

Aus dem Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

Überprüfung der Interaktion des Uhrenproteins PER2 mit dem Protein GAPVD1 durch Proximity Ligation Assay

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Anna Katharina Mundorf

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Reinke

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Björn Stork

Meiner Mutter Angelika Imgrund, meinem Bruder Johannes Mundorf und
meiner Tante Gertrud Giese.

Allen meinen Freunden, die mich während der
Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Ibrahim, H.; Reus, P.; Mundorf, A.K.; Grothoff, A.-L.; Rudenko, V.; Buschhaus, C.; Stefanski, A.; Berleth, N.; Stork, B.; Stühler, K.; Kalfalah, F.; Reinke, H. Phosphorylation of GAPVD1 Is Regulated by the PER Complex and Linked to GAPVD1 Degradation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3787.

Zusammenfassung

Circadiane Rhythmik entsteht durch zellautonome biologische Uhren, die in so gut wie allen lichtsensitiven Organismen vorhanden sind. Circadiane Uhren in Säugetieren sind hierarchisch organisiert. Ein zentraler Schrittmacher im Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus wird über die Augen durch Licht mit der Umwelt synchronisiert. Der zentrale Schrittmacher synchronisiert seinerseits zelluläre Uhren in fast allen anderen Körperzellen durch neuronale, endokrine und metabolische Mechanismen. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus beruht auf Uhrengenen, die durch negative Rückkopplungsschleifen miteinander verbunden sind und dadurch ihre eigene rhythmische Expression antreiben. Den Kern des molekularen Oszillators bilden die Aktivatorproteine CLOCK und BMAL1 zusammen mit den *Per*- und *Cry*-Repressorgenen. Die zentrale negative Rückkopplungsschleife durchläuft innerhalb von 24 h einmal den folgenden Zyklus: CLOCK und BMAL1 bilden Heterodimere und aktivieren die Transkription der Gene *Per1/2* und *Cry1/2*. Mit steigender Konzentration der Proteine PER1/2 und CRY1/2 im Zytoplasma bilden sich PER- und CRY-enthaltende Proteinkomplexe, die in den Kern transportiert werden und dort durch Bindung an die CLOCK-BMAL1-Heterodimere ihre eigene Expression reprimieren.

In Vorarbeiten wurde gefunden, dass das Uhrengen *Per2* eine zentrale Rolle bei der circadianen Regulation der Autophagie spielt, und dass PER2 mit GAPVD1, einem Regulator kleiner G-Proteine, assoziiert ist. Da GAPVD1 vesikulären Transport und Autophagie reguliert, könnte dieses Protein ein Schnittpunkt zwischen der circadianen Uhr und diesen Prozessen sein. Ziel dieser Arbeit war die Bestätigung der Interaktion von PER2 und GAPVD1 durch eine unabhängige Methode sowie die intrazelluläre Lokalisierung der GAPVD1-PER2-Interaktionen.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung und RNA-Interferenz wurden unterschiedliche Antikörper gegen PER2 oder GAPVD1 auf ihre Bindungsaffinität sowie ihre Spezifität hin untersucht. Geeignete Antikörper wurden anschließend im *Proximity Ligation Assay* (PLA) genutzt. Bei dieser Methode entstehen bei extrem enger Colokalisierung zweier Proteine mikroskopisch nachweisbare Fluoreszenzsignale.

Durch den PLA konnte die Interaktion der Proteine PER2 und GAPVD1 bestätigt werden. Zudem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Interaktionen von PER2 und GAPVD1 so gut wie ausschließlich im Zytoplasma stattfinden.

Summary

Circadian Rhythms are generated by cell-autonomous biological clocks, which exist in basically all light sensitive organisms. Circadian clocks in mammals are organized hierarchically. A central pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus in the hypothalamus is synchronized by environmental light that falls on the retina. The central pacemaker synchronizes cellular clocks in almost all body cells by neuronal, endocrine, and metabolic mechanisms. The underlying molecular mechanism is based on clock genes, which are connected through negative feedback loops and thereby drive their own rhythmic expression. The core of the circadian clock consists of the activator proteins CLOCK and BMAL1 together with the *Per*- and *Cry*- repressor genes. Within 24 hours this central negative feedback loop completes one time the following cycle: Heterodimers of CLOCK and BMAL1 stimulate the transcription of the genes *Per1/2* and *Cry1/2*. With rising concentrations of PER1/2 and CRY1/2 in the cytoplasm, PER- and CRY-containing complexes are formed. These complexes are transported to the nucleus where they repress their own expression through binding to CLOCK-BMAL1-heterodimers.

Preliminary studies showed that the clock gene *Per2* plays a central role for the circadian regulation of autophagy. Furthermore, they demonstrated that PER2 is associated with GAPVD1, a regulator of small G-proteins. Since GAPVD1 regulates vesicular transport and autophagy, this protein could act at the intersection between the circadian clock and these processes. The aim of this work was to confirm the interaction between PER2 and GAPVD1 by an independent method and to localize the GAPVD1-PER2-interactions within the cell.

Various antibodies against PER2 and GAPVD1 were tested by immunostaining and RNA-interference for their binding affinity and specificity. Suitable antibodies were then used for the Proximity Ligation Assay (PLA). This method produces microscopically detectable fluorescent signals when two proteins are extremely closely colocalized.

Interaction of PER2 and GAPVD1 was confirmed by PLA. Furthermore, the results indicate that PER2 and GAPVD1 interact almost exclusively in the cytoplasm.

Abkürzungsverzeichnis

Die Nomenklatur von Proteinen und Genen wird im Fließtext wie folgt gehandhabt: Gennamen und deren Abkürzungen werden mit einem Großbuchstaben beginnend und von Kleinbuchstaben folgend kursiv geschrieben. Proteinennamen, sowie ihre Abkürzungen, werden durchgehend groß und nicht kursiv geschrieben.

Abb.	Abbildung
anti-GAPVD1	Antikörper gegen GAPVD1
anti-GAPVD1(K)	Antikörper gegen GAPVD1, Kaninchen
anti-GAPVD1(M)	Antikörper gegen GAPVD1, Maus
anti-GFP	Antikörper gegen GFP
anti-PER2	Antikörper gegen PER2
AVP	<i>Vasopressin</i>
BMAL1	<i>Brain and muscle arnt-like 1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CANX	<i>Calnexin</i>
CLOCK	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
cm	Zentimeter
cm²	Quadratzentimeter
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CO₂	Kohlendioxid
CRH	<i>Corticotropin-releasing Hormone</i>
CRY	<i>Cryptochrome</i>
CRY1	<i>Cryptochrome 1</i>
CRY2	<i>Cryptochrome 2</i>
CSNK1D	<i>Casein Kinase 1 Delta</i>
CSNK1D/E	<i>Casein Kinase 1 Delta/Epsilon</i>

CSNK1E	<i>Casein Kinase 1 Epsilon</i>
Cy3	<i>Cyanine-3</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMH	<i>Nucleus dorsomedialis hypothalami</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EU	Europäische Union
EV	extrazelluläre Vesikel
FCS	fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
GAPVD1	<i>GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLUT4	<i>Glucose transporter type 4</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H₂O	Wasser
IgG	<i>Immunglobulin G</i>
IML	<i>Columna intermediolateralis</i>
ipRGC	intrinsisch photosensitive retinale Ganglienzelle
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat

I	Liter
LGN	<i>Corpus geniculatum laterale</i>
M	mol/l
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
miRNA	<i>microRNA</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MPN	medialer präoptischer Kern
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTNR1A	<i>Melatonin receptor type 1A</i>
mV	Millivolt
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na₂HPO₄ 2H₂O	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NAT	<i>N-acetyltransferase</i>
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NR1D1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 1</i>
NR1D2	<i>Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 2</i>
n.s.	nicht signifikant
p	p-Wert
PBN	<i>Nucleus parabrachialis</i>

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween™ 20
PER	<i>Period</i>
PER1	<i>Period1</i>
PER2	<i>Period2</i>
PER3	<i>Period3</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PITX1	<i>Pituitary homeobox 1</i>
PK2	<i>Prokineticin-2</i>
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i>
PVT	<i>Nucleus paraventricularis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rab5	<i>Ras-related protein in brain 5</i>
Rab-GEF	GTP-Austauschfaktor für RAB
RasGAP	<i>Ras GTPase activating protein</i>
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA-Interferenz	Ribonukleinsäure-Interferenz
ROI	<i>Region of Interest</i>
ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEM	Standardfehler
siGapvd1	<i>small interfering RNA</i> , die GAPVD1-Expression hemmend
siNT	<i>non-targeting siRNA</i>
siPer2	<i>small interfering RNA</i> , die PER2-Expression hemmend
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPZ	subparaventriculäre Zone des Hypothalamus
TGFα	<i>Transforming growth factor α</i>
TGS	Tris-Glycin-SDS-Puffer
TRH	<i>Thyreotropin-Releasing-Hormone</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
VGLUT	<i>Vesicular glutamate transporter</i>
VGLUT1	<i>Vesicular glutamate transporter 1</i>
VPS9	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 9</i>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
°C	Grad Celsius
x	-fach
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Hierarchischer Aufbau des circadianen Systems	2
1.2 Regulation der inneren Uhr durch Melatonin.....	6
1.3 Der molekulare Mechanismus der inneren Uhr	8
1.4 Zentrale Stellung von PER2 und CSNK1D/E im molekularen Oszillator ...	10
1.5 PER2 und Autophagie	11
1.6 Interaktion von PER2 und GAPVD1 in Immunpräzipitation und Massenspektrometrie	12
1.7 Funktionen des Proteins GAPVD1	13
1.8 Ziele der Arbeit.....	14
2 Material	15
2.1 Zellkultur.....	15
2.1.1 Zelllinien	15
2.1.2 Lösungen und Antibiotika für die Zellkultur.....	15
2.1.3 Medien.....	15
2.2 Puffer und Stammlösungen.....	15
2.3 Chemikalien und Reagenzien	16
2.4 Antikörper.....	17
2.4.1 Primäre Antikörper.....	17
2.4.2 Sekundäre Antikörper.....	18
2.5 siRNA	19
2.6 sonstige Proteine.....	19
2.7 Verbrauchsmaterialien	19
2.8 Kits	20
2.9 Geräte.....	21
2.10 Software.....	23
3 Methoden	24
3.1 Zellkultur.....	24
3.1.1 Kultivierung der Zellen.....	24
3.1.2 Kryokonservierung der Zellen.....	24
3.1.3 RNA-Interferenz.....	25
3.2 Proteinanalytische Methoden	25
3.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten	25
3.2.2 Western Blot Analysen	26
3.2.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
3.2.2.2 Elektrophoretischer Transfer	26
3.2.2.3 Immunchemische Detektion mittels Chemolumineszenz	27
3.2.2.4 Auswertung mittels <i>MultiGauge</i> und <i>GraphPad Prism® 8</i>	27
3.3 Mikroskopie	28

3.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopie	28
3.3.1.1 Darstellung mittels <i>MetaMorph V6.3r6</i> und <i>Photoshop</i>	29
3.3.2 Proximity Ligation Assay	29
3.3.2.1 Darstellung mittels <i>Adobe Photoshop</i> , <i>ImageJ</i> und <i>MetaMorph V6.3r6</i>	31
3.3.2.2 Auswertung mittels <i>ImageJ</i>	31
4 Ergebnisse	32
4.1 Prinzip des Proximity Ligation Assays	33
4.2 Optimierung der PLA-Schritte Blockieren und Waschen	34
4.3 Test der Antikörperspezifität	34
4.3.1 Test der PER2- und GFP-Antikörper mittels RNA-Interferenz und Western Blot	36
4.3.2 Test der GAPVD1-Antikörper mittels RNA-Interferenz und Western Blot	37
4.4 Test der Antikörperspezifität durch Immunfärbung	39
4.4.1 Vergleich von Immunfärbungen mit anti-PER2 und anti-GFP mit dem Fluoreszenzsignal von PER2-GFP	39
4.4.2 Das GAPVD1-Verteilungsmuster in der Immunfärbung entspricht der publizierten Lokalisation	40
4.5 Überprüfung der Interaktion von PER2 und GAPVD1 durch PLA	41
4.5.1 Etablierung des PLA mit anti-PER2 und anti-GFP	42
4.5.2 Etablierung des PLA mit anti-GAPVD1s	45
4.5.3 Überprüfung der Interaktion von PER2-GFP und GAPVD1 in HT1080 PER2-GFP durch PLA	47
4.5.4 Überprüfung der Interaktion von PER2 und GAPVD1 in HT1080 durch PLA	50
5 Diskussion	54
5.1 Positiver Test auf Interaktion von GAPVD1 und PER2 durch PLA	54
5.1.1 Eignung der verwendeten Antikörper	54
5.1.2 Stärken und Schwächen des PLA	55
5.1.3 Alternative Methoden für die Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen	58
5.2 Mögliche biologische Funktionen der Interaktion von PER2 und GAPVD1 ..	60
Schlussfolgerungen	62
Ausblick	62
6 Literaturverzeichnis	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die verschiedenen Zelltypen der Retina und ihre Verbindung mit dem Tractus opticus	3
Abbildung 2: Neuronale Projektionen des SCN	4
Abbildung 3: Interaktion zwischen zentraler Uhr und peripheren Uhren	6
Abbildung 4: Wechselseitige Regulation von Melatonin und SCN	7
Abbildung 5: Aufbau des molekularen Oszillators	9
Abbildung 6: Ablauf der Autophagie	12
Abbildung 7: Identifikation mit PER2 interagierender Proteine.....	13
Abbildung 8: Struktur von GAPVD1	13
Abbildung 9: Prinzip des PLA	33
Abbildung 10: Test des anti-PER2 und des anti-GFP im Western Blot.....	36
Abbildung 11: Test des anti-GAPVD1(K) und anti-GAPVD1(M) im Western Blot	38
Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbungen von PER2 und GFP in HT1080 PER2-GFP-Zellen	40
Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbungen der anti-GAPVD1s in HT1080 Wildtyp-Zellen.....	41
Abbildung 14: Negativkontrollen und Positivkontrolle von anti-PER2 und anti-GFP im PLA in HT1080 PER2-GFP.....	43
Abbildung 15: Negativ- und Positivkontrollen des anti-PER2 und anti-GFP in HT1080 PER2-GFP.....	44
Abbildung 16: Negativkontrollen und Positivkontrolle der anti-GAPVD1s im PLA in HT1080 PER2-GFP	45
Abbildung 17: Negativ- und Positivkontrollen der anti-GAPVD1s im PLA in HT1080 PER2-GFP.....	47
Abbildung 18: PLA der Proteine PER2-GFP und GAPVD1 in HT1080 PER2-GFP	48
Abbildung 19: Statistische Auswertung des PLA mit anti-GAPVD1(K) und anti-GFP in HT1080 PER2-GFP-Zellen	49
Abbildung 20: PLA der Proteine PER2 und GAPVD1 in HT1080 Wildtyp-Zellen mit Negativkontrollen	51
Abbildung 21: Statistische Auswertung des PLA mit anti-GAPVD1(M) und anti-PER2 in Wildtyp HT1080-Zellen.	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien	15
Tabelle 2: Medien für die Zellkultur	15
Tabelle 3: Puffer und Stammlösungen.....	15
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien	16
Tabelle 5: Primäre Antikörper	17
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper	18
Tabelle 7: siRNAs	19
Tabelle 8: sonstige Proteine.....	19
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 10: Kits	20
Tabelle 11: Geräte	21

1 Einleitung

So gut wie alle physiologischen Prozesse in Säugetieren unterliegen circadianen Oszillationen. Diese Oszillationen basieren wiederum auf der endogenen circadianen Uhr, einem selbsterhaltenden, zellautonomen Mechanismus, dessen Rhythmizität unter konstanten Bedingungen nur geringfügig von 24 h abweicht (lat. *circa* = ungefähr, *dies* = Tag) und der durch relevante Umweltsignale mit der Außenwelt synchronisiert wird (Reinke and Asher, 2019).

Alle circadianen Uhren zeichnen sich durch drei definierende Eigenschaften aus: Freilauf, *Entrainment* und Temperaturkompensation (Johnson et al., 2003).

Freilauf bedeutet, dass die Rhythmizität ohne äußere Einflüsse bestehen bleibt, und das in der Regel über die gesamte Lebensspanne eines Organismus (Aschoff et al., 1967). In Analogie zu mechanischen Uhren könnte man den Freilauf als die kontinuierliche Bewegung des Uhrwerks und der Zeiger verstehen.

Da ihre endogene Periodenlänge in der Regel leicht vom 24-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus abweicht, muss die circadiane Uhr ständig mit der Umwelt synchronisiert werden. Dieser Prozess wird *Entrainment* genannt, und Signale mit der Fähigkeit zur Synchronisierung circadianer Uhren werden als ‚Zeitgeber‘ bezeichnet (Golombek and Rosenstein, 2010). Bleibt man bei der oben erwähnten Analogie, entspricht das *Entrainment* dem Stellen einer mechanischen Uhr.

Schließlich sind circadiane Uhren molekulare Mechanismen (Shearman et al., 2000b, Zehring et al., 1984), worauf später noch detaillierter eingegangen wird, und damit, wie alle chemischen Reaktionen und Gleichgewichtsverhältnisse, grundsätzlich temperaturabhängig (Liu et al., 1998). Um dem entgegenzuwirken und einen gleichbleibenden Gang der inneren Uhr bei unterschiedlichen Temperaturen zu garantieren, sind circadiane Uhren temperaturkompensiert (Pittendrigh, 1954). Darüber hinaus existieren weitere Kompensationsmechanismen wie beispielsweise die transkriptionelle Kompensation (Dibner et al., 2009), die man in ihrer Gesamtheit als das robuste Gehäuse einer mechanischen Uhr sehen könnte.

Unter den physiologischen Prozessen, die von der circadianen Uhr gesteuert werden, ist der Schlaf-Wach-Rhythmus von besonderer Bedeutung. Tatsächlich unterliegen die meisten anderen Körperfunktionen ebenfalls einer circadianen Kontrolle, wie z.B. die Körpertemperatur, der Glucosestoffwechsel und der Blutdruck, um nur wenige zu nennen (Fleur, 1999, Refinetti and Menaker, 1992, Millar-Craig et al., 1978).

1.1 Hierarchischer Aufbau des circadianen Systems

Säugetiere besitzen ein hierarchisch aufgebautes System zur Aufrechterhaltung des circadianen Rhythmus. Der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) wird durch Licht mit der Außenwelt synchronisiert und erfüllt die Aufgabe einer ‚*Master Clock*‘. Diese synchronisiert periphere Oszillatoren, die in beinahe jeder Zelle des Körpers vorhanden sind (Dibner et al., 2010).

Lichtsignale, die auf die Retina treffen, werden durch drei verschiedene Typen von Photorezeptoren wahrgenommen: Den Zapfen und Stäbchen, sowie den intrinsisch photosensitiven retinalen Ganglionzellen (ipRGCs) (Hattar et al., 2002, Berson et al., 2002). Die retinalen Ganglionzellen, zu denen die ipRGCs als Untergruppe gehören, befinden sich in der inneren Schicht der Retina (*Stratum ganglionare*), welche an den Glaskörper grenzt. Die ipRGCs exprimieren Melanopsin, ein Opsin-Protein (Provencio et al., 2000). Sie sind für die sogenannten nicht bildgebenden Sehfunktionen (*non-image-forming vision*) verantwortlich (Guler et al., 2008) (Abb. 1).

MELANOPSIN weist die höchste Spektralempfindlichkeit bei ~480 nm auf (Walker et al., 2008), was blauem/cyanfarbenem Licht entspricht. MELANOPSIN ist bei Dunkelheit an das Chromophor 11-*cis* Retinal gebunden. Dieses isomerisiert bei Anregung durch Licht zu all-*trans* Retinal, was zu einer Änderung der Proteinkonformation des MELANOPSINS führt (Walker et al., 2008). Hierdurch wird eine Kaskade von Signalproteinen aktiviert, die schließlich in der Depolarisation der Zellen resultiert (Berson et al., 2002). Das elektrische Signal wird über die Axone der ipRGCs aus der Retina über den *Tractus opticus* und das *Chiasma opticum* weitergeleitet und in verschiedene Hirnregionen, darunter den SCN, projiziert (Hannibal and Fahrenkrug, 2004, Hattar et al., 2002, Hattar et al., 2006).

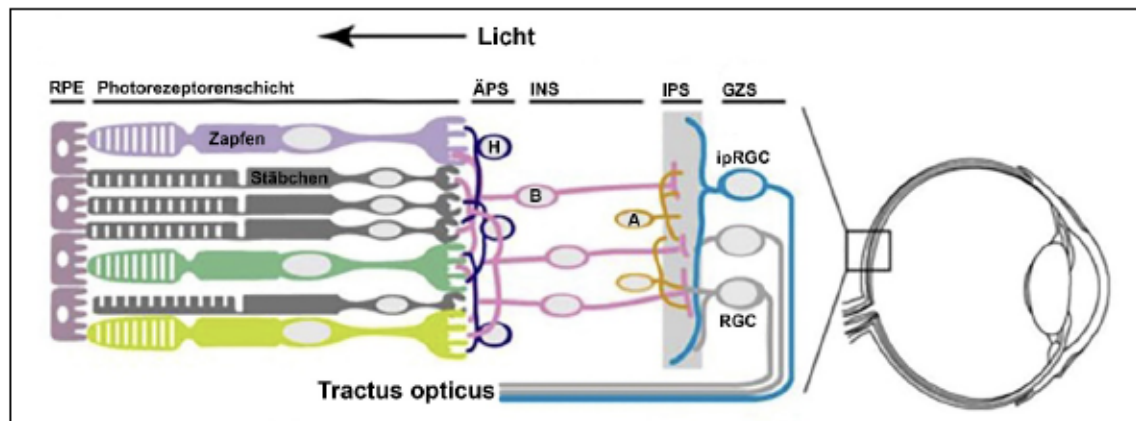


Abbildung 1: Die verschiedenen Zelltypen der Retina und ihre Verbindung mit dem Tractus opticus

Horizontalzellen (H); Bipolarzellen (B); Amakrinzellen (A); retinale Ganglienzellen (RGC); intrinsisch photosensitive Ganglienzellen (ipRGC); retinales Pigmentepithel (RPE); äußere plexiforme Schicht (ÄPS); innere nukleäre Schicht (INS); innere plexiforme Schicht (IPS); Ganglienzellschicht (GZS); bearbeitet nach (Hatori and Panda, 2010).

Der SCN steuert periphere Uhren mittels neuronaler Verbindungen und Hormonsekretion (Buijs et al., 2003). Auf neuronaler Ebene scheinen direkte Verbindungen des SCN zu neuroendokrinen Neuronen zu bestehen, welche beispielsweise CORTICOTROPIN-RELEASING-HORMONE (CRH) oder GONADOTROPIN-RELEASING-HORMONE sezernieren (de la Iglesia et al., 1995, Vrang et al., 1995). Über Zwischenneurone erreicht der SCN indirekt Gebiete, die neuroendokrine Pfade regulieren, wie den medialen präoptischen Kern (MPN) und den dorsomedialen Hypothalamus (DMH) (Deurveilher and Semba, 2003, Berk and Finkelstein, 1981) (Abb. 2). Der MPN ist in die Regulation des Reproduktionszyklus involviert (Shughrue et al., 1997) und der DMH ist an der Regulation der CRH-Sekretion beteiligt (Ter Horst and Luiten, 1987, Raadsheer et al., 1993). Über direkte neuronale Verbindungen wird die subparaventriculäre Zone des Hypothalamus (SPZ) erreicht (Watts et al., 1987). Die SPZ reguliert mit ihrem ventralen Anteil den Schlafrhythmus und die Bewegungsaktivität, mit ihrem dorsalen Anteil leitet sie Signale des SCN weiter, die den Rhythmus der Körpertemperatur kontrollieren (Lu et al., 2001). Darüber hinaus existieren Projektionen des SCN zu extrahypothalamischen Regionen, beispielsweise zum *Nucleus paraventricularis* des Thalamus (PVT) und zum *Corpus geniculatum laterale* (LGN) (Vrang et al., 1995, Watts et al., 1987). Die Rolle der Projektionen zum PVT und LGN sind noch nicht geklärt (Buijs and Kalsbeek, 2001). Insbesondere Projektionen zum autonomen *Nucleus paraventricularis* (aPVN) beeinflussen das autonome Nervensystem, über welches die peripheren Organe mit dem Rhythmus des SCN synchronisiert werden (Hermes et al., 1996, Swanson and Sawchenko, 1980, Cailotto et al., 2009) (Abb. 2).

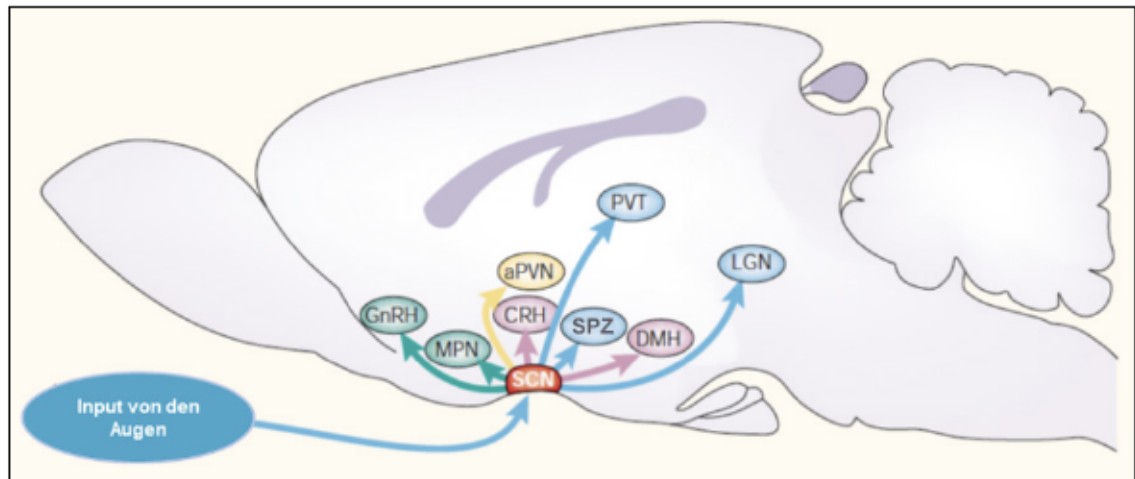


Abbildung 2: Neuronale Projektionen des SCN

Nucleus suprachiasmaticus (SCN); Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH); medialer präoptischer Kern (MPN); autonomer *Nucleus paraventricularis* (aPVN); Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH); dorsomedialer Hypothalamus (DMH); *Nucleus paraventricularis* (PVT); subparaventriculäre Zone (SPZ); *Corpus geniculatum laterale* (LGN); grüne Pfeile: Faserverläufe des SCN zu Neuronen, die den Reproduktionszyklus regulieren; gelber Pfeil: neuronale Projektion des SCN zu Neuronen des autonomen *Nucleus paraventricularis* (aPVN); violette Pfeile: Verbindungen des SCN zu CRH-produzierenden Neuronen, direkt und indirekt über den DMH; blaue Pfeile: Verbindungen des SCN zu den extrahypothalamischen Regionen PVT und LGN, sowie zu den Zwischenneuronen der SPZ des Hypothalamus; bearbeitet nach (Buijs and Kalsbeek, 2001).

Der SCN kann zudem VASOPRESSIN (AVP), PROKINETICIN-2 (PK2) und TRANSFORMING GROWTH FACTOR ALPHA (TGF α) sezernieren (Tonsfeldt and Chappell, 2012). Der AVP-Spiegel weist einen rhythmischen Verlauf auf, der bei fehlendem Entainment durch Licht-/Dunkelsignale für drei Wochen aufrechterhalten wird (Isobe and Nishino, 1998). Ebenfalls kontrolliert AVP über den dorsomedialen Hypothalamus (DMH) die Freisetzung von Corticosteroiden in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Kalsbeek et al., 1996). Sezerniertes PK2 löst Signale in verschiedenen Hypothalamusregionen aus, die PK2-Rezeptoren exprimieren, besonders im *Nucleus preopticus*, aber auch im Broca-Band und dem *Nucleus arcuatus* (Zhang et al., 2009). TGF α sezernierende Zellen sind im gesamten SCN vorhanden, jedoch zu einem größeren Anteil im Kern als im Randgebiet des SCN (Van der Zee et al., 2005). Der Wachstumsfaktor TGF α greift in Prozesse wie das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung ein und fördert über die Bindung an überexprimierten Epidermal Growth Factor Receptor das Wachstum und die Metastasierung von Krebszellen (Vassar and Fuchs, 1991, Hynes and Lane, 2005, Zhang et al., 2017).

Neben den beschriebenen Outputfunktionen erhält der SCN als Kerngebiet des Hypothalamus Informationen von peripheren Organen, die ihre eigenen Uhren besitzen. Buijs und Kalsbeek vermuten, dass dies über neuronale und hormonelle Verbindungen gleichermaßen geschieht (Buijs and Kalsbeek, 2001) (Abb. 3). Vagale sensorische Informationen laufen über den *Nucleus tractus solitarii* und über den *Nucleus parabrachialis* (PBN) (Felder and Mifflin, 1988). Es bestehen Verbindungen des PBN zum Hypothalamus, über die auch die vagalen Informationen laufen könnten (Saper and Loewy, 1980, Buijs and Kalsbeek, 2001). Sensorische Informationen erreichen das Hinterhorn des Rückenmarks. Vom Hinterhorn aus verlaufen Projektionen zum PBN, über welche auch diese Informationen zum Hypothalamus weitergeleitet werden könnten (Cechetti et al., 1985, Saper and Loewy, 1980, Buijs and Kalsbeek, 2001). In dem Modell von Buijs und Kalsbeek gelangen auch hormonelle Signale von peripheren Uhren ausgehend an den Hypothalamus (Buijs and Kalsbeek, 2001). Diese Hypothese konnte allerdings noch nicht belegt werden (Abb. 3). Die beschriebenen Verbindungen würden es erlauben periphere Prozesse mit den Lichtinformationen aus der Umwelt zu koordinieren. Signale aus der Peripherie haben für den SCN allerdings im Vergleich mit dem Lichtsignal nur eine untergeordnete Bedeutung (Blume et al., 2019).

Über neuronale und hormonelle Wege steuert der SCN den PVT an, von welchem laut Buijs und Kalsbeek drei verschiedene Pfade ausgehen und Einfluss auf periphere Uhren nehmen könnten (Hermes et al., 1996, Tousson and Meissl, 2004, Buijs and Kalsbeek, 2001). Der PVT setzt *Thyreotropin-Releasing-Hormone* (TRH) frei (Fliers et al., 1994). TRH erhöht die neuronale Feuerungsrate des *Nucleus dorsalis nervi vagi* (Travagli et al., 1992), welcher als möglicher circadianer Schrittmacher gilt und periphere Uhren synchronisieren könnte (Mieda et al., 2006). Diese Stationen bilden den ersten möglichen Pfad zu den peripheren Uhren (Buijs and Kalsbeek, 2001). Vom PVT aus laufen autonome Fasern zur *Columna intermediolateralis* (IML) (Ono et al., 1978). Autonome Fasern von der IML ziehen zu den Grenzstrangganglien und von dort zu peripheren Organen (Appel and Elde, 1988). Die beschriebenen autonomen Signale, die über den PVT und IML laufen, könnten als zweiten Pfad periphere Uhren beeinflussen (Buijs and Kalsbeek, 2001). Die dritte Möglichkeit zur Synchronisation peripherer Uhren mit dem SCN läuft ausschließlich über Hormone. Von dem durch den SCN getakteten PVT gelangt TRH zur Hypophyse (Fliers et al., 1994). Circadian kontrollierte Hypophysenhormone könnten über diesen Weg periphere Uhren synchronisieren (Buijs and Kalsbeek, 2001).

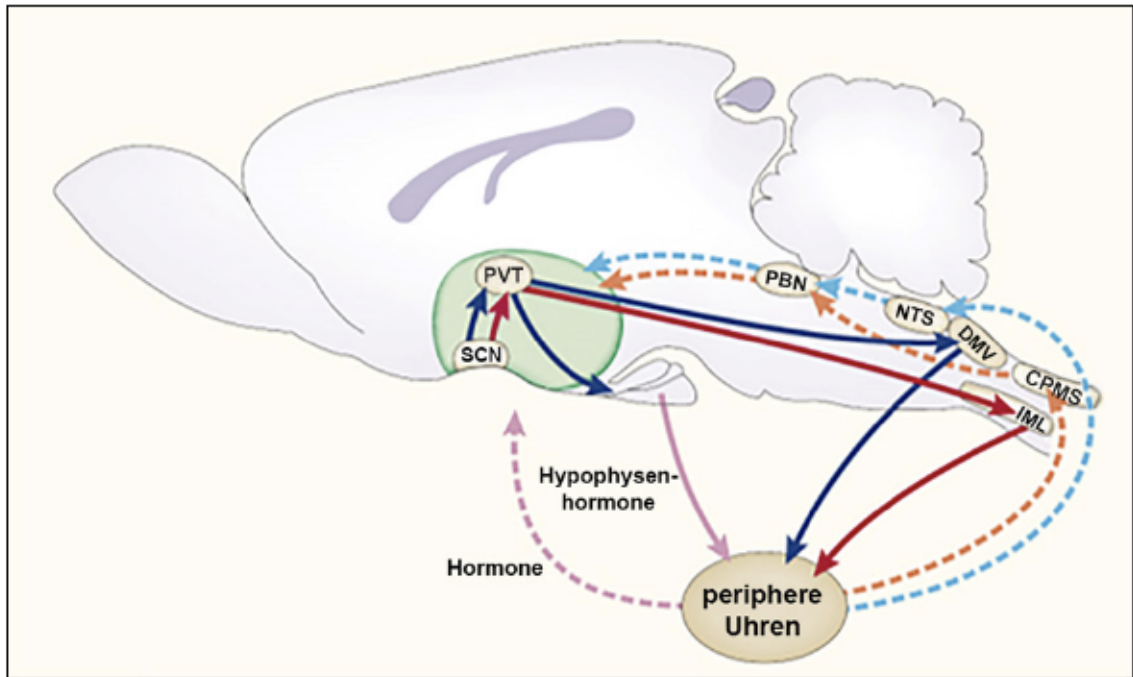


Abbildung 3: Modell der Interaktion zwischen zentraler Uhr und peripheren Uhren

Nucleus suprachiasmaticus (SCN); Nucleus paraventricularis (PVT); Nucleus parabrachialis (PBN); Nucleus tractus solitarius (NTS); Nucleus dorsalis nervi vagi (DMV); Hinterhorn/Cornu posterius medullae spinalis (CPMS); Columna intermediolateralis (IML); grün hinterlegter Bereich: Hypothalamus; durchgezogene Pfeile: Signale des SCN an periphere Uhren, blau: hormonelle Signale, rot: autonome Signale, rosa: Signale via Hypophysenhormone; gestrichelte Pfeile: Signale peripherer Uhren an den SCN, hellblau: vagale sensorische Informationen, orange: sympathische sensorische Informationen, rosa: hormonelle Signale; bearbeitet nach (Buijs and Kalsbeek, 2001).

1.2 Regulation der inneren Uhr durch Melatonin

Vom SCN verläuft eine neuronale Verbindung über das sympathische Nervensystem zur Zirbeldrüse (*Glandula pinealis*) (Moore, 1996) (Abb. 4). Bei Dunkelheit setzen die noradrenergen Fasern Noradrenalin frei und führen in der Zirbeldrüse zu einer Freisetzung von intrazellulär gespeicherter N-Acetyltransferase (NAT) (Wurtman et al., 1967, Klein et al., 1983b). Die NAT katalysiert die Umwandlung von SEROTONIN zu N-ACETYL-SEROTONIN, dem Vorläufer von Melatonin (Weissbach et al., 1960, Klein, 2007). Da die Aktivität der NAT durch Licht reprimiert wird (Klein et al., 1997), kann MELATONIN nur bei Dunkelheit produziert werden und wird daher auch als ‚Dunkelheitshormon‘ bezeichnet (Utiger, 1992).

MELATONIN wird von der Zirbeldrüse sekretiert und bindet an Melatoninrezeptoren in hypothalamischen Bereichen wie dem PVT sowie im SCN (Weaver et al., 1989). Die Bindung von Melatonin an seine Rezeptoren im SCN führt zur Phasenverschiebung

der circadianen Uhr (Hunt et al., 2001a). MELATONIN ist nach Licht der zweitwichtigste Zeitgeber für den SCN (Lewy et al., 2003).

4

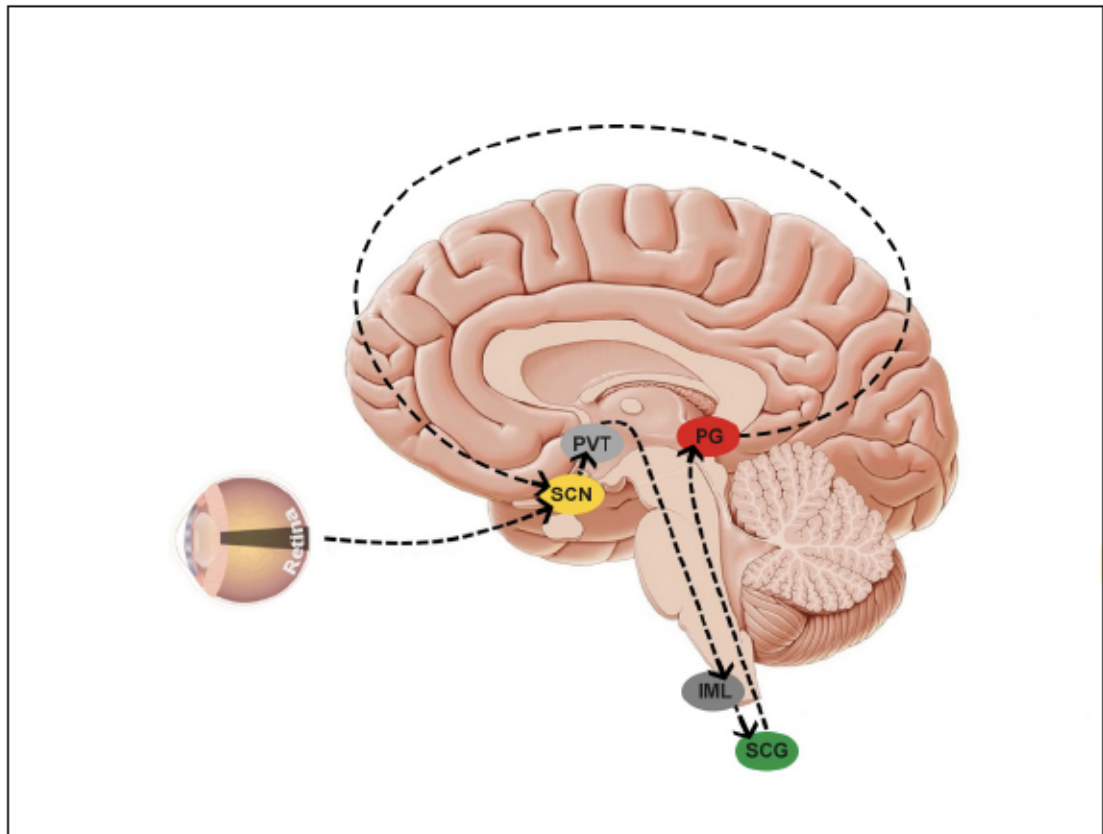


Abbildung 4: Wechselseitige Regulation von Melatonin und SCN

Das Auftreffen von Licht auf der Retina führt zu neuronalen Signalen über folgende Schaltpunkte: Nucleus suprachiasmaticus (SCN), Nucleus paraventricularis (PVT), Columna intermediolateralis (IML), Ganglion cervicale superius (SCG), Glandula pinealis (PG). Hier wird Melatonin freigesetzt, das über Melatoninrezeptoren im SCN eine rückkoppelnde Wirkung besitzt; bearbeitet nach (Genario et al., 2019), modifiziert nach (Klein et al., 1983a, Hunt et al., 2001b).

MELATONIN sowie seine Abbauprodukte können zur Bestimmung der circadianen Phase herangezogen werden. Ein rhythmischer Melatoninspiegel liegt im Blutplasma und Speichel vor (Kennaway and Voultsios, 1998). Ein Abbaumetabolit kann zudem im Urin gemessen werden (Benloucif et al., 2008). Andere Marker für den circadianen Rhythmus sind Cortisol (Kobberling and zur Muhlen, 1974) und die Körperkerntemperatur (Refinetti and Menaker, 1992).

Der Melatoninrezeptor-Agonist ‚Tasimelteon‘ kann zur Behandlung des Non-24-Syndroms, einem Leiden vorrangig vollblinder Menschen, eingesetzt werden (Lockley et al., 2015). Für den circadianen Rhythmus betroffener Personen funktioniert Licht nicht

als Zeitgeber, wodurch deren circadiane Uhr und damit auch der Schlaf-Wach-Rhythmus nicht mit der Umwelt synchronisiert werden kann (Okawa and Uchiyama, 2007). Die Behandlung mit dem Melatoninrezeptor-Agonisten kann in diesen Fällen zur Synchronisierung mit der Außenwelt genutzt werden (Lockley et al., 2015).

Zudem kann MELATONIN Jetlag-Symptome bei Flügen über mehrere Zeitzonen lindern, wenn es nahe der gewünschten Einschlafzeit eingenommen wird (Lewy, 2003). In der Europäischen Union (EU) hat die ‚Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit‘ MELATONIN als ‚Lebensmittelbestandteil (*food constituent*)‘ eingeordnet und empfiehlt bei Jet Lag-Symptomen eine Dosis von 0,5-5 mg während der ersten Tage der Reise zur Einschlafzeit (EFSA Panel on Dietetic Products and Allergies, 2010). Als Medikament ist MELATONIN in der EU unter der Bezeichnung ‚Circadin®‘ lediglich zur Behandlung von Patienten ab 55 Jahren mit primärer Insomnie zugelassen (Grossman et al., 2011).

1.3 Der molekulare Mechanismus der inneren Uhr

Die circadiane Uhr selbst ist ein molekularer Mechanismus, der sich in Säugetieren in fast jeder ausdifferenzierten Zelle befindet (Partch et al., 2014). Das wichtigste Element des molekularen Oszillators sind sogenannte transkriptionelle/translationelle negative Rückkopplungsschleifen (Takahashi, 2017). Die Proteine CIRCADIAN LOCOMOTOR OUTPUT CYCLES KAPUT (CLOCK) und BRAIN AND MUSCLE ARNT-LIKE 1 (BMAL1) bilden Heterodimere (CLOCK/BMAL1) und aktivieren die Transkription der *Period1*-, *Period2*-, *Period3*- (*Per1*, *Per2*, *Per3*) und *Cryptochrome 1/2*-Gene (*Cry1/2*) (Gekakis et al., 1998, Jin et al., 1999). Wenn die PER- und CRY-Proteine eine bestimmte zelluläre Konzentration erreicht haben, reprimieren sie ihre eigene Transkription indem sie an CLOCK/BMAL1 binden (Kume et al., 1999, Ye et al., 2014). Diese zentrale Rückkopplungsschleife wird durch weitere Rückkopplungsschleifen bestehend aus nukleären Rezeptoren der Typen RAR-RELATED ORPHAN RECEPTOR (ROR) (RAR-RELATED ORPHAN RECEPTOR ALPHA, RAR-RELATED ORPHAN RECEPTOR BETA, RAR-RELATED ORPHAN RECEPTOR GAMMA), NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 1, GROUP D, MEMBER 1 (NR1D1) und NUCLEAR RECEPTOR SUBFAMILY 1, GROUP D, MEMBER 2 (NR1D2), welche die *Bmal1*-Expression regulieren, ergänzt (Abb. 5) (Preitner et al., 2002, Sato et al., 2004, Ueda et al., 2002, Guillaumond et al., 2005). Posttranskriptionelle Regulation der Uhrenproteine sorgt für eine Feinabstimmung der inneren Uhr, indem die Periodenlänge des Oszillators durch

phosphorylierungsabhängige Ubiquitinierung von PER und CRY über zwei verschiedene Mechanismen reguliert wird (Eide et al., 2005, Lamia et al., 2009, Gatfield and Schibler, 2007). An diesem Prozess sind hauptsächlich die Kinasen CASEIN KINASE 1 DELTA (CSNK1D) und CASEIN KINASE 1 EPSILON (CSNK1E) beteiligt (Camacho et al., 2001, Keesler et al., 2000). Ohne posttranskriptionelle Regulation hätte der molekulare Oszillator eine Periodenlänge von deutlich weniger als 24 h, daher muss eine Verzögerung zwischen Aktivierung und Repression der Transkription erfolgen. Reversible Phosphorylierung und andere posttranskriptionelle Mechanismen regulieren Vorgänge wie subzelluläre Lokalisation von Uhrenproteinen, Bildung von Proteinkomplexen und Proteinabbau. In ihrer Gesamtheit tragen diese Prozesse zur Verlängerung der Periodenlänge auf ungefähr 24 h bei (Gallego and Virshup, 2007).

5

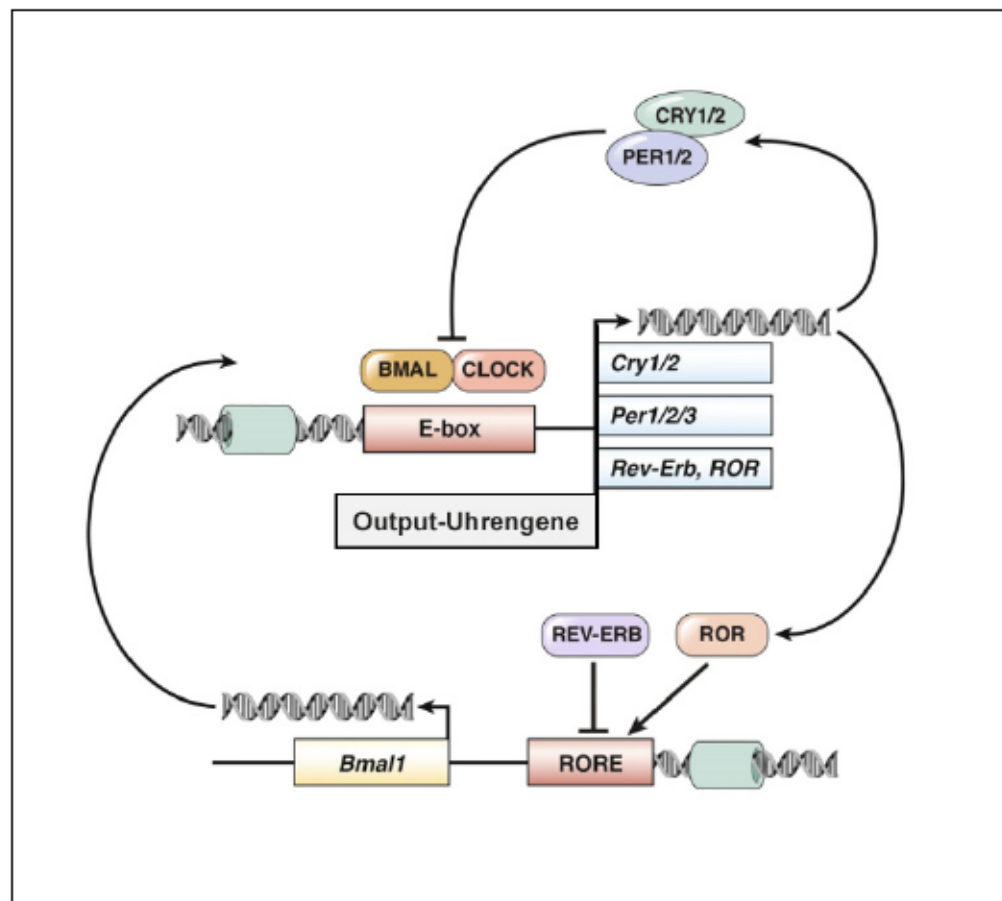


Abbildung 5: Aufbau des molekularen Oszillators

Der molekulare Oszillator besteht im Kern aus negativen Rückkopplungsschleifen. Die Aktivatorproteine CLOCK und BMAL1 aktivieren die Expression von *Cry*, *Per*, *ROR* und *Rev-Erb* (*Nr1d1*, *Nr1d2*) über E-boxen in deren Promotorregionen. PER und CRY reprimieren ihre eigene Transkription. Die Proteine REV-ERB (NR1D1, NR1D2) und ROR bilden eine unterstützende Rückkopplungsschleife, welche die Expression von BMAL1 reguliert; bearbeitet nach (Reinke and Asher, 2016).

Uhrenproteine haben Funktionen innerhalb und außerhalb des molekularen Oszillators, da sie auch Zielgene außerhalb der circadianen Uhr regulieren. Mutationen verschiedener Uhrengene rufen daher sehr unterschiedliche physiologische Phänotypen hervor (Marcheva et al., 2010, Viswambharan et al., 2007, Gamsby et al., 2013, Miller et al., 2004).

1.4 Zentrale Stellung von PER2 und CSNK1D/E im molekularen Oszillator

Insbesondere die Interaktion von PER2 und CSNK1D/E spielt eine essentielle Rolle im molekularen Oszillator, da sie grundlegende Eigenschaften der circadianen Uhr beeinflusst (Meng et al., 2010). Herunterregulation von PER2 oder CSNK1D/E verlängert die Periodenlänge in kultivierten Osteosarkom-Zellen (Baggs et al., 2009). Des Weiteren bestimmt die temperaturabhängige Phosphorylierung spezifischer Proteindomänen von PER2 durch CSNK1D/E die Geschwindigkeit des Abbaus von PER2. Dies macht einen wesentlichen Bestandteil des Temperaturkompensationsmechanismus aus und beeinflusst darüber hinaus auch Periodenlänge und Phasenverschiebungseigenschaften des Oszillators (Badura et al., 2007, Isojima et al., 2009, Qin et al., 2015). Der beschriebene Vorgang wird eindrucksvoll am Beispiel des *Familial Advanced Sleep Phase Syndrome* verdeutlicht. Betroffene besitzen eine stark vorverlagerte Schlafphase, bei der eine sehr frühe Einschlafzeit mit frühmorgendlichem Erwachen einhergeht (Jones et al., 1999). Zwei Punktmutationen in entweder *Per2* oder *Csnk1d/e*, die beide zu einer Hypophosphorylierung von PER2 führen, rufen hierbei einen identischen Phänotyp hervor (Toh et al., 2001, Xu et al., 2005).

Säugetiere besitzen drei *Per*-Gene: *Per1*, *Per2* und *Per3* (Albrecht et al., 1997, Takumi et al., 1998). PER1/2/3, CRY1/2 und CSNK1D bilden mit weiteren Proteinen einen Komplex, der im Kern mit dem CLOCK/BMAL1-Heterodimer interagiert. Dadurch wird die Transkription der *Per*- und *Cry*-Gene reprimiert (Aryal et al., 2017). Ausschalten von *Per1* und/oder *Per2* beeinflusst wesentliche Eigenschaften der circadianen Uhr während Ausschalten von *Per3* nicht in die Regulation der circadianen Uhr eingreift (Zheng et al., 2001, Shearman et al., 2000a). Neben ihrer Rolle in der Rückkopplungsschleife der circadianen Uhr sind PER-Proteine an Prozessen wie dem Zellzyklus und dem zellulären Metabolismus beteiligt und stehen damit in Verbindung zu verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen wie Altern und der Tumorentstehung (Kalfalah

et al., 2016, Gu et al., 2012). Ein besseres Verständnis aller zellulärer Funktionen von PER-Proteinen ist daher wesentlich für die Entwicklung von Therapien gegen metabolische und maligne Erkrankungen.

1.5 PER2 und Autophagie

PER2 hat eine wichtige Funktion bei der Regulation von Alterungsprozessen. In gealterten primären humanen Fibroblasten ist PER2 geringer exprimiert als in Fibroblasten von jungen Individuen. Die reduzierte PER2-Expression korreliert in diesen Zellen stark mit verminderten Autophagieleveln. In murinen Fibroblasten führt die Herunterregulation von PER2 ebenfalls zu erniedrigten Autophagieleveln, was wiederum ein schnelleres Fortschreiten von Alterungsprozessen bewirkt (Kalfalah et al., 2016). Die Autophagie ist ein kataboler Prozess, bei dem Zellen ihre eigenen Bestandteile abbauen (De Duve, 1963). Dieser Mechanismus wird durch verschiedene Arten von zellulärem Stress induziert und dient zum einen der Energiebereitstellung und hat zum anderen zytoprotektive Funktion indem er potentiell schädliches Material, wie beispielsweise Proteinaggregate, aus dem Zytosol eliminiert (Lum et al., 2005, Kroemer et al., 2010, Fortun et al., 2003). Neben ihrer Funktion zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase greift die Autophagie in den Nährstoffmetabolismus in Hungerphasen ein indem Autophagie bei Nährstoffmangel induziert wird (Mizushima et al., 2004). Ist der Prozess der Autophagie gestört, so kommt es zu einem erniedrigten Plasma-Glucosespiegel (Ezaki et al., 2011). Niedrige Autophagielevel stehen im Zusammenhang mit unterschiedlichen Erkrankungen wie Krebs, Diabetes, Hepatosteatose, skeletaler Myopathie und Neurodegeneration (Liang et al., 1999, Kaniuk et al., 2007, Lin et al., 2013, Grumati et al., 2010, Komatsu et al., 2006).

Die Induktion der Autophagie führt zur Rekrutierung von Autophagieproteinen zur *Phagophore Assembly Site* (Kim et al., 2002, Suzuki et al., 2001). Dort wird eine Doppelmembran geformt, welche eine Vertiefung bildet und Phagophor genannt wird (Mizushima, 2007). Die Membranbestandteile hierfür können aus verschiedenen zellulären Quellen stammen, beispielsweise aus dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat (van der Vaart and Reggiori, 2010, Hayashi-Nishino et al., 2009). Die Phagophormembran schließt sich um die abzubauenen Zellbestandteile und das resultierende Vesikel wird Autophagosom genannt (Mizushima, 2007). Anschließend verschmilzt das Autophagosom mit dem Lysosom zu einem Autolysosom (Mizushima,

2007). Die innere, nun im Autolysosom liegende, Autophagosomenmembran wird zusammen mit den Zielmolekülen durch das hydrolytische Milieu abgebaut (Dunn, 1994) (Abb. 6).

6

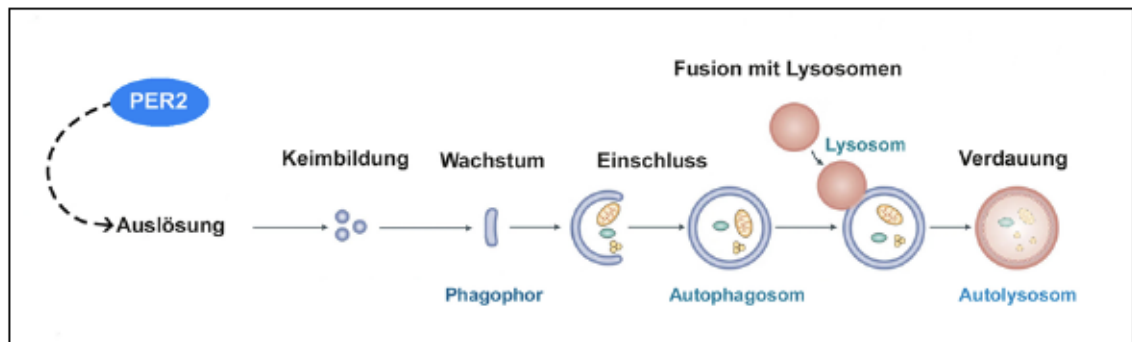


Abbildung 6: Ablauf der Autophagie

Ablauf der Autophagie von der Bildung des Autophagosoms mit Einschluss der zu verdauenden Moleküle, über die Fusion mit Lysosomen, bis zum Abbau der Vesikelbestandteile, bearbeitet nach (Menziez et al., 2015).

Die Autophagie wird durch die circadiane Uhr rhythmisch aktiviert, wobei insbesondere das Uhrenprotein PER2 eine zentrale Rolle spielt (Kalfalah et al., 2016). PER2 scheint den Autophagieprozess allerdings nicht über transkriptionelle Steuerung von Autophagiegengen zu regulieren, zumindest konnte keine Deregulation von mit der Autophagie in Verbindung stehenden Genen nach Herunterregulation von PER2 gefunden werden (Janke und Reinke, unveröffentlicht). Aus diesem Grund wurde eine Regulation der Autophagie durch PER2 über Protein-Protein-Interaktionen in Betracht gezogen.

1.6 Interaktion von PER2 und GAPVD1 in Immunpräzipitation und Massenspektrometrie

Um potenzielle PER2-Interaktoren mit Funktionen im Autophagieprozess zu identifizieren wurden mit PER2 assoziierte Proteine durch Immunpräzipitation angereichert und anschließend durch Massenspektrometrie identifiziert. In diesem Experiment wurde unter anderem GTPASE-ACTIVATING PROTEIN AND VPS9 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1 (GAPVD1) als Interaktionspartner von PER2 gefunden. GAPVD1 wurde innerhalb eines Konfidenzintervalls von einer Anreicherung >5x mit $p < 0.0005$ identifiziert, in das auch die Uhrenproteine fallen, die bekanntermaßen einen Proteinkomplex mit PER2 bilden (Abb. 7) (Aryal et al., 2017, Ibrahim et al., 2021).

7

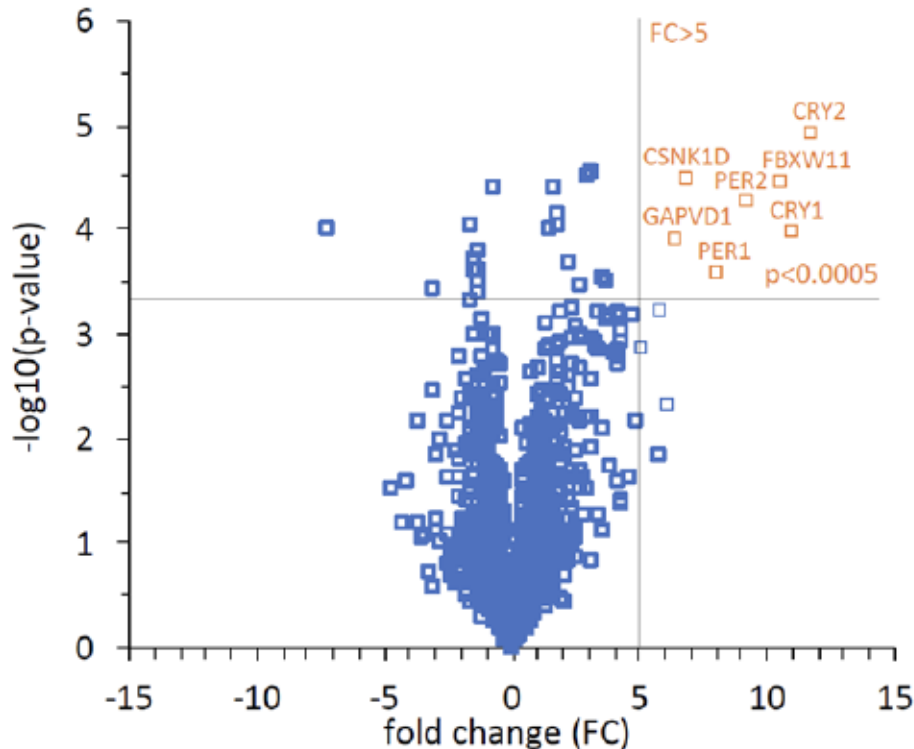


Abbildung 7: Identifikation mit PER2 interagierender Proteine

Streudiagramm von Proteinen, die als Interaktoren von PER2 identifiziert worden sind. GAPVD1 liegt mit bekannten PER2-Interaktoren in einem Konfidenzintervall (Anreicherung >5x, T-Test $p < 0,00005$); (Ibrahim et al., 2021).

1.7 Funktionen des Proteins GAPVD1

Das Protein GAPVD1 enthält eine VACUOLAR PROTEIN SORTING-ASSOCIATED PROTEIN 9 (VPS9)-Domäne mit Rab-GEF-Aktivität am C-Terminus und eine Ras-GAP-Domäne am N-Terminus, die durch einen Proteinabschnitt ohne bekannte Domänenstruktur getrennt sind (Abb. 8) (Delprato et al., 2004, Hunker et al., 2006). Durch die Kombination dieser Domänen könnte GAPVD1 eine Verbindung zwischen den Rab- und Ras-Signalwegen herstellen.

8

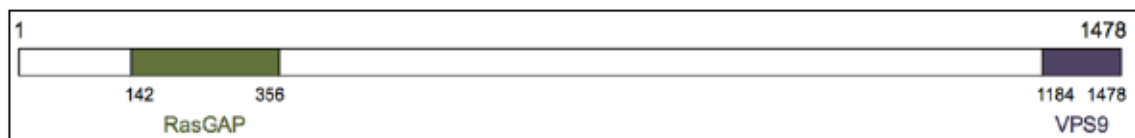


Abbildung 8: Struktur von GAPVD1 (human)

Das humane Protein GAPVD1 besteht aus 1478 Aminosäuren. Am N-Terminus verfügt es über eine RasGAP-Domäne und am C-Terminus befindet sich eine VPS9-Domäne; erstellt nach (Hunker et al., 2006).

Das Motiv der VPS9-Domäne findet sich ebenfalls in der katalytischen Domäne von GTP-Austauschfaktoren für GTPasen der RAS-RELATED PROTEIN IN BRAIN 5 (Rab5)-Familie (Carney et al., 2006, Delprato et al., 2004). Rab5 ist an Transportprozessen durch Vesikelbildung beteiligt, beispielsweise der Clathrin-vermittelten Endocytose sowie nachfolgenden Abläufen in frühen Endosomen (Gorvel et al., 1991, Bucci et al., 1992). Die Rolle von GAPVD1 in der Phagozytose steht im Einklang mit der Lokalisation des Proteins (Kitano et al., 2008). Es befindet sich vorwiegend im Zytoplasma, wobei ein nicht konstanter Anteil im Bereich der Plasmamembran zu finden ist (Lodhi et al., 2007). Sollte PER2 tatsächlich in Zellen mit GAPVD1 interagieren, würde diese Interaktion PER2 mit GAPVD1-regulierten Prozessen in Verbindung bringen. Da PER2 die Autophagie reguliert (Kalfalah et al., 2016) und Autophagie eng mit vesikulärem Transport verbunden ist (Papandreou and Tavernarakis, 2020), könnte PER2 seine Funktion in der Autophagie über die Interaktion mit GAPVD1 ausüben.

1.8 Ziele der Arbeit

GAPVD1 wurde in Vorarbeiten als potenzieller Interaktionspartner von PER2 identifiziert. Es war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit essentiell zunächst durch eine unabhängige Methode zu überprüfen, dass diese Interaktion tatsächlich existiert, bevor an weitere Untersuchungen zu deren Funktion gedacht werden konnte. Zur Überprüfung der Protein-Protein-Interaktion von PER2 und GAPVD1 durch eine alternative Methode eignet sich der ‚Proximity Ligation Assay (PLA)‘, der in meiner Arbeit zur Anwendung gekommen ist.

Der PLA ist eine Methode, um in kultivierten Zellen oder Gewebepräparaten eine extrem enge Colokalisation zweier Proteine nachzuweisen. Ein PLA-Signal wird dann produziert, wenn der Abstand zweier Proteine weniger als 40 nm beträgt (Hegazy et al., 2020). Da dieser Abstand im Bereich der Größenordnung von Proteinkomplexen liegt, impliziert ein positives Signal im PLA stark, dass die Proteine direkt interagieren, beziehungsweise zumindest im gleichen Proteinkomplex vorliegen (Hegazy et al., 2020). Darüber hinaus bietet der PLA die Möglichkeit die Lokalisation der Interaktion auf subzellulärer Ebene sichtbar zu machen (Soderberg et al., 2006), was den Beginn einer Antwort auf die Frage nach der Funktion der PER2-GAPVD1 Interaktion darstellen könnte.

2 Material

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

HT1080	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
HT1080 PER2-GFP	(Kalfalah et al., 2016)

2.1.2 Lösungen und Antibiotika für die Zellkultur

Falls nicht anderweitig spezifiziert, wurden die aufgelisteten Produkte von der Firma Gibco® (ThermoFisher), Carlsbad, Kalifornien, USA bezogen.

2.1.3 Medien

Tabelle 2: Medien für die Zellkultur

Nährmedium	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) (1x) + GlutaMAX™-I ([+] 4,5g/l D-Glucose, [+] Pyruvate), 10 % fetales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Selektionsmedium	DMEM (1x) + GlutaMAX™-I ([+] 4,5g/l D-Glucose, [+] Pyruvate), 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 500 µl Hygromycin B
Einfriermedium	50 % FCS, 40 % Nährmedium, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
DMEM (1X) + GlutaMAX™-I	Gibco (ThermoFisher), Carlsbad, Kalifornien, USA

2.2 Puffer und Stammlösungen

Tabelle 3: Puffer und Stammlösungen

10x Laemmli-Puffer	312 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)/Salzsäure (HCl) (pH 6,8),
--------------------	--

	50 % Glycerin, 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,4 % Bromphenolblau
10x Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS)	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O, 18 mM KH ₂ PO ₄
10x TGS-Puffer (Tris-Glycin-SDS-Puffer)	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS
1x Laemmli-Ladepuffer (1 ml)	200 µl 5x Laemmli-Puffer, 100 µl 10 % SDS, 10 µl Dithiothreitol (DTT), 10 µl Pefabloc®, 680 µl H ₂ O
1x TGS-Laufpuffer	100 ml 10x TGS, 900 ml H ₂ O
5 x Laemmli-Puffer	Tris/HCl pH 6, 156,25 mM 25 % Glycerin, 5 % SDS, 50 mM DTT, ad 10 ml H ₂ O, 1 Spatelspitze Bromphenolblau
6x Laemmli-Ladepuffer (1 ml)	600 µl 10x Laemmli-Puffer, 20 % SDS, 1 M DTT, 250 mM Pefabloc®, 260 µl H ₂ O
Duolink In Situ Wash Buffer A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Duolink In Situ Wash Buffer B	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS-T (1 l)	100 ml 10x PBS, 1 ml Tween® 20 (0,1 %), 999 ml H ₂ O
Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20	10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung, 0.1% Tween® 20
Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% Methanol

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
DharmaFECT 1 Transfection Reagent	Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
DTT	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, St. Louis, USA
Pefabloc®	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Polyacrylamid Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma, St. Louis, USA
Trypanblau Farbstoff 0,4%	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tween® 20	Sigma, St. Louis, USA

2.4 Antikörper

2.4.1 Primäre Antikörper

Tabelle 5: Primäre Antikörper

Antikörper	Antigen	Ursprung	Verdünnung		Produkt-nummer	Quelle
			Immunfluoreszenz/ PLA	Western Blot		
Anti-Calnexin	Calnexin	Kaninchen		1:10000 in 2,5 % Milch	C4731	Sigma, St. Louis, USA

Anti-GAPVD1(K)	GAPVD1	Kaninchen	1:300	1:2000 in 2,5 % bovinem Serumalbumin (BSA)	NBP1-19156	Novusbio, Centennial, Colorado, USA
Anti-GAPVD1(M)	GAPVD1	Maus	1:400	5 µg/ml in 2,5 % BSA	SAB1401 626-50UG	Sigma, St. Louis, USA
Anti-PER2	PER2	Kaninchen	1:150	1:200 in 2,5 % BSA	20359-1-AP	Proteintech, Rosemont, Illinois, USA
Anti-GFP	<i>green fluorescent protein</i> (GFP)	Maus	1:400	1:1500 in 2,5 % Milch	G6539	Sigma, St. Louis, USA

2.4.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Produkt-nummer	Quelle
Cyanine-3 (Cy3)-gekoppelter Anti-Maus (IgG) Antikörper	Ziege	1:3200	115-165-205	Jackson Immuno-Research, Ely, England
Cy3-gekoppelter Anti-Kaninchen IgG Antikörper	Ziege	1:3200	111-166-003	Jackson Immuno-Research, Ely, England
ECL™ Anti-Maus IgG Antikörper, mit Meerrettichperoxidase gekoppelt	Schaf	1:10000	NA931V	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, England
ECL™ Anti-Kaninchen IgG Antikörper, mit Meerrettichperoxidase gekoppelt	Esel	1:10000	NA934V	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, England

2.5 siRNA

Tabelle 7: siRNAs

	Produktnummer	Quelle
siGapvd1 Pool	L-026206-01-0005	Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA
siPer2 Pool	L-012977-00-0005	Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA
siNT Pool	D-001810-10-05	Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA

2.6 sonstige Proteine

Tabelle 8: sonstige Proteine

Milchpulver (fettarm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Sigma, St. Louis, USA

2.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

6 Well Zellkultur-Multischale ‚Nunclon Delta Surface‘	Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Dänemark
8 Well μ -Slide Kammerobjektträger	Ibidi, Martinsried, Germany
15 ml BD Falcon Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
50 ml BD Falcon Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa)	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Deckgläser ‚High Precision Microscope Cover Glasses‘ 100 Stck. 24x60 mm 170 $\pm$ 5 μ m No. 1.5H (170 nm High performance)	Ibidi, Martinsried, Germany
Gel Kassetten ‚Novex‘, 1 mm	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kryoröhrchen ‚VWR Temperature Freezer Vials – Self-Standing 2 ml‘	VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Nagellack ‚FAST & SHINY BASE AND TOP COAT‘	KIKO Milano, Bergamo, Italien
Objektträger mit abnehmbaren Kammern ‚4 Chamber Polystyrene Vessel‘	BD Falcon (BD Biosciences), Bedford, USA

Tissue Culture Treated Glass Slide (Includes Chamber Removal Devices)	
Petrischale 100x100x20 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipette ,Costar Stripette 5 ml Serological Pipet'	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Pipette ,Costar Stripette 10 ml Serological Pipet'	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Pipette ,Costar Stripette 25 ml Serological Pipet'	Corning Incorporated, Corning, New York, USA
Pipettenspitze ,Tip One 10 µl Bevelled Tip'	Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze ,Tip One 200 µl Bevelled Tip'	Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze ,Tip One 1000 µl Bevelled Tip'	Starlab, Hamburg, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Transfermembran	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Transfermembran ,Immobilon-P (PVDF) Transfer Membrane'	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Whatman Filterpapier	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, England
Zählkammer ,Countess cell counting chamber slide'	Invitrogen, Eugene, USA
Zellkulturflasche (klein, 25cm ²)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zellkulturschale ,Tissue Culture Dish, Tissue Culture-Treated by Vacuum Gas Plasma, 100x20 mm'	Corning Incorporated, Corning, New York, USA

2.8 Kits

Tabelle 10: Kits

Duolink in Situ PLA Probe Anti-Rabbit PLUS	Sigma, St. Louis, USA
Duolink PLA probe anti-Rabbit PLUS (5x)	

Duolink Antibody Diluent (1x)	
Duolink Blocking Solution (1x)	
Duolink in Situ PLA Probe Anti-Mouse MINUS	Sigma, St. Louis, USA
Duolink PLA probe anti-Mouse MINUS (5x)	
Duolink Antibody Diluent (1x)	
Duolink Blocking Solution (1x)	
Duolink In Situ Detection Reagents Red	Sigma, St. Louis, USA
1x Ligase (1 U/µl)	
Duolink Ligation (5x)/Ligation-Stammlösung	
1x Polymerase (10 U/µl)	
Duolink Amplification Red (5x)/Amplifikation- Stammlösung	
ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, England
Lösung A ‚Amersham™ ECL™ Prime Luminol Enhancer Solution‘	
Lösung B ‚Amersham™ ECL™ Prime Peroxide Solution‘	

2.9 Geräte

Tabelle 11: Geräte

63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Autoklav ‚V150‘	Systec, Linden, Deutschland
Automatisierter Zellzähler ‚Countess®-Cell-Counter‘	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Bildanalysesystem ‚Luminescent Image Analyzer LAS-4000‘	Fujifilm, Tokio, Japan
CO ₂ -Inkubator ‚Hera Cell‘	Heraeus, Hanau, Deutschland

Einfrierbehälter ‚Cryo 1 °C Freezing Container‘	Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA
EPS-Netzteil ‚Electrophoresis Power Supply EPS 301‘	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, England
Färbetrog nach Coplin für 5 Objekte mit Glasdeckel	Glaswerk Wertheim, Wertheim, Deutschland
Feinwaage ‚AE-166‘	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop ‚Axiovert 100‘	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Horizontale Gelelektrophoresekammer ‚Horizon 11.14‘	Biometra, Göttingen, Deutschland
Kippschüttler ‚WT 16‘	Biometra, Göttingen, Deutschland
Magnetrührer ‚IKAMAG RCT‘	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Mikrozentrifuge ‚Galaxy MiniStar‘	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Orbitalschüttler ‚GFL 3015‘	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
pH-Meter ‚Climatic 766‘	Knick, Berlin, Deutschland
Sterilbank ‚Hera Safe‘	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tank-Blot-Behälter ‚Mini-PROTEAN Tetra System‘	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA
Ultraschallhomogenisator ‚Sonopuls‘	Bandelin, Berlin, Deutschland
Vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer ‚Novex-Mini-Cell‘-Gelkammer	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Vortex ‚Bio Vortex V1‘	Biotechnology Lab4you, Berlin, Deutschland
Wasserbad ‚MWB20‘	Labortechnik Medingen, Dresden, Deutschland
Zentrifuge ‚Rotixa 50 RS‘	Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.10 Software

Tabelle 1: Software

Adobe Photoshop	Adobe, San José, Kalifornien, USA
GraphPad Prism® 8	GraphPad Software, LaJolla, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
LAS4000	Fujifilm, Tokyo, Japan
MetaMorph V6.3r6	Molecular Devices, San Jose, Kalifornien, USA
MultiGauge	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, England
Office	Microsoft, Redmont, Washington, USA

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung der Zellen

Beide verwendeten Zelllinien (siehe Kap. 2.1.1) wurden in Medium (siehe Kap. 2.1.3) bei einer Temperatur von 37 °C, einer maximalen Feuchtigkeitssättigung und 5 % CO₂ kultiviert.

Die HT1080-Zelllinie benötigt einfaches Nährmedium (siehe Kap. 2.1.3) und wurde in einem Abstand von zwei Tagen passagiert. Die HT1080-PER2-GFP-Zelllinie wurde in Selektionsmedium (siehe Kap. 2.1.3) kultiviert, während die Passage in einem Abstand von drei Tagen stattfand.

Die Passage fand wie folgt statt: Um die Zellen von der Fläche der Zellkulturflasche lösen zu können wurden sie mit PBS gewaschen und daraufhin mit 0,5 % Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure aus ihrem Verbund gelöst. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung in dem entsprechenden Medium. Abhängig von der Zelldichte, die in der alten Flasche bestand und in der neuen erreicht werden sollte, wurden unterschiedliche Konzentrationen in neue Flaschen überführt.

Um eine stete Zelldichte zu erreichen war eine Konzentration von 1/10 der Suspension aus HT1080-Zellen nötig, während von der HT1080-PER2-GFP-Suspension 1/5 in die neue Kultivierungsflasche pipettiert wurde. Anschließend wurde die neue Flasche mit dem der Zelllinie entsprechenden Medium aufgefüllt (siehe Kap. 2.1.3).

3.1.2 Kryokonservierung der Zellen

Die Kryokonservierung dient der langfristigen Lagerung von Zellen (Mazur, 1970). Dazu werden die Zellen in Einfrierbehälter gefüllt in einem mit flüssigem Stickstoff befüllten Tank gelagert.

Um die Zellen einzufrieren wurden sie wie zu Zwecken der Kultivierung von dem Flaschenboden gelöst (siehe Kap. 3.1.1). Anschließend wurde die Suspension in einen 15 ml BD Falcon Tube pipettiert und darin 3 min lang bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes des Zentrifugats schloss sich die Resuspendierung des Zellpellets in Einfriermedium (siehe Kap. 2.1.3) an. Von dieser Suspension wurde je 1 ml in ein Kryoröhrchen gefüllt. In Isopropanol enthaltenden Kryobehältern erfolgte

die Lagerung bei -80 °C für 24 h. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Behälter in den Stickstofftank überführt.

Um die Zellen aufzutauen, wurden die Kryokonservierungsröhrchen aus den Kryobehältern entnommen und bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die Zellsuspension wurde in einen 15 ml BD Falcon Tube gefüllt und nach der Zugabe von Medium pelletiert. Nachdem der DMSO-haltige Überstand entfernt worden war, wurde das Zellpellet in (Selektions-)Medium resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte anschließend in Zellkulturflaschen (siehe Kap. 3.1.1.).

3.1.3 RNA-Interferenz

Zur RNA-Interferenz-Behandlung wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Kammer in ‚6 Well Zellkultur-Multischalen‘ ausgesät und für 24 h bei 37 °C, feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ inkubiert.

Es wurde eine 5 µM Stammlösung der *small interfering RNA* (siRNA)/ *non-targeting siRNA* (siNT) mit Ribonuklease-freiem Wasser hergestellt. Um eine Konzentration der siRNA/siNT von 100 nmol/l zu erreichen wurde die Stammlösung, ‚DharmaFECT 1 Transfection Reagent‘, serumfreies Medium, antibiotikafreies Medium und die siRNA/siNT der Stammlösung zusammengeführt. Nach Absaugen des Mediums aus den ‚6 Well Zellkultur-Multischalen‘ wurde jede Kammer mit 3 ml dieser Transfektionslösung gefüllt. Zur Negativkontrolle wurde die jeweilige Kammer mit antibiotikafreiem Medium gefüllt.

Nach 24 h Inkubation unter den zuvor beschriebenen Bedingungen wurde der Inhalt der Kammern der ‚6 Well Zellkultur-Multischalen‘ abgesaugt und 3 ml antibiotikafreies Medium pro Kammer eingefüllt. Nach 48 h Inkubation bei den beschriebenen Bedingungen wurden die Zellen zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten genutzt (siehe Kap. 3.2.1).

3.2 Proteinanalytische Methoden

3.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und trypsinisiert, die entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml ‚BD Falcon Tube‘ gefüllt, und die Zellzahl mit dem Zellzähler be-

stimmt. Die Suspension wurde drei Minuten lang bei 1200 rpm zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgenommen. Pro 1×10^6 Zellen wurden 100 μ l 1xLaemmli-Puffer verwendet, in dem die Zellen resuspendiert wurden. In einem 1,5 ml fassendes Eppendorfreaktionsgefäß folgte die Homogenisierung der Suspension für 10 s bei 20 % Power durch den Ultraschallhomogenisator. Die Proben konnten nun direkt für den Western Blot verwendet werden oder bei -20 °C bis zur Nutzung gelagert werden.

3.2.2 Western Blot Analysen

3.2.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli genutzt, bei welcher eine Trennung vorwiegend nach Molekulargewicht erfolgt (Laemmli, 1970). Dazu wurde in eine ‚Novex‘ Gel Kassette ein Trenngel mit 8 % Acrylamid gegossen und anschließend eine Schicht Sammelgel mit 5 % Acrylamid in die Kassette gefüllt. Die Gesamtproteinextrakte in 1xLaemmli-Puffer werden zur Denaturierung für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und dann auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente die ‚Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-1245 kDa)‘. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 60-150 mV in 1xTGS-Laufpuffer.

3.2.2.2 Elektrophoretischer Transfer

Für den Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde der Tank-Blot-Behälter ‚Mini-Protean Tetra System‘ verwendet. Auf die schwarze Seite der Halterung wurde ein in Transferpuffer getränkter Schwamm gelegt. Hierauf folgte ein 1 mm dickes, ebenfalls mit Transferpuffer vollgesogenes, Whatman-Filterpapier und das SDS-Polyacrylamid-Gel, welches zuvor 20 min lang in Transferpuffer equilibriert worden ist. Auf das Gel wurde die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran gelegt, auf welche ein vollgesogenes Whatman-Filterpapier und ein in Transferpuffer getränkter Schwamm gelegt wurde.

Die Halterung wurde verschlossen, in den in ein Eisbad gestellten Tank-Blot-Behälter wurde ein Rührfisch gelegt und die befüllte Halterung wurde eingehängt. Der mit Transferpuffer aufgefüllte Behälter wurde im Eisbad auf einen Magnetrührer gestellt. Der Transfer fand bei 4 °C, 30 V und 90 mA für 20h statt.

3.2.2.3 Immunchemische Detektion mittels Chemolumineszenz

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran in einer 5%igen entfetteten Milchpulverlösung für 1 h bei Raumtemperatur (RT) geschwenkt. Beides erfolgte, wie auch bei den späteren Waschschritten, auf einem Kippschüttler bei 20 rpm. Danach wurde die Membran dreimal für je 10 min mit PBS-T gewaschen.

Der Primärantikörper wurde je nach Eignung in 2,5 % BSA (gelöst in PBS-T) oder in 2,5 % Milchpulver (gelöst in PBS-T) verdünnt und bei 4°C über Nacht bei 20 rpm inkubiert (siehe Kapitel 2.4.1, Tabelle 5). Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBS-T für jeweils 10 min gewaschen.

Der Sekundärantikörper, ein mit der Meerrettichperoxidase konjugierter Immunkomplex, wurde auf die Membran aufgetragen (siehe Kap. 2.4.2, Tabelle 6). Die Inkubationszeit der Membran betrug 1 h bei RT und 20 rpm. Die Membran wurde erneut dreimal je 10 min lang mit PBS-T gewaschen.

Mittels des ‚ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent‘-Kits und dem Bildanalysesystem ‚Luminescent Image Analyzer LAS-4000‘ folgte die Detektion der von den Antikörpern gebundenen Proteine.

3.2.2.4 Auswertung mittels ‚MultiGauge‘ und ‚GraphPad Prism® 8‘

Die Intensität der Autolumineszenz wurde mit dem Programm ‚MultiGauge‘ gemessen. Hierzu wurden die zu überprüfenden Proteinbanden als *Region of Interest* (ROI) markiert. Ein Bereich außerhalb der Banden mit der gleichen Fläche wurde als Hintergrund definiert. Bei hohem oder unregelmäßigem Hintergrund wurde der Hintergrund jeweils in der Spur über den Banden gewählt und einzeln in Verhältnis zu der Bande gesetzt. Nach der Messung der Autolumineszenz der definierten Bereiche durch ‚MultiGauge‘ wurde der Wert des Hintergrundes von den Messwerten der *ROIs* abgezogen.

Danach wurden die Ergebnisse zuerst auf die CANX-Ladekontrollen normalisiert bevor auf die siNT-Kontrollen normalisiert worden sind.

Von allen Replikaten eines Versuchs wurden die Ergebnistabellen von ‚MultiGauge‘ in ‚GraphPad Prism® 8‘ übernommen und als Graphen dargestellt. Auch das Signifikanzniveau wurde mit dieser Software bestimmt.

3.3 Mikroskopie

3.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopie

Das folgende Protokoll weicht in wesentlichen Teilen von gängigen Standardmethoden ab und wurde im Zuge dieser Arbeit etabliert.

Zur Fixierung und Färbung der Zellen zu Zwecken der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen in ‚8 Well μ -Slide Kammerobjektträgern‘ mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/Kammer ausgesät. Nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C, maximaler Feuchtigkeitssättigung und 5 % CO₂ wurde mit der Färbung begonnen.

Die Zellen wurden zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen, daraufhin mit 4 % PFA in PBS welches auf eine Temperatur von 37 °C gebracht worden war, für 10 min fixiert und danach mit PBS bei RT gewaschen. Es folgte eine dreimalige Permeabilisierung mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS für je 5 min, sowie ein weiterer Waschschrift mit PBS bei RT.

In jede Kammer wurden zu Zwecken des Blockierens 2 Tropfen ‚Duolink Blocking Solution (1x)‘ gegeben. Es schloss sich eine Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C, maximal feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ in einer vorgewärmten Feuchtigkeitskammer an. Die Feuchtigkeitskammer setzt sich zusammen aus einer Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm und einem in destilliertem Wasser getränkten Whatman-Filterpapier, welches in die Schale gelegt wurde.

Anschließend wurden die Primärantikörper verdünnt in ‚Duolink Antibody Diluent‘ auf die Kammern aufgetragen und über Nacht auf einem Kippschüttler bei 20 rpm und 4 °C belassen.

Daraufhin wurden die Zellen viermal für je 10 min mit PBS gewaschen, der Sekundärantikörper im Verhältnis 1:3200 in ‚Duolink Antibody Diluent‘ verdünnt auf die Zellen aufgetragen und für 1,5 h bei RT auf dem Kippschüttler (20 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden 4 min lang mit DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS gegengefärbt und viermal für je 10 min mit PBS bei RT gewaschen.

Daraufhin wurden die Zellen in PBS mit einem ‚Axiovert 100‘-Mikroskop und dem Ölimersionsobjektiv mit 63xVergrößerung mikroskopiert. Es wurden Durchlichtaufnahmen angefertigt. Um den Zellkern mittels der Kernfärbung ‚DAPI‘ darzustellen, wurde mit einem Anregungsfilter der Wellenlängen 325-375 nm und einem Emissionsfilter der

Wellenlängen 435-485 nm gearbeitet. Die Cy3™-Färbung wurde mit einem Anregungsfilter der Wellenlängen 533-557 nm und einem Emissionsfilter der Wellenlängen 570-620 nm detektiert.

Von den Zellen der Linie HT1080-PER2-GFP wurden zudem Aufnahmen mit einem Anregungsfilter der Wellenlängen 470-490 nm und einem Emissionsfilter der Wellenlängen 505-545 nm angefertigt um PER2-GFP zu lokalisieren.

3.3.1.1 Darstellung mittels ‚MetaMorph V6.3r6‘ und ‚Photoshop‘

Zur farbigen Darstellung der Immunfluoreszenzaufnahmen mussten diese eingefärbt werden. Hierzu wurde ‚MetaMorph‘ verwendet. In dem Fenster ‚Overlays erstellen‘ wurde die Datei geöffnet und die Farbe ausgewählt. Die übrigen Farbkanäle wurden freigelassen und eine neue Datei wurde erstellt. Die Aufnahme wurde allein mit der ausgewählten Farbe gefüllt. Um Overlays herzustellen wurden mehrere Farbkanäle mit unterschiedlichen Farben belegt.

Durchlichtaufnahmen wurden in Graustufen abgebildet, DAPI-Aufnahmen in Cyan, Aufnahmen der PLA-Signale in Rot, und GFP-Darstellungen in Hellgrün eingefärbt.

Mit Photoshop wurde die Auflösung auf 300 Pixel/Zoll gesetzt und die Größe nach Bedarf verändert.

3.3.2 Proximity Ligation Assay

Für den PLA wurden $3,4 \times 10^4$ Zellen/Kammer auf einen Objektträger mit abnehmbaren Kammern ausgesät. Bis einschließlich zum Schritt der Inkubation der Primärantikörper wurde wie bei der Immunfluoreszenzmikroskopie verfahren (siehe Kap. 3.3.1). Dabei wurden beide Primärantikörper in der Konzentration, die für die Immunfluoreszenzfärbung optimal war, verwendet (siehe Kap. 2.4.1). Es war hierbei notwendig, dass beide Antikörper von verschiedenen Spezies stammten. Die beiden Primärantikörper, welche jeweils an die zu überprüfenden Proteine binden, stammten daher von Maus und Kaninchen.

Die Waschschrte wurden bis auf die im folgenden erwähnten Ausnahmen auf einem Orbitalschüttler bei 120 rpm, abgedeckt durch Aluminiumfolie, durchgeführt. Als Feuchtkammern für die Inkubation wurden Zellkulturschalen mit einem Durchmesser

von 10 cm genutzt, die mit in destilliertem Wasser getränktem Whatman-Filterpapier ausgelegt wurden.

Die *PLA-Probes* und das ‚Antibody Diluent‘ wurden gemischt und im Verhältnis 1:5 verdünnt. Der Primärantikörper wurde aus den Kammern gesaugt und jede einzelne Kammer mit 510 µl Waschpuffer A gefüllt. Der Waschpuffer wurde aus den Kammern entfernt und die Kammern mit dem Trennschieber von dem Objektträger abgetrennt. Die Objektträger wurden zweimal für 5 min in dem Färbetrog nach Coplin mit Waschpuffer A gewaschen. Danach wird die *PLA-Probe*-Lösung auf die Felder der vorherigen Kammern gegeben (70 µl/Feld) und der Objektträger wurde 1 h lang in der vorgewärmten Feuchtigkeitskammer bei 37 °C inkubiert.

Die Ligation-Stammlösung wurde im Verhältnis 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt und gevortext. Auf jede Kammer wurde von der entstandenen Ligation-Ligase-Lösung 70 µl pipettiert und der Objektträger in eine vorgewärmten Feuchtigkeitskammer gelegt und bei 37 °C für 30 min inkubiert.

Die Amplifikation-Stammlösung wurde 1:5 in destilliertem Wasser verdünnt und gemischt. Die Ligation-Ligase-Lösung wurde von dem Objektträger genommen und die Objektträger zweimal für 2 min mit Waschpuffer A im Färbetrog nach Coplin auf dem orbitalen Schüttler gewaschen. Der Färbetrog wurde zum Schutz vor Licht mit Alufolie überdeckt. Die Polymerase wurde im Verhältnis 1:80 in der Amplifikation-Lösung verdünnt, woraus die Amplifikation-Polymerase-Lösung resultierte. Nachdem der Waschpuffer A komplett von den Feldern genommen worden war wurden 70 µl der Amplifikation-Polymerase-Lösung auf jedes Feld pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C über 100 min in einer vorgewärmten Feuchtigkeitsschale. Die Amplifikation-Polymerase-Lösung wurde vom Objektträger genommen und der Objektträger zweimal für 10 min mit Waschpuffer B im Färbetrog nach Coplin bei RT auf dem orbitalen Schüttler gewaschen. Der Färbetrog wurde mit Alufolie abgedeckt.

Anschließend wurde über Nacht mit 0,01x Waschpuffer B bei 4 °C auf einem Kipp-schüttler gewaschen. Daraufgehend wurde mit DAPI in PBS in der Konzentration von 1:1000 gefärbt. Abgedeckt mit einem Deckglas, welches durch Nagellack seitlich fixiert worden war, wurde die Probe mit dem Mikroskop ‚Axiovert 100‘ mikroskopiert. Um die *PLA*-Signale zu lokalisieren wurde ein Anregungsfilter der Wellenlängen 553-587 nm und ein Emissionsfilter der Wellenlängen 590-650 nm verwendet. Die Filter für die Aufnahmen der DAPI-Färbung und GFP-Signale waren die gleichen, die bei der Immunfluoreszenzmikroskopie verwendet wurden (siehe Kap. 3.3.1).

3.3.2.1 Darstellung mittels ‚Adobe Photoshop‘, ‚ImageJ‘ und ‚MetaMorph V6.3r6‘

Die Ergebnisse des PLA wurden als Overlays dargestellt. Hierzu wurden die Aufnahmen einer Tonwertkorrektur mit ‚Adobe Photoshop‘ unterzogen, welche den gesamten Tonwert erfasst. Anschließend wurde von den Aufnahmen der PLA-Signale der Hintergrund mit ‚ImageJ‘ abgezogen, wobei für jedes Replikat eines Versuchs derselbe *Rolling ball radius* verwendet wurde. Dann wurden bei ‚MetaMorph V6.3r6‘ Overlays mit der Farbe ‚Cyan‘ für die DAPI-Aufnahmen, ‚Red‘ für PLA-Aufnahmen und ‚New Hue‘ für GFP-Aufnahmen erstellt.

Mit Adobe Photoshop wurde die Größe angepasst und die Auflösung auf 300 Pixel/Zoll gesetzt.

3.3.2.2 Auswertung mittels ‚ImageJ‘

Zur Quantifikation der Interaktionspunkte wurde die Software *ImageJ* genutzt.

Die Aufnahmen der PLA-Signale wurden als Rohdaten in *ImageJ* eingespeist und die Punkte mit der Anwendung *Find Maxima* gezählt. Anhand der Negativkontrollen der Versuche wurde jeweils für ein Replikat eines Versuchs eine *Noise Tolerance* festgelegt, bei dem möglichst alle Interaktionspunkte gemessen wurden und keine Messungen fernab der Punkte stattfanden.

Die Messdaten wurden in einer Excel-Tabelle aufgelistet und von dort in das Programm ‚GraphPad Prism® 8‘ übertragen, mit welchem die Darstellung als Graph und die Ermittlung des Signifikanzniveaus erfolgte.

4 Ergebnisse

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Identifikation von GAPVD1 als Interaktionspartner von PER2 in PER2-GFP stabil exprimierenden menschlichen Osteosarkomzellen (Ibrahim et al., 2021). Obwohl die in diesem Experiment angewandte Methode – Co-Immunopräzipitation gefolgt von der Identifikation aller mit dem Zielprotein assoziierten Proteine mittels Massenspektrometrie (Maccarrone et al., 2017) – heutzutage eine Standardmethode ist, führt sie wie alle Hochdurchsatzmethoden regelmäßig zu falsch positiven Ergebnissen (Malo et al., 2006). Darüber hinaus erlaubt diese Methode keine Aussage darüber wo in der Zelle Protein-Protein-Interaktionen stattfinden, und ob diese Interaktionen direkt oder indirekt, beispielsweise über gleichzeitige Interaktion mit bestimmten zellulären Strukturen, ablaufen.

Die Proteine PER2 und GAPVD1 sind Teil des zytoplasmatischen PER-Proteinkomplexes (Aryal et al., 2017). Auch in unserem Labor wurde GAPVD1 als Interaktionspartner von PER2 identifiziert (Ibrahim et al., 2021). Ziel meiner Arbeit war es, die Interaktion der Proteine GAPVD1 und PER2 mittels des PLA unter der Verwendung spezifischer Antikörper zu überprüfen. In dieser Immunfluoreszenzmethode werden Signale erzeugt, wenn sich zwei Proteine in einer extrem geringen Distanz (<40 nm) zueinander befinden (Hegazy et al., 2020).

Als erstes war es nötig den PLA in unserem Labor zu etablieren und, falls erforderlich, einzelne Schritte zu optimieren. Zunächst sollten die verwendeten Antikörper hinsichtlich Spezifität und optimaler Konzentration überprüft werden. Spezifische Antikörper sollten dann in der Konzentration, in der eine Immunfärbung das beste Verhältnis von Signal zu Hintergrund ergab, im PLA Anwendung finden. Um zu zeigen, dass die Ergebnisse des PLA nicht von einer bestimmten Zelllinie abhängig sind, sollte der Assay in zwei unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt werden: Wildtyp-Zellen (HT1080) und in der Zelllinie HT1080 PER2-GFP, die das Fusionsprotein PER2-GFP stabil exprimiert (Kalfalah et al., 2016). Damit zusätzlich die Unabhängigkeit der Ergebnisse von den verwendeten Reagenzien überprüft werden kann, sollten die Experimente in den unterschiedlichen Zelllinien jeweils mit unterschiedlichen Antikörerkombinationen durchgeführt werden. Für das PLA-Experiment in der Zelllinie HT1080 PER2-GFP sollten ein Antikörper gegen GAPVD1 und ein Antikörper gegen GFP und für das PLA-Experiment in den Wildtyp-Zellen ein anderer Antikörper gegen GAPVD1 und ein Antikörper gegen PER2 verwendet werden.

4.1 Prinzip des Proximity Ligation Assays

Der PLA dient dem Nachweis der extrem engen Colokalisation zweier Proteine indem er bei einer Distanz dieser Proteine von maximal 40 nm ein Signal hervorruft (Hegazy et al., 2020). Durch den extrem geringen Abstand wird stark impliziert, dass zwei Proteine direkt interagieren, beziehungsweise zumindest im gleichen Proteinkomplex vorliegen. Der PER-Proteinkomplex beispielsweise hat einen Durchmesser von ca. 25 nm (Aryal et al., 2017). Für die potenziell interagierenden Proteine werden zunächst Primärantikörper ausgesucht, die aus verschiedenen Spezies stammen. Die Primärantikörper wiederum werden mit sekundären Antikörpern, die PLA-Probes genannt werden, detektiert (Soderberg et al., 2008). An die PLA-Probes sind Oligonukleotide gebunden (i.), welche als *Template* für die Ringbildung durch Konnektor-Oligonukleotide dienen (ii.). Durch Hinzufügen der Ligase erfolgt die Ligation (iii.) mit anschließender *Rolling Circle Amplification* (RCA) durch eine Polymerase (iv.). Die RCA-Reaktion generiert einen Desoxyribonukleinsäure-Einzelstrang, der an den Antigen-Antikörper-Komplex kovalent gebunden ist. Durch Hybridisierung von komplementären, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden kann das RCA-Produkt detektiert werden (Abb. 9) (Soderberg et al., 2006).

9

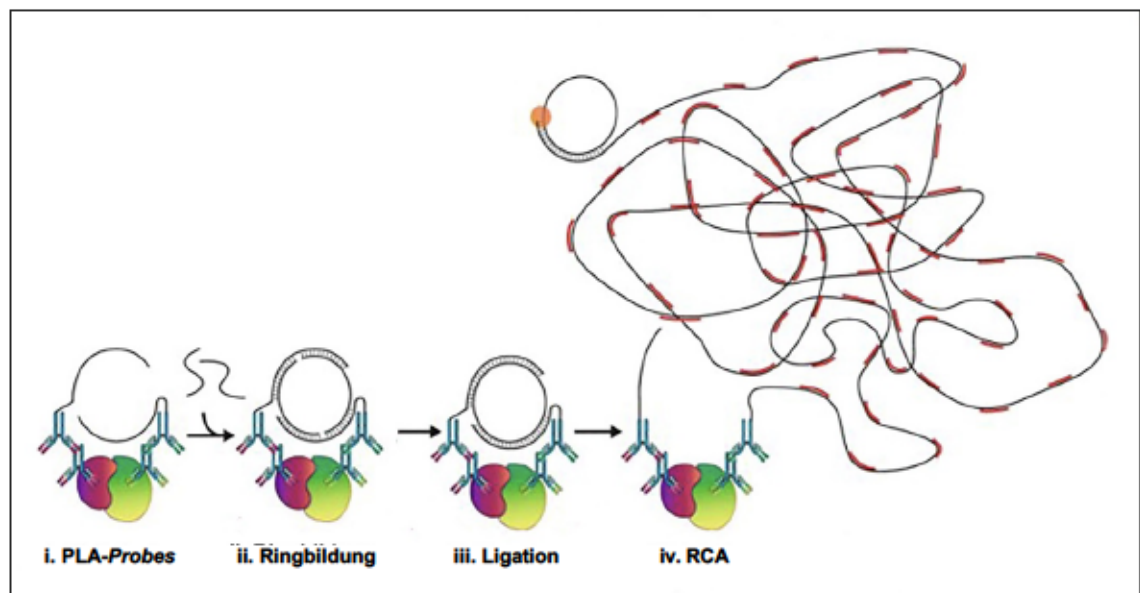


Abbildung 9: Prinzip des PLA

i. PLA-Probes binden an die Primärantikörper an beiden Zielproteinen, ii. nach Zugabe zweier weiterer Oligonukleotide erfolgt die Hybridisierung zu einer Ringstruktur, iii. Ligation, iv. nach Hinzufügen von Nukleotiden und fluoreszent markierten Oligonukleotiden, sowie einer Polymerase, erfolgt die RCA; (Klaesson et al., 2018), bearbeitet.

4.2 Optimierung der PLA-Schritte Blockieren und Waschen

Da in PLA-Vorexperimenten unspezifische Signale auftraten (hier nicht gezeigt), musste das Protokoll modifiziert werden. Das Blockieren wurde optimiert indem Veränderungen am Färbeprotokoll (siehe Kapitel 3.3.1), das am Anfang des PLA-Assays durchgeführt wird, vorgenommen wurden. Zum Blockieren vor Zugabe der Primärantikörper wurde die ‚Duolink Blocking Solution (1x)‘ aus dem ‚Doulink in Situ PLA Probe Kit‘ verwendet. Zuvor war im Immunfluoreszenz-Protokoll Ziegenerum zur Blockierung genutzt worden. Verwendung der ‚Duolink Blocking Solution (1x)‘ verringerte unspezifische Hintergrundsignale deutlich.

Zusätzlich wurden einige Waschschrte verändert. Anfänglich wurden als Färbekammern Petrischalen verwendet, in die ein ‚8 Well μ -Slide Kammerobjektträger‘ gelegt wurde, und auf einen Kippschüttler gestellt. Allerdings führte diese Behandlung zu unspezifischen Signalen insbesondere in der Peripherie der einzelnen Kammern des Objektträgers. Um stringenter waschen zu können wurde zu flachen Objektträgern mit abnehmbaren Kammern gewechselt. So konnten die Kammern nicht den Fluss des Waschpuffers beeinträchtigen. Zudem wurde umgestellt auf Färbetröge nach Coplin, in denen der Objektträger senkrecht steht. Damit der Waschpuffer auf dem Präparat sich nicht nur leicht von einer Seite zur anderen bewegt, sondern um den ganzen Objektträger fließen kann, wurde der Färbetrog auf einen Orbitalschüttler gestellt. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch den effektiveren Austausch des Puffers so besser abgelöst, und die unspezifischen Signale konnten stark verringert werden.

4.3 Test der Antikörperspezifität

Da viele kommerzielle Antikörper keine oder nur unspezifische Bindungsaktivität aufweisen, erfolgte zunächst ein Test, ob die Zielproteine von den verwendeten Antikörpern identifiziert werden. Die Expression der Zielproteine wurde durch Behandlung mit *small interfering RNA* (siRNA) herunterreguliert (Kurreck, 2009), anschließend wurden die Proteinmengen durch Western Blot quantifiziert. Dafür wurden Zellen mit *small interfering RNA Pools* gegen *Gapvd1* oder *Per2* transfiziert. Als Kontrolle wurde eine Transfektion mit einem *non-target siRNA Pool* durchgeführt sowie eine Kontrolle mit unbehandelten Zellen.

Behandlung von Zellen mit siRNA führt zur Herunterregulierung des Zielgens und dementsprechend reduzierter Expression des codierten Proteins. Dabei wird siRNA mittels Lipofektion in die Zellen eingeschleust. Anschließend leitet die siRNA den *RNA-induced silencing complex* (RISC) zum komplementären *messenger RNA* (mRNA)-Abschnitt. Die Ziel-mRNA wird durch das Argonautenprotein *Protein argonaute-2*, einem Bestandteil von RISC, gespalten. Nun fehlt der Ziel-mRNA respektive die 5'-Cap-Struktur oder die poly(A)-Sequenz, was zu einer Destabilisierung der mRNA führt. Die gespaltene und destabilisierte mRNA wird abgebaut und nicht mehr translatiert. Somit wird das entsprechende Protein nicht synthetisiert (Kurreck, 2009).

Verwendet wurden spezifische siRNAs, die die GAPVD1-Expression (siGapvd1) und PER2-Expression (siPer2) hemmen, sowie als Negativkontrolle *non-targeting siRNA* (siNT), für die keine spezifische Ziel-mRNA in der Zelle existiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Proteinlevel im Western Blot. Dabei wurden die mit spezifischer siRNA behandelten Zellen mit zwei Kontrollen verglichen: Unbehandelten Zellen und mit siNT-behandelten Zellen. Spezifische Antikörper sollten bei erfolgreicher RNA-Interferenz zu einer Verminderung des Proteinsignals in mit spezifischer siRNA behandelten Zellen führen.

Getestet wurden vier Antikörper, die für den PLA infrage kamen: Ein PER2-Antikörper (anti-PER2), ein GFP-Antikörper (anti-GFP), ein GAPVD1-Antikörper aus Maus (anti-GAPVD1(M)) und ein GAPVD1-Antikörper aus Kaninchen (anti-GAPVD1(K)). Als Ladekontrolle für den Western Blot diente Calnexin (CANX). Es wurde jeweils die Zelllinie verwendet, in der anschließend die Antikörper für den PLA eingesetzt werden sollten. In der Wildtyp-Zelllinie wurden der anti-PER2 und der anti-GAPVD1(M) verwendet, in HT1080-PER2-GFP der anti-GAPVD1(K). Mit dem anti-GFP wurde anders als mit den übrigen Antikörpern verfahren, da für seine Kontrolle keine RNA-Interferenz durchgeführt werden musste. Er wurde durch Vergleich mit Wildtyp-Zellen, die kein GFP enthalten, mit HT1080 PER2-GFP-Zellen getestet. Von jedem Versuch wurden drei unabhängige Replikate angefertigt. Ein Antikörper wurde als spezifisch erachtet wenn er in unabhängigen Replikaten zuverlässig eine Proteinbande erkennt, die sich in der erwarteten Höhe befindet und nur durch die spezifische siRNA herunterreguliert wird. Die Herunterregulation der Zielgene wurde zusätzlich quantitativ ausgewertet und in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 10 und 11). Dabei wurde auf siNT, beziehungsweise bei der Untersuchung des anti-GFP auf Wildtyp-Zellen normalisiert.

4.3.1 Test der PER2- und GFP-Antikörper mittels RNA-Interferenz und Western Blot

Nach Herunterregulation von PER2 durch siPer2 hat das PER2-Signal auf der erwarteten Höhe von 135 kDa im Western Blot im Vergleich zur siNT-Kontrolle deutlich abgenommen. Das auf die Ladekontrolle mit CANX normalisierte Proteinlevel ist im Vergleich zu den mit siNT behandelten Zellen auf 77% reduziert und im Vergleich mit den unbehandelten Zellen auf 76% zurückgegangen (Abb. 10A). Das zeigt, dass anti-PER2 spezifische Bindungsaktivität für PER2 aufweist.

Während in HT1080 PER2-GFP-Zellen eine deutliche PER2-GFP Bande auf der erwarteten Höhe von 245 kDa vorhanden ist, weist der anti-GFP in der HT1080-Zelllinie auf gleicher Höhe keine Bande auf (Abb. 10B). Das Ergebnis zeigt, dass auch der anti-GFP sein Zielprotein spezifisch bindet.

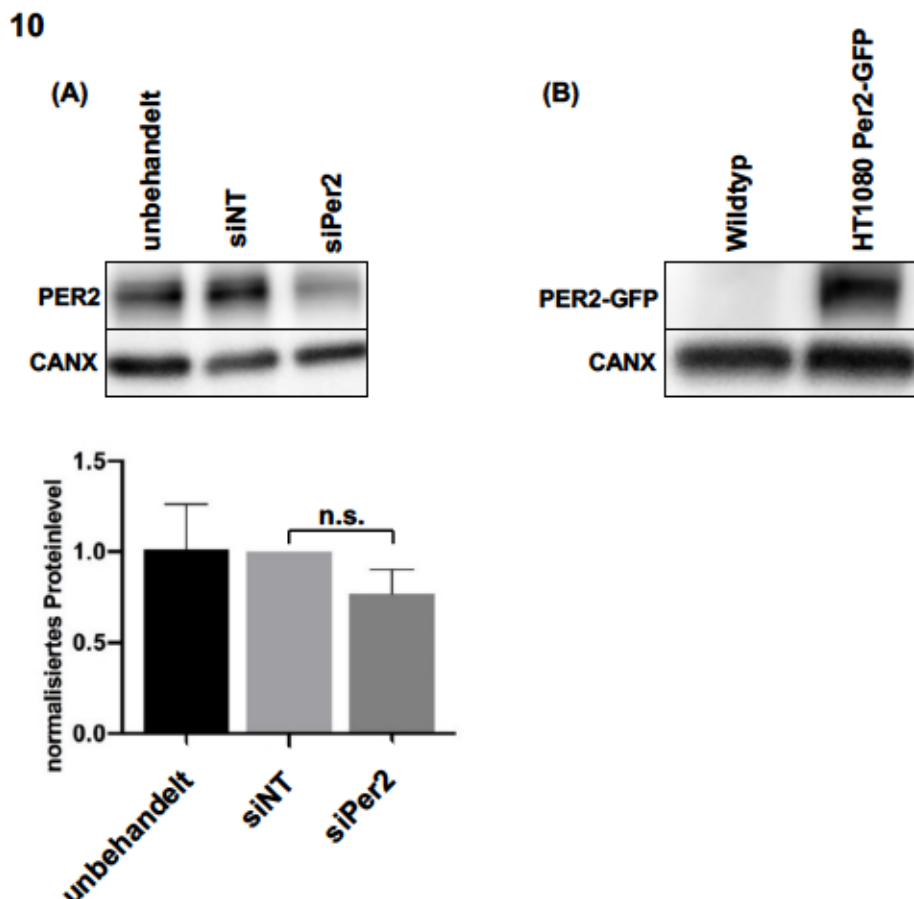


Abbildung 10: Test des anti-PER2 und des anti-GFP im Western Blot

(A) Oben: Western-Blot-Analyse von HT1080 PER2-GFP nach siPer2 unter Verwendung des anti-PER2 aus drei unabhängigen Replikaten ($n=3$); von links nach rechts: Negativkontrolle mit unbehandelten Zellen, Negativkontrolle mit siNT, siPer2; CANX: Ladekontrolle (Laufhöhe bei 90 kDa). Unten: Quantifizierung des auf siNT normalisierten Proteinlevels dreier unabhängiger Transfektionen mit siRNA durch

Western-Blot-Analysen unter Verwendung des anti-PER2 in PER2-GFP (n=3); von links nach rechts: Negativkontrolle mit unbehandelten Zellen, Negativkontrolle mit siNT, siPER2. Balken zeigen Standardfehler (SEM), nicht signifikant (n.s.), $p=0,1578$ (t-Test). **(B)** Western-Blot-Analyse von HT1080 und HT1080 PER2-GFP mit dem anti-GFP aus drei unabhängigen Replikaten (n=3), von links nach rechts: Negativkontrolle mit HT1080, HT1080 PER2-GFP; CANX (Laufhöhe bei 90 kDa): Ladekontrolle.

4.3.2 Test der GAPVD1-Antikörper mittels RNA-Interferenz und Western Blot

Die RNA-Interferenz von *Gapvd1* mit anschließendem Western Blot unter Verwendung des anti-GAPVD1(K) zeigt eine Reduktion des Signals bei einer Höhe von ca. 240 kDa, der erwarteten Position von GAPVD1 bei der SDS-Gelelektrophorese (Abb. 11A). Das auf die Ladekontrolle mit CANX normalisierte Proteinlevel von GAPVD1 in den mit siGapvd1 behandelten Zellen liegt bei 18 % der mit siNT behandelten Zellen und bei 16 % bezogen auf die unbehandelten Zellen (Abb. 11A).

Auf der gleichen Höhe bei ca. 240 kDa kann man eine Abschwächung des siGapvd1-Signals mit dem anti-GAPVD1(M) im Verhältnis zu den Kontrollen erkennen (Abb. 11B). Die Quantifizierung aller drei Replikate zeigt, dass nach der Transfektion mit siGapvd1 im Vergleich zu den Kontrollen mit der siNT noch 72 % des auf CANX normalisierten Proteinlevels nachgewiesen werden konnte. Es erfolgte eine Senkung des normalisierten Proteinlevels nach Behandlung mit der siGapvd1 auf 65 % des Proteinlevels der unbehandelten Zellen (Abb. 11B).

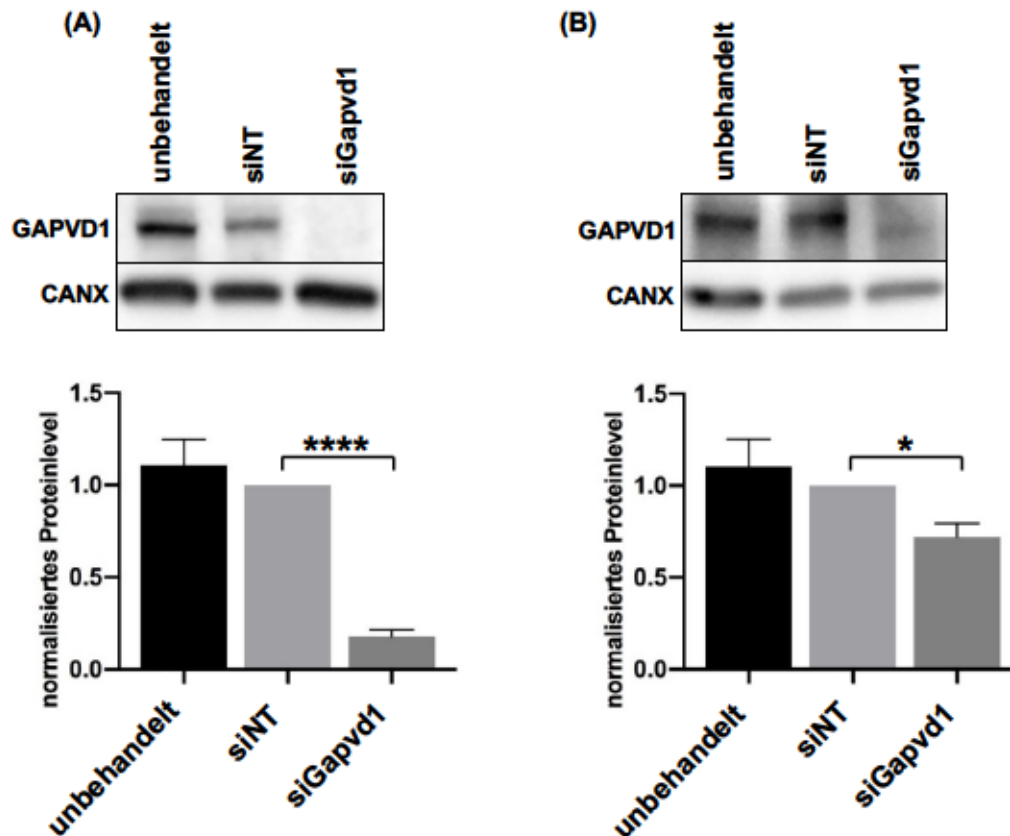


Abbildung 11: Test des anti-GAPVD1(K) und anti-GAPVD1(M) im Western Blot

(A) Oben: Western-Blot-Analyse von HT1080 nach siGapvd1 unter Verwendung des anti-GAPVD1(K) aus drei unabhängigen Replikaten im Wildtyp ($n=3$); von links nach rechts: Negativkontrolle mit unbehandelten Zellen, Negativkontrolle mit siNT, siGapvd1; CANX: Ladekontrolle (Laufhöhe bei 90 kDa). Unten: Quantifizierung des auf siNT normalisierten Proteinlevels dreier unabhängiger Transfektionen mit siRNA durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des anti-GAPVD1(K) im Wildtyp ($n=3$); von links nach rechts: Negativkontrolle mit unbehandelten Zellen, Negativkontrolle mit siNT, siGapvd1. Balken zeigen Standardfehler (SEM), **** $p<0,0001$ (t-Test). **(B)** Oben: Western-Blot-Analyse von HT1080 nach siGapvd1 unter Verwendung des anti-GAPVD1(M) aus drei unabhängigen Replikaten ($n=3$); von links nach rechts: Negativkontrolle mit unbehandelten Zellen, Negativkontrolle mit siNT, siGapvd1; CANX (Laufhöhe bei 90 kDa): Ladekontrolle. Unten: Quantifizierung des auf siNT normalisierten Proteinlevels dreier unabhängiger Transfektionen mit siRNA durch Western-Blot-Analyse unter Verwendung des anti-GAPVD1(M) im Wildtyp ($n=3$); von links nach rechts: Negativkontrolle mit unbehandelten Zellen, Negativkontrolle mit siNT, siGapvd1. Balken zeigen Standardfehler (SEM), * $p=0,0182$ (t-Test).

4.4 Test der Antikörperspezifität durch Immunfärbung

Um zu untersuchen, ob die PER2- und GFP-Antikörper in der Immunfärbung spezifisch an ihre Zielproteine binden oder ob sie unspezifische Bindungsaffinität aufweisen, wurden sie mit dem direkten Fluoreszenzsignal von PER2-GFP im gleichen Präparat verglichen. Anti-GAPVD1(K) und anti-GAPVD1(M) wurden in Wildtyp HT1080-Zellen getestet und die Ergebnisse mit GAPVD1-Immunfärbungen aus publizierten Studien verglichen.

4.4.1 Vergleich von Immunfärbungen mit Antikörpern gegen PER2 und GFP mit dem Fluoreszenzsignal von PER2-GFP

Die Menge an endogenem PER2 oszilliert in Abhängigkeit von der circadianen Uhr. Die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle bleibt dabei jedoch im Wesentlichen unverändert. Der überwiegende Anteil von PER2 befindet sich im Zellkern, und PER2 kann zu keinem Zeitpunkt ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen werden (Smyllie et al., 2016). Die Immunfärbungen von PER2-GFP mit den anti-PER2 und anti-GFP spiegelten die beschriebene intrazelluläre Verteilung von PER2 genau wider. Der Großteil von PER2 befand sich im Zellkern, während es im Zytoplasma in deutlich niedrigerer Konzentration vorhanden war. Vergleicht man außerdem das direkte Fluoreszenzsignal von PER2-GFP mit den Immunfärbungen der jeweiligen Antikörper, so waren die Signale weitgehend deckungsgleich (Abb. 12). Diese Befunde sprechen für eine hohe Spezifität der Antikörper in der Immunfärbung.

Darüber hinaus wurden Verdünnungsreihen beider Antikörper angefertigt, um die Bedingungen zu finden, bei denen das Verhältnis von spezifischem Signal zu Hintergrund optimal ist (Daten nicht gezeigt). Dabei hat sich herausgestellt, dass anti-PER2 am besten in einer Verdünnung von 1:150 und der anti-GFP in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt werden sollte (Abb. 12, zeigt ist jeweils nur die optimale Antikörperverdünnung).

12

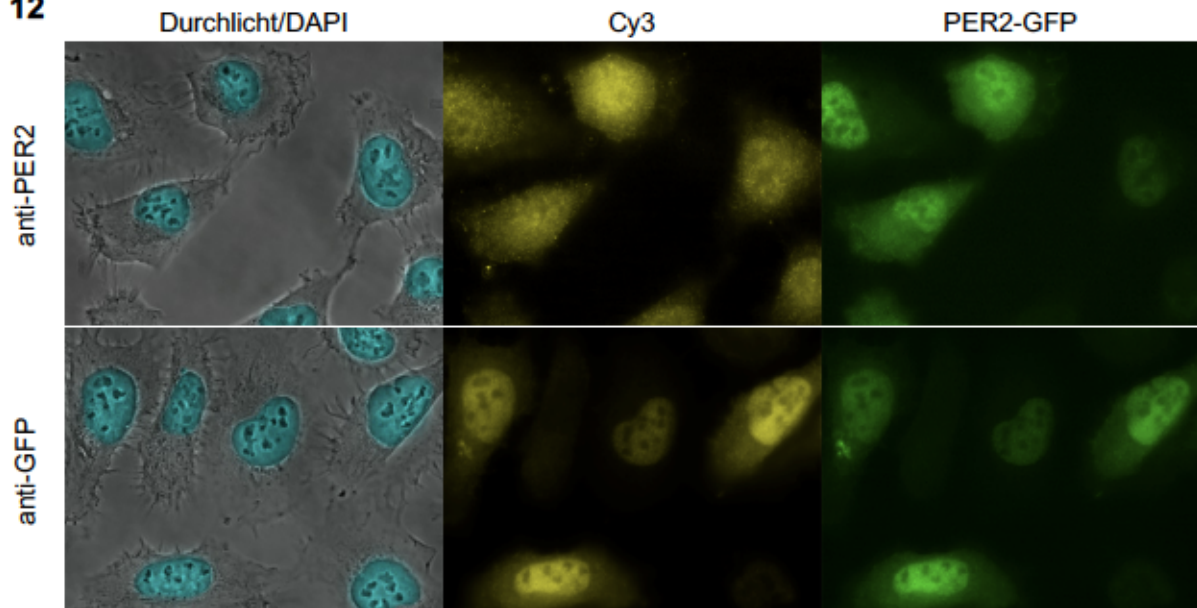


Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbungen von PER2 und GFP in HT1080 PER2-GFP-Zellen

Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen mit anti-PER2 in der Konzentration von 1:150 (oben) und dem anti-GFP in der Konzentration von 1:400 (unten) in der Zelllinie HT1080 PER2-GFP. Von links nach rechts: Overlay von Durchlicht- und DAPI-Aufnahme, Fluoreszenzfärbung von PER2 bzw. GFP unter Verwendung des Sekundärantikörpers Cy3 (gelb), Abbildung des PER2-GFP-Konstrukts (grün). Das Experiment ist einmal ausgeführt worden mit zwei Aufnahmen pro Konzentration (n=1).

4.4.2 Immunfärbungen mit Antikörpern gegen GAPVD1 und Vergleich mit der publizierten Lokalisation

Da keine Zelllinie verfügbar war, die fluoreszenzmarkiertes GAPVD1 exprimiert, konnten die anti-GAPVD1s lediglich daraufhin getestet werden, ob die resultierenden Verteilungsmuster von GAPVD1 bei der Immunfärbung bereits publizierten Daten entsprachen. Zu diesem Zweck wurden erneut Titrationsreihen mit beiden anti-GAPVD1s durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Für die Immunfärbung mit dem anti-GAPVD1(M) eignete sich am besten eine Konzentration von 1:400, für den anti-GAPVD1(K) eine Konzentration von 1:300 (Abb. 13).

GAPVD1 ist, soweit bisher bekannt ist, ausschließlich an zytosolischen Prozessen beteiligt. Es reguliert die Clathrin-vermittelte Endozytose (Sato et al., 2005) und Transportprozesse zwischen trans-Golgi-Netzwerk und Endosom (Lodhi et al., 2007). Dementsprechend zeigten die Immunfärbungen mit beiden Antikörpern deutliche Signale

im Zytoplasma und vereinzelt auch eine gehäufte Signaldichte an der Zellmembran (Abb. 13).

Beide anti-GAPVD1s sollten daher im PLA eingesetzt werden können, allerdings mit der Einschränkung, dass der anti-GAPVD1(K) auch im Zellkern deutliche Signale erzeugt, und eventuelle nukleäre Signale mit diesem Antikörper im PLA einer zusätzlichen Überprüfung durch einen weiteren Antikörper erfordern könnten (Abb. 13).

13

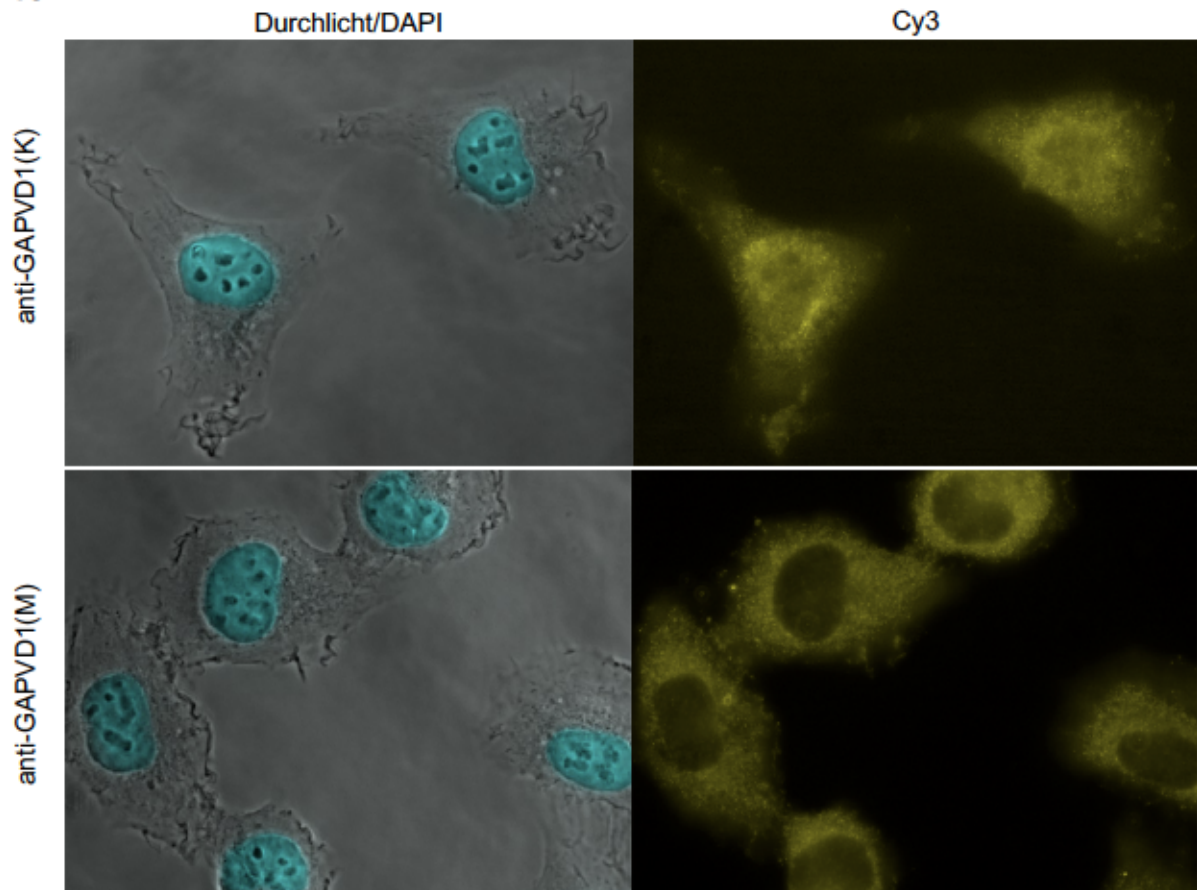


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbungen der anti-GAPVD1s in HT1080 Wildtyp-Zellen

Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen mit den anti-GAPVD1s in HT1080 Wildtyp-Zellen; obere Reihe: anti-GAPVD1(K) (1:300), untere Reihe: anti-GAPVD1(M) (1:400); von links nach rechts: Overlay von Durchlicht- und DAPI-Aufnahme, Fluoreszenzfärbung von GAPVD1. Das Experiment ist einmal ausgeführt worden mit zwei Aufnahmen pro Konzentration (n=1).

4.5 Überprüfung der Interaktion von PER2 und GAPVD1 durch PLA

Um den PLA zu etablieren und zu validieren, sollten vor der Durchführung des eigentlichen Experimentes Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt werden. Der Assay

wurde in HT1080 PER2-GFP-Zellen etabliert. PER2-GFP diente dabei als eine Positivkontrolle, da bei gleichzeitiger Verwendung von anti-PER2 und anti-GFP, die aus verschiedenen Spezies stammen, die beiden linear miteinander verbundenen Epitope PER2 und GFP <40 nm voneinander entfernt sind. Zusätzlich konnte in dieser Zelllinie die Überlagerung der PLA-Signale mit dem GFP-Signal als weitere Kontrolle dienen. Als zweite Positivkontrolle wurden beide anti-GAPVD1s in einem Versuchsansatz verwendet. Das war möglich, weil die Antikörper ebenfalls von verschiedenen Spezies stammen und an das gleiche Zielprotein binden. Auch in diesem Fall sollten die Bindungsepitope eine extrem enge räumliche Nähe aufweisen und zur Signalerzeugung führen.

Als Negativkontrolle war für jede Antikörper-Kombination die Verwendung eines einzelnen Antikörpers statt eines Antikörper-Paars vorgesehen. Signale im PLA trotz Fehlen des zweiten Primärantikörpers wären dann auf unspezifische Bindungsaktivität der Sekundärantikörper zurückzuführen. Für die PER2- und GFP-Antikörperkontrollen wurde die HT1080 PER2-GFP-Zelllinie genutzt, da überlagerte Bilder (Overlays) mit den PER2-GFP-Aufnahmen angefertigt werden konnten und so als weitere Kontrolle dienten (Abb. 14).

Es wurden verschiedene Fluoreszenzaufnahmen angefertigt, um die Lage der Signale im Verhältnis zum Zellkern und zur Zellmembran durch Overlays darstellen zu können: Durchlichtaufnahmen zur Beurteilung, ob die Signale innerhalb der Zelle liegen; DAPI-Aufnahmen, um die Lage relativ zum Zellkern abzubilden; und GFP-Aufnahmen für PER2-GFP. Mit diesen Aufnahmen wurden Overlays mit den PLA-Aufnahmen angefertigt, welche die PLA-Signale abbilden. Die PLA-Signale wurden mit 'ImageJ' gezählt und in Verhältnis zur Zellzahl gesetzt.

4.5.1 Etablierung des PLA mit Antikörpern gegen PER2 und GFP

Die Positiv- und Negativkontrollen mit anti-PER2 und anti-GFP ergaben eine unterschiedliche Eignung beider Antikörper im PLA-Assay. Der anti-GFP alleine zeigte eine deutlich geringere Anzahl an PLA-Signalen pro Zelle als die Positivkontrolle. Der anti-PER2 alleine wies jedoch nur geringfügig weniger Signale pro Zelle auf als die Positivkontrolle (Abb. 14). Den Overlays Durchlicht/DAPI/PLA ist zu entnehmen, dass die Signale der Positiv- und Negativkontrollen erwartungsgemäß innerhalb der Zellen lagen. Die Overlays DAPI/PLA zeigten deutlich die Lage der PLA-Signale in Bezug zum

Kern ohne weitere Strukturen der Zelle darzustellen. Die PLA-Signale im Bereich des Zellkerns waren unscharf abgebildet, während die PLA-Signale im Zytoplasma scharf abgebildet waren. Dies könnte dafür sprechen, dass Signale, die scheinbar im Kern lokalisiert waren, tatsächlich außerhalb des Kerns lagen und sich in Zellebenen über bzw. unter dem Zellkern befanden. In den Overlays PER2-GFP/PLA ist die Lage der PLA-Signale im Verhältnis zu dem GFP-Signal dargestellt. Sowohl in den Negativkontrollen, wie auch in der Positivkontrolle befand sich die Mehrzahl der PLA-Signale im Zytoplasma.

14

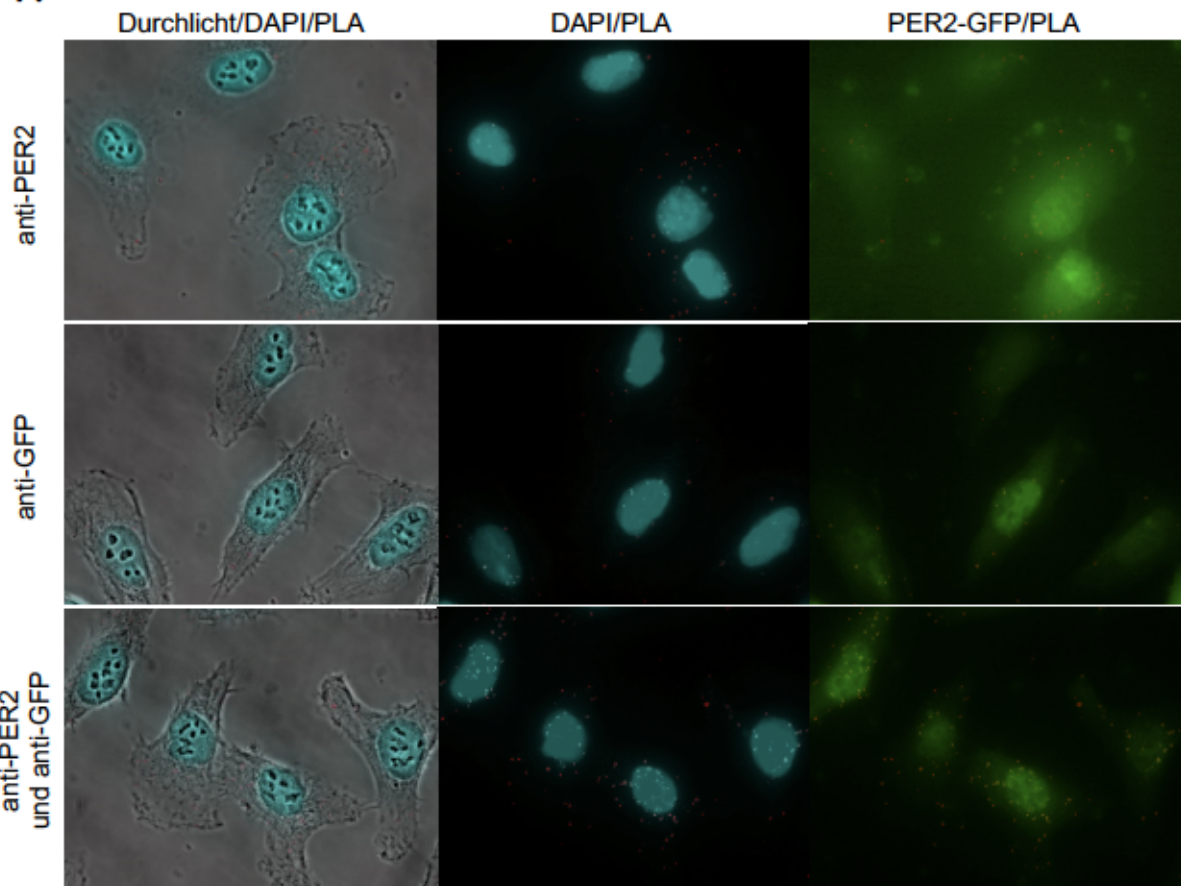


Abbildung 14: Negativkontrollen und Positivkontrolle von anti-PER2 und anti-GFP im PLA in HT1080 PER2-GFP

Mikroskopische Aufnahmen der Negativkontrollen (erste Reihe: anti-PER2, zweite Reihe anti-GFP) und der Positivkontrolle (dritte Reihe: anti-PER2 und anti-GFP) des anti-PER2 und anti-GFP im PLA; von links nach rechts: Overlay aus Durchlichtaufnahme (grau), Zellkern-Färbung (cyan) und PLA-Signalen (rot), danach Overlay aus Zellkern-Färbung (cyan) und PLA-Signalen (rot), danach Overlay aus PER2-GFP (grün) und PLA-Signalen (rot). Im Overlay PER2-GFP/PLA der Negativkontrolle mit dem anti-PER2 sind unspezifische Signale vorhanden, die wahrscheinlich von Klebstoffresten der Kammern auf dem Objektträger rühren. PLA-Signale, die aus Ebenen über oder hinter dem Nukleus in dessen Ebene projizieren, sind in den Overlays unscharf und weißlich abgebildet.

Die statistische Auswertung der Negativkontrollen der anti-PER2 und anti-GFP im Vergleich zur Positivkontrolle mit beiden Antikörpern ist in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 15). Die statistische Auswertung der Kontrollen der anti-PER2 und anti-GFP im PLA zeigt im Mittel 23,9 Signale pro Zelle in der Positivkontrolle unter Nutzung der Antikörper gegen PER2 und GFP. In den Negativkontrollen erzeugte der anti-PER2 20,9 Signale pro Zelle, während der anti-GFP 10,2 Signale pro Zelle hervorrief. Im ungepaarten t-Test der Negativkontrolle mit dem anti-GFP und der Positivkontrolle (anti-PER2 und anti-GFP) ergab sich ein signifikanter Signalunterschied ($p=0,0026$). Der Signalunterschied zwischen dem anti-PER2 und der Positivkontrolle war nicht signifikant (Abb. 15).

15

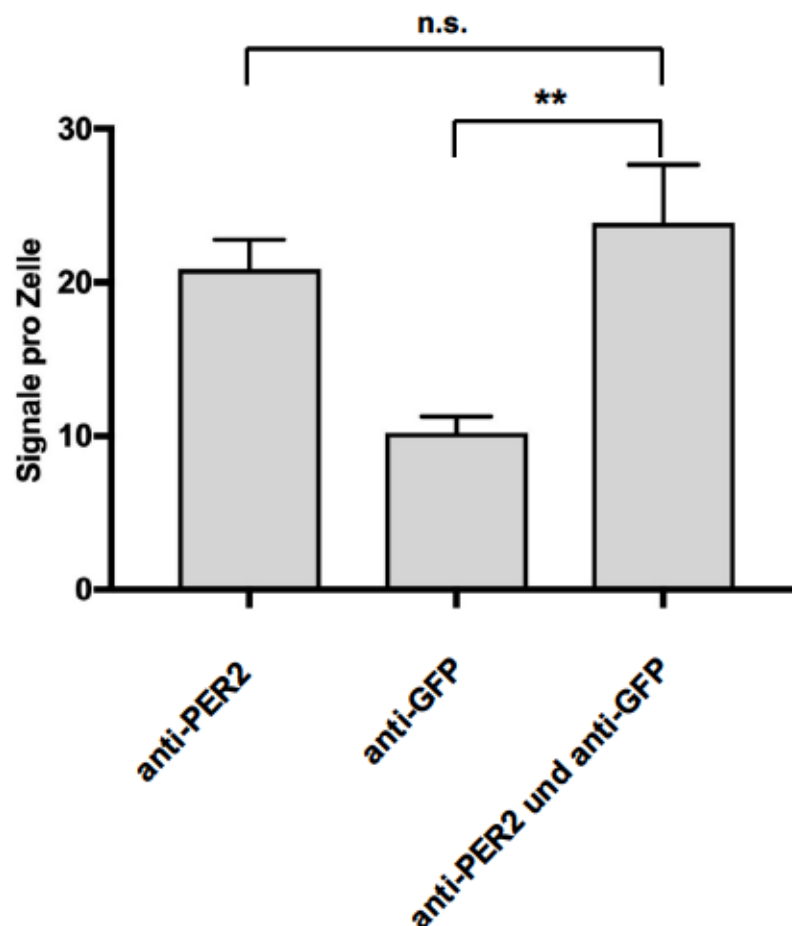


Abbildung 15: Negativ- und Positivkontrollen des anti-PER2 und anti-GFP in HT1080 PER2-GFP

Dargestellt sind die Signale pro Zelle der Negativ- und Positivkontrollen der in dem PLA verwendeten anti-PER2 und anti-GFP. Von links nach rechts: Negativkontrolle des anti-PER2, Negativkontrolle des

anti-GFP, Positivkontrolle mit dem anti-PER2 und anti-GFP. Es wurden jeweils 10 Aufnahmen pro Experiment mit im Durchschnitt 4,5 Zellen/Aufnahme ausgewertet.

4.5.2 Etablierung des PLA mit Antikörpern gegen GAPVD1

Die Positiv- und Negativkontrollen der anti-GAPVD1s ergaben eine ähnliche Eignung beider Antikörper im PLA-Assay, da die PLA-Signale der Negativkontrollen ähnlich niedrig waren und die Positivkontrolle mit beiden Antikörpern eine stark erhöhte Anzahl an PLA-Signalen hervorrief (Abb. 16). Auch hier waren die PLA-Signale im Bereich des Zellkerns unscharf abgebildet, während die PLA-Signale im Zytoplasma scharf abgebildet waren. Somit ist es wahrscheinlich, dass scheinbar im Kern lokalisierte Signale tatsächlich außerhalb des Kerns lagen und sich in Zellebenen über bzw. unter dem Zellkern befanden. In den Overlays PER2-GFP/PLA ist die Lage der PLA-Signale im Verhältnis zu dem GFP-Signal dargestellt. In den Negativkontrollen wie auch in der Positivkontrolle befand sich der Großteil der PLA-Signale im Zytoplasma.

16

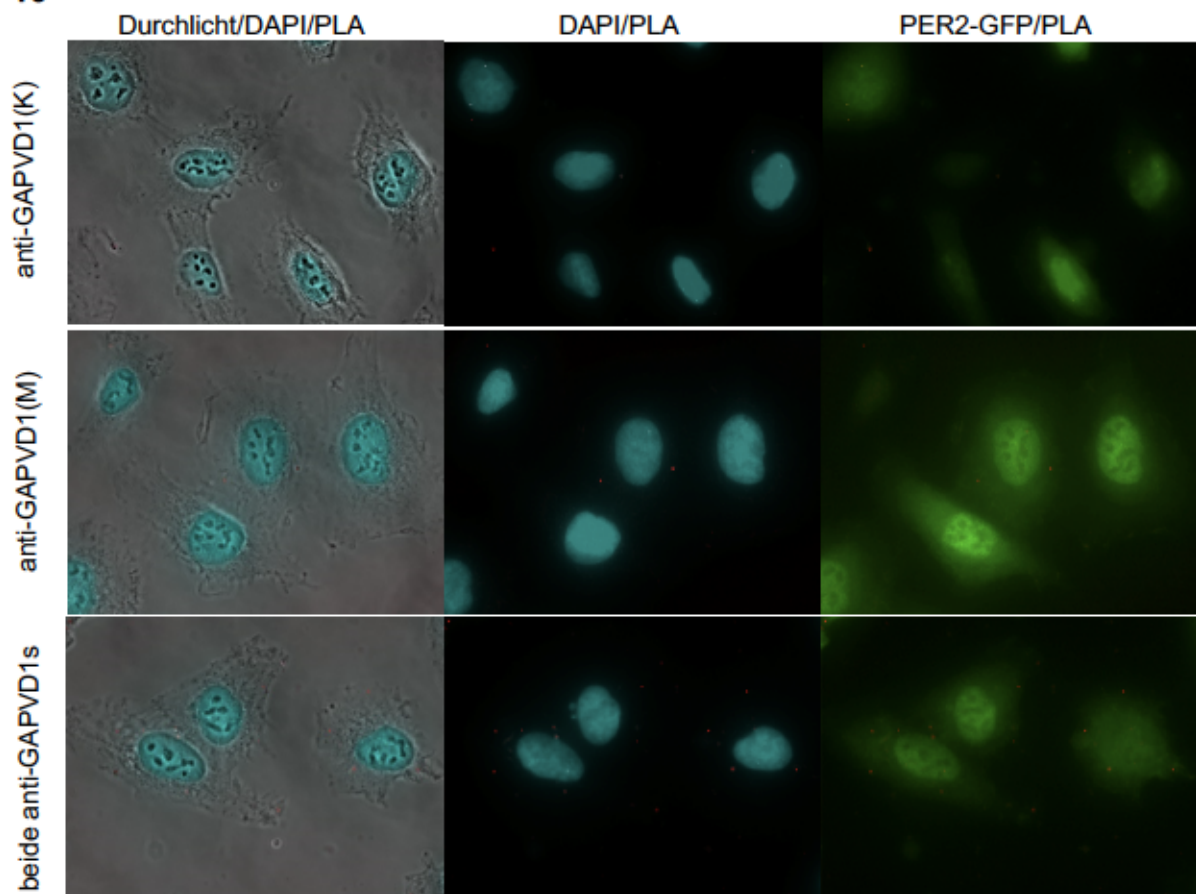


Abbildung 16: Negativkontrollen und Positivkontrolle der anti-GAPVD1s im PLA in HT1080 PER2-GFP

Mikroskopische Aufnahmen der Negativkontrollen (erste Reihe: anti-GAPVD1(K), zweite Reihe: anti-GAPVD1(M)) und der Positivkontrolle (dritte Reihe: beide anti-GAPVD1s) der anti-GAPVD1s im PLA; von links nach rechts: Overlay aus Durchlichtaufnahme (grau), Zellkern-Färbung (cyan) und PLA-Signalen (rot), danach Overlay aus Zellkern-Färbung (cyan) und PLA-Signalen (rot), danach Overlay aus PER2-GFP (grün) und PLA-Signalen (rot). PLA-Signale, die aus Ebenen über oder hinter dem Nukleus in dessen Ebene projizieren, sind in den Overlays unscharf und weißlich abgebildet.

Die statistische Auswertung der Negativkontrollen der jeweiligen anti-GAPVD1s im Vergleich zur Positivkontrolle mit beiden Antikörpern ist in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 17). In den statistischen Auswertungen wies die Positivkontrolle mit durchschnittlich 4,14 Signalen pro Zelle einen höheren Wert auf als die Negativkontrollen mit anti-GAPVD1(K) (1,7 Signale pro Zelle) und anti-GAPVD1(M) (1,9 Signale pro Zelle) alleine. Die Differenz zwischen der Negativkontrolle mit dem anti-GAPVD1(M) war im Vergleich zur Positivkontrolle im ungepaarten t-Test signifikant ($p=0,013$). Die Differenz zwischen anti-GAPVD1(K) und der Positivkontrolle war im ungepaarten t-Test ebenfalls signifikant ($p=0,0078$).

17

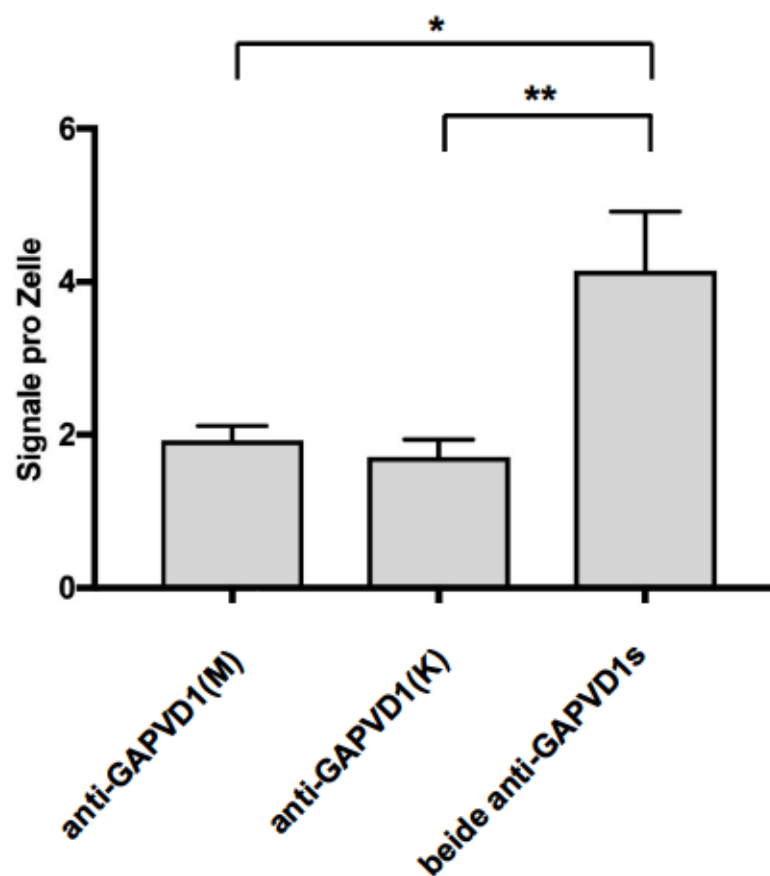


Abbildung 17: Negativ- und Positivkontrollen der anti-GAPVD1s im PLA in HT1080 PER2-GFP

Dargestellt sind die Signale pro Zelle der Negativ- und Positivkontrollen der in dem PLA verwendeten anti-GAPVD1s. Von links nach rechts: Negativkontrolle des anti-GAPVD1(K), Negativkontrolle des anti-GAPVD1(M), Positivkontrolle mit beiden anti-GAPVD1s. Es wurden 10 Aufnahmen pro Experiment, mit im Durchschnitt 4,3 Zellen/Aufnahme, ausgewertet.

4.5.3 Überprüfung der Interaktion von PER2-GFP und GAPVD1 in HT1080 PER2-GFP durch Proximity Ligation Assay

Um die Interaktion der Proteine GAPVD1 und PER2 im PLA zu überprüfen, wurde zunächst die PER2-GFP-Zelllinie verwendet, da das direkte Immunfluoreszenzsignal von PER2-GFP die Lage des PER2-Proteins zeigt und dadurch die PLA-Signale mit der Lokalisation von PER2 verglichen werden können. Für das PLA-Experiment wurden anti-GAPVD1(K) und anti-GFP genutzt. Es wurden drei unabhängige Replikate des Experiments durchgeführt.

Die Ergebnisse des PLA in der PER2-GFP-Zelllinie sind in zwei repräsentativen Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Neben dem Experiment wurden bei jedem Replikat zwei Negativkontrollen in derselben Zelllinie mit jeweils einem der beiden Antikörper ausgeführt. Es ist jeweils eine repräsentative Abbildung dargestellt (Abb. 18). Die Negativkontrollen wurden bereits in Kap. 4.5.1 und Kap. 4.5.2 beschrieben. Es sind keine PLA-Signale außerhalb der Zellen entstanden (Abb. 18, Durchlicht/DAPI/PLA-Overlays), was die Validität des Assays unterstützt. Im Bereich des Zellkerns waren überwiegend unscharf fokussierte PLA-Signale vorhanden, während die Mehrzahl der Signale in einer Fokusebene außerhalb der Nuklei lag (Abb. 18, Durchlicht/DAPI/PLA-Overlays und DAPI/PLA-Overlays). Dies könnte bedeuten, dass die Mehrzahl der Signale im Bereich des Zellkerns in einer anderen zellulären Ebene lag als die Signale im Zytoplasma. Da GAPVD1 ein Protein mit zytosolischer Funktion ist (Lodhi et al., 2007) und GAPVD1 ausschließlich als Bestandteil zytoplasmatischer PER-Komplexe gefunden wurde (Aryal et al., 2017), ist eine Interaktion von GAPVD1 mit PER2-GFP im Nukleus unwahrscheinlich.

Die zytoplasmatischen PLA-Signale überlappten natürlicherweise mit dem Fluoreszenzsignal von PER2-GFP, da PER2-GFP diffus in der ganzen Zelle verteilt ist (Abb. 18, GFP-PER2/PLA-Overlays). Allerdings ließ sich keine Korrelation der GFP-Signalarstärke mit den PLA-Signalen beobachten was darauf schließen lässt, dass die

GAPVD1-PER2-Interaktionen nicht von der lokalen Konzentration von PER2-GFP abhängig sind. In den Negativkontrollen mit nur jeweils einem Antikörper waren signifikant weniger PLA-Signale vorhanden als in dem eigentlichen Experiment mit beiden Antikörpern. Dies bestätigt die Hypothese, dass GAPVD1 und PER2 interagieren.

18

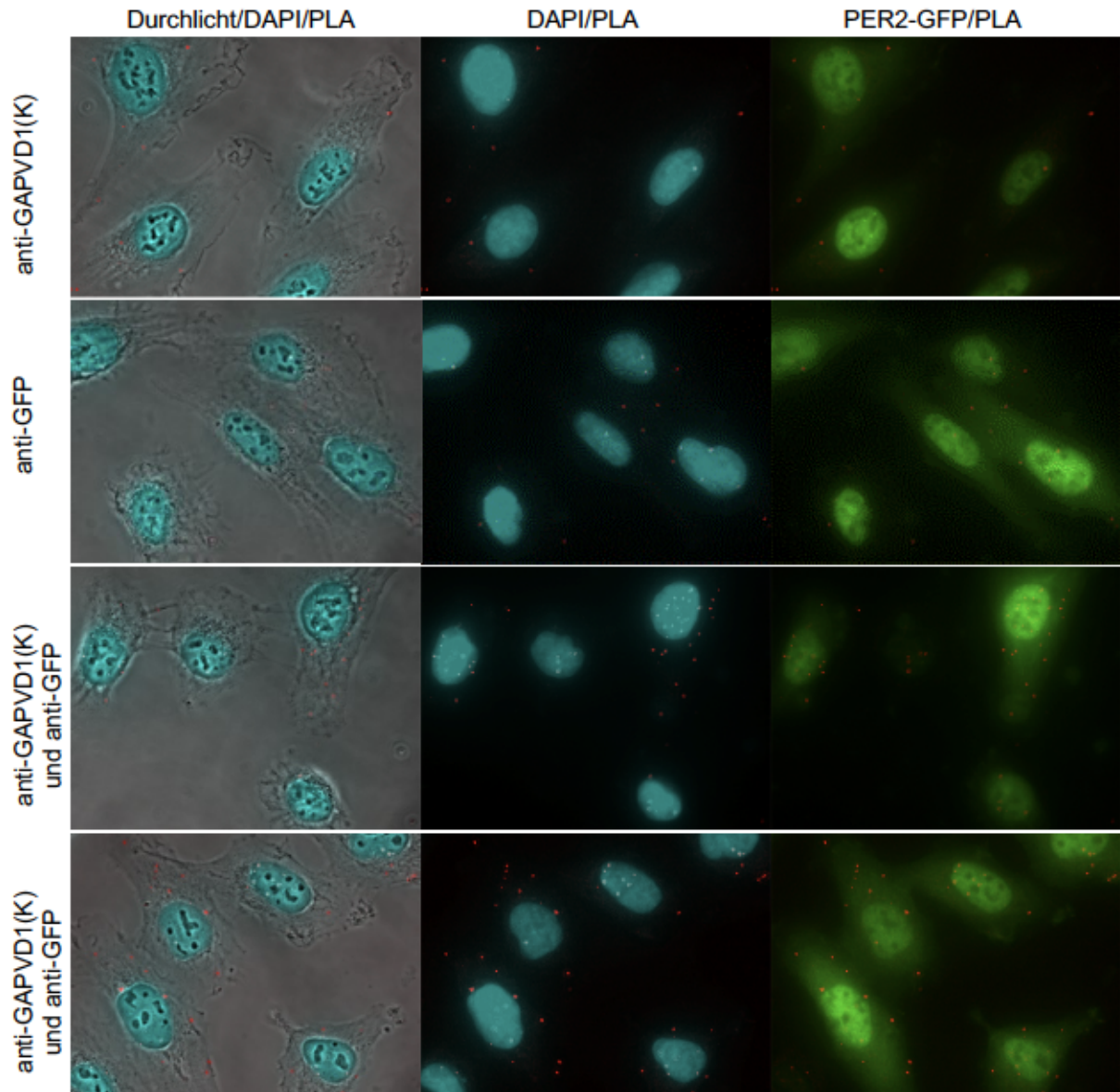


Abbildung 18: PLA der Proteine PER2-GFP und GAPVD1 in HT1080 PER2-GFP mit Negativkontrollen

Mikroskopische Aufnahmen nach PLA mit anti-GAPVD1(K) und anti-GFP mit Negativkontrollen in der Zelllinie HT1080 PER2-GFP. Von links nach rechts: Overlay aus Durchlichtaufnahme (grau), DAPI (cyan) und PLA-Signalen (rot) (erste Spalte), Overlay aus DAPI und PLA-Signalen (zweite Spalte), Overlay aus PER2-GFP und PLA-Signalen (dritte Spalte). Es sind repräsentative Abbildungen dreier unabhängiger Replikate des Experiments dargestellt (n=3).

In der statistischen Auswertung ergab sich bei der Negativkontrolle mit anti-GAPVD1(K) ein Mittelwert von 4,2 PLA-Signalen pro Zelle und bei der Negativkontrolle mit dem anti-GFP einen Mittelwert von 3,4 Signalen pro Zelle. Das Experiment wies mit 14,4 Signalen pro Zelle im Vergleich zu beiden Kontrollen einen um den p-Wert $<0,0001$ statistisch signifikanten Unterschied in der Anzahl der PLA-Signale pro Zelle auf (Abb. 19). Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass die Proteine GAPVD1 und PER2-GFP interagieren.

19

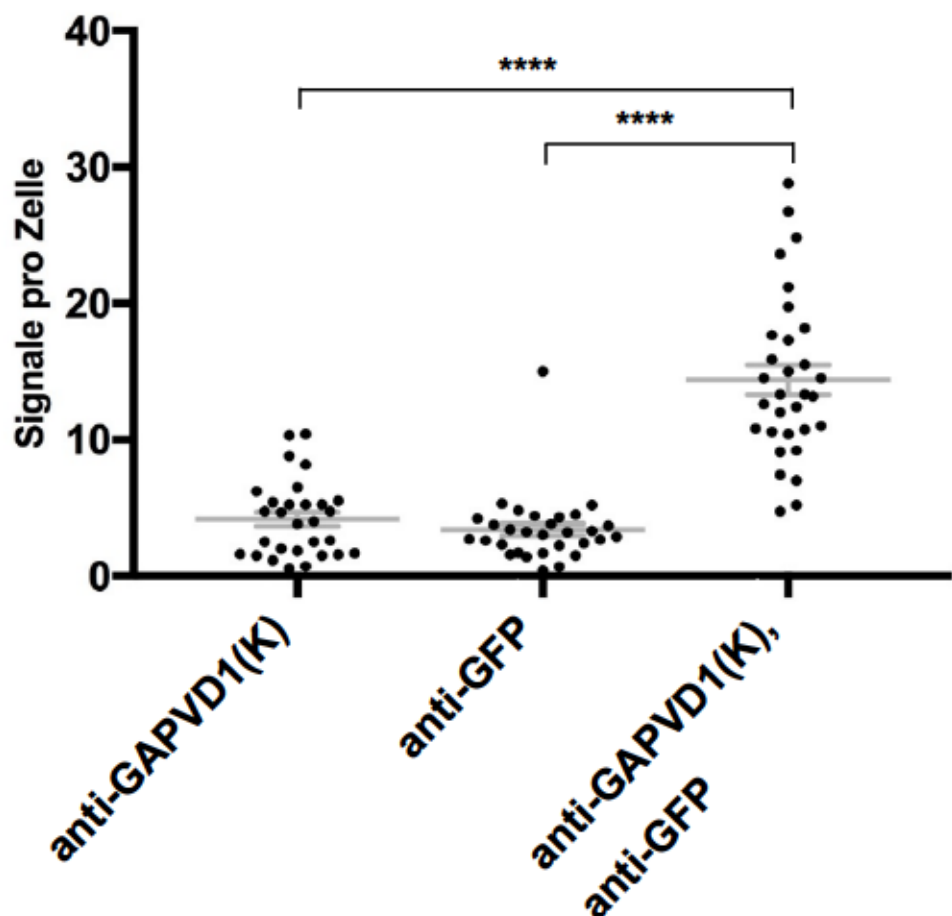


Abbildung 19: Statistische Auswertung des PLA mit anti-GAPVD1(K) und anti-GFP in HT1080 PER2-GFP-Zellen

Dargestellt ist die statistische Auswertung der Signale pro Zelle der PLAs mit anti-GAPVD1(K) und dem anti-GFP in der Zelllinie HT1080 PER2-GFP, sowie der Negativkontrollen mit den einzelnen Antikörpern. Von links nach rechts: Anti-GAPVD1(K) allein, anti-GFP allein, anti-GAPVD1(K) und anti-GFP ($n=3$). Die Ergebnisse des Experiments mit anti-GAPVD1(K) und dem anti-GFP sind im Vergleich zu beiden Negativkontrollen im ungepaarten t-Test um den p-Wert $<0,0001$ signifikant. Der Standardfehler (SEM) ist im Balkendiagramm angegeben. Es wurden 9-11 Aufnahmen pro Experiment, mit im Durchschnitt 5,5 Zellen/Aufnahme, ausgewertet.

4.5.4 Überprüfung der Interaktion von PER2 und GAPVD1 in HT1080 durch Proximity Ligation Assay

Das vorausgegangene Experiment zeigt, dass GAPVD1 mit überexprimiertem PER2-GFP interagieren kann. In der letzten Versuchsreihe sollte gezeigt werden, dass auch die beiden endogenen Proteine GAPVD1 und PER2 in der Wildtyp-Zelllinie HT1080 interagieren.

Als Antikörper wurden anti-PER2 und anti-GAPVD1(M) verwendet. Neben dem Experiment wurden bei jedem Replikat zwei Negativkontrollen in derselben Zelllinie mit jeweils einem der beiden Antikörper ausgeführt. Das Experiment und die Negativkontrollen wurden in drei unabhängigen Replikaten durchgeführt. Auch in diesem Experiment lagen alle PLA-Signale innerhalb der Zellen, und innerhalb des Nukleus vorhandene PLA-Signale schienen in einer anderen Ebene als der Fokusebene zu liegen (Abb. 20). Daraus kann geschlossen werden, dass auch die endogenen Proteine PER2 und GAPVD1 ausschließlich im Zytoplasma interagieren.

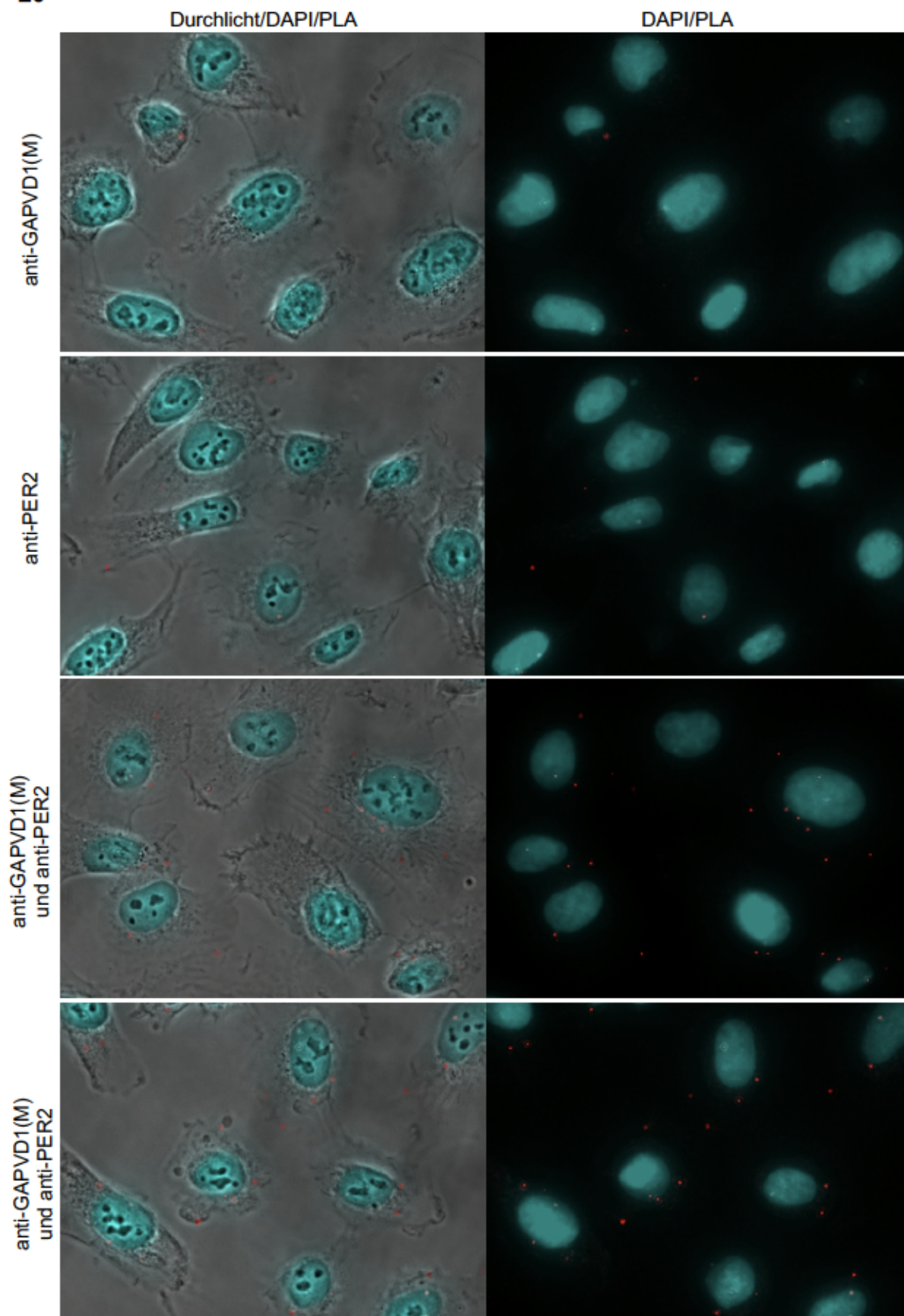


Abbildung 20: PLA der Proteine PER2 und GAPVD1 in HT1080 Wildtyp-Zellen mit Negativkontrollen

Mikroskopische Aufnahmen nach PLA mit anti-GAPVD1(M) und anti-PER2 mit Negativkontrollen in HT1080 Wildtyp-Zellen. Von links nach rechts: Overlay aus Durchlichtaufnahme (grau), Zellkern-Färbung (cyan) und PLA-Signalen (rot); Overlay aus Zellkern-Färbung (cyan) und PLA-Signalen (rot). Es sind repräsentative Abbildungen dreier unabhängiger Replikate des Experiments dargestellt (n=3).

Die statistische Auswertung ist in einem Punktediagramm dargestellt (Abb. 21). Vergleicht man die Ergebnisse vom PLA-Experiment mit den Negativkontrollen, so lag die Anzahl der Signale pro Zelle bei beiden Negativkontrollen deutlich unter der Anzahl der Signale im Experiment. Anti-GAPVD1(M) alleine rief 0,8 PLA-Signale pro Zelle hervor, der anti-PER2 alleine rief im Mittel 0,7 PLA-Signale pro Zelle hervor. Mit einer Anzahl von 2,5 Signalen pro Zelle im Experiment mit beiden Antikörpern war die Differenz zu beiden Kontrollen jeweils statistisch signifikant mit einem p-Wert <0,0001 (siehe Abb. 21). Dies bestätigt die Interaktion der endogenen Proteine PER2 und GAPVD1 in der Zelllinie HT1080.

21

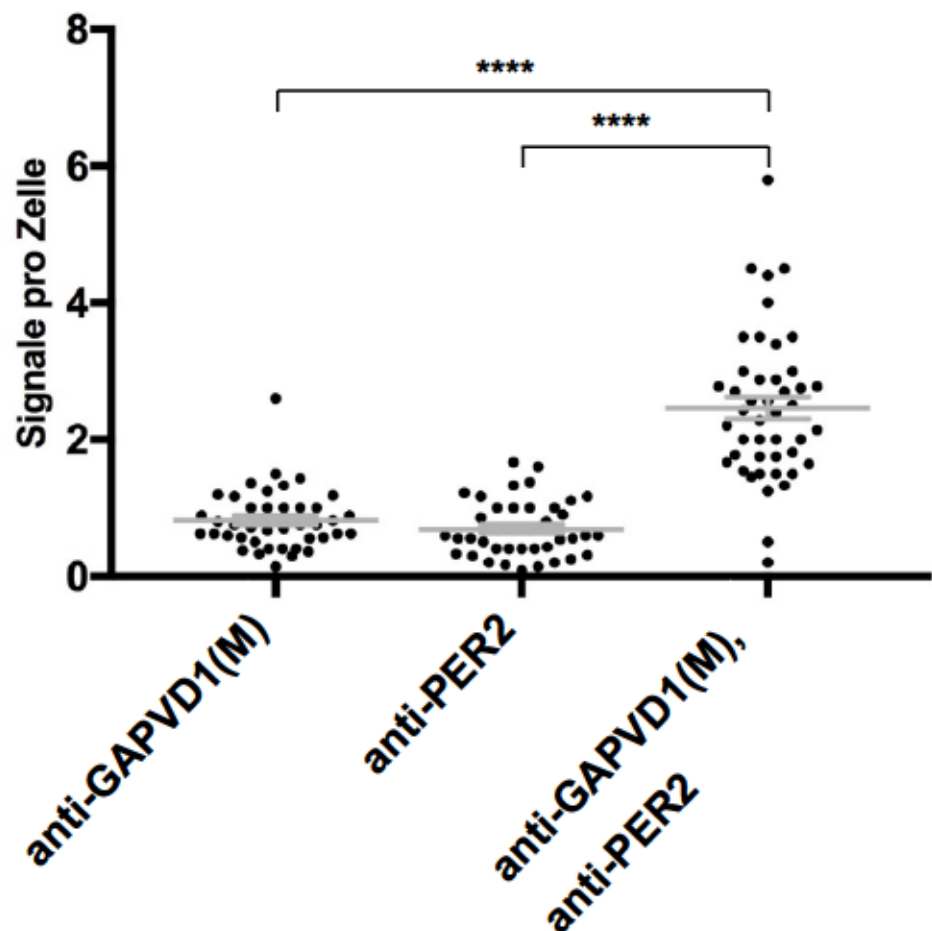


Abbildung 21: Statistische Auswertung des PLA mit anti-GAPVD1(M) und anti-PER2 in Wildtyp HT1080-Zellen.

Dargestellt ist die statistische Auswertung der Signale pro Zelle der PLAs mit anti-GAPVD1(M) und dem anti-PER2 in der Zelllinie HT1080, sowie der Negativkontrollen mit den einzelnen Antikörpern. Von links nach rechts: Anti-GAPVD1(M) allein, anti-PER2 allein, anti-GAPVD1(M) und anti-PER2 (n=3). Die Ergebnisse des Experiments mit anti-GAPVD1(M) und dem anti-PER2 sind im Vergleich zu beiden Negativkontrollen im ungepaarten t-Test um den p-Wert $<0,0001$ signifikant. Der Standardfehler (SEM) ist im Balkendiagramm angegeben. Es wurden in 10-20 Aufnahmen pro Experiment, mit im Durchschnitt 7,8 Zellen/Aufnahme, ausgewertet.

5 Diskussion

Da die Identifikation von GAPVD1 als Interaktionspartner von PER2 potenziell weitreichende Implikationen für die Funktion der zirkadianen Uhr beziehungsweise für GAPVD1-assoziierte Prozesse hat, war es unabdingbar die neue Interaktion mithilfe einer unabhängigen Methode zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurde die Methode ‚Proximity Ligation Assay (PLA)‘ im Labor etabliert und durchgeführt.

5.1 Positiver Test auf Interaktion von GAPVD1 und PER2 durch Proximity Ligation Assay

5.1.1 Eignung der verwendeten Antikörper

Die Aussagekraft des PLA beruht zu einem nicht unwesentlichen Teil auf der Qualität der verwendeten Antikörper. Die Verwendung von Antikörpern mit schwacher Affinität führt potentiell zu falsch negativen Ergebnissen im PLA. Im Gegensatz dazu verursachen unspezifische Antikörper falsch positive PLA-Signale. Aus diesem Grund wurden die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper durch zwei unabhängige Methoden getestet.

Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl der PER2- als auch der GFP-Antikörper in der Immunfluoreszenzfärbung von PER2-GFP-Zellen ein mit dem GFP-Signal weitgehend identisches Signal erzeugen. Fusionsproteine von PER2 mit fluoreszierenden Proteinen sind gut charakterisierte und in vielen Studien verwendete Proteine, deren subzelluläre Verteilung mit der des endogenen PER2 übereinstimmt (Nagoshi et al., 2004, Lee et al., 2015, Smyllie et al., 2016). Für den Test der GAPVD1-Antikörper stand keine Zelllinie zur Verfügung, die fluoreszenzmarkiertes GAPVD1 exprimiert. Dennoch bestätigten die Versuche, dass die subzelluläre Verteilung von GAPVD1 mit publizierten Daten übereinstimmt. Der überwiegende Teil befand sich im Cytoplasma, insbesondere in Kernnähe, was wahrscheinlich einer Lokalisation im Golgi-Apparat entspricht (Hermle et al., 2018). Dafür spricht auch, dass das Färbemuster auf eine Lokalisation von GAPVD1 in vesikulären Strukturen hindeutet, was wiederum in Einklang steht mit dessen Rolle bei Endozytose (Sato et al., 2005) und vesikulärem Transport (Lodhi et al., 2007). Es wurde dennoch insofern ein geringer Unterschied zwischen

den beiden GAPVD1-Antikörpern festgestellt, als dass anti-GAPVD1(K) mehr Signal im Zellkern als anti-GAPVD1(M) erzeugte. Da sich anschließend herausstellte, dass GAPVD1-PER2-Signale im PLA unabhängig von den verwendeten Antikörpern so gut wie ausschließlich im Zytoplasma auftreten, blieb dieser Befund für die PLA-Experimente folgenlos.

Darüber hinaus führte die Herunterregulierung von PER2 und GAPVD1 durch siRNA zu einer spezifischen Abnahme der Signalintensitäten im Western Blot. Ein GFP-Signal war ausschließlich in Zellen zu detektieren, die auch GFP exprimieren. Hier muss einschränkend angeführt werden, dass der Test mittels Western Blot im Vergleich zur Immunfluoreszenzfärbung geringere Aussagekraft für die Eignung eines Antikörpers im PLA besitzt, da Antigene auf einer Proteinmembran vollständig denaturieren, im PLA aber wie auch in der Immunfärbung nativ oder schwach denaturiert vorliegen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich in diesen Vorversuchen alle Antikörper hinsichtlich Spezifität und Affinität als für den PLA geeignet herausstellten, was sich in den anschließend durchgeführten PLA-Experimenten durchgehend bestätigt hat.

5.1.2 Stärken und Schwächen des PLA

Der PLA ist eine im Jahr 2002 entwickelte – und damit relativ neue – Methode, die mit hoher Sensitivität und Spezifität Interaktionen zwischen zwei Proteinepitopen detektiert, wobei die Epitope sich auf ein und demselben oder auf zwei unterschiedlichen Polypeptiden befinden können (Fredriksson et al., 2002, Zatloukal et al., 2014). In dieser Arbeit wurde der PLA für beide Zwecke eingesetzt. Die erste Variante, nämlich die Detektion zweier unterschiedlicher Proteinepitope auf PER2-GFP oder GAPVD1, diente als Positivkontrolle im Zuge der Etablierung der Methode. Diese Art der Positivkontrolle ist allerdings nicht zwangsläufig erfolgreich aufgrund bestimmter Eigenschaften der PLA-Methode.

Beispielsweise könnten sich Primärantikörper mit gleicher oder überlappender Bindungsstelle gegenseitig sterisch blockieren (Mocanu et al., 2011). Diese Möglichkeit bestand prinzipiell bei gleichzeitiger Verwendung der beiden GAPVD1-Antikörper. Das Antigen zur Herstellung von anti-GAPVD1(K) umfasste die Aminosäuren 550-600 von GAPVD1 während das komplette GAPVD1-Protein als Antigen zur Herstellung von

anti-GAPVD1(M) benutzt wurde. Die deutlich höhere PLA-Signalstärke bei Verwendung beider Antikörper im Vergleich zur Verwendung jeweils nur eines Antikörpers zeigt jedoch, dass beide Antikörper gleichzeitig GAPVD1 binden können.

Ähnliche Effekte wären auch bei den nachgeschalteten Reaktionen im PLA möglich. Beispielsweise könnten sich die Oligonukleotid-konjugierten Sekundärantikörper gegenseitig sterisch blockieren. Eine solche Situation könnte dafür verantwortlich sein, dass die gleichzeitige Verwendung der PER2- und GFP-Antikörper ein PLA-Signal erzeugte, das nur unwesentlich stärker war als das Signal mit dem PER2-Antikörper alleine, da in diesem Fall die Primärantikörper nachgewiesenermaßen unterschiedliche Proteinepitope binden. Lokal unterschiedliche sterische Blockade von Primär- und/oder Sekundärantikörpern könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass die PLA-Signale innerhalb einer Zelle in der Regel heterogen in Bezug auf Größe und Helligkeit sind, sowie dass die Signale oft nicht homogen in der Zelle verteilt sind obwohl von einer uniformen Verteilung der Proteininteraktionen im Zytoplasma ausgegangen werden darf.

Wichtig ist auch eine korrekte Interpretation der Ergebnisse der PLA-Methode. Obwohl die Methode allgemein als Nachweis von Proteininteraktionen gilt, erlaubt sie streng genommen nur die Schlussfolgerung, dass ein positives PLA-Signal eine Distanz von <40 nm zwischen zwei Molekülen bedeutet (Hegazy et al., 2020). Es ist daher möglich, dass GAPVD1 und PER2 trotz positivem PLA-Signal nicht direkt miteinander interagieren, sondern beispielsweise beide gleichzeitig an ein drittes Protein binden. Dafür käme insbesondere CSNK1D in Betracht, das sowohl mit PER2 (Aryal et al., 2017) als auch mit GAPVD1 (Kategaya et al., 2012) interagiert. Allgemein wird angenommen, dass zwei im PLA interagierende Proteine zumindest im gleichen Proteinkomplex enthalten sind.

Auch muss die absolute Signalstärke in PLA-Experimenten zurückhaltend interpretiert werden: Intermolekulare PLA-Signale erreichen bei hoher Expression der Zielproteine eine Sättigung. Bei systematischer Änderung der Dichte der oligonukleotidkonjugierten Antikörper durch Zugabe unkonjugierter Antikörper wird das PLA-Signal ebenfalls gesättigt. Diese Sättigung kann auch nicht durch Verringerung der Dauer der RCA beseitigt werden. Die Ergebnisse des PLA lassen sich daher nur semiquantitativ auswerten, da in der Reaktion eine Reihe nichtlinearer Effekte auftritt (Mocanu et al., 2011).

In mehreren Experimenten traten vereinzelte punktförmige PLA-Signale im Zellkern auf. Dabei fiel auf, dass bei Fokussierung auf die zytoplasmatischen Signale die Signale im Zellkern unscharf erschienen und umgekehrt. Eine mögliche Erklärung dafür, dass nicht alle Signale innerhalb einer Zelle gleichzeitig fokussiert werden konnten, könnte sein, dass die Signale in verschiedenen zellulären Ebenen liegen, und dass unscharfe Signale im Bereich des Zellkerns tatsächlich in einer tieferen Zellschicht außerhalb des Zellkerns liegen. Um diese Hypothese zu bestätigen könnten in einem nächsten Schritt PLA-Experimente nicht wie in dieser Arbeit mit einem Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop, sondern mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, das Licht aus Schichten oberhalb und unterhalb der fokussierten Ebene ausblendet, durchgeführt werden.

Der PLA ist auch anfällig dafür, falsch positive und scheinbar spezifische Signale für Antigene, die in keiner funktionellen Verbindung zueinander stehen, zu erzeugen. Versuche von Alsemarz, 2018 haben gezeigt, dass Antigenpaare, die keine direkte oder indirekte Interaktion aufweisen, jedoch teilweise überlappende Immunfluoreszenzsignale zeigen, positive Ergebnisse erzeugen können. Somit wäre es möglich, dass ein positives Signal erzeugt wird, wenn die Primärantikörper aus stochastischen Gründen nahe genug beieinander liegen, ohne dass ihre Zielproteine miteinander interagieren (Alsemarz, 2018).

Einen weiteren Kritikpunkt stellen die Kontrollen dar: Üblicherweise wird – wie auch in dieser Arbeit – als Negativkontrolle der PLA mit jeweils nur einem der beiden Primärantikörper durchgeführt. Dieses Vorgehen kontrolliert jedoch nur, ob die Sekundärantikörper spezifisch binden, aber nicht die komplette PLA-Methode (Alsemarz, 2018). Um PLA-Ergebnisse durch noch bessere Kontrollen absichern zu können wäre es notwendig Kontrollen nach Kriterien zu erschaffen, die die ‚Nähe‘ der Proteine zueinander als aussagekräftigen Beleg für eine Interaktion definieren (Alsemarz, 2018). Es ist allerdings noch offen wie solche Kontrollen aussehen könnten, da es sich um eine intrinsische Schwäche der Methode handelt.

Auf der anderen Seite besitzt der PLA eine Reihe von Eigenschaften, die ihn zu einer wertvollen Methode zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen, über die noch keine oder sehr wenig weitere Informationen vorliegen, machen. Die maximale Distanz von 40 nm zwischen den Primärantikörpern, die benötigt wird um ein positives Signal zu erhalten, erreicht die makromolekulare Ebene und liegt damit unter der optischen Auflösung (Hegazy et al., 2020). In anderen Worten, ein submikroskopischer

Vorgang wird mikroskopisch sichtbar gemacht. Das bedeutet, dass man gleichzeitig die Lokalisation der Interaktionen innerhalb der Zelle bestimmen kann. Im Fall der GAPVD1-PER2-Interaktion war diese Information sehr wertvoll, da GAPVD1 vornehmlich im Zytoplasma und PER2 mehrheitlich im Zellkern vorliegt. Der PLA hat gezeigt, dass GAPVD1-PER2 fast ausschließlich im Zytoplasma interagieren. Da PER2 seine biologische Funktion überwiegend im Zellkern und GAPVD1 im Zytoplasma ausübt, sind diese Ergebnisse ein erster Hinweis darauf, dass die PER2-GAPVD1-Interaktion der Regulation von GAPVD1 dienen könnte.

Ein weiterer Vorteil des PLA ist, dass er mit endogenen Proteinen in jeder Zell- und Gewebeart durchgeführt werden kann (Soderberg et al., 2008). Das unterscheidet ihn von einer Reihe verwandter mikroskopischer Methoden, beispielsweise einfachen Colokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie oder Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Mikroskopie, da die Proteine in diesen Fällen fluoreszenzmarkiert sein müssen. Die hier erhaltenen Ergebnisse könnten daher ohne zusätzlichen Aufwand in anderen Zellarten oder Gewebeschnitten überprüft werden.

PLA-Signale können auf einfache Weise automatisch gezählt werden, was als Vorteil gegenüber der manuellen Auswertung angesehen werden kann. Auch wenn das menschliche Auge gut Muster erkennen kann, fehlt ihm die Sensitivität um geringe Änderungen in der Dichte von Partikeln zu identifizieren, was Computerprogramme sehr effektiv und ohne Bias leisten können, beispielsweise mit der Funktion ‚*Find Maxima*‘ in *ImageJ* (Brocher, 2019).

5.1.3 Alternative Methoden für die Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen

Um zu überprüfen, ob GAPVD1 mit PER2 interagiert, kommen mehrere Methoden infrage. Die Immunfärbung kann beispielsweise darüber Aufschluss geben, ob Proteine in der Zelle colokalisiert sind, was zwar wie beim PLA nicht zwangsläufig bedeutet, dass zwei Proteine interagieren, jedoch einen Hinweis darauf liefern kann. Immunfärbungen sind einfach durchzuführen, haben jedoch den Nachteil, dass sie keine Aussagekraft besitzen, wenn der Großteil der Zielproteine gleichmäßig im Zytoplasma oder im Zellkern verteilt ist, was der Fall ist für PER2 und GAPVD1. In diesem Fall ist der PLA einer einfachen Immunfärbung deutlich überlegen.

Eine weitere Methode um eine potentielle direkte Protein-Protein-Interaktion zu untersuchen ist die FRET-Mikroskopie. FRET erzeugt fluoreszierende Signale bei einer intermolekularen Entfernung der Proteine von 1-10 nm zueinander (Jares-Erijman and Jovin, 2003). Um die Interaktion zweier Proteine detektieren zu können, werden vorab Fusionsproteine mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen benötigt, sogenannten FRET-Paaren (Bajar et al., 2016). Dabei muss das FRET-Paar so gewählt werden, dass nach Anregung des einen Fluoreszenzprotein dessen Lichtemission ausreicht um das zweite Fluoreszenzprotein anzuregen.

FRET-Mikroskopie von PER2 und GAPVD1 wurde bereits durchgeführt, zeigte jedoch keine positiven Ergebnisse (Kalfalah und Reinke, unveröffentlicht). Dafür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Prinzipiell schließt ein negatives Ergebnis im FRET eine direkte Interaktion zweier Proteine nicht aus, da unter Umständen die Fluoreszenzproteine bei bestehender Protein-Protein-Interaktion nicht nahe genug beieinander liegen. Das Fluoreszenzprotein könnte auch in das Zielprotein eingefaltet werden, so dass es nicht angeregt werden kann. Da der Versuch bisher nur mit PER2-GFP und GAPVD1-GFP durchgeführt wurde, müsste er mit verschiedenen Kombinationen von Fusionsproteinen wiederholt werden, die das fluoreszierende Protein auch am N- oder C-Terminus tragen. Alternativ könnte dieses Ergebnis auch darauf hinweisen, dass die Interaktion zwischen PER2 und GAPVD1 nicht direkt ist, sondern beispielsweise über CSNK1D als Bindeglied erfolgt (Aryal et al., 2017, Kategaya et al., 2012).

Schließlich ist eine nicht auf Mikroskopie beruhende Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen die Co-Immunopräzipitation (Co-IP). Am aussagekräftigsten ist dieses Experiment, wenn es gelingt zwei endogene Protein zu co-immunopräzipitieren. Steht für ein Protein kein geeigneter Antikörper zur Verfügung, kann versucht werden dieses Protein mit einer geeigneten Markierung, z.B. Flag oder Myc, in Zellen zu exprimieren und die Co-IP dann mit einem Antikörper, der gegen den Protein-Tag gerichtet ist, durchzuführen. Eine Variante dieses Experiments kann sehr hilfreich sein um direkte Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Dabei werden die Zielproteine mit oder ohne Tag in Bakterien exprimiert und dann wird eine Co-IP durchgeführt. Diese Strategie hat den Vorteil, dass in der Regel keine Proteine in Bakterienzellen vorhanden sind, die als Zwischenglieder bei der Interaktion dienen können, wie beispielsweise CSNK1D im Fall von PER2 und GAPVD1 (Aryal et al., 2017, Kategaya et al., 2012).

5.2 Mögliche biologische Funktionen der Interaktion von PER2 und GAPVD1

Die Interaktion von PER2 und GAPVD1 könnte prinzipiell dazu führen, dass die biologische Funktion eines der Proteine durch das andere Protein beeinflusst wird, oder dass sich beide Proteine gegenseitig in ihrer Funktion beeinflussen. Die hier durchgeführten Experimente geben nur wenig Aufschluss darüber in welche Richtung solch eine Regulation erfolgen könnte. Die PER2-GAPVD1-Interaktion wurde durch den PLA allerdings im Wesentlichen im Zytoplasma lokalisiert. Da GAPVD1 zytoplasmatische Prozesse reguliert und im Kern so gut wie nicht vorhanden ist (Lodhi et al., 2007, White et al., 1999), wogegen PER2 hauptsächlich im Kern lokalisiert ist und dort seine Hauptfunktion als transkriptioneller Repressor ausübt (Kume et al., 1999, Smyllie et al., 2016), ist es gegenwärtig wahrscheinlicher, dass PER2 die Funktion von GAPVD1 beeinflusst, als umgekehrt.

Es stellt sich die Frage wie so eine Regulation aussehen könnte. Die Interaktion mit einem anderen Protein kann beispielsweise Lokalisation, enzymatische Aktivität, post-translationelle Modifikationen und weitere Eigenschaften eines Proteins beeinflussen. Ein möglicher nächster Schritt wäre daher PER2 durch siRNA herunterzuregulieren und anschließend zu überprüfen welchen Einfluss das auf die Funktion von GAPVD1 hat. Relevant ist bei dieser Fragestellung besonders die Tatsache, dass PER2 als Uhrenprotein rhythmisch exprimiert wird. Dessen Rhythmik könnte daher GAPVD1 ebenfalls eine circadiane Rhythmik verleihen.

Neben der untersuchten Interaktion von PER2 mit GAPVD1 verfügen beide Proteine über weitere Interaktionspartner. So bilden die Proteine PER2 und GAPVD1 einen zytosolischen Komplex mit den Proteinen CSNK1D, PER1, PER3, CRY1 und CRY2 (Aryal et al., 2017). Das Protein CSNK1D reguliert mehrere Proteine durch Phosphorylierung, darunter auch PER2 (Camacho et al., 2001). Somit wäre es denkbar, dass CSNK1D durch eine Interaktion mit GAPVD1 ebenfalls die Phosphorylierung von GAPVD1 beeinflusst.

Im Hinblick auf die Ausgangsfragestellung nach der Rolle von PER2 bei der Regulation der Autophagie sind insbesondere GAPVD1-abhängige Prozesse interessant, die mit dem Autophagiemechanismus in Verbindung stehen. GAPVD1 ist an der Regulation des vesikulären Transports beteiligt, der mechanistisch eng mit dem Autophagiemechanismus verbunden ist. GAPVD1 fördert die Entpackung von Stachelsaumbläschen

(*clathrin coated vesicles*) bei der CLATHRIN-vermittelten Endozytose, die wiederum mechanistisch an Autophagie gekoppelt ist (Semerdjieva et al., 2008, Dwivedi et al., 2011). Darüber hinaus greift PER2 in den vesikulären Glutamatransport ein. Neurotransmitter werden von VESICULAR GLUTAMATE TRANSPORTER (VGLUT) in synaptische Vesikel überführt. Die Menge des gespeicherten Neurotransmitters richtet sich nach der Anzahl an VGLUTs pro Vesikel. Hierdurch wird die postsynaptische Reaktion beeinflusst. Die Menge an VGLUT1 (VESICULAR GLUTAMATE TRANSPORTER 1) in der vesikulären Fraktion oszilliert mit einem 24h-Rhythmus in Abhängigkeit von PER2 (Yelamanchili et al., 2006, Darna et al., 2009).

Einem circadianen Rhythmus unterliegt auch die Interaktion von VGLUT1 und Endophilin, einem Membran-Bindungsprotein bei der Clathrin-abhängigen Endozytose synaptischer Membranvesikel (Milosevic et al., 2011, Richter et al., 2018).

Überexpression von GAPVD1 fördert die Retention von GLUCOSE TRANSPORTER TYPE 4 (GLUT4) in Adipozyten, indem es die Fusion GLUT4-enthaltender Vesikel mit der Zytoplasmamembran verhindert (Lodhi et al., 2007). Der insulinresistente GLUT4 spielt in der postprandialen Glucoseverwertung eine wichtige Rolle (Stenbit et al., 1997). GLUT4 wird vor allem in den Muskelzellen und Adipozyten exprimiert, wo er die insulininduzierte Glucoseaufnahme durch Translokation in die Zellmembran ermöglicht (Bryant et al., 2002). Der Glucosestoffwechsel wird in starkem Maße von der circadianen Uhr reguliert (Kalsbeek et al., 2014), und Modulation der GAPVD1-Aktivität durch PER2 könnte eine mechanistische Verbindung zwischen diesen Prozessen sein. Zusammenfassend ist es also denkbar, dass eine rhythmische Steuerung von GAPVD1 durch PER2 zu circadianer Regulation des vesikulären Transports führt und dadurch Prozesse wie Autophagie oder Glucosestoffwechsel steuert.

PER2 und GAPVD1 stehen ebenfalls in Bezug auf das nephrotische Syndrom in Verbindung miteinander. Bei an membranöser Glomerulonephritis Erkrankten ist die Expression des MELATONIN RECEPTOR TYPE 1A (MTNR1A) in renalen Tubulusepithelzellen signifikant herunterreguliert. Der Transkriptionsfaktor PITUITARY HOMEBOX-1 (PITX1) bindet an den Promotor für MTNR1A und fördert dadurch die MTNR1A-Expression. Verminderte Expression von MTNR1A, PITX1 oder dem CYCLIC ADENOSINE MONOPHOSPHATE RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN reguliert die Expression von *Per2* hoch. In beschädigtem Gewebe führt verringerte PITX1-Expression zu niedrigeren Spiegeln von MTNR1A in renalen Tubulusepithelzel-

len. Dies erhöht das Risiko an membranöser Nephropathie zu erkranken, einem häufigen Grund des nephrotischen Syndroms bei Erwachsenen (Huang et al., 2018). Auch eine rezessive Mutation von *Gapvd1* führt zur Ausprägung eines nephrotischen Syndroms, jedoch der hereditären Form. Bei dieser Ursache wird die Podozytenmigrationsrate vermindert (Hermle et al., 2018). PER2 könnte so auch Einfluss auf die Entstehung eines nephrotischen Syndroms über dysfunktionales GAPVD1 besitzen.

Schlussfolgerungen

Die Colokalisation der Proteine PER2 und GAPVD1 wurde durch den PLA bestätigt, damit ist die Protein-Protein-Interaktion beider Proteine wahrscheinlich.

Ausblick

Um eine potentielle rhythmische Aktivierung von GAPVD1 durch PER2 zu überprüfen wäre es sinnvoll bekannte Funktionen von GAPVD1 auf circadiane Aktivität zu testen. Zunächst sollten solche Untersuchungen am Protein GAPVD1 selbst ansetzen. In Frage kommen dessen GAP- und GEF-Aktivitäten, die mithilfe von enzymatischen Assays (z.B. GTPase-Glo™ Assay, (Mondal et al., 2015)) analysiert werden können. Änderungen der subzellulären Lokalisation von GAPVD1 könnten mithilfe von fluoreszenzmarkiertem GAPVD1 und Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. In einem nächsten Schritt könnten zelluläre Prozesse, an denen GAPVD1 beteiligt ist, analysiert werden. Hier kommen insbesondere Clathrin-vermittelte Endozytose, vesikulärer Transport und Autophagie in Betracht. Wird einer dieser Prozesse als rhythmisch identifiziert, beispielsweise in Zellen, deren circadiane Uhr durch Dexamethason synchronisiert wurde (Balsalobre et al., 2000), sollte im nächsten Schritt GAPVD1 herunterreguliert werden. Hängt die Rhythmizität eines Prozesses von GAPVD1 ab, ist es wahrscheinlich, dass die PER2-GAPVD1-Interaktion dabei eine zentrale Rolle spielt.

Da PER2 von CSNK1D phosphoryliert wird (Camacho et al., 2001), GAPVD1 ebenfalls mit CSNK1D interagiert (Kategaya et al., 2012), und GAPVD1, PER2 und CSNK1D in einem Proteinkomplex vorliegen (Aryal et al., 2017), könnte eine Funktion der PER2-GAPVD1-Interaktion sein, GAPVD1 in den PER-Komplex zu rekrutieren, um dessen Phosphorylierung durch CSNK1D zu ermöglichen. Um zu untersuchen, ob GAPVD1 von CSNK1D phosphoryliert wird, könnte die Menge an phosphoryliertem GAPVD1 in

humanen Zellen gemessen werden. Mittels Immunpräzipitation könnte GAPVD1 angereichert werden und anschließend durch Massenspektrometrie potentielle Phosphorylierungsstellen von GAPVD1 bestimmt werden. Anschließend könnte mithilfe von CSNK1D-Inhibitoren untersucht werden, welche Phosphorylierungsstellen von CSNK1D abhängen.

Abschließend stellt sich die Frage welche Rolle die Wechselwirkung zwischen PER2 und GAPVD1 auf die Entstehung von Krankheiten haben könnte. Sollte GAPVD1 über seine Funktion in der Endozytose zu einer circadianen Vesikelbildung beitragen, dann könnte eine Fehlfunktion der circadianen Steuerung von GAPVD1 diese Vesikelbildung beeinflussen. In diesem Zusammenhang sind extrazelluläre Vesikel (EVs), die von fast jeder Zelle – auch von Tumorzellen – gebildet werden, von besonderem Interesse. EVs beinhalten eine große Auswahl an Molekülen wie Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate. EVs transportieren ihre Fracht zwischen benachbarten und auch weiter voneinander entfernten Zellen und dienen so der interzellulären Kommunikation. Zudem scheinen Nukleinsäuren wie *microRNAs* (miRNAs), die von EVs transportiert werden, zu einer zuträglichen Tumorumgebung beizutragen (Tkach and Théry, 2016). Da miRNAs mit Bezug zu EVs gewebespezifisch ausgeprägt sind (Lagos-Quintana et al., 2002) und gleichzeitig in Körperflüssigkeiten vorhanden sind (Weber et al., 2010), haben sie großes Potential für die frühe Krebsdiagnostik, die Prognosestellung und die Kontrolle des Behandlungserfolgs von Nutzen zu sein.

Auch PER2 ist an der Tumorentstehung beteiligt. PER2 besitzt Tumorsuppressoreigenschaften und ist bei verminderter Expression in die Genese onkologischer Erkrankungen involviert (Fu et al., 2002). In Brustkrebszellen, sowie in von chronisch myeloischer Leukämie betroffenen Zellen, wird die Expression von PER2 durch Promotor-methylierung herunterreguliert (Chen et al., 2005, Yang et al., 2006).

Die Proteine PER2 und GAPVD1 sind neben der Tumorentstehung in die Genese weiterer Erkrankungen eingebunden. So wird die *Per2*-Expression bei der membranösen Glomerulonephritis hochreguliert (Huang et al., 2018). Bei der Genese der experimentellen membranösen Glomerulonephritis (Heymann-Nephritis) spielen ebenso Vorgänge in clathrinbeschichteten Vertiefungen der glomerulären Epithelzellen eine Rolle (Kerjaschki et al., 1987). Die Entpackung von *clathrin coated vesicles* wird wiederum durch GAPVD1 gefördert (Semerdjieva et al., 2008).

Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass GAPVD1 in Neuronen von Alzheimerpatienten erhöht exprimiert wird (Scheper et al., 2007). GAPVD1 ist in Transportprozesse durch Vesikelbildung involviert und PER2 ist speziell an dem Glutamatvesikeltransport über den VGLUT1 beteiligt (Stenmark, 2009, Yelamanchili et al., 2006). Da der hippocampale Glutamatspiegel bei Alzheimerpatienten reduziert ist (Rupasingh et al., 2011), könnten die Proteine PER2 und GAPVD1 einen Einfluss auf den Glutamatspiegel im Hippocampus von Alzheimererkrankten haben. Proteine, die mit GLUT4 assoziiert sind, könnten als Ziele neuer Therapieansätze des Diabetes mellitus Typ II dienen (Morgan et al., 2011). So könnte auch eine Phosphorylierung von GAPVD1, einem mit GLUT4 assoziierten Protein (Lodhi et al., 2007), durch PER2 bei circadianer Vesikelbildung neue Erkenntnisse hinsichtlich der Behandlung von Diabetes mellitus Typ II liefern.

6 Literaturverzeichnis

- ALBRECHT, U., SUN, Z. S., EICHELE, G. & LEE, C. C. 1997. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, *mper1* and *mper2*, to light. *Cell*, 91, 1055-1064.
- ALSEMARZ, A. L., P.; FAGOTTO, F. 2018. Limited significance of the in situ proximity ligation assay.
- APPEL, N. M. & ELDE, R. P. 1988. The intermediolateral cell column of the thoracic spinal cord is comprised of target-specific subnuclei: evidence from retrograde transport studies and immunohistochemistry. *J Neurosci*, 8, 1767-75.
- ARYAL, R. P., KWAK, P. B., TAMAYO, A. G., GEBERT, M., CHIU, P. L., WALZ, T. & WEITZ, C. J. 2017. Macromolecular Assemblies of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell*, 67, 770-782 e6.
- ASCHOFF, J., GERECKE, U. & WEVER, R. 1967. Desynchronization of human circadian rhythms. *Jpn J Physiol*, 17, 450-7.
- BADURA, L., SWANSON, T., ADAMOWICZ, W., ADAMS, J., CIANFROGNA, J., FISHER, K., HOLLAND, J., KLEIMAN, R., NELSON, F., REYNOLDS, L., ST GERMAIN, K., SCHAEFFER, E., TATE, B. & SPROUSE, J. 2007. An inhibitor of casein kinase I epsilon induces phase delays in circadian rhythms under free-running and entrained conditions. *J Pharmacol Exp Ther*, 322, 730-8.
- BAGGS, J. E., PRICE, T. S., DITACCHIO, L., PANDA, S., FITZGERALD, G. A. & HOGENESCH, J. B. 2009. Network features of the mammalian circadian clock. *PLoS Biol*, 7, e52.
- BAJAR, B. T., WANG, E. S., ZHANG, S., LIN, M. Z. & CHU, J. 2016. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors (Basel)*, 16.
- BALSALOBRE, A., BROWN, S. A., MARCACCI, L., TRONCHE, F., KELLENDONK, C., REICHARDT, H. M., SCHUTZ, G. & SCHIBLER, U. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289, 2344-7.
- BENLOUCIF, S., BURGESS, H. J., KLERMAN, E. B., LEWY, A. J., MIDDLETON, B., MURPHY, P. J., PARRY, B. L. & REVELL, V. L. 2008. Measuring melatonin in humans. *J Clin Sleep Med*, 4, 66-9.
- BERK, M. L. & FINKELSTEIN, J. A. 1981. An autoradiographic determination of the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. *Brain Res*, 226, 1-13.
- BERSON, D. M., DUNN, F. A. & TAKAO, M. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, 295, 1070-1073.
- BLUME, C., GARBAZZA, C. & SPITSCHAN, M. 2019. Effects of light on human circadian rhythms, sleep and mood. *Somnologie (Berl)*, 23, 147-156.
- BROCHER, J. 2019. Workshop for Editing, Processing and Analysis of Scientific Images. In: BIOVOXXEL (ed.) Skript eines Kurses ed.
- BRYANT, N. J., GOVERS, R. & JAMES, D. E. 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 267-77.
- BUCCI, C., PARTON, R. G., MATHER, I. H., STUNNENBERG, H., SIMONS, K., HOFLACK, B. & ZERIAL, M. 1992. The small GTPase *rab5* functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70, 715-28.
- BUIJS, R. M. & KALSBECK, A. 2001. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci*, 2, 521-6.

- BUIJS, R. M., VAN EDEN, C. G., GONCHARUK, V. D. & KALSBECK, A. 2003. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol*, 177, 17-26.
- CAILOTTO, C., LEI, J., VAN DER VLIET, J., VAN HEIJNINGEN, C., VAN EDEN, C. G., KALSBECK, A., PEVET, P. & BUIJS, R. M. 2009. Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver. *PLoS One*, 4, e5650.
- CAMACHO, F., CILIO, M., GUO, Y., VIRSHUP, D., PATEL, K., KHORKOVA, O., STYREN, S., MORSE, B., YAO, Z. & KEESLER, G. 2001. Human casein kinase I δ phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS letters*, 489, 159-165.
- CARNEY, D. S., DAVIES, B. A. & HORAZDOVSKY, B. F. 2006. Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. *Trends Cell Biol*, 16, 27-35.
- CECHETTO, D. F., STANDAERT, D. G. & SAPER, C. B. 1985. Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 240, 153-60.
- CHEN, S. T., CHOO, K. B., HOU, M. F., YEH, K. T., KUO, S. J. & CHANG, J. G. 2005. Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis*, 26, 1241-6.
- DARNA, M., SCHMUTZ, I., RICHTER, K., YELAMANCHILI, S. V., PENDYALA, G., HOLTJE, M., ALBRECHT, U. & AHNERT-HILGER, G. 2009. Time of day-dependent sorting of the vesicular glutamate transporter to the plasma membrane. *J Biol Chem*, 284, 4300-7.
- DE DUVE, C. 1963. The lysosome. *Scientific American*, 208, 64-73.
- DE LA IGLESIA, H. O., BLAUSTEIN, J. D. & BITTMAN, E. L. 1995. The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH. *Neuroreport*, 6, 1715-22.
- DELPRATO, A., MERITHEW, E. & LAMBRIGHT, D. G. 2004. Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell*, 118, 607-17.
- DEURVEILHER, S. & SEMBA, K. 2003. Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to the median preoptic nucleus in rat. *Brain Res*, 987, 100-6.
- DIBNER, C., SAGE, D., UNSER, M., BAUER, C., D'EYSMOND, T., NAEF, F. & SCHIBLER, U. 2009. Circadian gene expression is resilient to large fluctuations in overall transcription rates. *EMBO J*, 28, 123-34.
- DIBNER, C., SCHIBLER, U. & ALBRECHT, U. 2010. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*, 72, 517-49.
- DUNN, W. A., JR. 1994. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol*, 4, 139-43.
- DWIVEDI, M., SUNG, H., SHEN, H., PARK, B. J. & LEE, S. 2011. Disruption of endocytic pathway regulatory genes activates autophagy in *C. elegans*. *Mol Cells*, 31, 477-81.
- EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, N. & ALLERGIES 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to melatonin and alleviation of subjective feelings of jet lag (ID 1953), and reduction of sleep onset latency, and improvement of sleep quality (ID 1953) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 8, 1467.
- EIDE, E. J., WOOLF, M. F., KANG, H., WOOLF, P., HURST, W., CAMACHO, F., VIELHABER, E. L., GIOVANNI, A. & VIRSHUP, D. M. 2005. Control of

- mammalian circadian rhythm by CKI ϵ -regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Molecular and cellular biology*, 25, 2795-2807.
- EZAKI, J., MATSUMOTO, N., TAKEDA-EZAKI, M., KOMATSU, M., TAKAHASHI, K., HIRAOKA, Y., TAKA, H., FUJIMURA, T., TAKEHANA, K. & YOSHIDA, M. 2011. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy*, 7, 727-736.
- FELDER, R. B. & MIFFLIN, S. W. 1988. Modulation of carotid sinus afferent input to nucleus tractus solitarius by parabrachial nucleus stimulation. *Circ Res*, 63, 35-49.
- FLEUR, L. 1999. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *Journal of neuroendocrinology*, 11, 643-652.
- FLIERS, E., NOPPEN, N. W., WIERSINGA, W. M., VISSER, T. J. & SWAAB, D. F. 1994. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing cells and fibers in the human hypothalamus. *J Comp Neurol*, 350, 311-23.
- FORTUN, J., DUNN, W. A., JR., JOY, S., LI, J. & NOTTERPEK, L. 2003. Emerging role for autophagy in the removal of aggresomes in Schwann cells. *J Neurosci*, 23, 10672-80.
- FREDRIKSSON, S., GULLBERG, M., JARVIUS, J., OLSSON, C., PIETRAS, K., GUSTAFSDOTTIR, S. M., OSTMAN, A. & LANDEGREN, U. 2002. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol*, 20, 473-7.
- FU, L., PELICANO, H., LIU, J., HUANG, P. & LEE, C. 2002. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell*, 111, 41-50.
- GALLEGO, M. & VIRSHUP, D. M. 2007. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 139-48.
- GAMSBY, J. J., TEMPLETON, E. L., BONVINI, L. A., WANG, W., LOROS, J. J., DUNLAP, J. C., GREEN, A. I. & GULICK, D. 2013. The circadian Per1 and Per2 genes influence alcohol intake, reinforcement, and blood alcohol levels. *Behav Brain Res*, 249, 15-21.
- GATFIELD, D. & SCHIBLER, U. 2007. Physiology. Proteasomes keep the circadian clock ticking. *Science*, 316, 1135-6.
- GEKAKIS, N., STAKNIS, D., NGUYEN, H. B., DAVIS, F. C., WILSBACHER, L. D., KING, D. P., TAKAHASHI, J. S. & WEITZ, C. J. 1998. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, 280, 1564-1569.
- GENARIO, R., MORELLO, E., BUENO, A. A. & SANTOS, H. O. 2019. The usefulness of melatonin in the field of obstetrics and gynecology. *Pharmacol Res*, 147, 104337.
- GOLOMBEK, D. A. & ROSENSTEIN, R. E. 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews*, 90, 1063-1102.
- GORVEL, J. P., CHAVRIER, P., ZERIAL, M. & GRUENBERG, J. 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, 64, 915-25.
- GROSSMAN, E., LAUDON, M. & ZISAPEL, N. 2011. Effect of melatonin on nocturnal blood pressure: meta-analysis of randomized controlled trials. *Vasc Health Risk Manag*, 7, 577-84.
- GRUMATI, P., COLETTI, L., SABATELLI, P., CESCONE, M., ANGELIN, A., BERTAGGIA, E., BLAAUW, B., URCIUOLO, A., TIEPOLO, T. & MERLINI, L. 2010. Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nature medicine*, 16, 1313-1320.
- GU, X., XING, L., SHI, G., LIU, Z., WANG, X., QU, Z., WU, X., DONG, Z., GAO, X. & LIU, G. 2012. The circadian mutation PER2 S662G is linked to cell cycle progression and tumorigenesis. *Cell Death & Differentiation*, 19, 397-405.

- GUILLAUMOND, F., DARDENTE, H., GIGUÈRE, V. & CERMAKIAN, N. 2005. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of biological rhythms*, 20, 391-403.
- GULER, A. D., ECKER, J. L., LALL, G. S., HAQ, S., ALTIMUS, C. M., LIAO, H. W., BARNARD, A. R., CAHILL, H., BADEA, T. C., ZHAO, H., HANKINS, M. W., BERSON, D. M., LUCAS, R. J., YAU, K. W. & HATTAR, S. 2008. Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision. *Nature*, 453, 102-5.
- HANNIBAL, J. & FAHRENKRUG, J. 2004. Target areas innervated by PACAP-immunoreactive retinal ganglion cells. *Cell Tissue Res*, 316, 99-113.
- HATORI, M. & PANDA, S. 2010. The emerging roles of melanopsin in behavioral adaptation to light. *Trends Mol Med*, 16, 435-46.
- HATTAR, S., KUMAR, M., PARK, A., TONG, P., TUNG, J., YAU, K. W. & BERSON, D. M. 2006. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol*, 497, 326-49.
- HATTAR, S., LIAO, H. W., TAKAO, M., BERSON, D. M. & YAU, K. W. 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295, 1065-70.
- HAYASHI-NISHINO, M., FUJITA, N., NODA, T., YAMAGUCHI, A., YOSHIMORI, T. & YAMAMOTO, A. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*, 11, 1433-7.
- HEGAZY, M., COHEN-BARAK, E., KOETSIER, J. L., NAJOR, N. A., ARVANITIS, C., SPRECHER, E., GREEN, K. J. & GODSEL, L. M. 2020. Proximity Ligation Assay for Detecting Protein-Protein Interactions and Protein Modifications in Cells and Tissues in Situ. *Current Protocols in Cell Biology*, 89, e115.
- HERMES, M. L., CODERRE, E. M., BUIJS, R. M. & RENAUD, L. P. 1996. GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J Physiol*, 496 (Pt 3), 749-57.
- HERMLE, T., SCHNEIDER, R., SCHAPIRO, D., BRAUN, D. A., VAN DER VEN, A. T., WAREJKO, J. K., DAGA, A., WIDMEIER, E., NAKAYAMA, M., JOBST-SCHWAN, T., MAJMUNDAR, A. J., ASHRAF, S., RAO, J., FINN, L. S., TASIC, V., HERNANDEZ, J. D., BAGGA, A., JALALAH, S. M., EL DESOKY, S., KARI, J. A., LARICCHIA, K. M., LEK, M., REHM, H. L., MACARTHUR, D. G., MANE, S., LIFTON, R. P., SHRIL, S. & HILDEBRANDT, F. 2018. GAPVD1 and ANKFY1 Mutations Implicate RAB5 Regulation in Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 29, 2123-2138.
- HUANG, Y. S., LU, K. C., CHAO, T. K., CHEN, J. S., CHEN, A., GUO, C. Y., HSIEH, H. Y., SHIH, H. M., SYTWU, H. K. & WU, C. C. 2018. Role of melatonin receptor 1A and pituitary homeobox-1 coexpression in protecting tubular epithelial cells in membranous nephropathy. *J Pineal Res*, 65, e12482.
- HUNKER, C. M., GALVIS, A., KRUK, I., GIAMBINI, H., VEISAGA, M. L. & BARBIERI, M. A. 2006. Rab5-activating protein 6, a novel endosomal protein with a role in endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 340, 967-75.
- HUNT, A. E., AL-GHOUL, W. M., GILLETTE, M. U. & DUBOCOVICH, M. L. 2001a. Activation of MT2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 280, C110-C118.
- HUNT, A. E., AL-GHOUL, W. M., GILLETTE, M. U. & DUBOCOVICH, M. L. 2001b. Activation of MT(2) melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C110-8.
- HYNES, N. E. & LANE, H. A. 2005. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5, 341-54.

- IBRAHIM, H., REUS, P., MUNDORF, A. K., GROTHOFF, A.-L., RUDENKO, V., BUSCHHAUS, C., STEFANSKI, A., BERLETH, N., STORK, B., STÜHLER, K., KALFALAH, F. & REINKE, H. 2021. Phosphorylation of GAPVD1 Is Regulated by the PER Complex and Linked to GAPVD1 Degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 3787.
- ISOBE, Y. & NISHINO, H. 1998. AVP rhythm in the suprachiasmatic nucleus in relation to locomotor activity under constant light. *Peptides*, 19, 827-32.
- ISOJIMA, Y., NAKAJIMA, M., UKAI, H., FUJISHIMA, H., YAMADA, R. G., MASUMOTO, K. H., KIUCHI, R., ISHIDA, M., UKAI-TADENUMA, M., MINAMI, Y., KITO, R., NAKAO, K., KISHIMOTO, W., YOO, S. H., SHIMOMURA, K., TAKAO, T., TAKANO, A., KOJIMA, T., NAGAI, K., SAKAKI, Y., TAKAHASHI, J. S. & UEDA, H. R. 2009. CKepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 15744-9.
- JARES-ERIJMAN, E. A. & JOVIN, T. M. 2003. FRET imaging. *Nat Biotechnol*, 21, 1387-95.
- JIN, X., SHEARMAN, L. P., WEAVER, D. R., ZYLKA, M. J., DE VRIES, G. J. & REPPERT, S. M. 1999. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96, 57-68.
- JOHNSON, C. H., ELLIOTT, J. A. & FOSTER, R. 2003. Entrainment of circadian programs. *Chronobiol Int*, 20, 741-74.
- JONES, C. R., CAMPBELL, S. S., ZONE, S. E., COOPER, F., DESANO, A., MURPHY, P. J., JONES, B., CZAJKOWSKI, L. & PTACEK, L. J. 1999. Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med*, 5, 1062-5.
- KALFALAH, F., JANKE, L., SCHIAVI, A., TIGGES, J., IX, A., VENTURA, N., BOEGE, F. & REINKE, H. 2016. Crosstalk of clock gene expression and autophagy in aging. *Aging (Albany NY)*, 8, 1876-1895.
- KALSBECK, A., LA FLEUR, S. & FLIERS, E. 2014. Circadian control of glucose metabolism. *Mol Metab*, 3, 372-83.
- KALSBECK, A., VAN DER VLIET, J. & BUIJS, R. M. 1996. Decrease of endogenous vasopressin release necessary for expression of the circadian rise in plasma corticosterone: a reverse microdialysis study. *J Neuroendocrinol*, 8, 299-307.
- KANIUK, N. A., KIRALY, M., BATES, H., VRANIC, M., VOLCHUK, A. & BRUMELL, J. H. 2007. Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic β -cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy. *Diabetes*, 56, 930-939.
- KATEGAYA, L. S., HILLIARD, A., ZHANG, L., ASARA, J. M., PTACEK, L. J. & FU, Y. H. 2012. Casein kinase 1 proteomics reveal prohibitin 2 function in molecular clock. *PLoS One*, 7, e31987.
- KEESLER, G. A., CAMACHO, F., GUO, Y., VIRSHUP, D., MONDADORI, C. & YAO, Z. 2000. Phosphorylation and destabilization of human period 1 clock protein by human casein kinase I ϵ . *Neuroreport*, 11, 951-955.
- KENNAWAY, D. J. & VOULTSIOS, A. 1998. Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1013-5.
- KERJASCHKI, D., MIETTINEN, A. & FARQUHAR, M. G. 1987. Initial events in the formation of immune deposits in passive Heymann nephritis. gp330-anti-gp330 immune complexes form in epithelial coated pits and rapidly become attached to the glomerular basement membrane. *The Journal of experimental medicine*, 166, 109-128.
- KIM, J., HUANG, W.-P., STROMHAUG, P. E. & KLIONSKY, D. J. 2002. Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a

- perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *Journal of biological chemistry*, 277, 763-773.
- KITANO, M., NAKAYA, M., NAKAMURA, T., NAGATA, S. & MATSUDA, M. 2008. Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature*, 453, 241-5.
- KLAESSON, A., GRANNAS, K., EBAI, T., HELDIN, J., KOOS, B., LEINO, M., RAYKOVA, D., OELRICH, J., ARNGARDEN, L., SODERBERG, O. & LANDEGREN, U. 2018. Improved efficiency of in situ protein analysis by proximity ligation using UnFold probes. *Scientific Reports*, 8.
- KLEIN, D., SMOOT, R., WELLER, J., HIGA, S., MARKEY, S., CREED, G. & JACOBOWITZ, D. 1983a. Lesions of the paraventricular nucleus area of the hypothalamus disrupt the suprachiasmatic→ spinal cord circuit in the melatonin rhythm generating system. *Brain research bulletin*, 10, 647-652.
- KLEIN, D. C. 2007. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem*, 282, 4233-7.
- KLEIN, D. C., COON, S. L., ROSEBOOM, P. H., WELLER, J. L., BERNARD, M., GASTEL, J. A., ZATZ, M., IUVONE, P. M., RODRIGUEZ, I. R., BEGAY, V., FALCON, J., CAHILL, G. M., CASSONE, V. M. & BALER, R. 1997. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Prog Horm Res*, 52, 307-57; discussion 357-8.
- KLEIN, D. C., SUGDEN, D. & WELLER, J. L. 1983b. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 599-603.
- KOBBERLING, J. & ZUR MUHLEN, A. V. 1974. The circadian rhythm of free cortisol determined by urine sampling at two-hour intervals in normal subjects and in patients with severe obesity or Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 38, 313-9.
- KOMATSU, M., WAGURI, S., CHIBA, T., MURATA, S., IWATA, J.-I., TANIDA, I., UENO, T., KOIKE, M., UCHIYAMA, Y. & KOMINAMI, E. 2006. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 441, 880-884.
- KROEMER, G., MARIÑO, G. & LEVINE, B. 2010. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, 40, 280-293.
- KUME, K., ZYLKA, M. J., SRIRAM, S., SHEARMAN, L. P., WEAVER, D. R., JIN, X., MAYWOOD, E. S., HASTINGS, M. H. & REPPERT, S. M. 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98, 193-205.
- KURRECK, J. 2009. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 1378-98.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227, 680-685.
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., YALCIN, A., MEYER, J., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 12, 735-9.
- LAMIA, K. A., SACHDEVA, U. M., DITACCHIO, L., WILLIAMS, E. C., ALVAREZ, J. G., EGAN, D. F., VASQUEZ, D. S., JUGUILON, H., PANDA, S., SHAW, R. J., THOMPSON, C. B. & EVANS, R. M. 2009. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*, 326, 437-40.
- LEE, Y., JANG, A. R., FRANCEY, L. J., SEHGAL, A. & HOGENESCH, J. B. 2015. KPNB1 mediates PER/CRY nuclear translocation and circadian clock function. *Elife*, 4.

- LEWY, A. J. 2003. Clinical applications of melatonin in circadian disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, 5, 399-413.
- LEWY, A. J., EMENS, J., SACK, R. L., HASLER, B. P. & BERNERT, R. A. 2003. Zeitgeber hierarchy in humans: resetting the circadian phase positions of blind people using melatonin. *Chronobiol Int*, 20, 837-52.
- LIANG, X. H., JACKSON, S., SEAMAN, M., BROWN, K., KEMPKES, B., HIBSHOOSH, H. & LEVINE, B. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402, 672-676.
- LIN, C.-W., ZHANG, H., LI, M., XIONG, X., CHEN, X., CHEN, X., DONG, X. C. & YIN, X.-M. 2013. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice. *Journal of hepatology*, 58, 993-999.
- LIU, Y., MERROW, M., LOROS, J. J. & DUNLAP, J. C. 1998. How Temperature Changes Reset a Circadian Oscillator. *Science*, 281, 825-829.
- LOCKLEY, S. W., DRESSMAN, M. A., LICAMELE, L., XIAO, C., FISHER, D. M., FLYNN-EVANS, E. E., HULL, J. T., TORRES, R., LAVEDAN, C. & POLYMERPOULOS, M. H. 2015. Tasimelteon for non-24-hour sleep-wake disorder in totally blind people (SET and RESET): two multicentre, randomised, double-masked, placebo-controlled phase 3 trials. *The Lancet*, 386, 1754-1764.
- LODHI, I. J., CHIANG, S. H., CHANG, L., VOLLENWEIDER, D., WATSON, R. T., INOUE, M., PESSIN, J. E. & SALTIEL, A. R. 2007. Gapex-5, a Rab31 guanine nucleotide exchange factor that regulates Glut4 trafficking in adipocytes. *Cell Metab*, 5, 59-72.
- LU, J., ZHANG, Y. H., CHOU, T. C., GAUS, S. E., ELMQUIST, J. K., SHIROMANI, P. & SAPER, C. B. 2001. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J Neurosci*, 21, 4864-74.
- LUM, J. J., BAUER, D. E., KONG, M., HARRIS, M. H., LI, C., LINDSTEN, T. & THOMPSON, C. B. 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120, 237-48.
- MACCARRONE, G., BONFIGLIO, J. J., SILBERSTEIN, S., TURCK, C. W. & MARTINS-DE-SOUZA, D. 2017. Characterization of a Protein Interactome by Co-Immunoprecipitation and Shotgun Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol*, 1546, 223-234.
- MALO, N., HANLEY, J. A., CERQUOZZI, S., PELLETIER, J. & NADON, R. 2006. Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nat Biotechnol*, 24, 167-75.
- MARCHEVA, B., RAMSEY, K. M., BUHR, E. D., KOBAYASHI, Y., SU, H., KO, C. H., IVANOVA, G., OMURA, C., MO, S., VITATERNA, M. H., LOPEZ, J. P., PHILIPSON, L. H., BRADFIELD, C. A., CROSBY, S. D., JEBAILY, L., WANG, X., TAKAHASHI, J. S. & BASS, J. 2010. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, 466, 627-31.
- MAZUR, P. 1970. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, 168, 939-49.
- MENG, Q.-J., MAYWOOD, E. S., BECHTOLD, D. A., LU, W.-Q., LI, J., GIBBS, J. E., DUPRÉ, S. M., CHESHAM, J. E., RAJAMOHAN, F. & KNAFELS, J. 2010. Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase 1 (CK1) enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 15240-15245.
- MENZIES, F. M., FLEMING, A. & RUBINSZTEIN, D. C. 2015. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 16, 345-57.

- MIEDA, M., WILLIAMS, S. C., RICHARDSON, J. A., TANAKA, K. & YANAGISAWA, M. 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 12150-12155.
- MILLAR-CRAIG, M., BISHOP, C. & RAFTERY, E. 1978. Circadian variation of blood-pressure. *The Lancet*, 311, 795-797.
- MILLER, B. H., OLSON, S. L., TUREK, F. W., LEVINE, J. E., HORTON, T. H. & TAKAHASHI, J. S. 2004. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol*, 14, 1367-73.
- MILOSEVIC, I., GIOVEDI, S., LOU, X. L., RAIMONDI, A., COLLES, C., SHEN, H. Y., PARADISE, S., O'TOOLE, E., FERGUSON, S., CREMONA, O. & DE CAMILLI, P. 2011. Recruitment of Endophilin to Clathrin-Coated Pit Necks Is Required for Efficient Vesicle Uncoating after Fission. *Neuron*, 72, 587-601.
- MIZUSHIMA, N. 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 21, 2861-73.
- MIZUSHIMA, N., YAMAMOTO, A., MATSUI, M., YOSHIMORI, T. & OHSUMI, Y. 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell*, 15, 1101-1111.
- MOCANU, M. M., VARADI, T., SZOLLOSI, J. & NAGY, P. 2011. Comparative analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay (PLA). *Proteomics*, 11, 2063-70.
- MONDAL, S., HSIAO, K. & GOUELI, S. A. 2015. A Homogenous Bioluminescent System for Measuring GTPase, GTPase Activating Protein, and Guanine Nucleotide Exchange Factor Activities. *Assay Drug Dev Technol*, 13, 444-55.
- MOORE, R. Y. 1996. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res*, 73, 125-30.
- MORGAN, B. J., CHAI, S. Y. & ALBISTON, A. L. 2011. GLUT4 associated proteins as therapeutic targets for diabetes. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 5, 25-32.
- NAGOSHI, E., SAINI, C., BAUER, C., LAROCHE, T., NAEF, F. & SCHIBLER, U. 2004. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*, 119, 693-705.
- OKAWA, M. & UCHIYAMA, M. 2007. Circadian rhythm sleep disorders: characteristics and entrainment pathology in delayed sleep phase and non-24-h sleep-wake syndrome. *Sleep Med Rev*, 11, 485-96.
- ONO, T., NISHINO, H., SASAKA, K., MURAMOTO, K., YANO, I. & SIMPSON, A. 1978. Paraventricular nucleus connections to spinal cord and pituitary. *Neurosci Lett*, 10, 141-6.
- PAPANDREOU, M. E. & TAVERNARAKIS, N. 2020. Crosstalk between Endo/Exocytosis and Autophagy in Health and Disease. *Biotechnol J*, e1900267.
- PARTCH, C. L., GREEN, C. B. & TAKAHASHI, J. S. 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol*, 24, 90-9.
- PITTENDRIGH, C. S. 1954. On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40, 1018-29.
- PREITNER, N., DAMIOLA, F., ZAKANY, J., DUBOULE, D., ALBRECHT, U. & SCHIBLER, U. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110, 251-260.
- PROVENCIO, I., RODRIGUEZ, I. R., JIANG, G., HAYES, W. P., MOREIRA, E. F. & ROLLAG, M. D. 2000. A novel human opsin in the inner retina. *J Neurosci*, 20, 600-5.

- QIN, X., MORI, T., ZHANG, Y. & JOHNSON, C. H. 2015. PER2 Differentially Regulates Clock Phosphorylation versus Transcription by Reciprocal Switching of CK1epsilon Activity. *J Biol Rhythms*, 30, 206-16.
- RAADSHEER, F., SLUITER, A., RAVID, R., TILDERS, F. & SWAAB, D. 1993. Localization of corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus; age-dependent colocalization with vasopressin. *Brain research*, 615, 50-62.
- REFINETTI, R. & MENAKER, M. 1992. The circadian rhythm of body temperature. *Physiology & behavior*, 51, 613-637.
- REINKE, H. & ASHER, G. 2016. Circadian Clock Control of Liver Metabolic Functions. *Gastroenterology*, 150, 574-80.
- REINKE, H. & ASHER, G. 2019. Crosstalk between metabolism and circadian clocks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20, 227-241.
- RICHTER, K., SCHMUTZ, I., DARNA, M., ZANDER, J. F., CHAVAN, R., ALBRECHT, U. & AHNERT-HILGER, G. 2018. VGLUT1 Binding to Endophilin or Intersectin1 and Dynamin Phosphorylation in a Diurnal Context. *Neuroscience*, 371, 29-37.
- RUPSINGH, R., BORRIE, M., SMITH, M., WELLS, J. L. & BARTHA, R. 2011. Reduced hippocampal glutamate in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 32, 802-10.
- SAPER, C. B. & LOEWY, A. D. 1980. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res*, 197, 291-317.
- SATO, M., SATO, K., FONAREV, P., HUANG, C. J., LIOU, W. & GRANT, B. D. 2005. Caenorhabditis elegans RME-6 is a novel regulator of RAB-5 at the clathrin-coated pit. *Nat Cell Biol*, 7, 559-69.
- SATO, T. K., PANDA, S., MIRAGLIA, L. J., REYES, T. M., RUDIC, R. D., MCNAMARA, P., NAIK, K. A., FITZGERALD, G. A., KAY, S. A. & HOGENESCH, J. B. 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43, 527-537.
- SCHEPER, W., HOOZEMANS, J., HOOGENRAAD, C., ROZEMULLER, A., EIKELENBOOM, P. & BAAS, F. 2007. Rab6 is increased in Alzheimer's disease brain and correlates with endoplasmic reticulum stress. *Neuropathology and applied neurobiology*, 33, 523-532.
- SEMERDJIEVA, S., SHORTT, B., MAXWELL, E., SINGH, S., FONAREV, P., HANSEN, J., SCHIAVO, G., GRANT, B. D. & SMYTHE, E. 2008. Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *The Journal of cell biology*, 183, 499-511.
- SHEARMAN, L. P., JIN, X., LEE, C., REPPERT, S. M. & WEAVER, D. R. 2000a. Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol*, 20, 6269-75.
- SHEARMAN, L. P., SRIRAM, S., WEAVER, D. R., MAYWOOD, E. S., CHAVES, I., ZHENG, B., KUME, K., LEE, C. C., VAN DER HORST, G. T., HASTINGS, M. H. & REPPERT, S. M. 2000b. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288, 1013-9.
- SHUGHRUE, P. J., LANE, M. V. & MERCHENTHALER, I. 1997. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study. *Endocrinology*, 138, 5476-84.
- SMYLLIE, N. J., PILORZ, V., BOYD, J., MENG, Q. J., SAER, B., CHESHAM, J. E., MAYWOOD, E. S., KROGAGER, T. P., SPILLER, D. G., BOOT-HANDFORD, R., WHITE, M. R., HASTINGS, M. H. & LOUDON, A. S. 2016. Visualizing and Quantifying Intracellular Behavior and Abundance of the Core Circadian Clock Protein PERIOD2. *Curr Biol*, 26, 1880-6.

- SODERBERG, O., GULLBERG, M., JARVIUS, M., RIDDERSTRALE, K., LEUCHOWIUS, K. J., JARVIUS, J., WESTER, K., HYDBRING, P., BAHRAM, F., LARSSON, L. G. & LANDEGREN, U. 2006. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods*, 3, 995-1000.
- SODERBERG, O., LEUCHOWIUS, K. J., GULLBERG, M., JARVIUS, M., WEIBRECHT, I., LARSSON, L. G. & LANDEGREN, U. 2008. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods*, 45, 227-232.
- STENBIT, A. E., TSAO, T. S., LI, J., BURCELIN, R., GEENEN, D. L., FACTOR, S. M., HOUSEKNECHT, K., KATZ, E. B. & CHARRON, M. J. 1997. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med*, 3, 1096-101.
- STENMARK, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10, 513-525.
- SUZUKI, K., KIRISAKO, T., KAMADA, Y., MIZUSHIMA, N., NODA, T. & OHSUMI, Y. 2001. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO journal*, 20, 5971-5981.
- SWANSON, L. W. & SAWCHENKO, P. E. 1980. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*, 31, 410-7.
- TAKAHASHI, J. S. 2017. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics*, 18, 164.
- TAKUMI, T., TAGUCHI, K., MIYAKE, S., SAKAKIDA, Y., TAKASHIMA, N., MATSUBARA, C., MAEBAYASHI, Y., OKUMURA, K., TAKEKIDA, S. & YAMAMOTO, S. 1998. A light-independent oscillatory gene mPer3 in mouse SCN and OVLT. *The EMBO journal*, 17, 4753-4759.
- TER HORST, G. & LUITEN, P. 1987. Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin tracing of intrahypothalamic connections of the lateral, ventromedial, dorsomedial and paraventricular hypothalamic nuclei in the rat. *Brain research bulletin*, 18, 191-203.
- TKACH, M. & THÉRY, C. 2016. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell*, 164, 1226-1232.
- TOH, K. L., JONES, C. R., HE, Y., EIDE, E. J., HINZ, W. A., VIRSHUP, D. M., PTÁČEK, L. J. & FU, Y.-H. 2001. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291, 1040-1043.
- TONSFELDT, K. J. & CHAPPELL, P. E. 2012. Clocks on top: the role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Mol Cell Endocrinol*, 349, 3-12.
- TOUSSON, E. & MEISSEL, H. 2004. Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci*, 24, 2983-8.
- TRAVAGLI, R. A., GILLIS, R. A. & VICINI, S. 1992. Effects of thyrotropin-releasing hormone on neurons in rat dorsal motor nucleus of the vagus, in vitro. *Am J Physiol*, 263, G508-17.
- UEDA, H. R., CHEN, W., ADACHI, A., WAKAMATSU, H., HAYASHI, S., TAKASUGI, T., NAGANO, M., NAKAHAMA, K.-I., SUZUKI, Y. & SUGANO, S. 2002. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 418, 534-539.
- UTIGER, R. D. 1992. Melatonin--the hormone of darkness. *N Engl J Med*, 327, 1377-9.

- VAN DER VAART, A. & REGGIORI, F. 2010. The Golgi complex as a source for yeast autophagosomal membranes. *Autophagy*, 6, 800-801.
- VAN DER ZEE, E. A., ROMAN, V., TEN BRINKE, O. & MEERLO, P. 2005. TGF α and AVP in the mouse suprachiasmatic nucleus: anatomical relationship and daily profiles. *Brain Res*, 1054, 159-66.
- VASSAR, R. & FUCHS, E. 1991. Transgenic mice provide new insights into the role of TGF- α during epidermal development and differentiation. *Genes Dev*, 5, 714-27.
- VISWAMBHARAN, H., CARVAS, J. M., ANTIC, V., MARECIC, A., JUD, C., ZAUGG, C. E., MING, X. F., MONTANI, J. P., ALBRECHT, U. & YANG, Z. 2007. Mutation of the circadian clock gene *Per2* alters vascular endothelial function. *Circulation*, 115, 2188-95.
- VRANG, N., LARSEN, P. J. & MIKKELSEN, J. D. 1995. Direct projection from the suprachiasmatic nucleus to hypophysiotrophic corticotropin-releasing factor immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of the hypothalamus demonstrated by means of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tract tracing. *Brain Res*, 684, 61-9.
- WALKER, M. T., BROWN, R. L., CRONIN, T. W. & ROBINSON, P. R. 2008. Photochemistry of retinal chromophore in mouse melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 8861-5.
- WATTS, A. G., SWANSON, L. W. & SANCHEZ-WATTS, G. 1987. Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol*, 258, 204-29.
- WEAVER, D. R., RIVKEES, S. A. & REPERT, S. M. 1989. Localization and characterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *Journal of Neuroscience*, 9, 2581-2590.
- WEBER, J. A., BAXTER, D. H., ZHANG, S., HUANG, D. Y., HUANG, K. H., LEE, M. J., GALAS, D. J. & WANG, K. 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56, 1733-41.
- WEISSBACH, H., REDFIELD, B. G. & AXELROD, J. 1960. Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim Biophys Acta*, 43, 352-3.
- WHITE, J., JOHANNES, L., MALLARD, F., GIROD, A., GRILL, S., REINSCH, S., KELLER, P., TZSCHASCHEL, B., ECHARD, A., GOUD, B. & STELZER, E. H. 1999. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol*, 147, 743-60.
- WURTMAN, R. J., AXELROD, J., SEDVALL, G. & MOORE, R. Y. 1967. Photic and neural control of the 24-hour norepinephrine rhythm in the rat pineal gland. *J Pharmacol Exp Ther*, 157, 487-92.
- XU, Y., PADIATH, Q. S., SHAPIRO, R. E., JONES, C. R., WU, S. C., SAIGOH, N., SAIGOH, K., PTÁČEK, L. J. & FU, Y.-H. 2005. Functional consequences of a CK1 δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, 434, 640-644.
- YANG, M. Y., CHANG, J. G., LIN, P. M., TANG, K. P., CHEN, Y. H., LIN, H. Y. H., LIU, T. C., HSIAO, H. H., LIU, Y. C. & LIN, S. F. 2006. Downregulation of circadian clock genes in chronic myeloid leukemia: alternative methylation pattern of hPER3. *Cancer science*, 97, 1298-1307.
- YE, R., SELBY, C. P., CHIOU, Y.-Y., OZKAN-DAGLIYAN, I., GADDAMEEDHI, S. & SANCAR, A. 2014. Dual modes of CLOCK: BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes & development*, 28, 1989-1998.

- YELAMANCHILI, S. V., PENDYALA, G., BRUNK, I., DARNA, M., ALBRECHT, U. & AHNERT-HILGER, G. 2006. Differential sorting of the vesicular glutamate transporter 1 into a defined vesicular pool is regulated by light signaling involving the clock gene *Period2*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 15671-15679.
- ZATLOUKAL, B., KUFFERATH, I., THUERINGER, A., LANDEGREN, U., ZATLOUKAL, K. & HAYBAECK, J. 2014. Sensitivity and specificity of in situ proximity ligation for protein interaction analysis in a model of steatohepatitis with Mallory-Denk bodies. *PLoS One*, 9, e96690.
- ZEHRING, W. A., WHEELER, D. A., REDDY, P., KONOPKA, R. J., KYRIACOU, C. P., ROSBASH, M. & HALL, J. C. 1984. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 39, 369-76.
- ZHANG, C., TRUONG, K. K. & ZHOU, Q. Y. 2009. Efferent projections of prokineticin 2 expressing neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus. *PLoS One*, 4, e7151.
- ZHANG, H., DENG, T., LIU, R., BAI, M., ZHOU, L., WANG, X., LI, S., WANG, X., YANG, H., LI, J., NING, T., HUANG, D., LI, H., ZHANG, L., YING, G. & BA, Y. 2017. Exosome-delivered EGFR regulates liver microenvironment to promote gastric cancer liver metastasis. *Nat Commun*, 8, 15016.
- ZHENG, B., ALBRECHT, U., KAASIK, K., SAGE, M., LU, W., VAISHNAV, S., LI, Q., SUN, Z. S., EICHELE, G. & BRADLEY, A. 2001. Nonredundant roles of the *mPer1* and *mPer2* genes in the mammalian circadian clock. *Cell*, 105, 683-694.

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Fritz Boege, welcher mir die Gelegenheit gegeben hat, diese Dissertation in seinem Institut durchzuführen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Hans für die Übernahme des Referats und seine Funktion als zuverlässiger und hilfsbereiter Ansprechpartner an der Universität.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich mich zudem bei Herrn Professor Björn Stork herzlich bedanken.

Bedanken möchte ich mich des Weiteren bei Frau Privatdozentin Doreen Floß für Ihre Teilnahme an der Prüfungskommission meiner Disputation.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Faiza bedanken, welche mir stets mit Rat zur Seite stand und wertvolle Ratschläge erteilte.

Großer Dank gilt dem gesamten Team der Forschungsabteilung des Zentrallabors, welchem ich eine spannende und freudige Forschungszeit verdanke.

Danke Christian, Hussam, Stefan, Anna-Lena, Birgit, Eleonora, Elke, Eva, Gabi und Laura für eure wertvolle Unterstützung.

Herzlichster Dank gilt meiner Mutter Angelika und meinem Bruder Johannes, welche mich stets dabei unterstützt haben diese Arbeit zu verwirklichen.