Arnt-Single-minded</i>
Bif-1	<i>Bax-Interacting Factor 1</i>
Bmal1	<i>Brain and Muscle ARNT-Like 1</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
β TrCP	<i>β-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
C	Kontrolle
ca.	circa
Cab39	<i>Calcium binding protein 39</i>

Camkk2	<i>Calcium/ calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 β</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-Bindeprotein
CCCP	Carbonylcyanid-3-chlorphenylhydrazon
cDNA	komplementäre DNA
Cebp β	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein-β</i>
CK1	Casein Kinase 1
Clock	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
CMA	Chaperon-vermittelte Autophagie
CMV	Cytomegalovirus
CP	Wendepunkt
CR	<i>Caloric Restriction</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	CRE Bindeprotein
CRY	<i>Cryptochrome</i>
CT	<i>Cycle threshold</i> (Schwellenwert Zyklus)
Ctsl	<i>Cathepsine L</i>
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
Dbp	<i>D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein</i>
DD	konstante Dunkelheit
Dec1	<i>Basic Helix-Loop-Helix Family, Member E40 (BHLHE40)</i>
Dec2	<i>Basic Helix-Loop-Helix Family, Member E41 (BHLHE41)</i>
DMA	Dimethylarsinsäure
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DRN	dorsale Raphe-Kerne
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eef1a	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1a</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär signalregulierte Kinase
et al.	<i>et alia</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FAD	Flavinadenindinukleotid
FBXL3	<i>F-Box and Leucine-Rich Repeat Protein 3</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FIP200	<i>FAK Family Kinase-Interacting Protein of 200 kDa</i>
frq	<i>Frequency</i>
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gapdh	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
gDNA	genomische DNA
GHT	geniculo-hypothalamisch
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Histon-Acetyltransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSC	<i>Heat Shock Cognate Protein</i>
IgG	Immunglobulin G
Inc.	<i>Incorporated</i>

IRES	Interne Ribosomenbindestelle
Irgm1	<i>Immunity-related GTPase family M member 1</i>
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LAMP-2	<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 2</i>
LB	Luria Bertani
LD	Licht-Dunkelrhythmus
LKB1	Leberkinase B1
LSK	lysosomale Speicherkrankheiten
Luc	Luciferin
lys	Lysin
MAP1/Lc3b	<i>Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 β</i>
Map3k7	<i>Mitogen activated protein kinase kinase kinase 7</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
Mdm	<i>Mitochondrial Distribution and Morphology</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
min	Minute(n)
MIPA	Mikropexophagie-spezifischer-Membran-Apparat
MMA	Monomethylarsonsäure
MRN	mediane Raphe-Kerne
mRNA	mitochondriale RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
mTor	<i>murine target of rapamycin</i>
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NAM	Nikotinamid

NAMPT	Nikotinamid-Phosphoribosyl-Transferase
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NP-40	Nonoxinol 40
Npas2	<i>neuronal PAS domain protein 2</i>
Nr1d1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1</i>
Nt	<i>Non-targeting</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	<i>Per-Arnt-Single-minded</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PER	<i>Period</i>
PIK3C3	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase, catalytic subunit 3</i>
PIK3R4	<i>Phosphoinositid-3-kinase, regulatory subunit 4</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3-phosphate</i>
PMN	<i>Piecemeal microautophagy of the nucleus</i>
PRC	<i>Phase response curve</i>
pRGC	photosensitive retinale Ganglionzelle
Prkaa1	<i>AMP-activated protein kinase alpha 1, catalytic subunit</i>
Prkaa2	<i>AMP-activated protein kinase alpha 2, catalytic subunit</i>
Prkab1	<i>AMP-activated protein kinase beta 1</i>
Prkag1	<i>AMP-activated protein kinase gamma 1</i>
PTC	<i>phase transition curve</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time PCR</i>
®	<i>Registered</i>

RHT	retinohypothalamisch
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
Ror	<i>Retinoic acid related Orphan Receptor</i>
RORE	<i>ROR Response Element</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Rubicon	<i>Run Domain Beclin-1 Interacting And Cystein-Rich Containing Protein</i>
S6K	<i>p70 ribosomal S6 kinase</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCN	suprachiasmatischer Nucleus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Sirt	Sirtuin
s.o.	siehe oben
SOB	Super Optimal Broth
Std.	Stunde(n)
Strada	<i>STE20-related kinase adaptor α</i>
Stk11	<i>Serine/ Threonine kinase 11</i>
s.u.	siehe unten
SV40	<i>Simian-Virus 40</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamin

TB	Terrific Broth
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF α	<i>Transforming Growth Factor α</i>
Tim	<i>Timeless</i>
TORC	<i>Target of rapamycin complex</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	<i>Unit(s)</i> [Einheit(en)]
Ulk	<i>Unc-51 like autophagy activating kinase</i>
USA	<i>United States of America</i>
UV	Ultraviolett
UVRAG	<i>UV Radiation Resistance Associated Gene</i>
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
vgl.	vergleiche
Vps	<i>Vacuolar Protein Sorting</i>
WC	<i>White Collar</i>
WIPI	<i>WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZT	Zeitgeber Zeit

Zusammenfassung

Autophagie ist ein essentieller intrazellulärer Abbaumechanismus, durch den zytosolische Makromoleküle und Organellen degradiert werden. Die durch den Abbau gewonnenen Molekülbausteine stehen dem Organismus anschließend wieder für katabolische und anabolische Prozesse zur Verfügung. Auch die zirkadiane Uhr, ein zellautonomer Mechanismus, der die periodische Aktivität einer Vielzahl von zellulären Prozessen steuert, spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Metabolismus. In der Maus konnte bereits eine Regulation der Autophagie durch die zirkadiane Uhr in Leber nachgewiesen werden. Darüber hinaus deuten mehrere Studien darauf hin, dass Alterungsprozesse sowohl Autophagielevel als auch den zirkadianen Oszillator maßgeblich beeinträchtigen. In dieser Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob in gealterten Zellen ein kausaler Zusammenhang zwischen beiden Prozessen bestehen könnte. Anders ausgedrückt, könnten durch Alterungsprozesse verursachte Veränderungen des zirkadianen Oszillators zu reduzierten Autophagieleveln führen oder umgekehrt?

Diese Arbeit zeigt, dass durch die spezifische Deregulation einzelner zirkadianer Gene sowohl die absoluten als auch die rhythmischen Autophagielevel in Säugetierfibroblasten beeinflusst werden und dass der zirkadiane Oszillator die Autophagie wenigstens zum Teil über die Phosphorylierung von AMPK reguliert. Weiterhin wurde beobachtet, dass in *in situ* gealterten menschlichen Fibroblasten eine direkte Korrelation zwischen dem Alter der Spender, dem Level des autophagischen Flux und den Expressionsleveln spezifischer Uhrgene besteht. Insbesondere die Expression von Komponenten des negativen und stabilisierenden Armes der zirkadianen Rückkopplungsschleife ist in gealterten Fibroblasten deutlich reduziert. Im Gegensatz dazu sind dieselben Uhrgene in stationären Fibroblasten und Cryptochrom-defizienten Zellen hochreguliert und diese Zellen weisen gleichzeitig erhöhte Autophagielevel auf verglichen mit wachsenden Zellen bzw. Cryptochrom-enthaltenden Zellen. Außerdem können durch Steigerung der Expressionslevel des am stärksten herunterregulierten Uhrgens in gealterten humanen Fibroblasten, PER2, die Autophagielevel in diesen Zellen teilweise wieder hergestellt werden. Im Gegensatz dazu reduziert der *Knock-down* von *Per2* die Autophagielevel in Mausfibroblasten. Zusammengefasst identifizieren die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente die zirkadiane Uhr als Regulator der Autophagie in Säugetierfibroblasten und führen zu einem Modell, in dem altersbedingte Veränderungen der Expressionslevel spezifischer Uhrgene zu reduzierten Autophagieleveln führen.



Summary

Autophagy is an essential intracellular degradation process which serves to degrade large cytosolic molecules and whole organelles. The molecular components that are newly acquired by the degradation process are then available to the organism for catabolic and anabolic processes. Furthermore the circadian clock, a cell-autonomous mechanism which controls the periodic activity of a variety of cellular processes, plays a central role in the regulation of metabolism. Regulation of autophagy by the circadian clock has already been shown in murine liver. In addition, several studies suggest that the aging process strongly affects decisively both autophagy and the circadian oscillator. This work addressed the question whether a causal relation between these two processes might exist in aged cells. In other words, could age-related alterations of the circadian oscillator therefore be directly responsible for reduced autophagy levels or vice versa?

This work shows that the specific deregulation of individual circadian genes can influence both the absolute and the rhythmic autophagy levels in mammalian fibroblasts. Autophagy is at least in part actuated by the circadian oscillator via the phosphorylation of AMPK. Furthermore it has been shown that aging, reduced autophagic flux and altered circadian gene expression are closely correlated in human fibroblasts aged *in situ*. In particular components of the negative and the stabilizing arm of the circadian feedback loop are significantly reduced in aged fibroblasts. On the other hand in stationary fibroblasts and cryptochrome deficient cells, clock gene expression as well as autophagy levels are increased compared to logarithmically growing fibroblasts or cryptochrome competent cells. In addition, autophagy level can be partially restored in aged human fibroblasts by increasing the expression level of the most strongly downregulated clock gene, PER2. In contrast, *knock-down* of *Per2* reduces autophagy in mouse fibroblasts. In summary, the experiments performed in this work identify the circadian clock as a regulator for autophagy in mammalian fibroblasts and put forward a model, in which age-related alterations in the expression levels of specific clock genes contribute to diminished autophagy levels.

1. Einleitung

1.1 Zirkadiane Rhythmen

Biologische Oszillationen reichen von wenigen Millisekunden bei neuronalen Aktionspotentialen über Jahresrhythmen, zum Beispiel beim Winterschlaf, bis zu Lebenszyklen von 13 bis 17 Jahren bei Zikaden der Gattung *Magicicadas* (Hildebrandt et al. 1998, Grant 2005). Eine der vorhersehbarsten rhythmischen Umweltveränderungen auf der Erde ist der Wechsel von Tag und Nacht durch die 24-Stunden-Erdrotation, die mit täglichen Veränderungen in den Lichtverhältnissen, der Temperatur, der Feuchtigkeit und der Nahrungsverfügbarkeit einhergeht. Bakterielle, pflanzliche und tierische Organismen haben ihr Verhalten und ihre Physiologie evolutiv diesen rhythmischen Umweltveränderungen angepasst und eine endogene zirkadiane Rhythmik entwickelt. Zirkadiane Rhythmen (zirkadian; lateinisch: *circa* – ungefähr; *dies* – Tag) sind biologische Oszillationen mit einer Periodenlänge von ca. 24 Stunden, die in fast allen lebenden Organismen von Einzellern bis zum Menschen beobachtet werden können (Dunlap 1999). Das Antizipieren umweltbedingter Veränderungen und die Synchronisation interner Prozesse wie Zellteilung oder Metabolismus durch externe Zeitinformationen, so genannte „Zeitgeber“ (Aschoff 1951), erhöht die Fähigkeit von Organismen zur Aufrechterhaltung eines homöostatischen Gleichgewichts. Die Photoperiode ist der stärkste rhythmische Zeitgeber (Doyle et al. 2006, Doyle et al. 2007, Dibner et al. 2010) und definiert nicht nur die Länge von Tag und Nacht sondern synchronisiert auch den zirkadianen Oszillator der Organismen mit der Umwelt. Weitere Zeitgeber sind Licht (Pittendrigh et al. 1976), Temperatur (Edery 2000, Brown et al. 2002) und Nahrung (Stokkan et al. 2001, Schibler et al. 2003). Zu Beginn der zirkadianen Forschung wurde angenommen, dass zirkadiane Rhythmen eine passive Reaktion auf den Licht-Dunkel-Zyklus sind. Im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, dass die zirkadiane Uhr genetisch determiniert ist und endogen erzeugt wird (Reppert et al. 2002, Gallego et al. 2007, Zhang et al. 2010).

Der Einfluss biologischer Rhythmen wurde zunächst 1729 von dem Astronomen Jean-Jaques d'Ortous de Mairan beschrieben. Er beobachtete, dass Mimosen ihre Blätter auch in konstanter Dunkelheit in einem 24-Stunden-Rhythmus zyklisch öffnen und schließen und somit nicht von externen Lichteinflüssen gesteuert werden (DeMairan 1729). Weitere Experimente zeigten, dass sowohl Pflanzen als auch Säugetiere zirkadiane Rhythmen

aufweisen wenn sie unter konstant dunklen oder konstant hellen Bedingungen gehalten werden. Die Periodenlänge dieser *free-running* Rhythmen war von der Lichtintensität im jeweiligen Experiment abhängig (Kleinhoonte 1929, Bünning et al. 1930, Johnson 1939). In den darauf folgenden Jahren wurden zirkadiane Rhythmen auch in Bakterien (Mitsui et al. 1986), einzelligen Eukaryoten (Hastings et al. 1958), Insekten (Stein-Beling 1935), Vögeln (Kramer 1952), Nagetieren (Richter 1922), Primaten (Simpson et al. 1906) und im Menschen (Aschoff et al. 1962, Aschoff 1965) nachgewiesen; die molekularen und genetischen Grundlagen blieben jedoch unklar. Zeitgleich zu Aschoff konnte Colin S. Pittendrigh mit seinen Studien an *Drosophila pseudoobscura* nachweisen, dass die Periodenlänge des endogenen zirkadianen Rhythmus unabhängig von externen Einflüssen wie Temperaturschwankungen und daher temperaturkompensiert ist (Pittendrigh 1954). Neben der Temperaturkompensation müssen zwei weitere Merkmale erfüllt sein, damit ein biologischer Rhythmus als zirkadian gelten kann. (I) Zeitgeber wie Licht (Pittendrigh, et al. 1976), Temperatur (Edery 2000, Brown, et al. 2002) und Nahrung (Stokkan, et al. 2001, Challet et al. 2003) müssen in der Lage sein den Rhythmus mit der Umwelt zu synchronisieren (*Entrainment*). (II) Auch ohne Zeitgeber und unter konstant dunklen und hellen Bedingungen oder bei konstanten Temperaturbedingungen muss der Rhythmus eine Periodenlänge von ca. 24 Stunden aufweisen (*free-running* Rhythmen). Aschoff und Pittendrigh gelten heute mit ihren Forschungen als Begründer der modernen Chronobiologie und haben mit vielen grundlegenden Definitionen und Prinzipien diesen damals noch neuartigen Wissenschaftsbereich geprägt (Daan et al. 1996, Daan 2001).

1971 entdeckten Benzer und Konopka in einem Mutanten-Screening in *Drosophila melanogaster* einige zirkadiane Mutanten, welche veränderte Periodenlängen von 28 Stunden oder 19 Stunden aufwiesen oder völlig arrhythmisch waren. Alle Phänotypen wurden durch Mutationen in demselben Gen hervorgerufen, welches Konopka und Benzer *Period (per)* nannten (Konopka et al. 1971). Fast zeitgleich wurde in *Neurospora crassa*, einem Hyphenpilz, das Gen *frequency (frq)*, ein Regulator für die rhythmische, asexuelle Sporenreproduktion entdeckt (Feldman et al. 1973). Die erste zirkadiane Mutation bei Säugetieren wurde 1988 in Goldhamstern gefunden. Die Tiere mit der so genannten *tau* Mutation weisen eine Periodenlänge von 20 Stunden (homozygot) bzw. 22 Stunden (heterozygot) auf (Ralph et al. 1988). Im Jahr 2000 wurde gezeigt, dass diese Mutation auf dem Gen *Casein-Kinase 1ε (CK1ε)* lokalisiert ist (Lowrey et al. 2000). Ab 1994 wurden in Maus mehrere Genorthologe zu den bereits bekannten zirkadianen Uhrgenen in *D. melanogaster* isoliert und charakterisiert. Dazu gehörten unter anderem *mClock (circadian*

locomotor output cycles kaput) (Vitaterna et al. 1994, Gekakis et al. 1998), drei *Period*-Gene *mPer1*, *mPer2*, *mPer3* (Albrecht et al. 1997, Sun et al. 1997, Zylka et al. 1998) sowie *mCry1* und *mCry2* (Orthologe des *D. melanogaster* Gens *Cryptochrome*) (Stanewsky et al. 1998, Kume et al. 1999, van der Horst et al. 1999). Des Weiteren fand man den Interaktionspartner von *mClock*, *mBmal1* (*Muscle Arnt-like-1*; auch *mMop3* genannt; Ortholog des Gens *Cycle* in *D. melanogaster*) (Hogenesch et al. 1998, Rutila et al. 1998, Bunger et al. 2000), sowie das *mClock* Analog *mNpas2* (*mMop4*) (Reick et al. 2001), *mRev-Erba* (*Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1*, auch *mNr1d1* genannt) (Damiola et al. 2000, Preitner et al. 2002), *mRora* (*RAR-Related Orphan Receptor α*) (Sato et al. 2004, Guillaumond et al. 2005), *mRor β* (*RAR-Related Orphan Receptor β*) (Sumi et al. 2002), *mRor γ* (*RAR-Related Orphan Receptor γ*) (Mongrain et al. 2008) und die beiden (bHLH)-PAS Proteine DEC1 (SHARP2) und DEC2 (SHARP1) (Honma et al. 2002, Rossner et al. 2008). Mittlerweile hat man neben der zirkadianen Expression einer Vielzahl von Uhrgenen im zentralen zirkadianen Taktgeber im suprachiasmatischen Nucleus auch zirkadiane Expressionsmuster in verschiedensten peripheren Organen gefunden, unter anderem in Herz, Leber, Lunge, Magen, Milz (Yamamoto et al. 2004), Niere, Nebenniere (Yoo et al. 2004), Pankreas, Schilddrüse (Yamazaki et al. 2009) und Muskel (Yamazaki et al. 2000).

1.1.2 Der suprachiasmatische Nucleus als Hauptschrittmacher

Schon die ersten zirkadianen Experimente legten nahe, dass Licht einen starken Einfluss auf die innere Uhr haben musste. Im Laufe der Zeit stellte sich heraus, dass Organismen, die eine sogenannte „Master-Clock“ oder einen „Hauptschrittmacher“ besitzen, welcher durch Licht synchronisiert wird, auch periphere Uhren besitzen und diese in der Regel nicht durch Licht synchronisiert werden. Der Hauptschrittmacher der zirkadianen Uhr ist im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) im vorderen Bereich des Hypothalamus direkt über dem *Chiasma opticum* lokalisiert (Reppert, et al. 2002). Seine rhythmische Aktivität wird durch externe Lichtsignale über drei mögliche Signalwege gesteuert; den retinohypothalamischen (RHT), den geniculo-hypothalamischen (GHT) und den serotonergen (5HT) Signalweg, welcher entweder über die dorsalen Raphe-Kerne (DRN) oder die medianen Raphe-Kerne (MRN) induziert wird. Bei Säugetieren werden Lichtsignale meist über synaptische

Transmissionen des RHT Weges aufgenommen (Moore et al. 1972), über Axone der photosensitiven retinalen Ganglionzellen (pRGC) weitergeleitet und dann von elektrischen Informationen in chemische Signale umgewandelt, bevor sie zur Regulation der zirkadianen Uhr in den SCN-Neuronen dienen können (Moore et al. 1995, Berson et al. 2002). Neben dem Hauptschrittmacher im SCN besitzen auch andere Hirnregionen sowie die meisten Organe periphere Uhren. Aufgabe des SCN ist es, diese peripheren Uhren über verschiedenste Signalwege wie neuronale, endokrine und metabolische Stimuli oder Temperaturregulationen zu synchronisieren (Menaker et al. 2013). Der SCN dient somit als Verbindung zwischen der Umwelt und dem Organismus und hilft durch die Synchronisation an sich verändernde Umwelteinflüsse und die entsprechende Informationsweitergabe, dass sich die unterschiedlichsten Gewebe und somit der gesamte Organismus an die Umweltbedingungen anpassen kann (Dibner, et al. 2010). Knapp 30% der SCN-Axone, welche in der Informationsweitergabe involviert sind, sekretieren sowohl GABA (γ -Aminobuttersäure) als auch Peptidneurotransmitter (Buijs et al. 1995, Castel et al. 2000), einer von ihnen ist Prokineticin 2 (PK2) (Cheng et al. 2002). Die Expression von PK2 im SCN weist oszillierende Level mit Expressionsspitzen während der Mitte der subjektiven Lichtphase auf (Cheng et al. 2005). Weitere neurochemische Transmitter im SCN sind Glutamat (Hermes et al. 1996), Arginin-Vasopressin (AVP) (Kalsbeek et al. 1992), vasoaktives intestinales Peptid (VIP) (Kalsbeek et al. 1992), Cardiolipin-like Zytokin (Kraves et al. 2006) und der *Transforming Growth Factor α* (TGF α) (Kramer et al. 2001, Li et al. 2002). Zusätzlich zur Einflussnahme auf periphere zirkadiane Organe durch Hormonsekretion kann der SCN periphere Organe auch direkt durch neuronale Mechanismen beeinflussen und damit ihre Sensitivität gegenüber ausgeschütteten Hormonen regulieren (Cailotto et al. 2009).

1.1.3 Zirkadiane Uhren in peripheren Organen

Viele physiologische Funktionen, wie die xeno- und endobiotische Detoxifikation in Leber und Niere sowie der Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus von Leber-, Muskel- und Fettgewebe, unterliegen täglichen Oszillationen (Lamia et al. 2008, Le Martelot et al. 2009). Auch kardiovaskuläre Parameter, wie Blutdruck oder Herzschlag oszillieren zirkadian (Gachon et al. 2004). Angesichts der hierarchischen Struktur des zirkadianen Systems wird

angenommen, dass alle rhythmischen peripheren Funktionen durch Signale vom SCN koordiniert werden, gegebenenfalls über die Synchronisation weiterer peripherer Oszillatoren (Stratmann et al. 2006, Kornmann et al. 2007). Die Koordination der Detoxifikation und diverser Stoffwechselwege ist für den Organismus von großem Vorteil. Zum einen wird die Nährstoffaufnahme hierdurch optimiert und metabolische Prozesse mit unerwünschten Nebeneffekten weitestgehend reduziert. Zum anderen werden unverträgliche Reaktionen (z.B. Glykogensynthese und -abbau) zeitlich voneinander getrennt und erst dann induziert wenn es für den Organismus von Vorteil ist (Schibler 2007, Dibner, et al. 2010).

Diese Interaktion von Umwelteinflüssen mit dem Organismus ist von großer Bedeutung, da der Tag-Nacht-Zyklus dann mit den tagesrhythmisch verlaufenden Stoffwechselprozessen und der Nahrungsaufnahme einhergehen kann. Damit wird ein tageszeitlich optimales Verhalten des Organismus geschaffen, und der Metabolismus kann sich diesem Rhythmus anpassen (Green et al. 2008). Diese Synchronisation ist umso bedeutsamer, wenn man bedenkt, dass beispielsweise Erkrankungen assoziiert mit Schichtarbeit stetig an Relevanz gewinnen (Kyriacou et al. 2010). Schichtarbeit ist durch unregelmäßige, außerhalb der Norm liegende Arbeitszeiten definiert. Klassische Schichtarbeit findet sich häufig in sozialen Berufen mit Bereitschaftsdiensten wie bei der Feuerwehr, der Polizei oder im medizinischen Sektor wieder. Allerdings gibt es auch in vielen industriellen Großbetrieben Schichtsysteme ähnlicher Art. Hier herrscht üblicherweise ein Drei-Schicht-System, welches neben der gängigen 8.00 – 16.00 Uhr Schicht auch Arbeitszeiten bis 22.00 Uhr vorsieht und Nachtarbeit mit einplant. Laut Statistischem Bundesamt arbeiteten 2013 knapp 14% aller Bundesbürger regelmäßig nachts, je nach Berufsgruppe waren es bis zu 50% der Personen auf dem Arbeitsmarkt, die regelmäßig nachts oder in rotierenden Schichten arbeiteten (Bundesamt 2013). Dies hat zur Konsequenz, dass der zirkadiane Rhythmus durch asynchron zum Lichtzyklus stattfindende Schlafepisoden und Nahrungsaufnahme gestresst wird und nicht richtig mit der Umwelt synchronisiert werden kann (Atkinson et al. 2008). Mehrere Studien zeigen, dass Schicht- und Nachtarbeiter eine reduzierte Aufmerksamkeitsspanne haben (Rajaratnam et al. 2001, Foster et al. 2005), anfälliger für das metabolische Syndrom (Arble et al. 2009), Adipositas (Salgado-Delgado et al. 2010) und Diabetes mellitus Typ II (Nagaya et al. 2002) sowie Depression und Burn-out sind (Bildt et al. 2002, Arendt 2010). Zusätzlich haben sie häufiger eine schwächere Immunabwehr, kardiovaskuläre Erkrankungen wie Hypertonie (Kivimaki et al. 2006), Angina pectoris (Knutsson 2003) oder Myokardinfarkt (Aldfresson et al. 1982) sowie die erhöhte Wahrscheinlichkeit einen Schlaganfall zu erleiden (Brown et al. 2009). Außerdem treten einige Krebsarten wie Brustkrebs in diesen

Berufsgruppen vermehrt auf (Schernhammer et al. 2001, Poole et al. 2011). Ein gestörter zirkadianer Rhythmus wirkt sich sogar auf die Entwicklung ungeborenen Lebens aus (Arble et al. 2010).

Neben Schichtarbeit kann auch eine kurzzeitige Zeitverschiebung wie die Umstellung von Sommer- auf Winterzeit oder längere Reisen über mehrere Zeitzonen ähnliche Auswirkungen auf den zirkadianen Oszillator haben. Reisende mit Jetlag zeigen ähnliche, jedoch meist deutlich weniger ausgeprägte metabolische, kardiovaskuläre, psychiatrische und neurologische Symptomatiken wie Schichtarbeiter. (Vosko et al. 2010, Weingarten et al. 2013).

1.1.4 Die zirkadiane Uhr auf molekularer Ebene

Zirkadiane Oszillationen können nicht nur in intakten Organismen sondern auch in isolierten Organen und in kultivierten Zellen beobachtet werden (Nagoshi et al. 2005). Während das SCN sowohl isoliert als Ganzes (Inouye et al. 1979) als auch einzelne SCN Neuronen (Green et al. 1982, Groos et al. 1982, Shibata et al. 1982) noch nach drei Wochen als *in vitro* Kultur zirkadiane Aktivität aufweisen (Bos et al. 1990), schwächt diese bei *in vitro* Zellkulturen von peripheren Organen schnell stark ab. So zeigen z.B. Fibroblasten zwar robuste Oszillationen, sie desynchronisieren jedoch nach wenigen Tagen, da jede individuelle Zelle eine unterschiedliche Periodenlänge aufweist. Durch eine Serum- oder Dexamethasonsynchronisation oszillieren die Zellen als Gesamtzellkultur, jedoch zeigen auch die synchronisierten Zellen nach einigen Tagen eine Reduktion in ihren Oszillationsmustern (Balsalobre et al. 1998, Nagoshi et al. 2004). Auf Einzelzellebene weisen Fibroblasten robuste, temperaturkompensierte Oszillationen auf, welche sie während der Zellteilung an ihre Tochterzellen weitergeben (Nagoshi, et al. 2004).

Eine Vielzahl von Organismen weist zirkadiane Oszillationen auf, allerdings variiert der molekulare Aufbau von Uhren verschiedener Organismen stark. Grundlegend ist die molekulare Interaktion von positiv und negativ regulierten Genen, welche über Rückkopplungsschleifen miteinander verbunden sind. Während eine posttranslationale Rückkopplungsschleife bei Cyanobakterien durch die Expression von nur drei Genen (*kaiA*, *kaiB* und *kaiC*) gebildet wird (Dong et al. 2008, Egli et al. 2013), wird bei Pilzen wie zum

Beispiel *N. crassa* eine posttranslationale Rückkopplungsschleife mit dem Gen *frq* und den unterschiedlichen Phosphorylierungsformen der white collar-1 (WC-1) und white collar-2 (WC-2) Proteinen gebildet (Baker et al. 2012). Komplexere zirkadiane Uhren liegen in höheren Eukaryoten vor.

Bei Säugetieren wird die Rückkopplungsschleife aus den Genen *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* und *Cry2* gebildet. CLOCK und BMAL1, die beiden positiven Elemente dieser Schleife, besitzen eine bHLH- und zwei PAS-Domänen (*basic helix-loop-helix; Per-Arnt-Single-minded*) welche Heterodimerisierung und DNA-Bindung nach Translokalisierung des Heterodimers in den Zellkern, vermittelt durch die Kernlokalisierungssignale von BMAL1, ermöglichen (Kwon et al. 2006, Farre et al. 2009). CLOCK:BMAL1 Heterodimere induzieren Transkription durch Bindung über die bHLH-Domäne an eine oder mehrere E-Boxen mit der Konsensussequenz 5'-CACGTG-3' im Promoter des jeweiligen Zielgenes (Hogenesch et al. 1997, Yoo, et al. 2004, Nakahata et al. 2009). Zu den von CLOCK:BMAL1 regulierten Genen gehören unter anderem die *Pers*, *Crys*, *Nr1d1* und *Rora*. Neben dem positiven Arm existiert auch ein negativer Arm der Rückkopplungsschleife. Zunächst bilden die CRYs zusammen mit den PER-Proteinen Heterodimere im Zytoplasma, translozieren in den Nukleus und inhibieren dort die CLOCK:BMAL1 induzierte Transkription (Griffin et al. 1999, Jin et al. 1999, Sato et al. 2006). Die Level der PER- und CRY-Proteine werden durch die gehemmte Transkription von CLOCK:BMAL1 reduziert, da die PER- und CRY-Proteine auch ihre eigene Transkription inhibieren. Nach Degradation der PER- und CRY-Proteine kommt es zu einer Reaktivierung der CLOCK:BMAL1 induzierten Transkription und somit zu dem Beginn eines erneuten zirkadianen Zyklus mit einer Oszillationslänge von etwa 24 Stunden.

Zusätzliche Rückkopplungsschleifen modulieren zudem die erzeugten Oszillationen und sorgen somit für weitere Stabilität. Eine stabilisierende Rückkopplungsschleife beinhaltet die Gene für die nukleären Rezeptoren *Rev-Erba* und *Rora*. Das REV-ERB α Protein bindet an RORE (ROR [*Retinoic acid-related Orphan receptor*] *Response Element*) Sequenzen am *Bmal1* Promotor (Preitner, et al. 2002, Ueda et al. 2002, Guillaumond, et al. 2005). Hierdurch wird sowohl die *Bmal1* Transkription und in Folge wiederum die Transkription des *Rev-Erba* Gens selbst inhibiert. Zusätzlich inhibieren PERs und CRYs die CLOCK:BMAL1 Heterodimere und damit auch die *Rev-Erba* Genexpression. Neben REV-ERB α bindet auch ROR α an die RORE Sequenzen im *Bmal1* Promotor und aktiviert die *Bmal1*-Transkription (Giguere 1999, Sato, et al. 2004, Akashi et al. 2005). So konkurrieren REV-ERB α - und

ROR α Proteine um die RORE Sequenzen und verbindet somit den negativen direkt mit dem positiven Arm der zirkadianen Uhr (Guillaumond, et al. 2005).

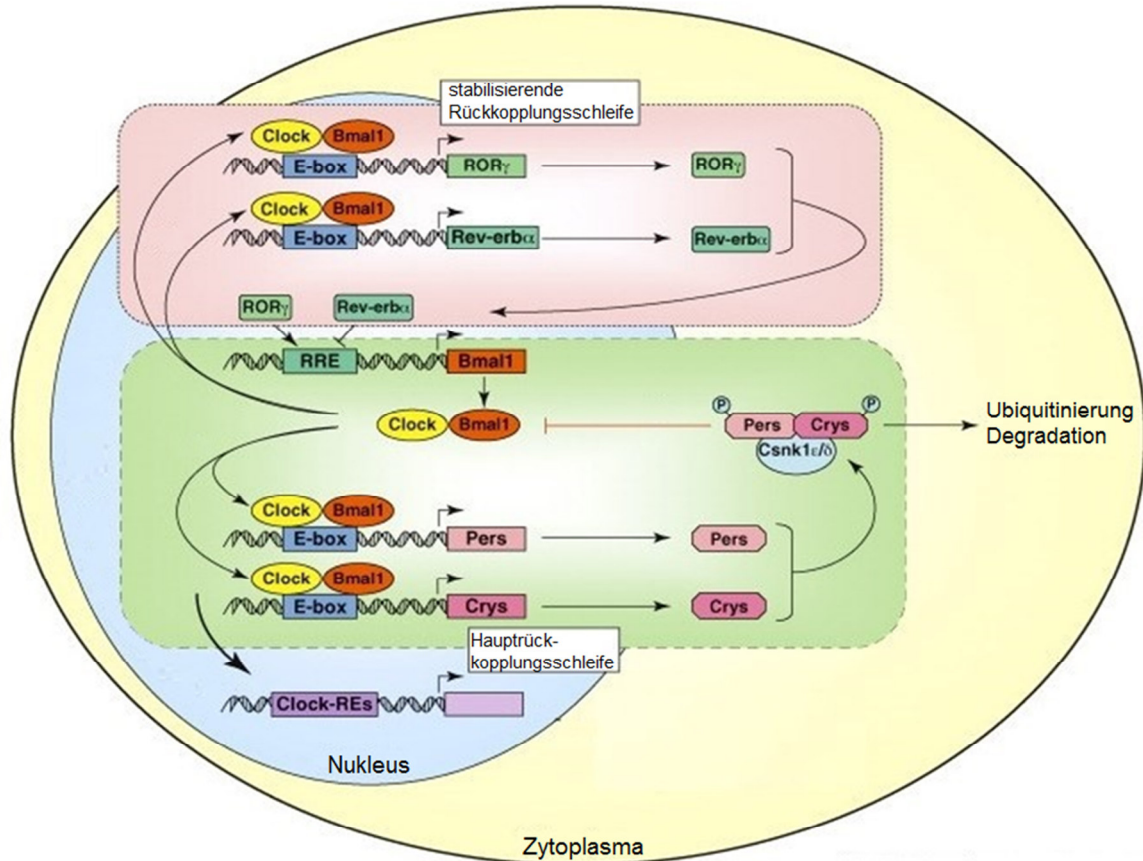


Abbildung 1.1: Der molekulare Mechanismus der zirkadianen Uhr in Säugtieren

Die zirkadiane Uhr wird über den positiven und negativen Arm der Rückkopplungsschleife und durch mehrere posttranslationale Mechanismen geregelt. Das CLOCK:BMAL1 Heterodimer bindet zunächst an E-Box Elemente in den Promoterregionen der Uhrgene *Per* und *Cry* und aktiviert deren Expression. *Pers* und *Crys* wiederum inhibieren die Transkriptionsaktivität von CLOCK:BMAL1 durch Bindung an E-Box Elemente in ihren eigenen Promotoren und durch Komplexbildung mit und Phosphorylierung durch CK1 ϵ und - δ . CLOCK:BMAL1 aktiviert auch die Expression weiterer zirkadianer Proteine wie REV-ERB α , ROR α , DEC1, DEC2 und DBP, welche stabilisierende Rückkopplungsschleifen bilden. Diese und weitere Transkriptionsfaktoren steuern eine Vielzahl von biologischen Prozessen (Nader et al. 2010).

1.1.5 Regulationsebenen der zirkadianen Uhr

Neben den transkriptionellen Rückkopplungsschleifen sind zusätzliche Regulationsebenen für die Genauigkeit der zirkadianen Uhr verantwortlich (Reddy et al. 2002, Hastings et al. 2003). mRNA sowie Proteinmenge und -aktivität von Uhrgenen werden auf transkriptionaler, translationaler und posttranslationaler Ebene durch viele weitere Faktoren reguliert (Garbarino-Pico et al. 2007). Einer dieser regulatorischen Faktoren sind Modifikationen an basischen Proteinen, so genannten Histonen, welche in der DNA im Nukleus dicht gepackt sind. Acht dieser Histone und etwa 200 bp der DNA bilden das Nukleosom (Kornberg 1974). Histonmodifikationen können z.B. durch Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung oder Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung beobachtet werden, sie können z.T. zu einer Änderung der Chromatinkonformation führen und somit in einer verstärkten oder verminderten Transkription resultieren (Strahl et al. 2000).

Auch die Chromatinregulation beeinflusst die zirkadiane Uhr. Dafür können unter anderem auf transkriptionaler Ebene sowohl zyklische Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP)-Responseelemente (CRE) am Promotor als auch strukturelle Veränderungen im Chromatin verantwortlich sein. CRE-Motive (TGACGTCA), welche sowohl in *Per1*- (Hida et al. 2000) als auch in *Per2*-Promotoren (Travnickova-Bendova et al. 2002) vorhanden sind, sind für die lichtinduzierte Expression von *Per1* durch CREB (CRE-bindendes Protein) essentiell (Obrietan et al. 1998, Travnickova-Bendova, et al. 2002). Die Aktivierung von pCREB durch ERK1/2 erfolgt nach der durch Licht induzierten Phosphorylierung. Des Weiteren werden die beiden Histon-Acetyltransferasen (HAT), das CREB-Bindeprotein (CBP) und p300 für die Bindung von pCREB an CRE benötigt (Kwok et al. 1994, Lee et al. 1996, Whitmore et al. 2000). Sie acetylieren bevorzugt die Histone H3 und H4. Studien konnten zeigen, dass die CRE-vermittelten Transkriptionszyklen im SCN von Mäusen in konstanter Dunkelheit zyklisch sind (Obrietan, et al. 1998). CBP und p300 interagieren rhythmisch mit Komplexen des positiven Armes der zirkadianen Uhr (Takahata et al. 2000, Etchegaray et al. 2003, Curtis et al. 2004). Des Weiteren wurde CLOCK selbst als eine HAT identifiziert und ist an der Acetylierung von BMAL1 beteiligt, während die Deacetylierung von BMAL1 maßgeblich durch die Histondeacetylase Sirtuin 1 (SIRT1, Homolog des Hefegens *Sir2*), welche selbst zirkadiane Muster aufweist, beeinflusst wird (Doi et al. 2007, Hirayama et al. 2007, Belden et al. 2008, Nakahata, et al. 2009). Somit kann neben der Acetylierung von BMAL1 mit Hilfe

von CLOCK auch der negative Arm der zirkadianen Uhr durch eine Acetylierung reguliert werden (Etchegaray, et al. 2003, Naruse et al. 2004, Hirayama, et al. 2007).

Zirkadiane Uhren, insbesondere peripherer Organe und Gewebe, können auch durch metabolische Signale reguliert werden. Sirtuine bilden dabei ein Verbindungsglied zwischen dem zirkadianen und den metabolischen Prozessen. Neben SIRT1, einer NAD⁺ (Nicotinamidadenindinukleotid)-abhängigen Histondeacetylase, gibt es bei Säugetieren noch weitere sechs Sirtuine, SIRT2 bis SIRT7 (Frye 2000), welche alle eine NAD⁺-Bindestelle und eine katalytische Domäne besitzen, jedoch Unterschiede in ihren N- und C-terminalen Enden aufweisen (Li et al. 2009). Aufgrund dieser Unterschiede haben die Sirtuine andere Bindungspartner, abweichende Substrate und unterschiedliche Lokalisationen (Haigis et al. 2010). SIRT3, SIRT4 und SIRT5 sind mitochondriale Sirtuine (Verdin et al. 2010, He et al. 2012). SIRT2 ist im Zytosol, SIRT6 und SIRT7 primär im Nukleus lokalisiert (Ford et al. 2006, Mostoslavsky et al. 2006), während SIRT1 in einigen Geweben in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen zwischen dem Kern und dem Zytosol shuttle kann (Michishita et al. 2005, Tanno et al. 2007). Da auch SIRT1 eine NAD⁺ Bindestelle aufweist, steht es in direkter Interaktion mit dem zellulären NAD⁺ Level und somit dem metabolischen/ energetischen Status der Zellen. So konnten neben der Interaktion mit den Komponenten der zirkadianen Uhr auch Verbindungen mit dem Glukose- und Lipidstoffwechsel (Rodgers et al. 2007, Liu et al. 2008, Purushotham et al. 2009) als auch zu Alterungsprozessen nachgewiesen werden (Picard et al. 2004, Nisoli et al. 2005). Auch die NAD⁺-abhängige Deacetylase SIRT3 weist Verbindungen mit der zirkadianen Uhr auf, ihr Ko-Faktor NAD⁺ oszilliert zirkadian und somit steht sie im Zusammenhang mit zirkadianen Rhythmen in der Acetylierung, der Aktivität von oxidativen Enzymen und der Respiration in isolierten Mitochondrien. Daher moduliert die zirkadian kontrollierte Verfügbarkeit von NAD⁺ die mitochondrialen oxidativen Funktionen von SIRT3 (Peek et al. 2013, Rey et al. 2013). Neben SIRT1 und SIRT3 interagiert auch SIRT6 mit dem zirkadianen Oszillator. SIRT6 reguliert die Chromatinbindung an die zirkadianen Promotoren und interagiert so direkt mit CLOCK:BMAL1. Die zirkadiane Chromatinbindung resultiert in einer zirkadianen Regulation von Genen welche im Cholesterol- und im Lipidstoffwechselweg involviert sind (Masri et al. 2014).

Neben der transkriptionalen Regulation der zirkadianen Uhr gibt es auch zahlreiche (post-) translationale Modifikationen, welche Prozesse der zirkadianen Uhr auf verschiedenste Arten reglementieren können (Lee et al. 2001, Gallego, et al. 2007). Eine wichtige Rolle übernehmen dabei die beiden Casein-Kinasen 1δ (CK1δ) und -1ε (CK1ε); diese werden

konstitutiv im SCN von Säugetieren exprimiert (Lowrey, et al. 2000, Takano et al. 2000, Ishida et al. 2001, Lee, et al. 2001). Durch die Phosphorylierung der PERs beeinflussen CK1 ϵ und CK1 δ maßgeblich die Geschwindigkeit der Uhr (Ralph, et al. 1988, Dey et al. 2005, Meng et al. 2008). Sie phosphorylieren sowohl PER1 und PER2 in Mäusen (Keesler et al. 2000, Camacho et al. 2001) und Menschen (Vielhaber et al. 2000, Akashi et al. 2002, Eide et al. 2002), während bisher keine Interaktion mit PER3 nachgewiesen werden konnte. Dies könnte erklären, warum *Per1* (Cermakian et al. 2001) und *Per2* (Zheng et al. 1999) nicht aber *Per3* (Lee et al. 2004) auf transkriptionaler Ebene zirkadiane Rhythmen aufweisen. Der Abbau von PER wird durch β -*Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase* (β TrCP) vermittelt (Shirogane et al. 2005). CK1 ϵ und CK1 δ bilden auch Komplexe mit CRYs und phosphorylieren diese (Lee, et al. 2001). Dabei steht auch dieser Proteinabbau unter zirkadianer Regulation; das *F-Box and Leucine-Rich Repeat Protein 3* (FBXL3) ist bei der phosphorylierungsabhängigen Ubiquitinierung von CRYs involviert (Godinho et al. 2007, Siepka et al. 2007) und die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert CRY2 für den proteasomalen Abbau (Harada et al. 2005).

Zusätzlich zur Phosphorylierung der PERs, reguliert CK1 sich selbst durch Autophosphorylierung von acht Aminosäuren in ihrem C-Terminus, wodurch es zu einer Inhibition ihrer Aktivität kommt (Graves et al. 1995, Cegielska et al. 1998, Gietzen et al. 1999). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Kinaseaktivität unter anderem von den Proteinphosphatasen PP1, PP2A, PP2B (Calcineurin) und PP5 wiederhergestellt werden kann, da diese die entsprechenden Aminosäuren dephosphorylieren (Cegielska, et al. 1998, Lowrey, et al. 2000). Die Bedeutung der PER-Phosphorylierung wird durch Mutationen in den CK1 ϵ - und CK1 δ Kinasen deutlich, diese führen bei Säugetieren zu veränderten zirkadianen Periodenlängen, welche sich als Schlafstörungen manifestieren (Toh et al. 2001, Xu et al. 2005). Die *in vivo* Expression von beispielsweise einer dominant negativen PP5 Mutante verringert die PER Phosphorylierung und eine Runterregulierung von PP5 reduziert die zirkadian oszillierende Amplitude von kultivierten menschlichen Fibroblasten deutlich (Partch et al. 2006). CK1 ϵ und CK1 δ , ihre Phosphatasen und die PERs und CRYs regulieren die zirkadiane Uhr in einem dynamischen Zusammenhang.

Auch die zellulären Level von CLOCK und BMAL1 werden durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Sowohl BMAL1 als auch CLOCK können durch GSK3 phosphoryliert werden, außerdem phosphoryliert CK1 ϵ neben den PERs und CRYs auch BMAL1 (Eide, et al. 2002). Auch MAPK (auch ERK genannt) ist in der Phosphorylierung

von BMAL1 involviert (Sanada et al. 2002). Neben der Phosphorylierung ist auch die Sumoylierung eine posttranslationale Modifikation, welche die zirkadianen Proteinlevel beeinflusst. Dabei kann BMAL1, in Abhängigkeit von CLOCK, von *Small Ubiquitin-related MOdifier* (SUMO) sumoyliert werden. Dies führt zu einem zum Anstieg des Transkriptionslevel des CLOCK:BMAL1 Heterodimers, zum anderen zum proteasomalen Abbau des zuvor markierten BMAL1 (Cardone et al. 2005, Lee et al. 2008).

1.1.6 Zirkadiane Oszillationen und Phasenverschiebungen

Zirkadiane Uhren können durch eine Reihe externer Stimuli moduliert werden; der stärkste Zeitgeber ist Licht. Der Effekt auf den zirkadianen Oszillator hängt dabei von Art, Dauer und Intensität des verwendeten Stimulus sowie vom Zeitpunkt der Stimulation relativ zur Phase des Oszillators ab. Zur experimentellen Bestimmung des Einflusses verschiedener Zeitgeber auf zirkadiane Uhren werden sogenannte Phasenverschiebungsexperimente durchgeführt. Um beispielsweise den Einfluss von Licht auf den Hauptschrittmacher in Mäusen zu untersuchen, werden Tiere unter konstanter Dunkelheit (DD) mit Wasser und Nahrung *ad libitum* gehalten, im Gegensatz zur Haltung unter Licht-Dunkelrhythmen (LD), und mit kurzen Lichtreizen zu verschiedenen Zeitpunkten stimuliert (Mendoza et al. 2010). Die zirkadiane Aktivität der Tiere wird vor und nach Setzen des Stimulus gemessen, wozu verschiedene Verhaltensparameter herangezogen werden können, z.B. das Trinkverhalten, die Körpertemperatur oder die Laufradaktivität (Leise et al. 2013). In solchen Experimenten haben Lichtsignale im Laufe des subjektiven Tages der Tiere so gut wie keinen Einfluss auf den zirkadianen Schrittmacher. Dagegen zeigen sich deutliche Effekte bei Stimulation der Tiere während der subjektiven Nacht (Aschoff 1969, Pittendrigh, et al. 1976). Bei Reizen am frühen Abend zeigen die Tiere eine Phasenverzögerung, bei Reizen in der späten Nacht wird ein Phasenvorlauf beobachtet (Pittendrigh, et al. 1976). Diese Experimente zeigen deutlich, dass der Zeitpunkt der Stimulation ausschlaggebend ist, da Lichtreize bei Tieren unter *free-running* Bedingungen je nach Stimuluszeitpunkt die Phase beschleunigen oder verzögern können. Neben *in vivo* Experimenten kann man auch mit Gewebeproben oder kultivierten Zellen Phasenverschiebungsexperimente durchführen. Als externe Reize dienen beispielsweise Temperaturveränderungen, pharmakologisch wirksame Substanzen oder Metabolite. Anders als bei *in vivo* Experimenten, werden kultivierte Zellen zunächst durch

Serum- oder Dexamethasoninkubation synchronisiert (Balsalobre et al. 2000). Anschließend wird ein Stimulus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Synchronisation appliziert und die rhythmische Expression einzelner Uhrgene vor und nach Applikation des Stimulus gemessen. Die Funktionsweise des zirkadianen Oszillators wird durch die Parameter Amplitude, Phase und Periodenlänge beschrieben (Bagheri, et al. 2007). Dabei ist die Periodenlänge die benötigte Zeit, um einen kompletten Oszillationszyklus abzuschließen. Die Amplitude ist die Differenz zwischen den Maximalwerten (Hoch- und Tiefpunkt) und dem arithmetischen Mittelwert der Maximalwerte. Die Phase beschreibt die relative Position eines Wertes, üblicherweise eines Hoch- oder Tiefpunkts der Oszillationskurve, relativ zum Synchronisationszeitpunkt (Kuhlman et al. 2007).

Phasenverschiebungen werden graphisch entweder in *phase response curves* (PRC) oder in *phase transition curves* (PTC) dargestellt (Johnson 1990). Während bei der PRC das Ausmaß

der Phasenverschiebung gegen den Zeitpunkt des Stimulus aufgetragen wird, wird bei der PTC die alte gegen die neue Phase aufgetragen; ob es sich dabei um eine Verzögerung oder einen Vorlauf handelt, ist dabei sekundär (Johnson 1992). Des Weiteren unterscheidet man bei letzterem zwischen Typ 1 und Typ 0 PTC; kleinere Phasenverschiebungen (bis zu sechs Stunden) werden als Typ 1 PTC klassifiziert (sie zeigen graphisch eine

Steigung ~ 1), größere Phasenverschiebungen als Typ 0 PTC (graphisch eine Steigung ~ 0) (Winfree 2001, Kuramoto 2003). In heterozygoten CLOCK Mäusen wurde nach einem Lichtstimulus ein Typ 0 PTC beobachtet während Wildtyp-Kontrollmäuse einen Typ 1 PTC aufwiesen. Auch SCN Schnitte dieser Tiere wiesen nach Mediumwechsel gleiche PTC Muster auf. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sowohl Licht als auch Mediumwechsel in

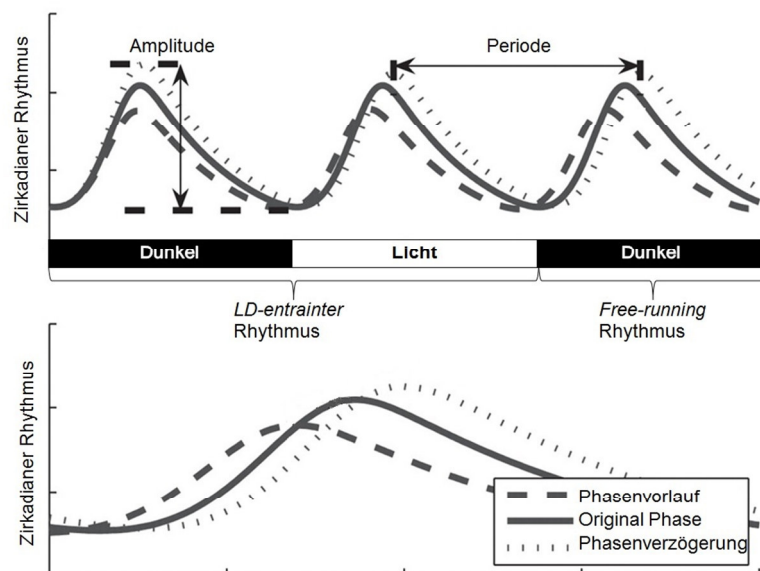


Abbildung 1.2: Parameter des zirkadianen Oszillators

Wichtige Charakteristika einer oszillierenden Kurve sind die Amplitude, die Periode (oberer Graph) und die Phase, welche allesamt durch Stimuli beeinflusst werden können. Dies kann in einem Phasenvorlauf oder einer Phasenverzögerung resultieren (unterer Graph) [modifiziert nach (Bagheri et al. 2007)].

heterozygoten CLOCK Mäusen und ihren SCN Schnitten zu einer Phasenverschiebung von mehr als sechs Stunden führen während Wildtyp-Kontrollmäuse deutlich kleinere Phasenverschiebungen aufwiesen (\leq sechs Stunden) (Vitaterna et al. 2006).

Interessanterweise haben die meisten zirkadianen Uhren verschiedener Organismen eine „kritische Phase“, bei der ein Lichtstimulus die Amplitude der Oszillation so stark reduziert, dass es zur Arrhythmizität oder „Singularität“ kommt (Winfree 1970, Jewett et al. 1991, Johnson et al. 1992, Honma et al. 1999, Covington et al. 2001). Lichtstimuli in einer anderen als der „kritischen“ zirkadianen Phase führen nicht zu einer Reduktion der Amplitude und können sogar in einem Amplitudenanstieg resultieren (Challet et al. 2003, Spoelstra et al. 2004). Die Singularität ist ein von Bakterien bis hin zu Säugetieren konserviertes Phänomen. In der Literatur wurden bisher zwei Modelle zu diesem Phänomen diskutiert: Die Amplitudenreduktion könnte zum einen durch die Desynchronisation der einzelnen Zellen und somit der einzelnen Oszillatoren, zum anderen aus der Dämpfung der Gesamtamplitude der Zellpopulation durch Arrhythmizität individueller Zellen entstehen (Winfree 1970, Winfree 1975). Auf molekularer Ebene könnte dies an einer ungleichen Neusynthese- und Abbaurate wichtiger zirkadianer Komponenten oder einem verschobenen Gleichgewicht zwischen Aktivatoren und Repressoren der zirkadianen Rückkopplungsschleife liegen.

Die bereits in Zellkulturmodellen durchgeführten Studien konnten weder eines der beiden Modelle ultimativ belegen oder widerlegen (Pulivarthy et al. 2007, Ukai et al. 2007). Pulivarthy und Kollegen zeigten, dass die zirkadianen Rhythmen in Fibroblasten auf Proteinebene abhängige Veränderungen in Phase und Amplitude aufweisen wenn sie einem Lichtstimulus ausgesetzt werden. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich individuelle Zellen jeweils zum Teil in der Phasenverzögerung oder im Phasenvorlauf befinden während einzelne Zellen durch den Lichtstimulus keine Phasenverschiebung aufzeigen. Somit oszilliert jede individuelle Zelle arrhythmisch zu ihrer Nachbarzelle, dies resultiert in der Reduktion der Gesamtamplitude der Zellpopulation durch die arrhythmisch oszillierenden Einzelzellen. Allerdings bemerken die Autoren dieser Studie auch, dass die Methoden der Einzelzellmessungen noch nicht vollständig technisch ausgearbeitet wurden und es weiteren Untersuchungen bedarf. Ukai und Mitarbeiter zeigten, dass die PER2 Aktivität in Zellen mit Melanopsin nach einem Lichtstimulus im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen einen Phasenvorlauf und eine Amplitudenänderung aufwies. Sie nehmen an, dass der Lichtstimulus die einzelnen Zellen und somit jeden einzelnen Oszillator desynchronisiert und somit für die Amplitudenveränderung verantwortlich ist. Allerdings schließen sie die Möglichkeit des

zweiten Modells für andere experimentelle Organismen nicht aus. Im SCN von Organismen hingegen können Oszillatoren, welche eine gedämpfte Amplitude aufweisen, von einigen wenigen rhythmisch robusten Oszillatoren wiederhergestellt werden (Liu et al. 2007). Dies könnte auch die Schwierigkeit erklären, eine Singularität in Säugetieren experimentell zu induzieren und über einen längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten und zu erforschen.

1.2 Autophagie – der kontrollierte Selbstverdau

Der Prozess der Autophagie ist seit etwa 50 Jahren bekannt. Der Terminus „Autophagie“ wurde erstmalig in 1963 von Christian R. de Duve verwendet (Blobel 2013, Dunn et al. 2013). De Duve war es auch, der zuvor schon das Enzym saure Phosphatase (Appelmans et al. 1955) und daraufhin in den 1950ern mittels biochemischer Methoden das Lysosom entdeckte (De Duve et al. 1955). Nur kurze Zeit später konnten er und Kollegen mit dem Elektronenmikroskop erstmalig Lysosomen in Zellfraktionen nachweisen (Novikoff et al. 1956). Für seine Entdeckungen „über die strukturelle und funktionelle Organisation der Zelle“ erhielt er zusammen mit Albert Claude und George E. Palade 1974 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Nobelprize 1974). Mittlerweile sind die meisten an der Autophagie beteiligten Gene und Proteine identifiziert worden und liegen von der Hefe bis hin zu Säugetieren hochkonserviert vor (Takeshige et al. 1992, Klionsky et al. 2003, Klionsky 2007).

Heute ist bekannt, dass die Autophagie ein essentieller intrazellulärer Abbaumechanismus in eukaryotischen Organismen ist. Während das Proteasom unter normalen Wachstumsbedingungen zuvor ubiquitinierte, nicht mehr benötigte oder falsch gefaltete Proteine im Zytoplasma und im Kern degradiert (Kostova et al. 2003, Meusser et al. 2005), werden bei der Autophagie neben zytosolischen Makromolekülen auch Zellorganellen abgebaut. Die so gewonnenen Molekülbausteine werden dem Organismus anschließend wieder für katabolische und anabolische Prozesse zur Verfügung gestellt, wodurch ein Recycling Kreislauf entsteht (Farre et al. 2004, Boya et al. 2013). Die meist durch zellulären Stress ausgelöste Autophagie kann multiple Gründe haben; hauptsächlich ist oft ein Mangel an Aminosäuren, Wachstumsfaktoren, Kohlenstoff oder Stickstoff (bei Pflanzen oder Hefen), selbst ein Sulfatmangel kann in manchen Organismen autophagische Prozesse stimulieren. Auch Insulin, Interleukine, Keramide oder Glukosamine oder die Ansammlung von *reactive oxygen species* (ROS) können Autophagie begünstigen (Tanida 2011). Zusätzlich ist die Autophagie in vielen weiteren zellulären Prozessen involviert, zu welchen unter anderem auch diverse Entwicklungsprozesse (Levine 2005, Levine et al. 2011), unterschiedliche stressbedingte Mechanismen der Zellen, wie die Antwort auf Hitzeschock, oder Detoxifikationsmechanismen (Zhao et al. 2009, Komatsu et al. 2010, Mei et al. 2014, Moon et al. 2014) als auch die Wirkung von pathogenen und kanzerogenen Einflüssen und Immunantworten zählen (Levine et al. 2007, Goldsmith et al. 2014, Vural et al. 2014). Zudem wirkt sich die Autophagie bei unterschiedlichen Krankheiten (Nixon et al. 2005, Singh et al.

2009, Mathew et al. 2011, Bonaldo et al. 2013), der Apoptose (McMillan et al. 2014) sowie auf die Alterungsprozesse von Zellen und ganzen Organismen aus (Vellai 2009, Cuervo et al. 2014).

1.2.1 Die Makroautophagie

Makroautophagie findet permanent auf einem basalen Grundniveau statt, wird jedoch als Reaktion auf diverse Arten von Stress hochreguliert (Klionsky et al. 2013), zum Beispiel wenn ein Organismus unter akutem Nährstoffmangel nicht mehr mit wichtigen Makromolekülen versorgt wird. Dabei werden in Säugetierzellen zytosolische Proteinkomplexe und Organellen von einem Doppelmembranvesikel aufgenommen, dem sogenannten Phagophor, der Vorstufe des Autophagosoms (Feng et al. 2014). Das Membranmaterial des Phagophors, welches es zur weiteren Elongation benötigt, stammt von Plasmamembranen (Ravikumar et al. 2010), dem Golgi Komplex (Yen et al. 2010), dem endoplasmatischen Retikulum (Lynch-Day et al. 2010) oder den Mitochondrien (Hailey et al. 2010).

Durch die Aktivierung der Autophagie wird der Master Regulator, die Serin/ Threoninkinase mTor (*target of rapamycin*) inhibiert. Dieser existiert in mindestens zwei Komplexen, TORC1 und TORC2; jedoch ist nur TORC1 durch Nährstoffe wie Glukose oder Aminosäure reguliert und beeinflussbar (Dann et al. 2007). Für die Bildung des Phagophores phosphoryliert bereits phosphoryliertes AMPK (Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase) den ULK1/ULK2 Komplex (Atg1 in Hefen) bestehend aus ULK1, ULK2, FIP200 (Atg17 in Hefen), ATG101 und ATG13 (Hara et al. 2008, Mercer et al. 2009). ATG14 ist ein Bestandteil eines weiteren, wichtigen Komplexes in der Phagophor und Autophagosomenbildung. Dieser beinhaltet die Lipidkinase PIK3C3 (Vps34), welche einen Komplex mit dem regulatorischen Element PIK3R4 (Vps15), BECLIN1 (Vps30/Atg6 in Hefen), und ATG14 einget (Itakura et al. 2008). Weitere Interaktions- und Bindungspartner können AMBRA1, UVRAG (Vps38 in Hefen), Rubicon, Bif-1 oder Rab5 sein (Burman et al. 2010). Eine der wichtigsten Aufgaben dieses PtdIns3 Kinase-Komplexes besteht in der Neusynthese des Phosphoinositid PtdIns3P (PIP3), welches zur Rekrutierung weiterer Faktoren in der Autophagosomenelongation

benötigt wird. Weiterhin wird neu synthetisiertes MAP1/LC3 (Atg8 in Hefen) im Zytosol durch ATG4B proteolytisch gespalten (proLC3 -> LC3-I) (Kabeya et al. 2000), durch die Bindung von ATG7 aktiviert und durch die Bindung von ATG3 am C-terminalen Glycin an Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert (LC3-II) (Tanida et al. 2001, Tanida et al. 2002). Parallel dazu wird auch ATG12 durch ATG7 aktiviert und am C-terminalen Glycin an einen Lysinrest von ATG5 konjugiert. ATG5 bindet nicht kovalent an ATG16L1, welches später dimerisiert (Mizushima et al. 1998, Mizushima et al. 2003). ATG16L1 bestimmt auch den Ort der neu zu entstehenden Autophagosomen (Fujita et al. 2008). Nach der dann abgeschlossenen Elongation fusioniert das Autophagosom letztlich mit einem Lysosom (dann Autolysosom genannt) oder, bei Pflanzen und Pilzen, einer Vakuole (dann autophagisches Körperchen genannt) (Klionsky et al. 2014). Bei Säugetierzellen ist es auch möglich, dass das Autophagosom zunächst mit einem Endosom fusioniert. Dies resultiert in einem Amphisom (Sanchez-Wandelmer et al. 2013), welches in einem zweiten Schritt mit dem Lysosom fusioniert, in einem Autolysosom resultiert um seinen Inhalt der Degradation zukommen zu lassen. Der Inhalt der fusionierten Autolysosomen/ autophagischen Körperchen wird durch Hydrolasen, wie Cathepsin L, Lipasen und Proteasen abgebaut und durch Membranpermeasen freigesetzt (Tanida 2011).

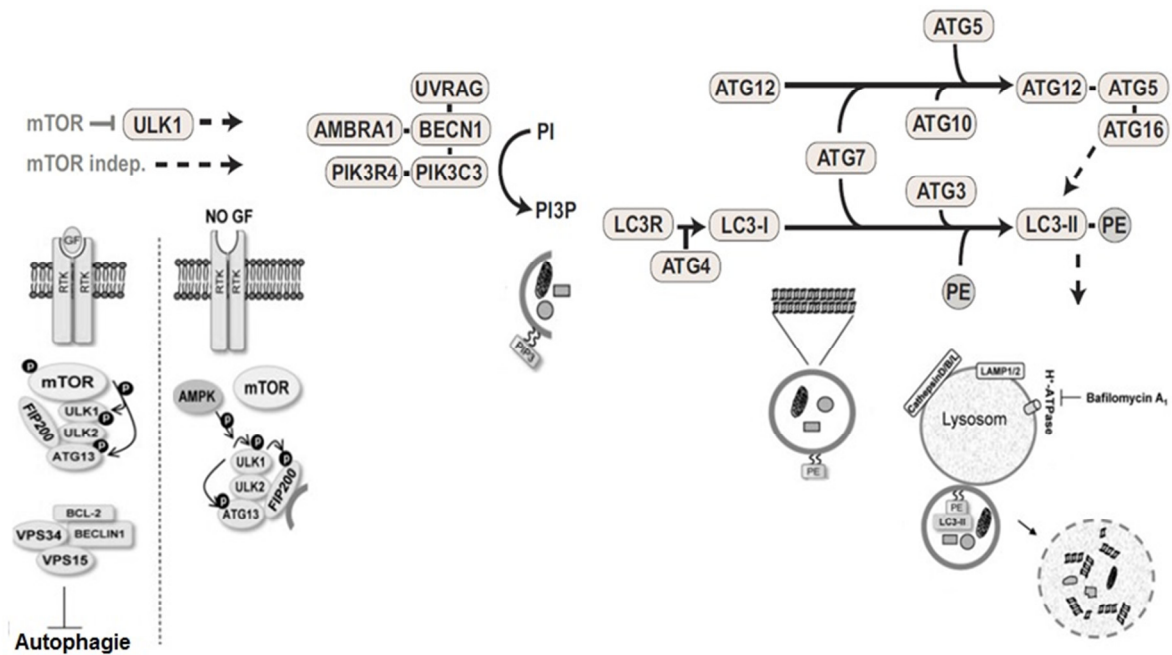


Abbildung 1.3: Der molekulare Mechanismus der Autophagie in Säugetieren

Autophagie kann über mTOR-abhängige oder -unabhängige Signalwege induziert werden, wobei der Prozess mit der Aktivierung des ULK1/2 Kinase-Komplexes beginnt, welcher z.B. durch Nährstoffmangel ausgelöst wird. Phosphoryliertes, aktives ULK1 fördert die Phosphorylierung von ATG13 und FIP200 und löst sich von mTOR. Des Weiteren bildet PIK3C3 (Vps34) einen Komplex mit PIK3R4 (Vps15), UVRAG, AMBRA1 und Beclin1. Zwei Ubiquitin-ähnliche Modifikationssysteme sind für Autophagie essentiell; ATG12 wird durch ATG7 aktiviert, zu ATG10 übertragen, an ATG5 konjugiert, um anschließend einen Komplex mit ATG16 einzugehen. MAP1/LC3 wird durch ATG4 gespalten, durch ATG7 aktiviert, zu ATG3 übertragen, und an PE konjugiert. Diese Form, auch als MAP1/LC3-II bekannt, lokalisiert dann an die Autophagosomenmembran und wird anschließend im Lysosom abgebaut. Autophagosomen enthalten Materialien wie Proteine und Organellen, die nach der Fusion mit Lysosomen abgebaut werden können [modifiziert nach (Jaeger et al. 2009, Helgason et al. 2011)].

Es gibt mehrere Möglichkeiten die Autophagielevel experimentell zu bestimmen, zum einen durch die transmissionselektronenmikroskopische Bildanalyse (TEM) von GFP-LC3 Punkten oder durch die Messung von LC3 via *Western Blotting*. Da die Autophagie, wie andere Signalkaskaden auch, an mehreren Stellen reguliert werden kann, wirkt sich dies kritisch auf die Messung der Autophagielevel aus. Eine Autophagosomakkumulation und somit höhere LC3-Level könnten beispielsweise die Induktion des Autophagieprozesses widerspiegeln, eine Reduktion in dem Autophagosomenumsatz oder ein Ungleichgewicht zwischen dem Umsatz und der Autophagosombildung darstellen. Daher wird nicht nur die gestiegene LC3-Lipidation oder die Bildung der Autophagosomen gemessen, sondern auch der Durchfluss (Flux) des Autophagosomes während des gesamten autophagischen Prozesses inklusive der Fusion mit dem Lysosom bzw. der Vakuole und dem anschließenden Abbau.

Inhibitoren greifen regulierend in die Autophagie ein, durch Rapamycin, einem mTor-Inhibitor, kann Autophagie induziert werden. PIK3C3-Inhibitoren wie 3-Methyladenin (3-MA) oder Wortmannin, greifen hemmend in die frühen Stadien des Autophagieprozesses ein. Auch ist es möglich den Prozess der Autolysosombildung mittels Substanzen wie z.B. Chloroquin oder Bafilomycin A, zu inhibieren. Diese Substanzen akkumulieren in den Endosomen/ Lysosomen, inhibieren die lysosomale H⁺-ATPase und verhindern somit schlussendlich die Ansäuerung des Lysosoms. Daraus resultiert eine Akkumulation der Autophagosomen in der Zelle und die Möglichkeit neben den statischen autophagischen Leveln auch den autophagischen Flux anhand des Markers MAP1/LC3 zu bestimmen (Klionsky et al. 2012).

1.2.2 Die Mikroautophagie

Bei der nicht-selektiven Form der Mikroautophagie werden zytosolische Proteine und möglicherweise Lipide durch röhrenförmige Membraneinstülpungen des Lysosoms bzw. der Vakuole in das lysosomale Kompartiment transportiert (Mijaljica et al. 2011). Die selektive Form der Mikroautophagie kann aufgrund der spezifischen Organelldegradation weiter klassifiziert werden; so werden bei der Pexophagie selektiv Peroxisomen abgebaut (Sibirny 2011, Till et al. 2012). Diese lässt sich in Makro- und Mikropexophagie gliedern (Farre et al. 2008). Bei der Makropexophagie werden einzelne Peroxisome von Membranen aufgenommen und formen somit Pexophagosome, welche anschließend mit den Vakuolenmembranen fusionieren. Dadurch kommt es zu einer Degradation der Peroxisome durch vakuoläre Hydrolasen (Dunn et al. 2005). Bei der Mikropexophagie wird ein Peroxisomencluster entweder durch segmentierte Vakuolen und/ oder Ausstülpungen in den Vakuolenmembranen oder durch den Mikropexophagie-spezifischen-Membran-Apparatus (MIPA) aufgenommen (Manjithaya et al. 2010); dieser führt auch zum Verschließen der vakuolären Membran (Sakai et al. 2006). Anschließend wird auch dieses Peroxisomencluster abgebaut.

Seit 2003 ist bekannt, dass auch der Nukleus durch die Autophagie teilweise abgebaut werden kann; die so genannte *Piecemeal microautophagy of the nucleus* (PMN) (Roberts et al. 2003) oder auch Mikronukleophagie (Krick et al. 2008, Krick et al. 2009) wurde bisher jedoch nur

in Hefen beobachtet. Dabei wird ein direkter Kontakt zwischen Nukleus und Vakuole hergestellt und Teilausstülpungen des Nukleus in die Vakuole transportiert, in der sich anschließend Vesikel für die spätere Degradation durch vakuoläre Hydrolasen bilden (Roberts, et al. 2003, Kvam et al. 2007). Auch Mitochondrien können durch Mitophagie degradiert werden. Diese lässt sich weiterhin in Makro- und Mikromitophagie gliedern. Bei der Mikromitophagie werden überflüssige, beschädigte oder dysfunktionale Mitochondrien durch direkte Fusion mit der Vakuole degradiert (Farre, et al. 2009, Bhatia-Kissova et al. 2010). Sie tritt häufig als Folge eines gestörten mitochondrialen elektrochemischen Transmembranpotentials oder einer fehlenden mitochondrialen Biogenese auf (Priault et al. 2005). Anders als bei der Mikromitophagie wird das Mitochondrium bei der Makromitophagie zunächst von einem Autophagosom aufgenommen bevor es zur weiteren Degradation mit dem Lysosom fusioniert; dieser Prozess ähnelt den Prozessen der Makroautophagie sehr (Richard et al. 2013, Sheibani et al. 2014).

1.2.3 Die Chaperon-vermittelte Autophagie

Die Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperone-mediated autophagy* – CMA) (Cuervo et al. 2000) unterscheidet sich deutlich von den anderen Autophagieformen, da hier kein Vesikeltransport involviert ist (Dice 2007, Kaushik et al. 2011). Die meist zytosolischen Proteine, die auf diesem Wege abgebaut werden, werden an ein Pentapeptid-Motif (KFERQ) gebunden (Dice 1990); dies ermöglicht ihnen die Translokation zum Lysosom. Die Bindung des Substratproteins erfolgt noch im Zytosol über KFERQ oder einer biochemisch verwandten Sequenz an einen zytosolischen Komplex, der das Chaperon HSC70 beinhaltet (Chiang et al. 1988). Der Substratprotein-Chaperonkomplex bindet an den lysosomalen Membrankomplex LAMP-2A (Cuervo et al. 1996, Cuervo et al. 2000) und HSP90 (Bandyopadhyay et al. 2008). Nachdem das Substratprotein entfaltet wurde, lagern sich zunächst LAMP-2A Komplexe an. Dann translokalisiert das Substratprotein mit Hilfe von lys-HSC70 (Agarraberes et al. 1997, Cuervo et al. 1997) in das lysosomale Lumen um dort durch Proteasen degradiert zu werden. Auch der LAMP-2A Komplex wird nach erfolgreicher Degradation des Substratproteins durch Cathepsin A abgebaut. Neben LAMP-2A existieren noch zwei weitere *splice* Varianten des Gens *lamp2*: LAMP-2B und LAMP-2C (Eskelinen et

al. 2005). Dies ist von Bedeutung, da gerade die Proteinvariante LAMP-2B im Prozess der Makroautophagie involviert ist (Massey et al. 2006) und somit die beiden, sehr unterschiedlichen Autophagieformen, doch miteinander zusammenhängen könnten.

1.2.4 Allgemeine und selektive Autophagie

Drei Formen der Autophagozytose bei Säugetieren sind die Makroautophagie, die Mikroautophagie (Mijaljica, et al. 2011, Sahu et al. 2011, Li, et al. 2012) und die Chaperon-vermittelte Autophagie. Zu den weniger verbreiteten Autophagieformen gehören unter anderem die lysosomale Fusion mit sekretorischen Granula (Crinophagie) (Marzella et al. 1981, Dice 2000), welche bisher schon in einer Vielzahl von Zellen und Geweben nachgewiesen werden konnte. Zu ihnen zählen sowohl sekretorische Zellen und Tumore (Liang 1989, Olejnicka et al. 1997) als auch neuroendokrine Zellen der Bauchspeicheldrüse (Sandberg et al. 2007), Leberzellen (Lenk et al. 1991), sowie Dünndarm- (Thachil et al. 2012), Prostata- und Harnwegszellen (Mahe et al. 2014). Eine spezielle Form der Makroautophagie stellt die so genannte Aggrephagie, der selektive Abbau von Proteinaggregaten, dar. (Lamark et al. 2012). Sowohl fehlgefaltete, (nicht-) ubiquitinierte Proteine, welche sich anhäufen, als auch diverse Autophagierezeptoren, werden in Aggresomen aufgenommen. Diese bilden sich durch die Überexpression von aggregationsanfälligen Proteinen, durch oxidativen Stress oder durch Nährstoffmangel (Hayat 2013). Auch Ribosomen können von Autophagosomen aufgenommen und dem Degradationsprozess zugeführt werden (Ribophagie) (Kiel 2010, Suzuki 2013). Der durch Nährstoffmangel ausgelöste Prozess führt dem Organismus durch die Degradation der Ribosomen nicht nur zusätzliche Energie in Form von Nährstoffbestandteilen zu, sondern reduziert parallel auch die sehr Energie konsumierende Proteintranslation (Dengjel et al. 2008, Cebollero et al. 2012). Alternativ wird aktuell spekuliert, ob auch unter normalen Bedingungen fehlerhafte oder dysfunktionale Ribosomen durch Ribophagie degradiert werden könnten, wofür allerdings bisher die Belege fehlen (Cebollero, et al. 2012). Des Weiteren konnten Mikroskopiestudien zeigen, dass auch endoplasmatischer Stress zur Bildung von Autophagosomen führen kann (Retikulophagie) (Bernales et al. 2006, Yorimitsu et al. 2006, Kouroku et al. 2007). Analysen von Autophagosomen zeigen die Aufnahme von

Teilen des endoplasmatischen Retikulums (ER) für die Degradation (Hamasaki et al. 2005, Bernales, et al. 2006). Neuere Studien belegen, dass Retikulophagie, ähnlich wie Xenophagie, eine wichtige Rolle bei der Immunantwort einnehmen könnte (Pengo et al. 2013, Pengo et al. 2013). 2009 konnte erstmalig Lipophagie nachgewiesen werden (Singh, et al. 2009). Dabei werden sowohl Triglyzeride als auch Cholesterol von Autophagosomen aufgenommen und nach der Fusion mit dem Lysosom durch saure Hydrolasen abgebaut (Weidberg et al. 2009). Die so neu gewonnenen Makromoleküle, hauptsächlich freie Fettsäuren, können dem Organismus erneut Energie liefern, indem sie z.B. für die mitochondriale β -Oxidation verwendet werden (Liu et al. 2013). Weiterhin ist die Lipophagie von wichtiger therapeutischer Bedeutung, da viele Erkrankungen wie z.B. ernährungsbedingte Fettleibigkeit (Settembre et al. 2013), das metabolische Syndrom (O'Rourke et al. 2013) oder Steatosis hepatis (Singh, et al. 2009) mit Lipidakkumulationen einhergehen (Wang et al. 2011). Sind bei Erkrankungen Erreger involviert, so ist die Autophagie auch am Abbau dieser Pathogene wie z.B. Bakterien und Viren beteiligt (Xenophagie) (Alexander et al. 2008, Knodler et al. 2011). Dabei werden, ähnlich wie bei der autophagischen Lyse von Zellorganellen, Pathogene durch Autophagosome aufgenommen und durch die Fusion mit Lysosomen degradiert. Die Xenophagie stellt einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunität dar (Zhou et al. 2012), Bakterien haben aber diverse Mechanismen entwickelt um nicht durch das Autophagosom aufgenommen zu werden und somit die Immunantwort zu umgehen (Choy et al. 2013).

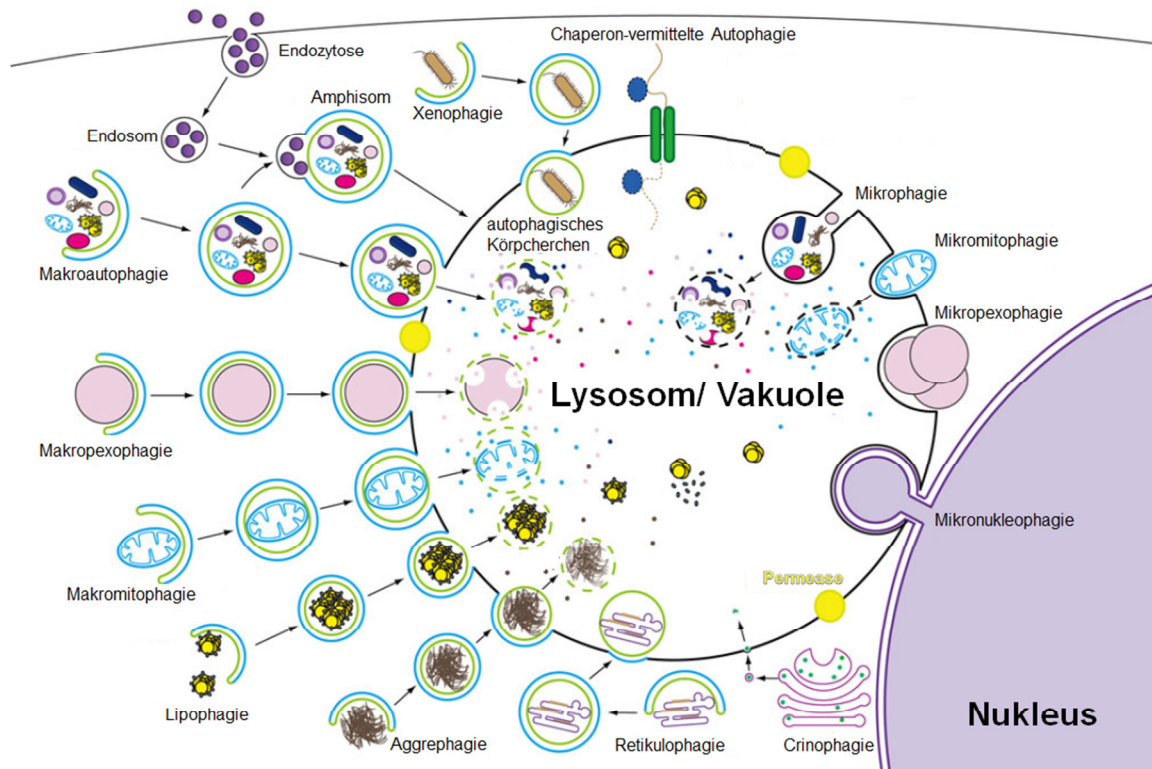


Abbildung 1.4: Formen der Autophagie

Zusammenfassend werden die morphologisch relevanten Schritte von 14 unterschiedlichen Autophagieformen dargestellt. Unter ihnen befinden sich die Mikroautophagie, die Chaperon-vermittelte Autophagie und die Makroautophagie. Des Weiteren einige selektive Autophagieformen. Nähere Informationen dazu siehe 1.2.4 (modifiziert nach (Li et al. 2012))

1.2.5 Die Bedeutung der Autophagie im humanen Alterungs- und Krankheitsprozess

Veränderungen bei der Autophagie können sowohl in systemischen Erkrankungen wie Krebs, Stoffwechselstörungen (Singh, et al. 2009), bei instabilen Gefäßwänden (Ryter et al. 2010) als auch bei organspezifischen Krankheiten wie Kardiomyopathien und allgemeinen Myopathien (Xie et al. 2011, Bonaldo, et al. 2013), der nicht-alkoholischen Steatosis hepatis (Schneider et al. 2014), neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Alzheimer (Nixon, et al. 2005, Nixon 2013) oder Morbus Crohn (Cadwell et al. 2008) auftreten.

Autophagie ist ein mehrstufiger Prozess und in den meisten Prozessschritten fehleranfällig. Die Folgen und Auswirkungen auf einen Organismus, die Entwicklung einer Krankheit und mögliche Therapieansätze sind stark abhängig davon, bei welchem Prozessschritt ein Fehler passiert. Die Autophagie kann durch Moleküle aus verschiedenen Signalkaskaden induziert werden. Erkrankungen, die mit einer Veränderung dieser Moleküle einhergehen, beeinflussen auch die Induktion und somit den weiteren Verlauf der Autophagie. Werden beispielsweise Proteine, welche abgebaut werden sollen, nur unzureichend oder gar nicht erkannt, könnte dies zum einen an Veränderungen an den Degradationstags der Proteine oder der Adaptermoleküle liegen oder zum anderen an einer generell reduzierten Anzahl der Moleküle (Schneider et al. 2014). Selbst wenn es zu einem Kontakt beider Moleküle kommt, kann die Interaktion gestört sein. Verweilen die zu degradierenden Proteine aufgrund der mangelnden Erkennung zu lange im Zytosol, führt dies unweigerlich zum Beginn einer toxischen Reaktion (Ravikumar et al. 2004). Auch die Initiation und Elongation des Autophagosoms kann erheblich gestört sein. Genmutationen in *Atg16L1*, einem bei der Autophagosomelongation involvierten Gens, stehen im Zusammenhang mit Morbus Crohn (Meixlsperger et al. 2009), Polymorphismen im Gen *Atg5* im Zusammenhang mit organspezifischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale (Martin et al. 2012) und systemischem Lupus erythematoses (Zhou et al. 2011). Weiterhin kann die Reifung des Autophagosoms und die Fusion mit dem Lysosom durch Mutationen der involvierten Moleküle, z.B. LAMP-2, verhindert sein (Nishino et al. 2000). Aber auch die Degradation des autolysosomalen Inhalts kann krankheitsbedingt gestört sein. Dieser Gruppe von Erkrankungen, auch lysosomale Speicherkrankheiten (LSK) genannt, liegen Defekte in den lysosomalen Abbauenzymen zugrunde (Lieberman et al. 2012), welche die Ansäuerung des Lysosoms beeinträchtigen (Lee et al. 2010). Die Akkumulation von Autophagosomen oder Autolysosomen ist, im Gegensatz zu Akkumulation von dysfunktionalen Proteinen im Zytosol, weniger toxisch. Allerdings verändert sich dadurch die Zellhomöostase und die eigentlich benötigten, nach dem autophagischen Prozess neu gewonnenen Bausteine, stehen den Zellen nicht zur Verfügung. Zusätzlich entweicht Zellinhalt durch die autophagosomalen und autolysosomalen Membranen in das Zytosol wenn die Akkumulation über einen längeren Zeitraum fortbesteht, wodurch es wiederum zu einer toxischen Reaktion kommen kann (Nixon 2013).

1.2.6 Autophagie, die zirkadiane Uhr und Alterungsprozesse

Alterungsprozesse zeichnen sich unter anderem durch ineffiziente oder fehlende Zellhomöostase, *Turnover*-Raten und Reparaturmechanismen aus, die zu einer Anhäufung von dysfunktionalen oder beschädigten Proteinen und Organellen in gealterten Zellen führen können, welche wiederum durch Autophagie entfernt werden (Grune 2000). Erste Studien zeigen, dass Autophagie Alterungsprozesse und Lebensdauer sowohl in individuellen Zellen als auch in Geweben regulieren könnte, und dass Alterungsprozesse wiederum Einfluss auf Autophagielevel haben könnten. Zusätzlich schützt Autophagie Zellen im Alter vor Nährstoffmangel und Krankheitserregern (Kroemer et al. 2008), dies geschieht neben der Aktivierung durch den mTor Signalweg auch über die Aktivierung von AMPK (Salminen et al. 2012).

AMPK, welches Orthologe in *Arabidopsis* (Baena-Gonzalez et al. 2007), *Saccharomyces cerevisiae* (Hedbacker et al. 2008), *Caenorhabditis elegans* (Narbonne et al. 2009) und *Drosophila* (Johnson et al. 2010) hat, ist ein bedeutender zellulärer Energiesensor und spielt eine wichtige Rolle in der Energiehomöostase (Hardie et al. 2012). Sie ist eine heterotrimere Proteinkinase, welche aus einer katalytischen (α) und zwei regulatorischen (β , γ) Untereinheiten besteht (Xiao et al. 2011). Der N-Terminus der katalytischen α Untereinheit besteht aus einer Serin/ Threonin Proteinkinase. Der C-terminale Bereich unmittelbar an der katalytischen Domäne hat inhibitorische Funktionen, während ein Bereich von etwa 150 Aminosäuren im C-Terminus mit den β und γ Untereinheiten assoziiert (Crute et al. 1998). Die β Untereinheit hat zwei konservierte Domänen in der zentralen und C-terminalen Region. Der C-Terminus wird für die korrekte Komplexbildung von α , β und γ Untereinheiten benötigt, die zentrale Region beinhaltet zudem eine Glykogen-Bindedomäne (Hudson et al. 2003, Polekhina et al. 2003). Die γ Untereinheit, bestehend aus $\gamma 1$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$, hat variable N-terminale Regionen gefolgt von vier *tandem repeats* mit einer Länge von 60 Aminosäuren (CBS-*motif*) (Bateman 1997). Die γ Untereinheit hat vier dieser CBS Domänen, welche Adenosin Monophosphat (AMP) oder Adenosin Triphosphat (ATP) binden (Cheung et al. 2000, Scott et al. 2004).

AMPK wird im Allgemeinen durch energetischen Stress aktiviert; dieser wirkt sich durch einen Anstieg des ADP:ATP oder AMP:ATP Verhältnisses aus. Der Anstieg dieser Verhältnisse kann zum einen durch eine verringerte katabolische ATP Produktion durch Nährstoffmangel oder Exposition gegenüber mitochondrialen Toxinen, zum anderen durch

einen Anstieg des ATP Verbrauchs durch z.B. Muskelkontraktionen bei erhöhter Bewegung ausgelöst werden. Im Hypothalamus reguliert AMPK die Energieaufnahme durch die gegenläufige Vermittlung von appetitanregenden und -hemmenden Signalen, während die Aktivierung von AMPK in peripheren Geweben durch Leberkinase B1 (LKB1) vermittelte (Hardie 2004, Sanders et al. 2007) oder Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase-Kinase- β (CAMKK β) vermittelte (Witters et al. 2006) Phosphorylierung bei gestiegenen AMP-Level oder durch intrazellulär erhöhte Calciumlevel stattfindet.

AMPK phosphoryliert *Cry1*, eine Komponente des negativen Arms der zirkadianen Uhr, und destabilisiert ihn somit. Außerdem sind sowohl Aktivität als auch nukleäre Lokalisation von AMPK rhythmisch (Lamia et al. 2009). Da AMPK ein zentraler Regulator in vielen metabolischen Prozessen ist, hat die oszillierende Regulation von AMPK Auswirkungen auf die zirkadiane Regulation des Stoffwechsels. Sowohl Änderungen in den AMPK Leveln (Andersson et al. 2004, Minokoshi et al. 2004, Narkar et al. 2008) als auch genetische Veränderungen der zirkadianen Uhr (Rudic et al. 2004, McDearmon et al. 2006, Lamia, et al. 2008) können zu Veränderungen im Fressverhalten, Körpergewicht, körperlicher Aktivität oder der Glukosehomöostase führen. Die Fähigkeiten von AMPK die zirkadiane Regulation zu vermitteln und über CRY1 als chemischer Energiesensor zu funktionieren, legen daher eine enge Beziehung zwischen metabolischer Steuerung und zirkadianen Rhythmen nahe.

Zellen weisen mit fortschreitendem Alterungsprozess neben akuten Stressspitzen auch einen kontinuierlich erhöhten oxidativen Stresslevel auf, welcher sich negativ auf die Zellen auswirkt (Sohal et al. 2002). Eine erhöhte autophagische Aktivität resultiert in einer steigenden Autolysosomenzahl, einer Ansäuerung des lysosomalen pHs und eines Anstiegs der lysosomalen Enzyme um den oxidativen Stress zu eliminieren und mögliche beschädigte Mitochondrien zu entfernen (Terman et al. 2004, Rubinsztein et al. 2011). Des Weiteren wird die Autophagie mit Lebensdauer verlängernden Signalkaskaden, wie sie z.B. durch eine reduzierte Nahrungsaufnahme (*Caloric Restriction*, CR) oder durch den Insulinstoffwechselweg (Madeo et al. 2010) aktiviert werden, in Verbindung gebracht. Unter den vielen Faktoren, die sich auf die Lebensdauer günstig auswirken können, ist CR der bisher wirksamste Faktor, der sich in verschiedenen Organismen lebensverlängernd auswirkt und dabei altersbedingte Krankheiten wie Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen und neurodegenerative Krankheiten positiv beeinflusst (Pyo et al. 2013). Unter CR Bedingungen werden an der Induktion der Autophagie beteiligte Regulatoren für Alterungsprozesse benötigt, z.B. SIRT1 oder DAF-16/ FOXO (Frye 1999). Durch CR werden

die zellulären NADH Konzentrationen reduziert, was wiederum zu einem Anstieg des NAD^+/NADH Verhältnis führt, wodurch die SIRT1 Aktivität stimuliert wird (Lin et al. 2004). SIRT1 aktiviert sowohl in Nematoden als auch in Säugetieren den Autophagieprozess durch Deacetylierung von *Atg5*, *Atg7* und *Atg8* (Chen et al. 2005, Lee et al. 2008, Morselli et al. 2010).

SIRT1 spielt allerdings nicht nur bei der Autophagie und mit Autophagie assoziierten Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington eine Rolle (Donmez et al. 2010, Donmez et al. 2012, Jeong et al. 2012, Jiang et al. 2012). SIRT1 ist vom intrazellulären NAD^+/NADH Verhältnis abhängig und wird durch NAD^+ zyklisch aktiviert. Es ist ein Verbindungsglied zwischen dem zirkadianen und metabolischen bzw. autophagischen Prozessen (Nakahata, et al. 2009, Ramsey et al. 2009). Es ist mit CLOCK assoziiert und wird so an den CLOCK:BMAL1 Komplex rekrutiert. Ein SIRT1 *Knockout* oder eine pharmakologische Inhibition von SIRT1 führen zu Störungen im zirkadianen Rhythmus und beeinträchtigen die Stabilität von PER2 (Asher et al. 2008) und die Acetylierung von BMAL1 (Nakahata et al. 2008).

Einen speziellen Status nimmt die Haut von Säugetieren ein; sie ist in besonderer Weise Umwelteinflüssen wie z.B. UV-Strahlung ausgesetzt, welche sich negativ auf die Alterungsprozesse auswirken kann. Durch UV-Strahlung oder H_2O_2 verursachte Hautschäden führen zu einer Reduktion von SIRT1 in Hautzellen (Cao et al. 2009) während AMPK durch UV-Strahlung oder der Behandlung mit H_2O_2 aktiviert wird (Cao et al. 2008). Da Hautzellen rhythmisch oszillieren (Gaddameedhi et al. 2011) und sowohl SIRT1 als auch AMPK in Zusammenhang mit dem zirkadianen Oszillator (Lamia, et al. 2009, Nakahata, et al. 2009) und autophagischen Prozessen (Morselli, et al. 2010, Li et al. 2013) stehen, ist auch die UV-Strahlung ein wichtiger Faktor mit Hinblick auf die Alterungsprozesse.

Alterungsprozesse verändern eine Vielzahl von Aspekten der zirkadianen Uhr und haben somit auf organischer als auch auf zellulärer Ebene Auswirkungen. Zirkadiane Oszillatoren weisen im Alter niedrigere Amplituden und Phasenvorläufe auf und sind in einigen Organen wie Leber und Herz häufiger desynchronisiert (Kolker et al. 2003, Hofman et al. 2006). Die Körpertemperatur und der Hormonspiegel weisen während des menschlichen Alterungsprozesses abschwächende rhythmische Oszillationen auf, auch reduzieren sich die zirkadianen Expressionslevel von PER2 mit fortschreitendem Alter (Weitzman 1982, Czeisler

et al. 1991). Auch Komponenten des Autophagie Signalweges sind aufgrund von deregulierten metabolischen und hormonellen Faktoren im Alter gestört (Dice 1982, Makrides 1983). Während des Alterungsprozesses können Veränderungen bei der Autophagie in systemischen Erkrankungen wie Stoffwechselstörungen (Singh, et al. 2009) als auch in organspezifischen Krankheiten wie der nicht-alkoholischen Fettleber (Schneider, et al. 2014) und neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Alzheimer (Nixon, et al. 2005, Nixon 2013) (Cadwell, et al. 2008) resultieren. Aus den vorliegenden Studien wird deutlich, dass Alterungsprozesse sowohl Autophagielevel als auch den zirkadianen Oszillator beeinflussen können, allerdings wurde ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Prozessen in gealterten Organismen bisher wenig betrachtet.

1.3 Zielsetzung und Konzeption der Arbeit

Zirkadiane Rhythmen sind in fast allen Organismen von Bakterien bis hin zum Menschen konserviert. Sowohl der zirkadiane Hauptschrittmacher im SCN als auch die zirkadianen Uhren der peripheren Organe werden durch Alterungsprozesse beeinflusst. Neben der zirkadianen Uhr ist auch die Regulation der Autophagie von zellulären Alterungsprozessen betroffen. Es wird angenommen, dass in beiden Fällen der Verlust der korrekten Funktionsweise dieser Mechanismen schädliche Konsequenzen für den Organismus nach sich zieht. Da in gealterten Organismen viele biologische Prozesse gleichzeitig in ihrer Funktionsweise beeinträchtigt sind, stellt sich die Frage nach der Hierarchie der beobachteten Effekte und, ob vielleicht der Verlust einiger weniger Regulationssysteme schädliche Konsequenzen für viele andere Prozesse nach sich zieht. In diesem Zusammenhang sollte hier der Frage nachgegangen werden, ob die zirkadiane Uhr ein derartiger zentraler Mechanismus beim Altern sein könnte und, ob die Autophagie in gealterten Zellen unter direkter Kontrolle der zirkadianen Uhr steht.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, in Säugetierfibroblasten eine mögliche Regulation der zirkadianen Uhr auf die Autophagie zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere die Frage, ob der fortschreitende Alterungsprozess eine solche Regulation beeinflusst, im Vordergrund stehen. Um eine mögliche Verbindung zwischen Autophagie und der zirkadianen Uhr herzustellen, sollte zunächst geprüft werden, ob Autophagie ein rhythmischer Prozess unter der Kontrolle des zirkadianen Oszillators ist. Anschließend sollte der Frage nachgegangen werden, wie sich beide Prozesse durch Altern verändern, welche molekularen Komponenten jeweils am stärksten betroffen sind und ob bestimmte Uhrgene als Schlüsselgene für die Regulation der Autophagie identifiziert werden können. Im Falle eines positiven Ergebnisses sollten mögliche Signalwege untersucht werden, die eine Regulation der Autophagie durch die zirkadiane Uhr vermitteln könnten.

2. Material

2.1 Chemikalien & Reagenzien

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller
AEBSF hydrochlorid (Pefablock)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
AICAR	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
APS (Amoniumperoxidsulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bafilomycin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
b-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Chloroquin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Compound C	Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dharmafect 1	Thermo Scientific Dharmacon Inc., Lafayette, USA
dH ₂ O	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
DMEM+Glutamax-I	Gibco, Thermo Scientific, Lafayette, USA
DMEM+Glutamax	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Material

EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Eppendorf Röhrchen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidium bromide solution (1%)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Falcons	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Thermo Scientific, Lafayette, USA
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
LightCycler480 „Master Mix“	Roche, Mannheim, Deutschland
Luciferin	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Metformin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Midori Green	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
Multiwell Platten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
NaCl	VWR International, West Chester, Pennsylvania, USA

Material

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natrium Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NP-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
PBS	Gibco, Thermo Scientific, Lafayette, USA
Penicillin (10.000U/ml)	Gibco, Thermo Scientific, Lafayette, USA
Penicillin (10.000U/ml)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Pipetten	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen	Nerbe plus, Winsen / Luhe, Deutschland
Polyacrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Rapamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Streptomycin (100 µg/ml)	Gibco, Thermo Scientific, Lafayette, USA
Streptomycin (100 µg/ml)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypan Blau	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Zellkulturmaterial	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.2 Geräte

Name	Hersteller
63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Ausschwingrotor (für 15-50 ml Gefäße)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Autoklav Systec V 150	Systec, Wettenberg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Countess® Cell Counter	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Digitale Kamera Spot-RT SE Monochrom	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, USA
Digitalkamera System Fuji LAS 4000	GE Healthcare, Chalfont St Giles, England
Einfrierbehälter Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc, Rochester, New York, USA
Electrophoresis Power Supply EPS 301	GE Healthcare, Chalfont St Giles, England
Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Epoch Spektralphotometer	BioTek, Winooski, Vermont, USA
FACS CANTO II	BD, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage AE-166	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Filtersätze	AHF Analysentech., Tübingen, Deutschland
Gelelektrophorese System Horizon 11-14	Whatman, Biometra, Göttingen,

	Deutschland
Gelelektrophorese System Novex Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Inkubationseinheit Δ TC3	Bioprotechs, Butler, Pennsylvania, USA
LightCycler480 II Real-Time PCR System	Roche, Mannheim, Deutschland
Lumicycle 32	Actimetrics, Evanston, Illinois, USA
pH-Meter Calimatic 766	Knick, Berlin, Deutschland
Photometer Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PowerPac Basic	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Rotor A 6.14 (für 250 ml Gefäße)	Kontron, Heraeus, Hanau, Deutschland
Rotor A 8.24 (für 50 ml Gefäße)	Kontron, Heraeus, Hanau, Deutschland
Rotor FA 45-30-11 (für 1,5-2 ml Gefäße)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotor für Reaktionsgefäße	Labor-Brand, Gießen, Deutschland
Schüttelinkubator SM-30	Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland
Sellamed UV Lampe	Sellas medizinische Geräte, Gevelsberg, Deutschland
Sonotrode Mikrospritze MS 72	Bandelin, Berlin, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermomixer ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Ultraschall Homogenisator Sonopuls	Bandelin, Berlin, Deutschland

Ultraschallwandler UW 2070	Bandelin, Berlin, Deutschland
Wasserbad WB20	Medingen, Dresden, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Centrikon H-401	Kontron, Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Rotixa / P	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
1 Kb plus DNA Leiter	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
8 well-Slide Kammerobjektträger	Ibidi, München, Deutschland
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Countess® Cell Counter Slides	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
ECL Prime Western Blotting Reagenz	Amersham, Little Chalfont, England
Gel Kassetten Novex, 1 mm	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Immobilon-P (PVDF) Transfermembran	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Küvetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pierce ECL Western Blotting Substrat	Thermo Scientific Dharmacon Inc., Lafayette, USA

2.4 Molekularbiologische Kits

Molekularbiologische Kits	Hersteller
Effectene Transfection Reagent Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
GenJet Plasmid MiniPrep Kit	Fermentas, St Leon-Roth, Deutschland
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIA RNeasy Mini Prep	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAShredder	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
TopTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.5 Bakterienstämme und Nährmedien für Bakterienkulturen

2.5.1 *Escherichia coli* Stamm

<i>Escherichia coli</i> DH5a	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> (Hanahan 1983)
Genotyp:	

2.5.2 Nährmedien für Bakterienkulturen

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g*L ⁻¹ Trypton, 5 g*L ⁻¹ Hefeextrakt, 10 g*L ⁻¹ NaCl, pH 7,0 (mit NaOH eingestellt)
LB-Agar	10 g Agar auf 1000 ml LB Medium Selektionen: Zugabe 50 µg/ml Ampicillin
Phosphatpuffer	0,17 M KH ₂ PO ₄ , 0,72 M K ₂ HPO ₄
SOB-Medium	20 g*L ⁻¹ Trypton, 5 g*L ⁻¹ Hefeextrakt, 0,5 g*L ⁻¹ NaCl lösen. Zugabe KCl bis 2,5 mM; pH 7,0 (mit NaOH eingestellt) Zugabe MgCl ₂ bis 10 mM und MgSO ₄ bis 20 mM nach dem Autoklavieren
TB-Medium	12 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerin in 900 ml H ₂ O lösen; autoklavieren. Danach Zugabe von 100 ml steriler Phosphatpuffer
TB-Puffer	10 mM Pipes, 250 mM KCl, 15 mM CaCl ₂ , 55 mM MnCl ₂ , pH 6,7

2.6. Zelllinien

2.6.1. Humane primäre Zelllinien

Fibroblasten	Humane dermale Fibroblasten isoliert von Hautproben, entnommen bei kosmetischen chirurgischen Eingriffen der unteren, sonnengeschützten Seite der menschlichen weiblichen Brust bei Spenderinnen im Alter von 20 bis 67 Jahren. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. J. Krutmann, Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf (Deutschland) zur Verfügung gestellt. (Tigges et al. 2013).
--------------	--

2.6.2 Murine adhärenzte Zelllinien

<i>Bmal1</i> -Luc-Fibroblasten	NIH3T3-Zellen, stabil transfiziert mit einem Luciferase-Gen (aus Leuchtkäfer) unter Kontrolle des <i>Bmal1</i> -Promoters (Nagoshi, et al. 2004). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. U. Schibler, Universität Genf, Genf (Schweiz) zur Verfügung gestellt.
CRY1/2 ^{-/-} MEFs	CRY1/2 ^{-/-} <i>Knockout</i> MEFs, isoliert aus C57BL/6 CRY1/2 ^{-/-} <i>Knockout</i> Mäusen (van der Horst, et al. 1999).
NIH3T3	Murine, embryonale Fibroblasten (Todaro et al. 1963), #DSM ACC 59, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig (Deutschland)
WT MEF	Wildtyp MEFs, isoliert aus C57BL/6 CRY1/2 ^{+/+} Mäusen (van der Horst, et al. 1999).

2.6.3 Mediumgrundlagen, Lösungen und Antibiotika für die Zellkultur

Bezeichnung	Zusammensetzung
Nährmedium	DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml ⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml ⁻¹ Streptomycin (alles von Gibco, Thermo Scientific, Lafayette, USA)
Nährmedium für primäre Fibroblasten	DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml ⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml ⁻¹ Streptomycin (alles von PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
Selektionsmedium 1	DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml ⁻¹ Penicillin, 100 µg*ml ⁻¹ Streptomycin und 100 µg*ml ⁻¹ Hygromycin
Selektionsmedium 2	DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml ⁻¹ Penicillin, 100 µg*ml ⁻¹ Streptomycin und 2 µg*ml ⁻¹ Puromycin
CO ₂ -unabhängiges Medium	DMEM-HighGlucose + L-Glutamine + 25 mM HEPES (ohne Phenolrot) versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml ⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml ⁻¹ Streptomycin plus 0,1 mM Luciferin und 10 mM Pyruvat
Serumfreies Medium	DMEM+Glutamax-I versetzt mit 100 U*ml ⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml ⁻¹ Streptomycin
Antibiotikum-freies Medium	DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS
Hungermedium	DMEM versetzt mit 100 U*ml ⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml ⁻¹ Streptomycin (alles von PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
Einfriermedium	DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml ⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml ⁻¹ Streptomycin plus 10% FCS und 20% DMSO

2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.1: Verwendete Puffer und Stocklösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
2x NUN Puffer	50 mM HEPES-NaOH (pH 7,6), 600 mM NaCl, 2% NP-40, 2 M Urea, 2 mM DTT, 1:50 Protease-Inhibitor Cocktail
10x Lämmli Puffer	1,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% Glycerin, 10% SDS, 100 mM DTT, 0,05% Bromphenolblau
5x SDS-PAGE-Probenpuffer	0,2 M Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerin, 10% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 10 mM DTT
10x PBS	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, 18 mM KH ₂ PO ₄
10x TBS	24,2 g*L ⁻¹ Tris, 80 g*L ⁻¹ NaCl, pH 7,6 (mit HCl eingestellt)
50x TAE	2 M Tris-HCl (pH 8,5), 2 M Essigsäure, 0,1 M EDTA
Amidoschwarzlösung	1% Amidoschwarz, 40% MeOH, 10% HOAc
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, 1 mM DTT, 1:50 Protease-Inhibitor Cocktail
SDS-PAGE-Laufpuffer	3 g*L ⁻¹ Tris, 14,4 g*L ⁻¹ Glycin, 1 g*L ⁻¹ SDS
TBS-T	1x TBS, 0,1% Tween20
Western Blot Puffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS (0,0375%), 20% Methanol, pH 9,2

2.8 Nukleinsäuren

2.8.1 Plasmide

Der Vektor, der für die Expression von humanem *Per2* verwendet wurde, basiert auf dem Plasmid pMC3-EGFP-cMyc-C (siehe Anhang 7.1). Im Vektor pMC3-hPer2-EGFP-cMyc-C wird das Hygromycin-Resistenzgen im zweiten Cistron einer bicistronischen mRNA kodiert. Durch die interne Ribosomenbindestelle (IRES) des Poliovirus wird die Translationsinitiation des zweiten Cistrons gewährleistet. Das Polyadenylierungssignal des Simian-Virus 40 (SV40) bildet den Abschluss der gebildeten mRNA. Das erste Cistron enthält die Sequenzen für *Per2* und GFP (*green fluorescent protein*). Die cDNA des humanen *Per2* Gens wurde in die MCS (*multiple cloning site*) des ersten Cistrons kloniert, so dass eine C-terminal (pMC3-hPer2-EGFP-cMyc-C) gekoppelte Version von *Per2* entsteht. Beide Cistrons stehen unter Kontrolle eines CMV-Promoters.

Tabelle 2.2: Primer für die Klonierung von Vektoren

Vektor	Primer	Sequenz
pMC3-hPer2-EGFP-cMyc-C	Per2-SalI-Fwd-C	5'-GGCGCGTCGACATGAATGGATA CGCGGAATTTC-3'
	Per2-SpeI-Rev-C	5'-CCGCGACTAGTCGTCTGCTCTT CGATCCTG-3'

2.8.2 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten ON-TARGETplus Maus SMARTpool siRNAs wurden von Thermo Scientific Dharmacon Inc. (Lafayette, Colorado, USA) bezogen. Die *non-targeting* (Nt) siRNA #1 bindet an keine bekannte Sequenz im jeweiligen Genom und wird daher als Negativkontrolle verwendet.

Alle verwendeten Primer für die Klonierungen sowie für die Real Time Polymerasekettenreaktion wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bezogen. Bei allen hier verwendeten Oligonukleotiden wurde darauf geachtet, dass die äußeren Basen möglichst aus einem Guanin oder Cytosin bestanden. Dies war jedoch nicht bei allen Primern möglich.

Tabelle 2.3: ON-TARGETplus Maus SMARTpool siRNAs für die Transfektionen

Target	Order ID	Sequenz
<i>Arntl</i>	J-040483-12	GAAAAGAGGGCGUCGGGACA
	J-040483-11	AGAUAAACUCACCGUGCUA
	J-040483-10	UGUCGUAGGAUGUGACCGA
	J-040483-09	AGACUGGACUCCGGUUA
<i>Cebp-β</i>	J-043110-09	GAGCGACGAGUACAAGAUG
	J-043110-10	CCUUUAGACCCAUGGAAGU
	J-043110-11	GCACCCUGCGGAACUUGUU
	J-043110-12	GAAAAGAGGGCGUAUGUAUA
<i>Nr1dl</i>	J-051721-08	CACCAUGGAGGAUGUGAUA
	J-051721-07	UUAGGCACCUCACCGGUA
	J-051721-06	CCACCAACCUAACAGCAAU
	J-051721-05	GUACAAACGGUGUCUGAAA
<i>Nt</i>	D-001810-01-05	UGGUUUACAUGUCGACUAA
<i>Per2</i>	J-040489-12	AGAACAAAUCCACCGGCUA
	J-040489-11	UCGUGAAGAACGCGGAUUAU
	J-040489-10	GGAUAGAGGCCCCAGACGUA

Material

	J-040489-09	GGGCAUUACCUCCGAGUAU
<i>Sirt1</i>	J-049440-08	UAGGCUAGGUGGUGAAUAU
	J-049440-07	GCGGAUAGGUCCAUAUACU
	J-049440-06	CCGAUGGACUCCUCACUAA
	J-049440-05	CAAAGGAGCAGAUUAGGUAA
<i>Sirt2</i>	J-061727-20	GCUCAAAGACCCUUCGUUC
	J-061727-19	UGGUAAAGCCUGAUAUCGU
	J-061727-18	CCAAGGAGCUCUAUCCCGG
	J-061727-17	GAGGGAGCAUGCCAACAUA
<i>Sirt3</i>	J-048921-05	GGCCAAUGUCACUCACUA
	J-048921-06	ACAGCAACCUUCAGCAGUA
	J-048921-07	GGAUGGACAGGACAGAUAA
	J-048921-08	CCACGGGACCUUUGUAACA
<i>Sirt4</i>	J-065606-12	AGAUCGGCUUCGCGGACUA
	J-065606-11	CCAAGAAACUCCUCGUGAU
	J-065606-10	UGACGGAGCUCCACGGAUG
	J-065606-09	GGAUUGACUUUCAGGCCGA
<i>Sirt5</i>	J-056506-12	CGGUGUACCUCGUGUGGCA
	J-056506-11	GCAGGGCACUAACGGGAAA
	J-056506-10	CCCAGAACAUCGACGAGUU
	J-056506-09	CAGUUGUGUUGUAGACGAA
<i>Sirt6</i>	J-061392-09	CAGCAGGGUUGUCGCCUUA

	J-061392-10	CAGUGCAUGUUUCGUAA
	J-061392-11	GGAUGGACCCUGCGUGCUA
	J-061392-12	ACGCAGUACGUCAGAGACA
<i>Sirt7</i>	J-054325-12	CGACCGAGGCUGCUAGCAA
	J-054325-11	GGUUGUGCCAAGCGUGCAA
	J-054325-10	UACAGAGAGUAUGUACGA
	J-054325-09	GGGACCCAGCUUCGGGAUA
<i>Ulk1</i>	J-040115-08	GCAAGGACCUGAUUGGACA
	J-040115-07	CGAGAGGGCUGUGUACCGA
	J-040115-06	UAAGCUGCCUGACUCCUA
	J-040115-05	CCACUCAGGUGCACAAUUA
<i>Ulk2</i>	J-040619-08	GCACCCACCCUCACCGAUA
	J-040619-07	CGUCAGACCACUCAUAUGA
	J-040619-06	GCAUAGAACAGAAUCUUUAU
	J-040619-05	GUACGAAGGUCUAAUACCA

Tabelle 2.4: Murine Primer für Real Time Polymerasekettenreaktion

Target	Probe*	Sequenz
<i>β-Aktin</i>	F	CGTGAAAAGATGACCCAGATCA
	R	CACAGCCTGGATGGCTACGT
	P	6-FAM-TGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG-TAMRA

Material

<i>Atg5</i>	F	TGGATGGGACTGCAGAATGA
	R	TCCATGAGTTTCCGGTTGATG
	P	6-FAM-AGATTTGACCAGTTTTGG-TAMRA
<i>Atg7</i>	F	CCTGGCAGCCCACAGATG
	R	CCCGAAAGCAGAGGACTTCA
	P	6-FAM-AGCGGCAGTTTCCAGT-TAMRA
<i>Atg14</i>	F	TCAGCCCGCGCTCTGA
	R	AGGTCTGCTCGAACTTCAAAGG
	P	6-FAM-CACCTAGGCAGGTCAG-TAMRA
<i>Atg16L</i>	F	GTATGTCTTCGATGCGCATGA
	R	CCGGGAGCCTGGACTGA
	P	6-FAM-AGAGGTCAACGCAGTGC-TAMRA
<i>Bmal1</i>	F	CCAAGAAAGTATGGACACAGACAAA
	R	GCATTCTTGATCCTTCCTTGGT
	P	6-FAM- TGACCCTCATGGAAGGTTAGAATATGCAGAA- TAMRA
<i>Cab39</i>	F	CGAGGCCTTCCACGTGTT
	R	GATGGGCTGCGTCTTGTTG
	P	6-FAM-AGGTGTTTGTGGCCAAC-TAMRA
<i>Camkk2</i>	F	CAGGATTGTGGTGCCTGAAA
	R	GCCCCGTGCCTCGTAAC
	P	6-FAM-CAAGCTGCACCCTTG-TAMRA

Material

<i>Cebpβ</i>	F	AGCGGCTGCAGAAGAAGGT
	R	GGCAGCTGCTTGAACAAGTTC
	P	6-FAM-AGCAGCTGTCGCGAGA-TAMRA
<i>Cry1</i>	F	CTGGCGTGGAAGTCATCGT
	R	CTGTCCGCCATTGAGTTCTATG
	P	6-FAM- CGCATTTCACATACTGTATGACCTGGACA- TAMRA
<i>Cry2</i>	F	TGTCCCTTCCTGTGTGGAAGA
	R	GCTCCCAGCTTGGCTTGA
	P	6-FAM-CAGTCACCCTGTGGCAGAGCCTGG- TAMRA
<i>Ctst</i>	F	GGGTTGTGTGACTCCTGTGAAG
	R	CGCTAAACGCCCAACAAGAC
	P	6-FAM-CCAGGGCCAGTGCG-TAMRA
<i>Eef1a</i>	F	TCCACTTGGTCGCTTTGCT
	R	CTTCTTGTCCACAGCTTTGATGA
	P	6-FAM-TTCGTGACATGAGGCAGACAGTTGCTG- TAMRA
<i>Gapdh</i>	F	TCCATGACAACCTTTGGCATTG
	R	CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGA
	P	6-FAM-AAGGGCTCATGACCACAGTCCATGC- TAMRA
<i>Irgm1</i>	F	CTCTTCATCCCCTTTCCCAAT

Material

	R	CTGTGGCCCCCAATCCA
	P	6-FAM-TGCTGTGGGACTTAC-TAMRA
<i>Map1/Lc3b</i>	F	CGCCGGAGCTTTGAACA
	R	GTGCTGCTCCCGGATGAG
	P	6-FAM-AGAGTGGAAGATGTCC-TAMRA
<i>Map3k7</i>	F	CATCCCAATGGCGTATCTTACA
	R	TGGGCACGGCGCTAGA
	P	6-FAM-TGGATCACCAGCTACAG-TAMRA
<i>Nr1d1</i> (<i>Rev-erba</i>)	F	TGCAGGCTGATTCTTCACACA
	R	AGCCCTCCAGAAGGGTAGGA
	P	6-FAM- ACACTCTCTGCTCTTCCCATGCAAATCAG- TAMRA
<i>Per1</i>	F	ACCAGCGTGTGATGATGACATAC
	R	CTCTCCCGGTCTTGCTTCAG
	P	6-FAM-CCGTCCAGGGATGCAGCCTCTG-TAMRA
<i>Per2</i>	F	ATGCTCGCCATCCACAAGA
	R	GCGGAATCGAATGGGAGAAT
	P	6-FAM-ATCCTACAGGCCGGTGGACAGCC- TAMRA
<i>Prkaa1</i>	F	TCGGCACCTTCGGGAAA
	R	GCCACTTTATGTCCGGTCAAC

Material

	P	6-FAM-TGAAGGTGGGCAAGC-TAMRA
<i>Prkaa2</i>	F	TGGAGGTGAATTGTTCTGACTACA
	R	GCGCGCTTCCACCTCTT
	P	6-FAM-CTGCAAACATGGGCG-TAMRA
<i>Prkab1</i>	F	CAGTACAAGTTCTTCGTGGATGGA
	R	TGGCTGGTTACTATTGGCTCAGA
	P	6-FAM-AGTGGACCCATGATC-TAMRA
<i>Prkag1</i>	F	GGTGTACCTGCAGGACTCCTTTAA
	R	TCAAACAAGCTGGCATTGG
	P	6-FAM-CACTTGTCTGCATCTC-TAMRA
<i>Strada</i>	F	TGAGCTGTGGGTCGTCACA
	R	TGCCAATGAGATCCTTTGCA
	P	6-FAM-CATTTATGGCGTACGGCT-TAMRA
<i>Stk11</i>	F	CGGCCACCACTCTCTGA
	R	ACCTCTGGCCGGCTCAT
	P	6-FAM-TCCGAGGGATGTTGGAG-TAMRA
<i>Tfeb</i>	F	CATCAACCCTGAGATGCAGATG
	R	TACACGTTTCAGGTGGCTGCTA
	P	6-FAM-TAACACGCTGCCCTG-TAMRA
<i>Ulk1</i>	F	GAAGCAGGTGGTACGCAGACT
	R	TGAGGCCCTGGCAGGATAC
	P	6-FAM-AATGAGCTGTACAAGGC-TAMRA

<i>Zkscan3</i>	F	TCTGGCAGCCTGGTTTCC
	R	TCGAGGCAAGTCCCTAACCTT
	P	6-FAM-TGGATCAGGACATGCAGA-TAMRA

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

Tabelle 2.5: Humane Primer für Real Time Polymerasekettenreaktion

Target	Primer*	Sequenz
<i>β-Aktin</i>	F	CGCGAGAAGATGACCCAGATC
	R	CACAGCCTGGATAGCAACGT
	P	6-FAM-TGAGACCTTCAACACCCCAGCCATG-TAMRA
<i>Bmal1</i>	F	TGGCTCCAGCCCATTGA
	R	GAGTCCCTCCATTTAAAATCTTCTTG
	P	6-FAM-ACGAGTACGCCTCCCCCTGATGC-TAMRA
<i>Camkk2</i>	F	TGGTGGAGGTCCTGGATGAC
	R	TTGACCAGTTCGAACACCATGT
	P	6-FAM-CCAATGAGGACCATCTG-TAMRA
<i>Cebpβ</i>	F	CAAGAAGACCGTGGACAAGCA
	R	CGCACGGCGATGTTGTT
	P	6-FAM-ACGAGTACAAGATCCGG-TAMRA
<i>Clock</i>	F	TCACAGCCCAACCCCTTCT
	R	TCGGGATCTTGGTTGGTGT

Material

	P	6-FAM-AGTTCAAGAAAATCATCTCACACGGCCGT-TAMRA
<i>Cry1</i>	F	TCCGCTGCGTCTACATCCT
	R	TGAAGCAAAAATCGCCACCTGTTGA
	P	6-FAM-CCTGGTTCGCCGGCTCCTCC-TAMRA
<i>Cry2</i>	F	TGAACTCCCGCCTGTTTGTAG
	R	GGTCACTCCCCATTCCTTGA
	P	6-FAM-ACAGCCAGCCGACGTGTTCCA -TAMRA
<i>Ctsl</i>	F	CAGCTTCACAATGGCCATGA
	R	CATCACCTGCCTGAATTCTTCA
	P	6-FAM-CCTTTGGAGACATGACC-TAMRA
<i>Dbp</i>	F	CGTGGAGGTGTTGATGACCTT
	R	AGGTCTCGTGGCCAGGAAT
	P	6-FAM-CGACCCAGCTGATCTTGCCCTATCAA-TAMRA
<i>Eef1a</i>	F	TCCACCTTTGGGTCGCTTT
	R	CTTCTTGTCCTACTGCTTTGATGA
	P	6-FAM-TTCGTGATATGAGACAGACAGTTGCGG-TAMRA
<i>Gapdh</i>	F	TCCATGACAACCTTTGGTATCG
	R	CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGA
	P	6-FAM-AAGGACTCATGACCACAGTCCATG-TAMRA
<i>Map1/Lc3b</i>	F	CCTTGTACCTGACCATGTCAACA
	R	TTGAGCTGTAAGCGCCTTCTAA
	P	6-FAM-AGTGAGCTCATCAAGATA-TAMRA

Material

<i>Map3k7</i>	F	TGGTGGCCCAGCTTTCC
	R	TATCAGTGGTGGTCGAGTACCAT
	P	6-FAM-AATCATGTGGGCTGTTC-TAMRA
<i>Nr1d1</i> (<i>Rev-erba</i>)	F	CGTGTATGCAGCCCCAGAA
	R	CATAGGACATGCCAGCAGAACA
	P	6-FAM-CACCTGCCAACAGTCCCCGGC-TAMRA
<i>Per1</i>	F	CCCAGCACCACTAAGCGTAAA
	R	TGCTGACGGCGGATCTTT
	P	6-FAM-CCTCAGCCTCTGACGACGACAGGC-TAMRA
<i>Per2</i>	F	CTTTCTTTTGCCGTGTCAGTGT
	R	CTTGTTGGTCCCGCACCTT
	P	6-FAM-AATGAAATCCGCTACCACCCCTTCCG-TAMRA
<i>Rora</i>	F	AGCATCAGGCTTCTTTCCCTACT
	R	TTCTAATTCTGCCATGGACACAGT
	P	6-FAM-TTCGTTACCAACGGCGAGACTTCC-TAMRA
<i>Sirt1</i>	F	TGCGGGAATCCAAAGGATAA
	R	CAGGCAAGATGCTGTTGCA
	P	6-FAM-TCAGTGTCATGGTTCCT-TAMRA
<i>Ulk1</i>	F	CGCGTCAAGATCGCTGACT
	R	AGAGTGTGGCCGCATCA
	P	6-FAM-CTTCGCGCGGTACC-TAMRA

<i>Zkscan3</i>	F	GCTGCAGAGAAGATAAAGTGGTAGCT
	R	GCCACATCTTCCACTTTCAACA
	P	6-FAM-CTAGGCTTACTCCAGAGTC-TAMRA

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

2.8.3 Sonstige Nukleinsäuren

100 bp DNA Molekulargewichtsmarker

NEB, Ipswich, Massachusetts, USA

Molekulargewichtsmarker 1 kb Plus

Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA

2.9 Proteine

2.9.1 Antikörper

2.9.1.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten primären Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Kaninchen-Anti-AMPK α (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Kaninchen-Anti-BMAL1 (monoklonal)	Abcam, Cambridge, England
Kaninchen-Anti-CALNEXIN (polyklonal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kaninchen-Anti-LC3B (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA

Material

Kaninchen-Anti-NR1D1 (polyklonal)	Thermo Scientific, Lafayette, Colorado, USA
Kaninchen-Anti-PER2 (polyklonal)	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-AMPK α (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Kaninchen-Anti-Phospho-p70 S6 Kinase (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Kaninchen-Anti-SQSTM1/p62 (polyklonal)	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Kaninchen-Anti-ULK1 (monoklonal)	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Maus-Anti- β -ACTIN (monoklonal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Maus-Anti-JL-8 (monoklonal)	Clontech Laboratories, Mountain View, Kalifornien, USA
Maus-Anti-SirT1 (monoklonal)	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Maus-Anti-U2AF (monoklonal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

2.9.1.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper	Ursprung	Bezugsquelle
ECL Anti-Kaninchen IgG, mit Meerrettich Peroxidase gekoppelt	Esel	Amersham, Little Chalfont, England
ECL Anti-Maus IgG, mit Meerrettich Peroxidase gekoppelt	Schaf	Amersham, Little Chalfont, England

2.9.2 Enzyme

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

2.9.3 Sonstige Proteine

ColorPlus Protein Leiter <i>prestained</i>	NEB, Ipswich, Massachusetts, USA
Peq Gold Proteinmarker II	PeQlab, Erlangen, Deutschland

2.10 Software

Software	Bezugsquelle
BD FACS Diva V6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism® 4.0a	GraphPad Software Inc., LaJolla, Kalifornien, USA
Lumicycle Analysis Program	Actimetrics, Evanston, Illinois, USA
MultiGauge Quantifizierungsprogramm	GE Healthcare, Chalfont St Giles, England
Primer Express 3	Applied Biosystems®, Thermo Scientific, Lafayette, Colorado, USA
Roche Lightcycler Analysis	Roche, Mannheim, Deutschland

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung muriner adhärenter Zellen

Die verschiedenen, hier verwendeten murinen Zelllinien (siehe 2.6.2) wurden alle in Nährmedium (DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml⁻¹ Streptomycin, von Gibco, Thermo Scientific, Lafayette, USA) bei 37°C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Je nach Konfluenz wurden die Zellen maximal dreimal die Woche passagiert, dazu wurden sie mit D-PBS gewaschen und mit 0,5% Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und resuspendiert. Danach wurde die Trypsinierung mit Nährmedium gestoppt. Von der Zellsuspension wurde je nach Bedarf entweder 30-50% (Zelllinien abhängig) oder eine spezifische Zellzahl, die mit dem Countess® Cell Counter ermittelt wurde, für weitere Experimente in neue Zellkulturschalen passagiert. Die maximale für experimentelle Ansätze zu verwendende Passage der Zellen war p20.

3.1.2 Kultivierung humaner adhärenter Zellen

Humane dermale Fibroblasten wurden aus Hautproben, entnommen bei kosmetischen chirurgischen Eingriffen von der unteren, sonnengeschützten Seite der menschlichen weiblichen Brust, isoliert. Zu dieser Untersuchung haben alle Spenderinnen im Alter von 20 bis 67 Jahren ihre Zustimmung schriftlich mitgeteilt. Die Untersuchung entspricht somit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf genehmigt (Project-Nr.: TOX_EF_D01/2008). Die Isolierung der primären humanen Hautfibroblasten erfolgte nach bereits veröffentlichten Methoden (Tigges, et al. 2013).

Die primären humanen Hautfibroblasten (siehe 2.6.1) wurden in Nährmedium (DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml⁻¹ Streptomycin, von PAA Laboratories, Pasching, Österreich) bei 37°C in

feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Je nach Konfluenz wurden die Zellen maximal einmal die Woche passagiert, dazu wurden sie mit D-PBS gewaschen und mit 0,5% Trypsin/ EDTA von der Zellkulturschale gelöst und resuspendiert. Danach wurde die Trypsinierung mit Nährmedium gestoppt. Von der Zellsuspension wurde je nach Bedarf entweder 30-50% oder eine spezifische Zellzahl, die mit dem Countess® Cell Counter ermittelt wurde, für weitere Experimente in neue Zellkulturschalen passagiert. Die maximale für experimentelle Ansätze zu verwendende Passage der Zellen war p9.

3.1.3 Ermittlung der Lebendzellzahl

Für die Ermittlung der Lebendzellzahl wurde eine Trypanblau-Ausschluss-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit 0,5% Trypsin/ EDTA von der Zellkulturschale gelöst und bei 300xg für drei Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,5-1 ml Nährmedium resuspendiert und ein Teil der Zellen in einer 1:1 Verdünnung mit einer Trypanblau-Lösung (0,4%) gemischt und auf ein Countess™ Cell Counter Slide aufgetragen. Die Zellzahl und Viabilität wurde mit dem Countess® Cell Counter ermittelt.

3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden Zellen mit D-PBS gewaschen und mit 0,5% Trypsin/ EDTA von der Zellkulturschale gelöst und vereinzelt. Danach wurde die Zellsuspension bei 300xg für drei Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml⁻¹ Streptomycin plus 10% FCS und 20% DMSO) aufgenommen und zu je einem Milliliter auf Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert. Diese wurden für 24 Stunden in mit Isopropanol gefüllte Kryo-Einfrierbehälter bei -80°C gelagert, bevor sie in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt wurden.

Für die Reaktivierung der Zellen wurden die Kryokonservierungsröhrchen kurz bei 37°C aufgetaut. Um das DMSO aus dem Medium zu entfernen, wurde die Zellsuspension mit dem

10fachen Volumen an Nährmedium aufgenommen und pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Nährmedium aufgenommen und vereinzelt, in neue Zellkulturschalen überführt und, wie oben beschrieben, weiter passagiert.

3.1.5 Transfektion und Selektion von Zellen

24 Stunden vor der Transfektion wurden konfluente Zellen, das heißt Zellen die ca. 90% des Zellkulturschalenbodens bedecken, mit 0,5% Trypsin/ EDTA von der Zellkulturschale gelöst und resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit dem Countess® Cell Counter ermittelt und eine spezifische Zellzahl, entsprechend der Größe der neuen Zellkulturschale, ausplattiert. Am Transfektionstag sollte die Zellkultur eine Konfluenz von etwa 70% aufweisen. Die Zellen wurden entsprechend den Herstellerangaben entweder mit Effectene Transfektionsreagenz von Qiagen oder mit Dharmafect 1 Transfektionsreagenz von Thermo Scientific Dharmacon transfiziert. 48 bis 72 Stunden nach der Transfektion wurde aus den transient transfizierten Zellen RNA isoliert (siehe 3.6.1), Proteinextrakte hergestellt (siehe 3.2.1) oder sie wurden für weitere Biolumineszenz-Messungen vorbereitet (siehe 3.1.9).

3.1.6 siRNA Transfektion von murinen Zellen

24 Stunden vor der Transfektion von siRNAs wurden 1×10^5 NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen in 35 mm oder 6-Lochzellkulturschalen ausplattiert. Von der jeweils zu transfizierenden siRNA (siehe Tabelle 2.3) wurde mit RNase-freiem Wasser eine 5 μ M Stocklösung erstellt. Diese wurde abhängig von der im Experiment einzusetzenden Konzentration bis zu einer finalen Konzentration von 10 bis 30 nM pro Zellkulturschale mit serumfreiem Medium (DMEM+Glutamax-I versetzt mit 100 U*ml⁻¹ Penicillin und 100 μ g*ml⁻¹ Streptomycin) weiter verdünnt. Wie von Thermo Scientific Dharmacon empfohlen, wurde als Transfektionsreagenz für die Transfektion für die NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen Dharmafect 1 verwendet. Die Transfektion erfolgte entsprechend des Dharmacon siRNA

Transfektionsprotokolls. Die Inkubation der transfizierten Zellen erfolgte für mindestens 48 Stunden bei 37°C; anschließend wurden die Zellen für die RNA Isolation aufbereitet und für weitere RT PCR Analysen verwendet oder es wurde die Biolumineszenz der Zellen in Echtzeit im Lumicycle 32 für 96 Stunden gemessen. Um die Herunterregulierung der Zielproteine zu überprüfen, wurden zusätzlich Proteinextrakte mit 1x Lämmli-Puffer (10x: 1,25 M Tris-HCl (pH 6,8), 10% Glycerin, 10% SDS, 100 mM DTT, 0,05% Bromphenolblau) hergestellt und durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot (siehe 3.2.5) analysiert.

3.1.7 Transfektion humaner primärer Fibroblasten mittels Elektroporation

Die Zellen wurden für das Experiment so ausplattiert, dass sie am Transfektionstag eine Konfluenz von etwa 90% aufwiesen. Diese wurden zunächst mit D-PBS gewaschen, mit 0,5% Trypsin/ EDTA von der Zellkulturschale gelöst und resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit dem Countess® Cell Counter ermittelt und 2×10^6 Zellen per Zentrifugation (300xg für drei Minuten) pelletiert. Die Zellen wurden in 100 µl P2 Primary Cell 4D-Nucleofactor Solution aufgenommen, gefolgt von der Zugabe von 5 µg der jeweiligen Plasmid DNA. Je 100 µl der Zellsuspension wurde in eine Küvette überführt und die Elektroporation (Programm FF-113) gestartet. Nach Beendigung und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Zellsuspension in vorgewärmtem Medium aufgenommen und in neue Zellkulturschalen überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für mindestens 48 Stunden bei 37°C.

48 Stunden nach der Elektroporation wurden die Zellen geerntet, RNA isoliert (siehe 3.6.1), Proteinextrakte hergestellt (siehe 3.2.1) oder sie wurden für mikroskopische Aufnahmen vorbereitet (siehe 3.3.1).

3.1.8. UVA Bestrahlung von Zellen

Für das Experiment wurden die Zellen mindestens 24 Stunden vor der Bestrahlung mit UVA in 35 mm, 100 mm oder 6-Lochzellkulturschalen ausplattiert. Die Bestrahlung wurde mit 20

Gray über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe einer Sellamed UV Lampe bestrahlt. Nach der UVA Behandlung wurden die Zellen erneut über einen festgelegten Zeitraum bei 37°C inkubiert, danach RNA isoliert (siehe 3.2.1), Proteinextrakte hergestellt (siehe 3.6.1) oder sie wurden für weitere Experimente vorbereitet.

3.1.9 Echtzeit-Biolumineszenz-Messung

Bei den NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen ist es durch die Kopplung des *Bmal1*-Promoters an ein Leuchtkäfer-Luziferase-Gen möglich, die zirkadiane Rhythmizität in Echtzeit zu messen (Echtzeit-Biolumineszenz).

Für Echtzeit-Biolumineszenz-Messungen wurde eine zuvor mit dem Countess® Cell Counter ermittelte spezifische Zellzahl von $1 \cdot 10^5$ Zellen in 35 mm Zellkulturschalen ausplattiert. Bei Beginn der Biolumineszenz-Aufzeichnung wurden die Zellen für 30 Minuten mit 100 nM Dexamethason synchronisiert, gefolgt von einem Waschschrift mit D-PBS. Anschließend erhielten die Zellen CO₂-unabhängiges Medium (DMEM+Glutamax-I versetzt mit 10% FCS, 100 U*ml⁻¹ Penicillin und 100 µg*ml⁻¹ Streptomycin), welches mit 0,1 mM Luziferin supplementiert war. Falls der Einfluss von Chemikalien auf die zirkadiane Uhr untersucht wurde, wurde das CO₂-unabhängige Medium zusätzlich mit den entsprechenden Substanzen versetzt. Vor der Überführung der Zellkulturschalen in den 32-Kanal Luminometer (Lumicycle 32) im lichtdichten Inkubator bei 37°C, wurden diese mit Parafilm verschlossen. Die Messung der Echtzeit-Biolumineszenz der Zellen erfolgte über mindestens drei Tage.

Für Phasenverschiebungsexperimente wurden die Zellkulturschalen nach ca. 24 Stunden erneut aus dem Lumicycle 32 entnommen, mit entsprechenden Chemikalien zu verschiedenen Zeitpunkten versetzt, mit Parafilm verschlossen und die Messung der Echtzeit-Biolumineszenz der Zellen über mindestens drei Tage fortgesetzt.

Die Auswertung aller Daten erfolgte mit dem LumiCycle Analysis Programm.

3.2 Proteinanalytische Methoden

3.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden zunächst exponentiell wachsende murine oder humane adhärenente Zellen mit D-PBS gewaschen und mit 0,5% Trypsin/ EDTA von der Zellkulturschale gelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mit Nährmedium neutralisiert, in Reaktionsgefäße überführt und bei 300xg für drei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in D-PBS aufgenommen und mit dem gleichen Volumen zweifach konzentriertem SDS-PAGE-Probenpuffer [5x: 0,2 M Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerin, 10% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 10 mM DTT] lysiert. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung durch Ultraschall für 10 Sekunden bei 20% Power. Die Proteinextrakte wurden nachfolgend bei -20°C gelagert.

Für gelelektrophoretische Analysen wurden in der Regel Äquivalente von etwa $1 \cdot 10^5$ Zellen des Proteinextraktes pro Gelspur aufgetragen. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen fünf Minuten bei 95°C denaturiert.

3.2.2 Immunpräzipitation

24 Stunden vor der Immunpräzipitation wurden NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Am Tag des Experiments wiesen die Zellen 80-90% Konfluenz auf, wurden mit D-PBS gewaschen, in 1 ml D-PBS mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst und in neue Reaktionsgefäße überführt. Danach wurde die Zellsuspension bei 300xg für drei Minuten bei 2°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3x Volumen RIPA Puffer aufgenommen und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgten zwei Zentrifugationsschritte à 30 Minuten bei 17000xg bei 2°C und der Überstand wurde jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 10% des Überstands wurden als Kontrollfraktion abgenommen, die Proteinkonzentration mittels Bradford Messung bestimmt (siehe 3.2.3) und bei -80°C gelagert. Der Rest des Proteinextrakts wurde mit 5 µl des jeweiligen Antikörpers versetzt und über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Parallel wurden die für die Immunpräzipitation benötigten Protein A- oder Protein G-gekoppelten

Sepharose-beads dreimal mit je 1 ml D-PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 750 µl D-PBS und 250 µl 1mg/ml BSA geblockt. Am folgenden Tag wurden die Sepharose-beads erneut dreimal mit je 1 ml D-PBS gewaschen bevor diese zusammen mit dem Proteinextrakt zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert wurden. Zuletzt wurden die Sepharose-beads bei 600xg für drei Minuten bei 2°C zentrifugiert und erneut viermal mit je 1 ml D-PBS gewaschen bevor sie in jeweils 25 µl 5x SDS-Probenpuffer (0,2 M Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerin, 10% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 10 mM DTT) aufgenommen wurden. Die Denaturierung der Proteine erfolgte für 10 Minuten bei 95°C.

3.2.3 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. Um das Verhältnis von Absorptionshöhe zur jeweiligen Proteinkonzentration beurteilen zu können, wurde zunächst eine BSA Konzentrationsreihe von 1 bis 20 µg*ml⁻¹ erstellt. Dann wurden je 20 µl der Konzentrationsreihe mit 1 ml Bradford Reagenz (siehe 2.2) versetzt, für 10 Minuten bei RT inkubiert und spektralphotometrisch bei 595 nm gemessen. Die daraus resultierenden Absorptionshöhen wurden gegen die Proteinkonzentrationen aufgetragen und eine Eichgerade erstellt. Um unbekannte Proteinkonzentration von Proteinlösungen zu ermitteln, wurden auch diese mit Bradford Reagenz (siehe 2.2) versetzt, für 10 Minuten bei RT inkubiert und spektralphotometrisch gemessen. Die Konzentration konnte anhand der zuvor ermittelten Eichgeradengleichung berechnet werden.

3.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von isolierten Proteingemischen durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde bereits bei Laemmli *et al.* beschrieben

(Laemmli 1970). Hierfür wurde ein Trenngel [je nach Bedarf 8 bis 12% Acrylamid (37,5:1 Acrylamid:Bisacrylamid, siehe 2.1), 375 mM Tris-Cl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,1% APS] in eine Novex Gel-Kassette gegossen und mit einem Sammelgel [5% Acrylamid (siehe 2.1), 125 mM Tris-Cl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,1% TEMED, 0,1% APS] überschichtet. Die Extrakte wurden für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in mit SDS-PAGE-Laufpuffer (3 g·l⁻¹ Tris, 14,4 g·l⁻¹ Glycin, 1 g·l⁻¹ SDS) gefüllten „Novex Mini-Cell“-Gelkammern bei 50 bis 150 V. Anschließend wurden die Gele für Western Blot Analysen verwendet.

3.2.5 Western Blot Analysen

Die mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des „BioRad TransBlot SemiDry“ Western Blot Systems auf eine PVDF-Membran transferiert. Dafür wurden zwei mit Western Blot Puffer [48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS (0,0375%), 20% Methanol, pH 9,2] getränkte Filterpapiere (je 1mm dick) auf die Anodenseite der Blot Kammer positioniert. Die zuvor in Methanol und H₂O aktivierte und mit Western Blot Puffer gewaschene PVDF-Membran wurde auf die beiden Filterpapiere gelegt. Das 20 Minuten in Western Blot Puffer equilibrierte SDS-Polyacrylamid-Gel wurde auf die PVDF-Membran gelegt, gefolgt von zwei weiteren in Western Blot Puffer getränkten Filterpapieren und dem Kathoden-Deckel des Western Blot Systems. Die Elektrophorese erfolgte mit 5,5 mA/cm² für 8-16 Minuten (in Abhängigkeit von der Proteingröße). Anschließend wurde die PVDF-Membran für eine Stunde bei RT und 30 rpm in 5% fettfreiem Milchpulver, gelöst in TBS-T (1x TBS, 0,1% Tween20), geblockt. Der primäre Antikörper wurde je nach Herstellerangaben in 2–5% BSA oder fettfreiem Milchpulver, gelöst in TBS-T, verdünnt über Nacht auf der Membran bei 30 rpm und 4°C inkubiert. Es folgten drei zwanzigminütige Waschschrte mit TBS-T bei RT und 30 rpm. Der sekundäre Antikörper wurde entweder in BSA oder fettfreiem Milchpulver, gelöst in TBS-T, verdünnt. Die Inkubation der Membran erfolgte für eine Stunde bei RT und 30 rpm, gefolgt von drei weiteren zwanzigminütigen Waschschrten mit TBS-T. Alle sekundären Antikörper waren mit einer aus Meerrettich stammenden Peroxidase gekoppelt. Mit Hilfe des jeweiligen ECL Kits und dem

Kamerasystem ImageQuant LAS-4000 konnten die durch die Antikörper erkannten Proteinbanden visualisiert werden. Die Lagerung der Membranen erfolgte bei 4°C in TBS-T.

Für eine Gesamtproteinfärbung der Membranen erfolgte zum Teil eine Färbung der Membran mit einer Amidoschwarzlösung. Dies diente vor allem zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen als auch der Überprüfung der Gleichmäßigkeit des Membrantransfers. Dazu wurde die Membran nach der Proteinbanden Detektion mit dem jeweiligen ECL Kit fünf Minuten in einer Amidoschwarzfärbelösung (1% Amidoschwarz, 40% MeOH, 10% HOAc) bei RT und 50 rpm inkubiert und anschließend mit H₂O mehrmals entfärbt und gewaschen, bis die gewünschte Hintergrundentfärbung erreicht wurde.

3.3 Mikroskopie

3.3.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden die Zellen auf 8-well Kammerobjektträgern kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit warmem D-PBS gewaschen. Nach der Fixierung der Zellen mit 4% Formaldehyd in PBS und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, erfolgte ein erneuter Waschschriff mit D-PBS. Anschließend wurden die Zellen mit „Mounting“-Medium (1,5% N-Propylgallat, 60% Glycerol, 80 ng*ml⁻¹ 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) überschichtet. Das Absorptionsmaximum von DAPI liegt im ultravioletten Bereich bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum im blauen Bereich bei 461 nm. Da DAPI die Eigenschaft besitzt an AT-reiche Regionen der DNA zu binden, färbt es die DNA im Nukleus der Zellen. Die fixierten und gefärbten Zellen wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse kühl und dunkel gelagert.

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, da bei diesen Enzymen die Erkennungsstellen mit ihren Schnittstellen korrelieren. Die Bedingungen der Restriktionshydrolysen entsprachen den Herstellerangaben.

3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Sowohl zur analytischen als auch zur präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren wurden 1-2%ige Agarose-Gele in TAE-Puffer [40 mM Tris-Acetat (pH 7,5), 2,5 mM EDTA] verwendet. Die Gele wurden mit $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Ethidiumbromid oder $5\mu\text{l}\cdot 100\text{ml}^{-1}$ Midori-Green Farbstoff versetzt, welche mit der DNA interkalierten. Auf einem UV-Transilluminator konnten die Nukleinsäuren aufgrund des Fluoreszenzsignals der interkalierten Farbstoffe detektiert werden.

3.4.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Die DNA-Banden wurden zuvor mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, mit dem Extraktions-Kit aufgereinigt und die isolierte DNA bei -20°C gelagert.

3.4.4 Ligation von Nukleinsäuren

Für die Ligation der DNA-Fragmente wurde das Rapid DNA Ligation Kit von Roche benutzt. Die Reaktionen wurden den Herstellerangaben entsprechend in einem Reaktionsvolumen von 30 µl auf Raumtemperatur durchgeführt und anschließend auf Eis inkubiert oder bei -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 (12 g*L⁻¹ Trypton, 24 g*L⁻¹ Hefeextrakt, 0,004 L Glycerin, 0,1L steriler Phosphatpuffer) mit einer Einzelkolonie einer LB-Agarplatte (10 g*L⁻¹ Trypton, 5 g*L⁻¹ Hefeextrakt, 10 g*L⁻¹ NaCl, pH 7,0, 10 g*L⁻¹ Agar) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Für größere Plasmidpräparationen wurden 4 ml TB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Tag bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am Abend wurde die wachsende 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 Bakterien mit einer Impföse auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Konnte Wachstum mit Einzelkolonien beobachtet werden, lagerten die Platten für bis zu vier Wochen bei 4°C. Bei Bedarf konnte sowohl dem Nährmedium als auch den LB-Agarplatten Ampicillin als selektives Antibiotikum hinzugefügt werden.

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). Dazu wurden *E. coli* in 1 L SOB Medium bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von

0,8 angezogen und anschließend bei 4000xg für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 250 mM KCl, 15 mM CaCl₂, 55 mM MnCl₂, pH 6,7) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4000xg für 20 Minuten bei 4°C wurden das Zellpellet erneut in 20 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und diese Suspension mit DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% versetzt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wurden die Bakterien in 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.5.3 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* Zellen (siehe 2.5.1) auf Eis aufgetaut, mit 10 ng der Plasmid-DNA oder 5 µl des Ligationsansatzes versehen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 45-sekündigen Hitzeschock bei 42°C wurde der Transformationsansatz anschließend mit 200 µl warmem LB-Medium (10 g*L⁻¹ Trypton, 5 g*L⁻¹ Hefeextrakt, 10 g*L⁻¹ NaCl, pH 7,0) versetzt und bei 37°C und 250 rpm für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten (10 g*L⁻¹ Trypton, 5 g*L⁻¹ Hefeextrakt, 10 g*L⁻¹ NaCl, pH 7,0, 10 g*L⁻¹ Agar) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

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

Für die Isolierung von kleineren Mengen Plasmid-DNA wurde das GenJET Plasmid Miniprep Kit von Fermentas verwendet. Dazu wurden zunächst 4 ml TB-Medium (12 g*L⁻¹ Trypton, 24 g*L⁻¹ Hefeextrakt, 0,004 L Glyzerin, 0,1 L steriler Phosphatpuffer) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Nach der Isolation wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert und z.B. für restriktionshydrolytische Analysen (siehe 3.4.1) verwendet. Für die Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit

verwendet. Hier wurden 4 ml TB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Tag bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Am Abend wurde die wachsende Bakterienkultur in 200 ml TB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Nach der Isolation, entsprechend der Herstellerangaben, wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert und z.B. für die Transfektionen von humanen und murinen Zelllinien verwendet.

3.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.6.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Für die Isolation von RNA wurden murine oder humane Zellen für 48 bis 72 Stunden in Zellkulturgefäße ausplattiert, so dass sie am Tag der Isolation eine Konfluenz von 90% erreicht hatten. Die Zellen wurden mit D-PBS gewaschen und mit 0,5% Trypsin/ EDTA von der Zellkulturschale gelöst und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mit Nährmedium neutralisiert, in Reaktionsgefäße überführt und bei 800xg für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 350 µl RLT Puffer, versetzt mit 3,5 µl β-Mercaptoethanol, lysiert. Das Lysat wurde mittels QIASHredder homogenisiert. Für die weitere Isolation von RNA wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Zuletzt wurde die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

3.6.2 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} ; Lösungen mit einem Wert $\geq 1,8$ wurden als rein protokolliert.

3.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde für die Amplifikation von Genen oder Genabschnitten aus Vektoren eingesetzt. Hierfür wurde der Phusion High Fidelity PCR MasterMix nach Herstellerangaben verwendet. Die Phusion DNA Polymerase besitzt eine 3'-5' Exonukleaseaktivität (*Proofreading*), welche laut Herstellerangaben im Vergleich zu einer gewöhnlichen Taq DNA Polymerase eine 50-fach geringere Fehlerrate aufweist. Für die Amplifizierung wurden weiterhin 25 pmol/μl der Primer und 50 ng Plasmid-DNA als Template eingesetzt. Die PCR fand unter den in Tabelle 3.1 wiedergegebenen Reaktionsbedingungen statt. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Größe des zu erwartenden PCR-Produktes variiert (**). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, detektiert und gegebenenfalls isoliert.

Tabelle 3.1: Reaktionsbedingungen für die Polymerasekettenreaktion

Zeit	Temperatur	Zyklusanzahl
10 Sekunden	98°C	1
10 Sekunden	98°C	35-45
1 Minute	58°C*	
5 Minuten**	72°C	
5 Minuten	72°C	1

* Die Temperatur wurde entsprechend der mittleren Schmelztemperatur der Primer (T_m-Wert) variiert.

3.6.4 cDNA Synthese aus RNA durch Reverse Transkription

Für die Generierung von cDNA aus isolierter RNA (siehe 3.6.1) wurde das QuantiTect Reverse Transkription Kit der Firma Qiagen verwendet. Es wurde pro Reaktion jeweils 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Im ersten Schritt wurde „gDNA Wipeout Buffer“ verwendet um mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA zu eliminieren. Im weiteren Verlauf erfolgte die Umschreibung der RNA in DNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase. Die Umschreibung erfolgte für 30 Minuten bei 42°C, die Inaktivierung des Prozesses für drei Minuten bei 95°C. Die isolierte RNA wurde bei -80°C, die neu gewonnene cDNA bei -20°C gelagert.

3.6.5 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Für die Quantifizierung von cDNA Molekülen wird die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Auch Real Time Polymerasekettenreaktion genannt, wird hier in Echtzeit zyklisch die freigesetzte Fluoreszenz, welche proportional zur Menge des PCR Produkts ist, gemessen. Dazu werden neben den forward und reverse Primern (siehe Tabelle 2.4 und 2.5) zusätzlich spezielle Hydrolyse-Sonden (TaqMan-Sonden) benötigt. Diese besitzen an ihrem 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (6-FAM) und an ihrem 3'-Ende den Quencher-Farbstoff 6-Carboxy-tetramethylrhodamin (TAMRA). Das hier verwendete Enzym Taq-Polymerase löst mit seiner 5'-Exonukleaseaktivität bei der Synthese der DNA zunächst den Reporterfarbstoff 6-FAM von der DNA ab. Die größer werdende räumliche Distanz der beiden Farbstoffe führt dazu, dass der Quencher TAMRA nach Anregung des Farbstoffes 6-FAM mit 488 nm, dessen Fluoreszenz nicht mehr unterdrücken kann und die so entstehende Fluoreszenz durch das Real Time PCR-System in Echtzeit detektiert werden kann.

Pro PCR Reaktion wurde jeweils 10 ng cDNA (siehe 3.6.4) (gelöst in 5 µl H₂O), 5 pmol forward und reverse Primer als auch Sonde sowie 10 µl 2x LightCycler480 „Master Mix“ in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert bevor diese mit einer Folie versiegelt wurde. Die

Messung fand unter folgenden Reaktionsbedingungen in einem LightCycler480 Real-Time PCR System der Firma Roche statt:

Tabelle 3.2: Reaktionsbedingungen für die Real Time Polymerasekettenreaktion

Zeit	Temperatur	Zyklenanzahl
2 Minuten	50°C	1
10 Minuten	95°C	1
15 Sekunden	95°C	45
1 Minute	60°C	
30 Minuten	40°C	1

Für die Auswertung der gewonnenen Messdaten wurde die Roche Lightcycler Analysis Software verwendet. Die Ergebnisse werden als ΔCP angegeben, ermittelt anhand der zweiten Ableitung des CT-Wertes $\Delta CP = 2^{-(\Delta CT)}$. Der ΔCT -Wert bildet die Differenz des gemessenen CT-Wertes des Gens von Interesse und dem Mittelwert der CT-Werte drei konstitutiv exprimierter Gene (so genannter Housekeeping Gene): $\Delta CT = CT (\text{Gen von Interesse}) - \text{Mittelwert CT (drei Housekeeping Gene)}$.

3.7 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Datenwerte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung in den Tabellen und Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes in den Abbildungen dargestellt. Statistische Analysen zur Signifikanz wurden mit einem ungepaarten Student t-Test durchgeführt, $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen und als solches gekennzeichnet. Korrelationsanalysen wurden unter Verwendung der GraphPad Prism 5.00 Statistik-Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Potentielle Regulation der zirkadianen Uhr durch Autophagie beeinflussende Substanzen

Während des Alterungsprozesses weisen Zellen, unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies verursachte, erhöhte oxidative Stresslevel auf (Sohal, et al. 2002). Auch die wichtigsten Komponenten des Autophagie Signalweges sind im Alter dereguliert (Dice 1982, Makrides 1983). Alterungsprozesse verändern des Weiteren eine Vielzahl von Aspekten der zirkadianen Rhythmik und haben somit auf organischer als auch auf zellulärer Ebene weitere Auswirkungen, welche sich in veränderten Oszillationen von Körpertemperatur, des Hormonspiegels und Schlaf-Wachrhythmen äußern (Kolker, et al. 2003, Hofman, et al. 2006). Einige Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen Alterungsprozessen und sowohl der Autophagie als auch dem zirkadianen Oszillator hin (Makrides 1983, Kolker, et al. 2003). Hauptziel dieser Arbeit war es, den Zusammenhang von Autophagie, der zirkadianen Uhr und Alterungsprozessen zu analysieren. Zunächst wurde daher untersucht, ob Autophagie oder erhöhte ROS-Level die Funktionsweise der zirkadianen Uhr beeinflussen. Dazu wurden unterschiedliche niedermolekulare Substanzen eingesetzt, welche ROS-Level und/ oder Autophagie beeinflussen, und der Effekt dieser Substanzen auf die zelluläre zirkadiane Uhr bestimmt.

Durch die Analyse der Periodenlänge können Veränderungen in den zirkadianen Rückkopplungsschleifen beobachtet werden. Sind die Periodenlängenänderungen zu gering oder bleiben ganz aus, kann man mittels Phasenverschiebungsexperimenten subtilere Effekte auf den Oszillator untersuchen. Neben *in vivo* Experimenten können auch mit Gewebeproben oder mit Zellen Phasenverschiebungsexperimente durchgeführt werden. Neben Licht oder Temperatur können auch Chemikalien eingesetzt werden um diese Phasenverschiebungen auszulösen. Nach einer temporären Serum- oder Dexamethasonsynchrisation (Balsalobre, et al. 2000), erfolgten die Stimulusapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten, die Messung der zirkadianen Oszillationen und die Bestimmung ihrer Parameter wie Periode, Phase und Amplitude. Für die Messung von zirkadianen Phasenverschiebungsexperimenten mittels Echtzeit-Biolumineszenz-Messungen wurden NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Mausfibroblasten verwendet (Nagoshi, et al. 2004). Am Beginn des Experiments ($T = 0$) wurden die Mausfibroblasten für 30 Minuten mit Dexamethason inkubiert. Diese Synchronisation führt

durch die Aktivierung von *immediate-early* Genen zu einer Neueinstellung der Phase und zu einem gleichmäßigen Oszillieren aller Zellen als Gesamtzellkultur (Balsalobre, et al. 1998). Anschließend erfolgte mindestens eine vollständige Oszillation, bevor die Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit verschiedenen Chemikalien versetzt wurden (siehe Tabelle 4.1). Diese Applikation geschah in einem Abstand von vier Stunden zu Zeitgeber (ZT) 26, 30, 34, 38, 42 und ZT46 (siehe Abb. 4.1).

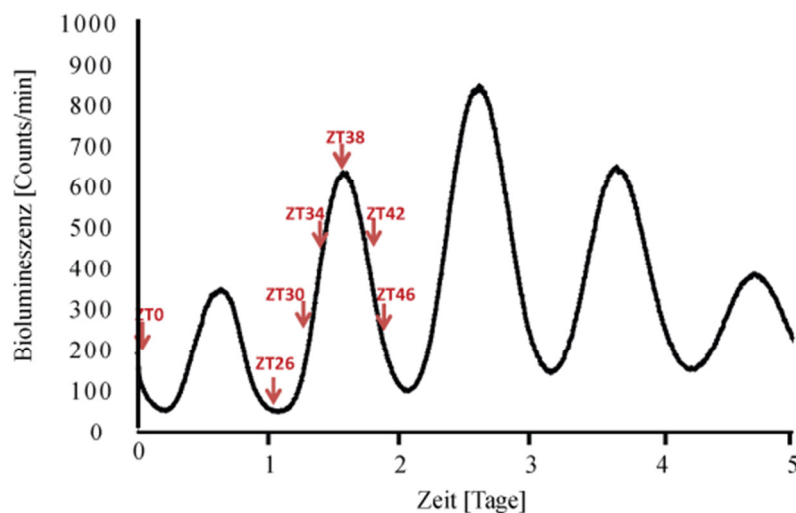


Abbildung 4.1 Applikationsschema bei der Echtzeit-Biolumineszenzmessung von NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen

Die zirkadiane Luciferase-Aktivität des *Bmal1*-Reporterkonstrukts in stationär kultivierten NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen ($> 10^5$ Zellen/ cm^2) nach der Synchronisation bei ZT0. Nach mindestens einer vollständigen Oszillation wurden in einem Abstand von vier Stunden (Pfeile) über einen Zeitraum von 24 Stunden die angegebenen Substanzen (siehe Tab. 1.1) appliziert.

Neben Chemikalien mit antibiotischen Eigenschaften wie A23187, Antimycin A, Monensin, Nigericin, Oligomycin A und TSA wurden auch pharmakologische Substanzen die zur Behandlung von humanen psychiatrischen Erkrankungen eingesetzt werden (Chlorgylin, Deprenyl HCl, Pargylin und Tranylcypromin), analysiert. Alle die für diese Experimente verwendeten Substanzen haben etwas gemein, sie beeinflussen ROS-Level und/ oder Autophagie. Nigericin zeigt inhibierende Tendenzen auf ROS-Level (Schonfeld et al. 2010) während sich auch die Monoaminoxidase (MAO) Inhibitoren Chlorgylin, Deprenyl HCl (Kochman et al. 2003), Pargylin (Stansley et al. 2013) und Tranylcypromin (Pena-Silva et al. 2009) hemmend auf die ROS Bildung auswirken. Quercetin (Kim et al. 2014) als auch Sirtinol (Albani et al. 2009) wirken sich hingegen induzierend auf die ROS-Level aus. Im Gegensatz dazu werden Oligomycin A (Tettamanti et al. 2006), CCCP (Kwon et al. 2011) und

Geldanamycin (Mori et al. 2015) Autophagie induzierende, TSA (He et al. 2014), Monensin (Choi et al. 2013) und Antimycin A (Ma et al. 2011) Autophagie inhibierende Tendenzen zugeschrieben. FK866, ein NAD Inhibitor, induziert die Autophagie, durch die Gabe von NAD kann dieser Effekt allerdings wieder revertiert werden (Billington et al. 2008). A23187 inhibiert die Autophagie durch Interaktion mit dem intrazellulären Calciumspiegel (Gordon et al. 1993). Auch physikalischer Stress wie Hitzeschock (Dokladny et al. 2013) oder Kälteschock (Neutelings et al. 2013) können die Autophagie beeinflussen. Zudem wurde auch ein giftiges Halbmetall untersucht. Arsen (As) und seine Verbindungen werden aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften häufig in Insektiziden, Pestiziden, Herbiziden, Arzneimitteln und in verschiedenen Legierungen verwendet. Nicht nur Arsen, sondern auch seine Verbindungen sind von großer Bedeutung, da sie unterschiedliche Toxizitätsniveaus aufweisen (Kumaresan et al. 2001). Hauptbestandteile in bisher untersuchten klinischen und umweltmedizinischen Proben sind neben einer großen Anzahl von arsenigen Säuren auch Arsenit und Arsenat (Henke 2009). Diese Verbindungen weisen unterschiedliche Oxidationsstufen (-III, 0, III, V) und entsprechend chemische Komplexität auf. Anorganisches Arsen, welches der Stickstofffamilie angehört, existiert hauptsächlich in zwei Redoxzuständen. Zum einen liegt es in der reduzierten Form als Arsenit (AsIII) und zum anderen in der oxidierten Form als Arsenat (AsV) vor, welche beide für die meisten Organismen toxisch sind (Druwe et al. 2010, Koehler et al. 2014). Arsenit ist eine anorganische Verbindung aus dem Bereich des Arsens. Es interagiert mit den Sulfhydrylgruppen in den Aminosäuren und kann die Proteinstruktur zerstören (Tamaki et al. 1992). Durch die gesteigerte Löslichkeit und Affinität von Arsenit, steigert dies potentiell auch seine Toxizität (Frankenberger 2001). Arsenit ist zehnfach toxischer als Arsenat und 70mal toxischer als die methylierten Verbindungen (Kumaresan, et al. 2001). Trotz der hochtoxischen, Autophagie (Bolt et al. 2010) und ROS (Jiang et al. 2013) induzierenden Eigenschaften von Arsenit konnte bisher keine Interaktion mit der zirkadianen Uhr in Säugetieren nachgewiesen werden.

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Metabolite und pharmakologischen Substanzen

Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
A23187	7 μ M	Monensin	20 μ M
Antimycin A	30 μ M	NAD	10 mM
Arsenit	0,5 – 2 mM	NAM	10 mM
CCCP	0,7 mM	Nigericin	50 μ M
Chlorgylin	1 mM	Oligomycin	10 μ M
Deprenyl HCl	1 mM	Pargylin	1 mM
FAD	1 mM	Quercetin	0,1 mM
FK866	1 nM	Sirtinol	20 μ M
Geldanamycin	0,8 μ M	Tranlylcypromin	0,1 mM
KNK437	30 μ M	TSA	5 μ M

Die Inkubation der Zellen mit den meisten Substanzen hatte keinen Einfluss auf Periodenlänge (Abb. 4.2 A) oder die Phase (Abb. 4.2 B). Die Periode und die Phase der zirkadianen Uhr zeigten Veränderungen nach der Inkubation der Zellen mit NAM (Periode: 26,0 h \pm 0,2 h, Phase: 1,5 h \pm 0,4 h), Tranlylcypromin (Periode: 22,7 h \pm 0,7 h, Phase: 1,8 h \pm 0,7 h), Arsenit (Periode: 26,0 h \pm 0,2 h, Phase: 1,6 h \pm 0,2 h), TSA (Periode: 21,9 h \pm 0,3 h, Phase: 2,6 h \pm 0,2 h) und Oligomycin A (Periode: 22,1 h \pm 0,4 h, Phase: 2,4 h \pm 0,3 h). Chlorgylin (Periode: 23,8 h \pm 0,1 h) und Pargylin (Periode: 23,6 h \pm 0,2 h) zeigten nach der Substanzapplikation im Vergleich zur Kontrolle (Periode: 24,5 h \pm 0,2 h, Phase: 0,3 h \pm 0,02 h) einen Effekt auf die Periode, alle weiteren Substanzen hatten keinen Einfluss auf die Periodenlänge oder die Phase der Zellen (vgl. Abb. 4.2 A und B).

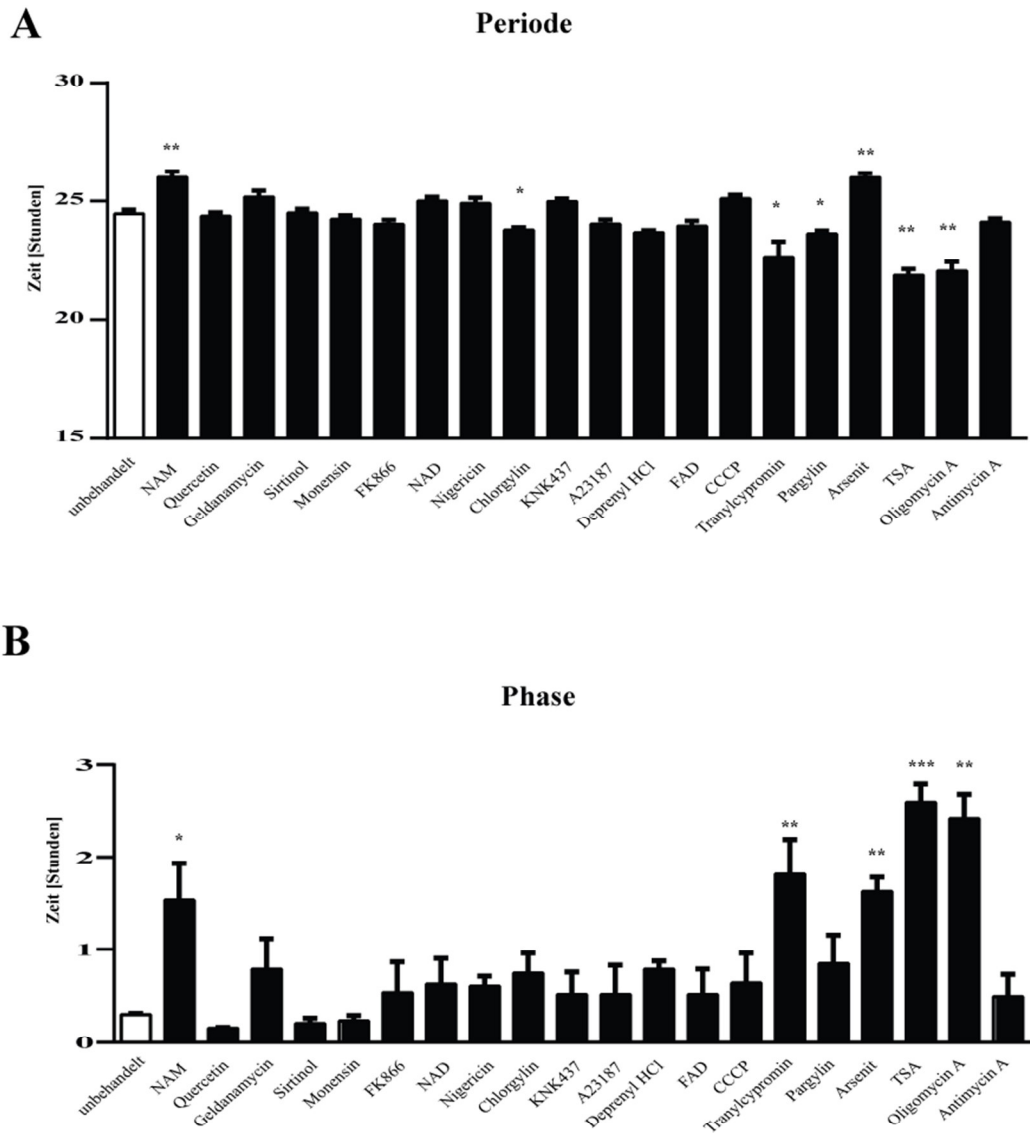


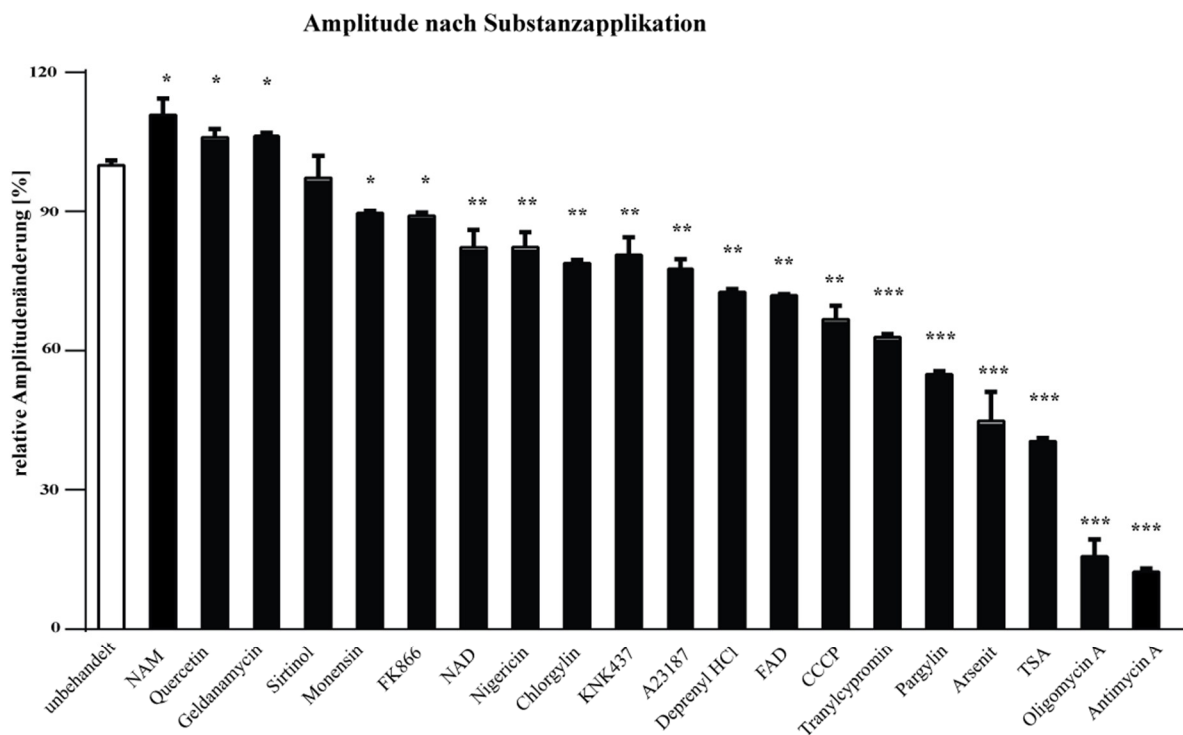
Abbildung 4.2: Echtzeit-Biolumineszenz-Analyse der Periode und Phase von NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen

NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen wurden an Tag null synchronisiert. Nach mindestens einer vollständigen Oszillation, wurden in einem Abstand von vier Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden die angegebenen Substanzen appliziert. Die Biolumineszenz wurde während eines Zeitraums von 168 Stunden gemessen. Analysiert wurden die Veränderungen der (A) Periode [Stunden] und (B) der Phase [Stunden] in unabhängigen Replikaten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ (zweiseitiger T-Test)

Mit allen Substanzen konnte eine veränderte Amplitude nach Zugabe bei ZT38 beobachtet werden (Abb. 4.3 A). Während die Behandlung der Zellen mit NAM (108%), Quercetin (106%) und Geldanamycin (106%) zu einem Amplitudenanstieg führte, verursachten viele Substanzen eine moderate Amplitudenreduktion zwischen 89% (Monensin) und 54% (Pargylin) (Übersicht aller Substanzen, siehe Abb. 4.3 A). Deutliche Amplitudenreduktionen konnten bei Inkubation mit Arsenit (41%), TSA (40%), Oligomycin A (13%) und Antimycin

A (12%) verzeichnet werden. Auch physikalischer Stress wie Hitzeschock oder Kälteschock führte zu einem sichtbaren Anstieg der Amplitude (4°C: 128%; 45°C: 112%; Abb. 4.3 B), UV-Strahlung dagegen zu einer signifikanten Reduktion (22%; Abb. 4.3 B). Somit kann ein direkter Einfluss von unterschiedlichen Substanzen, welche ROS-Level und/ oder Autophagie beeinflussen auf die zirkadiane Uhr in Säugetieren nachgewiesen werden.

A



B

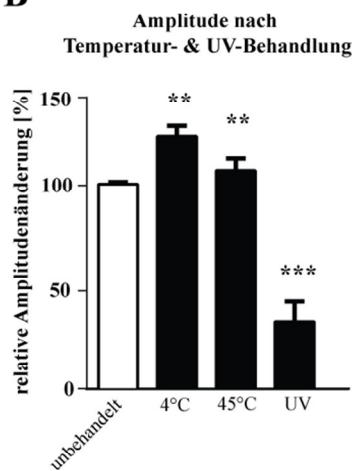


Abbildung 4.3: Echtzeit-Biolumineszenz-Analyse der Amplitude von NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen

NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen wurden an Tag null synchronisiert und anschließend nach mindestens einer vollständigen Oszillation, erneut in einem Abstand von vier Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit (A) den angegebenen Substanzen behandelt oder (B) einem Temperaturwechsel oder UV-Strahlung unterzogen. Die Biolumineszenz wurde in Echtzeit über 168 Stunden gemessen, die Veränderungen der Amplitude [%] in unabhängigen Replikaten, normalisiert auf den zugehörigen Wert der unbehandelten Kontrolle, analysiert. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ (zweiseitiger T-Test)

Da es in Phasenverschiebungsexperimenten bei ZT38 zu einer deutlichen Amplitudenreduktion mit Arsenit kam (vgl. Abb. 4.3 A, Konzentration von Arsenit 0,5 mM), wurden erneut Experimente mit dieser Substanz durchgeführt. Um einen

konzentrationsabhängigen Effekt von Arsenit auf die zirkadiane Uhr zu bestätigen, erfolgten Experimente mit Konzentrationen von 0,5, 1 und 2 mM Arsenit zu ZT38 und einem 12 Stunden versetzten Zeitpunkt, ZT26 (Abb. 4.4). Während die ansteigende Arsenitkonzentration bei ZT38 zu einem signifikant verstärkten Effekt auf die zirkadiane Uhr führte (0,5 mM: 41%; 1 mM: 34%; 2 mM: 17%; Abb. 4.4 B), war bei ZT26 keine signifikante konzentrationsabhängige Veränderung der Amplitude zu verzeichnen (0,5 mM: 106%; 1 mM: 105%; 2 mM: 107%; Abb. 4.4 A).

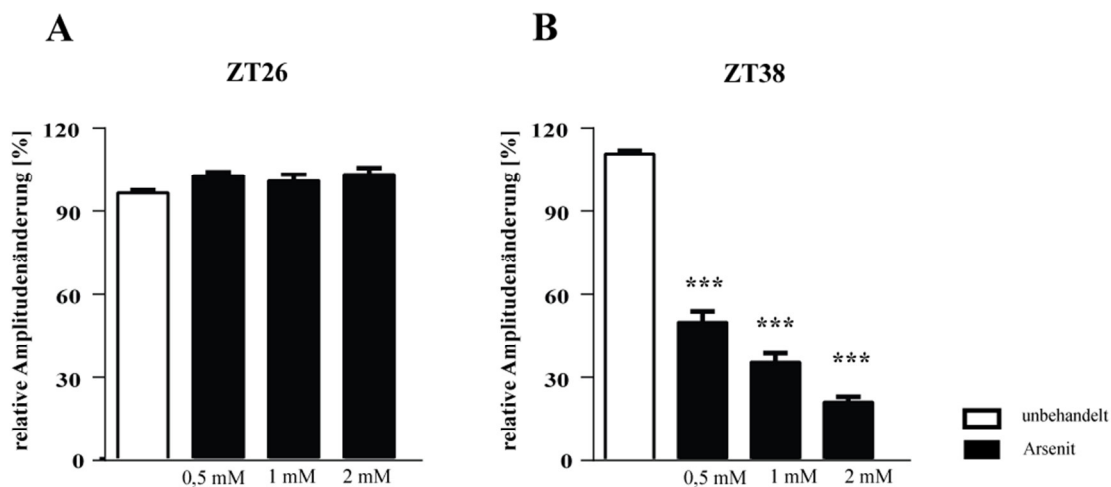


Abbildung 4.4: Auswirkungen der Arsenitkonzentrationen auf die Amplitude bei ZT26 und ZT38 von NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen nach Phasenverschiebungsexperimenten

NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen wurden an Tag null synchronisiert und anschließend wurden nach mindestens einer vollständigen Oszillation, erneut in einem Abstand von vier Stunden über einen Zeitraum von 24 Stunden mit den angegebenen Arsenitkonzentrationen appliziert. Die Biolumineszenz wurde in Echtzeit über 168 Stunden gemessen, die Veränderungen der Amplitude [%] bei (A) ZT26 und (B) ZT38 in unabhängigen Replikaten, normalisiert auf den zugehörigen Wert der unbehandelten Kontrolle, analysiert. *** $p < 0,0005$ (zweiseitiger T-Test)

Aus diesen Analysen wurde deutlich, dass die Substanzen, welche die stärksten Amplitudenreduktionen aufweisen, allesamt wichtige Abläufe in der zirkadianen Rhythmik oder damit verbundene Vorgänge beeinflussen können. Die hier beobachteten Effekte der Autophagie-beeinflussenden Chemikalien auf die zirkadiane Uhr sind zusammenfassend jedoch zu gering um von einer starken Wirkung der Autophagie auf den zirkadianen Oszillator zu sprechen. Als nächstes sollte daher der Einfluss der zirkadianen Uhr auf die Autophagie untersucht werden.

4.2 Die Korrelation der Autophagie und der zirkadianen Uhr in Abhängigkeit vom Zellwachstum

Die ersten Ergebnisse ergaben, dass Substanzen, die ROS- und/ oder Autophagielevel in NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten beeinflussen, teilweise signifikante aber nur schwache Auswirkungen auf die zirkadianen Uhr haben. Da diese Effekte weniger ausgeprägt waren, wurde entschieden, diese Richtung nicht weiter zu verfolgen. Da die Ergebnisse dennoch zeigen, dass Autophagie und der zirkadiane Oszillator in Zusammenhang stehen könnten, wurde stattdessen die umgekehrte Fragestellung adressiert, nämlich ob die zirkadiane Uhr ein Regulator für Autophagie sein könnte.

4.2.1 Ermittlung des Einflusses der Passagenzahl auf die Uhr in immortalisierten murinen Fibroblasten

Kontinuierliches Passagieren treibt kultivierte Zellen in die Seneszenz und beeinflusst deren Metabolismus. Da derartige Veränderungen die Funktionsweise der zirkadianen Uhr beeinflussen könnten, sollte zunächst der Einfluss der Passagenzahl auf die zirkadiane Uhr von kultivierten NIH3T3-Zellen untersucht werden. NIH3T3-*Bmal1*-Luc besitzt ein stabil exprimiertes Luziferase-Gen, welches unter der Kontrolle des zirkadian regulierten *Bmal1*-Promotors steht (Nagoshi, et al. 2004). Durch Echtzeit-Biolumineszenz-Messungen kann man die Rhythmik der endogenen zirkadianen Uhr dieser Zellen analysieren, da die oszillatorische Aktivierung des Luziferase-Gens auch der von *Bmal1* entspricht. Dafür wurden die Mausfibroblasten für 30 Minuten mit dem Glukokortikoid Dexamethason synchronisiert. Dies führt zu einer Neueinstellung der Phase und zu einem gleichmäßigen Oszillieren aller Zellen als Gesamzellkultur (Balsalobre, et al. 1998, Nagoshi, et al. 2004).

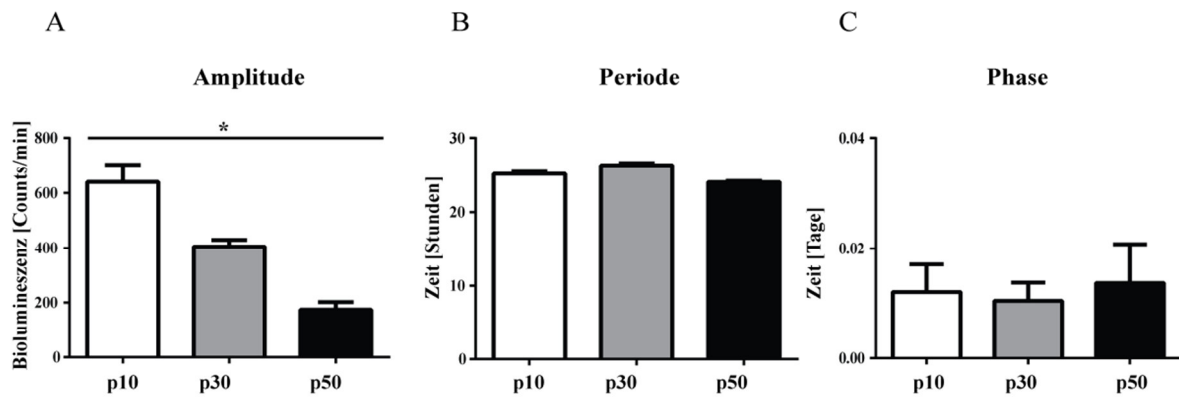


Abbildung 4.5: Echtzeit-Biolumineszenz-Analyse von NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen mit steigenden Passagenzahlen

Die Biolumineszenz (Counts/Minute) von synchronisierten NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen wurde in Echtzeit über 96 Stunden gemessen. Die Mittelwerte der Veränderungen (A) der Amplitude, (B) der Periode und (C) der Phase dreier unabhängiger Replikate (n=3) wurden analysiert. Fehlerbalken stellen SEM dar. * p<0.05 (zweiseitiger T-Test)

Die Analysen in Abbildung 4.5 zeigen, dass mit steigender Passagenzahl (p10 – p50) eine zunehmende Veränderung der Amplitude der zirkadianen Oszillation der NIH3T3-Zellen beobachtet werden konnte. Diese Veränderung wird besonders deutlich im direkten Vergleich von p10 und p50; dort konnte eine signifikante Amplitudenreduktion von ca. 70% (p10: 640 ± 63 Counts/min; p50: 173 ± 29 Counts/min; Abb. 4.5 A) verzeichnet werden. Für die Periodenlänge der Zellen aller Passagen konnte keine signifikante Veränderung beobachtet werden (p10: 25,1 ± 0,3 h; p50: 24,1 ± 0,2 h; Abb. 4.5 B). Auch die Phase der zirkadianen Uhr veränderte sich mit steigenden Passagenzahlen nicht signifikant (p10: 0,3 ± 0,1 h; p50: 0,3 ± 0,2 h; Abb. 4.5 C).

Für alle folgenden Experimente wurden NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen bis p20 kultiviert und experimentell verwendet, da bis zu dieser Passage keine signifikanten Passagen-abhängigen Veränderungen der Uhr beobachtet werden konnten. Mit weiter steigenden Passagenzahlen zeigten die Auswirkungen des Passagierens durch den stetig reduzierten Amplitudenlevel deutlich ihren Einfluss auf die zirkadiane Uhr.

4.2.2 Einfluss von Wachstumsstadium und Zelldichte auf die Expression von Autophagiegene und zirkadianen Genen in murinen Fibroblasten

Sowohl die Autophagie als auch die zirkadiane Uhr werden durch den zellulären Stoffwechsel beeinflusst. Der Metabolismus wiederum wird von der zirkadianen Uhr reguliert und auch Alterungsprozesse wirken sich auf den Stoffwechsel aus. Daher sollte untersucht werden, ob die Autophagie und die zirkadiane Uhr abhängig vom Zellwachstum in Korrelation zueinander stehen. Da die detektierten Effekte auf die Amplitude durch die Behandlung mit den verschiedenen Substanzen, welche auch die Autophagie beeinflussen können, hervorgerufen wurden (vgl. Abb. 4.3), wurden für weitere Experimente unbehandelte NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen verwendet. Diese wurden in unterschiedlichen Zelldichten von logarithmisches Wachstum bis zur stationären Phase (Wachstumsarrest) untersucht und die Proteinlevel von LC3-II (Klionsky, et al. 2012) bestimmt und quantifiziert. Da die Autophagie über verschiedene Signalwege, welche auch von der zirkadianen Uhr reguliert werden, vom Zellwachstum beeinflusst wird, ist eine mögliche Korrelation beider Prozesse nicht auszuschließen.

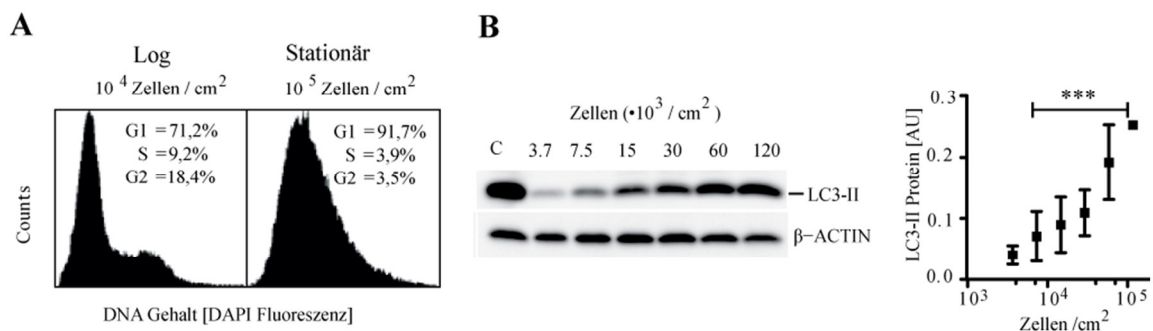


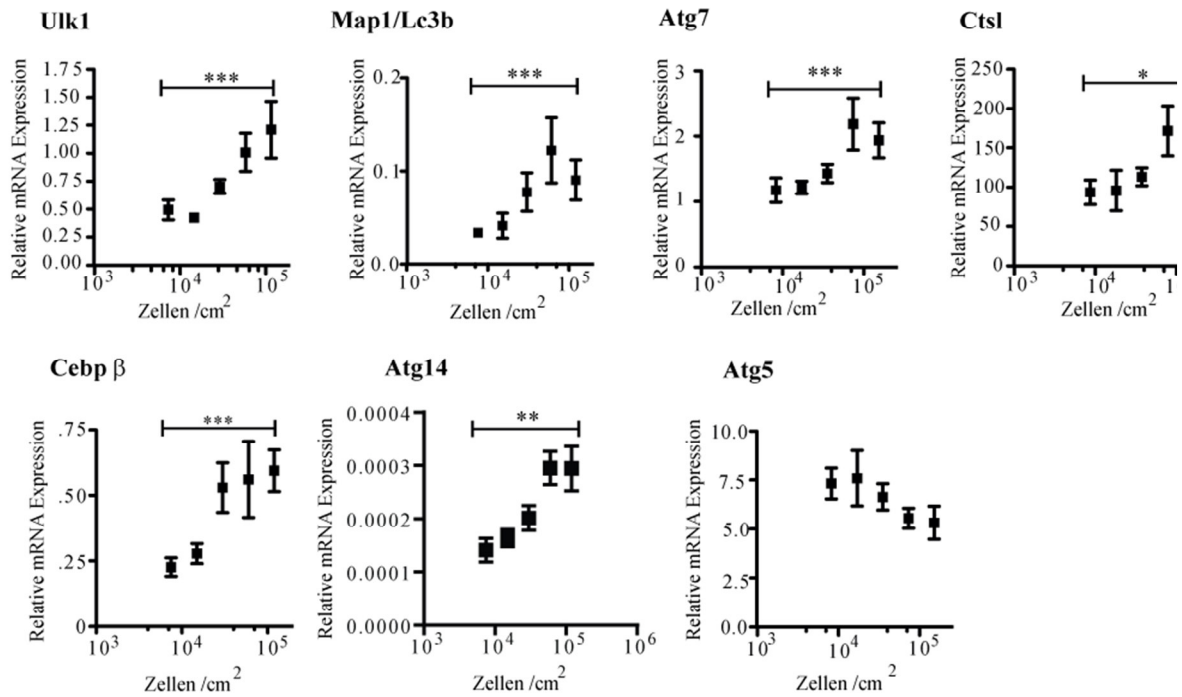
Abbildung 4.6: Durchflusszytometrische Zellzyklusphasenanalyse und Analyse der zellulären LC3-II Level in NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen

(A) Durchflusszytometrische Zellzyklusphasenanalyse NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen und die Darstellung der entsprechenden prozentualen Verteilung des DNA-Gehalts der logarithmisch (links, log; 10^4 Zellen/ cm^2) und stationär (rechts, 10^5 Zellen/ cm^2) gewachsenen Zellen ($n=3$) anhand der DAPI Fluoreszenz. (B) Analyse der zellulären Level von endogenem LC3-II (anti-LC3B Antikörper) in ansteigenden NIH3T3-Zellzahlen durch *Western Blotting* (links) und der Quantifizierung der LC3-II-Proteinlevel anhand der Bandenintensitäten (rechts). Das Protein β -ACTIN (anti- β -ACTIN Antikörper) dient als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung ($n=3$). AU: unskalierte Einheit, C: Kontrolle; Fehlerbalken stellen SEM dar. *** $p < 0,0005$ (zweiseitiger T-Test)

Die durchflusszytometrische Kontrollmessung in Abbildung 4.6 A zeigt, dass sich das logarithmische Zellwachstum ab einer Zelldichte von 10^5 Zellen/ cm^2 deutlich reduzierte. Dafür wurden Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI inkubiert, welcher an AT-reiche Regionen in der DNA bindet, mittels FACS-Messung prozentual ihrer Verteilung des DNA-Gehalts sortiert und in die Zellzyklusphasen unterteilt. Im Vergleich zu den logarithmisch wachsenden Zellen (10^4 Zellen/ cm^2) zeigte fast die gesamte Fibroblastenkultur einen Wachstumsarrest in der G0/G1-Phase auf (10^4 Zellen/ cm^2 : 71,2%; 10^5 Zellen/ cm^2 : 91,7%; Abb. 4.6 A).

Autophagielevel wurden bestimmt, indem die lipidierte Form von LC3-II gemessen und relativ zu den Leveln des Kontrollproteins β -Aktin quantifiziert wurde. LC3-II zeigte bei Übergang der Kultur von logarithmischem Wachstum ($3,7 * 10^3$ Zellen/ cm^2) zu Konfluenz ($120 * 10^3$ Zellen/ cm^2) einen parallel zur Zelldichte verlaufenden, signifikanten Anstieg seiner Proteinlevel (Abb. 4.6 B).

A



B

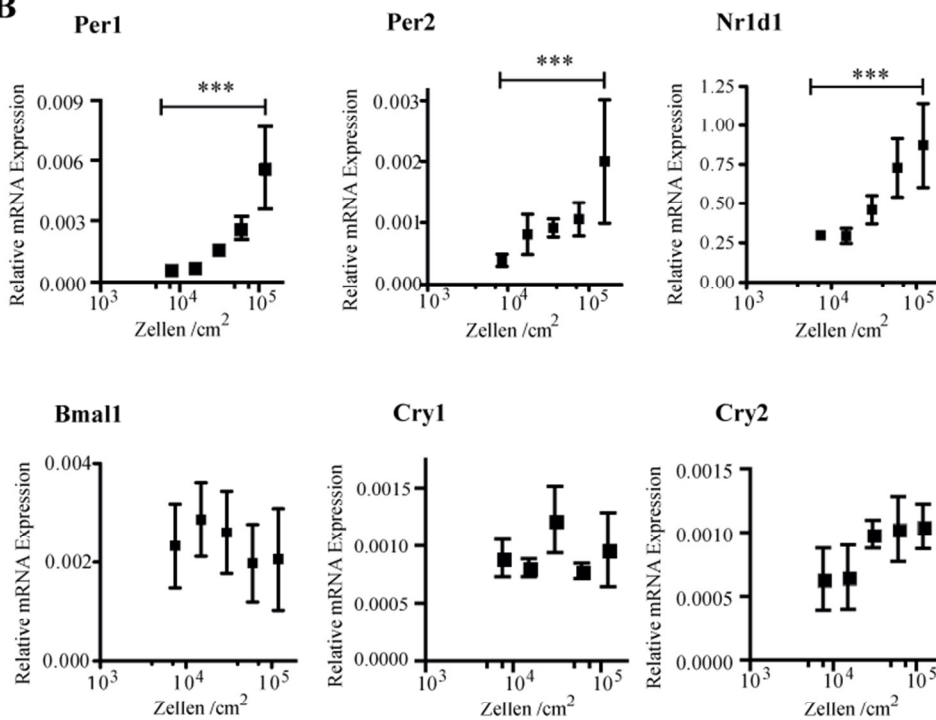


Abbildung 4.7: mRNA Expression von Autophagie- und Uhrgenen in Abhängigkeit vom Zellwachstum

Analyse der mRNA-Expression der Autophagiegene (A) *Ulk1*, *Map1/Lc3b*, *Atg7*, *Ctstl*, *Cebpβ*, *Atg14* und *Atg5* sowie der zirkadianen Uhrgene (B) *Per1*, *Per2*, *Nr1d1*, *Bmal1*, *Cry1* und *Cry2* in unterschiedlichen NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zelldichten (n=3), normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -*Aktin* und *Gapdh*. Fehlerbalken stellen SEM dar. * p<0,05; ** p<0,005; *** p<0,0005 (zweiseitiger T-Test)

Mit dem Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase konnte neben dem Anstieg der LC3-II Proteinlevel auch eine signifikante Hochregulation verschiedener Autophagiegene beobachtet werden (Abb. 4.7). Sowohl Gene der Autophagie-Initiation, wie *Ulk1*, als auch Gene, die bei der Autophagosomformation (*Atg14*), der Autophagosomexpansion (*Map1/Lc3b* und *Atg7*) und dem Degradationsprozess (*Ctsl*) beteiligt sind, weisen einen signifikanten Expressionsanstieg mit zunehmender Zellzahl auf (Abb. 4.7 A). Jedoch zeigten nicht alle gemessenen Autophagiegene einen Anstieg in ihren Expressionsleveln. Bei allen untersuchten Zelldichten zeigte *Atg5*, ein Faktor bei der Autophagosomexpansion, keinen Anstieg in seinem Expressionslevel. Zusätzlich wurde die Expression von *Cebpβ* gemessen. Auch hier konnte eine Wachstumsarrest-assoziierte Hochregulation beobachtet werden (Abb. 4.7 A). Der Transkriptionsfaktor *Cebpβ* wird in der Leber für die zirkadiane Regulation der Autophagie Genexpression benötigt (Ma et al. 2011) und stellt somit in der Leber eine Verbindung zwischen der zirkadianen Uhr und der Autophagie dar.

Um eine potentielle Korrelation zwischen Autophagie und der zirkadianen Uhr in Abhängigkeit vom Zellwachstum zu untersuchen, wurde in den gleichen Zellen die mRNA Expression der zentralen Uhr gene gemessen. Die mRNA Level einiger Uhr gene des negativen Armes der Rückkopplungsschleife, wie *Per1*, *Per2* und *Nr1d1*, waren beim Übergang in den zellulären Wachstumsarrest signifikant erhöht. Die Expression anderer Gene, wie *Bmall*, *Cry1* und *Cry2*, zeigten keine signifikanten Änderungen auf (Abb. 4.7 B). Dies lässt darauf schließen, dass die gemessenen erhöhten mRNA Level der zirkadianen Uhr gene und Autophagiegene spezifisch und kein unspezifisches Resultat des Übergangs von logarithmischem Wachstum in den Wachstumsarrest darstellen. Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse, dass die Autophagie und die zirkadiane Uhr abhängig vom Zellwachstum in Korrelation zueinander stehen.

4.2.3 UV-Strahlung hat in murinen Fibroblasten einen quantitativen Einfluss auf die Autophagie

UVA-Strahlung beeinflusst Fibroblasten und greift in die Hautalterung ein (Naru et al. 2009). Da sowohl die autophagischen Prozesse als auch der zirkadiane Oszillator in murinen Fibroblasten abhängig vom Zellwachstum in Korrelation zueinander stehen, wurde als nächstes untersucht, ob diese Korrelation beider Mechanismen auch nach UV-Behandlung gegeben ist.

Dafür wurden die Zellen erneut, sowohl im logarithmischen als auch im stationärem Wachstum befindlich, UV-bestrahlt und der LC3-II Proteinlevel sowie die mRNA Expression ausgewählter Autophagiegene gemessen (Abb. 4.8).

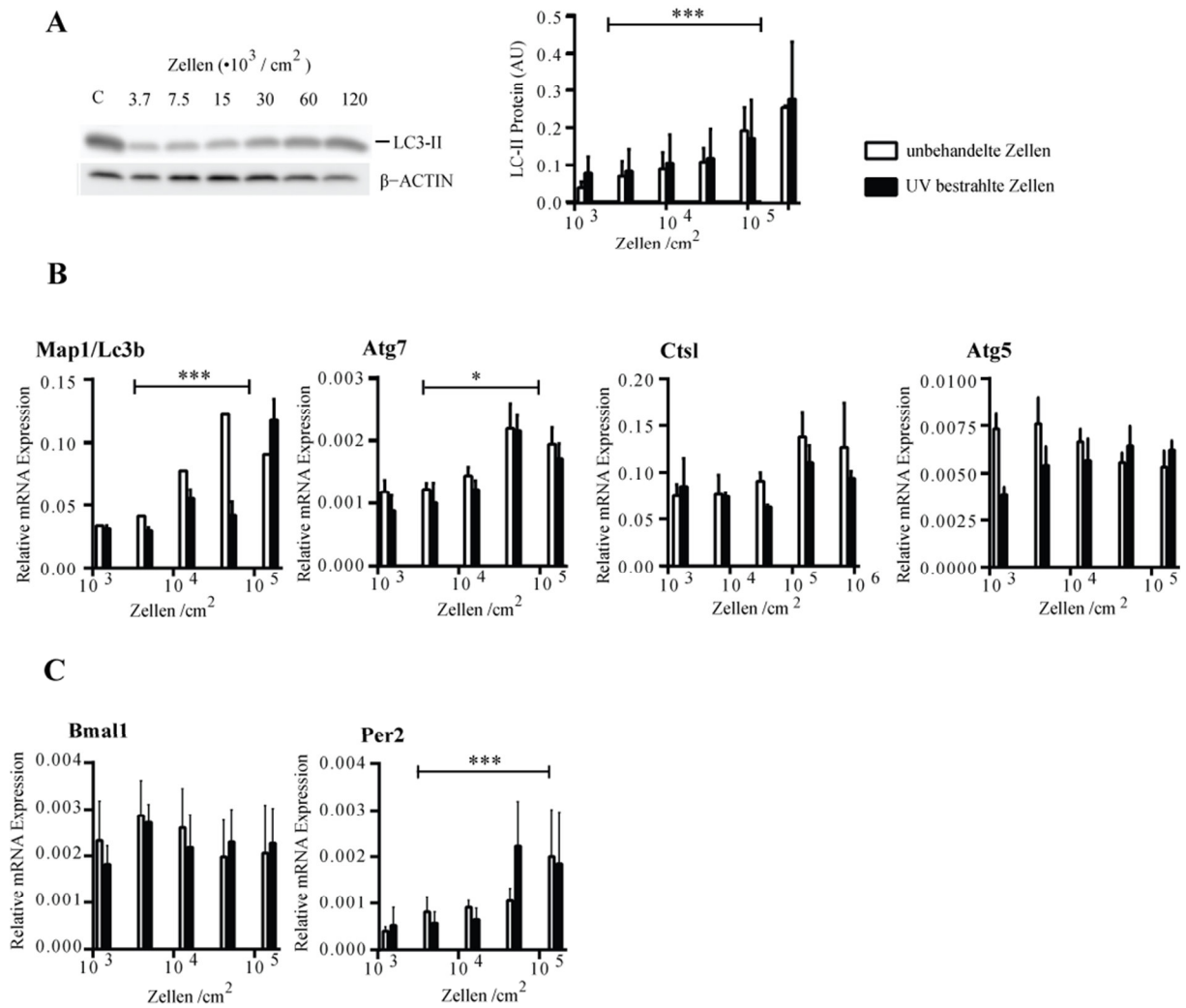


Abbildung 4.8: Analyse der zellulären LC3-II Level und mRNA Expression von Autophagie- und Uhr genes in Abhängigkeit vom Zellwachstum nach UV-Bestrahlung

(A) Analyse der zellulären Level von endogenem LC3-II in unterschiedlichen NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zelldichten (links) und Quantifizierung der LC3-II-Proteinlevel anhand der Bandenintensitäten (rechts) nach UV-Bestrahlung. Das Protein β -ACTIN dient als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung (n=3). (B) Analyse der mRNA-Expression der Autophagiegene *Map1/Lc3b*, *Atg7*, *Ctst1*, und *Atg5* sowie der Uhr genes (C) *Bmal1* und *Per2* in unterschiedlichen NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zelldichten (n=3), normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. AU: unskalierte Einheit, C: Kontrolle; Fehlerbalken stellen SEM dar. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$ (zweiseitiger T-Test)

Auch nach der UV-Bestrahlung von NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen wurde LC3-II auf Proteinebene gemessen und quantifiziert. Die Quantifizierung von LC3-II zeigte erneut einen signifikanten Anstieg der Autophagielevel von logarithmisch in stationär übergehende Zellen, jedoch verlief dieser weniger stark ansteigend (Abb. 4.8 A). Zusätzlich zeigt die Analyse der mRNA Expressionen, dass die Gene, die in der frühen Phase der Autophagie, z.B. in der Autophagosomexpansion (*Map1/Lc3b* und *Atg7*), involviert sind, von der logarithmischen zur

stationären Wachstumsphase einen signifikanten Expressionsanstieg aufweisen. Gene, welche später im Autophagieprozess an Bedeutung gewinnen, solche die z.B. dem Degradationsprozess (*Ctsl*) zugeordnet sind, zeigen mit zunehmender Zellzahl keinen Anstieg in ihren Expressionsmuster (Abb. 4.8 B). Auch Gene, die zuvor keinen signifikanten Expressionsanstieg zeigten (*Atg5*), blieben bezüglich ihrer Expression unter UV-Einfluss unverändert. Zudem wurde in den gleichen Zellen die mRNA Expression der zentralen Uhr gene gemessen. Die mRNA Level von *Per2* waren beim Übergang in den zellulären Wachstumsarrest signifikant erhöht während die Expressionslevel von *Bmal1* keine signifikanten Änderungen aufzeigten (Abb. 4.8 C). Somit zeigt sich, dass UV-Bestrahlung die Autophagie quantitativ beeinflussen kann, die gleichzeitige Hochregulierung von Autophagiegenen und Uhr genen beim Übergang in die stationäre Phase bleibt bestehen.

4.3 Die Regulation der Autophagielevel durch den zirkadianen Oszillator in murinen Fibroblasten

4.3.1 In murinen Fibroblasten unterliegt die Autophagie der zirkadianen Kontrolle

Die vorangegangenen Experimente konnten zeigen, dass eine zusammenhängende Regulierung der zirkadianen Uhr und der Autophagie besteht. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt durch eine direkte Regulation der Autophagie durch die zirkadiane Uhr in Fibroblasten hervorgerufen wird, wurden im nächsten Schritt die Autophagielevel in konfluenten, zuvor mit Dexamethason synchronisierten, NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten bestimmt.

Die Analyse zeigt, dass neben der rhythmischen Expression der durch den *Bmal1*-Promotor getriebenen Luziferase, auch die Proteinlevel von LC3-II oszillatorische Muster mit einer Periodenlänge von etwa 24 Stunden aufweisen (Abb. 4.9 A); diese sind in Phase mit dem zirkadianen mRNA-Expressionsmuster des Uhr gens *Per2* des negativen Armes der Rückkopplungsschleife (Hochpunkt bei 26 Stunden und Tiefpunkt bei 38 Stunden), und

antiphasisch zu endogenem *Bmal1* (Hochpunkt bei 38 Stunden und Tiefpunkt bei 26 Stunden) (Abb. 4.9 B).

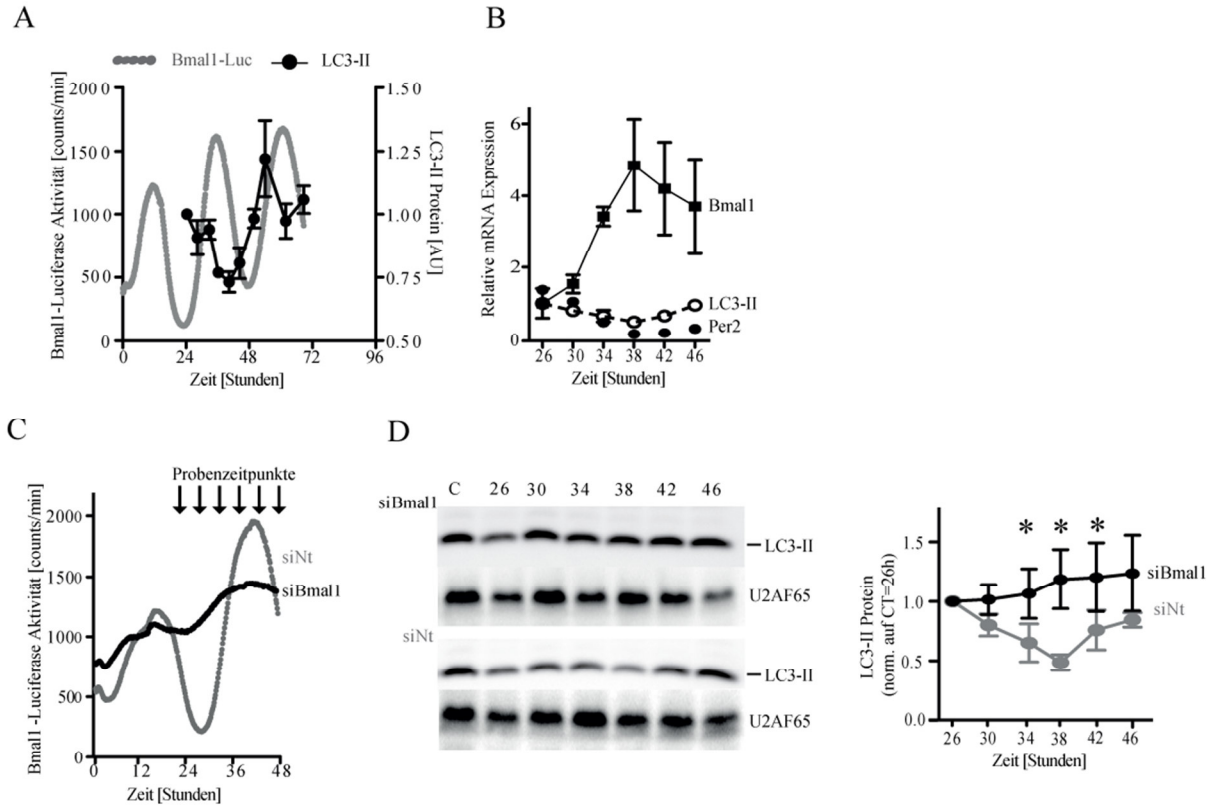


Abbildung 4.9: Die zirkadianen LC3-II-Proteinlevel und der Einfluss eines siRNA-vermittelten *Bmal1* Knock-downs auf die Autophagie

Stationär kultivierte NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen ($> 10^5$ Zellen/ cm^2) wurden an Zeitpunkt = 0 synchronisiert. (A) Die *Bmal1* Reporter-gen-Aktivität (graue Symbole) wurde in Echtzeit über 72 Stunden gemessen, überlagert von den zirkadianen Oszillationen auf der LC3-II-Proteinebene (schwarze Symbole, $n=4$). (B) Analyse der mRNA Expression der zirkadianen Uhr gene *Bmal1* (Vierecke) und *Per2* (gefüllte Kreise) sowie des oszillierenden LC3-II Proteinlevels (offene Kreise) ($n=3$; Daten normiert auf die Mittelwerte bei 26 Std.). (C-D) Die Zellen wurden mit einer *Bmal1*-spezifischen siRNA (schwarz, *siBmal1*) oder einer äquivalenten Konzentration *non-targeting*-siRNA (grau, *siNt*) transfiziert und anschließend synchronisiert (Zeitpunkt = 0 Std.). (C) Die zirkadiane Luciferase-Aktivität des *Bmal1*-Reporterkonstrukts nach Transfektion der NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen mit siRNA gegen *Bmal1* (schwarz) oder *non-targeting*-siRNA (grau). (D) Analyse der LC3-II Proteinlevel nach Transfektion der NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen mit siRNA gegen *Bmal1* oder siNt (links) und das zirkadiane Oszillationsmuster der LC3-II-Proteinlevel nach *Knock-down* von *Bmal1* (rechts, *siBmal1* schwarz; siNt grau; $n=6$), Lc3-II wurde quantifiziert und normalisiert auf die Mittelwerte bei 26 Std. Das Protein U2AF65 dient zur Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung. Alle Daten werden als Mittelwert \pm SEM angegeben, * $p < 0,05$ (zwischen *siBmal1* & siNt) (zweiseitiger T-Test).

Anschließend wurde *Bmall*, ein Mitglied des positiv regulierenden Arms der zirkadianen Rückkopplungsschleife, durch siRNA in diesen Zellen herunterreguliert. Als Negativkontrolle wurde eine *non-targeting*-siRNA, die an keine bekannten murinen Genprodukte binden kann, verwendet. Durch den siRNA-vermittelten *Bmall Knock-down* sollte auch die rhythmische Aktivität der endogenen zirkadianen Uhr dieser Zellen, im Vergleich zu den *non-targeting*-siRNA behandelten Zellen, bei Echtzeit-Biolumineszenz-Analysen veränderte Muster aufweisen.

Wie erwartet, zeigten die NIH3T3-*Bmall*-Luc-Fibroblasten nach dem *Knock-down* mit einer *Bmall*-spezifischen siRNA ein arrhythmisches Oszillationsmuster (Abb. 4.9 C). Die Proben wurden zu den gekennzeichneten Zeitpunkten (Abb. 4.9 C Pfeile) während eines Zeitraums von 24 Stunden alle vier Stunden gesammelt, um die Proteinmengen von LC3-II nach dem *siBmall Knock-down* oder dem *siNt Kontroll-Knock-down* in einem vollständigen zirkadianen Zyklus ermitteln zu können. Das Protein U2AF65 diente als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung (Abb. 4.9 D). Durch den *Knock-down* von *Bmall*, oszillieren auch die LC3-II Proteinlevel nicht mehr (Abb. 4.9 B, vgl. mit Abb. 4.9 D), was darauf hinweist, dass die zelluläre zirkadiane Uhr rhythmische Oszillationen der Autophagie in Säugetierfibroblasten beeinflussen kann.

Um abzuklären, ob die Expressionslevel der Autophagiegene die rhythmischen LC3-II Proteinlevel widerspiegeln, wurden im nächsten Schritt die zirkadianen mRNA Expressionsmuster von Autophagie assoziierten Genen in konfluenten, synchronisierten NIH3T3-*Bmall*-Luc-Fibroblasten untersucht. Im Gegensatz zu dem oszillierenden LC3-II Proteinlevel erwiesen sich die mRNA Expressionsniveaus von *Map1/Lc3b*, *Cebp β* , *Ulk1* und einer Anzahl von weiteren wichtigen Genen, welche im Autophagieprozess involviert sind (*Atg5*, *Atg7*, *Atg14*, *Atg16L1* und *Ctsl*), als nicht rhythmisch (Abb. 4.10 A).

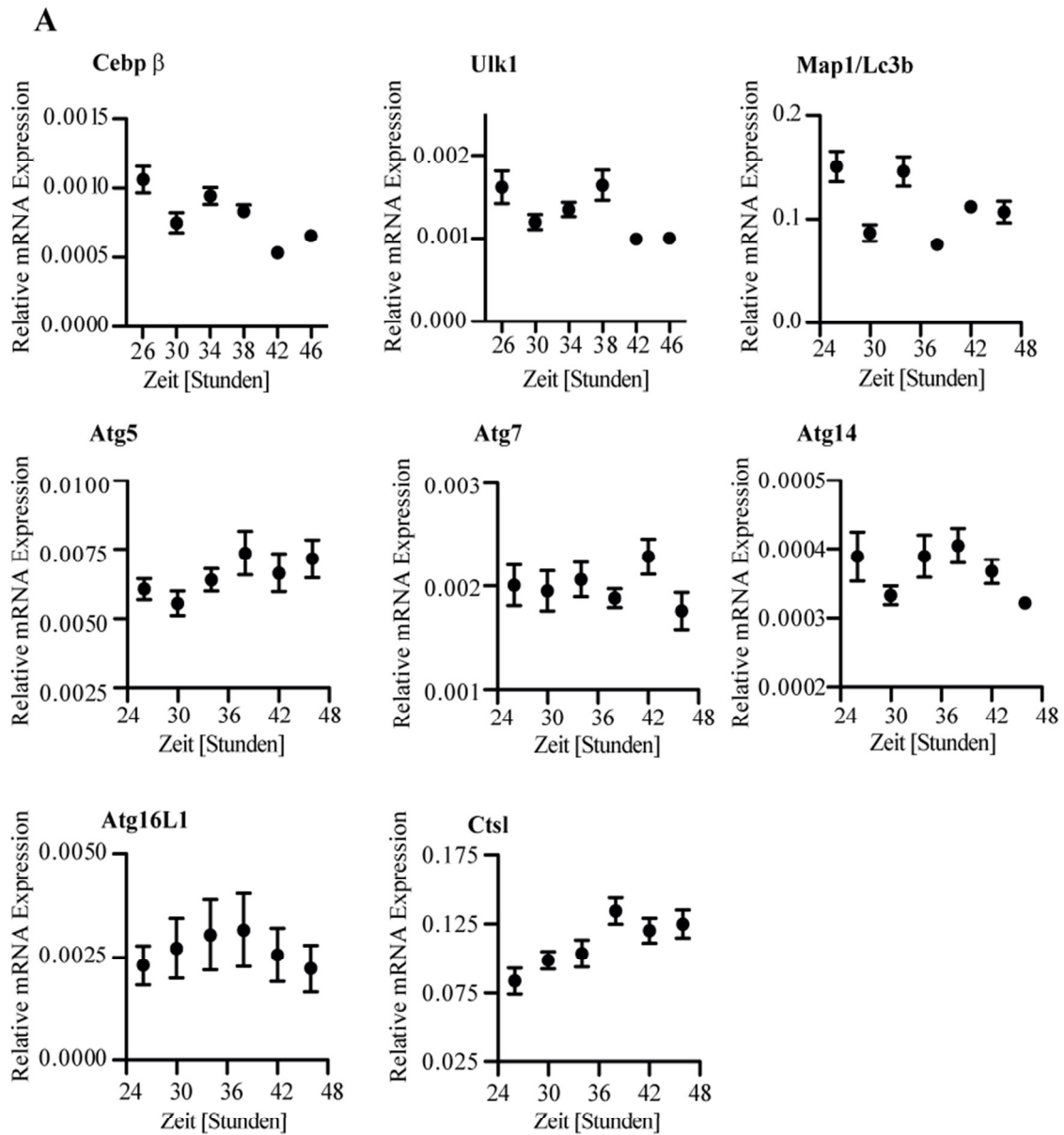


Abbildung 4.10: Zirkadiane Expressionsmuster von Autophagiegene

Stationär kultivierte NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen ($> 10^5$ Zellen/ cm^2) wurden an Zeitpunkt = 0 Std. synchronisiert. (A) Analyse der mRNA-Expression der Autophagiegene *Cebpβ*, *Ulk1* und *Map1/Lc3b* (obere Reihe), *Atg5*, *Atg7* und *Atg14* (mittlere Reihe), *Atg16L1* und *Ctst1* (untere Reihe) in NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen (n=3), normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. Daten angegeben als Mittelwerte \pm SEM.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in murinen Fibroblasten der molekulare zirkadiane Oszillator die rhythmischen Autophagielevel beeinflusst und dass diese Regulation wahrscheinlich eher auf einem posttranskriptionalen /-translationalen Mechanismus als auf einem transkriptionalen Vorgang beruht.

4.3.2 Die Expressionslevel der Uhrgene reduzieren die Autophagielevel auf Proteinebene

Weitere Untersuchungen sollten klären, ob sowohl die rhythmischen als auch die absoluten Autophagielevel durch genetische *Knock-downs* gegen Uhrgene beeinflusst werden können. Zu diesem Zweck wurden *Per2*, *Bmal1* und *Nr1d1* in NIH3T3-Fibroblasten durch spezifische siRNA (siehe Tabelle 2.3) herunterreguliert und die Auswirkungen auf die Gen- und Proteinexpression von Autophagiefaktoren bestimmt. Auch *Cebpβ* wurde, wegen seiner Rolle bei der Regulation der Autophagie in Leber (Ma, et al. 2011), in diese Analyse einbezogen.

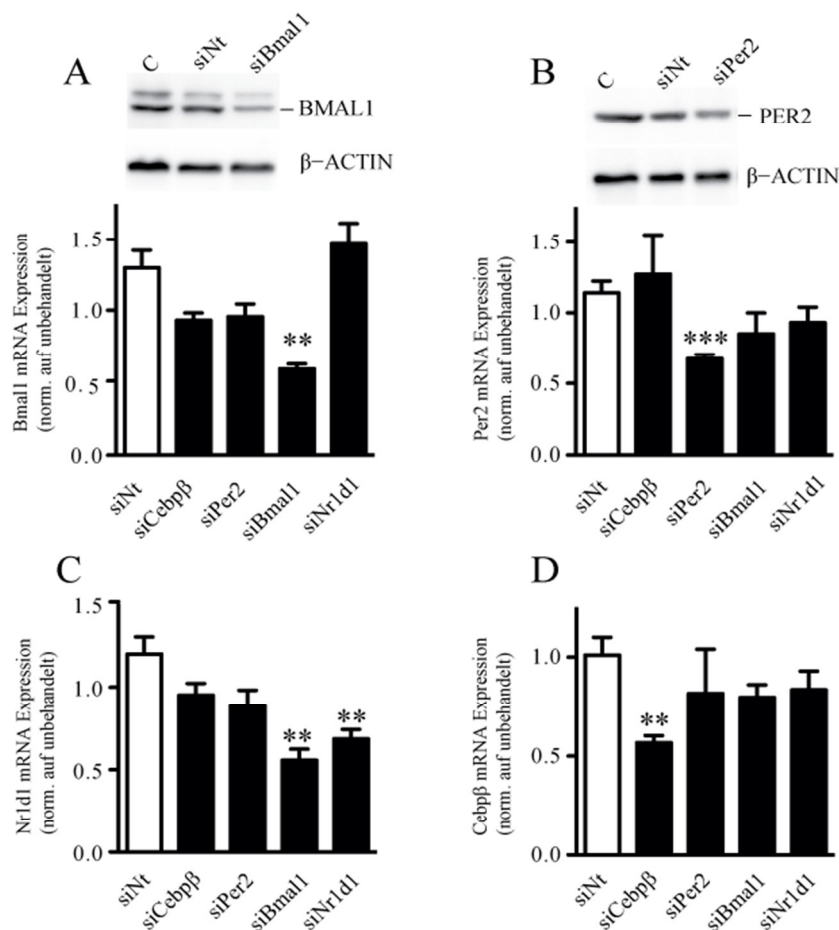


Abbildung 4.11: Einfluss der *Knock-downs* auf die Expression von Uhrgenen und *Cebpβ*.

NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen (10^4 Zellen) wurden mit 30 nM *siCebpβ*, 20nM *siPer2*, 25nM *siBmal1* oder 30nM *siNr1d1* oder der jeweils äquivalenten siNt Konzentration behandelt, 72 Std. inkubiert und Protein bzw. RNA Extrakte isoliert (n=4). (A) Analyse der BMAL1 Proteinlevel nach Transfektion der NIH3T3-Zellen mit siRNA gegen *Bmal1* (oben) und RT-PCR Analyse nach *Knock-down* von *Bmal1* (unten). (B) Gleiches wie in (A) für PER2 Protein (oben) und *Per2* mRNA Level (unten). (C) Analyse der mRNA Expression des zirkadianen Uhrgens *Nr1d1*. (D) *Cebpβ* mRNA Expressionslevel. Daten werden als Mittelwert \pm SEM angegeben, ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ (zweiseitiger T-Test).

Alle Zielgene konnten mit der spezifischen siRNA um ca. 40% herunterreguliert werden (Abb. 4.11 A-D). Deutlich zu beobachten ist auch der signifikant reduzierte LC3-II Proteinlevel nach dem *Knock-down* von *Per2* und *Nr1d1* (Reduktion um 40-50%, Abb. 4.12 A) während *Bmall* keine reduzierten LC3-II Proteinlevel aufwies (Abb. 4.12 A). Auch die ULK1 Proteinmengen waren nach dem *Per2* und dem *Nr1d1 Knock-down* verringert (40 bzw. 65% Reduktion, vgl. Abb. 4.12 B). Eine Herunterregulierung von *Bmall* durch siRNA zeigte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinmengen von ULK1. Weiterhin konnten bei keinem der *Knock-downs* wesentliche Veränderungen bei den *Ulk1* mRNA Expressionsleveln beobachtet werden (Abb. 4.12 C).

Zudem wurde durch den *Knock-down* von *Cebp β* die Autophagie maßgeblich reduziert (Abb. 4.12 A), dies weist erneut auf die funktionale Bedeutung dieses Gens bei der Regulierung der Autophagie in murinen Fibroblasten hin. Wichtig ist jedoch, dass der *Knock-down* von *Per2*, *Bmall* oder *Nr1d1* nicht die Expressionslevel von *Cebp β* mindert (Abb. 4.11 D) und *Cebp β* im umgekehrten Fall die mRNA Level der zirkadianen Gene auch nicht verringert (Abb. 4.11 A-C). Des Weiteren wurden die Proteinlevel von p62, einem Protein welches man zur Bestimmung des autophagischen Flux verwenden kann (Bjorkoy et al. 2009), bestimmt. Während die p62 Proteinlevel nach dem *Knock-down* von *Per2* leicht erhöht waren, zeigte sich nach dem *Knock-down* von *Bmall* eine signifikante Reduktion. Somit zeigt sich, dass der *Knock-down* von spezifischen Uhrgenen die absoluten Autophagielevel reduziert und der molekulare zirkadiane Oszillator die Autophagie regulieren kann.

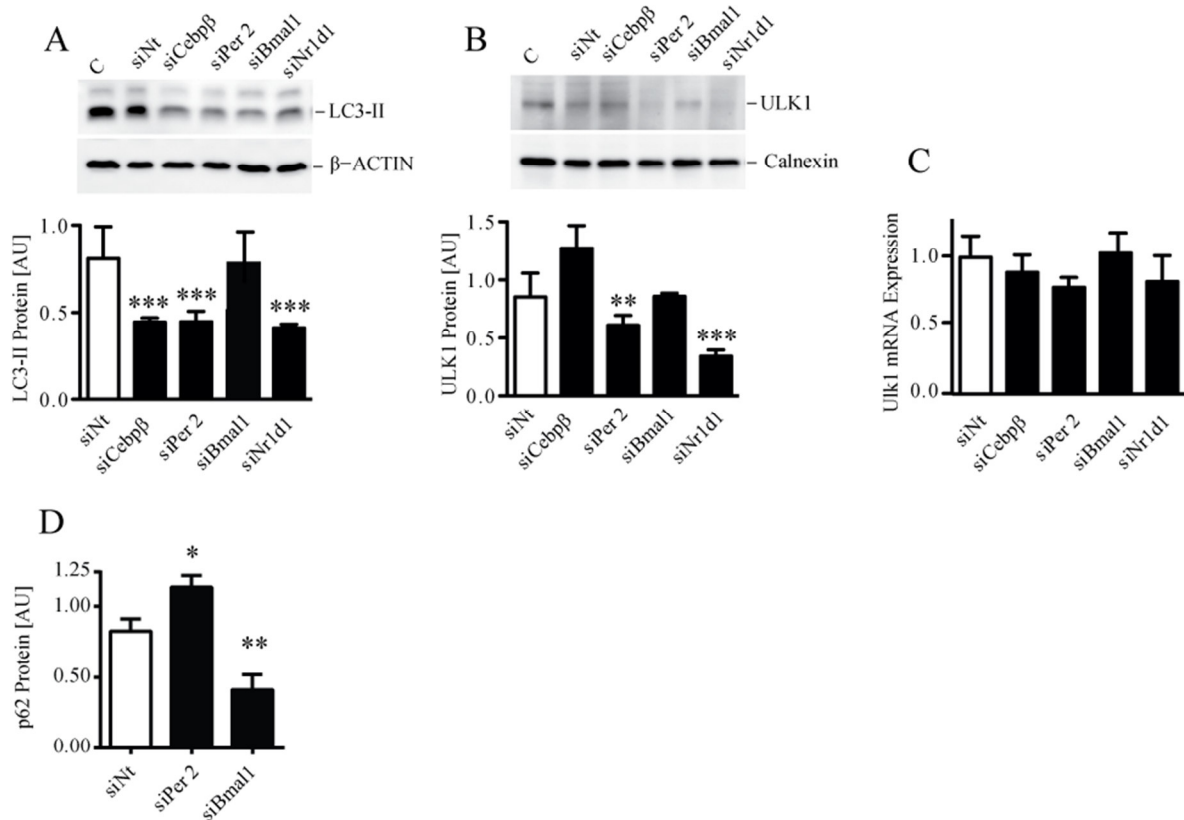


Abbildung 4.12: Einfluss der *Knock-downs* der Uhr gene auf die Autophagie

NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen (10^4 Zellen) wurden mit 30 nM *siCebpb β* , 20nM *siPer2*, 25nM *siBmal1* oder 30nM *siNr1d1* oder der jeweils äquivalenten siNt Konzentration behandelt, 72 Std. inkubiert und Protein bzw. RNA Extrakte isoliert (n=4). (A) Analyse der LC3-II Proteinlevel nach Transfektion der NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen mit den angegebenen siRNAs (oben) und Quantifizierung des Western Blots, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (unten). (B) Gleiches wie in (A) für ULK1 Protein (oben) und Quantifizierung, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle (unten). Die Proteine β -ACTIN und Calnexin dienen als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung. (C) Analyse der *Ulk1* mRNA Expressionslevel (D) Analyse der p62 Proteinlevel nach Transfektion der NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen mit den angegebenen siRNAs. C: unbehandelte Kontrolle; Daten werden als Mittelwert \pm SEM angegeben, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ (zweiseitiger T-Test).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden neben den Proteinleveln von LC3-II und ULK1 die Genexpressionslevel einiger Autophagiegene bestimmt. Dabei zeigte sich, dass der *Knock-down* von *Bmal1*, welcher im Gegensatz zu *Per2* und *Nr1d1* keinen reduzierenden Effekt auf die ULK1 Proteinlevel hatte, die Autophagie möglicherweise durch einen anderen Mechanismus regulieren könnte. Erste Anzeichen dafür finden sich in signifikant gestiegenen Expressionsleveln von *Ctsl* und *Irgm1*. Beides sind Gene, welche mit Autophagie assoziiert werden und welche nur bei dem spezifischen *Knock-down* von *Bmal1* hochreguliert werden

(Abb. 4.13 A und B). Bei weiteren, mit der Autophagie assoziierten Genen wie *Zkscan3*, einem transkriptionalem Repressor der Autophagie, oder *Tfeb*, zeigten die spezifischen *Knock-downs* keine Auswirkungen (Abb. 4.13 C und D).

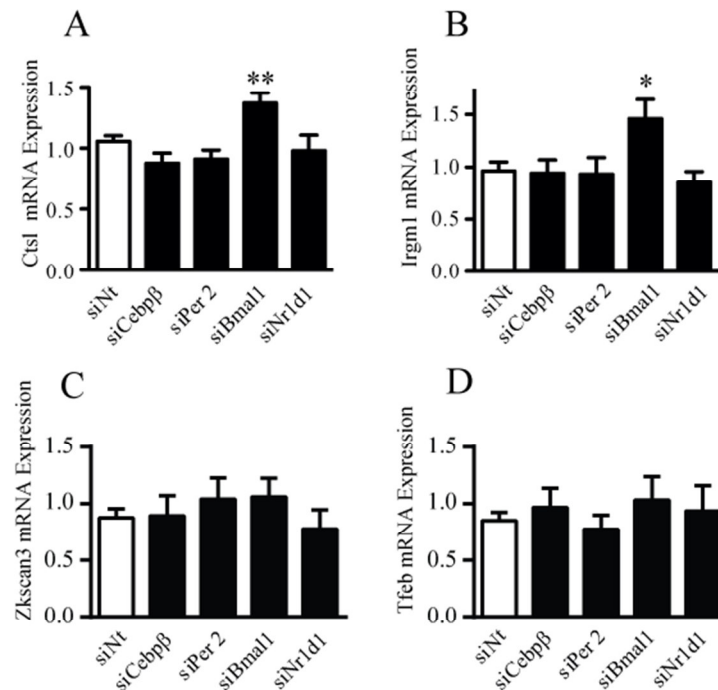


Abbildung 4.13: Expressionsmuster von Autophagie assoziierten Genen nach spezifischen *Knock-downs*

NIH3T3-*Bmall*-Luc-Zellen (10^4 Zellen) wurden mit 30 nM *siCebpb*, 20nM *siPer2*, 25nM *siBmall* oder 30nM *siNr1d1* oder der jeweils äquivalenten *siNt* Konzentration behandelt, 72 Std. inkubiert und RNA Extrakte isoliert (n=4). (A) Analyse der mRNA Expression von *Ctst*. (B) *Irgm1*, (C) *Zkscan3* und (D) *Tfeb* normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. Daten werden als Mittelwert \pm SEM gegeben, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ (zweiseitiger T-Test).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass spezifische genetische *Knock-downs* gegen die Uhr gene, die absoluten Autophagielevel, auch unabhängig von *Cebpb*, beeinflussen können. Zudem bieten sie auch eine erste mechanistische Grundlage um Genexpressionslevel und Autophagielevel in Zusammenhang zu bringen.

4.4 Cryptochrome-Knockout Zellen weisen erhöhte Autophagielevel auf

Um die bisherigen Ergebnisse eines regulierenden Einflusses der zirkadianen Uhr auf die Autophagie in Fibroblasten zu bestätigen, wurde im Folgenden der Effekt des zirkadianen Oszillators auf die Autophagie in *Cry1/2*-defizienten embryonalen Mausfibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) untersucht. Übereinstimmend mit bereits publizierten Daten (Ishida, et al. 2001), führt das Fehlen von sowohl *Cry1* als auch *Cry2* zu einem Verlust der zirkadianen Genexpression in den stationär gewachsenen und zuvor synchronisierten Fibroblasten (Abb. 4.14 A) und zu konstant erhöhten Expressionsniveaus von *Per1*, *Per2* und *Nr1d1*. Während *Per1* ein zweifach bzw. *Nr1d1* ein dreifach erhöhtes mRNA Level aufwies, zeigte *Per2* einen 20fachen Anstieg in seinen Expressionsleveln. Im Gegensatz dazu waren die mRNA Level von *Bmal1* im Vergleich zu Wildtyp (WT) Zellen signifikant reduziert (Abb. 4.14 B und C).

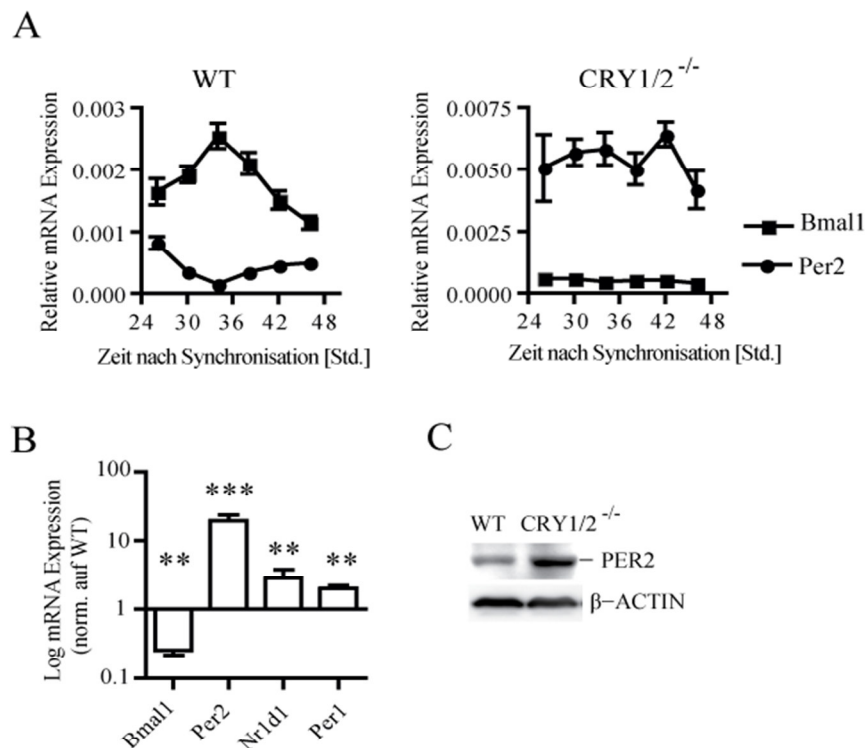


Abbildung 4.14: Zirkadiane Expression von Uhrgenen in Wildtyp und *Cry1/2*^{-/-} MEFs

WT und *Cry1/2*^{-/-} MEFs (> 10⁵ Zellen/ cm²) wurden stationär kultiviert. (A) Analyse der zirkadianen mRNA-Expression von *Bmal1* (Vierecke) und *Per2* (Kreise) (n=4) und die (B) Quantifizierung der mRNA Level der *Cry1/2*^{-/-} MEFs von *Bmal1*, *Per2*, *Nr1d1* und *Per1*, normalisiert auf die entsprechenden Werte der jeweiligen WT MEFs (n=6), alle Expressionsdaten normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. (C) Western Blot Analyse der PER2-Proteinlevel in WT und CRY1/2^{-/-} MEFs, β -ACTIN dient als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung. Daten angegeben als Mittelwerte \pm SEM, ** p<0,005; *** p<0,0005 (zweiseitiger T-Test).

Es ist experimentell möglich, die Autolysosombildung mittels diverser Substanzen, wie z.B. Chloroquin oder Bafilomycin A, zu inhibieren. Die Substanzen akkumulieren in den Lysosomen, inhibieren die lysosomale H⁺-ATPase und verhindern somit schlussendlich die Ansäuerung des Lysosoms. Der Flux von Autophagosomen bis zur Fusionierung mit dem Lysosom stoppt und die Autophagosomen akkumulieren in der Zelle. Dies bietet die Möglichkeit anhand des Markers MAP1/LC3 neben den statischen autophagischen Leveln auch den autophagischen Flux zu bestimmen.

In den *Cry1/2*^{-/-} Zellen sind neben den zirkadianen Expressionsmustern von *Per1*, *Per2* und *Nr1d1* zusätzlich sowohl die Autophagielevel zweifach erhöht als auch der autophagische Flux, gemessen mit Bafilomycin A als auch mit Chloroquin, signifikant angestiegen (Abb. 4.15 A). Die beobachteten Effekte auf dem Autophagielevel als auch auf dem autophagischen Flux spiegeln sich wiederum nicht in einem Anstieg der mRNA Expressionsrate von *Map1/Lc3b* wieder (Abb. 4.15 B). Zusätzlich wurden die Expressionslevel weiterer, für die Autophagie relevanter, Gene gemessen.

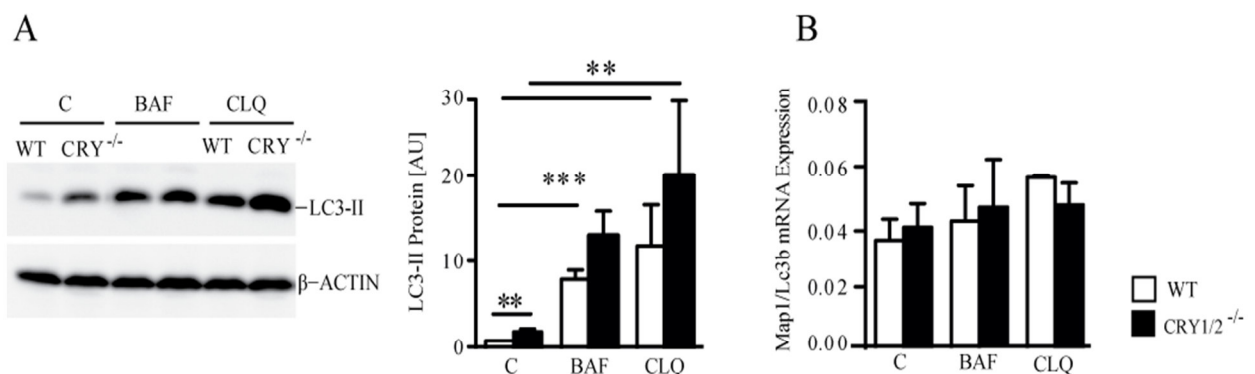


Abbildung 4.15: Einfluss des *Cry1/2*^{-/-} Knockouts auf die Autophagielevel

Wildtyp (WT) und *Cry1/2*^{-/-} MEFs (> 10⁵ Zellen/ cm²) wurden stationär kultiviert. (A) Western Blot Analyse (links) und Quantifizierung (rechts) der LC3-II Proteinlevel in WT und *Cry1/2*^{-/-} MEFs, in Abwesenheit (C=Kontrolle) oder Anwesenheit von Bafilomycin A (BAF, 10 nM, 3 Std.) oder Chloroquin (CLQ, 50 µM, 3 Std.), β-ACTIN dient als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung (n=4). (B) Analyse der zirkadianen mRNA-Expressionslevel von *Map1/Lc3b* (n=5) normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, *β-Aktin* und *Gapdh*. AU: unskalierte Einheit, Daten angegeben als Mittelwerte ± SEM; ** p<0,005; *** p<0,0005 (zweiseitiger T-Test).

Die beobachteten Anstiege der Autophagielevel und des Flux bei den *Cry1/2*^{-/-} Zellen gehen mit signifikant erhöhten Expressionsniveaus einiger Autophagie assoziierter Gene (*Ctsl*, *Irgm1*, *Ulk1* und *Cebpβ*) einher (Abb. 4.16 A). Auf andere Autophagiegene, wie *Atg7*, *Atg14*, *Atg16L1* und *Atg5*, hatte der *Cry1/2*-Knockout keine Auswirkungen bezüglich ihrer mRNA Expressionslevel (Abb. 4.16 A).

Dieses, bisher in den NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten nicht beobachtete Phänomen, deutet darauf hin, dass in den *Cry1/2*^{-/-} Fibroblasten auch transkriptionale Mechanismen die Autophagie regulieren könnten.

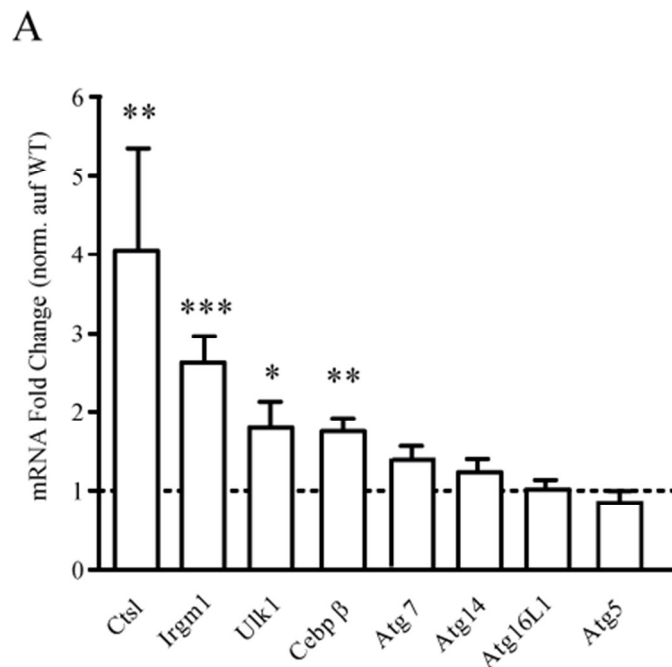


Abbildung 4.16: Einfluss des *Cry1/2*-Knockouts auf die Expression von Autophagie assoziierten Genen

Wildtyp (WT) und *Cry1/2*^{-/-} MEFs (> 10⁵ Zellen/ cm²) wurden stationär kultiviert und RNA Extrakte isoliert. (A) Analyse der mRNA-Expressionslevel der dargestellten Gene in *Cry1/2*^{-/-} MEFs (n=6) normalisiert auf die entsprechenden Werte der jeweiligen WT MEFs (gepunktete Linie), alle Daten normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. Daten angegeben als Mittelwerte \pm SEM, * p<0,05; ** p<0,005; *** p<0,0005 (zweiseitiger T-Test).

4.5 Der Einfluss des Alterns auf Uhrgene und die Autophagie in humanen Fibroblasten

Bereits publizierte Daten weisen auf einen Zusammenhang zwischen den Alterungsprozessen und der Autophagie als auch auf den zirkadianen Oszillator hin (Makrides 1983, Kolker, et al. 2003, Rubinsztein, et al. 2011). Dieser Zusammenhang könnte gerade in Hautzellen von großer Relevanz sein, da diese sowohl mit externen Umwelteinflüssen als auch internen Stressoren und Zellschäden zurechtkommen müssen und somit besonderen Belastungen ausgesetzt sind. Daher wurde im folgenden Abschnitt untersucht, ob sowohl die innere Uhr oder bestimmte Funktionen des zirkadianen Oszillators als auch die Autophagie mit fortschreitenden Alterungsprozessen in menschlichen humanen primären Fibroblasten gestört oder beeinträchtigt sind.

4.5.1 In gealterten humanen primären Fibroblasten korreliert eine deregulierte zirkadiane Uhr mit reduziertem autophagischen Flux

Zunächst wurde die Funktionsweise der zirkadianen Uhr in synchronisierten stationären Fibroblasten analysiert. Alle hier verwendeten humanen Fibroblasten wurden aus Hautproben von Spenderinnen im Alter von 20 bis 67 Jahren, entnommen bei kosmetischen chirurgischen Eingriffen von der unteren, sonnengeschützten Seite der menschlichen weiblichen Brust isoliert; dies schließt gewebe- oder geschlechtsspezifische Effekte bei der Analyse aus. Die Isolierung der primären humanen Fibroblasten erfolgte nach bereits veröffentlichten Methoden (Tigges, et al. 2013). Die so gewonnenen Primärzellkulturen wurden weit unter dem Replikationslimit analysiert, um mögliche, der Seneszenz geschuldete, Einflüsse auszuschließen (Lopez-Otin et al. 2013, Tigges et al. 2014). Die Ergebnisse zeigen, dass die zirkadiane Uhr sowohl in jungen (21 Jahre) als auch in gealterten (67 Jahre) Fibroblasten ein rhythmisches mRNA Expressionsmuster von *Bmall* und antiphasisch dazu eines von *Per2* aufweist (Abb. 4.17 A). Dies zeigt, dass die zirkadiane Uhr selbst im fortgeschrittenen Alter rhythmisch oszilliert.

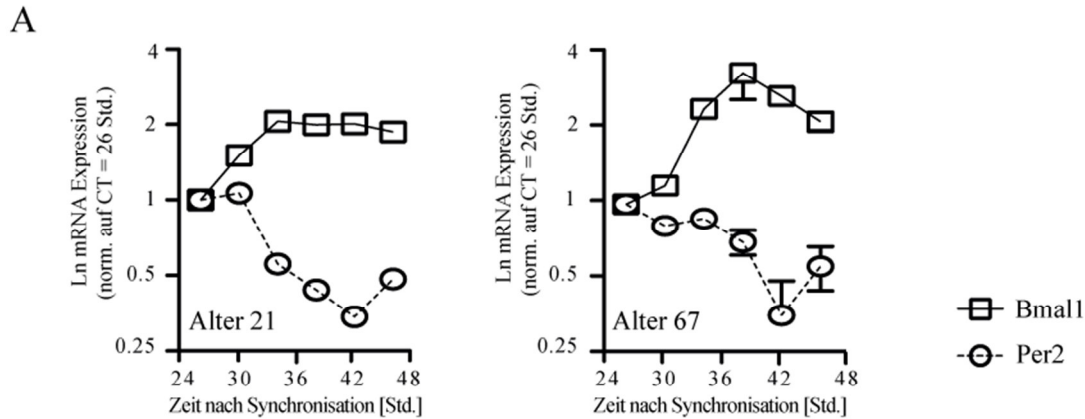


Abbildung 4.17: Zirkadiane Expression von Uhrgenen in humanen primären Fibroblasten

(A) Analyse der zirkadianen mRNA-Expression von *Bmal1* (Vierecke) und *Per2* (Kreise) der humanen primären Fibroblasten der jüngsten (21 Jahre, links) und der ältesten (67 Jahre, rechts) Spenderin der Kohorte, normalisiert auf Zeitpunkt CT=26 Std., alle Daten normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. Daten angegeben als Mittelwerte \pm SEM.

Durch bereits publizierte Daten ist bekannt, dass die zirkadiane Uhr transkriptional kompensiert ist, das heißt, dass sie auch dann noch Rhythmicität aufweist, wenn die absoluten mRNA Level der zirkadianen Gene des positiven und negativen Armes der Rückkopplungsschleife stark verändert vorliegen (Dibner et al. 2009). Daher wurden neben den rhythmischen mRNA Expressionsmustern (Abb. 4.17) in synchronisierten Zellen auch die absoluten mRNA Expressionslevel von einzelnen zirkadianen Genen in unsynchronisierten humanen primären Fibroblasten bestimmt (Abb. 4.18 A). Während die Expression von *Bmal1* stark hochreguliert war, zeigten viele Gene des negativen Armes der Rückkopplungsschleife in den Zellen von Spenderinnen der Altersgruppe 60-70 Jahre (im Vergleich zu der Altersgruppe 20-30 Jahre) eine signifikante Reduktion (*Per1*, *Per2* und *Cry2*). Gleiches wurde auch für *Nr1d1* beobachtet, da auch hier das Expressionslevel dieses Gens in den gealterten Zellen deutlich herunterreguliert war (Abb. 4.18 A). Die reduzierten mRNA Expressionslevel von *Per2* bzw. gestiegenen *Bmal1* Level spiegeln sich auch auf der Proteinebene wieder (Abb. 4.18 B).

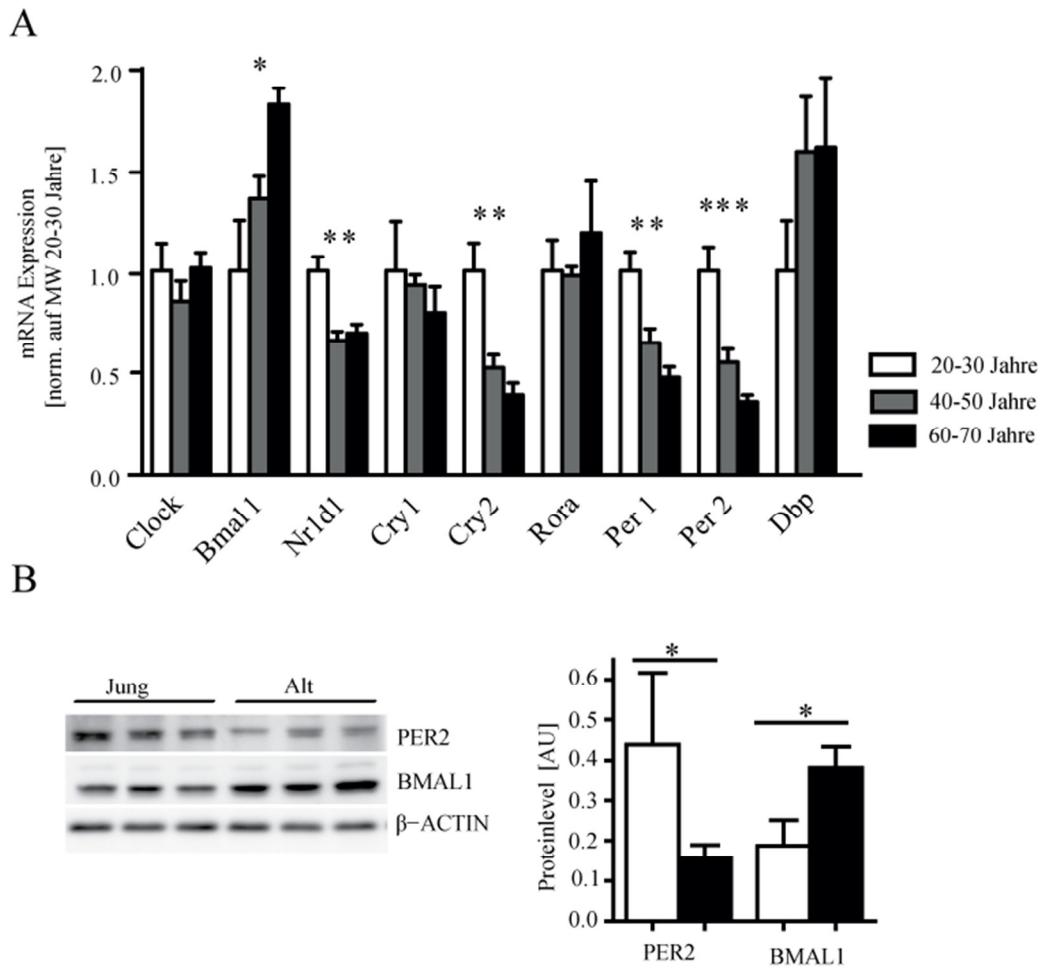


Abbildung 4.18: Einfluss des Alterungsprozesses auf die Expression von Uhrgenen

(A) Analyse der mRNA-Expressionslevel der dargestellten Gene in humanen primären Fibroblasten (je fünf Probanden) für die Altersgruppen 20-30 Jahre (weiß), 40-50 Jahre (grau) und 60-70 Jahre (schwarz), normalisiert auf die entsprechenden Mittelwerte der Altersgruppe 20-30 Jahre, alle Daten normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. (B) Western Blot Analyse (links) und Quantifizierung (rechts) der PER2 und BMAL1 Proteinlevel in je drei jungen (Altersgruppe 20-30 Jahre) und alten (Altersgruppe 60-70 Jahre) Probanden, β -ACTIN dient als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung. AU: unskalierte Einheit, Daten angegeben als Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ (Signifikanzen zwischen Altersgruppen 20-30 Jahre und 60-70 Jahre) (zweiseitiger T-Test).

Neben den Expressionsleveln der Uhrgene wurden auch die LC3-II Proteinlevel in Ab- und Anwesenheit des Autolysosominhibitors Chloroquin ermittelt. Dies ermöglicht sowohl die Bestimmung der statischen Autophagielevel als auch des autophagischen Flux. Die Autophagielevel sind in den humanen primären Fibroblasten der Spenderinnen mit fortgeschrittenem Alter deutlich reduziert (Abb. 4.19 A) und stehen signifikant im Zusammenhang mit dem Spenderalter ($R^2 = 0,42$; $p < 0,0001$). Zwischen der jüngsten und der ältesten Spenderin konnte eine zehnfache Reduktion beobachtet werden. Diese Tendenzen

decken sich mit bereits publizierten Studien (Zhang et al. 2008). Neben dem Autophagielevel zeigen die Ergebnisse der Korrelationsanalyse auch einen sehr starken Zusammenhang zwischen dem autophagischen Flux und dem Alter der Probenspenderin ($R^2 = 0,40$; $p < 0,01$) (Abb. 4.19 B). Bezieht man neben den autophagischen Leveln auch die Expressionslevel von *Per2* und *Bmal1* mit in die Korrelationsanalysen ein, ergibt sich eine starke Korrelation zwischen dem Alter, der Autophagie (LC3-II Proteinlevel) und der Expression der Uhr gene (Verhältnis von *Per2*/*Bmal1* Expression) ($R^2 = 0,91$, $p < 0,0001$) (Abb. 4.19 C).

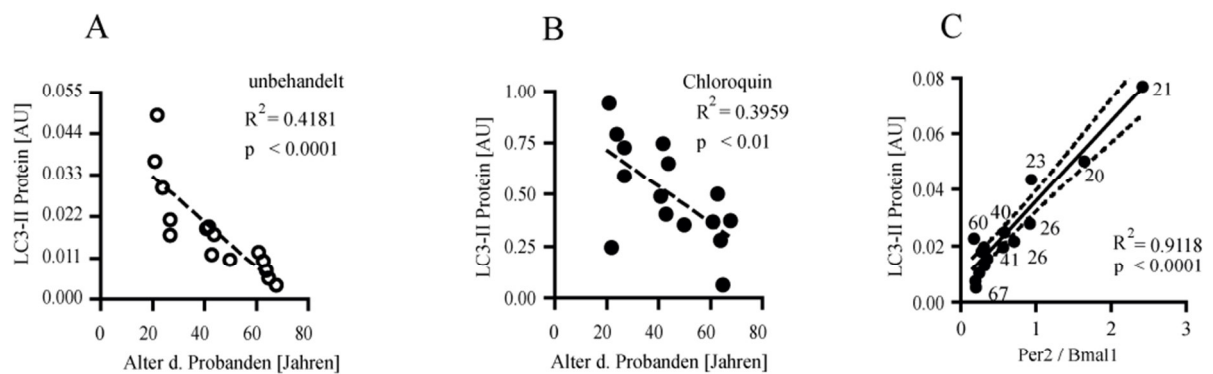


Abbildung 4.19: Der Einfluss von Alterungsprozessen auf die zirkadiane Uhr und die Autophagie

(A) LC3-II Proteinlevel in humanen primären Fibroblasten normalisiert auf die Kontrollwerte einer Vorhaut-Fibroblasten Zelllinie (n=4). (B) Messung des autophagischen Flux nach Behandlung der Fibroblasten mit Chloroquin (50 μ M, 3 Std.). Darstellung der linearen Regression (gestrichelte Linie) der isolierten humanen primären Fibroblastenkultur (n=4). (C) Korrelationsberechnung des LC3-II Proteinlevel mit dem *Per2*/*Bmal1* mRNA Verhältnis (Δ Cp/ Δ Cp) der isolierten humanen primären Fibroblastenkultur, alle Daten normiert auf den Zeitpunkt CT26. Darstellung der linearen Regression (schwarze Linie) und 95% Abweichung (gestrichelte Linie) sowie das Alter jeder einzelnen Spenderin (Zahl neben dem Datenpunkt) (n=3). AU: unskalierte Einheit, Daten angegeben als Mittelwerte.

Neben den Expressionsleveln der Uhr gene (Abb. 4.18 A) zeigten auch Autophagie gene wie *Ulk1* ($p < 0,05$) und *Map1/Lc3b* ($p < 0,0005$) eine signifikante Reduktion der mRNA Expressionslevel bei steigendem Spenderalter (Abb. 4.20 A) während für *Ctsl*, *Map3k7* oder *Zkscan3* kein signifikanter Bezug zwischen dem Alter und den Expressionsleveln hergestellt werden konnte (Abb. 4.20 A). Die Analyse der Korrelation zwischen den LC3-II Proteinlevel und einigen Autophagie genen wie *Ulk1* ($R^2 = 0,13$), *Map1/Lc3b* ($R^2 = 0,04$) und *Ctsl* ($R^2 = 0,003$) wies eine schwache Korrelation auf (Abb. 4.20 B bis D).

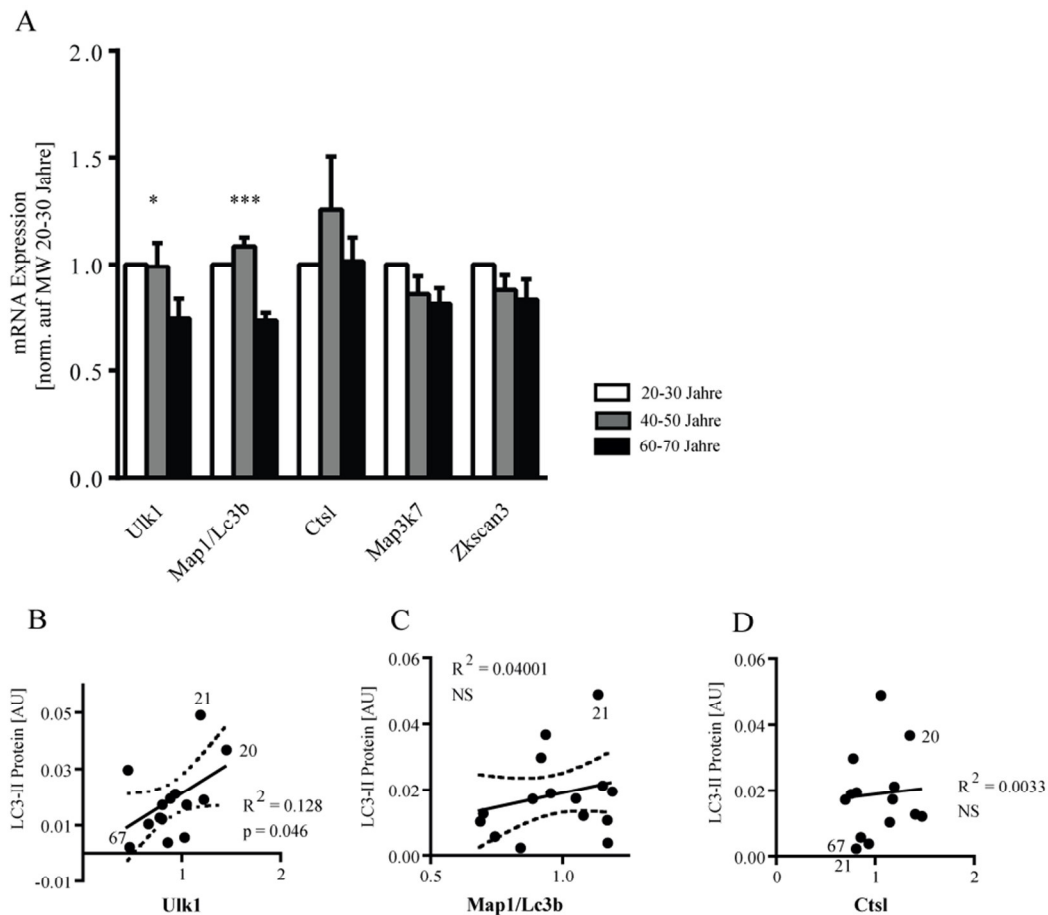


Abbildung 4.20: Expression der Autophagogene und Korrelationsanalysen in Abhängigkeit vom Spenderalter

(A) Analyse der mRNA Expressionslevel einiger Autophagogene in humanen primären Fibroblasten (je fünf Probanden) für die Altersgruppen 20-30 Jahre (weiß), 40-50 Jahre (grau) und 60-70 Jahre (schwarz), normalisiert auf die entsprechenden Mittelwerte der Altersgruppe 20-30 Jahre. Daten angegeben als Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$; *** $p < 0,0005$ (Signifikanzen zwischen Altersgruppen 20-30 Jahre und 60-70 Jahre) (zweiseitiger T-Test) (B-D) Altersabhängige Korrelation einiger Autophagogene mit dem LC3-II Proteinlevel jeder einzelnen humanen primären Fibroblastenkultur, alle Daten normiert auf den Zeitpunkt CT26. (B) *Ulk1* (C) *Map1/Lc3b* und (D) *Ctsl*. Darstellung der linearen Regression (schwarze Linie) und 95% Abweichung (gestrichelte Linie) sowie das Alter der Spenderin (Zahl neben dem Datenpunkt) ($n=3$). AU: unskalierte Einheit, NS: nicht signifikant; Daten angegeben als Mittelwerte. Alle mRNA Daten normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*.

Die Korrelationsanalysen der Autophagielevel mit einigen Uhrgenen ergaben einen linearen Zusammenhang zwischen dem Alter der Spenderin und den Expressionsleveln von *Bmal1* ($R^2 = 0,52$; $p < 0,0001$), *Per1* ($R^2 = 0,40$; $p < 0,001$), *Per2* ($R^2 = 0,23$; $p < 0,01$), *Nr1d1* ($R^2 = 0,24$; $p < 0,01$) und *Cry2* ($R^2 = 0,45$; $p < 0,0001$) (Abb. 4.21 A-E). Die Gene *Clock*, *Cry1*, *Rora* und *Dbp* zeigten dagegen keine signifikante Korrelation zwischen dem Alter und der mRNA Expressionsrate (Abb. 4.21 F-I). Daher ist davon auszugehen, dass die veränderten Expressionslevel der Uhrgene in gealterten humanen primären Fibroblasten genspezifisch sind und keinen allgemeinen Effekt auf die Transkription von Uhrgenen darstellen.

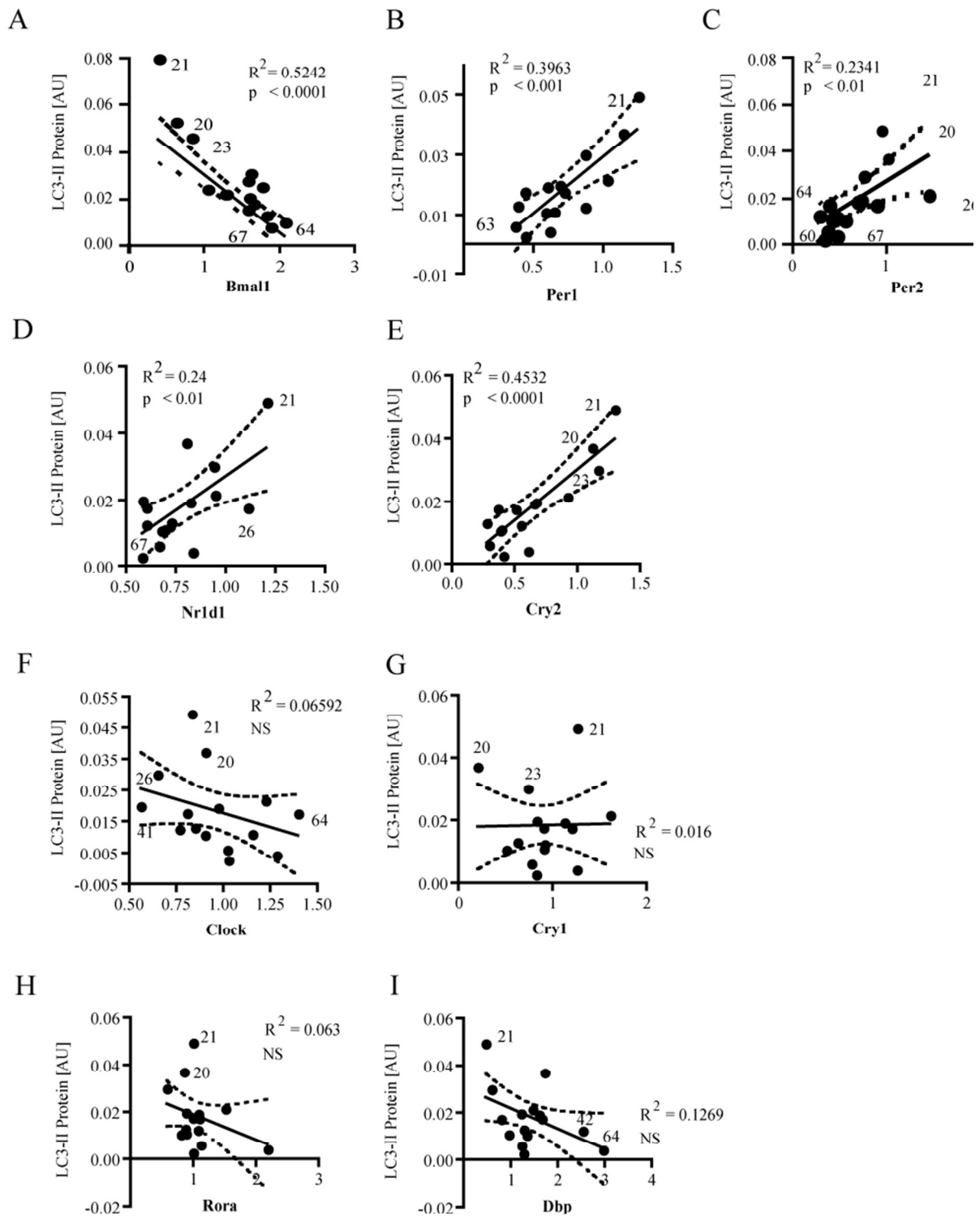


Abbildung 4.21: Korrelationsanalysen der Autophagielevel mit einigen Uhrgenen in Abhängigkeit vom Spenderalter

Altersabhängige Korrelation einiger Uhrgene mit dem LC3-II Proteinlevel jeder einzelnen humanen primären Fibroblastenkultur, alle Daten normiert auf den Zeitpunkt CT26. (A) *Bmal1* (B) *Per1* (C) *Per2* (D) *Nr1d1* (E) *Cry2* (F) *Clock* (G) *Cry1* (H) *Rora* und (I) *Dbp*. Darstellung der linearen Regression (schwarze Linie) und 95% Abweichung (gestrichelte Linie) sowie das Alter der Spenderin (Zahl neben dem Datenpunkt) (n=3). AU: unskalierte Einheit, NS: nicht signifikant; Daten angegeben als Mittelwerte.

4.5.2 In gealterten humanen primären Fibroblasten erhöht die Überexpression eines einzelnen zirkadianen Gens die Autophagie

Ausgehend von den reduzierten Autophagieleveln auf Protein- (Abb. 4.19 A und B) und mRNA Ebene (Abb. 4.20 A) in gealterten humanen primären Fibroblasten (Altersgruppe 60-70 Jahre) und der starken Korrelation zwischen dem Alter, der Autophagie und der Expression von Uhrgenen (Abb. 4.19 C) ergibt sich die Frage, ob man in gealterten humanen primären Fibroblasten die reduzierten Autophagielevel durch eine Erhöhung der zirkadianen Genexpression auf das Niveau junger humaner primärer Fibroblasten wiederherstellen kann.

Dazu wurden drei humane primäre Fibroblasten Zelllinien von Spenderinnen der Altersgruppe 60-70 Jahre transient mit PER2-GFP transfiziert und neben der Transfektionseffizienz auch die LC3-II Proteinlevel bestimmt (Abb. 4.22). mRNA Analysen zeigten, dass die Transfektion des PER2-GFP Konstrukts effizient war und PER2-GFP in den gealterten Fibroblasten deutlich erhöht war (Abb. 4.22 A). Die Fluoreszenz Analyse erbrachte außerdem, dass in allen transient transfizierten Ansätzen GFP bzw. PER2-GFP exprimiert wurde. GFP lag gleichmäßig im Zytoplasma und Nukleus verteilt vor (Abb. 4.22 C), während PER2-GFP eine ungleichmäßige subzelluläre Verteilung zeigte (Abb. 4.22 D). Zusätzlich waren auch die gemessenen Autophagielevel fast zweifach erhöht (Abb. 4.22 B).

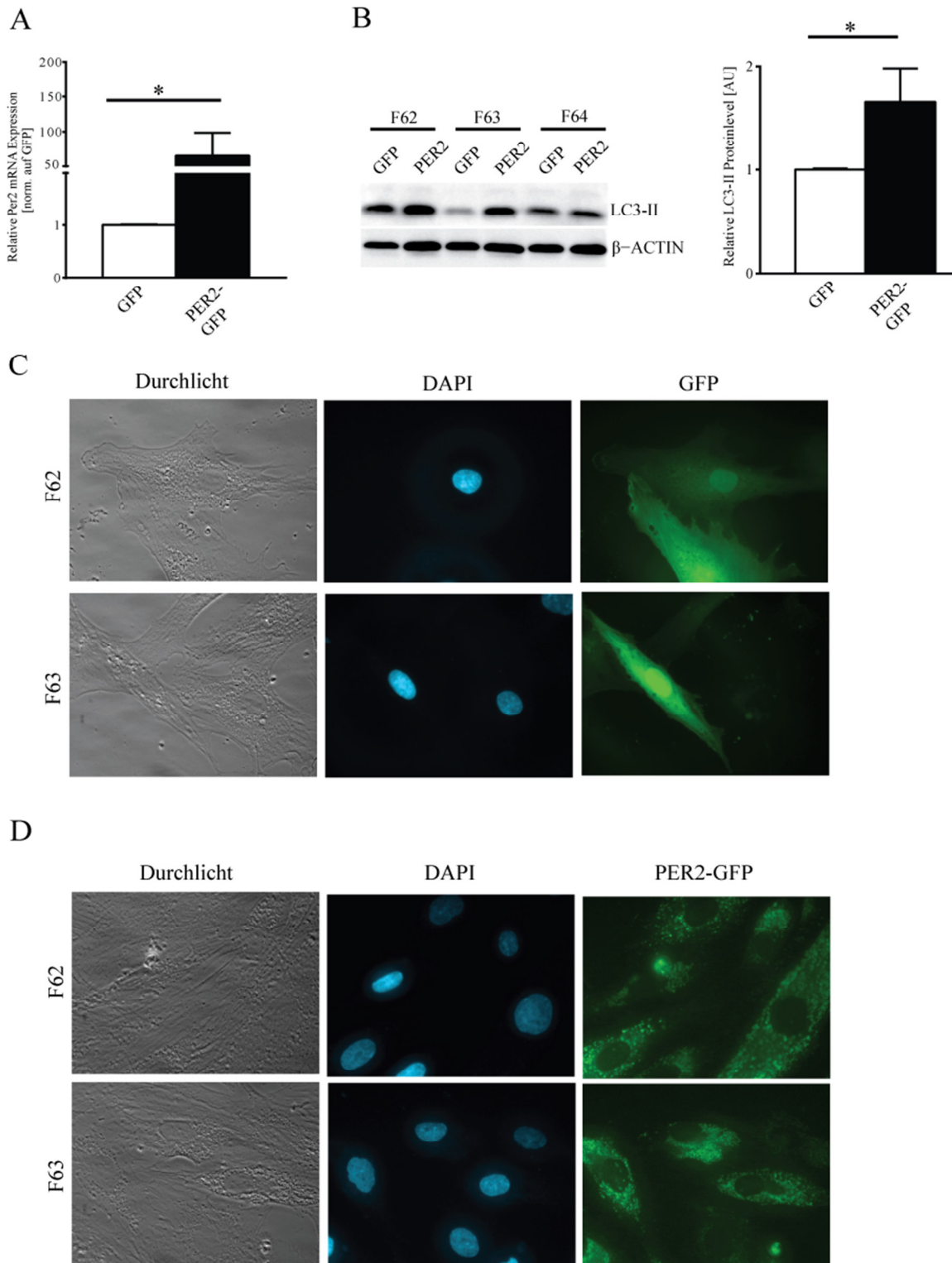


Abbildung 4.22: PER2-GFP Expressionslevel in gealterten humanen primären Fibroblasten

(A) Analyse der *Per2* mRNA Expressionslevel in humanen primären Fibroblasten (je drei Probanden) für die Altersgruppe 60-70 Jahre, GFP (weiß) oder PER2-GFP (schwarz) exprimierend, normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. (B) Western Blot Analyse (links) und Quantifizierung (rechts) der LC3-II Proteinlevel der GFP (weiß) oder PER2-GFP (schwarz) exprimierenden humanen primären Fibroblasten (n=3), normalisiert auf die entsprechenden Mittelwerte der GFP exprimierenden Gruppe, β -ACTIN dient als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung. (C-D) Fluoreszenz *Imaging* der Fibroblasten der Altersgruppe 60-70 Jahre entweder (C) GFP oder (D) PER2-GFP exprimierend. Daten angegeben als Mittelwerte \pm SEM, * p<0,05; *** p<0,0005 (zweiseitiger T-Test).

Im Gegensatz zu den signifikant reduzierten zirkadianen mRNA Leveln (Altersgruppe 60-70 Jahre) (Abb. 4.18 A), waren die mRNA Expressionsniveaus der gemessenen Uhrgene (*Bmal1*, *Per1*, *Cry1*, *Cry2* und *Nr1d1*) nach der PER2-GFP Überexpression (Abb. 4.23 A) zwar erhöht, jedoch nicht signifikant gestiegen. Auch die mRNA Expressionslevel der Autophagiegene (*Map1/Lc3b*, *Ulk1*, *Ctsl* und *Cebpb*) (Abb. 4.23 B) zeigten, im Vergleich zu den gealterten Fibroblasten (Abb. 4.19 und 4.20), eine steigende Tendenz. Es konnte aber keine signifikante Abweichung von der jeweiligen Kontrollprobe ermittelt werden. *Sirt1* ist nach der Überexpression, im Vergleich zu gealterten untransfizierten Fibroblasten (Kalfalah et al. 2014), ebenfalls angestiegen (1,3fach erhöht), aber nicht signifikant. (Abb. 4.23 C).

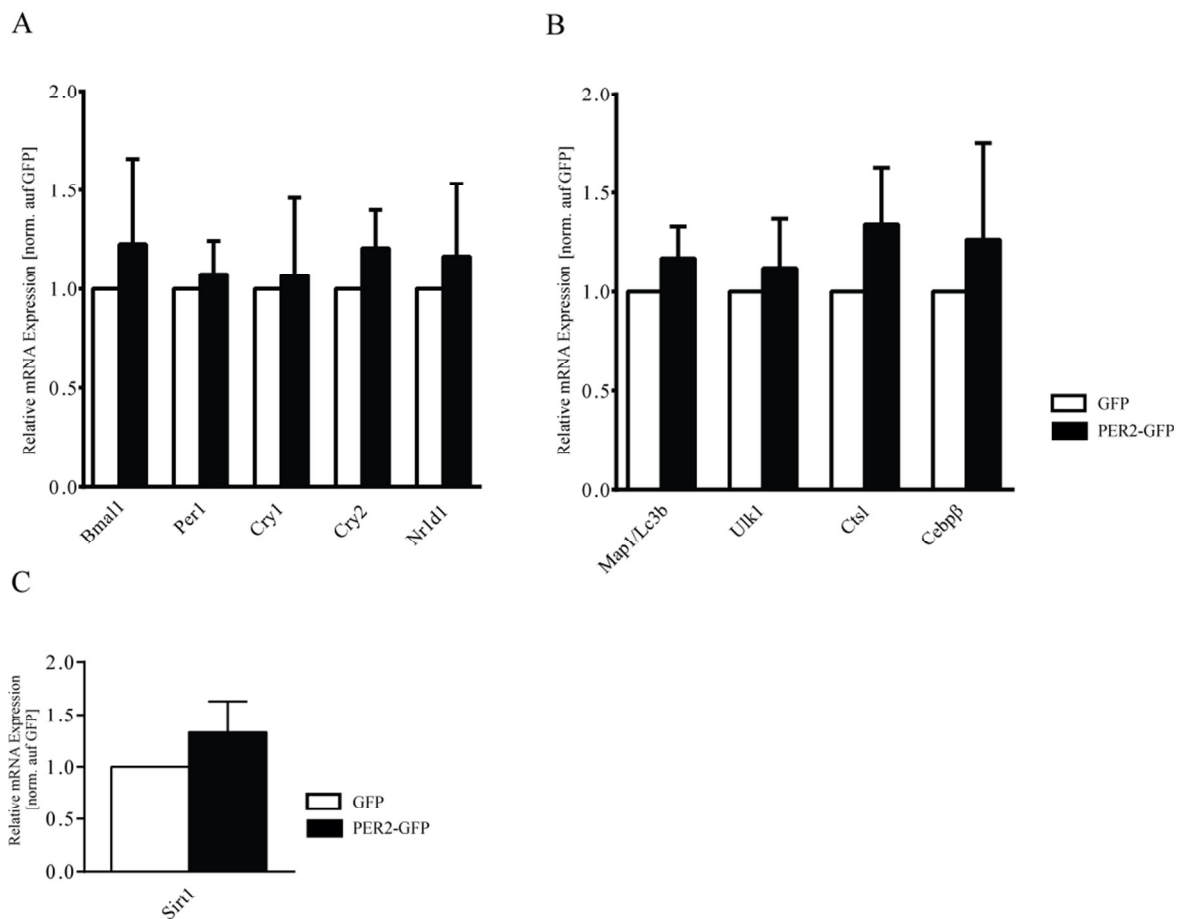


Abbildung 4.23: Einfluss der PER2-GFP Überexpression auf die Expression von Uhr- und Autophagiegengen

Analyse (A) der Uhrgene, (B) einiger Autophagiegene und (C) *Sirt1* in humanen primären Fibroblasten (je drei Probanden) für die Altersgruppe 60-70 Jahre, GFP (weiß) oder PER2-GFP (schwarz) exprimierend, normalisiert auf die entsprechenden Mittelwerte der GFP exprimierenden Gruppe. Alle mRNA Daten normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. Daten angegeben als Mittelwerte \pm SEM.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in den humanen primären Fibroblasten die Autophagie im Alter stark reduziert ist und der zirkadiane Oszillator während des Alterungsprozesses immer noch rhythmisch ist. Die absoluten, stationären mRNA Expressionsmuster einzelner Uhr gene können im fortgeschrittenen Alter jedoch stark verändert sein. Zudem korrelieren die Expressionslevel dieser Gene eng mit dem autophagischen Level. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese zirkadianen Genlevel in den humanen primären Fibroblasten zu den reduzierten autophagischen Leveln in fortgeschrittenem Alter beitragen können. Auch konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die niedrigen Autophagielevel in gealterten humanen primären Fibroblasten durch die Erhöhung der Expression eines einzelnen zirkadianen Gens so stark zu beeinflussen, dass die Zellen Expressionslevel der jungen humanen primären Fibroblasten aufweisen und somit „verjüngt“ werden.

4.6 Die metabolische Regulation der Autophagie über die zirkadiane Uhr

4.6.1 Die zirkadiane Uhr reguliert die Autophagie über den AMPK Signalweg

Sowohl die Autophagie als auch die zirkadiane Uhr werden durch metabolische Stoffwechselwege beeinflusst und wirken regulierend auf diese ein. Der Metabolismus wiederum wirkt sich auf die Autophagie aus. Unter z.B. akutem Nährstoffmangel, wird der Organismus nicht mehr mit wichtigen Makromolekülen versorgt, welches einen ersten Schritt für die Hochregulierung der Autophagie darstellen könnte. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Autophagie in murinen Fibroblasten über den AMPK oder den mTor Signalweg induziert wird. Durch Hungerbedingungen kann man die Autophagie induzieren, zusätzlich wurden beide Signalwege einzeln untersucht.

Die Behandlung der Zellen mit Compound C, einem AMPK-Inhibitor (Abb. 4.24; vgl. Spur 2), führte zu einer sichtbaren Reduktion in den LC3-II Proteinlevel und einer Inhibition der AMPK Aktivität während die mTor Proteinlevel unverändert blieben (Abb. 4.24; vgl. Spur 1 und 2). Nach der Behandlung der Zellen mit Rapamycin, einem Makrolid Antibiotikum,

(Abb. 4.24; vgl. Spur 3) zeigten sich keine Auswirkungen auf die Autophagielevel und auf die pAMPK Level. Deutlich ist jedoch die Reduktion der mTor Proteinlevel im Vergleich zur Kontrollbande zu beobachten (Abb. 4.24; vgl. Spur 1 und 3). Unter Hungerbedingungen (Abb. 4.24; vgl. Spur 4) konnte in den murinen NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten ein deutlicher Anstieg des LC3-II Proteinlevels beobachtet werden (Abb. 4.24; vgl. Spur 1 und 4). Sowohl der AMPK als auch der mTor Signalweg sind durch Nährstoffe wie Glukose oder Aminosäuren regulier- und beeinflussbar (Dann, et al. 2007), können unter Nährstoffmangel parallel durch die Phosphorylierung von AMPK und die Inhibition von mTor aktiviert werden und zu einem deutlichen Anstieg der Autophagie führen. Zusätzlich ist daher ein deutlicher Anstieg der AMPK Level und eine Reduktion der mTor Proteinlevel sichtbar.

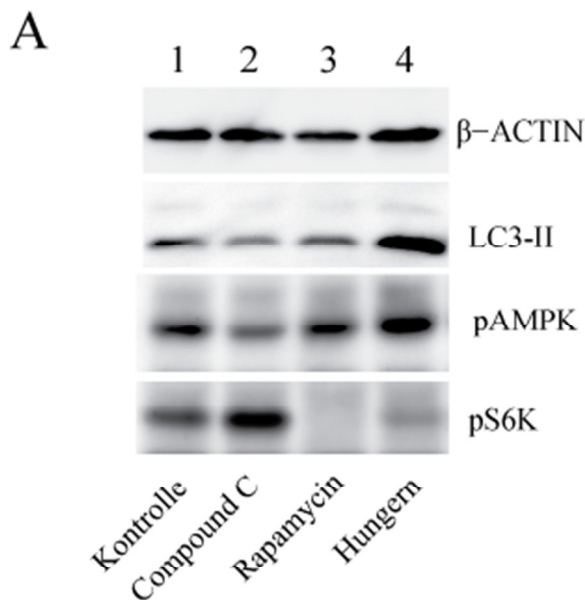


Abbildung 4.24: Einflüsse des mTor- und des AMPK Signalweges auf die autophagischen LC3-II Proteinlevel

NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten ($> 10^5$ Zellen/ cm^2) wurden vor der Analyse stationär kultiviert. (A) Western Blot Analyse in Abwesenheit (Spur 1, Kontrolle) oder Anwesenheit von Compound C (Spur 2, 10 μM , 3 Std.), Rapamycin (Spur 3, 1 μM , 3 Std.) oder in Hungermedium (Spur 4, (-)Glukose, (-)Pyruvat und (-)Serum, 3 Std.). Detektion von LC3-II, phosphoryliertem AMPK (pAMPK) oder pS6K, einer Serin/ Threoninkinase im mTor Signalweg. β -ACTIN dient als Kontrolle für die gleichmäßige Proteinbeladung (n=3).

Dadurch, dass die Hemmung des mTor Signalweges (durch Rapamycin) keinen Einfluss auf die Autophagielevel zeigte (Abb. 4.24; Spur 3) und die Inhibition der AMPK Aktivität (durch Compound C) zu einer deutlichen Reduktion der LC3-II Proteinlevel führte (Abb. 4.24; Spur 2), ist naheliegend, dass der AMPK Signalweg und nicht der mTor Signalweg unter den getesteten Bedingungen wichtig für die Regulation der Autophagie ist.

4.6.2 *Per2* verbindet den zirkadianen Oszillator und die Autophagie über den AMPK Signalweg

Schon bei den humanen primären Fibroblasten fiel eine der berechneten Korrelationen besonders auf: die enge Korrelation zwischen dem Alter, der Autophagie und der Expression von Uhrgenen (Verhältnis von *Per2*/ *Bmal1*, siehe auch Abb. 4.19 C). Mit *Per2* und *Bmal1* stehen zwei Gene im Fokus, welche auch bei den murinen NIH3T3-Fibroblasten von Interesse waren. Um den Einfluss dieser Gene auf die Regulierung der Autophagie via des AMPK Signalweges zu analysieren, wurden *Per2* und *Bmal1* in NIH3T3-Fibroblasten durch siRNA (siehe Tabelle 2.3) herunterreguliert (Abb. 4.25 A und B) und die Auswirkungen auf den Gesamt- und den phosphorylierten AMPK Anteil auf Proteinebene bestimmt. Die Gesamtproteinlevel von AMPK waren sowohl in den Zellen die mit siNt transfiziert wurden als auch in den NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen mit dem *Knock-down* gegen *Per2* oder *Bmal1* ähnlich (Abb. 4.25 C), jedoch sank der Anteil an phosphoryliertem AMPK durch den *Knock-down* gegen *Per2* signifikant um fast 50%. Ein *Knock-down* gegen *Bmal1* hingegen hatte keinen signifikanten Einfluss auf den Proteinlevel des phosphorylierten AMPKs. Dies deutet darauf hin, dass die zirkadiane Uhr den AMPK Signalweg eher über *Per2* beeinflusst.

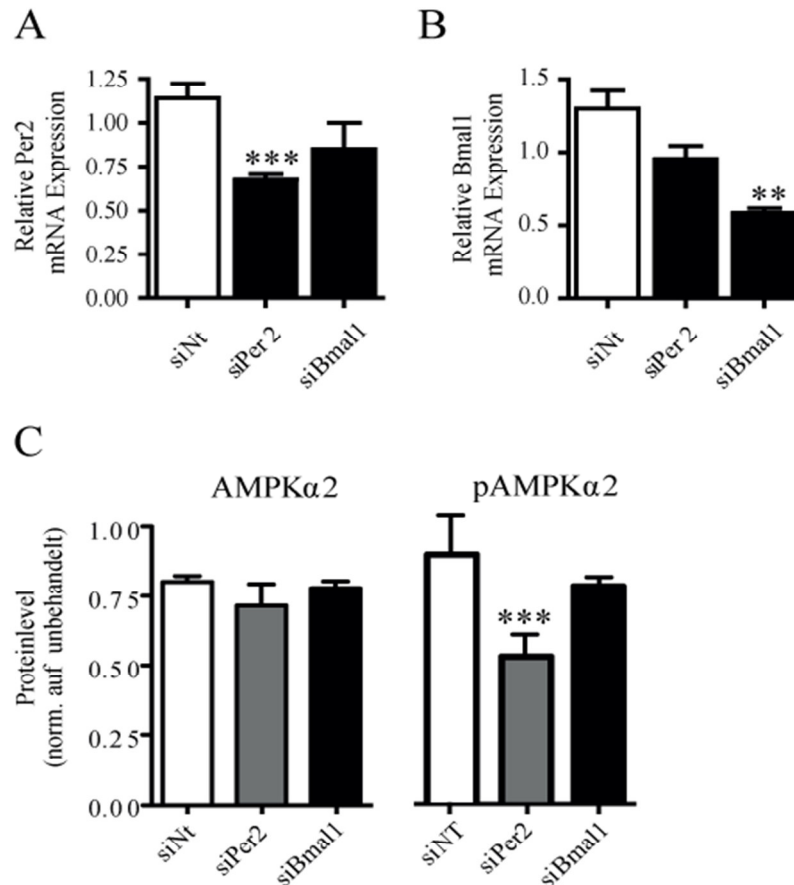


Abbildung 4.25: Einfluss des Knock-downs von Uhrgenen auf den AMPK Signalweg

NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen (10^4 Zellen) wurden mit 20 nM siPer2 oder 25 nM siBmal1 oder der jeweils äquivalenten siNt Konzentration behandelt, 72 Stunden inkubiert und Protein bzw. RNA Extrakte isoliert ($n=3$). (A) RT-PCR Analyse der *Per2* Expressionslevel nach *Knock-down* der NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen mit siRNA gegen *Per2* oder *Bmal1*, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) Gleiches wie in (A) für *Bmal1* mRNA Level, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. (C) Western Blot Quantifizierung der AMPKα2 (links) und pAMPKα2 (rechts) Proteinlevel nach Transfektion der NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen mit den angegebenen siRNAs, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. Alle mRNA Expressionsdaten sind normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. Daten werden als Mittelwert \pm SEM angegeben, ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$ (zweiseitiger T-Test).

Weitere Untersuchungen sollten nun auf mRNA Expressionsebene klären, ob man mit Hilfe des *Knock-down* gegen *Per2* klären könnte, ob eine bestimmte Untereinheit der heterotrimeren Proteinkinase AMPK für die Interaktion verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde *Per2* erneut durch siRNA in NIH3T3-Fibroblasten herunterreguliert und die Auswirkungen auf AMPK auf der Genexpressionsebene untersucht. Auch AMPK Kinasen wurden, wegen ihrer Rolle bei der Regulation der AMPK Phosphorylierung in diese Analyse einbezogen.

Die mRNA Expressionsniveaus von der katalytischen (*Prkaa1* und *Prkaa2*) als auch beiden regulatorischen Untereinheiten (*Prkab1* und *Prkay1*) von AMPK (Abb. 4.26 A) erwiesen sich als nicht signifikant reduziert. Und auch die mRNA Expressionsmuster der AMPK Kinasen *Lkb1*, *Cab39*, *Strada* und *Camkk2* zeigten keine signifikanten Abweichungen von der unbehandelten Kontrollprobe (Abb. 4.26 B).

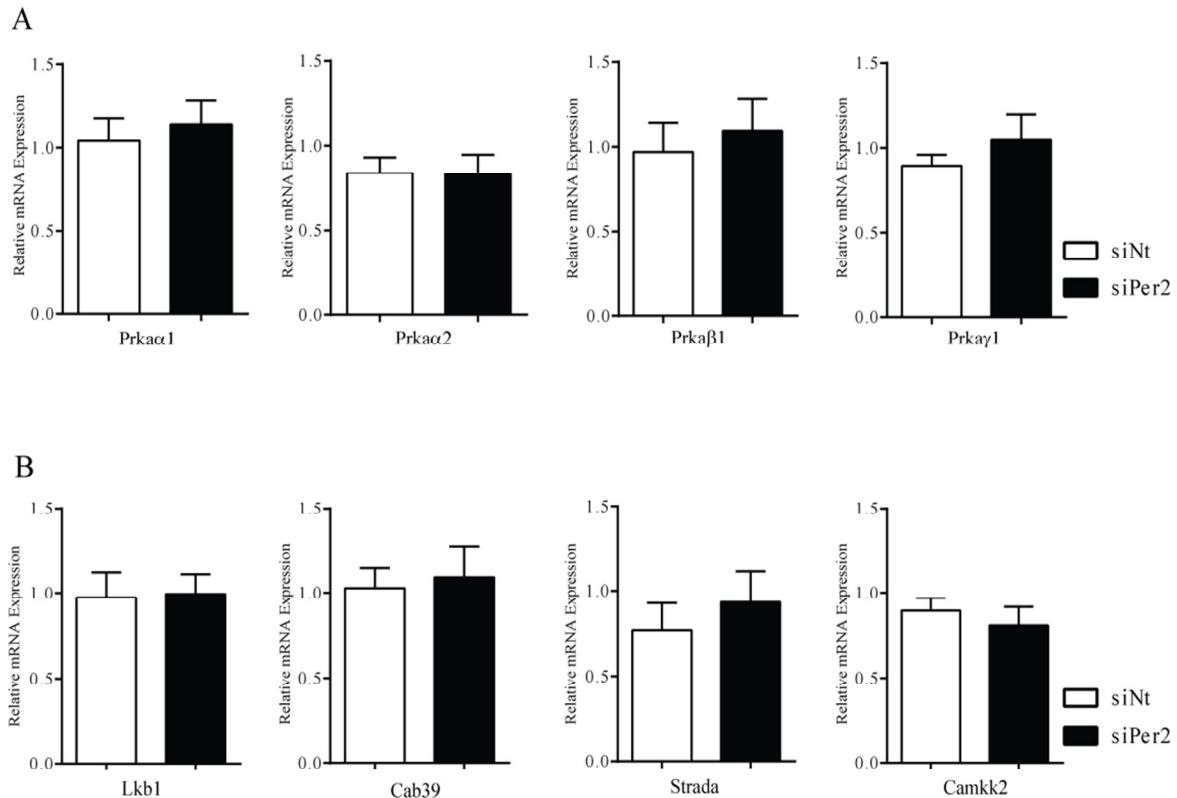


Abbildung 4.26: Einfluss des *Per2*-Knock-downs auf den AMPK Signalweg

NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen (10^4 Zellen) wurden mit 20nM *siPer2* oder 25nM *siBmal1* oder der jeweils äquivalenten siNt Konzentration behandelt, 72 Std. inkubiert und RNA Extrakte isoliert (n=7). (A) RT-PCR Analyse der Expressionslevel für *Prkaa1*, *Prkaa2*, *Prkab1* und *Prkay1* nach *Knock-down* der NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen mit siRNA gegen *Per2*, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) Gleiches wie in (A) für *Lkb1*, *Cab39*, *Strada* und *Camkk2* mRNA Level, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. Alle mRNA Expressionsdaten sind normalisiert auf die Expression der drei *Housekeeper*-Gene *Eef1a*, β -Aktin und *Gapdh*. Daten werden als Mittelwert \pm SEM angegeben.

Zusammenfassend wird deutlich, dass unter diesen experimentellen Bedingungen der AMPK Signalweg bei der Regulation der Autophagie eine wichtige Rolle einnehmen könnte und dass die zirkadiane Uhr eher durch *Per2* als durch *Bmal1* über den AMPK Signalweg mit der Autophagie verknüpft wird.



5. Diskussion

5.1 Die Regulation der zirkadianen Uhr und der Autophagie in Fibroblasten

Der Idee der „alternden Uhr“ ist seit etwa 40 Jahren bekannt und wurde erstmalig 1973 von dem Australier Arthur Everitt beschrieben (Everitt 1973). Dabei spekulierte er, dass eine oder mehrere dieser Uhren im Hypothalamus vorhanden sein könnten. Auch versuchte er, die „Neuroendokrine Theorie des Alterns“ des Russen Vladimir Dilman aus dem Jahr 1971 (Dilman 1971) in seinen Ansätzen zu berücksichtigen und in seine Ideen zu integrieren. Sowohl Everitt als auch Dilman hatten die Vermutung, dass Rückkopplungsmechanismen ein „genetisches Entwicklungs- und Alterungsprogramm“ steuern würden und der Hypothalamus somit eine Art „alternde Uhr“ darstellen würde (Dilman 1971, Everitt 1973). Dass Alterungsprozesse nicht nur zahlreiche Aspekte der zirkadianen Rhythmik verändern, sondern sowohl auf organischer als auch auf zellulärer Ebene weitere schädliche Auswirkungen haben, ist bereits durch zahlreiche Studien bekannt (Wang et al. 2009, Jonker et al. 2013). Im Alter weisen zirkadiane Oszillatoren tendenziell niedrigere Amplituden und Phasenvorläufe auf. Des Weiteren führen Alterungsprozesse zur Desynchronisation zirkadianer Uhren in zahlreichen Geweben und Organen, z.B. in Hirn, Herz oder Leber (Kolker, et al. 2003, Hofman, et al. 2006). Wie bereits erwähnt sinkt abhängig vom Alter im SCN die Aktivität des Alterungsproteins SIRT1, was zu veränderten Expressionsmustern von Uhrgenen führt (Chang et al. 2013). Auch konnte gezeigt werden, dass bei gealterten Menschen die rhythmischen Oszillationen der Körpertemperatur und des Hormonspiegels schwächere Amplituden aufweisen (Weitzman 1982, Czeisler, et al. 1991). Zusätzlich zu veränderten zirkadianen Expressionsleveln sinken mit fortschreitendem Alter auch die Autophagielevel; dies geschieht sowohl aufgrund der Deregulation der einzelnen metabolischen und hormonellen Regulatoren als auch wichtiger Komponenten des Autophagie Signalweges (Dice 1982, Makrides 1983, Rubinsztein, et al. 2011).

Dennoch ist die Hypothese, dass die beiden Prozesse verbunden sein könnten, noch nicht konkret untersucht worden. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, in Fibroblasten eine mögliche Regulation der zirkadianen Uhr auf die Autophagie zu identifizieren und zu untersuchen ob der fortschreitende Alterungsprozess regulierend auf diese Regulation

einwirkt. Um eine erste Verbindung zwischen der Regulation der Autophagie und der zirkadianen Uhr herzustellen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Zellwachstum in murinen Fibroblasten auf die Expression von Autophagie- und Uhrgenen analysiert. Anschließend wurde sowohl mit murinen Fibroblasten als auch unter Verwendung von *Cry1/2* defizienten *Knockout* Zellen der Einfluss der zirkadianen Uhr auf rhythmische und absolute Autophagielevel untersucht. Besonderes Augenmerk lag auf der Fragestellung, ob der fortschreitende Alterungsprozess über eine Regulation der zirkadianen Uhr auf die Autophagie einwirken kann. In diesen Experimenten wurde mit humanen primären Fibroblasten gezeigt, dass Alterungsprozesse Einfluss auf die zirkadiane Uhr und die Autophagie nehmen können und dass dieser Prozess reversibel ist. Darüber hinaus wurden mögliche Signalwege und deren regulatorische Rolle auf die Autophagielevel beleuchtet: der AMPK und der mTOR Signalweg.

5.1.1 Fibroblasten zeigen eine koordinierte Regulation der Autophagie und der zirkadianen Genexpression

Zunächst wurde untersucht, ob in Säugetierfibroblasten ein Zusammenhang zwischen der zirkadianen Uhr und der Autophagie besteht. Dazu wurde der Effekt unterschiedlicher Zelldichten vom logarithmischen Wachstum bis zur stationären Phase in NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten auf die Autophagielevel sowie Expression von Autophagiegenen und Uhrgenen untersucht und verglichen.

Das Zellwachstum reduzierte sich ab einer Zellzahl von 10^5 Zellen/ cm^2 deutlich, parallel führte der Wachstumsarrest zu einem signifikanten Anstieg der Proteinlevel von LC3-II, einem etablierten Autophagosomformationsmarker (Klionsky, et al. 2012). Die Analyse der mRNA Expressionendaten ergab, dass mit dem Übergang von der logarithmischen zur stationären Wachstumsphase neben dem Anstieg der Autophagielevel auch eine signifikante Hochregulation von verschiedenen Autophagiegenen beobachtet wurde. Dieser Effekt scheint genspezifisch zu sein, da der Anstieg in den mRNA Expressionsleveln nicht bei allen gemessenen Autophagiegenen beobachtet werden konnte. Auch die mRNA Level bestimmter Uhrgene wie *Per1*, *Per2* und *Nr1d1* sind beim Übergang in den zellulären Wachstumsarrest

signifikant erhöht. Die beobachteten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in Säugetierfibroblasten eine Interaktion bzw. Regulation zwischen diesen beiden Prozessen, der Autophagie und dem zirkadianen Oszillator, möglich ist.

Hinzukommend konnte auch für den Transkriptionsfaktor *Cebp β* eine durch Wachstumsarrest assoziierte Hochregulation gezeigt werden. *Cebp β* wird in der Leber für die zirkadiane Regulation der autophagischen Genexpression benötigt (Ma, et al. 2011, Ma et al. 2012). Des Weiteren übernimmt *Cebp β* eine wichtige Rolle im Zellzyklus (Jakobsen et al. 2013) und der Differenzierung von Fibroblasten in Adipozyten (Tang et al. 2003) welche auch von der Autophagie moduliert werden kann (Singh et al. 2009). In ihrer physiologischen Umgebung, der Haut, wachsen dermale Fibroblasten, ähnlich wie Zellen in Zellkultur, bis zum Wachstumsarrest. Dabei versuchen sie die Akkumulation von Zellschäden wie fehlgefaltete Proteine oder DNA-Schäden mitunter durch die Autophagie zu vermeiden. Es ist bereits bekannt, dass das Zellwachstum die Autophagie über verschiedene Signalwege reguliert (Neufeld 2012). Diese Signalwege sind unter anderem mit der Zellzyklusphase oder der Nährstoffversorgung über den AMPK und den mTor Signalweg verknüpft (Schieke et al. 2008, Alers et al. 2012). Beide Signalwege (Cao et al. 2011, Khapre et al. 2014) sowie der Zellzyklus (Matsuo et al. 2003) werden auch von der zirkadianen Uhr reguliert. Somit ist ein Zusammenhang der Regulation beider Prozesse über z.B. AMPK durchaus möglich.

Die Haut von Säugetieren ist Umwelteinflüssen, wie z.B. UV-Strahlung, meist in besonderer Weise ausgesetzt. Ferner kann sich UV-Strahlung ungünstig auf das Altern der Hautzellen auswirken. Beschädigte oder falsch gefaltete Proteine sowie Mitochondrien, die in jungen Zellen durch das autophagosomale System beseitigt werden, akkumulieren in gealterten Zellen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Übergang in den Wachstumsarrest unter UVA-Bestrahlung zu einem schwächeren Anstieg der autophagischen Protein- und mRNA Level führt als in unbehandelten Zellen. Mehrere Studien zeigten deckungsgleich mit den hier vorliegenden Ergebnissen, dass UVA-Strahlung in Hautzellen Autophagie beeinflussen kann, beispielsweise führen durch UVA- und UVB-Strahlung verursachte Hautschäden zu einer Aktivierung von AMPK in Hautzellen (Cao, et al. 2008). Des Weiteren ist die Autophagie für den Abbau von der durch UV-Stress induzierten Akkumulation von hochmolekularen Proteinen und Phospholipiden essentiell (Misovic et al. 2013, Zhao et al. 2013). Auch bei Fibroblasten, welche auch zirkadiane Muster zeigen, kann es durch UV-Bestrahlung zu Proteinoxidation (Sander et al. 2002) und mitochondrialer Dysfunktion (Krutmann et al.

2009) kommen, welche durch autophagische Prozesse geklärt werden (Yen et al. 2008, Gaddameedhi, et al. 2011).

5.1.2 Die zirkadiane Uhr reguliert die Autophagielevel in Fibroblasten

Die hier gewonnenen Ergebnisse konnten zeigen, dass eine Korrelation bei der Regulation der zirkadianen Uhr und der Autophagie besteht. Um den Effekt der Regulation der zirkadianen Uhr auf die Autophagie in Fibroblasten näher zu charakterisieren, wurden im nächsten Schritt die Autophagielevel in konfluenten, synchronisierten NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten untersucht.

Die Analyse zeigte, dass die Proteinlevel von LC3-II oszillatorische Muster mit einer Periodenlänge von etwa 24 Stunden aufwiesen. Diese befinden sich in Phase mit dem endogenen mRNA Expressionsmuster von *Per2* und sind antiphasisch zu endogenem *Bmal1*. Nach dem *Knock-down* mit einer *Bmal1* siRNA waren die NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten arrhythmisch. Außerdem verlieren die oszillierenden Autophagielevel unter den *Bmal1* *Knock-down* Bedingungen ihre Rhythmizität, was darauf hinweist, dass die zirkadiane Uhr in murinen Fibroblasten auf die rhythmischen Oszillationen der Autophagie einwirkt. Abweichend zu dem oszillierenden LC3-II Proteinlevel erwiesen sich die mRNA Expressionsniveaus von *Map1/Lc3b* und einigen weiteren, im Autophagieprozess involvierten Genen, als nicht rhythmisch. Die hier gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die rhythmischen Autophagielevel in den synchronisierten NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen von einer funktionalen zirkadianen Uhr abhängig sind.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass man durch *Knock-downs* von Uhrgenen wie *Per2* und *Nr1d1* in NIH3T3-Fibroblasten nicht nur die Rhythmizität der Autophagielevel, sondern auch die absoluten Autophagielevel reduzieren kann. Nach dem *Knock-down* von *Per2* oder *Nr1d1* sind die LC3-II Proteinlevel reduziert. Auch sind nach dem *Per2* und dem *Nr1d1* *Knock-down* signifikant verringerte ULK1 Proteinmengen erkennbar. Die Rolle von *Per2* im Alterungsprozess konnte schon bei *Per2* defizienten Mäusen beobachtet werden. So zeigen diese Mäuse eine vorzeitige Grauverfärbung ihres Felles während *Per1/2* defiziente Tiere neben einem beschleunigten Alterungsprozess auch eine deutlich reduzierte Fruchtbarkeit

aufwiesen (Lee 2005), welche wiederum durch die Autophagie positiv beeinflusst werden kann (Gawriluk et al. 2011) indem die Autophagie den mütterlichen Organismus nach der Befruchtung mit zusätzlichen Aminosäuren aus dem Proteinabbau versorgt (Yamamoto et al. 2014).

Eine Herunterregulierung von *Bmal1* zeigte im Gegensatz zu den *Knock-downs* mit *Per2* und *Nr1d1* keinen signifikanten Einfluss auf die LC3-II Proteinlevel. Auch die Proteinmengen oder die mRNA Expressionslevel von *Ulk1* waren nach dem *Bmal1 Knock-down* nicht verringert. Die Analyse des autophagischen Flux ergab jedoch, dass auch *Bmal1* einen Einfluss auf die Autophagie hat. Da die Proteinlevel von p62, einem Protein welches man zur Bestimmung des autophagischen Flux verwenden kann (Bjorkoy, et al. 2009), nach dem *Bmal1 Knock-down* signifikant reduziert waren, reguliert auch *Bmal1* die Autophagie. Bei der Bestimmung der Genexpressionslevel von Autophagiegenen zeigte sich, dass *Bmal1* die Autophagie möglicherweise durch einen anderen Mechanismus als *Per2* regulieren könnte. Dies deuten auch die signifikant gestiegenen Expressionslevel von *Ctsl* und *Irgm1* an, welche nur beim *Bmal1 Knock-down* zu beobachten sind. Somit könnte die Autophagie, anders als beim *Per2* oder beim *Nr1d1 Knock-down*, eher über einen transkriptionalen Mechanismus reguliert werden. In Kombination mit der starken Korrelation zwischen dem Alter, der Autophagie und der Expression des Uhrgens *Bmal1* in den humanen primären Fibroblasten weisen diese Ergebnisse auch *Bmal1* eine Funktion in der Autophagie in Verbindung mit dem Alterungsprozess bei Abwesenheit einer funktionellen zirkadianen Uhr zu. Der Verlust von *Bmal1* führt, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit dem gleichen genetischen Hintergrund, zu einer verkürzten Lebensdauer und einem beschleunigten Alterungsprozess (Kondratov et al. 2006, Nadon 2006). In diesen vorzeitig alternden *Bmal1* defizienten Mäusen konnten neben Katarakten, Muskelabbau und kleineren Organen auch Defekte im Haarwachstum (Kondratov, et al. 2006), einem Biomarker für die Alterung (Harrison et al. 1988), nachgewiesen werden. Der Haarwuchs ist ein Prozess, der in hohem Maße von Fibroblasten abhängt. Diese sind sowohl für das Haarwachstum als auch für die Haarfollikelbildung verantwortlich (Driskell et al. 2013) und gerade die Haarfollikel können durch Rapamycin, einen Inhibitor von mTor und somit Autophagiestimulator, moduliert werden (Castilho et al. 2009). Zusätzlich weisen die vorzeitig alternden *Bmal1* defizienten Mäuse verringerte Mengen an subkutanem Fett auf (Kondratov, et al. 2006). Dies könnte auf einen Differenzierungsdefekt der Fibroblasten zu Adipozyten hinweisen. Es ist bereits publiziert, dass *Bmal1*, wie *Nr1d1* auch, sowohl eine wichtige Rolle im Glukosestoffwechsel als auch bei der Lipogenese (Rudic, et al. 2004) und der Differenzierung von Fibroblasten in Adipozyten

übernehmen (Chawla et al. 1993, Shimba et al. 2005). Auch die Autophagie moduliert die Differenzierung der Adipozyten, hauptsächlich um den Anteil an weißem und braunem Fett zu regulieren (Singh, et al. 2009), und wirkt regulierend auf metabolische Stoffwechselwege ein (Carroll et al. 2014, Roberts et al. 2014).

Diese Ergebnisse weisen auch darauf hin, dass *Ulk1* auf mRNA- oder Proteinebene in die mechanistische Regulation der Autophagie involviert sein könnte. So führte der *Knock-down* von *Per2* und *Nr1d1* in NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten zu signifikant verringerten ULK1 Proteinmengen außerdem zeigten sich deutlich reduzierte mRNA Expressionslevel für *Ulk1* in gealterten humanen primären Fibroblasten. In stationären murinen Fibroblasten und in *Cry1/2*-defizienten MEFs hingegen sind die mRNA Expressionslevel für *Ulk1* signifikant erhöht. Die Unterschiede in der ULK1 Regulation als auch die unterschiedlichen mRNA Expressionslevel spiegeln folglich die zelluläre Antwort auf verschiedene Stimuli wie Alterungsprozesse bei den humanen Fibroblasten oder genetischen *Knock-downs* bzw. *Knockouts* des zirkadianen Oszillators wieder, die transkriptionale sowie posttranslationale Antworten zur Folge haben können (Ma et al. 2012). Zum einen könnten diese Ergebnisse auf eine direkte Regulation von *Ulk1* durch die zirkadiane Uhr hinweisen, welche sich auf die Autophagie auswirkt. Zum anderen könnte der zirkadiane Oszillator über die Autophagie die Regulation von *Ulk1* beeinflussen. Für letzteres Modell sprechen Studien, die besagen, dass die ULK1 Proteinmenge durch Phosphorylierung und Ubiquitinierung über den mTor Signalweg reguliert wird (Kim et al. 2011, Nazio et al. 2013). Weitere Studien konnten zeigen, dass *Ulk1* durch die Phosphorylierung von AMPK positiv reguliert wird (Egan et al. 2011, Shang et al. 2011) und somit eine direkte Interaktion zwischen diesen beiden Komponenten besteht (Lee et al. 2010). Dennoch bedarf es weiteren Untersuchungen die klären, ob hier eine direkte Regulierung von ULK1 über die Autophagie durch einen zirkadian-abhängigen Mechanismus vorliegt.

Wegen seiner Rolle bei der Regulation der Autophagie in der Leber (Ma, et al. 2011) wurde auch *Cebpb* in diese Analyse einbezogen. Die Autophagie reduziert sich nach dem *Knock-down* von *Cebpb* deutlich. Dies zeigt die Wichtigkeit dieses Gens bei der Regulierung der Autophagie in murinen Fibroblasten auf. Im Gegensatz zu der Situation in der Leber, reguliert die zirkadiane Uhr die Autophagie in Fibroblasten nicht über *Cebpb*, da durch den *Knock-down* von *Per2*, *Nr1d1* oder *Bmal1* die Autophagielevel in den NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Zellen auch ohne Einflussnahme auf das mRNA Expressionsniveau von *Cebpb* vermindert wurden. Dass dennoch auch in einigen der hier ermittelten Ergebnissen die mRNA Expressionsmuster

parallel zu den gemessenen Autophagieleveln verlaufen, deutet darauf hin, dass *Cebpb* für mögliche zelluläre metabolische Veränderungen, welche oft mit einer Induktion oder Repression der Autophagie einhergehen, empfindlich ist. Erste Berichte, dass die Transkription von *Cebpb* durch einen Aminosäuremangel induziert werden kann, unterstützen diese These (Thiaville et al. 2008).

5.2 *Cry1/2*-defiziente Zellen haben erhöhte Autophagielevel

Um zu bestätigen, dass die zirkadiane Uhr die Autophagie in Fibroblasten reguliert, wurde anschließend der Effekt des zirkadianen Oszillators auf die Autophagie in *Cry1/2*-defizienten MEFs untersucht. Wie bereits publiziert resultiert das Nichtvorhandensein von *Cry1* und *Cry2* zu einem Verlust der zirkadianen Genexpression (van der Horst, et al. 1999, Ishida, et al. 2001). Das Fehlen von *Cry1* und *Cry2* führt zudem zu konstant erhöhten Expressionsniveaus von *Per1*, *Per2* und *Nr1d1*. Es war bereits bekannt, dass *in vitro* kultivierte SCN Schnitte von unter LL Bedingungen gehaltenen Tieren, rhythmische PER2 Oszillationen zeigen, welche den Verlust des zirkadianen Oszillators aufgrund des *Cry-Knockouts* zumindest zum Teil revertieren konnten (Ono et al. 2013). Die mRNA Level von *Bmal1* sind in diesen Zellen im Gegensatz dazu signifikant reduziert. Zusätzlich sind sowohl die Autophagielevel als auch der autophagische Flux signifikant erhöht. Somit weisen *Cry1/2* defiziente MEFs deutlich höhere Autophagielevel als Wildtyp MEFs auf. Diese Effekte spiegeln sich nicht in einem Anstieg der mRNA Expressionslevel von *Map1/Lc3b* wieder. Außerdem sind die mRNA Expressionsniveaus einiger Autophagie assoziierter Gene in den *Cry1/2 Knockout* Zellen signifikant erhöht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Autophagie in Fibroblasten auch durch (post-) transkriptionale Mechanismen reguliert werden kann.

Schlussfolgernd stützt der *Cry1/2 Knockout* die Ergebnisse in Bezug auf die Regulation von Uhrgenen wie *Bmal1*, *Per1*, *Per2* und *Nr1d1* in den gealterten humanen primären Fibroblasten, welche gegenläufig zu den *Cry1/2 Knockout* Zellen sind. Sowohl der autophagische Flux als auch die statischen autophagischen Proteinlevel waren in *Cry1/2* defizienten Zellen, verglichen zu der Reduzierung des autophagischen Flux in gealterten humanen primären Fibroblasten, signifikant erhöht und zeigten damit gegenteilige Ergebnisse.

Zusammengefasst zeigen sowohl das *Cry1/2 Knockout* Zellsystem als auch die humanen primären Fibroblasten eine positive Korrelation der Expressionslevel von *Per1*, *Per2* und *Nr1d1* mit dem autophagischen Flux während die mRNA Expressionslevel von *Bmal1* negativ mit der Autophagie korrelieren.

5.3 Alterungsprozesse beeinflussen die Expression von Uhrgenen und die Autophagie in humanen primären Fibroblasten

Publizierte Studien konnten sowohl eine Verbindung zwischen Alterungsprozessen und Autophagie als auch einen Zusammenhang zwischen dem Alter und der zirkadianen Uhr nachweisen (Makrides 1983, Kolker, et al. 2003). In dieser Arbeit wurde in humanen primären Fibroblasten untersucht, ob der fortschreitende Alterungsprozess in Zusammenhang mit der Regulation der Autophagie durch die zirkadiane Uhr stehen könnte. Gerade in Fibroblasten könnte dies von Bedeutung sein, da diese externen Umwelteinflüssen, internen Stressoren und Zellschäden ausgesetzt sind. Somit stehen sie unter ständiger hoher Belastung und sind auch im Alter auf eine funktionale Autophagiemaschinerie angewiesen.

Aus diesem Grund lag ein besonderes Augenmerk dieser Arbeit darauf, welche Auswirkungen die innere Uhr oder bestimmte Funktionen des zirkadianen Oszillators mit fortschreitendem Alter auf die Autophagie in menschlichen humanen primären Fibroblasten haben könnten und ob Alterungsprozesse diese Auswirkungen beeinflussen. Versuche in humanen primären Fibroblasten widerlegten die Annahme, dass der Verlust der zellulären Rhythmizität in diesen Zellen mit veränderten Autophagieleveln in Zusammenhang steht. Die zirkadiane Uhr oszilliert selbst im fortgeschrittenen Alter rhythmisch. Sie kann allerdings, auch wenn die absoluten mRNA Level der zirkadianen Gene stark verändert vorliegen, durch transkriptionale Kompensationsmechanismen immer noch Rhythmizität aufweisen (Dibner, et al. 2009). In unsynchronisierten gealterten humanen primären Fibroblasten sind die absoluten mRNA Expressionslevel von *Bmal1* stark hochreguliert, parallel dazu zeigten viele Gene des negativen und stabilisierenden Armes der Rückkopplungsschleife wie *Per1*, *Per2*, *Cry2* und *Nr1d1* in gealterten Zellen eine signifikante Reduktion der Expression. Die reduzierten mRNA Expressionslevel spiegeln sich auch auf Proteinebene wieder. Weiterhin konnten enge

Korrelationen zwischen Alter und den Expressionsleveln von *Bmall*, *Per1*, *Per2*, *Nr1d1* und *Cry2* festgestellt werden. Analog zu diesen Ergebnissen, wurde bereits in mehreren Fällen von altersbedingter Deregulierung von Uhrgenen berichtet (Weinert et al. 2001, Oishi et al. 2011, Chang, et al. 2013). Da andere Uhrgene wie *Clock*, *Cry1*, *Rora* und *Dbp* unter diesen Bedingungen keine signifikante Veränderungen aufwiesen, scheinen die veränderten zirkadianen Expressionslevel in gealterten humanen primären Fibroblasten genspezifisch zu sein und keinen generellen Effekt auf die Transkription von Uhrgenen widerzuspiegeln.

Übereinstimmend mit publizierten Daten, stehen sowohl die Autophagielevel als auch der autophagische Flux signifikant im Zusammenhang mit dem Spenderalter und sind mit fortgeschrittenem Alter deutlich reduziert (Zhang, et al. 2008). Aufgrund der biologischen Diversität der einzelnen Proben wiesen die Ergebnisse der hier gezeigten Korrelationsanalyse innerhalb der jeweiligen Altersgruppe eine relativ hohe Streuung auf. Da die hier verwendeten humanen primären Fibroblasten *in situ* gealtert sind, können sie im jeweiligen Organismus verschiedenen Faktoren wie Stress oder unterschiedlichen metabolischen Stoffwechselprozessen ausgesetzt gewesen sein. Externe Einflüsse wie UV-Strahlung wurden allerdings ausgeschlossen, da diese Hautproben von der unteren, sonnengeschützten Seite der weiblichen Brust isoliert wurden. Nach der Entnahme der Proben kann es während der kurzen Kultivierungsdauer in der Zellkultur außerdem zu einer selektiven Proliferation der Primärzellen gekommen sein; auch dies könnte die Streuung des Datensatzes erklären. Die gemessenen Effekte spiegelten sich schließlich auch in einer Reduktion der mRNA Expressionslevel von Autophagiegenen, wie *Ulk1* und *Map1/Lc3b*, bei steigendem Spenderalter wieder. Des Weiteren ist *Bmall* in humanen primären Fibroblasten sowohl auf Protein- als auch auf mRNA Expressionsebene im Alter signifikant erhöht, während *Per2* deutlich reduzierte Level aufweist. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Resultate der *Cry1/2 Knockout* Ergebnisse, welche sowohl in Bezug auf die Regulation der Uhrgene *Bmall* und *Per2* als auch in Bezug auf die Autophagielevel gegenläufig sind. Schlussfolgernd ergibt sich unter Berücksichtigung der Autophagielevel und der mRNA Expressionslevel der Uhrgene eine starke Korrelation zwischen dem Alter, der Autophagie und den Uhrgenen. Daher wurde an diesem Punkt die These aufgestellt, dass diese beiden Uhrgene in den gealterten humanen primären Fibroblasten zu den reduzierten autophagischen Leveln beitragen.

Ausgehend von dieser These und den reduzierten Autophagieleveln auf Protein- und mRNA Ebene in den gealterten humanen primären Fibroblasten, wurden die reduzierten

Autophagielevel in gealterten menschlichen Fibroblasten durch eine Erhöhung der zirkadianen Genexpression auf das Niveau junger Zellen wieder hergestellt. Neben der bestätigten Transfektionseffizienz mittels mRNA Analyse, zeigte die Mikroskopieanalyse, dass eine gleichmäßige GFP-Verteilung im Zytoplasma und im Nukleus vorlag während PER2-GFP eine ungleichmäßige subzelluläre Verteilung aufwies. Diese spiegelt eventuell die verschiedenen Phosphorylierungszustände und deren Einfluss auf die Kernlokalisierungsregulation wieder (Yagita et al. 2000), welche für diese Experimente jedoch keine Bedeutung hatten. Die Autophagielevel weisen eine signifikante Erhöhung auf, dies spiegelt sich auch in einem leichten Anstieg der mRNA Expressionslevel diverser Autophagiegene (*Map1/Lc3b*, *Ulk1*, *Ctsl*) wieder. Das erneute Ansteigen des Autophagielevels auf das Level der jungen Fibroblasten nach Hochregulierung von nur einem der schwächer exprimierten Gene in den gealterten Fibroblasten, *Per2*, zeigt, dass die zirkadiane Uhr eine zentrale Rolle bei der Regulation der Autophagie in gealterten Zellen, insbesondere beim Vorliegen einer Deregulierung von spezifischen Uhrgenen, einnimmt. Es wurde bereits mehrfach publiziert, dass *PER2* Level im Alter reduziert sind (Sellix et al. 2012, Duncan et al. 2013). Daten über *Rescue*-Experimente sind jedoch kaum vorhanden. Vergleichsstudien mit *Per2* defizienten Mäusen zeigten, dass Mäuse mittleren Alters Reproduktionsdefizite, vergleichbar mit denen der gealterten Wildtypgruppe, aufwiesen (Pilorz et al. 2008). Diese Reproduktionsdefizite können durch einen reduzierten autophagischen Flux, wie er besonders in den Wildtyp Mäusen vorliegt, ausgelöst werden. Gerade dieser ist aber für die richtige Entwicklung und das Überleben des Embryos von großer Bedeutung (Tsukamoto et al. 2014, Tsukamoto et al. 2014).

5.4 *Per2* verbindet die zirkadiane Uhr mit dem AMPK Signalweg

Die Autophagie wird, als Reaktion auf diverse Arten von Stress, hochreguliert. (Klionsky, et al. 2013). Ein möglicher Auslöser ist akuter Nährstoffmangel, eine Situation bei der der Organismus nicht mehr ausreichend mit wichtigen Makromolekülen versorgt wird. Unter Nährstoffmangel können sowohl der AMPK als auch der mTor Signalweg, beide durch Nährstoffe wie Glukose oder Aminosäuren regulier- und beeinflussbar (Dann, et al. 2007),

durch die Phosphorylierung von AMPK und die Inhibition von mTor aktiviert werden, wodurch es zu einem Anstieg der Autophagie kommen kann.

In murinen NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten konnte unter Nährstoffmangel der Anstieg der Autophagie durch die gleichzeitige Inhibition von mTor und der Phosphorylierung von AMPK beobachtet werden. Die Inhibition des mTor Signalweges zeigte jedoch keine Auswirkungen, während die Inhibition der AMPK Aktivität zu einer sichtbaren Reduktion der Autophagielevel führte. Ausgehend von diesen Ergebnissen, scheint der AMPK Signalweg unter den hier vorliegenden Bedingungen eine wesentlichere Aufgabe bei der Regulation der Autophagie einzunehmen.

Schon bei den humanen primären Fibroblasten fiel die Korrelation zwischen dem Alter, der Autophagie und der Expression der Uhrgene *Per2* und *Bmal1* auf. In NIH3T3-*Bmal1*-Luc-Fibroblasten reduzierte sich der Anteil an phosphoryliertem AMPK nur durch einen siRNA *Knock-down* gegen *Per2*, im Vergleich zu dem *Knock-down* gegen *Bmal1*, signifikant. Dies ist ein Indiz dafür, dass die zirkadiane Uhr die Autophagie über den AMPK Signalweg reguliert. Im Gegensatz zu den signifikant erhöhten AMPK Proteinleveln, spiegeln sich diese Effekte nicht in einer signifikanten Erhöhung der mRNA Expressionslevel der katalytischen und der regulatorischen AMPK Untereinheiten wieder. Zusätzlich zeigen auch die gemessenen AMPK Kinasen keine signifikanten Veränderungen ihrer mRNA Expressionslevel. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Funktion von AMPK über posttranslationale Modifikationen oder individuelle Untereinheiten reguliert werden muss. Die posttranslationale Regulation von AMPK könnte über ULK1 stattfinden, denn es wurde gezeigt, dass ULK1 einen Interaktionspartner für alle Untereinheiten von AMPK darstellt (Behrends et al. 2010, Lee, et al. 2010) und dass der ULK1 Komplex durch eine direkte Phosphorylierung von AMPK aktiviert wird (Egan, et al. 2011, Kim, et al. 2011). Die Ergebnisse des *Per2 Knock-downs* stützen diese These, auch dort konnte beobachtet werden, dass die ULK1 Proteinlevel deutlich reduziert waren während die mRNA Expressionslevel unverändert blieben.

AMPK konnte, neben der Interaktion mit ULK1, weitere regulatorische Funktionen im Glukose- und Insulinstoffwechselweg (Dann, et al. 2007, Zhang et al. 2012), bei der Phosphorylierung von Lipiden (Watt et al. 2006, Ahmadian et al. 2011) und die Interaktion mit der zirkadianen Uhr nachgewiesen werden. Dabei reguliert AMPK die Stabilität von CRY1, einem zirkadianen Komponenten des negativen Armes der Rückkopplungsschleife (Lamia, et al. 2009). Die durch Phosphorylierung erfolgte Regulierung dieses

Oszillatorkomponenten führt zu einer Bindung des im Proteinabbau involvierten F-Box Proteins FBXL3 an CRY1 und Ubiquitin-vermittelter Degradation (Godinho, et al. 2007, Siepka, et al. 2007). Weiterhin konnte AMPK, durch die Phosphorylierung von CK1 ϵ an Serin389, mit der zirkadianen Uhr in Verbindung gebracht werden. Diese Phosphorylierung resultiert in einer gesteigerten CK1 ϵ Aktivität und führt zu einem Abbau von PER2 (Um et al. 2007). Eine Studie mit AMPK defizienten Mäusen zeigte einen weiteren wichtigen Aspekt; sie konnte belegen, dass AMPK den zirkadianen Oszillator in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Ausmaße beeinflussen konnte (Um et al. 2011).

Aus den bisher publizierten Ergebnissen wurde geschlossen, dass der AMPK Signalweg eine zentrale Schnittstelle zwischen der zirkadianen Uhr und der Autophagie darstellt. Aufgrund der vorliegenden Daten kann diese Aussage weiter eingegrenzt werden. Komponenten des negativen Armes der Rückkopplungsschleife, insbesondere *Per2*, verknüpfen die zirkadiane Uhr über den AMPK Signalweg mit der Autophagie. Dennoch bedarf es weiteren Untersuchungen, da der mechanistische Hintergrund nicht eindeutig geklärt werden konnte.

5.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten deutliche Indizien für eine regulatorische Funktion der zirkadianen Uhr, insbesondere von *Per2*, auf die Autophagie. Allerdings sollten weitere Experimente folgen, um diese Hypothese zu unterstützen. Zunächst wären weitere Experimente im Zusammenhang mit *Per2* und der mechanistischen Wirkungsweise auf AMPK von Bedeutung. Neben der Untersuchung des Phosphorylierungsstatus und der AMPK Kinasen sollten auch die zellulären Level von NAD⁺/NADH und die Enzymaktivität von NAMPT überprüft werden. Aus Veröffentlichungen ist bereits bekannt, dass sowohl NAD⁺ als auch AMPK rhythmisch oszillieren (Lamia, et al. 2009, Nakahata, et al. 2009, Ramsey, et al. 2009), daher könnten sie als Verbindungsglied zwischen dem zirkadianen und den metabolisch regulierten autophagischen Prozessen fungieren (Dann, et al. 2007, Alers, et al. 2012).

Ein ferner zu untersuchender Aspekt ist die Rolle von *Ulk1*, weiteren Komponenten und ihrer molekularen Interaktionspartner, bevorzugt im zirkadianen Bereich, und deren regulatorische Funktion. Erste vielversprechende Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass eine Interaktion mit oder über Komponenten der zirkadianen Uhr stattfindet. Letztendlich sollte auch die Funktion von BMAL1 im Zusammenhang mit Autophagie und Alterungsprozessen ermittelt werden. Diese scheint sich, nach ersten Ergebnissen, deutlich von dem regulatorischen *Per2* Prozess zu unterscheiden. Auch hier bedarf es weiterer Experimente um Interaktionspartner und Schnittstellen zwischen der Autophagie und der zirkadianen Uhr zu identifizieren.



6. Literatur

F. A. Agarraberes, S. R. Terlecky and J. F. Dice (1997). "An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation." J Cell Biol **137**(4): 825-34.

M. Ahmadian, M. J. Abbott, T. Tang, C. S. Hudak, Y. Kim, M. Bruss, M. K. Hellerstein, H. Y. Lee, V. T. Samuel, G. I. Shulman, Y. Wang, R. E. Duncan, C. Kang and H. S. Sul (2011). "Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype." Cell Metab **13**(6): 739-48.

M. Akashi and T. Takumi (2005). "The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1." Nat Struct Mol Biol **12**(5): 441-8.

M. Akashi, Y. Tsuchiya, T. Yoshino and E. Nishida (2002). "Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I (CKI) and CKI in Cultured Cells." Mol Cell Biol **22**(6): 1693-1703.

D. Albani, L. Polito, S. Batelli, S. De Mauro, C. Fracasso, G. Martelli, L. Colombo, C. Manzoni, M. Salmona, S. Caccia, A. Negro and G. Forloni (2009). "The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide." J Neurochem **110**(5): 1445-56.

U. Albrecht, Z. S. Sun, G. Eichele and C. C. Lee (1997). "A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light." Cell **91**(7): 1055-64.

L. Aldfresson, R. Karasek and T. Theorell (1982). "Myocardial infarction risk and psychosocial work environment an analysis of the male Swedish working force." Soc Sci Med **16**: 463-467.

S. Alers, A. S. Loffler, S. Wesselborg and B. Stork (2012). "Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks." Mol Cell Biol **32**(1): 2-11.

D. E. Alexander and D. A. Leib (2008). "Xenophagy in herpes simplex virus replication and pathogenesis." Autophagy **4**(1): 101-3.

U. Andersson, K. Filipsson, C. R. Abbott, A. Woods, K. Smith, S. R. Bloom, D. Carling and C. J. Small (2004). "AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake." J Biol Chem **279**(13): 12005-8.

F. Appelmans, R. Wattiaux and C. De Duve (1955). "Tissue Fractionation Studies: 5. The Association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver." Biochem J **59**.

D. M. Arble, J. Bass, A. D. Laposky, M. H. Vitaterna and F. W. Turek (2009). "Circadian timing of food intake contributes to weight gain." Obesity (Silver Spring) **17**(11): 2100-2.

D. M. Arble, K. M. Ramsey, J. Bass and F. W. Turek (2010). "Circadian disruption and metabolic disease: findings from animal models." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **24**(5): 785-800.

J. Arendt (2010). "Shift work: coping with the biological clock." Occup Med (Lond) **60**(1): 10-20.

J. Aschoff (1951). "Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter konstanten Umgebungsbedingungen." Die Naturwissenschaften **21**.

J. Aschoff (1965). "Circadian Rhythms in Man - A Self-Sustained Oscillator with An Inherent Frequency Underlies Human 24-Hour Periodicity." Science **148**.

J. Aschoff (1969). "Desynchronization and resynchronization of human circadian rhythms." Aerosp Med **40**(8): 844-9.

J. Aschoff and R. Wever (1962). "Spontanperiodik des Menschen bei Ausschluss aller Zeitgeber." Die Naturwissenschaften **49**(15).

G. Asher, D. Gatfield, M. Stratmann, H. Reinke, C. Dibner, F. Kreppel, R. Mostoslavsky, F. W. Alt and U. Schibler (2008). "SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation." Cell **134**(2): 317-28.

G. Atkinson, S. Fullick, C. Grindey and D. Maclaren (2008). "Exercise, energy balance and the shift worker." Sports Med **38**(8): 671-85.

E. Baena-Gonzalez, F. Rolland, J. M. Thevelein and J. Sheen (2007). "A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling." Nature **448**(7156): 938-42.

N. Bagheri, J. Stelling and F. J. Doyle, 3rd (2007). "Quantitative performance metrics for robustness in circadian rhythms." Bioinformatics **23**(3): 358-64.

C. L. Baker, J. J. Loros and J. C. Dunlap (2012). "The circadian clock of *Neurospora crassa*." FEMS Microbiol Rev **36**(1): 95-110.

A. Balsalobre, S. A. Brown, L. Marcacci, F. Tronche, C. Kellendonk, H. M. Reichardt, G. Schutz and U. Schibler (2000). "Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling." Science **289**(5488): 2344-7.

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

U. Bandyopadhyay, S. Kaushik, L. Varticovski and A. M. Cuervo (2008). "The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane." Mol Cell Biol **28**(18): 5747-63.

A. Bateman (1997). "The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein." Trends Biochem Sci **22**(1): 12-3.

C. Behrends, M. E. Sowa, S. P. Gygi and J. W. Harper (2010). "Network organization of the human autophagy system." Nature **466**(7302): 68-76.

W. J. Belden and J. C. Dunlap (2008). "SIRT1 is a circadian deacetylase for core clock components." Cell **134**(2): 212-4.

S. Bernales, K. L. McDonald and P. Walter (2006). "Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response." PLoS Biol **4**(12): e423.

D. M. Berson, F. A. Dunn and M. Takao (2002). "Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock." Science **295**(5557): 1070-3.

I. Bhatia-Kissova and N. Camougrand (2010). "Mitophagy in yeast: actors and physiological roles." FEMS Yeast Res **10**(8): 1023-34.

C. Bildt and H. Michelsen (2002). "Gender differences in the effects from working conditions on mental health: a 4-year follow-up." Int Arch Occup Environ Health **75**(4): 252-8.

R. A. Billington, A. A. Genazzani, C. Travelli and F. Condorelli (2008). "NAD depletion by FK866 induces autophagy." Autophagy **4**(3): 385-7.

G. Bjorkoy, T. Lamark, S. Pankiv, A. Overvatn, A. Brech and T. Johansen (2009). "Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1." Methods Enzymol **452**: 181-97.

G. Blobel (2013). "Christian de Duve (1917-2013)." Nature **498**(7454): 300-300.

A. M. Bolt, R. M. Douglas and W. T. Klimecki (2010). "Arsenite exposure in human lymphoblastoid cell lines induces autophagy and coordinated induction of lysosomal genes." Toxicol Lett **199**(2): 153-9.

P. Bonaldo and M. Sandri (2013). "Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy." Dis Model Mech **6**(1): 25-39.

N. P. Bos and M. Mirmiran (1990). "Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus." Brain Res **511**(1): 158-62.

P. Boya, F. Reggiori and P. Codogno (2013). "Emerging regulation and functions of autophagy." Nat Cell Biol **15**(7): 713-20.

M. Bradford (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochem **72**: 248-254.

D. L. Brown, D. Feskanich, B. N. Sanchez, K. M. Rexrode, E. S. Schernhammer and L. D. Lisabeth (2009). "Rotating night shift work and the risk of ischemic stroke." Am J Epidemiol **169**(11): 1370-7.

S. A. Brown, G. Zumbrunn, F. Fleury-Olela, N. Preitner and U. Schibler (2002). "Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks." Curr Biol **12**(18): 1574-83.

R. M. Buijs, J. Wortel and Y. X. Hou (1995). "Colocalization of gamma-aminobutyric acid with vasopressin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin in the rat suprachiasmatic nucleus." J Comp Neurol **358**(3): 343-52.

S. Bundesamt (2013). Statistisches Jahrbuch 2013 Deutschland und Internationales. S. Bundesamt. **1**: 689.

M. K. Bunger, L. D. Wilsbacher, S. M. Moran, C. Clendenin, L. A. Radcliffe, J. B. Hogenesch, M. C. Simon, J. S. Takahashi and C. A. Bradfield (2000). "Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals." Cell: 1009-1017.

E. Bünning and K. Stern (1930). "Über die tagesperiodischen Bewegungen der Primärblätter von *Phaseolus multiflorus*. II. Die Bewegungen bei Thermokonstanz." Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft **48**(7): 227-252.

C. Burman and N. T. Ktistakis (2010). "Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate." FEBS Lett **584**(7): 1302-12.

K. Cadwell, J. Y. Liu, S. L. Brown, H. Miyoshi, J. Loh, J. K. Lennerz, C. Kishi, W. Kc, J. A. Carrero, S. Hunt, C. D. Stone, E. M. Brunt, R. J. Xavier, B. P. Sleckman, E. Li, N. Mizushima, T. S. Stappenbeck and H. W. t. Virgin (2008). "A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells." Nature **456**(7219): 259-63.

C. Cailotto, J. Lei, J. van der Vliet, C. van Heijningen, C. G. van Eden, A. Kalsbeek, P. Pevet and R. M. Buijs (2009). "Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver." PLoS One **4**(5): e5650.

F. Camacho, M. Cilio, Y. Guo, D. M. Virshup, K. Patel, O. Khorkova, S. Styren, B. Morse, Z. Yao and G. A. Keesler (2001). "Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2." FEBS Lett **489**(2-3): 159-65.

C. Cao, S. Lu, R. Kivlin, B. Wallin, E. Card, A. Bagdasarian, T. Tamakloe, W. M. Chu, K. L. Guan and Y. Wan (2008). "AMP-activated protein kinase contributes to UV- and H₂O₂-induced apoptosis in human skin keratinocytes." J Biol Chem **283**(43): 28897-908.

C. Cao, S. Lu, R. Kivlin, B. Wallin, E. Card, A. Bagdasarian, T. Tamakloe, W. J. Wang, X. Song, W. M. Chu, N. Kouttab, A. Xu and Y. Wan (2009). "SIRT1 confers protection against UVB- and H₂O₂-induced cell death via modulation of p53 and JNK in cultured skin keratinocytes." J Cell Mol Med **13**(9B): 3632-43.

R. Cao, F. E. Anderson, Y. J. Jung, H. Dziema and K. Obrietan (2011). "Circadian regulation of mammalian target of rapamycin signaling in the mouse suprachiasmatic nucleus." Neuroscience **181**: 79-88.

L. Cardone, J. Hirayama, F. Giordano, T. Tamaru, J. J. Palvimo and P. Sassone-Corsi (2005). "Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1." Science **309**(5739): 1390-4.

B. Carroll, V. I. Korolchuk and S. Sarkar (2014). "Amino acids and autophagy: cross-talk and co-operation to control cellular homeostasis." Amino Acids.

M. Castel and J. F. Morris (2000). "Morphological heterogeneity of the GABAergic network in the suprachiasmatic nucleus, the brains circadian pacemaker." J Anat **196**: 1-13.

R. M. Castilho, C. H. Squarize, L. A. Chodosh, B. O. Williams and J. S. Gutkind (2009). "mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging." Cell Stem Cell **5**(3): 279-89.

E. Cebollero, F. Reggiori and C. Kraft (2012). "Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories." Int J Cell Biol **2012**: 182834.

A. Cegielska, K. F. Gietzen, A. Rivers and D. M. Virshup (1998). "Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis." J Biol Chem **273**(3): 1357-64.

N. Cermakian, L. Monaco, M. P. Pando, A. Dierich and P. Sassone-Corsi (2001). "Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the Period1 gene." EMBO J **20**(15): 3967-74.

E. Challet, I. Caldelas, C. Graff and P. Pevet (2003). "Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals." Biol Chem **384**(5): 711-9.

E. Challet, V. J. Poirel, A. Malan and P. Pevet (2003). "Light exposure during daytime modulates expression of Per1 and Per2 clock genes in the suprachiasmatic nuclei of mice." J Neurosci Res **72**(5): 629-37.

H. C. Chang and L. Guarente (2013). "SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging." Cell **153**(7): 1448-60.

A. Chawla and M. A. Lazar (1993). "Induction of Rev-ErbA alpha, an orphan receptor encoded on the opposite strand of the alpha-thyroid hormone receptor gene, during adipocyte differentiation." J Biol Chem **268**(22): 16265-9.

D. Chen, A. D. Steele, S. Lindquist and L. Guarente (2005). "Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1." Science **310**(5754): 1641.

M. Y. Cheng, E. L. Bittman, S. Hattar and Q. Y. Zhou (2005). "Regulation of prokineticin 2 expression by light and the circadian clock." BMC Neurosci **6**: 17.

M. Y. Cheng, C. M. Bullock, C. Li, A. G. Lee, J. C. Bermak, J. Belluzzi, D. R. Weaver, F. M. Leslie and Q. Y. Zhou (2002). "Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus." Nature **417**(6887): 405-10.

P. C. Cheung, I. P. Salt, S. P. Davies, D. G. Hardie and D. Carling (2000). "Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding." Biochem J **346 Pt 3**: 659-69.

H.-L. Chiang and J. F. Dice (1988). "Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal." J Biol Chem.

H. S. Choi, E. H. Jeong, T. G. Lee, S. Y. Kim, H. R. Kim and C. H. Kim (2013). "Autophagy Inhibition with Monensin Enhances Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by mTOR or Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Lung Cancer Cells." Tuberc Respir Dis (Seoul) **75**(1): 9-17.

A. Choy and C. R. Roy (2013). "Autophagy and bacterial infection: an evolving arms race." Trends Microbiol **21**(9): 451-6.

M. F. Covington, S. Panda, X. L. Liu, C. A. Strayer, D. R. Wagner and S. A. Kay (2001). "ELF3 modulates resetting of the circadian clock in Arabidopsis." Plant Cell **13**(6): 1305-15.

B. E. Crute, K. Seefeld, J. Gamble, B. E. Kemp and L. A. Witters (1998). "Functional domains of the alpha catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **273**(52): 35347-54.

A. M. Cuervo and J. F. Dice (1996). "A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes." Science **273**(5274): 501-3.

A. M. Cuervo and J. F. Dice (2000). "Age-related decline in chaperone-mediated autophagy." J Biol Chem **275**(40): 31505-13.

A. M. Cuervo and J. F. Dice (2000). "Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms." J Cell Sci **113 Pt 24**: 4441-50.

A. M. Cuervo, J. F. Dice and E. Knecht (1997). "A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins." J Biol Chem **272**(9): 5606-15.

A. M. Cuervo and F. Macian (2014). "Autophagy and the immune function in aging." Curr Opin Immunol **29C**: 97-104.

A. M. Curtis, S. B. Seo, E. J. Westgate, R. D. Rudic, E. M. Smyth, D. Chakravarti, G. A. FitzGerald and P. McNamara (2004). "Histone acetyltransferase-dependent chromatin remodeling and the vascular clock." J Biol Chem **279**(8): 7091-7.

C. A. Czeisler, A. J. Chiasera and J. F. Duffy (1991). "Research on sleep, circadian rhythms and aging: applications to manned spaceflight." Exp Gerontol **26**(2-3): 217-32.

S. Daan (2001). "Jürgen Aschoff 1913-1998: A life of duty, wit and vision." Zeitgebers, Entrainment and Masking of the Circadian System, K. Honma and S. Honma (eds.), University of Hokkaido Press, Sapporo, Japan: 17-47.

S. Daan, G. Block and J. Aschoff (1996). "In memoriam to Dr. Colin Stephenson Pittendrigh." Journal of Biological Rhythms **11**(2): 91-92.

F. Damiola, N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela and U. Schibler (2000). "Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus." Genes Dev **14**(23): 2950-61.

S. G. Dann, A. Selvaraj and G. Thomas (2007). "mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer." Trends Mol Med **13**(6): 252-9.

C. De Duve, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux and F. Appelmanns (1955). "Tissue Fractionation Studies 6. Intracellular Distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." Biochem J **60**.

J. J. DeMairan (1729). "Observation botanique." Histoire de l'Académie royale des sciences

J. Dengjel, A. R. Kristensen and J. S. Andersen (2008). "Ordered bulk degradation via autophagy." Autophagy **4**(8): 1057-9.

J. Dey, A. J. Carr, F. R. Cagampang, A. S. Semikhodskii, A. S. Loudon, M. H. Hastings and E. S. Maywood (2005). "The tau mutation in the Syrian hamster differentially reprograms the circadian clock in the SCN and peripheral tissues." J Biol Rhythms **20**(2): 99-110.

C. Dibner, D. Sage, M. Unser, C. Bauer, T. d'Eysmond, F. Naef and U. Schibler (2009). "Circadian gene expression is resilient to large fluctuations in overall transcription rates." EMBO J **28**(2): 123-34.

C. Dibner, U. Schibler and U. Albrecht (2010). "The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks." Annu Rev Physiol **72**: 517-49.

J. F. Dice (1982). "Altered degradation of proteins microinjected into senescent human fibroblasts." J Biol Chem **257**(24): 14624-7.

J. F. Dice (1990). "Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis." TIBS **15**.

J. F. Dice (2000). Lysosomal pathways of protein degradation, Landes Bioscience.

J. F. Dice (2007). "Chaperone-mediated autophagy." Autophagy **3**(4): 295-9.

V. M. Dilman (1971). "Age-associated elevation of hypothalamic, threshold to feedback control, and its role in development, ageing, and disease." Lancet **1**(7111): 1211-9.

M. Doi, S. Cho, I. Yujnovsky, J. Hirayama, N. Cermakian, A. C. Cato and P. Sassone-Corsi (2007). "Light-inducible and clock-controlled expression of MAP kinase phosphatase 1 in mouse central pacemaker neurons." J Biol Rhythms **22**(2): 127-39.

K. Dokladny, M. N. Zuhl, M. Mandell, D. Bhattacharya, S. Schneider, V. Deretic and P. L. Moseley (2013). "Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: heat shock response and autophagy." J Biol Chem **288**(21): 14959-72.

G. Dong and S. S. Golden (2008). "How a cyanobacterium tells time." Curr Opin Microbiol **11**(6): 541-6.

G. Donmez, A. Arun, C. Y. Chung, P. J. McLean, S. Lindquist and L. Guarente (2012). "SIRT1 protects against alpha-synuclein aggregation by activating molecular chaperones." J Neurosci **32**(1): 124-32.

G. Donmez, D. Wang, D. E. Cohen and L. Guarente (2010). "SIRT1 suppresses beta-amyloid production by activating the alpha-secretase gene ADAM10." Cell **142**(2): 320-32.

S. Doyle and M. Menaker (2007). "Circadian photoreception in vertebrates." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**: 499-508.

S. E. Doyle, A. M. Castrucci, M. McCall, I. Provencio and M. Menaker (2006). "Nonvisual light responses in the Rpe65 knockout mouse: rod loss restores sensitivity to the melanopsin system." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10432-7.

R. R. Driskell, B. M. Lichtenberger, E. Hoste, K. Kretzschmar, B. D. Simons, M. Charalambous, S. R. Ferron, Y. Herault, G. Pavlovic, A. C. Ferguson-Smith and F. M. Watt (2013). "Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair." Nature **504**(7479): 277-81.

I. L. Druwe and R. R. Vaillancourt (2010). "Influence of arsenate and arsenite on signal transduction pathways: an update." Arch Toxicol **84**(8): 585-96.

M. J. Duncan, J. R. Prochot, D. H. Cook, J. Tyler Smith and K. M. Franklin (2013). "Influence of aging on Bmal1 and Per2 expression in extra-SCN oscillators in hamster brain." Brain Res **1491**: 44-53.

J. C. Dunlap (1999). "Molecular bases for circadian clocks." Cell **96**(2): 271-90.

W. Dunn, Jr., L. Schroder and J. Aris (2013). Historical Overview of Autophagy. Autophagy and Cancer. H.-G. Wang, Springer New York. **8**: 1-24.

W. A. Dunn, Jr., J. M. Cregg, J. A. Kiel, I. J. van der Klei, M. Oku, Y. Sakai, A. A. Sibirny, O. V. Stasyk and M. Veenhuis (2005). "Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes." Autophagy **1**(2): 75-83.

I. Edery (2000). "Circadian rhythms in a nutshell." Physiol Genomics **3**(2): 59-74.

D. F. Egan, D. B. Shackelford, M. M. Mihaylova, S. Gelino, R. A. Kohnz, W. Mair, D. S. Vasquez, A. Joshi, D. M. Gwinn, R. Taylor, J. M. Asara, J. Fitzpatrick, A. Dillin, B. Viollet, M. Kundu, M. Hansen and R. J. Shaw (2011). "Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy." Science **331**(6016): 456-61.

M. Egli and C. H. Johnson (2013). "A circadian clock nanomachine that runs without transcription or translation." Curr Opin Neurobiol **23**(5): 732-40.

E. J. Eide, E. L. Vielhaber, W. A. Hinz and D. M. Virshup (2002). "The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase Iepsilon." J Biol Chem **277**(19): 17248-54.

E. L. Eskelinen, A. M. Cuervo, M. R. Taylor, I. Nishino, J. S. Blum, J. F. Dice, I. V. Sandoval, J. Lippincott-Schwartz, J. T. August and P. Saftig (2005). "Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2." Traffic **6**(11): 1058-61.

J. P. Etchegaray, C. Lee, P. A. Wade and S. M. Reppert (2003). "Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock." Nature **421**(6919): 177-82.

A. V. Everitt (1973). "The hypothalamic-pituitary control of ageing and age-related pathology." Exp Gerontol **8**(5): 265-77.

J. C. Farre, R. Krick, S. Subramani and M. Thumm (2009). "Turnover of organelles by autophagy in yeast." Curr Opin Cell Biol **21**(4): 522-30.

J. C. Farre, R. Manjithaya, R. D. Mathewson and S. Subramani (2008). "PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy." Dev Cell **14**(3): 365-76.

J. C. Farre and S. Subramani (2004). "Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process." Trends Cell Biol **14**(9): 515-23.

J. F. Feldman and M. N. Hoyle (1973). "Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*." Genetics **75**(4): 605-13.

Y. Feng, D. He, Z. Yao and D. J. Klionsky (2014). "The machinery of macroautophagy." Cell Res **24**(1): 24-41.

E. Ford, R. Voit, G. Liszt, C. Magin, I. Grummt and L. Guarente (2006). "Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription." Genes Dev **20**(9): 1075-80.

R. G. Foster and K. Wulff (2005). "The rhythm of rest and excess." Nat Rev Neurosci **6**(5): 407-14.

W. T. Frankenberger (2001). Environmental Chemistry of Arsenic, Taylor & Francis.

R. A. Frye (1999). "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity." Biochem Biophys Res Commun **260**(1): 273-9.

R. A. Frye (2000). "Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins." Biochem Biophys Res Commun **273**(2): 793-8.

N. Fujita, T. Itoh, H. Omori, M. Fukuda, T. Noda and T. Yoshimori (2008). "The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy." Mol Biol Cell **19**(5): 2092-100.

F. Gachon, E. Nagoshi, S. A. Brown, J. Ripperger and U. Schibler (2004). "The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology." Chromosoma **113**(3): 103-12.

S. Gaddameedhi, C. P. Selby, W. K. Kaufmann, R. C. Smart and A. Sancar (2011). "Control of skin cancer by the circadian rhythm." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(46): 18790-5.

M. Gallego and D. M. Virshup (2007). "Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 139-48.

E. Garbarino-Pico and C. B. Green (2007). "Posttranscriptional regulation of mammalian circadian clock output." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**: 145-56.

T. R. Gawriluk, A. N. Hale, J. A. Flaws, C. P. Dillon, D. R. Green and E. B. Rucker, 3rd (2011). "Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary." Reproduction **141**(6): 759-65.

N. Gekakis, D. Staknis, H. B. Nguyen, F. C. Davis, L. D. Wilsbacher, D. P. King, J. S. Takahashi and C. J. Weitz (1998). "Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism." Science **280**(5369): 1564-9.

K. F. Gietzen and D. M. Virshup (1999). "Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon." J Biol Chem **274**(45): 32063-70.

V. Giguere (1999). "Orphan nuclear receptors: from gene to function." Endocr Rev **20**(5): 689-725.

S. I. Godinho, E. S. Maywood, L. Shaw, V. Tucci, A. R. Barnard, L. Busino, M. Pagano, R. Kendall, M. M. Quwailid, M. R. Romero, J. O'Neill, J. E. Chesham, D. Brooker, Z. Lalanne, M. H. Hastings and P. M. Nolan (2007). "The after-hours mutant reveals a role for Fbxl3 in determining mammalian circadian period." Science **316**(5826): 897-900.

J. Goldsmith, B. Levine and J. Debnath (2014). "Autophagy and cancer metabolism." Methods Enzymol **542**: 25-57.

P. B. Gordon, I. Holen, M. Fosse, J. S. Rotnes and P. O. Seglen (1993). "Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium." J Biol Chem **268**(35): 26107-12.

P. R. Grant (2005). "The priming of periodical cicada life cycles." Trends Ecol Evol **20**(4): 169-74.

P. R. Graves and P. J. Roach (1995). "Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta." J Biol Chem **270**(37): 21689-94.

C. B. Green, J. S. Takahashi and J. Bass (2008). "The meter of metabolism." Cell **134**(5): 728-42.

D. J. Green and R. Gillette (1982). "Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice." Brain Res **245**(1): 198-200.

E. A. Griffin, Jr., D. Staknis and C. J. Weitz (1999). "Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock." Science **286**(5440): 768-71.

G. Groos and J. Hendriks (1982). "Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro." Neurosci Lett **34**(3): 283-8.

T. Grune (2000). "Oxidative stress, aging and the proteasomal system." Biogerontology **1**(1): 31-40.

F. Guillaumond, H. Dardente, V. Giguere and N. Cermakian (2005). "Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors." J Biol Rhythms **20**(5): 391-403.

M. C. Haigis and D. A. Sinclair (2010). "Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance." Annu Rev Pathol **5**: 253-95.

D. W. Hailey, A. S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P. K. Kim and J. Lippincott-Schwartz (2010). "Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation." Cell **141**(4): 656-67.

M. Hamasaki, T. Noda, M. Baba and Y. Ohsumi (2005). "Starvation triggers the delivery of the endoplasmic reticulum to the vacuole via autophagy in yeast." Traffic **6**(1): 56-65.

D. Hanahan (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." Journal of molecular biology **166**(4): 557-580.

T. Hara, A. Takamura, C. Kishi, S. Iemura, T. Natsume, J. L. Guan and N. Mizushima (2008). "FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells." J Cell Biol **181**(3): 497-510.

Y. Harada, M. Sakai, N. Kurabayashi, T. Hirota and Y. Fukada (2005). "Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta." J Biol Chem **280**(36): 31714-21.

D. G. Hardie (2004). "The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream." J Cell Sci **117**(Pt 23): 5479-87.

D. G. Hardie, F. A. Ross and S. A. Hawley (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(4): 251-62.

D. E. Harrison and J. R. Archer (1988). "Biomarkers of aging: tissue markers. Future research needs, strategies, directions and priorities." Exp Gerontol **23**(4-5): 309-25.

J. W. Hastings and B. M. Sweeney (1958). "A persistent diurnal rhythm on luminescence in *Gonyaulax polyedra*." Biol Bulletin.

M. H. Hastings, A. B. Reddy and E. S. Maywood (2003). "A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease." Nat Rev Neurosci **4**(8): 649-61.

A. Hayat (2013). Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging: Volume 1 - Molecular Mechanisms, Elsevier Science.

G. He, Y. Wang, X. Pang and B. Zhang (2014). "Inhibition of autophagy induced by TSA sensitizes colon cancer cell to radiation." Tumour Biol **35**(2): 1003-11.

W. He, J. C. Newman, M. Z. Wang, L. Ho and E. Verdin (2012). "Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism." Trends Endocrinol Metab **23**(9): 467-76.

K. Hedbacker and M. Carlson (2008). "SNF1/AMPK pathways in yeast." Front Biosci **13**: 2408-20.

G. V. Helgason, M. Karvela and T. L. Holyoake (2011). "Kill one bird with two stones: potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML." Blood **118**(8): 2035-43.

K. Henke (2009). Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment, Wiley.

M. L. Hermes, E. M. Coderre, R. M. Buijs and L. P. Renaud (1996). "GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat." J Physiol **496** (Pt 3): 749-57.

A. Hida, N. Koike, M. Hirose, M. Hattori, Y. Sakaki and H. Tei (2000). "The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription." Genomics **65**(3): 224-33.

G. Hildebrandt, M. Moser and M. Lehofer (1998). Chronobiologie und Chronomedizin: biologische Rhythmen, medizinische Konsequenzen, Hippokrates.

J. Hirayama, S. Sahar, B. Grimaldi, T. Tamaru, K. Takamatsu, Y. Nakahata and P. Sassone-Corsi (2007). "CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function." Nature **450**(7172): 1086-1090.

M. A. Hofman and D. F. Swaab (2006). "Living by the clock: the circadian pacemaker in older people." Ageing Res Rev **5**(1): 33-51.

J. B. Hogenesch, W. K. Chan, V. H. Jackiw, R. C. Brown, Y. Z. Gu, M. Pray-Grant, G. H. Perdew and C. A. Bradfield (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.

J. B. Hogenesch, Y. Z. Gu, S. Jain and C. A. Bradfield (1998). "The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(10): 5474-9.

S. Honma and K. Honma (1999). "Light-induced uncoupling of multioscillatory circadian system in a diurnal rodent, Asian chipmunk." Am J Physiol **276**(5 Pt 2): R1390-6.

S. Honma, T. Kawamoto, Y. Takagi, K. Fujimoto, F. Sato, M. Noshiro, Y. Kato and K. Honma (2002). "Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock." Nature **419**(6909): 841-4.

E. R. Hudson, D. A. Pan, J. James, J. M. Lucocq, S. A. Hawley, K. A. Green, O. Baba, T. Terashima and D. G. Hardie (2003). "A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias." Curr Biol **13**(10): 861-6.

H. Inoue, H. Nojima and H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-28.

S. T. Inouye and H. Kawamura (1979). "Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(11): 5962-6.

Y. Ishida, K. Yagita, T. Fukuyama, M. Nishimura, M. Nagano, Y. Shigeyoshi, S. Yamaguchi, T. Komori and H. Okamura (2001). "Constitutive expression and delayed light response of casein kinase Iepsilon and Idelta mRNAs in the mouse suprachiasmatic nucleus." J Neurosci Res **64**(6): 612-6.

E. Itakura, C. Kishi, K. Inoue and N. Mizushima (2008). "Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG." Mol Biol Cell **19**(12): 5360-72.

P. A. Jaeger and T. Wyss-Coray (2009). "All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration and neuroprotection." Mol Neurodegener **4**: 16.

J. S. Jakobsen, J. Waage, N. Rapin, H. C. Bisgaard, F. S. Larsen and B. T. Porse (2013). "Temporal mapping of CEBPA and CEBPB binding during liver regeneration reveals dynamic occupancy and specific regulatory codes for homeostatic and cell cycle gene batteries." Genome Res **23**(4): 592-603.

H. Jeong, D. E. Cohen, L. Cui, A. Supinski, J. N. Savas, J. R. Mazzulli, J. R. Yates, 3rd, L. Bordone, L. Guarente and D. Krainc (2012). "Sirt1 mediates neuroprotection from mutant huntingtin by activation of the TORC1 and CREB transcriptional pathway." Nat Med **18**(1): 159-65.

M. E. Jewett, R. E. Kronauer and C. A. Czeisler (1991). "Light-induced suppression of endogenous circadian amplitude in humans." Nature **350**(6313): 59-62.

M. Jiang, J. Wang, J. Fu, L. Du, H. Jeong, T. West, L. Xiang, Q. Peng, Z. Hou, H. Cai, T. Seredenina, N. Arbez, S. Zhu, K. Sommers, J. Qian, J. Zhang, S. Mori, X. W. Yang, K. L. Tamashiro, S. Aja, T. H. Moran, R. Luthi-Carter, B. Martin, S. Maudsley, M. P. Mattson, R. H. Cichewicz, C. A. Ross, D. M. Holtzman, D. Krainc and W. Duan (2012). "Neuroprotective role of Sirt1 in mammalian models of Huntington's disease through activation of multiple Sirt1 targets." Nat Med **18**(1): 153-8.

X. Jiang, C. Chen, W. Zhao and Z. Zhang (2013). "Sodium arsenite and arsenic trioxide differently affect the oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in A549 cells: an implication for the paradoxical mechanism." Environ Toxicol Pharmacol **36**(3): 891-902.

X. Jin, L. P. Shearman, D. R. Weaver, M. J. Zylka, G. J. de Vries and S. M. Reppert (1999). "A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock." Cell **96**(1): 57-68.

C. H. Johnson (1990). "An Atlas of Phase Responses Curves for Circadian and Circatidal Rhythms." Vanderbilt University Dept. of Biology.

C. H. Johnson (1992). "Phase Response Curves - What can they tell us about circadian clocks." Special Lecture.

C. H. Johnson and T. Kondo (1992). "Light pulses induce "singular" behavior and shorten the period of the circadian phototaxis rhythm in the CW15 strain of Chlamydomonas." J Biol Rhythms **7**(4): 313-27.

E. C. Johnson, N. Kazgan, C. A. Bretz, L. J. Forsberg, C. E. Hector, R. J. Worthen, R. Onyenwoke and J. E. Brenman (2010). "Altered metabolism and persistent starvation behaviors caused by reduced AMPK function in Drosophila." PLoS One **5**(9).

M. S. Johnson (1939). "Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white-footed mice (Peromyscus)." J Exp Zool.

M. J. Jonker, J. P. Melis, R. V. Kuiper, T. V. van der Hoeven, P. F. Wackers, J. Robinson, G. T. van der Horst, M. E. Dolle, J. Vijg, T. M. Breit, J. H. Hoeijmakers and H. van Steeg (2013). "Life spanning murine gene expression profiles in relation to chronological and pathological aging in multiple organs." Aging Cell **12**(5): 901-9.

Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." EMBO J **19**(21): 5720-8.

F. Kalfalah, S. Sobek, B. Bornholz, C. Gotz-Rosch, J. Tigges, E. Fritsche, J. Krutmann, K. Kohrer, R. Deenen, S. Ohse, M. Boerries, H. Busch and F. Boege (2014). "Inadequate mitobiogenesis in primary dermal fibroblasts from old humans is associated with impairment of PGC1A-independent stimulation." Exp Gerontol **56**: 59-68.

A. Kalsbeek and R. M. Buijs (1992). "Peptidergic transmitters of the suprachiasmatic nuclei and the control of circadian rhythmicity." Prog Brain Res **92**: 321-33.

A. Kalsbeek, R. M. Buijs, J. J. van Heerikhuize, M. Arts and T. P. van der Woude (1992). "Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release." Brain Res **580**(1-2): 62-7.

S. Kaushik, U. Bandyopadhyay, S. Sridhar, R. Kiffin, M. Martinez-Vicente, M. Kon, S. J. Orenstein, E. Wong and A. M. Cuervo (2011). "Chaperone-mediated autophagy at a glance." J Cell Sci **124**(Pt 4): 495-9.

G. A. Keesler, F. Camacho, Y. Guo, D. Virshup, C. Mondadori and Z. Yao (2000). "Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase I epsilon." Neuroreport **11**(5): 951-5.

R. V. Khapre, A. A. Kondratova, S. Patel, Y. Dubrovsky, M. Wrobel, M. P. Antoch and R. V. Kondratov (2014). "BMAL1-dependent regulation of the mTOR signaling pathway delays aging." Aging (Albany NY) **6**(1): 48-57.

J. A. Kiel (2010). "Autophagy in unicellular eukaryotes." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **365**(1541): 819-30.

G. T. Kim, S. H. Lee, J. I. Kim and Y. M. Kim (2014). "Quercetin regulates the sestrin 2-AMPK-p38 MAPK signaling pathway and induces apoptosis by increasing the generation of intracellular ROS in a p53-independent manner." Int J Mol Med **33**(4): 863-9.

J. Kim, M. Kundu, B. Viollet and K. L. Guan (2011). "AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1." *Nat Cell Biol* **13**(2): 132-41.

M. Kivimaki, M. Virtanen, M. Elovainio, A. Vaananen, L. Keltikangas-Jarvinen and J. Vahtera (2006). "Prevalent cardiovascular disease, risk factors and selection out of shift work." *Scand J Work Environ Health* **32**(3): 204-8.

A. Kleinhoonte (1929). Über die durch das Licht regulierten autonomen Bewegungen der Canavalia-Blätter, Société hollandaise des sciences.

D. J. Klionsky (2007). "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(11): 931-7.

D. J. Klionsky, F. C. Abdalla, H. Abeliovich, R. T. Abraham, A. Acevedo-Arozena, K. Adeli, L. Agholme, M. Agnello, P. Agostinis, J. A. Aguirre-Ghiso, H. J. Ahn, O. Ait-Mohamed, S. Ait-Si-Ali, T. Akematsu, S. Akira, H. M. Al-Younes, M. A. Al-Zeer, M. L. Albert, R. L. Albin, J. Alegre-Abarrategui, M. F. Aleo, M. Alirezaei, A. Almasan, M. Almonte-Becerril, A. Amano, R. Amaravadi, S. Amarnath, A. O. Amer, N. Andrieu-Abadie, V. Anantharam, D. K. Ann, S. Anoopkumar-Dukie, H. Aoki, N. Apostolova, G. Arancia, J. P. Aris, K. Asanuma, N. Y. Asare, H. Ashida, V. Askanas, D. S. Askew, P. Auberger, M. Baba, S. K. Backues, E. H. Baehrecke, B. A. Bahr, X. Y. Bai, Y. Bailly, R. Baiocchi, G. Baldini, W. Balduini, A. Ballabio, B. A. Bamber, E. T. Bampton, G. Banhegyi, C. R. Bartholomew, D. C. Bassham, R. C. Bast, Jr., H. Batoko, B. H. Bay, I. Beau, D. M. Bechet, T. J. Begley, C. Behl, C. Behrends, S. Bekri, B. Bellaire, L. J. Bendall, L. Benetti, L. Berliocchi, H. Bernardi, F. Bernassola, S. Besteiro, I. Bhatia-Kissova, X. Bi, M. Biard-Piechaczyk, J. S. Blum, L. H. Boise, P. Bonaldo, D. L. Boone, B. C. Bornhauser, K. R. Bortoluci, I. Bossis, F. Bost, J. P. Bourquin, P. Boya, M. Boyer-Guittaut, P. V. Bozhkov, N. R. Brady, C. Brancolini, A. Brech, J. E. Brenman, A. Brennand, E. H. Bresnick, P. Brest, D. Bridges, M. L. Bristol, P. S. Brookes, E. J. Brown, J. H. Brumell, N. Brunetti-Pierri, U. T. Brunk, D. E. Bulman, S. J. Bultman, G. Bultynck, L. F. Burbulla, W. Bursch, J. P. Butchar, W. Buzgariu, S. P. Bydlowski, K. Cadwell, M. Cahova, D. Cai, J. Cai, Q. Cai, B. Calabretta, J. Calvo-Garrido, N. Camougrand, M. Campanella, J. Campos-Salinas, E. Candi, L. Cao, A. B. Caplan, S. R. Carding, S. M. Cardoso, J. S. Carew, C. R. Carlin, V. Carmignac, L. A. Carneiro, S. Carra, R. A. Caruso, G. Casari, C. Casas, R. Castino, E. Cebollero, F. Cecconi, J. Celli, H. Chaachouay, H. J. Chae, C. Y. Chai, D. C. Chan, E. Y. Chan, R. C. Chang, C. M. Che, C. C. Chen, G. C. Chen, G. Q. Chen, M. Chen, Q. Chen, S. S. Chen, W. Chen, X. Chen, X. Chen, X. Chen, Y. G. Chen, Y. Chen, Y. Chen, Y. J. Chen, Z. Chen, A. Cheng, C. H. Cheng, Y. Cheng, H. Cheong, J. H. Cheong, S. Cherry, R. Chess-Williams, Z. H. Cheung, E. Chevet, H. L. Chiang, R. Chiarelli, T. Chiba, L. S. Chin, S. H. Chiou, F. V. Chisari, C. H. Cho, D. H. Cho, A. M. Choi, D. Choi, K. S. Choi, M. E. Choi, S. Chouaib, D. Choubey, V. Choubey, C. T. Chu, T. H. Chuang, S. H. Chueh, T. Chun, Y. J. Chwae, M. L. Chye, R. Ciarcia, M. R. Ciriolo, M. J. Clague, R. S. Clark, P. G. Clarke, R. Clarke, P. Codogno, H. A. Coller, M. I. Colombo, S. Comincini, M. Condello, F. Condorelli, M. R. Cookson, G. H. Coombs, I. Coppens, R. Corbalan, P. Cossart, P. Costelli, S. Costes, A. Coto-Montes, E. Couve, F. P. Coxon, J. M. Cregg, J. L. Crespo, M. J. Cronje, A. M. Cuervo,

J. J. Cullen, M. J. Czaja, M. D'Amelio, A. Darfeuille-Michaud, L. M. Davids, F. E. Davies, M. De Felici, J. F. de Groot, C. A. de Haan, L. De Martino, A. De Milito, V. De Tata, J. Debnath, A. Degterev, B. Dehay, L. M. Delbridge, F. Demarchi, Y. Z. Deng, J. Dengjel, P. Dent, D. Denton, V. Deretic, S. D. Desai, R. J. Devenish, M. Di Gioacchino, G. Di Paolo, C. Di Pietro, G. Diaz-Araya, I. Diaz-Laviada, M. T. Diaz-Meco, J. Diaz-Nido, I. Dikic, S. P. Dinesh-Kumar, W. X. Ding, C. W. Distelhorst, A. Diwan, M. Djavaheri-Mergny, S. Dokudovskaya, Z. Dong, F. C. Dorsey, V. Dosenko, J. J. Dowling, S. Doxsey, M. Dreux, M. E. Drew, Q. Duan, M. A. Duchosal, K. Duff, I. Dugail, M. Durbeej, M. Duszenko, C. L. Edelstein, A. L. Edinger, G. Egea, L. Eichinger, N. T. Eissa, S. Ekmekcioglu, W. S. El-Deiry, Z. Elazar, M. Elgendy, L. M. Ellerby, K. E. Eng, A. M. Engelbrecht, S. Engelender, J. Erenpreisa, R. Escalante, A. Esclatine, E. L. Eskelinen, L. Espert, V. Espina, H. Fan, J. Fan, Q. W. Fan, Z. Fan, S. Fang, Y. Fang, M. Fanto, A. Fanzani, T. Farkas, J. C. Farre, M. Faure, M. Fechheimer, C. G. Feng, J. Feng, Q. Feng, Y. Feng, L. Fesus, R. Feuer, M. E. Figueiredo-Pereira, G. M. Fimia, D. C. Fingar, S. Finkbeiner, T. Finkel, K. D. Finley, F. Fiorito, E. A. Fisher, P. B. Fisher, M. Flajolet, M. L. Florez-McClure, S. Florio, E. A. Fon, F. Fornai, F. Fortunato, R. Fotedar, D. H. Fowler, H. S. Fox, R. Franco, L. B. Frankel, M. Fransen, J. M. Fuentes, J. Fueyo, J. Fujii, K. Fujisaki, E. Fujita, M. Fukuda, R. H. Furukawa, M. Gaestel, P. Gailly, M. Gajewska, B. Galliot, V. Galy, S. Ganesh, B. Ganetzky, I. G. Ganley, F. B. Gao, G. F. Gao, J. Gao, L. Garcia, G. Garcia-Manero, M. Garcia-Marcos, M. Garmyn, A. L. Gartel, E. Gatti, M. Gautel, T. R. Gawriluk, M. E. Gegg, J. Geng, M. Germain, J. E. Gestwicki, D. A. Gewirtz, S. Ghavami, P. Ghosh, A. M. Giammarioli, A. N. Giatromanolaki, S. B. Gibson, R. W. Gilkerson, M. L. Ginger, H. N. Ginsberg, J. Golab, M. S. Goligorsky, P. Golstein, C. Gomez-Manzano, E. Goncu, C. Gongora, C. D. Gonzalez, R. Gonzalez, C. Gonzalez-Estevez, R. A. Gonzalez-Polo, E. Gonzalez-Rey, N. V. Gorbunov, S. Gorski, S. Goruppi, R. A. Gottlieb, D. Gozuacik, G. E. Granato, G. D. Grant, K. N. Green, A. Gregorc, F. Gros, C. Grose, T. W. Grunt, P. Gual, J. L. Guan, K. L. Guan, S. M. Guichard, A. S. Gukovskaya, I. Gukovsky, J. Gunst, A. B. Gustafsson, A. J. Halayko, A. N. Hale, S. K. Halonen, M. Hamasaki, F. Han, T. Han, M. K. Hancock, M. Hansen, H. Harada, M. Harada, S. E. Hardt, J. W. Harper, A. L. Harris, J. Harris, S. D. Harris, M. Hashimoto, J. A. Haspel, S. Hayashi, L. A. Hazelhurst, C. He, Y. W. He, M. J. Hebert, K. A. Heidenreich, M. H. Helfrich, G. V. Helgason, E. P. Henske, B. Herman, P. K. Herman, C. Hetz, S. Hilfiker, J. A. Hill, L. J. Hocking, P. Hofman, T. G. Hofmann, J. Hohfeld, T. L. Holyoake, M. H. Hong, D. A. Hood, G. S. Hotamisligil, E. J. Houwerzijl, M. Hoyer-Hansen, B. Hu, C. A. Hu, H. M. Hu, Y. Hua, C. Huang, J. Huang, S. Huang, W. P. Huang, T. B. Huber, W. K. Huh, T. H. Hung, T. R. Hupp, G. M. Hur, J. B. Hurley, S. N. Hussain, P. J. Hussey, J. J. Hwang, S. Hwang, A. Ichihara, S. Ilkhanizadeh, K. Inoki, T. Into, V. Iovane, J. L. Iovanna, N. Y. Ip, Y. Isaka, H. Ishida, C. Isidoro, K. Isobe, A. Iwasaki, M. Izquierdo, Y. Izumi, P. M. Jaakkola, M. Jaattela, G. R. Jackson, W. T. Jackson, B. Janji, M. Jendrach, J. H. Jeon, E. B. Jeung, H. Jiang, H. Jiang, J. X. Jiang, M. Jiang, Q. Jiang, X. Jiang, X. Jiang, A. Jimenez, M. Jin, S. Jin, C. O. Joe, T. Johansen, D. E. Johnson, G. V. Johnson, N. L. Jones, B. Joseph, S. K. Joseph, A. M. Joubert, G. Juhasz, L. Juillerat-Jeanneret, C. H. Jung, Y. K. Jung, K. Kaarniranta, A. Kaasik, T. Kabuta, M. Kadowaki, K. Kagedal, Y. Kamada, V. O. Kaminsky, H. H. Kampinga, H. Kanamori, C. Kang, K. B. Kang, K. I. Kang, R. Kang, Y. A. Kang, T. Kanki, T. D. Kanneganti, H. Kanno, A. G. Kanthasamy, A. Kanthasamy, V. Karantza, G. P. Kaushal, S. Kaushik, Y. Kawazoe, P. Y. Ke, J. H. Kehrl, A. Kelekar, C. Kerkhoff, D. H. Kessel, H. Khalil, J. A. Kiel, A. A. Kiger, A. Kihara, D. R. Kim, D. H. Kim, D. H. Kim, E. K. Kim, H. R. Kim, J. S. Kim, J. H. Kim, J. C. Kim, J. K. Kim, P. K. Kim, S. W. Kim, Y. S. Kim, Y. Kim, A. Kimchi, A. C. Kimmelman, J. S. King, T. J. Kinsella, V. Kirkin, L. A. Kirshenbaum, K. Kitamoto, K. Kitazato, L. Klein, W. T. Klimecki, J. Klucken, E. Knecht, B. C. Ko, J. C. Koch, H. Koga, J. Y. Koh, Y. H. Koh, M. Koike, M. Komatsu, E. Kominami, H. J. Kong, W. J. Kong, V. I. Korolchuk, Y. Kotake, M. I. Koukourakis, J. B. Kouri Flores, A. L. Kovacs, C.

Kraft, D. Krainc, H. Kramer, C. Kretz-Remy, A. M. Krichevsky, G. Kroemer, R. Kruger, O. Krut, N. T. Ktistakis, C. Y. Kuan, R. Kucharczyk, A. Kumar, R. Kumar, S. Kumar, M. Kundu, H. J. Kung, T. Kurz, H. J. Kwon, A. R. La Spada, F. Lafont, T. Lamark, J. Landry, J. D. Lane, P. Lapaquette, J. F. Laporte, L. Laszlo, S. Lavandero, J. N. Lavoie, R. Layfield, P. A. Lazo, W. Le, L. Le Cam, D. J. Ledbetter, A. J. Lee, B. W. Lee, G. M. Lee, J. Lee, J. H. Lee, M. Lee, M. S. Lee, S. H. Lee, C. Leeuwenburgh, P. Legembre, R. Legouis, M. Lehmann, H. Y. Lei, Q. Y. Lei, D. A. Leib, J. Leiro, J. J. Lemasters, A. Lemoine, M. S. Lesniak, D. Lev, V. V. Levenson, B. Levine, E. Levy, F. Li, J. L. Li, L. Li, S. Li, W. Li, X. J. Li, Y. B. Li, Y. P. Li, C. Liang, Q. Liang, Y. F. Liao, P. P. Liberski, A. Lieberman, H. J. Lim, K. L. Lim, K. Lim, C. F. Lin, F. C. Lin, J. Lin, J. D. Lin, K. Lin, W. W. Lin, W. C. Lin, Y. L. Lin, R. Linden, P. Lingor, J. Lippincott-Schwartz, M. P. Lisanti, P. B. Liton, B. Liu, C. F. Liu, K. Liu, L. Liu, Q. A. Liu, W. Liu, Y. C. Liu, Y. Liu, R. A. Lockshin, C. N. Lok, S. Lonial, B. Loos, G. Lopez-Berestein, C. Lopez-Otin, L. Lossi, M. T. Lotze, P. Low, B. Lu, B. Lu, B. Lu, Z. Lu, F. Luciano, N. W. Lukacs, A. H. Lund, M. A. Lynch-Day, Y. Ma, F. Macian, J. P. MacKeigan, K. F. Macleod, F. Madeo, L. Maiuri, M. C. Maiuri, D. Malagoli, M. C. Malicdan, W. Malorni, N. Man, E. M. Mandelkow, S. Manon, I. Manov, K. Mao, X. Mao, Z. Mao, P. Marambaud, D. Marazziti, Y. L. Marcel, K. Marchbank, P. Marchetti, S. J. Marciniak, M. Marcondes, M. Mardi, G. Marfe, G. Marino, M. Markaki, M. R. Marten, S. J. Martin, C. Martinand-Mari, W. Martinet, M. Martinez-Vicente, M. Masini, P. Matarrese, S. Matsuo, R. Matteoni, A. Mayer, N. M. Mazure, D. J. McConkey, M. J. McConnell, C. McDermott, C. McDonald, G. M. McInerney, S. L. McKenna, B. McLaughlin, P. J. McLean, C. R. McMaster, G. A. McQuibban, A. J. Meijer, M. H. Meisler, A. Melendez, T. J. Melia, G. Melino, M. A. Mena, J. A. Menendez, R. F. Menna-Barreto, M. B. Menon, F. M. Menzies, C. A. Mercer, A. Merighi, D. E. Merry, S. Meschini, C. G. Meyer, T. F. Meyer, C. Y. Miao, J. Y. Miao, P. A. Michels, C. Michiels, D. Mijaljica, A. Milojkovic, S. Minucci, C. Miracco, C. K. Miranti, I. Mitroulis, K. Miyazawa, N. Mizushima, B. Mograbi, S. Mohseni, X. Molero, B. Mollereau, F. Mollinedo, T. Momoi, I. Monastyrska, M. M. Monick, M. J. Monteiro, M. N. Moore, R. Mora, K. Moreau, P. I. Moreira, Y. Moriyasu, J. Moscat, S. Mostowy, J. C. Mottram, T. Motyl, C. E. Moussa, S. Muller, S. Muller, K. Munger, C. Munz, L. O. Murphy, M. E. Murphy, A. Musaro, I. Mysorekar, E. Nagata, K. Nagata, A. Nahimana, U. Nair, T. Nakagawa, K. Nakahira, H. Nakano, H. Nakatogawa, M. Nanjundan, N. I. Naqvi, D. P. Narendra, M. Narita, M. Navarro, S. T. Nawrocki, T. Y. Nazarko, A. Nemchenko, M. G. Netea, T. P. Neufeld, P. A. Ney, I. P. Nezis, H. P. Nguyen, D. Nie, I. Nishino, C. Nislow, R. A. Nixon, T. Noda, A. A. Noegel, A. Nogalska, S. Noguchi, L. Notterpek, I. Novak, T. Nozaki, N. Nukina, T. Nurnberger, B. Nyfeler, K. Obara, T. D. Oberley, S. Oddo, M. Ogawa, T. Ohashi, K. Okamoto, N. L. Oleinick, F. J. Oliver, L. J. Olsen, S. Olsson, O. Opota, T. F. Osborne, G. K. Ostrander, K. Otsu, J. H. Ou, M. Ouimet, M. Overholtzer, B. Ozpolat, P. Paganetti, U. Pagnini, N. Pallet, G. E. Palmer, C. Palumbo, T. Pan, T. Panaretakis, U. B. Pandey, Z. Papackova, I. Papassideri, I. Paris, J. Park, O. K. Park, J. B. Parys, K. R. Parzych, S. Patschan, C. Patterson, S. Pattingre, J. M. Pawelek, J. Peng, D. H. Perlmutter, I. Perrotta, G. Perry, S. Pervaiz, M. Peter, G. J. Peters, M. Petersen, G. Petrovski, J. M. Phang, M. Piacentini, P. Pierre, V. Pierrefite-Carle, G. Pierron, R. Pinkas-Kramarski, A. Piras, N. Piri, L. C. Plataniias, S. Poggeler, M. Poirot, A. Poletti, C. Pous, M. Pozuelo-Rubio, M. Praetorius-Ibba, A. Prasad, M. Prescott, M. Priault, N. Produit-Zengaffinen, A. Progulske-Fox, T. Proikas-Cezanne, S. Przedborski, K. Przyklenk, R. Puertollano, J. Puyal, S. B. Qian, L. Qin, Z. H. Qin, S. E. Quaggin, N. Raben, H. Rabinowich, S. W. Rabkin, I. Rahman, A. Rami, G. Ramm, G. Randall, F. Randow, V. A. Rao, J. C. Rathmell, B. Ravikumar, S. K. Ray, B. H. Reed, J. C. Reed, F. Reggiori, A. Regnier-Vigouroux, A. S. Reichert, J. J. Reiners, Jr., R. J. Reiter, J. Ren, J. L. Revuelta, C. J. Rhodes, K. Ritis, E. Rizzo, J. Robbins, M. Roberge, H. Roca, M. C. Roccheri, S. Rocchi, H. P. Rodemann, S. Rodriguez de Cordoba, B. Rohrer, I. B. Roninson, K. Rosen, M. M. Rost-Roszkowska, M. Rouis, K. M. Rouschop, F. Rovetta, B. P.

Rubin, D. C. Rubinsztein, K. Ruckdeschel, E. B. Rucker, 3rd, A. Rudich, E. Rudolf, N. Ruiz-Opazo, R. Russo, T. E. Rusten, K. M. Ryan, S. W. Ryter, D. M. Sabatini, J. Sadoshima, T. Saha, T. Saitoh, H. Sakagami, Y. Sakai, G. H. Salekdeh, P. Salomoni, P. M. Salvaterra, G. Salvesen, R. Salvioli, A. M. Sanchez, J. A. Sanchez-Alcazar, R. Sanchez-Prieto, M. Sandri, U. Sankar, P. Sansanwal, L. Santambrogio, S. Saran, S. Sarkar, M. Sarwal, C. Sasakawa, A. Sasnauskiene, M. Sass, K. Sato, M. Sato, A. H. Schapira, M. Scharl, H. M. Schatzl, W. Scheper, S. Schiaffino, C. Schneider, M. E. Schneider, R. Schneider-Stock, P. V. Schoenlein, D. F. Schorderet, C. Schuller, G. K. Schwartz, L. Scorrano, L. Sealy, P. O. Seglen, J. Segura-Aguilar, I. Seiliez, O. Seleverstov, C. Sell, J. B. Seo, D. Separovic, V. Setaluri, T. Setoguchi, C. Settembre, J. J. Shacka, M. Shanmugam, I. M. Shapiro, E. Shaulian, R. J. Shaw, J. H. Shelhamer, H. M. Shen, W. C. Shen, Z. H. Sheng, Y. Shi, K. Shibuya, Y. Shidoji, J. J. Shieh, C. M. Shih, Y. Shimada, S. Shimizu, T. Shintani, O. S. Shirihai, G. C. Shore, A. A. Sibirny, S. B. Sidhu, B. Sikorska, E. C. Silva-Zacarin, A. Simmons, A. K. Simon, H. U. Simon, C. Simone, A. Simonsen, D. A. Sinclair, R. Singh, D. Sinha, F. A. Sinicrope, A. Sirko, P. M. Siu, E. Sivridis, V. Skop, V. P. Skulachev, R. S. Slack, S. S. Smaili, D. R. Smith, M. S. Soengas, T. Soldati, X. Song, A. K. Sood, T. W. Soong, F. Sotgia, S. A. Spector, C. D. Spies, W. Springer, S. M. Srinivasula, L. Stefanis, J. S. Steffan, R. Stendel, H. Stenmark, A. Stephanou, S. T. Stern, C. Sternberg, B. Stork, P. Stralfors, C. S. Subauste, X. Sui, D. Sulzer, J. Sun, S. Y. Sun, Z. J. Sun, J. J. Sung, K. Suzuki, T. Suzuki, M. S. Swanson, C. Swanton, S. T. Sweeney, L. K. Sy, G. Szabadkai, I. Tabas, H. Taegtmeier, M. Tafani, K. Takacs-Vellai, Y. Takano, K. Takegawa, G. Takemura, F. Takeshita, N. J. Talbot, K. S. Tan, K. Tanaka, K. Tanaka, D. Tang, D. Tang, I. Tanida, B. A. Tannous, N. Tavernarakis, G. S. Taylor, G. A. Taylor, J. P. Taylor, L. S. Terada, A. Terman, G. Tettamanti, K. Thevissen, C. B. Thompson, A. Thorburn, M. Thumm, F. Tian, Y. Tian, G. Tocchini-Valentini, A. M. Tolkovsky, Y. Tomino, L. Tonges, S. A. Tooze, C. Tournier, J. Tower, R. Towns, V. Trajkovic, L. H. Travassos, T. F. Tsai, M. P. Tschann, T. Tsubata, A. Tsung, B. Turk, L. S. Turner, S. C. Tyagi, Y. Uchiyama, T. Ueno, M. Umekawa, R. Umemiya-Shirafuji, V. K. Unni, M. I. Vaccaro, E. M. Valente, G. Van den Berghe, I. J. van der Klei, W. van Doorn, L. F. van Dyk, M. van Egmond, L. A. van Grunsven, P. Vandenabeele, W. P. Vandenberghe, I. Vanhorebeek, E. C. Vaquero, G. Velasco, T. Vellai, J. M. Vicencio, R. D. Vierstra, M. Vila, C. Vindis, G. Viola, M. T. Viscomi, O. V. Voitsekhovskaja, C. von Haefen, M. Votruba, K. Wada, R. Wade-Martins, C. L. Walker, C. M. Walsh, J. Walter, X. B. Wan, A. Wang, C. Wang, D. Wang, F. Wang, F. Wang, G. Wang, H. Wang, H. G. Wang, H. D. Wang, J. Wang, K. Wang, M. Wang, R. C. Wang, X. Wang, X. Wang, Y. J. Wang, Y. Wang, Z. Wang, Z. C. Wang, Z. Wang, D. G. Wansink, D. M. Ward, H. Watada, S. L. Waters, P. Webster, L. Wei, C. C. Weihl, W. A. Weiss, S. M. Welford, L. P. Wen, C. A. Whitehouse, J. L. Whitton, A. J. Whitworth, T. Wileman, J. W. Wiley, S. Wilkinson, D. Willbold, R. L. Williams, P. R. Williamson, B. G. Wouters, C. Wu, D. C. Wu, W. K. Wu, A. Wyttenbach, R. J. Xavier, Z. Xi, P. Xia, G. Xiao, Z. Xie, Z. Xie, D. Z. Xu, J. Xu, L. Xu, X. Xu, A. Yamamoto, A. Yamamoto, S. Yamashina, M. Yamashita, X. Yan, M. Yanagida, D. S. Yang, E. Yang, J. M. Yang, S. Y. Yang, W. Yang, W. Y. Yang, Z. Yang, M. C. Yao, T. P. Yao, B. Yeganeh, W. L. Yen, J. J. Yin, X. M. Yin, O. J. Yoo, G. Yoon, S. Y. Yoon, T. Yorimitsu, Y. Yoshikawa, T. Yoshimori, K. Yoshimoto, H. J. You, R. J. Youle, A. Younes, L. Yu, L. Yu, S. W. Yu, W. H. Yu, Z. M. Yuan, Z. Yue, C. H. Yun, M. Yuzaki, O. Zabirnyk, E. Silva-Zacarin, D. Zacks, E. Zacksenhaus, N. Zaffaroni, Z. Zakeri, H. J. Zeh, 3rd, S. O. Zeitlin, H. Zhang, H. L. Zhang, J. Zhang, J. P. Zhang, L. Zhang, L. Zhang, M. Y. Zhang, X. D. Zhang, M. Zhao, Y. F. Zhao, Y. Zhao, Z. J. Zhao, X. Zheng, B. Zhivotovsky, Q. Zhong, C. Z. Zhou, C. Zhu, W. G. Zhu, X. F. Zhu, X. Zhu, Y. Zhu, T. Zoladek, W. X. Zong, A. Zorzano, J. Zschocke and B. Zuckerbraun (2012). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy." *Autophagy* 8(4): 445-544.

D. J. Klionsky and P. Codogno (2013). "The mechanism and physiological function of macroautophagy." J Innate Immun **5**(5): 427-33.

D. J. Klionsky, J. M. Cregg, W. A. Dunn, Jr., S. D. Emr, Y. Sakai, I. V. Sandoval, A. Sibirny, S. Subramani, M. Thumm, M. Veenhuis and Y. Ohsumi (2003). "A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes." Dev Cell **5**(4): 539-45.

D. J. Klionsky, E. L. Eskelinen and V. Deretic (2014). "Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused." Autophagy **10**(4): 549-51.

L. A. Knodler and J. Celli (2011). "Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy." Cell Microbiol **13**(9): 1319-27.

A. Knutsson (2003). "Health disorders of shift workers." Occup Med (Lond) **53**(2): 103-8.

A. Kochman, J. Skolimowski, L. Gebicka and D. Metodiewa (2003). "Antioxidant properties of newly synthesized N-propargylamine derivatives of nitroxyl: a comparison with deprenyl." Pol J Pharmacol **55**(3): 389-400.

Y. Koehler, E. M. Luther, S. Meyer, T. Schwerdtle and R. Dringen (2014). "Uptake and toxicity of arsenite and arsenate in cultured brain astrocytes." J Trace Elem Med Biol **28**(3): 328-37.

D. E. Kolker, H. Fukuyama, D. S. Huang, J. S. Takahashi, T. H. Horton and F. W. Turek (2003). "Aging alters circadian and light-induced expression of clock genes in golden hamsters." J Biol Rhythms **18**(2): 159-69.

M. Komatsu, H. Kurokawa, S. Waguri, K. Taguchi, A. Kobayashi, Y. Ichimura, Y. S. Sou, I. Ueno, A. Sakamoto, K. I. Tong, M. Kim, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Ueno, E. Kominami, H. Motohashi, K. Tanaka and M. Yamamoto (2010). "The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1." Nat Cell Biol **12**(3): 213-23.

R. V. Kondratov, A. A. Kondratova, V. Y. Gorbacheva, O. V. Vykhovanets and M. P. Antoch (2006). "Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock." Genes Dev **20**(14): 1868-73.

R. J. Konopka and S. Benzer (1971). "Clock mutants of *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(9): 2112-6.

R. D. Kornberg (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." Science **184**(4139): 868-71.

B. Kornmann, O. Schaad, H. Reinke, C. Saini and U. Schibler (2007). "Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**: 319-30.

Z. Kostova and D. H. Wolf (2003). "For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection." EMBO J **22**(10): 2309-17.

Y. Kouroku, E. Fujita, I. Tanida, T. Ueno, A. Isoai, H. Kumagai, S. Ogawa, R. J. Kaufman, E. Kominami and T. Momoi (2007). "ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation." Cell Death Differ **14**(2): 230-9.

A. Kramer, F. C. Yang, P. Snodgrass, X. Li, T. E. Scammell, F. C. Davis and C. J. Weitz (2001). "Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling." Science **294**(5551): 2511-5.

G. Kramer (1952). "Experiments on Bird Orientation *." Ibis **94**(2): 265-285.

S. Kraves and C. J. Weitz (2006). "A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity." Nat Neurosci **9**(2): 212-9.

R. Krick, Y. Muehe, T. Prick, S. Bremer, P. Schlotterhose, E. L. Eskelinen, J. Millen, D. S. Goldfarb and M. Thumm (2008). "Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes." Mol Biol Cell **19**(10): 4492-505.

R. Krick, Y. Muhe, T. Prick, M. Bredschneider, S. Bremer, D. Wenzel, E. L. Eskelinen and M. Thumm (2009). "Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic and morphological traits." Autophagy **5**(2): 270-2.

G. Kroemer and B. Levine (2008). "Autophagic cell death: the story of a misnomer." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(12): 1004-10.

J. Krutmann and P. Schroeder (2009). "Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model." J Invest Dermatol Symp Proc **14**(1): 44-9.

S. J. Kuhlman, S. R. Mackey and J. F. Duffy (2007). "Biological Rhythms Workshop I: introduction to chronobiology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**: 1-6.

M. Kumaresan and P. Riyazuddin (2001). "Overview of speciation chemistry of arsenic." Curr Sci **80**(7): 837-46.

K. Kume, M. J. Zylka, S. Sriram, L. P. Shearman, D. R. Weaver, X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings and S. M. Reppert (1999). "mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop." Cell **98**(2): 193-205.

Y. Kuramoto (2003). Chemical Oscillations, Waves, and Turbulence, Dover Publications.

E. Kvam and D. S. Goldfarb (2007). "Nucleus-vacuole junctions and piecemeal microautophagy of the nucleus in *S. cerevisiae*." Autophagy **3**(2): 85-92.

R. P. S. Kwok, J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Richards, H. P. Bächinger, R. G. Brennan, S. G. E. Roberts, M. R. Green and R. H. Goodman (1994). "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB." Nat Letters.

I. Kwon, J. Lee, S. H. Chang, N. C. Jung, B. J. Lee, G. H. Son, K. Kim and K. H. Lee (2006). "BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer." Mol Cell Biol **26**(19): 7318-30.

K. Y. Kwon, B. Viollet and O. J. Yoo (2011). "CCCP induces autophagy in an AMPK-independent manner." Biochem Biophys Res Commun **416**(3-4): 343-8.

C. P. Kyriacou and M. H. Hastings (2010). "Circadian clocks: genes, sleep, and cognition." Trends Cogn Sci **14**(6): 259-67.

U. K. Laemmli (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.

T. Lamark and T. Johansen (2012). "Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy." Int J Cell Biol **2012**: 736905.

K. A. Lamia, U. M. Sachdeva, L. DiTacchio, E. C. Williams, J. G. Alvarez, D. F. Egan, D. S. Vasquez, H. Juguilon, S. Panda, R. J. Shaw, C. B. Thompson and R. M. Evans (2009). "AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation." Science **326**(5951): 437-40.

K. A. Lamia, K. F. Storch and C. J. Weitz (2008). "Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(39): 15172-7.

G. Le Martelot, T. Claudel, D. Gatfield, O. Schaad, B. Kornmann, G. Lo Sasso, A. Moschetta and U. Schibler (2009). "REV-ERBalpha participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis." PLoS Biol **7**(9): e1000181.

C. Lee, J. P. Etchegaray, F. R. Cagampang, A. S. Loudon and S. M. Reppert (2001). "Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock." Cell **107**(7): 855-67.

C. Lee, D. R. Weaver and S. M. Reppert (2004). "Direct association between mouse PERIOD and CKIepsilon is critical for a functioning circadian clock." Mol Cell Biol **24**(2): 584-94.

C. C. Lee (2005). "The circadian clock and tumor suppression by mammalian period genes." Methods Enzymol **393**: 852-61.

I. H. Lee, L. Cao, R. Mostoslavsky, D. B. Lombard, J. Liu, N. E. Bruns, M. Tsokos, F. W. Alt and T. Finkel (2008). "A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3374-9.

J. Lee, Y. Lee, M. J. Lee, E. Park, S. H. Kang, C. H. Chung, K. H. Lee and K. Kim (2008). "Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex." Mol Cell Biol **28**(19): 6056-6065.

J. H. Lee, W. H. Yu, A. Kumar, S. Lee, P. S. Mohan, C. M. Peterhoff, D. M. Wolfe, M. Martinez-Vicente, A. C. Massey, G. Sovak, Y. Uchiyama, D. Westaway, A. M. Cuervo and R. A. Nixon (2010). "Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations." Cell **141**(7): 1146-58.

J. S. Lee, X. Zhang and Y. Shi (1996). "Differential interactions of the CREB/ATF family of transcription factors with p300 and adenovirus E1A." J Biol Chem **271**(30): 17666-74.

J. W. Lee, S. Park, Y. Takahashi and H. G. Wang (2010). "The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy." PLoS One **5**(11): e15394.

T. L. Leise, P. Indic, M. J. Paul and W. J. Schwartz (2013). "Wavelet meets actogram." J Biol Rhythms **28**(1): 62-8.

S. E. Lenk, D. L. Fisher and W. A. Dunn, Jr. (1991). "Regulation of protein secretion by crinophagy in perfused rat liver." Eur J Cell Biol **56**(2): 201-9.

B. Levine (2005). "Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense." Cell **120**(2): 159-62.

B. Levine and V. Deretic (2007). "Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol **7**(10): 767-77.

B. Levine, N. Mizushima and H. W. Virgin (2011). "Autophagy in immunity and inflammation." Nature **469**(7330): 323-35.

L. Li, Y. Chen and S. B. Gibson (2013). "Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation." Cell Signal **25**(1): 50-65.

W. W. Li, J. Li and J. K. Bao (2012). "Microautophagy: lesser-known self-eating." Cell Mol Life Sci **69**(7): 1125-36.

X. Li and N. Kazgan (2009). " Mammalian Sirtuins and Energy Metabolism." Int J Biol Sci.

X. Li, N. Sankrithi and F. C. Davis (2002). "Transforming growth factor-alpha is expressed in astrocytes of the suprachiasmatic nucleus in hamster: role of glial cells in circadian clocks." Neuroreport **13**(16): 2143-7.

P. Liang (1989). "[Electron microscopic study of mucus secretion in gastric carcinoma and its pathologic significance]." Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi **18**(3): 175-7.

A. P. Lieberman, R. Puertollano, N. Raben, S. Slaugenhaupt, S. U. Walkley and A. Ballabio (2012). "Autophagy in lysosomal storage disorders." Autophagy **8**(5): 719-30.

S. J. Lin, E. Ford, M. Haigis, G. Liszt and L. Guarente (2004). "Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH." Genes Dev **18**(1): 12-6.

A. C. Liu, D. K. Welsh, C. H. Ko, H. G. Tran, E. E. Zhang, A. A. Priest, E. D. Buhr, O. Singer, K. Meeker, I. M. Verma, F. J. Doyle, 3rd, J. S. Takahashi and S. A. Kay (2007). "Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network." Cell **129**(3): 605-16.

K. Liu and M. J. Czaja (2013). "Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy." Cell Death Differ **20**(1): 3-11.

Y. Liu, R. Dentin, D. Chen, S. Hedrick, K. Ravnskjaer, S. Schenk, J. Milne, D. J. Meyers, P. Cole, J. Yates, 3rd, J. Olefsky, L. Guarente and M. Montminy (2008). "A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange." Nature **456**(7219): 269-73.

C. Lopez-Otin, M. A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano and G. Kroemer (2013). "The hallmarks of aging." Cell **153**(6): 1194-217.

P. L. Lowrey, K. Shimomura, M. P. Antoch, S. Yamazaki, P. D. Zemenides, M. R. Ralph, M. Menaker and J. S. Takahashi (2000). "Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau." Science **288**(5465): 483-92.

M. A. Lynch-Day, D. Bhandari, S. Menon, J. Huang, H. Cai, C. R. Bartholomew, J. H. Brumell, S. Ferro-Novick and D. J. Klionsky (2010). "Trs85 directs a Ypt1 GEF, TRAPPIII, to the phagophore to promote autophagy." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(17): 7811-6.

D. Ma, S. Li, M. M. Molusky and J. D. Lin (2012). "Circadian autophagy rhythm: a link between clock and metabolism?" Trends Endocrinol Metab **23**(7): 319-25.

D. Ma and J. D. Lin (2012). "Circadian regulation of autophagy rhythm through transcription factor C/EBPbeta." Autophagy **8**(1): 124-5.

D. Ma, S. Panda and J. D. Lin (2011). "Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C/EBPbeta." EMBO J **30**(22): 4642-51.

X. Ma, M. Jin, Y. Cai, H. Xia, K. Long, J. Liu, Q. Yu and J. Yuan (2011). "Mitochondrial electron transport chain complex III is required for antimycin A to inhibit autophagy." Chem Biol **18**(11): 1474-81.

F. Madeo, N. Tavernarakis and G. Kroemer (2010). "Can autophagy promote longevity?" Nat Cell Biol **12**(9): 842-6.

E. Mahe, C. Nguyen and J. Arredondo (2014). "Crinophagy in neuroblastoma: a case report and review of the literature." Ultrastruct Pathol **38**(3): 237-41.

S. C. Makrides (1983). "Protein synthesis and degradation during aging and senescence." Biol Rev Camb Philos Soc **58**(3): 343-422.

R. Manjithaya, T. Y. Nazarko, J. C. Farre and S. Subramani (2010). "Molecular mechanism and physiological role of pexophagy." FEBS Lett **584**(7): 1367-73.

L. J. Martin, J. Gupta, S. S. Jyothula, M. Butsch Kovacic, J. M. Biagini Myers, T. L. Patterson, M. B. Ericksen, H. He, A. M. Gibson, T. M. Baye, S. Amirisetty, A. M. Tsoras, Y.

Sha, N. T. Eissa and G. K. Hershey (2012). "Functional variant in the autophagy-related 5 gene promoter is associated with childhood asthma." PLoS One **7**(4): e33454.

L. Marzella, J. Ahlberg and H. Glaumann (1981). "Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **36**(2-3): 219-34.

S. Masri, P. Rigor, M. Cervantes, N. Ceglia, C. Sebastian, C. Xiao, M. Roqueta-Rivera, C. Deng, Timothy F. Osborne, R. Mostoslavsky, P. Baldi and P. Sassone-Corsi (2014). "Partitioning Circadian Transcription by SIRT6 Leads to Segregated Control of Cellular Metabolism." Cell **158**(3): 659-672.

A. C. Massey, S. Kaushik, G. Sovak, R. Kiffin and A. M. Cuervo (2006). "Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(15): 5805-10.

R. Mathew and E. White (2011). "Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night." Curr Opin Genet Dev **21**(1): 113-9.

T. Matsuo, S. Yamaguchi, S. Mitsui, A. Emi, F. Shimoda and H. Okamura (2003). "Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo." Science **302**(5643): 255-9.

E. L. McDearmon, K. N. Patel, C. H. Ko, J. A. Walisser, A. C. Schook, J. L. Chong, L. D. Wilsbacher, E. J. Song, H. K. Hong, C. A. Bradfield and J. S. Takahashi (2006). "Dissecting the functions of the mammalian clock protein BMAL1 by tissue-specific rescue in mice." Science **314**(5803): 1304-8.

E. M. McMillan and J. Quadrilatero (2014). "Autophagy is required and protects against apoptosis during myoblast differentiation." Biochem J.

Y. Mei, M. D. Thompson, R. A. Cohen and X. Tong (2014). "Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases." Biochim Biophys Acta.

S. Meixlsperger and C. Münz (2009). "Morbus Crohn—a disease of failing macroautophagy in the immune system?" International Immunology **21**(11): 1205-1211.

M. Menaker, Z. C. Murphy and M. T. Sellix (2013). "Central control of peripheral circadian oscillators." Curr Opin Neurobiol **23**(5): 741-6.

J. Mendoza, U. Albrecht and E. Challet (2010). "Behavioural food anticipation in clock genes deficient mice: confirming old phenotypes, describing new phenotypes." Genes Brain Behav **9**(5): 467-77.

Q. J. Meng, L. Logunova, E. S. Maywood, M. Gallego, J. Lebiecki, T. M. Brown, M. Sladek, A. S. Semikhodskii, N. R. Glossop, H. D. Piggins, J. E. Chesham, D. A. Bechtold, S. H. Yoo, J. S. Takahashi, D. M. Virshup, R. P. Boot-Handford, M. H. Hastings and A. S. Loudon (2008). "Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins." Neuron **58**(1): 78-88.

C. A. Mercer, A. Kaliappan and P. B. Dennis (2009). "A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy." Autophagy **5**(5): 649-62.

B. Meusser, C. Hirsch, E. Jarosch and T. Sommer (2005). "ERAD: the long road to destruction." Nat Cell Biol **7**(8): 766-72.

E. Michishita, J. Y. Park, J. M. Burneskis, J. C. Barrett and I. Horikawa (2005). "Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins." Mol Biol Cell **16**(10): 4623-35.

D. Mijaljica, M. Prescott and R. J. Devenish (2011). "Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum." Autophagy **7**(7): 673-82.

Y. Minokoshi, T. Alquier, N. Furukawa, Y. B. Kim, A. Lee, B. Xue, J. Mu, F. Fofelle, P. Ferre, M. J. Birnbaum, B. J. Stuck and B. B. Kahn (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." Nature **428**(6982): 569-74.

M. Misovic, D. Milenkovic, T. Martinovic, D. Ciric, V. Bumbasirevic and T. Kravic-Stevovic (2013). "Short-term exposure to UV-A, UV-B, and UV-C irradiation induces alteration in cytoskeleton and autophagy in human keratinocytes." Ultrastruct Pathol **37**(4): 241-8.

A. Mitsui, S. Kumazawa, A. Takahashi, H. Ikemoto, S. Cao and T. Arai (1986). "Strategy by which nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically." Nature **323**(6090): 720-722.

N. Mizushima, A. Kuma, Y. Kobayashi, A. Yamamoto, M. Matsubae, T. Takao, T. Natsume, Y. Ohsumi and T. Yoshimori (2003). "Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate." J Cell Sci **116**(Pt 9): 1679-88.

N. Mizushima, H. Sugita, T. Yoshimori and Y. Ohsumi (1998). "A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy." J Biol Chem **273**(51): 33889-92.

V. Mongrain, X. Ruan, H. Dardente, E. E. Fortier and N. Cermakian (2008). "Clock-dependent and independent transcriptional control of the two isoforms from the mouse Rorgamma gene." Genes Cells **13**(12): 1197-210.

S. Y. Moon, H. S. Kim, K. W. Nho, Y. J. Jang and S. K. Lee (2014). "Endoplasmic Reticulum Stress Induces Epithelial-Mesenchymal Transition through Autophagy via Activation of c-Src Kinase." Nephron Exp Nephrol **126**(3): 127-140.

R. Y. Moore and N. J. Lenn (1972). "A retinohypothalamic projection in the rat." J Comp Neurol **146**(1): 1-14.

R. Y. Moore, J. C. Speh and J. P. Card (1995). "The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells." J Comp Neurol **352**(3): 351-66.

M. Mori, T. Hitora, O. Nakamura, Y. Yamagami, R. Horie, H. Nishimura and T. Yamamoto (2015). "Hsp90 inhibitor induces autophagy and apoptosis in osteosarcoma cells." Int J Oncol **46**(1): 47-54.

E. Morselli, M. C. Maiuri, M. Markaki, E. Megalou, A. Pasparaki, K. Palikaras, A. Criollo, L. Galluzzi, S. A. Malik, I. Vitale, M. Michaud, F. Madeo, N. Tavernarakis and G. Kroemer (2010). "Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy." Cell Death Dis **1**: e10.

R. Mostoslavsky, K. F. Chua, D. B. Lombard, W. W. Pang, M. R. Fischer, L. Gellon, P. Liu, G. Mostoslavsky, S. Franco, M. M. Murphy, K. D. Mills, P. Patel, J. T. Hsu, A. L. Hong, E. Ford, H. L. Cheng, C. Kennedy, N. Nunez, R. Bronson, D. Frendewey, W. Auerbach, D. Valenzuela, M. Karow, M. O. Hottiger, S. Hursting, J. C. Barrett, L. Guarente, R. Mulligan, B. Demple, G. D. Yancopoulos and F. W. Alt (2006). "Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6." Cell **124**(2): 315-29.

N. Nader, G. P. Chrousos and T. Kino (2010). "Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis." Trends Endocrinol Metab **21**(5): 277-86.

N. L. Nadon (2006). "Exploiting the rodent model for studies on the pharmacology of lifespan extension." Aging Cell **5**(1): 9-15.

T. Nagaya, H. Yoshida, H. Takahashi and M. Kawai (2002). "Markers of insulin resistance in day and shift workers aged 30-59 years." Int Arch Occup Environ Health **75**(8): 562-8.

E. Nagoshi, S. A. Brown, C. Dibner, B. Kornmann and U. Schibler (2005). "Circadian gene expression in cultured cells." Methods Enzymol **393**: 543-57.

E. Nagoshi, C. Saini, C. Bauer, T. Laroche, F. Naef and U. Schibler (2004). "Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells." Cell **119**(5): 693-705.

Y. Nakahata, M. Kaluzova, B. Grimaldi, S. Sahar, J. Hirayama, D. Chen, L. P. Guarente and P. Sassone-Corsi (2008). "The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control." Cell **134**(2): 329-40.

Y. Nakahata, S. Sahar, G. Astarita, M. Kaluzova and P. Sassone-Corsi (2009). "Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1." Science **324**(5927): 654-7.

P. Narbonne and R. Roy (2009). "Caenorhabditis elegans dauers need LKB1/AMPK to ration lipid reserves and ensure long-term survival." Nature **457**(7226): 210-4.

V. A. Narkar, M. Downes, R. T. Yu, E. Embler, Y. X. Wang, E. Banayo, M. M. Mihaylova, M. C. Nelson, Y. Zou, H. Juguilon, H. Kang, R. J. Shaw and R. M. Evans (2008). "AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics." Cell **134**(3): 405-15.

E. Naru, T. Ohta, K. Inomata, A. Hayashi and K. Kaji (2009). "Donor age-dependent acceleration of cellular aging by repeated ultraviolet A irradiation of human dermal fibroblasts derived from a single donor." Hum Cell **22**(2): 31-7.

Y. Naruse, K. Oh-hashii, N. Iijima, M. Naruse, H. Yoshioka and M. Tanaka (2004). "Circadian and light-induced transcription of clock gene Per1 depends on histone acetylation and deacetylation." Mol Cell Biol **24**(14): 6278-87.

F. Nazio, F. Strappazzon, M. Antonioli, P. Bielli, V. Cianfanelli, M. Bordi, C. Gretzmeier, J. Dengjel, M. Piacentini, G. M. Fimia and F. Cecconi (2013). "mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6." Nat Cell Biol **15**(4): 406-16.

T. P. Neufeld (2012). "Autophagy and cell growth--the yin and yang of nutrient responses." J Cell Sci **125**(Pt 10): 2359-68.

T. Neutelings, C. A. Lambert, B. V. Nusgens and A. C. Colige (2013). "Effects of mild cold shock (25 degrees C) followed by warming up at 37 degrees C on the cellular stress response." PLoS One **8**(7): e69687.

I. Nishino, J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J. E. Riggs, S. J. Oh, Y. Koga, C. M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro and M. Hirano (2000). "Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease)." Nature **406**(6798): 906-10.

E. Nisoli, C. Tonello, A. Cardile, V. Cozzi, R. Bracale, L. Tedesco, S. Falcone, A. Valerio, O. Cantoni, E. Clementi, S. Moncada and M. O. Carruba (2005). "Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS." Science **310**(5746): 314-7.

R. A. Nixon (2013). "The role of autophagy in neurodegenerative disease." Nat Med **19**(8): 983-97.

R. A. Nixon, J. Wegiel, A. Kumar, W. H. Yu, C. Peterhoff, A. Cataldo and A. M. Cuervo (2005). "Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study." J Neuropathol Exp Neurol **64**(2): 113-22.

C. Nobelprize (1974). "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1974." Press Release.

A. B. Novikoff, H. Beaufay and C. De Duve (1956). "Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver." J Biophys Biochem Cytol **2**(4 Suppl): 179-84.

E. J. O'Rourke and G. Ruvkun (2013). "MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability." Nat Cell Biol **15**(6): 668-76.

K. Obrietan, S. Impey and D. R. Storm (1998). "Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the scn." Nat Neurosci.

K. Oishi, S. Koyanagi and N. Ohkura (2011). "Circadian mRNA expression of coagulation and fibrinolytic factors is organ-dependently disrupted in aged mice." Exp Gerontol **46**(12): 994-9.

B. T. Olejnicka, K. Ollinger and U. T. Brunk (1997). "A short exposure to a high-glucose milieu stabilizes the acidic vacuolar apparatus of insulinoma cells in culture to ensuing oxidative stress." APMIS **105**(9): 689-98.

D. Ono, S. Honma and K.-i. Honma (2013). "Postnatal Constant Light Compensates *Cryptochrome1* and *2* Double Deficiency for Disruption of Circadian Behavioral Rhythms in Mice under Constant Dark." PLoS One **8**(11): e80615.

C. L. Partch, K. F. Shields, C. L. Thompson, C. P. Selby and A. Sancar (2006). "Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10467-72.

C. B. Peek, A. H. Affinati, K. M. Ramsey, H. Y. Kuo, W. Yu, L. A. Sena, O. Ilkayeva, B. Markeva, Y. Kobayashi, C. Omura, D. C. Levine, D. J. Bacsik, D. Gius, C. B. Newgard, E. Goetzman, N. S. Chandel, J. M. Denu, M. Mrksich and J. Bass (2013). "Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice." Science **342**(6158): 1243417.

R. A. Pena-Silva, J. D. Miller, Y. Chu and D. D. Heistad (2009). "Serotonin produces monoamine oxidase-dependent oxidative stress in human heart valves." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(4): H1354-60.

N. Pengo and S. Cenci (2013). "The role of autophagy in plasma cell ontogenesis." Autophagy **9**(6): 942-4.

N. Pengo, M. Scolari, L. Oliva, E. Milan, F. Mainoldi, A. Raimondi, C. Fagioli, A. Merlini, E. Mariani, E. Pasqualetto, U. Orfanelli, M. Ponzoni, R. Sitia, S. Casola and S. Cenci (2013). "Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production." Nat Immunol **14**(3): 298-305.

F. Picard, M. Kurtev, N. Chung, A. Topark-Ngarm, T. Senawong, R. Machado De Oliveira, M. Leid, M. W. McBurney and L. Guarente (2004). "Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma." Nature **429**(6993): 771-6.

V. Pilonis and S. Steinlechner (2008). "Low reproductive success in Per1 and Per2 mutant mouse females due to accelerated ageing?" Reproduction **135**(4): 559-68.

C. S. Pittendrigh (1954). "On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in *Drosophila*." Proc Natl Acad Sci U S A **40**(10): 1018-29.

C. S. Pittendrigh and S. Daan (1976). "A Functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents." J Comp Physiol.

G. Polekhina, A. Gupta, B. J. Mitchell, B. van Denderen, S. Murthy, S. C. Feil, I. G. Jennings, D. J. Campbell, L. A. Witters, M. W. Parker, B. E. Kemp and D. Stapleton (2003). "AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen." Curr Biol **13**(10): 867-71.

E. M. Poole, E. S. Schernhammer and S. S. Tworoger (2011). "Rotating night shift work and risk of ovarian cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **20**(5): 934-8.

N. Preitner, F. Damiola, L. Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht and U. Schibler (2002). "The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator." Cell **110**.

M. Priault, B. Salin, J. Schaeffer, F. M. Vallette, J. P. di Rago and J. C. Martinou (2005). "Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast." Cell Death Differ **12**(12): 1613-21.

S. R. Pulivarthy, N. Tanaka, D. K. Welsh, L. De Haro, I. M. Verma and S. Panda (2007). "Reciprocity between phase shifts and amplitude changes in the mammalian circadian clock." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20356-61.

A. Purushotham, T. T. Schug, Q. Xu, S. Surapureddi, X. Guo and X. Li (2009). "Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation." Cell Metab **9**(4): 327-38.

J. O. Pyo, S. M. Yoo and Y. K. Jung (2013). "The Interplay between Autophagy and Aging." Diabetes Metab J **37**(5): 333-9.

S. M. Rajaratnam and J. Arendt (2001). "Health in a 24-h society." Lancet **358**(9286): 999-1005.

M. R. Ralph and M. Menaker (1988). "A mutation of the circadian system in golden hamsters." Science **241**(4870): 1225-7.

K. M. Ramsey, J. Yoshino, C. S. Brace, D. Abrassart, Y. Kobayashi, B. Marcheva, H. K. Hong, J. L. Chong, E. D. Buhr, C. Lee, J. S. Takahashi, S. Imai and J. Bass (2009). "Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis." Science **324**(5927): 651-4.

B. Ravikumar, K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri and D. C. Rubinsztein (2010). "Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures." Nat Cell Biol **12**(8): 747-57.

B. Ravikumar, C. Vacher, Z. Berger, J. E. Davies, S. Luo, L. G. Oroz, F. Scaravilli, D. F. Easton, R. Duden, C. J. O'Kane and D. C. Rubinsztein (2004). "Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease." Nat Genet **36**(6): 585-95.

A. B. Reddy, M. D. Field, E. S. Maywood and M. H. Hastings (2002). "Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag." J Neurosci.

M. Reick, J. A. Garcia, C. Dudley and S. L. McKnight (2001). "NPAS2: an analog of clock operative in the mammalian forebrain." Science **293**(5529): 506-9.

S. M. Reppert and D. R. Weaver (2002). "Coordination of circadian timing in mammals." Nature **418**(6901): 935-41.

G. Rey and A. B. Reddy (2013). "Protein acetylation links the circadian clock to mitochondrial function." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(9): 3210-3211.

V. R. Richard, A. Leonov, A. Beach, M. T. Burstein, O. Koupaki, A. Gomez-Perez, S. Levy, L. Pluska, S. Mattie, R. Rafesh, T. Iouk, S. Sheibani, M. Greenwood, H. Vali and V. I. Titorenko (2013). "Macromitophagy is a longevity assurance process that in chronologically aging yeast limited in calorie supply sustains functional mitochondria and maintains cellular lipid homeostasis." Aging (Albany NY) **5**(4): 234-69.

C. P. Richter (1922). A Behavioristic Study of the Activity of the Rat, Williams & Wilkins Company.

D. J. Roberts, V. P. Tan-Sah, E. Y. Ding, J. M. Smith and S. Miyamoto (2014). "Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition." Mol Cell **53**(4): 521-33.

P. Roberts, S. Moshitch-Moshkovitz, E. Kvam, E. O'Toole, M. Winey and D. S. Goldfarb (2003). "Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **14**(1): 129-41.

J. T. Rodgers and P. Puigserver (2007). "Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(31): 12861-6.

M. J. Rossner, H. Oster, S. P. Wichert, L. Reinecke, M. C. Wehr, J. Reinecke, G. Eichele, R. Taneja and K. A. Nave (2008). "Disturbed clockwork resetting in Sharp-1 and Sharp-2 single and double mutant mice." PLoS One **3**(7): e2762.

D. C. Rubinsztein, G. Marino and G. Kroemer (2011). "Autophagy and aging." Cell **146**(5): 682-95.

R. D. Rudic, P. McNamara, A. M. Curtis, R. C. Boston, S. Panda, J. B. Hogenesch and G. A. Fitzgerald (2004). "BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis." PLoS Biol **2**(11): e377.

J. E. Rutila, V. Suri, M. Le, W. V. So, M. Rosbash and J. C. Hall (1998). "CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless." Cell **93**(5): 805-14.

S. W. Ryter, S. J. Lee, A. Smith and A. M. Choi (2010). "Autophagy in vascular disease." Proc Am Thorac Soc **7**(1): 40-7.

R. Sahu, S. Kaushik, C. C. Clement, E. S. Cannizzo, B. Scharf, A. Follenzi, I. Potolicchio, E. Nieves, A. M. Cuervo and L. Santambrogio (2011). "Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes." Dev Cell **20**(1): 131-9.

Y. Sakai, M. Oku, I. J. van der Klei and J. A. Kiel (2006). "Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes." Biochim Biophys Acta **1763**(12): 1767-75.

R. Salgado-Delgado, M. Angeles-Castellanos, N. Sadari, R. M. Buijs and C. Escobar (2010). "Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work." Endocrinology **151**(3): 1019-29.

A. Salminen and K. Kaarniranta (2012). "AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network." Ageing Res Rev **11**(2): 230-41.

K. Sanada, T. Okano and Y. Fukada (2002). "Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1." J Biol Chem **277**(1): 267-71.

J. Sanchez-Wandelmer and F. Reggiori (2013). "Amphisomes: out of the autophagosome shadow?" EMBO J **32**(24): 3116-8.

M. Sandberg and L. A. Borg (2007). "Steroid effects on intracellular degradation of insulin and crinophagy in isolated pancreatic islets." Mol Cell Endocrinol **277**(1-2): 35-41.

C. S. Sander, H. Chang, S. Salzmann, C. S. Muller, S. Ekanayake-Mudiyanselage, P. Elsner and J. J. Thiele (2002). "Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo." J Invest Dermatol **118**(4): 618-25.

M. J. Sanders, P. O. Grondin, B. D. Hegarty, M. A. Snowden and D. Carling (2007). "Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade." Biochem J **403**(1): 139-48.

T. K. Sato, S. Panda, L. J. Miraglia, T. M. Reyes, R. D. Rudic, P. McNamara, K. A. Naik, G. A. FitzGerald, S. A. Kay and J. B. Hogenesch (2004). "A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock." Neuron.

T. K. Sato, R. G. Yamada, H. Ukai, J. E. Baggs, L. J. Miraglia, T. J. Kobayashi, D. K. Welsh, S. A. Kay, H. R. Ueda and J. B. Hogenesch (2006). "Feedback repression is required for mammalian circadian clock function." Nat Genet.

E. S. Schernhammer, F. Laden, F. E. Speizer, W. C. Willett, D. J. Hunter, I. Kawachi and G. A. Colditz (2001). "Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study." J Natl Cancer Inst **93**(20): 1563-8.

U. Schibler (2007). "The daily timing of gene expression and physiology in mammals." Dialogues Clin Neurosci **9**(3): 257-72.

U. Schibler, J. Ripperger and S. A. Brown (2003). "Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food." J Biol Rhythms **18**(3): 250-60.

S. M. Schieke, J. P. McCoy, Jr. and T. Finkel (2008). "Coordination of mitochondrial bioenergetics with G1 phase cell cycle progression." Cell Cycle **7**(12): 1782-7.

J. L. Schneider and A. M. Cuervo (2014). "Autophagy and human disease: emerging themes." Curr Opin Genet Dev **26C**: 16-23.

J. L. Schneider and A. M. Cuervo (2014). "Liver autophagy: much more than just taking out the trash." Nat Rev Gastroenterol Hepatol **11**(3): 187-200.

P. Schonfeld, M. R. Wieckowski, M. Lebedzinska and L. Wojtczak (2010). "Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 929-38.

J. W. Scott, S. A. Hawley, K. A. Green, M. Anis, G. Stewart, G. A. Scullion, D. G. Norman and D. G. Hardie (2004). "CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations." J Clin Invest **113**(2): 274-84.

M. T. Sellix, J. A. Evans, T. L. Leise, O. Castanon-Cervantes, D. D. Hill, P. DeLisser, G. D. Block, M. Menaker and A. J. Davidson (2012). "Aging differentially affects the re-entrainment response of central and peripheral circadian oscillators." J Neurosci **32**(46): 16193-202.

C. Settembre, R. De Cegli, G. Mansueto, P. K. Saha, F. Vetrini, O. Visvikis, T. Huynh, A. Carissimo, D. Palmer, T. J. Klisch, A. C. Wollenberg, D. Di Bernardo, L. Chan, J. E. Irazoqui and A. Ballabio (2013). "TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop." Nat Cell Biol **15**(6): 647-58.

L. Shang, S. Chen, F. Du, S. Li, L. Zhao and X. Wang (2011). "Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(12): 4788-93.

S. Sheibani, V. R. Richard, A. Beach, A. Leonov, R. Feldman, S. Mattie, L. Khelghatybana, A. Piano, M. Greenwood, H. Vali and V. I. Titorenko (2014). "Macromitophagy, neutral lipids synthesis, and peroxisomal fatty acid oxidation protect yeast from "liponecrosis", a previously unknown form of programmed cell death." Cell Cycle **13**(1): 138-47.

S. Shibata, Y. Oomura, H. Kita and K. Hattori (1982). "Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice." Brain Res **247**(1): 154-8.

S. Shimba, N. Ishii, Y. Ohta, T. Ohno, Y. Watabe, M. Hayashi, T. Wada, T. Aoyagi and M. Tezuka (2005). "Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12071-6.

T. Shirogane, J. Jin, X. L. Ang and J. W. Harper (2005). "SCFbeta-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein." J Biol Chem **280**(29): 26863-72.

A. A. Sibirny (2011). "Mechanisms of autophagy and pexophagy in yeasts." Biochemistry (Mosc) **76**(12): 1279-90.

S. M. Siepkka, S. H. Yoo, J. Park, W. Song, V. Kumar, Y. Hu, C. Lee and J. S. Takahashi (2007). "Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression." Cell **129**(5): 1011-23.

S. Simpson and J. J. Galbraith (1906). "IV.—Observations on the Normal Temperature of the Monkey and its Diurnal Variation, and on the Effect of Changes in the Daily Routine on this Variation." Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh **45**(01): 65-104.

R. Singh, S. Kaushik, Y. Wang, Y. Xiang, I. Novak, M. Komatsu, K. Tanaka, A. M. Cuervo and M. J. Czaja (2009). "Autophagy regulates lipid metabolism." Nature **458**(7242): 1131-5.

R. Singh, Y. Xiang, Y. Wang, K. Baikati, A. M. Cuervo, Y. K. Luu, Y. Tang, J. E. Pessin, G. J. Schwartz and M. J. Czaja (2009). "Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice." J Clin Invest **119**(11): 3329-39.

R. S. Sohal, R. J. Mockett and W. C. Orr (2002). "Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis." Free Radic Biol Med **33**(5): 575-86.

K. Spoelstra, U. Albrecht, G. T. van der Horst, V. Brauer and S. Daan (2004). "Phase responses to light pulses in mice lacking functional per or cry genes." J Biol Rhythms **19**(6): 518-29.

R. Stanewsky, M. Kaneko, P. Emery, B. Beretta, K. Wager-Smith, S. A. Kay, M. Rosbash and J. C. Hall (1998). "The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*." Cell **95**(5): 681-92.

B. J. Stansley and B. K. Yamamoto (2013). "L-dopa-induced dopamine synthesis and oxidative stress in serotonergic cells." Neuropharmacology **67**: 243-51.

I. v. Stein-Beling (1935). "ÜBER DAS ZEITGEDÄCHTNIS BEI TIEREN." Biological Reviews **10**(1): 18-41.

K. A. Stokkan, S. Yamazaki, H. Tei, Y. Sakaki and M. Menaker (2001). "Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding." Science **291**(5503): 490-3.

B. D. Strahl and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-5.

M. Stratmann and U. Schibler (2006). "Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators." J Biol Rhythms **21**(6): 494-506.

Y. Sumi, K. Yagita, S. Yamaguchi, Y. Ishida, Y. Kuroda and H. Okamura (2002). "Rhythmic expression of ROR beta mRNA in the mice suprachiasmatic nucleus." Neurosci Lett **320**(1-2): 13-6.

Z. S. Sun, U. Albrecht, O. Zhuchenko, J. Bailey, G. Eichele and C. C. Lee (1997). "RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene." Cell **90**(6): 1003-11.

K. Suzuki (2013). "Selective autophagy in budding yeast." Cell Death Differ **20**(1): 43-8.

S. Takahata, T. Ozaki, J. Mimura, Y. Kikuchi, K. Sogawa and Y. Fujii-Kuriyama (2000). "Transactivation mechanisms of mouse clock transcription factors, mClock and mArnt3." Genes Cells **5**(9): 739-47.

A. Takano, K. Shimizu, S. Kani, R. M. Buijs, M. Okada and K. Nagai (2000). "Cloning and characterization of rat casein kinase 1epsilon." FEBS Lett **477**(1-2): 106-12.

K. Takeshige, M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda and Y. Ohsumi (1992). "Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction." J Cell Biol **119**(2): 301-11.

S. Tamaki and W. T. Frankenberger, Jr. (1992). "Environmental biochemistry of arsenic." Rev Environ Contam Toxicol **124**: 79-110.

Q. Q. Tang, T. C. Otto and M. D. Lane (2003). "CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 850-5.

I. Tanida (2011). "Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy." Antioxid Redox Signal **14**(11): 2201-14.

I. Tanida (2011). "Autophagy basics." Microbiol Immunol **55**(1): 1-11.

I. Tanida, E. Tanida-Miyake, M. Komatsu, T. Ueno and E. Kominami (2002). "Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p." J Biol Chem **277**(16): 13739-44.

I. Tanida, E. Tanida-Miyake, T. Ueno and E. Kominami (2001). "The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3." J Biol Chem **276**(3): 1701-6.

M. Tanno, J. Sakamoto, T. Miura, K. Shimamoto and Y. Horio (2007). "Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1." J Biol Chem **282**(9): 6823-32.

A. Terman and U. T. Brunk (2004). "Aging as a catabolic malfunction." Int J Biochem Cell Biol **36**(12): 2365-75.

G. Tettamanti, D. Malagoli, E. Marchesini, T. Congiu, M. de Eguileor and E. Ottaviani (2006). "Oligomycin A induces autophagy in the IPLB-LdFB insect cell line." Cell Tissue Res **326**(1): 179-86.

E. Thachil, J. P. Hugot, B. Arbeille, R. Paris, A. Grodet, M. Peuchmaur, P. Codogno, F. Barreau, E. Ogier-Denis, D. Berrebi and J. Viala (2012). "Abnormal activation of autophagy-induced crinophagy in Paneth cells from patients with Crohn's disease." Gastroenterology **142**(5): 1097-1099 e4.

M. M. Thiaville, E. E. Dudenhausen, C. Zhong, Y. X. Pan and M. S. Kilberg (2008). "Deprivation of protein or amino acid induces C/EBPbeta synthesis and binding to amino acid response elements, but its action is not an absolute requirement for enhanced transcription." Biochem J **410**(3): 473-84.

J. Tigges, J. Krutmann, E. Fritsche, J. Haendeler, H. Schaal, J. W. Fischer, F. Kalfalah, H. Reinke, G. Reifenberger, K. Stuhler, N. Ventura, S. Gundermann, P. Boukamp and F. Boege (2014). "The hallmarks of fibroblast ageing." Mech Ageing Dev **138**: 26-44.

J. Tigges, H. Weighardt, S. Wolff, C. Gotz, I. Forster, Z. Kohne, U. Huebenthal, H. F. Merk, J. Abel, T. Haarmann-Stemann, J. Krutmann and E. Fritsche (2013). "Aryl hydrocarbon receptor repressor (AhRR) function revisited: repression of CYP1 activity in human skin fibroblasts is not related to AhRR expression." J Invest Dermatol **133**(1): 87-96.

A. Till, R. Lakhani, Burnett S. F. and S. Subramani (2012). "Pexophagy: The Selective Degradation of Peroxisomes." International Journal of Cell Biology **2012**.

G. J. Todaro and H. Green (1963). "QUANTITATIVE STUDIES OF THE GROWTH OF MOUSE EMBRYO CELLS IN CULTURE AND THEIR DEVELOPMENT INTO ESTABLISHED LINES." J Cell Biol **17**(2): 299-313.

K. L. Toh, C. R. Jones, Y. He, E. J. Eide, W. A. Hinz, D. M. Virshup, L. J. Ptacek and Y. H. Fu (2001). "An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome." Science **291**(5506): 1040-3.

Z. Travnickova-Bendova, N. Cermakian, S. M. Reppert and P. Sassone-Corsi (2002). "Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7728-33.

S. Tsukamoto, T. Hara, A. Yamamoto, S. Kito, N. Minami, T. Kubota, K. Sato and T. Kokubo (2014). "CORRIGENDUM: Fluorescence-based visualization of autophagic activity predicts mouse embryo viability." Sci Rep **4**: 6178.

S. Tsukamoto, T. Hara, A. Yamamoto, S. Kito, N. Minami, T. Kubota, K. Sato and T. Kokubo (2014). "Fluorescence-based visualization of autophagic activity predicts mouse embryo viability." Sci Rep **4**: 4533.

H. R. Ueda, W. Chen, A. Adachi, H. Wakamatsu, S. Hayashi, T. Takasugi, M. Nagano, K. Nakahama, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Iino, Y. Shigeyoshi and S. Hashimoto (2002). "A transcription factor response element for gene expression during circadian night." Nature **418**(6897): 534-9.

H. Ukai, T. J. Kobayashi, M. Nagano, K. H. Masumoto, M. Sujino, T. Kondo, K. Yagita, Y. Shigeyoshi and H. R. Ueda (2007). "Melanopsin-dependent photo-perturbation reveals desynchronization underlying the singularity of mammalian circadian clocks." Nat Cell Biol **9**(11): 1327-34.

J. H. Um, J. S. Pendergast, D. A. Springer, M. Foretz, B. Viollet, A. Brown, M. K. Kim, S. Yamazaki and J. H. Chung (2011). "AMPK regulates circadian rhythms in a tissue- and isoform-specific manner." PLoS One **6**(3): e18450.

J. H. Um, S. Yang, S. Yamazaki, H. Kang, B. Viollet, M. Foretz and J. H. Chung (2007). "Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iepsilon (CKIepsilon)-dependent degradation of clock protein mPer2." J Biol Chem **282**(29): 20794-8.

G. T. van der Horst, M. Muijtjens, K. Kobayashi, R. Takano, S. Kanno, M. Takao, J. de Wit, A. Verkerk, A. P. Eker, D. van Leenen, R. Buijs, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers and A. Yasui (1999). "Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms." Nature **398**(6728): 627-30.

T. Vellai (2009). "Autophagy genes and ageing." Cell Death Differ **16**(1): 94-102.

E. Verdin, M. D. Hirschey, L. W. Finley and M. C. Haigis (2010). "Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling." Trends Biochem Sci **35**(12): 669-75.

E. Vielhaber, E. Eide, A. Rivers, Z. H. Gao and D. M. Virshup (2000). "Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon." Mol Cell Biol **20**(13): 4888-99.

M. H. Vitaterna, D. P. King, A. M. Chang, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, J. D. McDonald, W. F. Dove, L. H. Pinto, F. W. Turek and J. S. Takahashi (1994). "Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior." Science **264**(5159): 719-25.

M. H. Vitaterna, C. H. Ko, A.-M. Chang, E. D. Buhr, E. M. Fruechte, A. Schook, M. P. Antoch, F. W. Turek and J. S. Takahashi (2006). "The mouse Clock mutation reduces circadian pacemaker amplitude and enhances efficacy of resetting stimuli and phase-response curve amplitude." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(24): 9327-9332.

A. M. Vosko, C. S. Colwell and A. Y. Avidan (2010). "Jet lag syndrome: circadian organization, pathophysiology, and management strategies." Nat Sci Sleep **2**: 187-98.

A. Vural and J. H. Kehrl (2014). "Autophagy in Macrophages: Impacting Inflammation and Bacterial Infection." Scientifica (Cairo) **2014**: 825463.

C. Wang, D. Jurk, M. Maddick, G. Nelson, C. Martin-Ruiz and T. von Zglinicki (2009). "DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice." Aging Cell **8**(3): 311-23.

D. Q. H. Wang, P. Portincasa and B. A. Neuschwander-Tetri (2011). Steatosis in the Liver. Comprehensive Physiology, John Wiley & Sons, Inc.

M. J. Watt, A. G. Holmes, S. K. Pinnamaneni, A. P. Garnham, G. R. Steinberg, B. E. Kemp and M. A. Febbraio (2006). "Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(3): E500-8.

H. Weidberg, E. Shvets and Z. Elazar (2009). "Lipophagy: selective catabolism designed for lipids." Dev Cell **16**(5): 628-30.

H. Weinert, D. Weinert, I. Schurov, E. S. Maywood and M. H. Hastings (2001). "Impaired expression of the mPer2 circadian clock gene in the suprachiasmatic nuclei of aging mice." Chronobiol Int **18**(3): 559-65.

J. A. Weingarten and N. A. Collop (2013). "Air travel: effects of sleep deprivation and jet lag." Chest **144**(4): 1394-401.

E. D. Weitzman (1982). "Chronobiology of man. Sleep, temperature and neuroendocrine rhythms." Hum Neurobiol **1**(3): 173-83.

D. Whitmore, N. S. Foulkes and P. Sassone-Corsi (2000). "Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock." Nature **404**(6773): 87-91.

A. T. Winfree (1970). "Integrated view of resetting a circadian clock." J Theor Biol **28**(3): 327-74.

A. T. Winfree (1975). "Unclocklike behaviour of biological clocks." Nature **253**(5490): 315-9.

A. T. Winfree (2001). The Geometry of Biological Time, Springer New York.

L. A. Witters, B. E. Kemp and A. R. Means (2006). "Chutes and Ladders: the search for protein kinases that act on AMPK." Trends Biochem Sci **31**(1): 13-6.

B. Xiao, M. J. Sanders, E. Underwood, R. Heath, F. V. Mayer, D. Carmena, C. Jing, P. A. Walker, J. F. Eccleston, L. F. Haire, P. Saiu, S. A. Howell, R. Aasland, S. R. Martin, D. Carling and S. J. Gamblin (2011). "Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP." Nature **472**(7342): 230-3.

M. Xie, C. R. Morales, S. Lavandero and J. A. Hill (2011). "Tuning flux: autophagy as a target of heart disease therapy." Curr Opin Cardiol **26**(3): 216-22.

Y. Xu, Q. S. Padiath, R. E. Shapiro, C. R. Jones, S. C. Wu, N. Saigoh, K. Saigoh, L. J. Ptacek and Y. H. Fu (2005). "Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome." Nature **434**(7033): 640-4.

K. Yagita, S. Yamaguchi, F. Tamanini, G. T. van Der Horst, J. H. Hoeijmakers, A. Yasui, J. J. Loros, J. C. Dunlap and H. Okamura (2000). "Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells." Genes Dev **14**(11): 1353-63.

A. Yamamoto, N. Mizushima and S. Tsukamoto (2014). "Fertilization-induced autophagy in mouse embryos is independent of mTORC1." Biol Reprod **91**(1): 7.

T. Yamamoto, Y. Nakahata, H. Soma, M. Akashi, T. Mamine and T. Takumi (2004). "Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues." BMC Mol Biol **5**: 18.

S. Yamazaki, R. Numano, M. Abe, A. Hida, R. Takahashi, M. Ueda, G. D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker and H. Tei (2000). "Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats." Science **288**(5466): 682-5.

S. Yamazaki, T. Yoshikawa, E. W. Biscoe, R. Numano, L. M. Gallaspy, S. Soulsby, E. Papadimas, P. Pezuk, S. E. Doyle, H. Tei, Y. Sakaki, G. D. Block and M. Menaker (2009). "Ontogeny of circadian organization in the rat." J Biol Rhythms **24**(1): 55-63.

W. L. Yen and D. J. Klionsky (2008). "How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging." Physiology (Bethesda) **23**: 248-62.

W. L. Yen, T. Shintani, U. Nair, Y. Cao, B. C. Richardson, Z. Li, F. M. Hughson, M. Baba and D. J. Klionsky (2010). "The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy." J Cell Biol **188**(1): 101-14.

S. H. Yoo, S. Yamazaki, P. L. Lowrey, K. Shimomura, C. H. Ko, E. D. Buhr, S. M. Siepka, H. K. Hong, W. J. Oh, O. J. Yoo, M. Menaker and J. S. Takahashi (2004). "PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(15): 5339-46.

T. Yorimitsu, U. Nair, Z. Yang and D. J. Klionsky (2006). "Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy." J Biol Chem **281**(40): 30299-304.

C. Zhang and A. M. Cuervo (2008). "Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function." Nat Med **14**(9): 959-65.

E. E. Zhang and S. A. Kay (2010). "Clocks not winding down: unravelling circadian networks." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(11): 764-76.

W. Zhang, X. Zhang, H. Wang, X. Guo, H. Li, Y. Wang, X. Xu, L. Tan, M. T. Mashek, C. Zhang, Y. Chen, D. G. Mashek, M. Foretz, C. Zhu, H. Zhou, X. Liu, B. Viollet, C. Wu and Y. Huo (2012). "AMP-activated protein kinase α 1 protects against diet-induced insulin resistance and obesity." Diabetes **61**(12): 3114-25.

Y. Zhao, S. Gong, E. Shunmei and J. Zou (2009). "Induction of macroautophagy by heat." Mol Biol Rep **36**(8): 2323-7.

Y. Zhao, C. F. Zhang, H. Rossiter, L. Eckhart, U. Konig, S. Karner, M. Mildner, V. N. Bochkov, E. Tschachler and F. Gruber (2013). "Autophagy is induced by UVA and promotes removal of oxidized phospholipids and protein aggregates in epidermal keratinocytes." J Invest Dermatol **133**(6): 1629-37.

B. Zheng, D. W. Larkin, U. Albrecht, Z. S. Sun, M. Sage, G. Eichele, C. C. Lee and A. Bradley (1999). "The *mPer2* gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock." Nature **400**(6740): 169-73.

X. J. Zhou, X. L. Lu, J. C. Lv, H. Z. Yang, L. X. Qin, M. H. Zhao, Y. Su, Z. G. Li and H. Zhang (2011). "Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population." Ann Rheum Dis **70**(7): 1330-7.

Z. Zhou, E. Cottam, M. Whelband, L. Vaux and T. Wileman (2012). "Xenophagy and the removal of intracellular pathogens: Evolving immunity." Autophagy

M. J. Zylka, L. P. Shearman, D. R. Weaver and S. M. Reppert (1998). "Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain." Neuron **20**(6): 1103-10.

7. Anhang

7.1 Vektorkarten

A

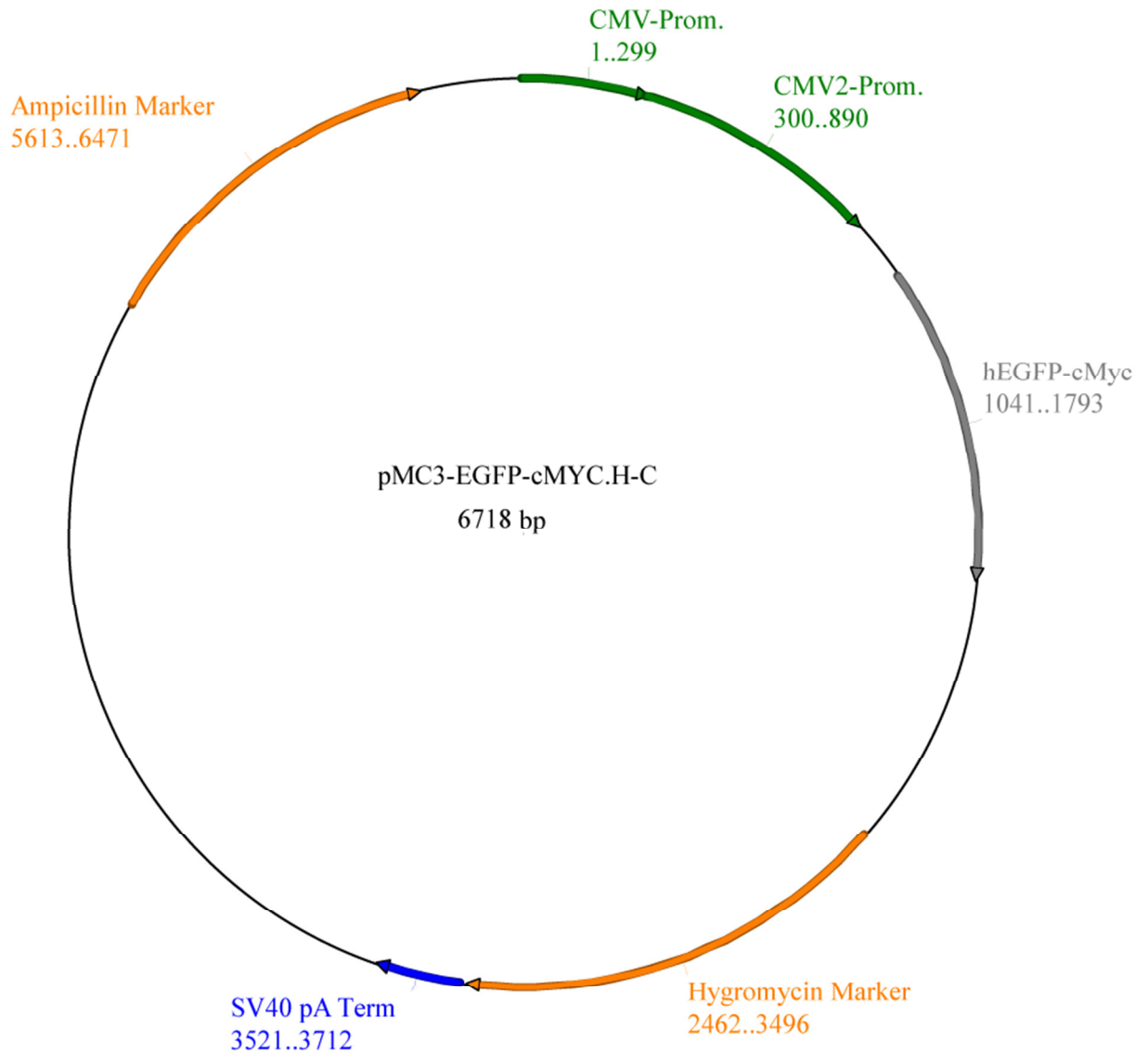


Abbildung 7.1: Vektorkarte des verwendeten pMC3-EGFP-cMYC.H-C-Plasmids für die Überexpression von GFP in den humanen primären Fibroblasten

(A) Das Plasmid pMC3-EGFP-cMYC.H-C wurde freundlicherweise vom Institut Prof. Dr. Boege (Universitätsklinikum Düsseldorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt und diente als Grundlage für den Vektor pMC3-hPer2-EGFP-cMYC.H-C (siehe auch Abb. 7.2).

A

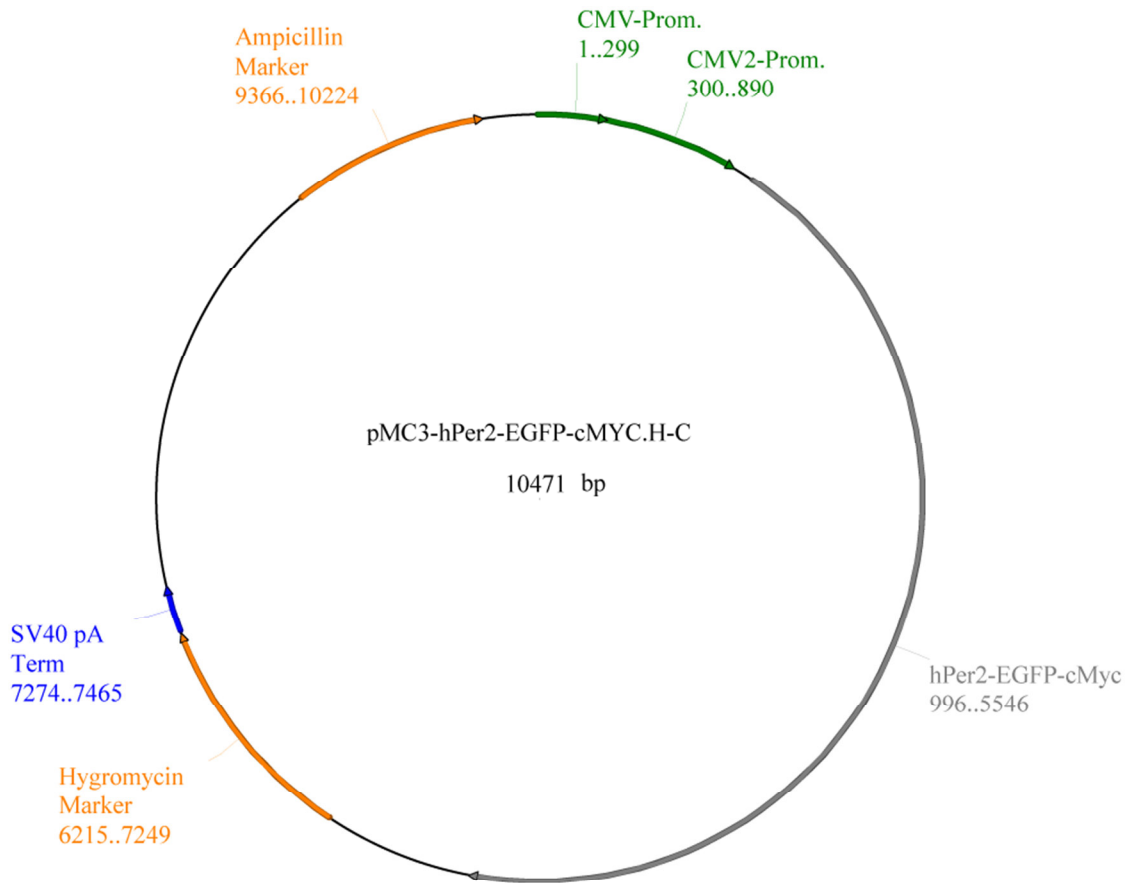


Abbildung 7.2: Vektorkarte des verwendeten pMC3-hPer2-EGFP-cMYC.H-C-Plasmids für die Überexpression von PER2-GFP in humanen primären Fibroblasten

(A) Vektorkarte des neu generierten Plasmids, als Grundlage diente das Plasmid pMC3-EGFP-cMYC.H-C.

Danksagung

“Leider läßt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.”

- *Johann Wolfgang von Goethe*

Das Schreiben dieser Arbeit war eine der größten wissenschaftlichen Herausforderungen mit denen ich je konfrontiert war. Ohne die Hilfe, Unterstützung, Ermutigung und Geduld der folgenden Personen wäre diese Arbeit nicht so zustande gekommen. Ihnen möchte ich meine tiefste Dankbarkeit ausdrücken.

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hans Reinke, für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Er gab mir die Möglichkeit zu einer interdisziplinären Arbeitsgruppen-übergreifenden Zusammenarbeit mit der AG Boege, eine für mich besonders fruchtbare Erfahrung. So wünsche ich ihm für die Zukunft auch rhythmisch signifikante chronobiologische HSF1 Forschungen und Publikationen. Herrn Prof. Boege danke ich, für die Möglichkeit, meine Studien in seinem Institut durchzuführen, für die Bereitstellung von Laborräumen und Geräten sowie die zusätzliche Finanzierung. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Martin für die Übernahme des Koreferates bedanken. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Faiza Kalfalah für die wertvollen Diskussionen und für die Unterstützung während des gesamten Projektes bedanken. Ich bin dankbar, für all die Geduld die sie mit mir hatte und die wertvolle, fachliche Hilfe bei so manchen Experimenten.

Ohne die Unterstützung und die ein oder anderen motivierenden Worte von meinen (ehemaligen) Kollegen und den Mitarbeitern der AG Boege wäre das Arbeiten im Labor sicher nicht so angenehm für mich gewesen. Mein besonderer Dank gilt daher auch allen weiteren (ehemaligen) Kollegen des Zentralinstituts für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik: Anja, Beatrice, Björn, Birgit, Britta, Chieh-Hua, Christian, Deniss, Elke, Eva, Gabi, Ina, Isabella, Jana, Kerstin, Lisa, Michael, Rebecca, René, Sara, Theresa und Thomas sowie Dr. Falk und seinem Team in der Routine (in alphabetischer Reihenfolge).

Ein besonderer Dank gilt dabei Rebecca, die nach langer gemeinsamer Zeit am Institut auch nach ihrem Verlassens des Instituts auf meine Mails reagiert hat, vielen Dank für das kritische Lesen dieser Arbeit und deine Anregungen sowohl zu dieser Arbeit als auch jederzeit zu meinen experimentellen Ergebnissen (x5).

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung und Ermutigung, meine Interessen zu verfolgen und für ihre grenzenlose Liebe! Und natürlich auch meinem Bruder Martin, der mich immer gefördert hat und mich mit vielen kleinen und großen Gesten unterstützt hat. Der mit seinem blauen Dromedar mit Kühlaggregat da war, egal um welche Uhrzeit, der es nicht scheute, trotz einem eher geringen Interesse an den Naturwissenschaften, meine gesamte Arbeit zu lesen und dabei nach vielen Jahren erstaunt feststellte, dass ich doch interessante Dinge mache. Etwas Besseres als ihn kann man nicht in der Familie haben. Danke! Vielen Dank an dieser Stelle auch an die momozygote Tetina-Fliege.

Last but not least, hat dieser Mensch, neben meiner Familie, mit mir Höhen und Tiefen ausgehalten, und ich bin ihm sehr dankbar, dass er diesen Weg mit mir gemeinsam gegangen ist. Ich danke Helge für seine Liebe, Unterstützung, Ausdauer und Geduld. Er hat mir, wann immer nötig, seine helfenden Hände geliehen und war da wo ich nicht mehr sein konnte. Ich bin ihm dankbar für so vieles und noch ein kleines bisschen mehr.

Schließlich gilt mein Dank all denen, die ich hier nicht namentlich erwähnt habe, die aber zum Gelingen dieser Arbeit und/ oder zu dieser besonderen Zeit in Düsseldorf beigetragen haben. Vielen Dank euch allen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere des 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 15.01.2015

Linda Janke