

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

# Charakterisierung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 in der circadianen Uhr

Dissertation

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

vorgelegt von  
Anna-Lena Grothoff

2023

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 Oma Friede, die sich immer einen „Doktor“ in der Familie gewünscht hat,  
diesen Meilenstein aber nicht mehr miterleben kann.

Allen, die mich auf verschiedenen Wegen unterstützt, motiviert und mitgefiebert  
haben, aber auch mit mir verzweifelt sind.

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., 2021, Phosphorylation of GAPVD1 Is Regulated by the PER Complex and Linked to GAPVD1 Degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, (22), 3787

# Zusammenfassung

Alle Säugetiere besitzen circadiane Uhren, die als integrale zelluläre Bestandteile ihre Rhythmik autonom aufrechterhalten und hierarchisch organisiert sind. Die zentrale Uhr im *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) des *Hypothalamus* wird durch Licht über den *retinohypothalamischen* Trakt mit der Umwelt synchronisiert. Periphere Uhren in Organen wiederum werden durch den SCN mithilfe neuronaler Verbindungen und Hormonsekretion gestellt. Circadianen Uhren als Element fast jeder ausdifferenzierten Körperzelle liegt ein molekularer Mechanismus zugrunde, der sogenannte molekulare Oszillator. Uhrenproteine steuern dabei ihre eigene rhythmische Genexpression durch negative Rückkopplungsschleifen. Die Aktivatorproteine CLOCK und BMAL1 treiben in der zentralen negativen Rückkopplungsschleife die Expression von Period- und Cryptochrome-Repressorgen an.

In Vorarbeiten des gastgebenden Labors wurde das Uhrengen *Per2* als circadianer Regulator der Autophagie identifiziert. Eine biochemische Reinigung PER2-enthaltender Proteinkomplexe zeigte, dass PER2 mit GAPVD1, einem Regulator kleiner G-Proteine, co-immunopräzipitiert. GAPVD1 wurde darüber hinaus von anderen Arbeitsgruppen in einem Proteinkomplex mit der Caseinkinase CSNK1D gefunden, die ebenfalls mit PER2 interagiert. Die Interaktion von PER2, CSNK1D und GAPVD1 könnte daher eine zentrale Rolle bei der circadianen Regulation der Autophagie spielen. Das Ziel dieser Arbeit war der Nachweis der Protein-Protein-Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 sowie deren intrazellulärer Lokalisation.

Hierzu wurde der *Proximity Ligation Assay* (PLA) verwendet, bei dem durch extrem enge (<40nm) Colokalisation zweier Proteine mikroskopisch detektierbare Signale entstehen. Um im PLA aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten wurden verschiedene Antikörper gegen CSNK1D und GAPVD1 zunächst mittels Immunofluoreszenz hinsichtlich ihrer Antigenaffinität geprüft und deren Spezifität durch siRNA-*Knockdown* und *Western Blot* bestätigt.

Durch PLA konnte die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 bestätigt werden, die mehrheitlich im Zytoplasma stattfand, während im Zellkern und dessen Peripherie so gut wie keine PLA-Signale auftraten. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 mithilfe einer von der Co-Immunopräzipitation unabhängigen Methode nachgewiesen werden kann, und dass sie sich hauptsächlich im Zytoplasma abspielt.

## Summary

All mammals have circadian clocks, which are integral cellular components that display autonomous rhythmicity and are organized hierarchically. The central clock in the nucleus suprachiasmaticus (SCN) of the hypothalamus is synchronized with the environment by light via the retinohypothalamic tract. Peripheral organ clocks, on the other hand, are set by the SCN via neuronal connections and hormone secretion. The circadian clock as an element of most differentiated body cells is based on a molecular mechanism, called a molecular oscillator. Clock proteins regulate their own rhythmic gene expression through negative feedback loops. The activator proteins CLOCK and BMAL1 drive the expression of *Per*- and *Cry*- repressor genes in the central negative feedback loop.

Previous work of the hosting laboratory identified the clock gene *Per2* as a circadian regulator of autophagy. Biochemical purification of PER2-containing protein complexes showed that PER2 co-immunoprecipitates with GAPVD1, a regulator of small G-proteins. GAPVD1 was shown additionally by other research groups to be in a protein complex with casein kinase CSNK1D, which also interacts with PER2. The interaction of PER2, CSNK1D and GAPVD1 could therefore play a central role in the circadian regulation of autophagy. The goal of this work was to demonstrate the protein-protein interaction of CSNK1D and GAPVD1 and their intracellular localization.

For this purpose, the Proximity Ligation Assay (PLA) was employed, in which extremely close (<40nm) colocalization of two proteins results in microscopically detectable signals. In order to obtain meaningful results with the PLA, various antibodies against CSNK1D and GAPVD1 were first tested for their antigen affinity by immunofluorescence and their specificity was verified by siRNA knockdown and Western blot.

PLA confirmed the interaction of CSNK1D and GAPVD1, which occurred mostly in the cytoplasm, whereas nearly no PLA signals occurred in the nucleus and its periphery. In summary, these results show that the interaction of CSNK1D and GAPVD1 can be demonstrated with a method different from co-immunoprecipitation and that it takes place mainly in the cytoplasm.

# Abkürzungsverzeichnis

|                        |                                                    |
|------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Abb.</b>            | Abbildung                                          |
| <b>AGO2</b>            | <i>Argonaute 2</i>                                 |
| <b>ANKFY1</b>          | <i>Ankyrin Repeat and FYVE Domain Containing 1</i> |
| <b>Anti-CSNK1D</b>     | Antikörper gegen CSNK1D                            |
| <b>anti-CSNK1D (K)</b> | Antikörper gegen CSNK1D, Kaninchen                 |
| <b>anti-CSNK1D (M)</b> | Antikörper gegen CSNK1D, Maus                      |
| <b>anti-GAPVD1(K)</b>  | Antikörper gegen GAPVD1, Kaninchen                 |
| <b>anti-GFP</b>        | Antikörper gegen GFP                               |
| <b>anti-PER2</b>       | Antikörper gegen PER2                              |
| <b>APS</b>             | Ammoniumperoxodisulfat                             |
| <b>BMAL1</b>           | <i>Brain and muscle arnt-like 1</i>                |
| <b>BSA</b>             | bovines Serumalbumin                               |
| <b>b-TrCP</b>          | <i>beta-transducin repeat-containing protein</i>   |
| <b>CANX</b>            | <i>Calnexin</i>                                    |
| <b>CK1</b>             | <i>Casein Kinase 1</i>                             |
| <b>CLOCK</b>           | <i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>     |
| <b>cm</b>              | Zentimeter                                         |
| <b>cm<sup>2</sup></b>  | Quadratzentimeter                                  |
| <b>CO<sub>2</sub></b>  | Kohlendioxid                                       |
| <b>Co-IP</b>           | Co-Immunopräzipitation                             |
| <b>CRY</b>             | <i>Cryptochrome</i>                                |
| <b>CRY1</b>            | <i>Cryptochrome 1</i>                              |
| <b>CRY2</b>            | <i>Cryptochrome 2</i>                              |
| <b>CSNK1</b>           | <i>Casein Kinase 1</i>                             |

|                       |                                                                           |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>CSNK1D</b>         | <i>Casein Kinase 1 Delta</i>                                              |
| <b>CSNK1E</b>         | <i>Casein Kinase 1 Epsilon</i>                                            |
| <b>Cy3</b>            | <i>Cyanine-3</i>                                                          |
| <b>DAPI</b>           | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                                               |
| <b>dH2O</b>           | destilliertes Wasser                                                      |
| <b>DMEM</b>           | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>                                 |
| <b>DMSO</b>           | Dimethylsulfoxid                                                          |
| <b>DNS</b>            | Desoxyribonukleinsäure                                                    |
| <b>DSMZ</b>           | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen<br>und Zellkulturen                 |
| <b>dsRNA</b>          | doppelsträngige <i>RNA</i>                                                |
| <b>DTT</b>            | Dithiothreitol                                                            |
| <b>EDTA</b>           | Ethylendiamintetraessigsäure                                              |
| <b>FASP</b>           | <i>Familial advanced sleep-phase</i>                                      |
| <b>FASPS</b>          | <i>Familial advanced sleep-phase syndrome</i>                             |
| <b>FCS</b>            | fetales Kälberserum                                                       |
| <b>FRET</b>           | Förster-Resonanzenergietransfer                                           |
| <b>g</b>              | Gramm                                                                     |
| <b>GAPVD1</b>         | <i>GTPase-activating protein and VPS9 domain<br/>containing protein 1</i> |
| <b>GFP</b>            | <i>green fluorescent protein</i>                                          |
| <b>GLUT4</b>          | Glucose Transporter Typ 4                                                 |
| <b>GSK3B</b>          | Glycogen Synthase Kinase 3 Beta                                           |
| <b>h</b>              | Stunde                                                                    |
| <b>H<sub>2</sub>O</b> | Wasser                                                                    |
| <b>HCl</b>            | Salzsäure                                                                 |
| <b>IFN-β</b>          | Interferon beta                                                           |

|                                                      |                                                                 |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>IgG</b>                                           | <i>Immunglobulin G</i>                                          |
| <b>ipRGCs</b>                                        | intrinsisch      photosensitive      retinale<br>Ganglionzellen |
| <b>K</b>                                             | Kaninchen                                                       |
| <b>Kap.</b>                                          | Kapitel                                                         |
| <b>KCl</b>                                           | Kaliumchlorid                                                   |
| <b>kDa</b>                                           | Kilodalton                                                      |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>                  | Kaliumdihydrogenphosphat                                        |
| <b>L</b>                                             | Liter                                                           |
| <b>M</b>                                             | Maus                                                            |
| <b>MDM2</b>                                          | <i>Murine double minute 2</i>                                   |
| <b>mM</b>                                            | Millimol                                                        |
| <b>min</b>                                           | Minute                                                          |
| <b>mA</b>                                            | Milliampere                                                     |
| <b>mg</b>                                            | Milligramm                                                      |
| <b>mL</b>                                            | Milliliter                                                      |
| <b>mm</b>                                            | Millimeter                                                      |
| <b>mRNA</b>                                          | <i>messenger RNA</i>                                            |
| <b>mV</b>                                            | Millivolt                                                       |
| <b>N</b>                                             | unabhängige Wiederholungen                                      |
| <b>n</b>                                             | Stichprobengröße                                                |
| <b>NaCl</b>                                          | Natriumchlorid                                                  |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O</b> | Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat                              |
| <b>nm</b>                                            | Nanometer                                                       |
| <b>nmol</b>                                          | Nanomol                                                         |
| <b>p</b>                                             | p-Wert                                                          |
| <b>PBS</b>                                           | Phosphat-gepufferte Salzlösung                                  |

|                                         |                                                                                 |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PBS-T</b>                            | Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween20                                      |
| <b>PER</b>                              | <i>Period</i>                                                                   |
| <b>PER1</b>                             | <i>Period1</i>                                                                  |
| <b>PER2</b>                             | <i>Period2</i>                                                                  |
| <b>PER3</b>                             | <i>Period3</i>                                                                  |
| <b>PFA</b>                              | Paraformaldehyd                                                                 |
| <b>PGC-1<math>\alpha</math></b>         | <i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor<br/>gamma Coactivator 1-alpha</i> |
| <b>pH</b>                               | pH-Wert                                                                         |
| <b>PLA</b>                              | <i>Proximity Ligation Assay</i>                                                 |
| <b>PS1</b>                              | Presenilin 1                                                                    |
| <b>PVDF</b>                             | Polyvinylidenfluorid                                                            |
| <b>RAB5</b>                             | <i>Ras-related protein in brain 5</i>                                           |
| <b>RCA</b>                              | <i>Rolling-Circle Amplification</i>                                             |
| <b>REV-ERB<math>\alpha</math>/NR1D1</b> | <i>Nuclear receptor subfamily 1 group D<br/>member 1</i>                        |
| <b>RHT</b>                              | <i>retinohypothalamischer Trakt</i>                                             |
| <b>RISC</b>                             | <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>                                            |
| <b>RNA</b>                              | Ribonukleinsäure                                                                |
| <b>RNAi</b>                             | RNA-Interferenz                                                                 |
| <b>ROI</b>                              | <i>Region of Interest</i>                                                       |
| <b>ROR</b>                              | <i>RAR-related orphan receptors</i>                                             |
| <b>rpm</b>                              | <i>round per minute</i>                                                         |
| <b>RT</b>                               | Raumtemperatur                                                                  |
| <b>SCN</b>                              | <i>Nucleus suprachiasmaticus</i>                                                |
| <b>SDS</b>                              | Natriumdodecylsulfat                                                            |
| <b>SDS-PAGE</b>                         | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                             |

|                 |                                        |
|-----------------|----------------------------------------|
| <b>s</b>        | Sekunde                                |
| <b>SEM</b>      | Standardfehler                         |
| <b>siCSNK1D</b> | siRNA gegen CSNK1D                     |
| <b>siGAPVD1</b> | siRNA gegen GAPVD1                     |
| <b>siNT</b>     | <i>non-targeting siRNA</i>             |
| <b>siRNA</b>    | <i>small interfering RNA</i>           |
| <b>SJL</b>      | <i>Social Jetlag</i>                   |
| <b>SNP</b>      | <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> |
| <b>TBS-T</b>    | Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 |
| <b>TEMED</b>    | Tetramethylethylendiamin               |
| <b>TGS</b>      | Tris-Glycin-SDS-Puffer                 |
| <b>Tris</b>     | Tris(hydroxymethyl)aminomethan         |
| <b>U</b>        | <i>Units</i>                           |
| <b>V</b>        | Volt                                   |
| <b>µg</b>       | Mikrogramm                             |
| <b>µl</b>       | Mikroliter                             |
| <b>µm</b>       | Mikrometer                             |
| <b>µM</b>       | Mikromolar                             |
| <b>°C</b>       | Grad Celsius                           |
| <b>X</b>        | -fach                                  |
| <b>z.B.</b>     | zum Beispiel                           |

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                            |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Zusammenfassung</b> .....                                                               | <b>I</b>   |
| <b>Summary</b> .....                                                                       | <b>II</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....                                                         | <b>III</b> |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....                                                         | <b>X</b>   |
| <b>Tabellenverzeichnis</b> .....                                                           | <b>XI</b>  |
| <b>1 Einleitung</b> .....                                                                  | <b>1</b>   |
| 1.1 Die circadiane Uhr .....                                                               | 1          |
| 1.2 Hierarchische Organisation des circadianen Systems .....                               | 1          |
| 1.3 Medizinische Bedeutung circadianer Störungen .....                                     | 4          |
| 1.4 Funktionsweise des molekularen Oszillators .....                                       | 7          |
| 1.5 CSNK1D in der circadianen Uhr .....                                                    | 8          |
| 1.6 GAPVD1 als Komponente des PER-Komplexes.....                                           | 11         |
| 1.7 Zielsetzung .....                                                                      | 12         |
| <b>2 Material</b> .....                                                                    | <b>13</b>  |
| 2.1 Zellkultur.....                                                                        | 13         |
| 2.1.1 Zelllinien .....                                                                     | 13         |
| 2.1.2 Medien und Lösungen .....                                                            | 13         |
| 2.2 Puffer und Stammlösungen .....                                                         | 14         |
| 2.3 Antikörper.....                                                                        | 15         |
| 2.3.1 Primäre Antikörper.....                                                              | 15         |
| 2.3.2 Sekundäre Antikörper .....                                                           | 15         |
| 2.4 siRNA .....                                                                            | 16         |
| 2.5 Sonstige Proteine .....                                                                | 16         |
| 2.6 Chemikalien und Reagenzien .....                                                       | 17         |
| 2.7 Verbrauchsmaterialien .....                                                            | 18         |
| 2.8 Kits .....                                                                             | 19         |
| 2.9 Geräte .....                                                                           | 20         |
| 2.10 Software .....                                                                        | 21         |
| <b>3 Methoden</b> .....                                                                    | <b>22</b>  |
| 3.1 Zellkultur.....                                                                        | 22         |
| 3.1.1 Kultivierung humaner Zellen .....                                                    | 22         |
| 3.1.2 Einfrieren von Zellen.....                                                           | 22         |
| 3.2 Proteinanalyse .....                                                                   | 23         |
| 3.2.1 RNA Interferenz.....                                                                 | 23         |
| 3.2.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....                                          | 23         |
| 3.2.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....                         | 24         |
| 3.2.4 Western Blot Analyse .....                                                           | 24         |
| 3.2.5 Quantifizierung .....                                                                | 25         |
| 3.3 Mikroskopie.....                                                                       | 26         |
| 3.3.1 Immunfluoreszenzfärbung und -Mikroskopie .....                                       | 26         |
| 3.3.2 Proximity Ligation Assay.....                                                        | 27         |
| 3.3.3 Auswertung und Statistik .....                                                       | 28         |
| <b>4 Ergebnisse</b> .....                                                                  | <b>30</b>  |
| 4.1 PLA: Eine in situ Methode für den Nachweis von Protein-Protein-<br>Interaktionen ..... | 30         |
| 4.2 Test der Antikörper durch Immunfärbung.....                                            | 32         |

|            |                                                                          |           |
|------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.1      | Überprüfung verschiedener CSNK1D-Antikörper .....                        | 32        |
| 4.2.2      | Bestimmung der optimalen CSNK1D-Antikörperkonzentration.....             | 33        |
| <b>4.3</b> | <b>Test der Antikörper durch RNA-Interferenz und Western Blot .....</b>  | <b>34</b> |
| 4.3.1      | Bestätigung der CSNK1D-Antikörperspezifität .....                        | 35        |
| 4.3.2      | Bestätigung der GAPVD1-Antikörperspezifität .....                        | 36        |
| <b>4.4</b> | <b>Charakterisierung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 durch PLA</b> | <b>37</b> |
| 4.4.1      | CSNK1D interagiert mit GAPVD1 in HT1080-Zellen .....                     | 37        |
| 4.4.2      | CSNK1D und GAPVD1 interagieren im Zytoplasma .....                       | 41        |
| <b>5</b>   | <b>Diskussion .....</b>                                                  | <b>43</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Bestätigung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 durch PLA .....</b> | <b>43</b> |
| 5.1.1      | Validierung der in der PLA eingesetzten Antikörper .....                 | 43        |
| 5.1.2      | Nutzen und Limitationen des PLA .....                                    | 44        |
| 5.1.3      | Weitere Methoden zur Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen ....  | 47        |
| <b>5.2</b> | <b>Funktionen der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1.....</b>             | <b>48</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Relevanz in der Pathogenese .....</b>                                 | <b>50</b> |
| <b>5.4</b> | <b>Schlussfolgerung.....</b>                                             | <b>54</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                                        | <b>56</b> |

# Abbildungsverzeichnis

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Hierarchischer Aufbau der circadianen Uhr.....              | 3  |
| Abbildung 2: Nachschicht als Störfaktor der circadianen Uhr.....         | 6  |
| Abbildung 3: Molekularer Oszillator .....                                | 7  |
| Abbildung 4: Struktur von CSNK1D .....                                   | 10 |
| Abbildung 5: Struktur von GAPVD1 .....                                   | 11 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung PLA.....                           | 31 |
| Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung anti-CSNK1Ds.....                   | 33 |
| Abbildung 8: Optimale Konzentration des anti-CSNK1D (M) .....            | 33 |
| Abbildung 9: Test des anti-CSNK1D durch RNAi .....                       | 35 |
| Abbildung 10: Test des anti-GAPVD1 durch RNAi .....                      | 36 |
| Abbildung 11: PLA von CSNK1D und GAPVD1 mit Negativkontrollen.....       | 38 |
| Abbildung 12: Bestätigung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1.....     | 39 |
| Abbildung 13: PLA Positivkontrolle in HT1080-PER2-GFP-Zellen .....       | 40 |
| Abbildung 14: Statistische Auswertung der PER2-GFP Positivkontrolle..... | 41 |
| Abbildung 15: Lokalisation der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1.....    | 42 |

# Tabellenverzeichnis

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Zelllinien .....                 | 13 |
| Tabelle 2: Zellkulturmedien .....           | 13 |
| Tabelle 3: Zellkulturlösungen.....          | 13 |
| Tabelle 4: Puffer und Stammlösungen .....   | 14 |
| Tabelle 5: Primäre Antikörper .....         | 15 |
| Tabelle 6: Sekundäre Antikörper .....       | 15 |
| Tabelle 7: siRNAs .....                     | 16 |
| Tabelle 8: Sonstige Proteine .....          | 16 |
| Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien ..... | 17 |
| Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien .....     | 18 |
| Tabelle 11: Kits .....                      | 19 |
| Tabelle 12: Geräte .....                    | 20 |
| Tabelle 13: Software.....                   | 21 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Die circadiane Uhr

Die circadiane Uhr (lat. *circa* „ungefähr“, *dies* „Tag“) befähigt Lebewesen sich auf rhythmische Umweltveränderungen einstellen zu können und physiologische Körperfunktionen tageszeitabhängig anzupassen; eine Eigenschaft, die in fast allen lichtsensiblen Organismen und deren Zellen zu finden ist (Dibner et al. 2010). Da circadiane Uhren und ihre rhythmischen Oszillationen nur eine ungefähre endogene Periodenlänge von 24 Stunden aufweisen, müssen sie durch externe Stimuli, sogenannte Zeitgeber, auf exakt 24 Stunden mit dem geophysikalischen Licht-Dunkel-Rhythmus synchronisiert werden. Hierbei ist Licht als Photoperiode der wichtigste Zeitgeber (Dibner et al. 2010).

Circadiane Uhren definieren sich durch drei grundlegende Merkmale: freilaufender Rhythmus, Temperaturkompensation und *Entrainment* (Johnson et al. 2003). Der Freilauf beschreibt die Eigenschaft, dass die circadiane Rhythmik unter konstanten Bedingungen auch ohne externe Zeitgeber fortbesteht (Aschoff 1981). Wenn endogene circadiane Rhythmen auf verschiedene Zyklen von Zeitgebern stabil und spezifisch mit einer Phasenverschiebung reagieren, bezeichnet man dies als *Entrainment* (Pittendrigh 1981). *Entrainment* (fr. *entrainer* „mit sich reißen“) bedeutet also, dass die freilaufende circadiane Periode mit der externen Zeitgeberperiode mitgerissen wird und es infolge dessen zu Oszillationen mit einer Periodenlänge von genau 24 Stunden kommt (Johnson et al. 2003). Nicht zuletzt ist auch die Temperaturkompensation ein essenzielles Merkmal circadianer Uhren, um ein Einwirken von verschiedenen Umgebungstemperaturen auf die endogene Periodenlänge zu verhindern (Pittendrigh 1954).

## 1.2 Hierarchische Organisation des circadianen Systems

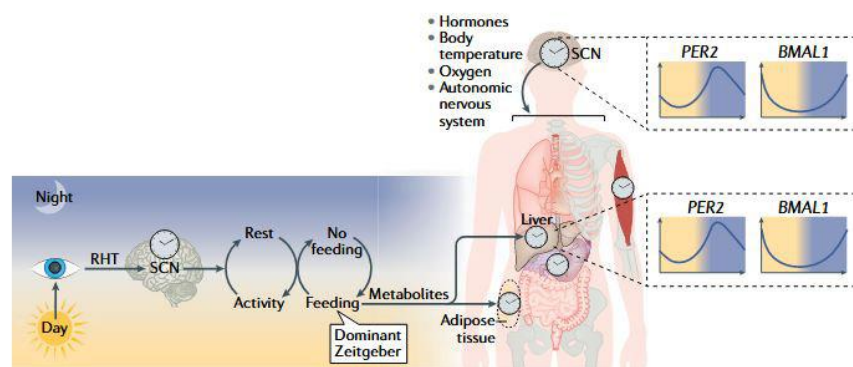
1960 stellte Pittendrigh die Theorie eines lichtempfindlichen Hauptschrittmachers und peripherer Oszillatoren auf (Pittendrigh 1960). Läsionsexperimente in Ratten konnten den *Nucleus Suprachiasmaticus* (SCN), eine bilaterale Hirnstruktur im Hypothalamus, als Schrittmacher für die Aufrechterhaltung eines zyklischen Corticosteron-Rhythmus der Nebennieren (Moore und Eichler 1972) und für die Erzeugung eines rhythmischen

Trinkverhaltens zeigen (Stephan und Zucker 1972). Neurale Transplantationsexperimente konnten darlegen, dass durch die Implantation von fetalem SCN in adulte, arrhythmische Hamster mit SCN-Läsionen die circadiane Rhythmik wiederhergestellt wurde (Lehman et al. 1987). Eine ähnliche Studie mit SCN-Transplantaten in Hamstern mit verkürzter circadianer Periode zeigte außerdem, dass der wiederhergestellte Rhythmus immer durch den Genotyp des Spenders bestimmt wird (Ralph et al. 1990). Auch erfolgreiche artübergreifende Transplantationen des SCN wurden durchgeführt (Saitoh et al. 1991), sodass diese und weitere Erkenntnisse bestätigten, dass der SCN in der circadianen Uhr von Säugetieren als zentraler Schrittmacher anzusehen ist.

Licht trifft auf die Netzhaut von Säugetieren und wird als Signal von verschiedenen Photorezeptoren wahrgenommen. Für das photische *Entrainment* des SCN sind vor allem nicht-visuelle Photorezeptoren in intrinsisch photosensitiven retinalen Ganglionzellen (ipRGCs) von Bedeutung, da visuelle Blindheit durch Verlust der Zapfen und Stäbchen im Tiermodell keinen Einfluss auf circadiane Reaktionen auf Licht zeigte (Foster et al. 1991). Die ipRGCs sind entscheidend für die lichtabhängige Synchronisierung der circadianen Uhr, indem sie bei Licht depolarisieren (Berson et al. 2002). Das von ihnen exprimierte Photopigment Melanopsin bewirkt die intrinsische Lichtempfindlichkeit dieser Zellen (Hattar et al. 2002; Hannibal et al. 2002). Eine fehlende Melanopsin-Expression führt zu einer stark abgeschwächten Phasenverschiebung durch Licht (Panda et al. 2002b). Die ipRGCs übermitteln ihre photischen Informationen direkt über den *retinohypothalamischen* Trakt (RHT) an die *suprachiasmatischen* Kerne (Moore und Lenn 1972). Bei dieser Signalprojektion nach photischer Stimulation der ipRGCs werden Glutamat (Castel et al. 1993) und hypophysäres Adenylatzyklase-aktivierendes Peptid (PACAP) (Hannibal et al. 1997) als Neurotransmitter im synaptischen Spalt freigesetzt. Dadurch kommt es u.a. auch zur Induktion von Uhrengenen im SCN (Shearman et al. 1997) und letztlich zur Phasenverschiebung und Anpassung des SCN an den Licht-Dunkel-Rhythmus.

In fast allen peripheren Geweben außerhalb des SCN wurden zusätzlich autonome circadiane Oszillatoren entdeckt, beispielsweise konnten in Leber, Lunge und der Skelettmuskulatur durch Explantatkulturen robuste und autonome circadiane Rhythmen identifiziert werden (Yamazaki et al. 2000; Yoo et al. 2004; Yamamoto et al. 2004), wobei diese gewebespezifische Abweichungen in der circadianen Periode aufweisen (Yoo et al. 2004). Sogar kultivierte immortalisierte Rat-1 Fibroblasten

weisen nach Serumschock circadiane Genexpression auf (Balsalobre et al. 1998). Viele Gene in peripheren Organen zeigen eine gewebeabhängige circadiane Transkriptions-Rhythmik (Panda et al. 2002a; Zhang et al. 2014). In Zusammenschau dieser Ergebnisse und nicht zuletzt durch den Nachweis, dass SCN-abhängige Verhaltens- oder Blutsignale ausreichen, um circadiane Rhythmen in peripheren Organen wie Leber und Niere zu synchronisieren (Guo et al. 2005), spricht man bei Säugetieren von einem hierarchischen Aufbau der circadianen Uhr mit dem SCN als zentrale Uhr, welche die autonomen peripheren Uhren über verschiedene Signale synchronisiert (siehe Abb.1).



**Abb. 1: Hierarchischer Aufbau der circadianen Uhr**

Die circadiane Uhr unterliegt einem hierarchischen Aufbau mit einer zentralen circadianen Uhr im SCN, die durch Licht über den RHT synchronisiert wird. Periphere Uhren wiederum werden durch den SCN über verschiedene Signalwege durch die zentrale Uhr synchronisiert. Bearbeitet nach (Reinke und Asher 2019).

Das *Entrainment* der peripheren circadianen Uhren erfolgt sowohl durch SCN-abhängige, als auch SCN-unabhängige Signale (siehe Abb.1). Die SCN-abhängige Synchronisierung peripherer Uhren geschieht über das neuroendokrine und autonome Nervensystem (Buijs et al. 1999a; Buijs et al. 1999b), durch direkte polysynaptische Verbindungen zwischen SCN und Organen, wie beispielsweise der Leber (La Fleur et al. 2000), aber auch über Hormone wie Glucocorticoide, für deren Rhythmus ein intakter SCN nötig ist (Moore und Eichler 1972) und die eine Phasenverschiebung in peripheren Geweben induzieren können (Balsalobre et al. 2000). Externe Umgebungstemperaturrhythmen können ebenfalls dem *Entrainment* peripherer Oszillatoren, nicht aber dem des SCN dienen (Brown et al. 2002). Darüber hinaus sind Ruhe-Aktivitätszyklen und Fütterungs-Fasten-Rhythmen für viele periphere Organe wichtige Zeitgeber (Dibner et al. 2010). So konnte gezeigt werden, dass die Fütterung

von Mäusen gegenphasig zum normalen Ruhe-Aktivitätszyklus die Phasen peripherer Gewebe umkehrt und vom SCN entkoppelt, was der Nahrungsaufnahme als Zeitgeber eine dominante Wirkung auf periphere Oszillatoren zuschreibt (Damiola et al. 2000; Stokkan et al. 2001).

### **1.3 Medizinische Bedeutung circadianer Störungen**

Viele, wenn nicht fast alle physiologischen Körperprozesse werden von der circadianen Uhr koordiniert, wie beispielsweise Körpertemperatur, Urinausscheidung und Aktivitätsverhalten (Aschoff 1965), tageszeitabhängiger Blutdruck und Herzfrequenz (Millar-Craig et al. 1978). Aber auch die Wundheilung durch eine circadiane Aktindynamik und rhythmische Fibroblastenmobilisierung (Hoyle et al. 2017), die angeborene entzündliche Immundefunktion durch circadiane Uhren in Makrophagen (Keller et al. 2009) und diverse Stoffwechselvorgänge (Reinke und Asher 2019) werden in Zusammenspiel mit dem circadianen System gesteuert.

Es wird vermutet, dass sich das circadiane System durch adaptive Evolution in periodischen Umgebungen entwickelt hat und einen Überlebensvorteil bietet (Paranjpe und Sharma 2005), da in Tierexperimenten gezeigt werden konnte, dass eine Läsion des SCN zu einem gestörten Rhythmus des Winterschlafs (Ruby et al. 1996) und zu einer niedrigeren Überlebensrate eines Angriffs führte (DeCoursey et al. 1997). Zusammenfassend ist es für Säugetiere und dementsprechend auch für den Menschen essenziell, dass die Maschinerie der circadianen Uhr intakt bleibt und ohne Störungen ablaufen kann.

Einer funktionierenden circadianen Uhr steht die moderne Lebensweise konträr gegenüber, durch die der Mensch nicht mehr nur den natürlichen Umgebungsveränderungen ausgesetzt ist. Die Zeitumstellung auf die Sommerzeit, Reisen über Zeitzonen hinweg, Schichtarbeit, *Social Jetlag*, künstliches Licht in der Nacht und permanentes Nahrungsangebot können zu einer Abschwächung natürlicher Zeitgeber führen und in einer circadianen Fehlausrichtung resultieren, die mit etlichen somatischen, als auch psychiatrischen Krankheiten assoziiert ist und in Bezug auf Volkskrankheiten einen neuen Ansatz bieten könnte (Baron und Reid 2014; Finger et al. 2020). So erfährt die circadiane Uhr eine enorme Herausforderung durch nächtliche Lichtverschmutzung, von der mittlerweile 80 % der Menschheit betroffen sind; zwei

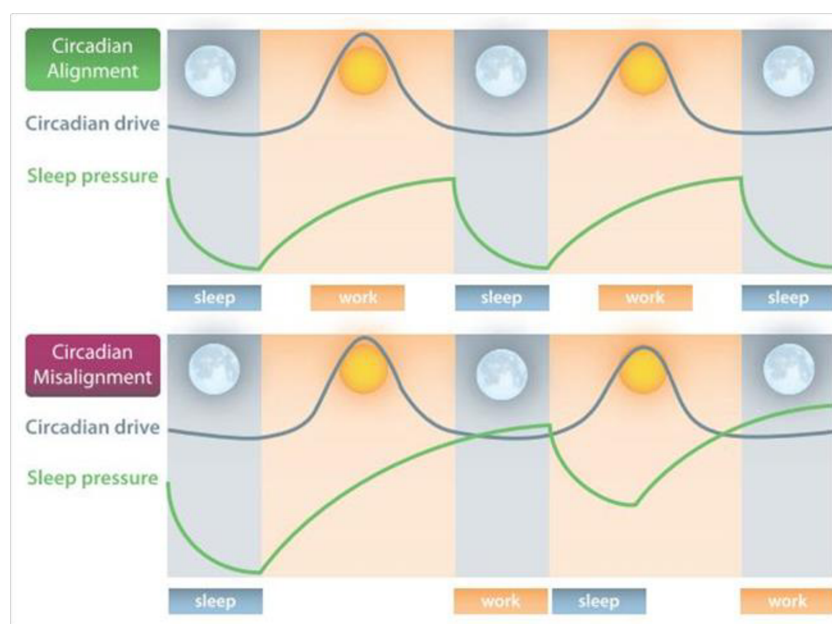
Drittel der Weltbevölkerung in einem solchem Maße, dass die Milchstraße nicht mehr zu sehen ist (Falchi et al. 2016).

Eine weitere Ursache für circadiane Störungen vieler Menschen stellt der *Social Jetlag* (SJL) dar, eine chronische Form des *Jetlags*, der durch eine Diskrepanz der endogenen, biologischen Uhr und der sozialen Uhr entsteht, die durch das Arbeits- und Sozialleben vorgegeben wird (Wittmann et al. 2006). Besonders betroffen hiervon ist der späte Chronotyp, der durch endogene späte Einschlafzeiten und sozial frühe Aufwachzeiten während der Arbeitswoche ein Schlafdefizit generiert, das an freien Tagen durch längeren Schlaf kompensiert wird (Roenneberg et al. 2003; Wittmann et al. 2006). Diese Verschiebung des Schlaf-/Aktivitätszyklus um mehrere Stunden kommt einem klassischen *Jet Lag* gleich und wird mit einem Stimulanzienkonsum von Nikotin, Alkohol und Koffein in Verbindung gebracht (Wittmann et al. 2006). Die Auswirkungen des SJL sind zahlreich, so korreliert er negativ mit akademischen Leistungen von Studenten (Haraszti et al. 2014), ist mit einem niedrigeren *High Density* Lipoprotein (HDL)-Spiegel und höheren Triglycerid- und Nüchtern-Insulin-Werten assoziiert, die kardiometabolische Risikofaktoren darstellen (Wong et al. 2015). Zudem ist der SJL ein Risikofaktor für die Entwicklung einer Depression und ist mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für depressive Symptome verbunden (Levandovski et al. 2011; Islam et al. 2020). Interessanterweise konnten während des *Lockdowns* in der COVID-19-Pandemie gleichmäßigere Schlafzeiten mit einer Schlafverschiebung an Wochentagen und einem verringerten SJL beobachtet werden (Leone et al. 2020).

Ein weiterer Auslöser circadianer Fehlausrichtungen ist die Arbeit in Nachtschichten (siehe Abb.2), von der mittlerweile ca. 15-20 % der Menschen in Industrienationen betroffen sind (Walker, W. H., 2nd et al. 2020). Dabei resultiert Schichtarbeit in einem partiellen Schlafdefizit, das sich besonders auf Arbeitnehmer in 12-Stunden-Schichten und Dauernachtschichten auswirkt und einen SJL von etwa drei Stunden bei Schichtarbeitern hervorruft (Casjens et al. 2022). Bei dem Wechsel von Nachtschichten auf andere Schichten benötigt die circadiane Uhr ca. zwei Tage für die Wiederherstellung eines zyklisch synchronen Cortisolprofils, was für eine gestörte circadiane Hormonausschüttung durch Nachtschichten spricht (Niu et al. 2015). Nachtschichtarbeit ist mit weitreichenden gesundheitlichen Folgen verbunden, so ist die Gesamtmortalität und die Sterblichkeit aufgrund von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei weiblichem Pflegepersonal in rotierenden Nachtschichten signifikant höher (Gu et al. 2015). Nachtschichtarbeiter weisen ein höheres Risiko für Typ-2-Diabetes auf, das

mit der Anzahl von Nachtschichten pro Monat korreliert (Vetter et al. 2018), und in den pankreatischen Inselzellen von Typ-2-Diabetes Patienten konnten circadiane Uhren mit verminderten rhythmischen Amplituden gefunden werden, die vermutlich zu einer verminderten Insulinsekretion führen (Petrenko et al. 2020). Des Weiteren sind Nachtschichten mit einem höheren Risiko für psychische Erkrankungen und Asthma assoziiert (Bara und Arber 2009; Maidstone et al. 2021) aber auch mit einer signifikant höheren Wahrscheinlichkeit für Vorhofflimmern im Vergleich zu Tagarbeitern (Wang et al. 2021a).

Angesichts dieser enormen Auswirkungen von circadianen Fehlausrichtungen, die einen Großteil der Bevölkerung betreffen, sollte die moderne Medizin und die Gesellschaft der circadianen Uhr mit ihren vom Menschen geschaffenen Störfaktoren eine bedeutsamere Rolle in Krankheitsentstehungen einräumen und die notwendige Intaktheit dieses Mechanismus für eine gesunde Lebensweise gewährleisten.

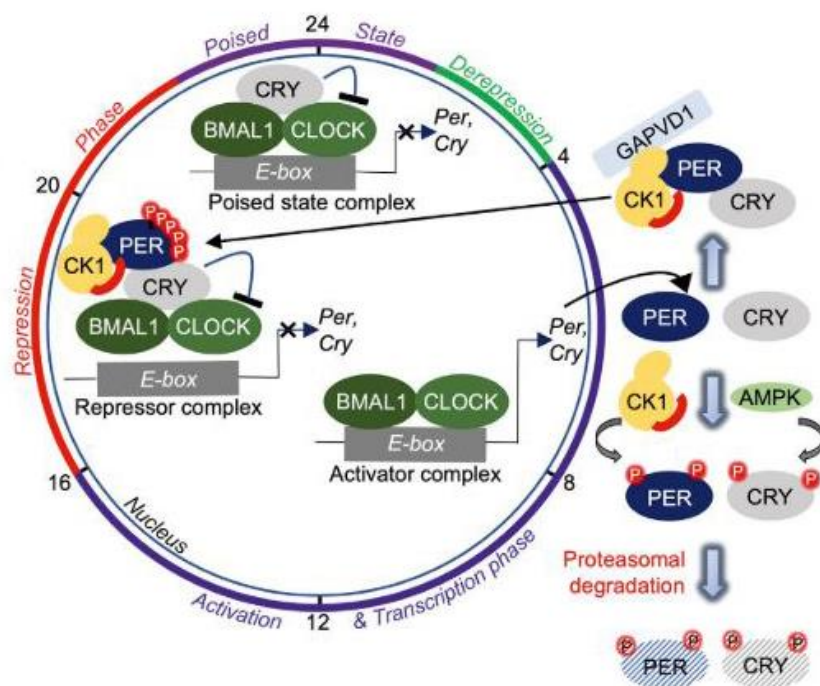


**Abb. 2: Nachtschicht als Störfaktor der circadianen Uhr**

Schichtarbeit (unteres Feld) führt zu einer Verschiebung des circadianen Antriebs (blaue Linie) und zu einem höheren Schlafverlangen (grün) im Vergleich zur Tagarbeit (oberes Feld) (Linz et al. 2021).

## 1.4 Funktionsweise des molekularen Oszillators

Circadiane Uhren sind molekulare Oszillatoren, die aus negativen transkriptionellen-translationalen Rückkopplungsschleifen bestehen und einen 24-Stunden-Zyklus der Genexpression gewährleisten (Partch et al. 2014; Takahashi 2017). Der positive Schenkel der Kernschleife des molekularen Uhrwerks wird gebildet durch das Heterodimer der Proteine Brain and muscle ARNT-Like 1 (BMAL1) und Circadian locomotor output cycles protein kaput (CLOCK), das an E-box-Elemente im Promotorbereich der *Period1*-, *Period2*-, *Period3*-Gene (*Per1*, *Per2*, *Per3*) und der *Cryptochrome1*- und *Cryptochrome2*-Gene (*Cry1*, *Cry2*) bindet und die Transkription dieser Gene aktiviert (Gekakis et al. 1998; Yoo et al. 2005). Die PER- und CRY-Proteine stellen den negativen Schenkel der Kernschleife dar, reichern sich im Zytoplasma an und bilden zusammen mit Caseinkinase 1 (CSNK1) einen zytoplasmatischen PER-Komplex, der in den Nukleus transloziert wird, wo er durch Bindung an das BMAL1:CLOCK Heterodimer den nukleären PER-Komplex formt und die Expression von *Per*- und *Cry*-Genen hemmt (siehe Abb.3) (Kume et al. 1999; Aryal et al. 2017).



**Abb. 3: Molekularer Oszillator**

Die Basis des molekularen Oszillators bildet eine zentrale Rückkopplungsschleife: Das Heterodimer aus den Transkriptionsaktivatoren BMAL1 und CLOCK bindet an E-Box-Elemente und aktiviert die Expression von PER und CRY. PER- und CRY-Proteine reichern sich in einem zytoplasmatischen Komplex mit CSNK1D und GAPVD1 an und werden in den Nukleus transportiert, wo sie ihre eigene Expression durch Bindung an BMAL1:CLOCK hemmen. Verändert nach (Narasimamurthy und Virshup 2021).

CLOCK und BMAL1 haben aber nicht nur in der Kernschleife die Funktion als Transkriptionsaktivatoren, sondern auch in einer weiteren, stabilisierenden Rückkopplungsschleife, in der sie die Expression der nukleären Rezeptoren RAR-related orphan receptors (ROR) und REV-ERB $\alpha$  (auch nuclear receptor subfamily 1 group D member 1; NR1D1) antreiben, welche wiederum die Expression von BMAL1 entweder hemmen (REV-ERB $\alpha$ ) oder aktivieren (ROR) (Preitner et al. 2002; Sato et al. 2004; Guillaumond et al. 2005; Ueda et al. 2002).

Neben den transkriptionellen-translationalen Rückkopplungsschleifen des molekularen Oszillators, deren Durchlaufen ohne die Beteiligung weiterer molekularer Mechanismen nur wenige Stunden dauern würde, sind retardierende Mechanismen wie posttranslationale Modifikationen durch beispielsweise Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Acetylierung notwendig, um eine endogene Periodenlänge von ungefähr 24 Stunden zu generieren (Gallego und Virshup 2007; Hirano et al. 2016). So ist der *Phosphoswitch* (siehe Kapitel 1.5) ein wichtiger Prozess, in dem CSNK1D die Stabilität und den Abbau von PER2 reguliert und damit auch die Periodenlänge beeinflusst (Zhou et al. 2015).

## 1.5 CSNK1D in der circadianen Uhr

Die Casein Kinase 1 Delta (CSNK1D) gehört in der Superfamilie der Proteinkinasen zu den Serin/Threonin-Kinasen. Über die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch Phosphorylierung ist sie an der Regulation zellulärer Prozesse beteiligt und in eukaryontischen Organismen ubiquitär vorhanden (Knippschild et al. 2005).

In der circadianen Uhr ist CSNK1D ein wichtiger Bestandteil wesentlicher Abläufe. Zusammen mit PER und CRY bildet CSNK1D in der zentralen Rückkopplungsschleife einen Proteinkomplex, der mit dem CLOCK:BMAL1 Heterodimer den nukleären PER-Komplex formt und so die *Per*- und *Cry*-Genexpression hemmt (Aryal et al. 2017; Lee et al. 2001). Auch hat CSNK1D eine regulatorische Funktion in der negativen Rückkopplungsschleife. Zusammen mit Casein Kinase 1 Epsilon (CSNK1E) modifiziert sie Uhrenproteine posttranslational. Beispielsweise werden PER-Proteine durch die Kinasen phosphoryliert und damit ihre subzelluläre Lokalisation hin zum Nukleus beeinflusst, sowie der Abbau von PER-Proteinen eingeleitet (Lee et al. 2001; Akashi et al. 2002). Somit beeinflusst die Phosphorylierung die PER2-Stabilität und den PER-

Abbau, gesteuert von CSNK1D/E und Phosphatasen (Gallego und Virshup 2007; Virshup et al. 2007).

Durch die Mitwirkung als Uhrenprotein an zentralen Prozessen der circadianen Uhr können Mutationen in *Csnk1d* auch zu Schlafstörungen durch Verschiebung der Schlafphase führen z.B. bei dem *familial advanced sleep phase syndrome* (FASPS), wo der interne Rhythmus betroffener Personen um etwa dreieinhalb Stunden vorverlagert ist (Reid et al. 2001; Xu et al. 2005).

Es wird angenommen, dass CSNK1D die Bindungsaffinität von CLOCK:BMAL1 an die DNA verringert und so die Dissoziation von dieser fördert (Aryal et al. 2017). Darüber hinaus ist die temperaturunempfindliche CSNK1D-abhängige Phosphorylierung als einer der wichtigsten, die Periode circadianer Uhren bestimmenden Prozesse identifiziert worden, da der *Knockdown* von CSNK1D eine deutliche Periodenverlängerung auf mehr als 28 h zeigt (Isojima et al. 2009). Auch bei Vorhandensein eines funktionellen *Csnk1d*-Allels konnte eine geringe Periodenverlängerung beobachtet werden, vermutlich wie auch in CSNK1D-defizienten Leberzellen durch verringerte PER-Phosphorylierung (Etchegaray et al. 2009). Durch ein Gleichgewicht zwischen CSNK1D/E und Proteinphosphatase 1 wird die PER2-Phosphorylierung gesteuert, wobei eine Deletion von CSNK1D zu einer deutlich niedrigeren Phosphorylierungsrate führt und es zu einer zytoplasmatischen Akkumulation von PER2 durch fehlende Translokation kommt (Lee et al. 2011).

PER2 besitzt zwei CSNK-abhängige Phosphorylierungsstellen, eine davon ist die FASP-Stelle, deren Mutation eine der Grundlagen für das FASPS ist und eine Priming-Phosphorylierung dieser Region und somit auch die anschließende Phosphorylierung durch CSNK mit nachfolgender Stabilisierung von PER2 blockiert (Toh et al. 2001; Vanselow et al. 2006). Bei der zweiten Phosphorylierungsstelle handelt es sich um die beta-transducin repeat-containing protein (b-TrCP)-Bindungsstelle, auch Phosphodegron-Stelle genannt, durch deren Phosphorylierung TrCP binden kann und den Ubiquitin-vermittelten Abbau von PER2 reguliert (Eide et al. 2005; Zhou et al. 2015; Narasimamurthy und Virshup 2021). Dieser Mechanismus, in dem CSNK1D durch die Phosphorylierung an den zwei entgegengesetzt wirkenden FASP- und TrCP-Stellen von PER2 zwischen Stabilisierung und Abbau umschaltet, wird als *Phosphoswitch* bezeichnet (Zhou et al. 2015). Somit steuert CSNK1D im *Phosphoswitch*-Modell die PER2-Stabilität, indem die Phosphorylierung an der FASP-Stelle eine Phosphorylierung an der TrCP-Stelle blockiert (Zhou et al. 2015). Die

Autoren konnten in ihrer Arbeit ebenso zeigen, dass der *Phosphoswitch* eine entscheidende Komponente in der Temperaturkompensation der circadianen Uhr ist, da eine höhere Temperatur eine erhöhte Phosphorylierung der FASP-Stelle und damit eine Stabilisierung von PER2 zur Folge hat, wodurch die Periode bei höheren Temperaturen verlängert wird, was den beschleunigten Reaktionsraten im molekularen Oszillator entgegenwirkt (Zhou et al. 2015).

Behrend et al. konnten nachweisen, dass CSNK1D darüber hinaus regulatorischer Bestandteil des Zellzyklus ist, da es in der Interphase mit Mikrotubuli assoziiert ist und bei DNA-Schädigung zu den Zentrosomen und dem Spindelapparat mobilisiert wird (Behrend et al. 2000).

Zudem ist CSNK1D in der DNA-Schadensantwort involviert, indem CSNK1D den Tumorsuppressor p53 phosphoryliert und eine Überexpression von CSNK1D in einer Hyperphosphorylierung des N-Terminus von p53 resultiert (Knippschild et al. 1997). Darüber hinaus konnte dieselbe Arbeitsgruppe nachweisen, dass zellulärer Stress durch p53 zu einem erhöhten Proteinlevel von CSNK1D führt und eine Rückkopplungsschleife zwischen CSNK1D und p53 existiert. DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung resultieren beispielsweise in einer N-terminalen Phosphorylierung von p53 an Threonin 18 und vorgelagert an Serin 15 durch CSNK1, die die Interaktion von p53 und seinem Regulator Murine double minute 2 (MDM2) stark herabsetzt, wodurch die Transkriptionsaktivität von p53 zunimmt (Shieh et al. 1997; Sakaguchi et al. 2000). Andere Untersuchungen zeigten außerdem, dass CSNK1D als Reaktion auf einen DNA-Schaden in den Nukleus verlagert wird, mit MDM2 interagiert und dieses an mehreren Stellen phosphoryliert um dessen Abbau einzuleiten (Inuzuka et al. 2010). Eine Inaktivierung von CSNK1D wiederum löst eine MDM2 Anreicherung und damit eine verminderte Aktivität von p53 aus, was zu einer Resistenz gegenüber Apoptose führen kann (Inuzuka et al. 2010).



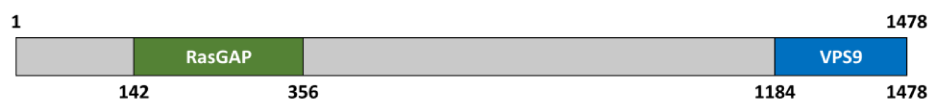
**Abb. 4: Struktur von CSNK1D**

Es existieren zwei CSNK1D-Isoformen unterschiedlicher Proteinlängen (hellblau) mit einer Kinase-Domäne (dunkelblau) und autoinhibitorischen Phosphorylierungsstellen am C-Terminus des Proteins (rot). Verändert nach (Schitteck und Sinnberg 2014).

## 1.6 GAPVD1 als Komponente des PER-Komplexes

Das Protein GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1 (GAPVD1) ist eine Komponente des PER-Komplexes und als Interaktionspartner von PER2 im Zytoplasma identifiziert worden (siehe Abb.3) (Ibrahim et al. 2021; Aryal et al. 2017). Es wurde sowohl auf intrazellulären Vesikeln als auch auf der Plasmamembran lokalisiert und besitzt zwei funktionelle Domänen (siehe Abb.5): eine Rab-GEF-Domäne, auch als VPS9-Domäne bezeichnet, am C-Terminus des Proteins und eine Ras-GAP-Domäne am N-Terminus, die eine Spezifität für Ras aufweist und dessen GTP-Hydrolyseaktivität stimuliert (Hunker et al. 2006). Durch die katalytische Rab-GEF-Domäne wirkt GAPVD1 als GTP-Austauschfaktor (GEF) und interagiert mit Ras-related protein in brain 5 (RAB5), indem es dieses aktiviert (Hunker et al. 2006; Sato et al. 2005). RAB5 ist an der Endozytose beteiligt und wurde an der Plasmamembran und frühen Endosomen nachgewiesen (Chavrier et al. 1990). RAB5 reguliert in der Endozytose den u.a. Clathrin-vermittelten Transport zwischen diesen beiden Zellorganellen (Bucci et al. 1992). Außerdem konnte gezeigt werden, dass RAB5 die Endosomenmotilität entlang der Mikrotubuli und damit auch die intrazelluläre Verteilung der frühen Endosomen steuert (Nielsen et al. 1999). Über eine Interaktion mit CIP4 ist GAPVD1 zudem ein Regulator des insulinstimulierten GLUT4-Transport in Adipozyten (Lodhi et al. 2007). Es wird auch angenommen, dass die Regulierung von RAB5 an altersbedingten Veränderungen der neuronalen Funktion beteiligt ist (Sann et al. 2012). Somit ist GAPVD1 ein Protein, das über seine katalytischen Domänen in zahlreichen Zellprozessen und Signalwegen integriert ist.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde GAPVD1 als neuer Bestandteil des reifen zytoplasmatischen PER-Komplexes identifiziert, in dem auch CSNK1D enthalten ist (Aryal et al. 2017), und die Frage wurde aufgeworfen, welche Funktion aus dieser möglichen Protein-Protein-Interaktion im zytoplasmatischen PER-Komplex resultiert.



**Abb. 5: Struktur von GAPVD1**

GAPVD1 weist zwei funktionelle Domänen, eine Ras-GAP-Domäne am N-Terminus und eine VPS9/Rab-GEF-Domäne am C-Terminus, auf. Diese befinden sich an den dargestellten Aminosäurepositionen des Proteins, angefertigt nach (Hunker et al. 2006).

## 1.7 Zielsetzung

Unsere Arbeitsgruppe konnte durch biochemische Reinigung PER2-enthaltender Proteinkomplexe zeigen, dass PER2 mit GAPVD1 co-immunopräzipitiert und durch weitere Versuche, dass GAPVD1 mit PER2 im Zytoplasma interagiert (Ibrahim et al. 2021). Zusätzlich wurde in anderen Vorarbeiten GAPVD1 in einem Proteinkomplex mit CSNK1D und PER2 identifiziert (Aryal et al. 2017; Kategaya et al. 2012). Daher sollte in dieser Arbeit die Protein-Protein-Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 in der circadianen Uhr durch eine unabhängige Methode, den sogenannten *Proximity Ligation Assay* (PLA) nachgewiesen und deren intrazelluläre Lokalisation identifiziert werden. Die subzelluläre Charakterisierung der möglichen Interaktion durch den PLA könnte neben einer Bestätigung der Interaktion auch einen Ansatz bieten, um die Funktion eines Zusammenspiels von CSNK1D und GAPVD1 in der circadianen Uhr und deren gegenseitigen Einfluss aufeinander genauer verstehen zu können.

## 2 Material

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

| Bezeichnung     | Beschreibung                                                                                                                              |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HT1080          | Humane Fibrosarkomzellen,<br>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und<br>Zellkulturen (DSMZ), #DSM ACC 315, Braunschweig,<br>Deutschland |
| HT1080 PER2-GFP | Exprimieren stabil PER2-GFP,<br>(Kalfalah et al. 2016)                                                                                    |

#### 2.1.2 Medien und Lösungen

Tabelle 2: Zellkulturmedien

| Bezeichnung               | Zusammensetzung                                                                                                     |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Antibiotikumfreies Medium | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i><br>(DMEM)+GlutaMAX-I versetzt mit 10 % fetales<br>Kälberserum (FCS)       |
| Einfriermedium            | 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), 40 % Nährmedium,<br>50 % FCS                                                          |
| Nährmedium                | DMEM+GlutaMAX-I versetzt mit 10 % FCS, 100 U/mL<br>Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin                            |
| Selektionsmedium          | DMEM+GlutaMAX-I versetzt mit 10 % FCS, 100 U/mL<br>Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 100 µg/mL<br>Hygromycin B |
| Serumfreies Medium        | DMEM+GlutaMAX-I versetzt mit 100 U/mL Penicillin<br>und 100 µg/mL Streptomycin                                      |

Tabelle 3: Zellkulturlösungen

| Bezeichnung             | Hersteller           |
|-------------------------|----------------------|
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma, St.Louis, USA |

|                                                                                   |                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| fetales Kälberserum (FCS)                                                         | Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Hygromycin                                                                        | Sigma, St.Louis, USA            |
| Penicillin- (10.000 U/mL) und Streptomycinlösung (100 µg/mL)                      | Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (Ca <sup>2+</sup> -; Mg <sup>2+</sup> -frei) | Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA |
| Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (0,5 %)                        | Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA |

## 2.2 Puffer und Stammlösungen

Tabelle 4: Puffer und Stammlösungen

| Bezeichnung                                              | Zusammensetzung/Hersteller                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10x Laemmli-Puffer                                       | 312mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)/HCl (pH 6,8), 50 % Glycerin, 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,4 % Bromphenolblau |
| 10x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)                 | 1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O, 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        |
| 10x TGS-Puffer (Tris-Glycin-SDS-Puffer)                  | 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1 % SDS                                                                                            |
| 6x Laemmli-Ladepuffer (1 mL)                             | 600 µL 10x Laemmli-Puffer, 20 % SDS, 1M Dithiothreitol (DTT), 250 mM Pefa, 260 µL H <sub>2</sub> O                             |
| 5x Laemmli-Puffer                                        | Tris/HCl pH 6, 156,25 mM 25 % Glycerin, 5 % SDS, 50 mM DTT, ad 10 ml H <sub>2</sub> O, 1 Spatelspitze Bromphenolblau           |
| 1x Laemmli-Ladepuffer (1 mL)                             | 200 µL 5x Laemmli-Puffer, 100 µL 10 % SDS, 10 µL DTT, 10 µL Pefa, 680 µL H <sub>2</sub> O                                      |
| 1x TGS-Laufpuffer                                        | 100 mL 10x TGS, 900 mL H <sub>2</sub> O                                                                                        |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (PBS-T) (1 L) | 100 mL 10x PBS, 1 mL Tween20 (0,1 %), 999 mL H <sub>2</sub> O                                                                  |
| Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20 (TBS-T)           | 10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung, 0.1% Tween20                                                                               |
| Transferpuffer Western Blot                              | 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% Methanol                                                                                         |

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 5: Primäre Antikörper

| Antikörper    | Antigen  | Ursprung      | Verdünnung<br>IF, PLA/WB                                | Produkt-<br>nummer | Hersteller                                                        |
|---------------|----------|---------------|---------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Anti-Calnexin | Calnexin | Kaninchen (K) | -/1:10000 in<br>2,5 % Milch                             | C4731              | Sigma, St.Louis,<br>USA                                           |
| Anti-CSNK1D   | CSNK1D   | Maus<br>(M)   | 1:2500/1:1000<br>in 5 % Milch                           | ab85320            | Abcam,<br>Cambridge,<br>England                                   |
| Anti-CSNK1D   | CSNK1D   | K             | 1:100 -1:300/-                                          | #12417             | Cell Signaling<br>Technology,<br>Danvers, Massa-<br>chusetts, USA |
| Anti-GAPVD1   | GAPVD1   | K             | 1:300/1:2000<br>in 5 % Rinder-<br>serumalbumin<br>(BSA) | NBP1-<br>19156     | Novusbio,<br>Centennial,<br>Colorado, USA                         |
| Anti-GFP      | GFP      | M             | 1:400/1:1500<br>in 2,5 % Milch                          | G6539              | Sigma, St.Louis,<br>USA                                           |
| Anti-PER2     | PER2     | K             | 1:150/1:200 in<br>5 % BSA                               | 20359-1-<br>AP     | Proteintech,<br>Rosemont,<br>Illinois, USA                        |

### 2.3.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper

| Antikörper                                    | Ursprung | Verdünnung | Produkt-<br>nummer | Hersteller                                 |
|-----------------------------------------------|----------|------------|--------------------|--------------------------------------------|
| Cy3-gekoppelter Anti-Kaninchen IgG Antikörper | Ziege    | 1:3200     | 111-166-003        | Jackson<br>ImmunoResearch,<br>Ely, England |

|                                                                        |       |         |             |                                        |
|------------------------------------------------------------------------|-------|---------|-------------|----------------------------------------|
| Cy3-gekoppelter Anti-Maus IgG Antikörper                               | Ziege | 1:3200  | 115-165-205 | Jackson ImmunoResearch, Ely, England   |
| ECL Anti-Kaninchen IgG Antikörper, mit Meerrettichperoxidase gekoppelt | Esel  | 1:10000 | NA934V      | GEHealthcare, Buckinghamshire, England |
| ECL Anti-Maus IgG Antikörper, mit Meerrettichperoxidase gekoppelt      | Schaf | 1:40000 | NA931V      | GEHealthcare, Buckinghamshire, England |

## 2.4 siRNA

Tabelle 7: siRNAs

| Bezeichnung   | Produktnummer    | Hersteller                          |
|---------------|------------------|-------------------------------------|
| siCSNK1D Pool | L-003478-01-0005 | Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA |
| siGAPVD1 Pool | L-026206-01-0005 | Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA |
| siNT Pool     | D-001810-10-05   | Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA |

## 2.5 Sonstige Proteine

Tabelle 8: Sonstige Proteine

| Protein                  | Hersteller                   |
|--------------------------|------------------------------|
| Milchpulver (fettarm)    | Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma, St.Louis, USA         |
| Ziegenserum              | Sigma, St.Louis, USA         |

## 2.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 9: Chemikalien und Reagenzien

| Bezeichnung                        | Hersteller                                         |
|------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | Sigma, St.Louis, USA                               |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)       | Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Bromphenol-Blau                    | Merck, Darmstadt, Deutschland                      |
| dH <sub>2</sub> O                  | Merck, Darmstadt, Deutschland                      |
| DharmaFECT 1 Transfection Reagent  | Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA                |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)            | Sigma, St.Louis, USA                               |
| Dithiothreitol (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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>    | Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Methanol                           | Merck, Darmstadt, Deutschland                      |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| NaCl                               | VWR International, West Chester, Pennsylvania, USA |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)         | Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Paraformaldehyd (PFA)              | Sigma, St.Louis, USA                               |
| Pefa                               | Applichem, Darmstadt, Deutschland                  |
| Polyacrylamid Rotiphorese Gel 30   | Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED)   | Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Tris                               | Roth, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Triton X-100                       | Sigma, St.Louis, USA                               |
| Trypanblau Farbstoff 0,4%          | Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA             |
| Tween20                            | Sigma, St.Louis, USA                               |

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung                                                              | Hersteller                                          |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 4 Chamber Polystyrene Vessel Tissue Culture Treated Glas Slide BD Falcon | BD Biosciences Bedford, USA                         |
| 15 mL BD Falcon Tube                                                     | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA                 |
| 50 mL BD Falcon Tube                                                     | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA                 |
| 6-Well-Zellkultur-Multischale, Nunclon Delta Surface'                    | Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark        |
| Color Prestained Protein Standard, Broad Range                           | New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland |
| Countess®-Cell-Counter Slides                                            | Invitrogen, Carlsbad, USA                           |
| Fast and Shiny Base and Top Coat                                         | KIKO Milano, Bergamo, Italien                       |
| Gel Kassetten Novex, 1 mm                                                | Invitrogen, Carlsbad, USA                           |
| High Precision Microscope Cover Glasses, 24x60 mm, 170 ±5 µm No. 1.5H    | Ibidi, Martinsried, Deutschland                     |
| Immobilon-P Polyvinylidenfluorid (PVDF) Transfermembran                  | Millipore, Bedford, USA                             |
| KB+-Marker                                                               | Invitrogen, Carlsbad, USA                           |
| µ-Slide 4 Well                                                           | Ibidi, Martinsried, Deutschland                     |
| µ-Slide 8 Well                                                           | Ibidi, Martinsried, Deutschland                     |
| Parafilm                                                                 | Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA            |
| Petrischale 100x100x20 mm                                                | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland                    |
| PVDF-Transfermembran                                                     | Millipore, Bedford, USA                             |
| Whatman Filterpapier                                                     | GEHealthcare, Buckinghamshire, England              |
| Zellkulturflasche (klein, T25)                                           | Thermo Scientific, Nümbrecht, Deutschland           |
| Zellkulturschale (Ø 15 cm)                                               | BD Biosciences, Franklin Lakes, USA                 |

## 2.8 Kits

Tabelle 11: Kits

| Bezeichnung                                       | Hersteller                       |
|---------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Duolink In Situ Detection Reagents Red</b>     | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA    |
| 5x Duolink Amplification Red                      |                                  |
| 5x Duolink Ligation                               |                                  |
| 1x Duolink Ligase (1 U/ $\mu$ L)                  |                                  |
| 1x Duolink Polymerase (10 U/ $\mu$ L)             |                                  |
| <b>Duolink In Situ PLA Probe Anti-Mouse MINUS</b> | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA    |
| 5x Duolink PLA Probe Anti-Mouse MINUS             |                                  |
| 1x Duolink Antibody Diluent                       |                                  |
| 1x Duolink Blocking Solution                      |                                  |
| <b>Duolink In Situ PLA Probe Anti-Rabbit PLUS</b> | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA    |
| 5x Duolink PLA Probe Anti-Rabbit PLUS             |                                  |
| 1x Duolink Antibody Diluent                       |                                  |
| 1x Duolink Blocking Solution                      |                                  |
| <b>Duolink In Situ Wash Buffers, Fluorescence</b> | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA    |
| 3x Duolink Wash Buffer A                          |                                  |
| 1x Duolink Wash Buffer B                          |                                  |
| <b>Pierce ECL PLUS Western Blotting Substrate</b> | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| Pierce ECL PLUS Solution A                        |                                  |
| Pierce ECL PLUS Solution B                        |                                  |

## 2.9 Geräte

Tabelle 12: Geräte

| Bezeichnung                                                                | Hersteller                                            |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| 63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv                                           | Zeiss, Oberkochen, Deutschland                        |
| Autoklav V150                                                              | Systec, Wettenberg, Deutschland                       |
| CO2-Inkubator Hera Cell                                                    | Heraeus, Hanau, Deutschland                           |
| Countess®-Cell-Counter                                                     | Invitrogen, Carlsbad, USA                             |
| Einfrierbehälter Cryo 1 °C Freezing Container                              | Nalge Nunc, Rochester, New York, USA                  |
| Electrophoresis Power Supply EPS 301                                       | GEHealthcare, Buckinghamshire, England                |
| 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                      |
| Luminescent image analyzer LAS4000                                         | Fujifilm, Tokyo, Japan                                |
| Magnetrührer IKAMAG RCT                                                    | IKA-Werke, Staufen, Deutschland                       |
| Orbitalschüttler GFL 3015                                                  | Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland |
| pH-Meter Climatic 766                                                      | Knick, Berlin, Deutschland                            |
| Sterilbank Herae Safe                                                      | Heraeus, Hanau, Deutschland                           |
| TransBlot SD SemiDry Transfer Cell                                         | BioRad, Hercules, USA                                 |
| Vertikale Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer: Novex-Mini-Cell-Gelkammer | Invitrogen, Carlsbad, USA                             |
| Ultrasound Homogenizer Sonopuls                                            | Bandelin, Berlin, Deutschland                         |
| Vortex Genie 2                                                             | Bender und Hobein AG, München, Deutschland            |
| Wasserbad WB20                                                             | Medingen, Dresden, Deutschland                        |
| Zentrifuge Galaxy MiniStar                                                 | VWR International, Darmstadt, Deutschland             |
| Zentrifuge Rotixa/P                                                        | Hettich, Tuttlingen, Deutschland                      |

## 2.10 Software

Tabelle 13: Software

| Bezeichnung      | Hersteller                                             |
|------------------|--------------------------------------------------------|
| Adobe Photoshop  | Adobe, San Jose, USA                                   |
| GraphPadPrism® 7 | GraphPad Software Inc., LaJolla, USA                   |
| ImageJ           | National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA |
| LAS4000          | Fujifilm, Tokyo, Japan                                 |
| MetaMorph V6.3r6 | Molecule Devices, Sunnyvale, USA                       |
| Microsoft Office | Microsoft, Redmond, Washington, USA                    |
| Multi-Gauge      | GE, Healthcare, Chalfont St. Giles, England            |

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung der verwendeten humanen Zelllinien (siehe Kapitel 2.1.1) fand bei 37 °C, feuchtigkeitsgesättigter Luft und 5 % CO<sub>2</sub> in Medien statt (siehe Kapitel 2.1.2). Für den Wildtyp HT1080-Zellen wurde Nährmedium verwendet, für die HT1080-PER2-GFP-Zellen hingegen Selektionsmedium. Beide Zelllinien wurden alle zwei bis drei Tage passagiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 0,5 % Trypsin/EDTA von der Kultivierungsfläche gelöst. Anschließend wurden die gelösten Zellen in entsprechendem Medium resuspendiert. Je nach Experiment und Zelldichte wurde ein Fünftel oder ein Zehntel der Zellsuspension in die neue Zellkulturflasche gegeben.

#### 3.1.2 Einfrieren von Zellen

Durch das Einfrieren, der sogenannten Kryokonservierung, können Zellen zeitlich unbefristet gelagert werden. Zum Konservieren wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 0,5 % Trypsin/EDTA von der Kultivierungsfläche gelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 mL *BD Falcon Tube* gefüllt und anschließend für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Danach konnte der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Einfriermedium (siehe Kapitel 2.1.2) resuspendiert werden. Je 1 mL der Suspension wurden in ein Kryokonservierungsröhrchen gegeben. Es folgte die Temperatursenkung auf -80 °C in einem mit Isopropanol gefüllten Kryobehälter. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zur Lagerung in den -130 °C Stickstofftank überführt.

Für die Rekultivierung der Zellen, wurden die Kryokonservierungsröhrchen für wenige Minuten im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden in entsprechendem Medium aufgenommen, in ein 15 mL *BD Falcon Tube* gegeben und pelletiert, sodass anschließend der DMSO enthaltende Überstand entfernt werden konnte. Zuletzt wurden die Zellen mit Medium resuspendiert, in neue Zellkulturgefäße überführt und kultiviert (siehe Kapitel 3.1.1)

## 3.2 Proteinanalyse

### 3.2.1 RNA Interferenz

Durch das Einbringen von *small interfering RNA* (siRNA) in die Zellen durch Transfektion, erfolgte eine experimentelle Herabregulierung der Expression von Zielgenen. Dazu wurden jeweils 100.000 Zellen pro Wachstumsfläche einer 6-Well-Kulturplatte ausgesät und für 24 h kultiviert (siehe Kapitel 3.1.1).

Anschließend wurde mit Ribonuklease-freiem Wasser eine 5  $\mu$ M Stammlösung der siRNA und *non-targeting* siRNA (siNT) angesetzt. In einem ersten Reaktionsgefäß wurden je siRNA/siNT und serumfreies Medium gemischt, in einem zweiten 15 mL *BD Falcon Tube* DharmaFECT 1 *Transfection Reagent* und serumfreies Medium. Beide Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Inhalt des ersten Reaktionsgefäßes wurde in das zweite Gefäß gegeben, gemischt und erneut für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von antibiotikumfreiem Medium und Entfernen des Mediums aus der 6-Well-Kulturplatte, wurden jeweils 3 mL der entstandenen Lösung auf die Zellen der entsprechenden Kammern pipettiert. Zusätzlich wurden 3 mL antibiotikumfreies Medium in die Kammer der Negativkontrolle gefüllt.

Nach den ersten 24 h im Inkubator bei 37 °C wurde das Medium in allen Kammern durch frisches, antibiotikumfreies Medium ersetzt und nach weiteren 48 h konnten die behandelten Zellen für die folgende Gewinnung von Gesamtproteinextrakten verwendet werden.

### 3.2.2 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Um die zellulären Proteine für die Western Blot-Analyse freizusetzen, wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Es folgte das Abstoppen der Reaktion durch antibiotikumfreies Medium und das Überführen der Zellsuspension in ein 15 mL *BD Falcon Tube*. Danach wurden 10  $\mu$ L der Suspension mit 10  $\mu$ L Trypanblau 0,4 % vermischt und mittels *Countess®-Cell-Counter* die Zellzahl und Viabilität der zu untersuchenden Zellen bestimmt. Durch das Zentrifugieren der Zellsuspension für 3 min bei 1200 rpm, konnte der Überstand vollständig entfernt werden. Nachfolgend wurden die Zellpellets in 100  $\mu$ L 1x Laemmli-Puffer pro  $1 \times 10^6$  Zellen resuspendiert und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß für 10 s bei 20 %

Geräteleistung durch Ultraschall homogenisiert. Die Lysate wurden für die Western Blot-Analyse entweder sofort verwendet oder bei -20 °C für einen späteren Zeitpunkt gelagert.

### **3.2.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht, wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) genutzt. Hierzu wurden Trenngele mit 8 % Acrylamid-Anteil (GAPVD1) oder 12 % Acrylamid-Anteil (CSNK1D) in eine Novex-Gel-Kassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die Trenngele mit einem 5 %igen Sammelgel beschichtet und die Gelkassette in der *Novex-Mini-Cell*-Gelkammer eingespannt. Anschließend wurde die Kammer mit 1x TGS-Laufpuffer aufgefüllt und die zuvor in 1x Laemmli-Puffer eingefrorenen Proben bei 95 °C für 5 min erhitzt. Danach wurden die Proben und der Standardgrößenmarker *Color Prestained Protein Standard, Broad Range* zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine auf das Gel aufgetragen. Bei 50-150 V erfolgte die Gelelektrophorese bis zum Erreichen des Gel-Endes durch die Lauffront.

### **3.2.4 Western Blot Analyse**

#### **3.2.4.1 Elektrophoretischer Transfer**

Nach Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE, wurden diese durch das *TransBlot SemiDry Transfer*-System von BioRad auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den Transfer wurde das Gel für 20 min in Transferpuffer equilibriert, während die PVDF-Membran für 2 min in Methanol aktiviert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und ebenfalls kurz in Transferpuffer equilibriert wurde. Auf die Grundplatte der Blotkammer, die Anode, wurden zwei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere aufeinander gelegt, darüber die aktivierte PVDF-Membran. Es folgten wieder zwei Whatman-Filterpapiere und als Abschluss des Aufbaus die Deckelplatte des Systems, die Kathode. Bei jedem Aufbauschritt war darauf zu achten, dass mögliche Luftblasen entfernt wurden. Der Transfer lief bei 15 V für 15 min ab.

### 3.2.4.2 Immunchemische Detektion

Es folgte das Blockieren von unspezifischen Proteinbindungsstellen in einer 5%igen Milchpulverlösung (5 % Milchpulver in TBS-T), in der die Membran für 1h bei Raumtemperatur geschwenkt wurde. Der entsprechende Primärantikörper wurde entweder in 2,5-5%iger Milchpulverlösung oder 5%iger BSA/TBS-T-Lösung hinzugegeben und schwenkend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimalig für je 10 min in TBS-T gewaschen, um sie im nächsten Schritt in einer 2,5%igen Lösung aus Milch/BSA und TBS-T mit dem Sekundärantikörper zu inkubieren. Nach 1h bei Raumtemperatur wurde die Membran drei weiteren Waschschritten mit TBS-T für je 10 min unterzogen, wonach die Immundetektion mittels Chemolumineszenz durchgeführt wurde. Hierfür wurde das *Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate*-Kit genutzt, dessen Lösungen auf der Membran verteilt und für 4 min lichtdicht inkubiert wurden. Die Chemolumineszenz konnte nun mithilfe des Kamerasystems *ImageQuant LAS-400* detektiert werden, bei einer Expositionszeit von 30 s bis 3 min.

Zur Normierung wurde als Ladekontrolle Calnexin (CANX) eingesetzt und wie in diesem Kapitel beschrieben verwendet.

### 3.2.5 Quantifizierung

Um die Western Blot-Analysen interpretieren zu können, mussten zunächst die Intensitäten der Chemoluminiszenz-Bilder ausgewertet werden. Die Banden der untersuchten Proteine und auch der Hintergrund wurden mit einer Messfläche, einer sogenannten *Region of Interest* (ROI), mittels der *Multi-Gauge*-Software hinterlegt und die Intensitäten der markierten Flächen gemessen. Der Hintergrundwert wurde durch das Programm subtrahiert, die Ergebnistabelle in Excel exportiert und hier auf siNT normalisiertes Proteinlevel hin berechnet. Die bearbeiteten Werte konnten dann durch *GraphPad Prism® 7* als Graphen dargestellt und durch einen ungepaarten t-Test das Signifikanzniveau ermittelt werden.

## 3.3 Mikroskopie

### 3.3.1 Immunfluoreszenzfärbung und -Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die HT1080-Zellen mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^4$  Zellen pro Wachstumsfläche eines *μ-Slide 8 Well* in antibiotikumfreien Medium ausgesät und für 24 h unter den beschriebenen Kultivierungsbedingungen inkubiert (siehe Kapitel 3.1.1).

Nach Absaugen des antibiotikumfreien Mediums folgte ein Waschschrift mit auf 37 °C erwärmtem PBS. Die Fixierung erfolgte durch Hinzugabe einer Lösung aus 4 % PFA in 37 °C warmen, antibiotikumfreien Medium für 10 min bei RT. Danach schloss sich ein Waschschrift mit PBS bei RT an, ehe dreimal für jeweils 5 min 0,1 % Triton X-100 in die Kammern gegeben und somit die Permeabilisierung durchgeführt wurde. Nach erneutem Waschschrift mit PBS bei RT wurde in jede Kammer 10 % Ziegenerum zum Blockieren hinzugefügt und für 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde nochmals mit PBS bei RT gewaschen, bevor der Primärantikörper auf die Zellen gegeben wurde. Hierzu wurden die verwendeten Antikörper von verschiedenen Spezies und in verschiedenen Konzentrationen mit 4 % Ziegenerum in PBS angesetzt und in die jeweilige Kammer pipettiert, sodass die Oberfläche vollständig bedeckt war. Über Nacht wurde die Kulturplatte dann bei 4 °C schwenkend gelagert.

Im nächsten Schritt wurde viermal für je 10 min mit PBS gewaschen, der Sekundärantikörper mit 4 % Ziegenerum in PBS gemischt und auf die Kammerflächen überführt. Unter lichtdichten Bedingungen wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler inkubiert und anschließend die Zellkerne mit DAPI in einer Konzentration von 1:1000 in PBS gefärbt. Abschließend wurde das *μ-Slide 8 Well* viermal für je 10 min in PBS gewaschen und die Zellen mit 10 % 10x PBS in Glycerol eingedeckt, um das Ausbleichen zu verzögern.

Danach konnte mithilfe des Axiovert 100-Fluoreszenzmikroskopes und dem 63x/1,25 NA-Ölimmersionsobjektiv mikroskopiert werden. Zuerst wurden Durchlichtaufnahmen angefertigt, dann folgten die Fluoreszenzaufnahmen, wobei die Anregungs- und Emissionswellenlängen 325-375 nm/435-485 nm für DAPI und 533-557 nm/570-620 nm für Cy3 betragen.

Mittels *MetaMorph* wurden die zuvor aufgenommenen Mikroskopiebilder bearbeitet, indem die Durchlichtaufnahmen in Grau, die DAPI-Aufnahmen in Cyan und die Cy3-

Aufnahmen in Rot eingefärbt wurden. Zuletzt wurden durch *Photoshop* die Bildauflösung auf 300 Pixel/Zoll geändert und die Bildgröße, den gewünschten Abbildungen entsprechend modifiziert.

### 3.3.2 Proximity Ligation Assay

Um die Protein-Protein-Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 zu charakterisieren wurde der PLA angewendet. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $8 \times 10^4$  Zellen/mL mit antibiotikumfreien Medium in ein *BD Falcon 4 Chamber Culture Slide* ausgesät und für 24 h unter Kultivierungsbedingungen inkubiert (siehe Kapitel 3.1.1).

Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zwei Waschschritten mit auf 37 °C erwärmtem PBS unterzogen, bevor sie dann für 10 min mit 4 % PFA in PBS fixiert wurden. Anschließend konnte das PFA entfernt und die Zellkulturplatte wieder mit PBS gewaschen werden, um dann die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für dreimal 5 min unter Raumtemperatur zu permeabilisieren. Vor dem nächsten Schritt wurde erneut mit PBS gewaschen. Zum Blockieren wurden vier Tropfen der 1x *Duolink Blocking Solution* auf jede Wachstumsfläche gegeben und die Zellkulturplatte für 60 min bei 37 °C in einer vorgewärmten Feuchtigkeitskammer inkubiert. Danach wurde die Lösung aus den Kammern entfernt und der Primärantikörper, in der zuvor durch Immunofluoreszenzfärbung getesteten Konzentration, mit 1x *Duolink Antibody Diluent* angesetzt und in die jeweiligen Kammern gegeben. Über Nacht wurde das *Slide* bei 4 °C auf dem Kippschüttler gelagert.

Anschließend wurde der Primärantikörper entfernt, die Plastikkammern vorsichtig mit einem Trennschieber von der Glaskulturplatte abgelöst und die Glasplatte zweimal für jeweils 5 min in einem Färbetrog nach Coplin mit dem *Duolink Wash Buffer A* auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Wenn nicht anders beschrieben erfolgten die folgenden Waschschriffe ebenfalls in dem Färbetrog nach Coplin auf einem Orbitalshaker. Währenddessen wurden die *Duolink PLA Probes* zusammen in einem Verhältnis von 1:5 in *Duolink Antibody Diluent* verdünnt und nach dem Waschen auf die markierten Flächen der Glasplatte gegeben. Die folgende Inkubationszeit bei 37 °C in einer vorgewärmten Feuchtigkeitskammer betrug 1 h, wobei 20 min vor Ablauf dieser Zeit die *Duolink Ligation*-Stammlösung auf Raumtemperatur gebracht wurde und dann 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt werden musste. Dann wurden die *PLA Probes* entfernt, die Kulturplatte zweimal 5 min in *Duolink Wash Buffer A* gewaschen und

danach die *Duolink Ligase* in einem Verhältnis von 1:40 mit der *Ligation* Lösung gemischt. Die entstandene *Ligation-Ligase*-Lösung wurde auf jede Fläche der ehemaligen Kammern verteilt und in einer vorgewärmten Feuchtigkeitskammer für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde die *Ligation-Ligase*-Lösung von der Glasplatte entfernt und diese zweimal für je 2 min in *Duolink Wash Buffer A* gewaschen. Ab jetzt erfolgte alles Weitere möglichst unter Lichtausschluss durch Abdecken mit Aluminiumfolie. Zwischenzeitlich konnte die *Duolink Amplification Red*-Stammlösung in einem Verhältnis von 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt werden, nach dem Waschen der *Wash Buffer A* vollständig heruntergenommen und die *Duolink Polymerase* 1:80 in der *Amplification*-Lösung verdünnt werden. Von der *Amplification-Polymerase*-Lösung wurden jeweils 70 µL auf jedes Feld gegeben und dann für 100 min bei 37 °C in einer vorgewärmten Feuchtigkeitskammer inkubiert. Anschließend wurde die Lösung von den Kammerflächen entfernt, für jeweils 10 min zweimal in *Duolink Wash Buffer B* gewaschen und danach in 0,01x *Duolink Wash Buffer B* bei 4 °C über Nacht schwenkend aufbewahrt.

Am nächsten Versuchstag wurden die Zellkerne mit DAPI in einer Konzentration von 1:1000 in PBS gefärbt und die Zellen mit einem Deckglas abgedeckt. Danach wurde die Versuchskulturplatte mithilfe des Axiovert 100-Fluoreszenzmikroskopes und dem 63x/1,25 NA-Ölimmersionsobjektiv mikroskopiert. Zuerst wurden Durchlichtaufnahmen angefertigt, dann folgten die Fluoreszenzaufnahmen, wobei die Anregungs- und Emissionswellenlängen 325-375 nm/435-485 nm für DAPI, 470-490 nm/ 505-545 nm für GFP und 553-587 nm/590-650 nm für die PLA-Signale betrugen.

### **3.3.3 Auswertung und Statistik**

Mittels *Photoshop* wurde eine Tonwertkorrektur der Mikroskopieaufnahmen durchgeführt und danach von den Aufnahmen des Experiments, also der PLA-Signale, der Hintergrund durch das Programm *ImageJ* abgezogen. Dabei wurde für jede Aufnahme des gleichen Versuchs derselbe *Rolling ball radius* ausgewählt. In *MetaMorph* konnten so die PLA-Aufnahmen übereinander gelegt werden, sodass *Overlays* entstanden. Hierbei wurde *Red* für die PLA-Signale, *Cyan* für DAPI und *New Hue* für die HT1080-Per2-GFP Zellen der Positivkontrolle genutzt. Wie auch schon bei

den Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung, wurde zuletzt mit *Photoshop* die Bildauflösung und Bildgröße bearbeitet.

Um den PLA mit seinen Signalen statistisch auswerten zu können, wurden die unbearbeiteten Aufnahmen der entsprechenden Kammer der Glaskulturplatte in *ImageJ* geöffnet. Der Hintergrund wurde abgezogen und dann mithilfe des Werkzeugs *Find maxima* die Anzahl der PLA-Signale einer Aufnahme gezählt, wobei für die Aufnahmen der gleichen Kammern eines Versuchs jeweils derselbe Wert für die *Noise tolerance* gewählt wurde. Anschließend wurden die so ermittelten Daten für Experiment, Negativ- und Positivkontrollen in eine Excel-Tabelle eingespeist und diese in *GraphPad Prism* einem ungepaarten t-Test unterzogen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte ebenso durch dieses Programm.

## 4 Ergebnisse

Vor Beginn dieser Arbeit wurde GAPVD1 als Teil des zytoplasmatischen PER-Komplexes zusammen mit CSNK1D gefunden, die auch mit PER2 interagiert (Aryal et al. 2017; Kategaya et al. 2012). Darüber hinaus wurde auch in unserer Arbeitsgruppe GAPVD1 als Interaktionspartner von PER2 nachgewiesen. Hierzu wurden PER2-enhaltende Proteinkomplexe zunächst biochemisch gereinigt, dann eine Co-Immunopräzipitation mit anschließender Massenspektrometrie durchgeführt, in der interagierende Proteine des Zielproteins, PER2, gezeigt werden konnten (Ibrahim et al. 2021).

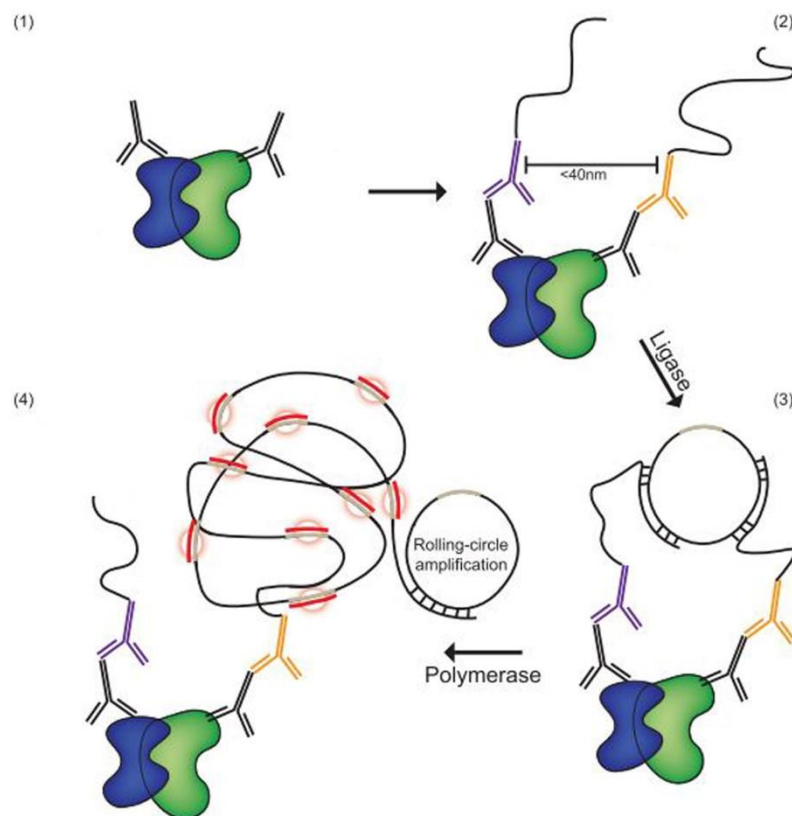
Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Protein-Protein-Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 in einer unabhängigen Methode, dem *in situ* PLA (Soderberg et al. 2006; Soderberg et al. 2008), nachzuweisen, und deren intrazelluläre Lokalisation genauer zu charakterisieren. Das Prinzip dieses Assays beruht darauf, dass die potentiell interagierenden Proteine zunächst in fixierten Proben von zwei verschiedenen Antikörpern spezifisch gebunden werden. Gegen diese Antikörper sind dann im nächsten Schritt wieder zwei verschiedene Sekundärantikörper gerichtet, die mit fluoreszenten Proben gekoppelt sind, die nur dann aufleuchten, wenn beide zu untersuchende Proteine und somit auch die gebundenen Antikörper sich in großer physikalischer Nähe im gleichen Proteinkomplex (<40 nm) zueinander befinden. Wird also mit Hilfe dieser Methode ein fluoreszentes Signal erzeugt, so ist dies zum einen ein Nachweis, dass die beiden Proteine tatsächlich in einer Zelle interagieren. Zum anderen erhält man zusätzlich Informationen, in welchem Zellkompartiment die Interaktion stattfindet, je nachdem, wo das fluoreszente Signal nachgewiesen wird (Hegazy et al. 2020; Wang et al. 2021b).

### 4.1 PLA: Eine *in situ* Methode für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen

In dieser Arbeit sollte also ein *in situ* PLA für den Nachweis der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 entwickelt und etabliert werden. Für die Durchführung der Methode wurden Kits der Firma Sigma Aldrich verwendet.

Das Prinzip dieses Assays ist in Abbildung 6 dargestellt. Es werden fixierte Zellen mit zwei immunfluoreszenzkompatiblen Primärantikörpern inkubiert (Abb. 6 (1)), die auf

verschiedenen Spezies basieren (Alam 2018). Es folgt die Inkubation mit Sekundärantikörpern, den *PLA-Probes* (PLUS und MINUS), welche an die Primärantikörper binden und mit Oligonukleotiden konjugiert sind (Abb. 6(2)) (Hegazy et al. 2020; Soderberg et al. 2008). Befinden sich die zu untersuchenden Proteine in einer Entfernung von unter 40 nm zueinander, hybridisieren zugesetzte freie Oligonukleotide mit den *PLA-Probes* und bilden nach Hinzugabe der Ligase eine geschlossene Kreiskonformation (Abb. 6 (3)). Im letzten Schritt wird eine Polymerase zugegeben, um die *Rolling-Circle Amplifikation* (RCA) zu bewirken (Soderberg et al. 2008), durch die eine einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNS) entsteht, an die anschließend fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide hybridisiert werden, was bei erfolgreicher Rolling-Circle-Amplifikation zu fluoreszierenden Signalen führt (Hegazy et al. 2020). Die als Fluoreszenzsignale dargestellten Interaktionen können durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden, und die Anzahl und Intensität der Signale kann bestimmt werden (Alam 2018).



**Abb. 6: Schematische Darstellung des PLA**

(1) Primärantikörper aus zwei verschiedenen Spezies werden zu Zielproteinen hinzugefügt; (2) *PLA-Probes* und Oligonukleotide binden an Primärantikörper; (3) nach Hinzugabe von freien Oligonukleotiden und Ligase entsteht zirkuläre DNS; (4) mit einer Polymerase kann die RCA stattfinden und fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide können hybridisieren. Bearbeitet nach (Hegazy et al. 2020).

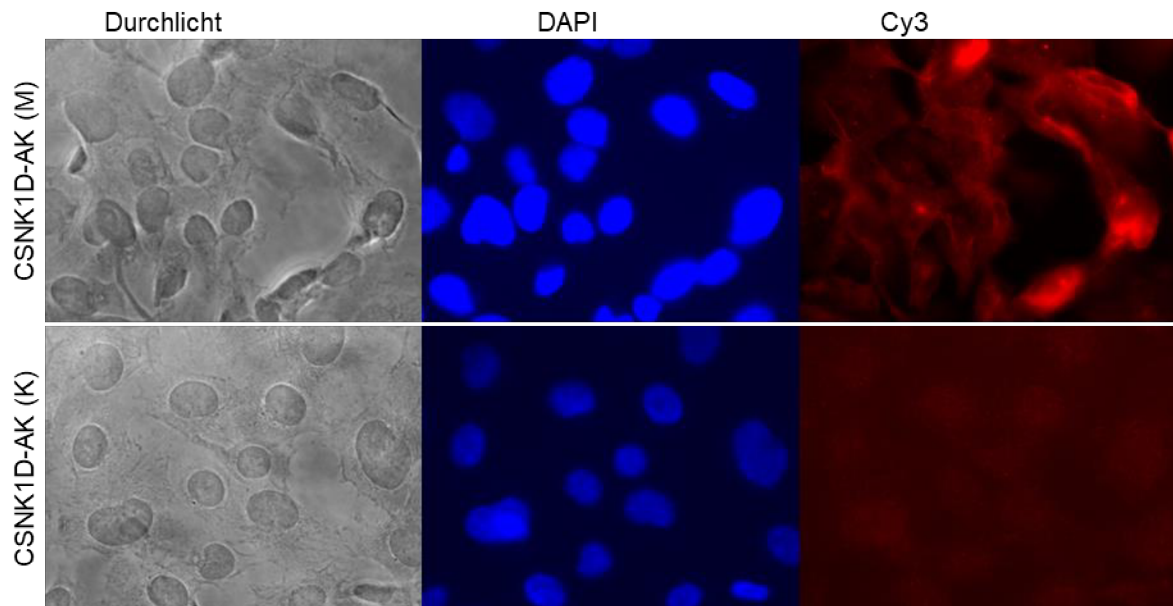
Vor der Durchführung des PLA (siehe Abb.6) war es notwendig die Bedingungen für die Antikörper, die zuvor durch Immunfluoreszenzfärbung getestet werden sollten, zu optimieren und die beste Antikörperkonzentration zu bestimmen (Donaldson 2015). Um von Anfang an kompatibel zu dem nachfolgenden PLA zu bleiben, wurde während der Optimierung der Immunfluoreszenz statt des sonst üblichen Ziegsenrums zum Blockieren die für den PLA vorgeschriebene *Duolink Blocking Solution* eingesetzt, um spezifische Hintergrundsignale zu reduzieren.

## **4.2 Test der Antikörper durch Immunfärbung**

Um den PLA mit dem Nachweis einer Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 durchführen zu können, musste zunächst ein geeigneter Antikörper gegen CSNK1D gefunden werden. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden zwei anti-CSNK1D verschiedener Spezies in HT1080-Zellen getestet und deren Lokalisation publizierten Daten gegenübergestellt, für anti-GAPVD1 erfolgte keine Testung durch Immunfluoreszenzfärbung, da kein etabliertes Referenzmuster vorlag. Der in der Arbeitsgruppe schon etablierte Antikörper gegen GAPVD1 (Mundorf 2021) wurde mittels *Knockdown* auf Spezifität überprüft (siehe Kapitel 4.3.2).

### **4.2.1 Überprüfung verschiedener CSNK1D-Antikörper**

In der Immunfluoreszenzfärbung wurden zwei Antikörper gegen CSNK1D getestet. Es wurden fixierte HT1080-Zellen sowohl mit dem anti-CSNK1D (M), als auch dem anti-CSNK1D (K) inkubiert und anschließend mithilfe des Cy3-Sekundärantikörpers fluoreszenzgefärbt. Der anti-CSNK1D (K) zeigte ein unspezifisches Hintergrundsignal, während sich der anti-CSNK1D (M) hauptsächlich zytoplasmatisch, teilweise mit angefärbtem Zentrosom und wenig Signaldichte im Nukleus darstellte (siehe Abbildung 7). Für die Verwendung im PLA wurde daher der CSNK1D-Antikörper (M) ausgewählt, da sein Verteilungsmuster mit der publizierten Lokalisation überwiegend im Zytoplasma und Koloalisation mit dem Golgi-Apparat übereinstimmte (Milne et al. 2001).

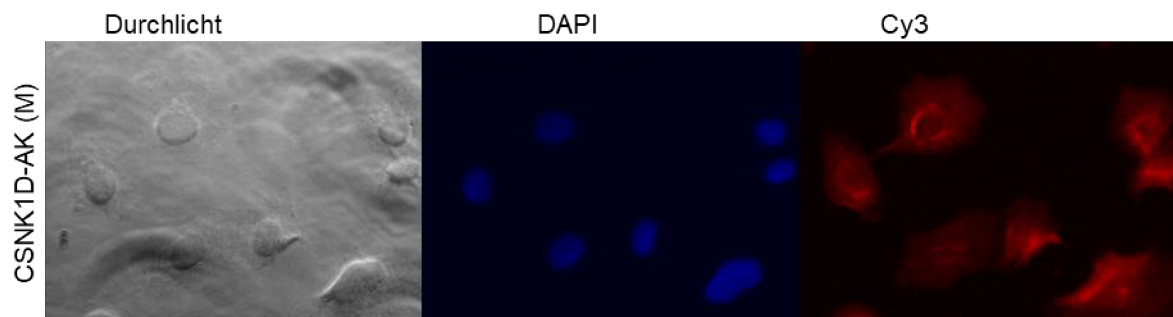


**Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbung anti-CSNK1D**

Immunfluoreszenzaufnahmen zweier Antikörper gegen CSNK1D in HT1080-Zellen (n=1). Von links nach rechts: Durchlichtaufnahme (grau), Kernfärbung DAPI (blau), Fluoreszenzfärbung mit Cy3 (rot). Oben: anti-CSNK1D (M) in einer Konzentration von 1:200. Unten: anti-CSNK1D (K) in einer Konzentration von 1:300.

#### 4.2.2 Bestimmung der optimalen CSNK1D-Antikörperkonzentration

Nach erster Testung beider CSNK1D-Antikörper, wurde für den anti-CSNK1D (M) eine weitere Verdünnungsreihe angefertigt, um die optimale Konzentration für den PLA zu etablieren. Bei einer Konzentration von 1:2500 wurde das beste Verhältnis von spezifischem Signal zu unspezifischem Hintergrundsignal erzielt (Abb. 8). Das Verteilungsmuster entsprach dem des Vorversuches (siehe Kapitel 4.2.1).



**Abb. 8: Optimale Konzentration des anti-CSNK1D (M)**

Immunfluoreszenzaufnahmen des anti-CSNK1D (M) in HT1080-Zellen (n=1). Von links nach rechts: Durchlichtaufnahme (grau), Kernfärbung DAPI (blau), Fluoreszenzfärbung mit Cy3 (rot). Hier dargestellt ist die optimale Konzentration aus der Verdünnungsreihe von 1:2500.

## 4.3 Test der Antikörper durch RNA-Interferenz und Western Blot

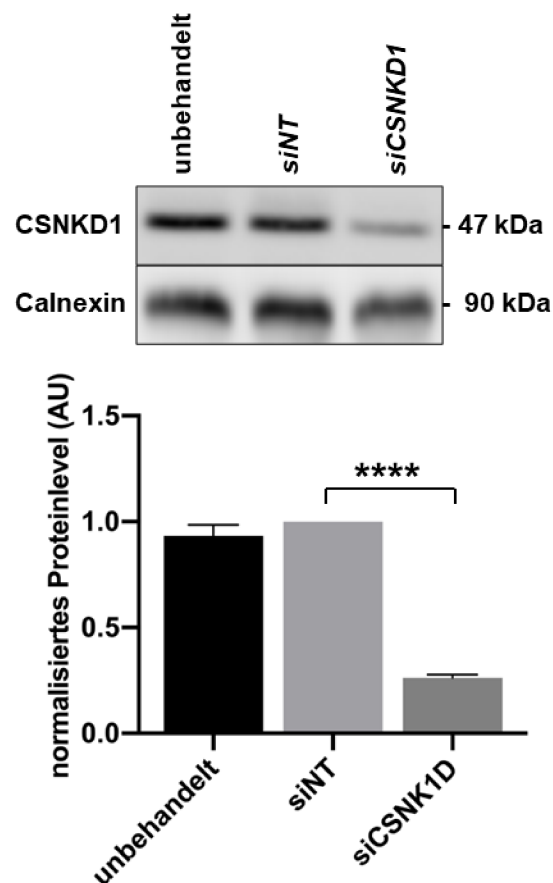
Nachdem die Antikörper in der Immunfluoreszenz getestet worden waren oder zuvor in unserer Arbeitsgruppe schon etabliert waren, folgte die Überprüfung, ob diese die zu untersuchenden Zielproteine CSNK1D und GAPVD1 spezifisch detektieren. Dazu wurde eine RNA-Interferenz (RNAi) durchgeführt, ein sequenzspezifischer, posttranskriptioneller Mechanismus zum Stilllegen von Genen, der erstmals in Nematoden entdeckt wurde (Fire et al. 1998) und durch sequenzspezifische siRNA auch in Säugetierzellen reproduziert werden konnte (Elbashir et al. 2001). Auf dieser Grundlage sollte durch die Transfektion von siRNA ein *Knockdown* der Zielgene herbeigeführt und die entsprechenden Proteinmengen, also die Expression der Zielproteine, durch *Western Blot*-Analysen ausgewertet werden. Bei den siRNAs handelt es sich um synthetisierte, sequenzspezifische Ribonukleinsäuremoleküle mit einer Länge von 21 Basenpaaren, die in Säugetieren die RNAi-Antwort auslöst (Elbashir et al. 2001).

Durch Lipofektion dringt die siRNA in die Zelle ein. Die doppelsträngige RNA (dsRNA) wird direkt appliziert, von den Zellen aufgenommen und in den *RNA-Induced Silencing Complex* (RISC) eingebaut (Röhl und Kurreck 2006), wo der Passagierstrang durch das Protein Argonaute 2 (AGO2) gespalten wird (Rand et al. 2005) und dissoziiert. Der Führungsstrang leitet den RISC zur komplementären *messenger* RNA (mRNA) (Kurreck 2009), die durch die katalytische Komponente des RISC, AGO2, gespalten wird, wodurch der Abbau eingeleitet wird (Liu et al. 2004). Dies führt zum *Knockdown*, also zum meist vollständigen Abbau der betroffenen mRNA und damit zur verminderten Proteinsynthese.

Verwendet wurden spezifische siRNA Pools gegen *Csnk1d* oder *Gapvd1*, sowie ein siNT Pool ohne spezifische Ziel-mRNA und unbehandelte Zellen als Negativkontrollen. Nach Behandlung der Wildtyp HT1080-Zellen mit der entsprechenden siRNA und *Western Blot*-Analyse, wurden die Proteinmengen quantifiziert und mit den Negativkontrollen in einem ungepaarten t-Test verglichen. Untersucht wurden in jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen ein CSNK1D-Antikörper (M), sowie ein GAPVD1-Antikörper (K).

### 4.3.1 Bestätigung der CSNK1D-Antikörperspezifität

Abbildung 9 zeigt, dass nach RNA-Interferenz-Behandlung der HT1080-Zellen mit einer siRNA gegen CSNK1D und Hinzugabe des CSNK1D-Antikörpers (M), eine Proteinbande auf der zu erwartenden Höhe von 47 kDa im *Western Blot* erscheint. Neben den Negativkontrollen der mit siNT behandelten und unbehandelten Zellen, präsentiert sich diese deutlich schwächer. Verglichen mit der siNT-Bande ist das Proteinlevel der siCSNK1D auf 26,15 % herunterreguliert (siehe Abb. 9). Dies bestätigt, dass der CSNK1D-Antikörper (M) tatsächlich spezifisch für CSNK1D ist.

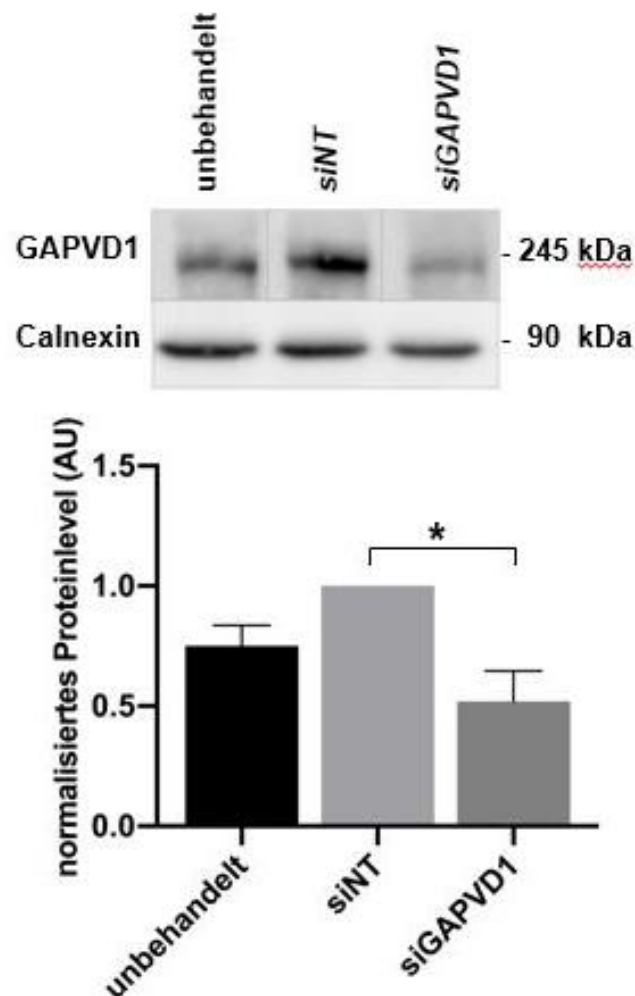


**Abb. 9: Test des anti-CSNK1D durch RNAi**

Die Behandlung der Zellen mit siCSNK1D führt zur Herabregulierung der CSNK1D-Expression. Oben dargestellt ist die Western Blot-Analyse nach *Knockdown* mit siCSNK1D und Hinzugabe des anti-CSNK1D (M); von links nach rechts angeordnet sind die beiden Negativkontrollen mit unbehandelten und siNT-behandelten Zellen, als auch die Behandlung mit siCSNK1D, darunter die Ladekontrolle mit CANX auf einer Höhe von 90 kDa. Unten: statistische Auswertung durch auf siNT genormtes Proteinlevel mit Mittelwerten und Standardfehler (SEM); \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ,  $N=3$ .

### 4.3.2 Bestätigung der GAPVD1-Antikörperspezifität

Nach Behandlung der HT1080-Zellen mit der siGAPVD1 und Western-Blot-Analyse mit anti-GAPVD1 (K), zeigt sich eine Bande in der von GAPVD1 bekannten Höhe bei 245 kDa (Abb. 10). Das Signal stellt sich nach Herunterregulierung entgegen den Banden der Negativkontrollen reduziert dar. Nach *Knockdown* mit siGAPVD1 beträgt das Proteinlevel im Vergleich zu den mit siNT behandelten Zellen 52,04 %, d.h. auch der anti-GAPVD1-Antikörper bindet sein Zielprotein spezifisch.



**Abb. 10: Test des anti-GAPVD1 durch RNAi**

Die RNAi mit siGAPVD1 führt zur Herunterregulierung der GAPVD1-Expression. Oben abgebildet ist die Western Blot-Analyse nach *Knockdown* mit siGAPVD1 und Hinzufügen des anti-GAPVD1 (K); von links nach rechts dargestellt sind die beiden Negativkontrollen mit unbehandelten und siNT-behandelten Zellen, sowie die RNAi mit siGAPVD1; darunter die Ladekontrolle mit CANX auf einer Höhe von 90 kDa. Unten: statistische Auswertung durch auf siNT normalisiertes Proteinlevel mit Mittelwert und SEM; \*,  $p=0,0188$ ,  $N=3$ .

## 4.4 Charakterisierung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 durch PLA

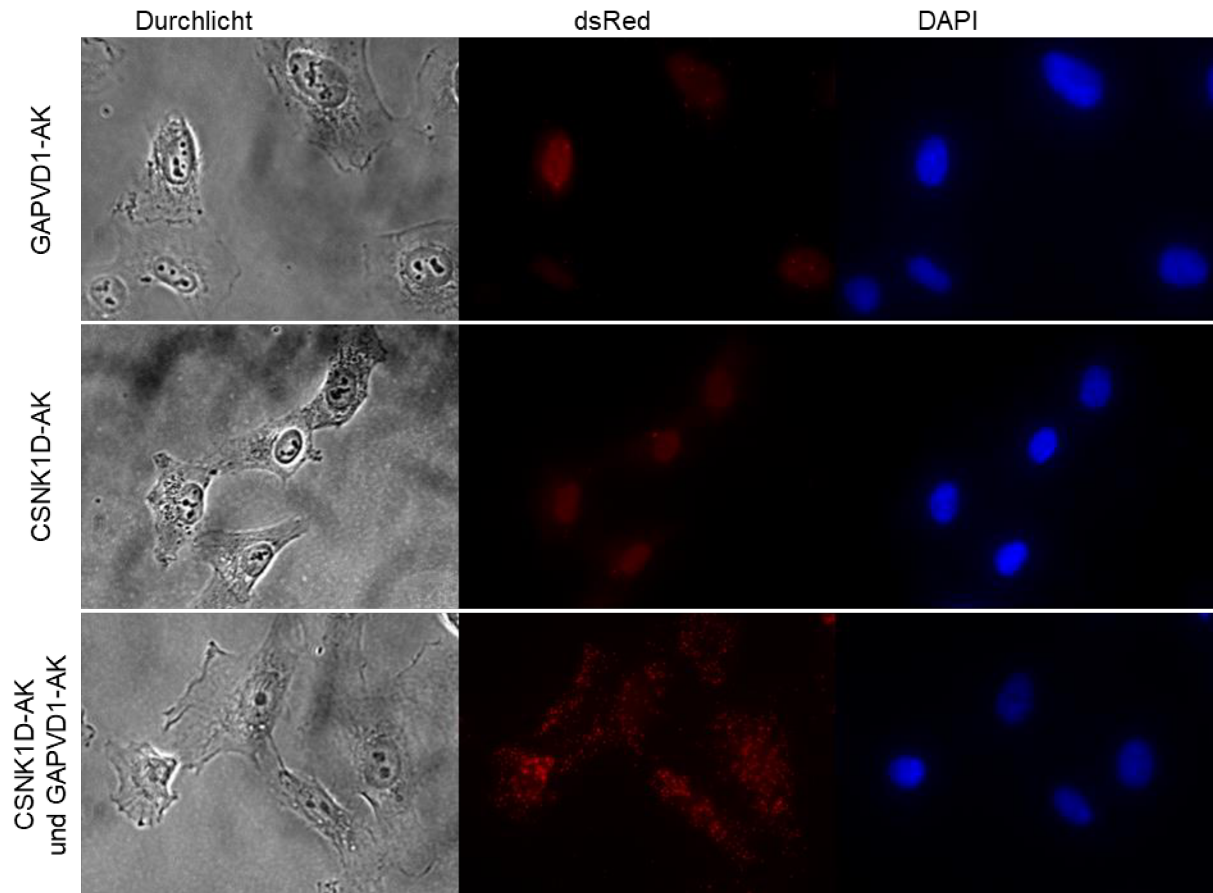
Um die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 zu bestätigen, wurde nach den oben genannten Überprüfungen der Primärantikörper nun der *in situ* PLA in HT1080-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls zwei Negativkontrollen mit jeweils einem der Primärantikörper angefertigt, um eine unspezifische Detektion durch einen der Sekundärantikörper ausschließen zu können. Als Positivkontrolle wurden HT1080-PER2-GFP-Zellen genutzt, die ein Fusionsprotein aus PER2 und dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) exprimieren. Somit ist eine größtmögliche Nähe der beiden Proteine gegeben, und ein PLA mit Antikörpern gegen PER2 und GFP muss daher ein deutlich sichtbares Signal ergeben.

Mithilfe des Fluoreszenzmikroskops wurden verschiedene Aufnahmen erstellt, um die Interaktion der Proteine, sowie ihre intrazelluläre Lokalisation darstellen und anschließend statistisch auswerten zu können. Sowohl das Experiment, als auch die jeweiligen Kontrollen wurden viermal unabhängig voneinander durchgeführt (N=4) und in jedem *Well* wurden ca. 15-20 Aufnahmen zufällig ausgewählter Stellen angefertigt.

### 4.4.1 CSNK1D interagiert mit GAPVD1 in HT1080-Zellen

Für den Nachweis der Protein-Protein-Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 wurde der *in situ* PLA angewandt. Das Experiment wurde mit fixierten HT1080-Zellen durchgeführt, die zunächst mit CSNK1D- (M) und GAPVD1-Primärantikörper (K) inkubiert wurden. Dieselbe Zelllinie wurde auch für die beiden Negativkontrollen verwendet, in denen die Zellen mit jeweils nur einem der beiden Primärantikörper anti-CSNK1D (M) oder anti-GAPVD1 (K) inkubiert wurden. Jede Wiederholung des Experiments wurde auch von einer Positivkontrolle begleitet (siehe Abb. 13). Die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen des Experiments und der Kontrollen sind in zwei repräsentativen Abbildungen dargestellt (siehe Abb. 11 und 13). Die entstandenen PLA-Signale erscheinen nur intrazellulär, wobei die Signale im Zytoplasma scharf erscheinen, während sich solche im Bereich des Zellkerns weniger scharf präsentieren, was auf eine andere Fokusebene dieser Signale zurückzuführen sein könnte. Verglichen mit dem Experiment mit beiden Antikörpern, zeigten sich in den

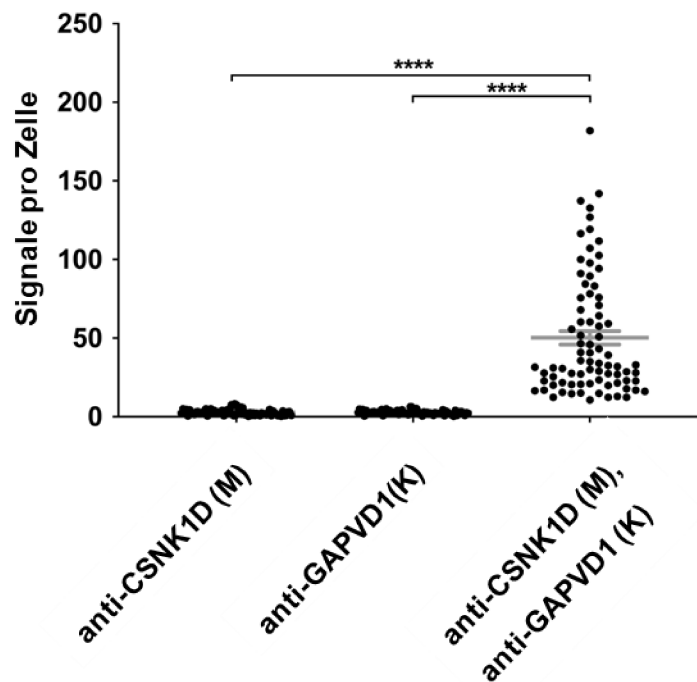
Negativkontrollen deutlich weniger PLA-Signale (siehe Abb.11), was darauf hinweist, dass der PLA die Interaktion zwischen CSNK1D und GAPVD1 spezifisch nachweist.



**Abb. 11: PLA von CSNK1D und GAPVD1 mit Negativkontrollen**

Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen des PLA mit anti-CSNK1D (M) und anti-GAPVD1 (K) mit zwei Negativkontrollen in HT1080-Zellen. Von links nach rechts: Durchlichtaufnahme (grau), PLA-Signale (rot) Kernfärbung DAPI (blau). Von oben nach unten: Negativkontrolle mit anti-GAPVD1 (K), Negativkontrolle mit anti-CSNK1D, Experiment mit anti-CSNK1D (M) und anti-GAPVD1 (K).

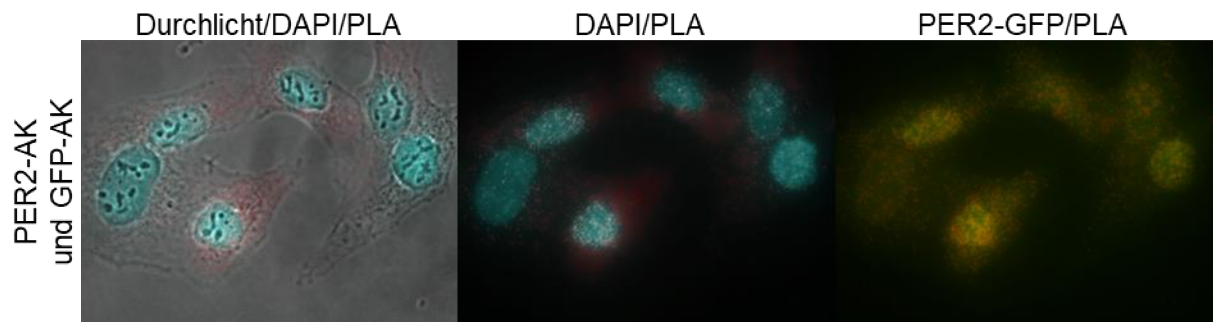
Nach Quantifizierung der insgesamt vier unabhängig voneinander durchgeführten Replikate zeigte die statistische Auswertung der Negativkontrolle mit anti-GAPVD1 (K) im Mittel 2,77 PLA-Signale pro Zelle (n=76 Aufnahmen) und die Negativkontrolle mit anti-CSNK1D (M) einen Mittelwert von 2,85 PLA-Signalen pro Zelle (n=77 Aufnahmen). Im Gegensatz dazu entstanden im Experiment mit anti-CSNK1D und anti-GAPVD1 im Durchschnitt 50,27 PLA-Signale pro Zelle (n=80 Aufnahmen). Dieser statistisch signifikante Unterschied mit einem p-Wert <0,0001 bestätigt im ungepaarten t-Test die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 (siehe Abb.12).



**Abb. 12: Bestätigung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1**

Statistische Auswertung des PLA mit anti-CSNK1D (M) und anti-GAPVD1 (K) in HT1080-Zellen und dessen Negativkontrollen. Von links nach rechts: Negativkontrolle mit anti-CSNK1D (M) mit einem Mittelwert von 2,85 PLA-Signalen pro Zelle (n=77 Aufnahmen); Negativkontrolle mit anti-GAPVD1 (K) mit einem Mittelwert von 2,77 PLA-Signalen pro Zelle (n=76 Aufnahmen); Experiment mit anti-CSNK1D (M) und anti-GAPVD1 (K) mit einem Mittelwert von 50,27 PLA-Signalen pro Zelle (n=80 Aufnahmen). Verglichen mit den Negativkontrollen, ist das Ergebnis des Experiments mit beiden Antikörpern im ungepaarten t-Test statistisch signifikant. Dargestellt sind PLA-Signale pro Aufnahme mit Mittelwert und SEM; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ,  $N=4$ .

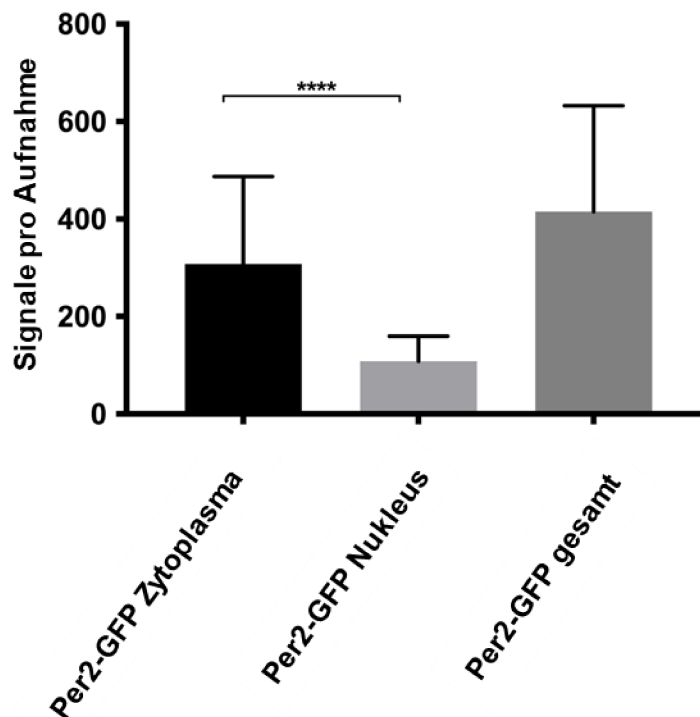
Als Positivkontrolle des Experiments dienten PER2 und GFP in HT1080-PER2-GFP-Zellen, die stabil PER2-GFP exprimieren (Kalfalah et al. 2016). Hierbei wurde ein PER2-Antikörper (K) und ein GFP-Antikörper (M) verschiedener Spezies als Primärantikörper genutzt. Die entstandenen PLA-Signale erscheinen hauptsächlich im Zytoplasma und sind dort scharf dargestellt, während die Signale im Bereich des Zellkerns weniger scharf sind und möglicherweise in einer anderen Zellebene lokalisiert sind (siehe Abbildung 13).



**Abb. 13: PLA Positivkontrolle in HT1080-PER2-GFP-Zellen**

Fluoreszenzmikroskopie der Positivkontrolle mit anti-PER2 (K) und anti-GFP (M) in HT1080-PER2-GFP-Zellen. Von links nach rechts dargestellt sind Overlays aus Durchlicht (grau), Kernfärbung DAPI (cyan) und PLA-Signalen (rot), in der Mitte Overlays aus Kernfärbung DAPI (cyan) und PLA-Signalen (rot), sowie Overlays aus PER2-GFP (grün) und PLA-Signalen (rot). Im Bereich des Zellkerns sind die PLA-Signale unschärfer als im Zytoplasma.

Die statistische Auswertung der Positivkontrolle (siehe Abbildung 14) von Per2-GFP zeigte im Mittel 307 PLA-Signale im Zytoplasma und 108,1 PLA-Signale im Nukleus pro Aufnahmen (n=67 Aufnahmen). Somit ist die zytoplasmatische Lokalisation der PLA-Signale im ungepaarten t-Test statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Ebenso konnte durch diese Kontrolle der *in situ* PLA verifiziert werden.

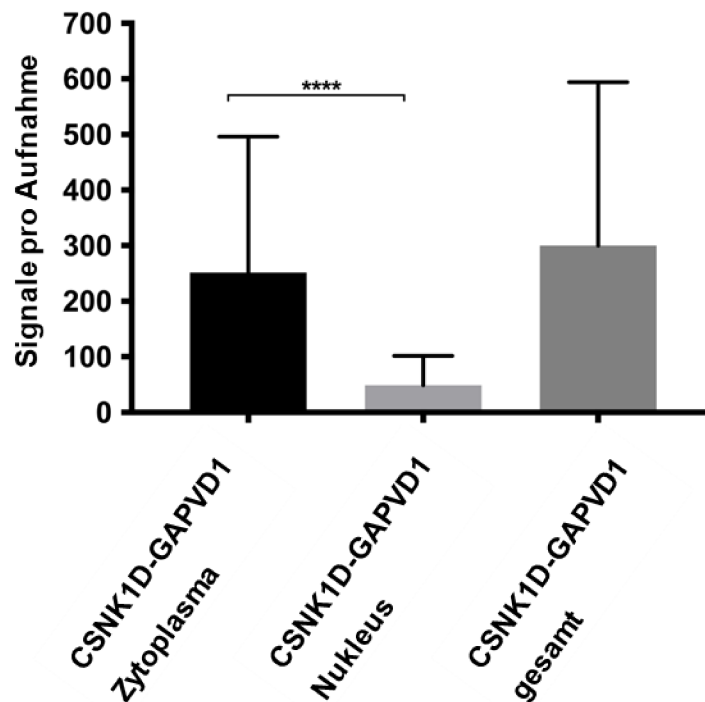


**Abb. 14: Statistische Auswertung der PER2-GFP Positivkontrolle**

Das Balkendiagramm zeigt die PLA-Signale pro Aufnahme der Positivkontrolle in HT1080-PER2-GFP-Zellen. Von links nach rechts: Anzahl der PLA-Signale im Zytoplasma, im Nukleus und insgesamt. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ,  $N=4$ .

#### 4.4.2 CSNK1D und GAPVD1 interagieren im Zytoplasma

Nach Bestätigung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 (siehe Kapitel 4.4.1), sollte der Interaktionsort der Proteine bestimmt werden, nachdem in den Mikroskopieaufnahmen (siehe Abb. 11) die überwiegende Anzahl der PLA-Signale im Zytoplasma auftraten, während die Signale in der Nähe des Zellkerns weniger und unschärfer erschienen. Die Statistik zeigte im Mittel 251,9 PLA-Signale pro Aufnahme ( $n=80$ ) im Zytoplasma und 48,56 PLA-Signale pro Aufnahme ( $n=80$ ) im Bereich des Zellkerns. Der Unterschied beider Lokalisationen ist mit einem  $p$ -Wert  $< 0,0001$  statistisch signifikant und zeigt, dass die Protein-Protein-Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 mehrheitlich im Zytoplasma stattfindet.



**Abb. 15: Lokalisation der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1**

Statistische Auswertung des PLA mit anti-CSNK1D (M) und anti-GAPVD1 (K) in HT1080-Zellen. Von links nach rechts: PLA-Signale im Zytoplasma, PLA-Signale im Nukleus, PLA-Signale insgesamt. Verglichen mit der Anzahl der PLA-Signale im Nukleus, ist die Lokalisation der PLA-Signale und damit auch die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 im ungepaarten t-Test statistisch signifikant. Dargestellt sind PLA-Signale pro Aufnahme (n=80) mit Mittelwert und SEM; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ , N=4.

## 5 Diskussion

### 5.1 Bestätigung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 durch PLA

#### 5.1.1 Validierung der in der PLA eingesetzten Antikörper

Die Primärantikörper gegen die zu untersuchenden Proteine, in dieser Arbeit CSNK1D und GAPVD1, sind ein zentraler Bestandteil der PLA-Methode. Ihre Spezifität ist entscheidend für die Aussagekraft des PLAs (Debaize et al. 2017), weshalb die Antikörper zuvor durch zwei unabhängige Methoden validiert wurden.

Im PLA werden zwei Immunfluoreszenz-kompatible Primärantikörper gegen die Zielproteine benötigt (Alam 2018), in diesem Fall gegen CSNK1D und GAPVD1. Der anti-GAPVD1 (K) war zuvor schon in der Arbeitsgruppe etabliert und für den PLA standardisiert (Mundorf 2021). Um einen geeigneten anti-CSNK1D-Antikörper zu etablieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit zwei unterschiedlichen CSNK1D-Antikörpern in HT1080-Zellen durchgeführt. Da keine Zelllinie vorhanden war, die fluoreszenzmarkiertes CSNK1D exprimiert, musste das erhaltene Muster mit publizierten Daten verglichen werden. Hierbei zeigte der anti-CSNK1D (M) eine subzelluläre Lokalisation hauptsächlich im Zytoplasma und in der Peripherie des Nukleus. Dies entspricht auch der publizierten zell- und speziesunabhängigen Lokalisation im Zytoplasma und perinukleär und weist auf eine Lokalisation am Golgi-Apparat hin (Milne et al. 2001; Behrend et al. 2000). Im Gegensatz dazu zeigte der anti-CSNK1D (K) überwiegend diffuse und weniger starke Signale, weshalb dieser für den PLA weniger geeignet schien. Wie von Donaldson (2015) beschrieben, wurde eine Verdünnungsreihe des anti-CSNK1D (M) angefertigt, um CSNK1D optimal zu markieren. Anschließend wurde die vermutliche Spezifität der Antikörperfärbung in einem *Western Blot* bestätigt, um die Färbung auf das Vorhandensein von CSNK1D zurückführen zu können. Der gleiche Test wurde parallel auch mit dem bereits etablierten anti-GAPVD1-Antikörper durchgeführt.

In der *Western Blot*-Analyse der *Knockdown*-Experimente von CSNK1D und GAPVD1 durch siRNA, kam es zu einer signifikanten Abnahme der Expression beider Proteine und damit auch zu einer reduzierten Signalintensität durch die getesteten Antikörper. Jedoch muss kritisch festgehalten werden, dass es durch die SDS-PAGE mit Erhitzen der Proben bei 95 °C zur Denaturierung der Proteine kommt, während sowohl in der

Immunfluoreszenzfärbung, als auch im PLA die Proteine weitestgehend nativ vorliegen. Es ist also möglich, dass ein Antikörper das Zielprotein in der Immunfluoreszenz detektiert, während die aufgetrennten und denaturierten Proteine im *Western Blot* durch denselben Antikörper nicht erkannt werden (Donaldson 2015). Eine andere Methode, um die besten Paare der Primärantikörper zu validieren, nutzen Debaize et al. (2017). Sie nutzten einfach eine Reihe kommerziell erhältlicher Antikörper und testeten alle möglichen Kombinationen an Antikörperpaaren auf die Signalstärke bei dem PLA. Die beste Kombination wurde weiterverwendet. Das Antikörperpaar mit den wenigsten PLA-Signalen wurde so interpretiert, dass wahrscheinlich ein Antikörper nicht nahe genug an dem anderen das Zielprotein band und daher für den PLA nicht genutzt werden sollte.

In der Zusammenschau der Untersuchungen beider primären Antikörper gegen CSNK1D und GAPVD1 zeigten sich vor allem der anti-CSNK1D (M) und der anti-GAPVD1 (K) als spezifisch und affin für die Zielproteine und damit als wahrscheinlich geeignet für den PLA. Diese Einschätzung wurde durch den nachfolgenden sehr effektiven PLA bekräftigt, denn die Spezifität des PLAs ist abhängig von der Qualität der Antikörper und wird durch den am wenigsten spezifischen Primärantikörper limitiert (Debaize et al. 2017; Wang et al. 2021b; Bagchi et al. 2015).

### **5.1.2 Nutzen und Limitationen des PLA**

Der PLA ist eine hochsensitive Methode, um Protein-Protein-Interaktionen in Zellen oder Geweben nachzuweisen, ohne zuvor die Zellen genetisch zu manipulieren (Alam 2018). Jedoch gibt es auch Kritikpunkte der Methode, die an dieser Stelle diskutiert werden sollten.

In der Literatur besteht ein Konsens darüber, dass neben dem PLA mit den Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine auch Kontrollen durch dieselbe Methode durchgeführt werden sollten. Als Positivkontrolle können Proteine dienen, die nachgewiesenermaßen kolokalisieren oder interagieren (Bagchi et al. 2015), sowie Zellen, die eben diese Proteine endogen oder auch nach Transfektion exprimieren (Leuchowius et al. 2011). Daher wurden in dieser Arbeit als Positivkontrolle HT1080-PER2-GFP-Zellen mit einem anti-PER2 (K) und einem anti-GFP (M) erfolgreich verwendet. Wie auch in dieser Arbeit, erfolgen in der Regel die Negativkontrollen durch Hinzugabe nur einer der beiden Primärantikörper. Zu viele Hintergrundsignale in dieser

Kontrolle können auf einen fehlerhaft durchgeführten PLA hinweisen, während durch eine Negativkontrolle mit RNAi-behandelten Zellen die Antikörperspezifität und auch der PLA beurteilt werden könnten (Bagchi et al. 2015; Leuchowius et al. 2011). Diese Durchführung der Negativkontrollen stellt jedoch für Alsemarz et al. (2018) einen Diskussionspunkt dar, da unter ihren Versuchsbedingungen in den Negativkontrollen immer nur keine bis wenige PLA-Signale entstanden. Laut ihrer Auffassung kann so nur die Spezifität der Antikörper kontrolliert werden, nicht aber die PLA-Methode selbst. Daher sollten zukünftig Negativkontrollen entwickelt werden, die den PLA als solchen validieren können.

Der *in situ* PLA wird seit seiner Entwicklung (Soderberg et al. 2006; Soderberg et al. 2008) für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt, kann aber letztlich nur die Nähe zweier Epitope von unter 40 nm und damit keine direkte Interaktion von zwei Proteinen nachweisen (Leuchowius et al. 2011). So ist es möglich, dass CSNK1D und GAPVD1 trotz der signifikanten Ergebnisse im PLA nicht direkt miteinander interagieren, sondern indirekt über andere Proteine, wie z.B. PER2 im reifen zytoplasmatischen PER-Komplex (Aryal et al. 2017). Damit wird das Problem falsch positiver PLA-Signale offengelegt, die keine spezifische Aussage erlauben. So beschreiben einige Autoren, dass positive Signale auch ohne jegliche Interaktion entstehen können, wenn sich zwei Proteine aufgrund einer hohen Konzentration nah genug aneinander befinden (Leuchowius et al. 2011) und so auch die entsprechenden primären Antikörper lokal in großer Menge binden (Alsemarz et al. 2018). Ein falsch positives Signal kann ebenso durch einen für das Zielprotein unspezifischen Primärantikörper entstehen, der ähnliche Epitope in anderen, unbekannten Proteinen bindet (Wang et al. 2021b).

Darüber hinaus muss die absolute Signalanzahl in den PLA-Aufnahmen vor dem Hintergrund einiger Beobachtungen beurteilt werden. Normalerweise sollte jedes Signal eine Nähe zweier Proteine darstellen. Jedoch können bei sehr hoher Signaldichte aufgrund einer hohen Expression der Zielproteine die PLA-Signale verschmelzen und die absolute Anzahl verzerren (Leuchowius et al. 2011). Alam (2018) weist darauf hin, dass es zu solch einer Signalkoaleszenz auch durch eine hohe Konzentration des primären Antikörpers oder durch eine Überbelichtung während der Mikroskopieaufnahmen kommen kann. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass die Anzahl der PLA-Signale die tatsächlichen Protein-Protein-Interaktionen widerspiegeln. Beispielsweise können Proteine nicht detektiert werden, wenn ihre Epitope sterisch

blockiert sind (Leuchowius et al. 2011; Mocanu et al. 2011). Ebenso wurde ein nichtlinearer Sättigungseffekt der Signale beobachtet, der vermutlich während des RCA-Schrittes abläuft, aber noch genauer untersucht werden muss (Mocanu et al. 2011).

Eine weitere Schwäche ist, dass es zu einer Antigenmaskierung innerhalb dichter Strukturen, wie dem Zellkern kommen kann und verschiedene Bestandteile des *in situ* PLAs eine unterschiedlich begrenzte Diffusionsfähigkeit und damit Zugang zu diesem haben (Alsemarz et al. 2018). Dies könnte dazu führen, dass die PLA-Signale leichter und damit überwiegend im Zytoplasma entstehen. Auch in dem hier durchgeführten PLA von CSNK1D und GAPVD1, stellten sich die Signale hauptsächlich zytoplasmatisch dar, während nur wenige im Bereich des Nukleus auftraten. Auffällig war, dass die nukleären PLA-Signale in allen Experimenten unscharf im Vergleich zu den zytoplasmatischen Signalen schienen und eine scharfe Fokussierung beider Signallokalisationen in einer Aufnahme nicht möglich war. Dies könnte auf eine Lokalisation in unterschiedlichen Zellebenen zurückzuführen sein. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, könnten die Bildaufnahmen der PLA-Signale in zukünftigen Versuchen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie erstellt werden, wodurch die Signale jeweils in ihrer Fokusebene auch bezüglich ihrer subzellulären Verteilung objektiver beurteilt werden können und Fluoreszenzpunkte anderer Ebenen ausgeblendet werden.

Aufgrund der Schwächen der *in situ* PLA-Methode, die teilweise auch intrinsischen Ursprungs sind, sollte ein positives Ergebnis und damit eine mögliche Protein-Protein-Interaktion durch eine zusätzliche Methode bestätigt werden. Empfohlen wird von Leuchowius et al. (2011) die Immunpräzipitation. Tatsächlich konnte in unserem Labor mit Hilfe dieser Methode die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 nachgewiesen und die PLA-Ergebnisse mit anti-CSNK1D (M) und anti-GAPVD1 (K) verifiziert werden (Ibrahim et al. 2021).

Demgegenüber bietet der *in situ* PLA einige Vorteile, um Proteine und Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen und ist inzwischen in vielen Forschungsbereichen als Methode etabliert.

Ein Vorzug der PLA-Methode ist, dass die detektierten Fluoreszenzsignale mithilfe von Programmen automatisiert ausgewertet werden können und in einem späteren Schritt einfacher statistisch aufzubereiten sind (Hegazy et al. 2020). Hierfür stehen einige kommerzielle Programme zur Verfügung, wobei in dieser Arbeit *ImageJ* u.a. mit der

Funktion *Find Maxima* zum Zählen der Signale verwendet wurde. Somit konnten alle Versuchsreplikate standardisiert quantifiziert werden.

Einer der bedeutsamsten Vorteile des PLAs im Vergleich zu anderen Methoden ist, dass Protein-Protein-Interaktionen endogener Proteine mit hoher Spezifität und Sensitivität nachgewiesen werden können (Fredriksson et al. 2002; Gullberg et al. 2004; Soderberg et al. 2006). Zudem kann der PLA in allen Zellen und Geweben - *in situ* – und mit allen Proteinen durchgeführt werden, für die geeignete Antikörper genutzt werden können, was die Wiederholbarkeit des Experiments vereinfacht (Soderberg et al. 2008). Auch ist die Methode sensitiv für niedrig exprimierte Proteine, sodass PLA-Signale entstehen können, auch wenn Proteine oder Protein-Protein-Interaktionen zuvor in anderen Methoden nicht nachgewiesen werden konnten (Leuchowius et al. 2011). So können auch neue Proteininteraktionspartner identifiziert und die subzelluläre Lokalisation bestimmt werden, da die entstehenden PLA-Fluoreszenzsignale leicht unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und ausgewertet werden können (Debaize et al. 2017).

### **5.1.3 Weitere Methoden zur Überprüfung von Protein-Protein-Interaktionen**

Alternativ zum PLA gibt es auch weitere Methoden um eine Interaktion zweier Proteine nachzuweisen. Dazu eignet sich die Co-Immunopräzipitation (Co-IP), eine biochemische Methode, die 1975 entwickelt (Kessler 1975) und durch den *Western Blot* ergänzt wurde (Towbin et al. 1979). Sie kann *in vivo* mit Proben aus Geweben oder *in vitro* aus Zellkulturen durchgeführt werden und neue Interaktionspartner identifizieren (Isono und Schwechheimer 2010). Der Erfolg der Co-IP ist abhängig von der Antikörperspezifität und der Menge der Proteine im Gesamtzellextrakt, da die relative Häufigkeit der Proteine deren Fähigkeit zur Kopräzipitation beeinflussen kann (Elion 2007). Wichtig ist, dass gegen die nativen Zielproteine ein spezifischer Antikörper vorhanden ist oder die Proteine mit einem Epitop markiert werden, das von einem spezifischen Antikörper erkannt wird (Elion 2007; Kuroda et al. 2006), beispielsweise Myc oder FLAG (Evan et al. 1985; Hopp et al. 1988; Knappik und Plückthun 1994). Der Nachteil der klassischen Co-IP besteht darin, dass z.B. bei niedriger endogener Proteinexpression, schwacher oder flüchtiger Protein-Protein-

Interaktion und wenig spezifischen Antikörpern eine Wechselwirkung der untersuchten Proteine nicht zu identifizieren ist (Tang und Takahashi 2018).

Eine weitere Alternative ist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), ein strahlungsfreier Energietransfer zwischen einem Donor in angeregtem Zustand und einem Akzeptor im Grundzustand (Förster 1948), wenn diese sich in einem Abstand von bis zu 10 nm befinden (Stryer 1978; Jares-Erijman und Jovin 2003). FRET gilt im Nanometerbereich bei Benutzung von Fluoreszenzfarbstoffen als molekulares Lineal und eignet sich zur Identifizierung makromolekularer Strukturen, wie Protein-Protein-Interaktionen (Stryer und Haugland 1967; Algar et al. 2019).

## 5.2 Funktionen der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1

Zu Beginn meiner Experimente 2017 wurden CSNK1D und GAPVD1 zusammen neben PER1, PER2, PER3, CRY1 und CRY2 in einem zytoplasmatischen PER-Komplex entdeckt (Aryal et al. 2017; Ibrahim et al. 2021). Im Laufe der Arbeit konnte eine Protein-Protein-Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 *in situ* durch den PLA nachgewiesen werden, wobei diese signifikant im Zytoplasma identifiziert wurde. Es stellte sich also die Frage, welche Funktion diese Interaktion ausübt und vor allem, ob eines der Proteine das andere modifizieren kann und somit in seiner Funktion verändern könnte.

Da CSNK1D, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, als Proteinkinase durch Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation an zahlreichen Prozessen innerhalb und auch außerhalb der circadianen Uhr eine Rolle spielt (Knippschild et al. 2005), war es wahrscheinlich, dass durch die Interaktion der beiden Proteine CSNK1D die Funktion von GAPVD1 durch eine Phosphorylierung beeinflusst.

Seit langem wird vermutet, dass CSNK1D besonders aktiv bei geprimten Substraten ist, in deren Sequenz eine Phosphatgruppe oder saure Gruppe (Anion) vor dem Zielthreonin oder -Serin liegt, beispielsweise wie das geprimte Substrat pSxxS (Flotow et al. 1990). Andererseits existieren auch Substrate, die keine voranstehende, negative Ladung besitzen, also nicht geprimed sind, wie die Phosphodegronstelle in PER2 (Eide et al. 2005). CSNK1D kann also geprimte und nicht-geprimte Aminosäurereste in PER2 mit unterschiedlicher Effizienz phosphorylieren (Narasimamurthy und Virshup 2021), aber auch selbst als *Priming*-Kinase für die FASP-Stelle diese phosphorylieren und gewinnt dadurch eine noch größere

Bedeutung in der Regulation von PER2 und der circadianen Uhr (Narasimamurthy et al. 2018).

Besonders in Bezug auf die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 könnten die neu gewonnenen Erkenntnisse zur Substratspezifität von CSNK1D eine wichtige Rolle spielen. Anders als bei anderen Proteinkinasen wird die Substratspezifität von CSNK1D nämlich durch eine flexible Aktivierungsschleife reguliert, die auf ihrer Oberfläche drei Anionenbindungsseiten besitzt und im Wildtyp in der *loop down* Position konformiert ist, in welcher der Substratbindungsspalt geöffnet ist (Longenecker et al. 1996; Philpott et al. 2020). Anhand von Untersuchungen mit dem CSNK1E-Tau-Allel, welches zu einer Verkürzung der Periodenlänge auf 20 h führt (Ralph und Menaker 1988; Lowrey et al. 2000), konnte gezeigt werden, dass durch die Tau-Mutation an der Anionenbindungsseite 1 der Anionenbindungstasche das *Priming* und die FASP-Phosphorylierung reduziert werden, während es zu einer Zunahme der Aktivität an der Phosphodegronstelle kommt (Philpott et al. 2020). An der Kristallstruktur von CSNK1D-Tau wurde nicht nur eine Störung der Anionenbindungsseite 1, sondern auch eine sterische Blockade der Anionenbindungsseite 2 durch eine alternative *loop up* Konformation der Aktivierungsschleife in Tau festgestellt, sodass insgesamt eine Umkehr der Substratselektivität von CSNK1D und ein erhöhter PER2-Abbau durch die Tau-induzierte Konformationsänderung stattfindet (Philpott et al. 2020; Narasimamurthy und Virshup 2021). Tau stabilisiert die *loop up* Stellung der Aktivierungsschleife von CSNK1D und führt zu einem Verlust der Kinaseaktivität bei geprimten Substraten oder beim *Priming* selbst durch Verhinderung der Anionenbindung an Seite 2, wohingegen die Kinaseaktivität an der Phosphodegronstelle von PER2 erhöht wird, weil in dieser Konformation zusätzlich der Substratbindungsspalt durchgängiger geöffnet ist (Philpott et al. 2020). Nicht nur dieser beschriebene Konformationsschalter der Aktivierungsschleife kann die Kinaseaktivität von CSNK1D und damit auch die PER2-Stabilität regulieren, sondern auch die Autophosphorylierung des C-terminalen Schwanzes, wodurch die Kinaseaktivität von CSNK1D gehemmt wird (Graves und Roach 1995; Philpott et al. 2020).

Besonders bedeutsam für die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 sind die Untersuchungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe, durch die eine neue Funktion des PER-Komplexes identifiziert werden konnte: die CSNK1D-abhängige Phosphorylierung von GAPVD1 (Ibrahim et al. 2021). Für den Grad der

Phosphorylierung spielt die Kinaseaktivität von CSNK1D eine wesentliche Rolle; für die dynamische Phosphorylierung als solche sind aber CSNK1D und PER2 erforderlich (Ibrahim et al. 2021). Auch lassen die Ergebnisse vermuten, dass PER2 der autoinhibitorischen Aktivität am C-Terminus von CSNK1D entgegenwirkt und auf diese Weise die GAPVD1-Phosphorylierung antreibt (Ibrahim et al. 2021). Diese Interaktion könnte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein, ebenso die Frage, wie sich die Phosphorylierung von GAPVD1 auf zelluläre Prozesse auswirkt. Es wird vermutet, dass CSNK1D durch die Phosphorylierung von GAPVD1 die Endozytose beeinflussen kann (Guillen et al. 2020).

### 5.3 Relevanz in der Pathogenese

CSNK1D und GAPVD1 sind nicht nur Bestandteile der circadianen Uhr und üben in ihr wichtige Funktionen in zentralen Abläufen aus, sondern sie sind beide auch in vielfältige andere Prozesse involviert. Darüber hinaus können beide Proteine in der Genese von Krankheiten, aber auch in Therapieansätzen integriert sein.

So scheint CSNK1D in der Lymphozytenphysiologie und lymphoiden Neoplasmen beteiligt zu sein, da nach mitogener Stimulation die Kinaseaktivitäts- und Proteinwerte von CSNK1D zunehmen und so eine Rolle in der Lymphozytenproliferation möglich ist (Maritzen et al. 2003). Die Autoren konnten darüber hinaus in hyperplastischen B-Follikeln und fortgeschrittenen B-Zell-Lymphomen p53 defizienter Mäuse eine erhöhte Expression von CSNK1D nachweisen. In verschiedenen Lymphomzelllinien ist bestätigt worden, dass alle CSNK1D stark exprimieren und eine nicht mutierte kodierende Sequenz aufweisen, weshalb CSNK1D-Inhibitoren eine neue Therapieoption bei malignen Lymphomen darstellen könnten (Winkler et al. 2015).

Auch in dukalen Adenokarzinomen des Pankreas wird CSNK1D verstärkt exprimiert und kann vermutlich zu einem aggressiven Tumorwachstum beitragen, das durch einen CSNK1D-Inhibitor reduziert wird (Brockschmidt et al. 2008). Dieser erhöht die Apoptoserate, verringert das Tumorwachstum ähnlich stark wie die Behandlung mit Gemcitabin und könnte daher ein neuer Ansatzpunkt in der Therapie sein (Brockschmidt et al. 2008). Die R342H-Mutation in der C-terminalen Domäne von *Csnk1d* fördert unabhängig vom Wnt-/β-Catenin-Weg die Entstehung von kolorektalen Adenomen und wird daher als potenziell onkogen angesehen (Tsai et al. 2007). Ebenfalls Wnt/β-Catenin-unabhängig, aber abhängig von inaktivem p53 und

aktiviertem RAS induziert der CSNK1D/E spezifische Inhibitor IC261 einen Zellzyklusstillstand und Apoptose von Krebszellen (Cheong und Virshup 2011; Cheong et al. 2011).

Eine weitere Mutation von *Csnk1d*, die T67S-Mutation, führt zu einer höheren Kinaseaktivität, sowie erhöhtem Wachstum und Proliferation in kolorektalen Tumorzellen mit verstärkter Koloniebildung auf Agarplatten (Richter et al. 2015). Mit Fokus auf das kolorektale Karzinom konnte gezeigt werden, dass eine verringerte CSNK1D-Expression im Gewebe von niedriggradigen rechtsseitigen Tumoren mit einer längeren Überlebensrate korreliert und CSNK1D in Zukunft als prognostischer Biomarker und Ansatz neuer Therapien des kolorektalen Karzinoms genutzt werden könnte (Richter et al. 2016). CSNK1D könnte zusätzlich auch in der Prävention des kolorektalen Karzinoms wichtig sein, da sieben *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) des Gens im Wnt-/ $\beta$ -Catenin-Signalweg mit einem signifikanten Darmkrebsrisiko verbunden sind (Hildebrandt et al. 2016).

Auch in der Genese des Brustkrebs wird CSNK1D eine wichtige Rolle zugeschrieben, da eine verringerte Aktivität einer *Csnk1d*-Mutation die Simian-Virus 40 (SV40) vermittelte Zelltransformation und die SV40-induzierte Mammakarzinogenese in der Maus abschwächt (Hirner et al. 2012). CSNK1D kann ein aussichtsreiches Ziel für die Therapie von Brustkrebs sein (Rosenberg et al. 2015). Die Autoren konnten nachweisen, dass CSNK1D in allen wichtigen menschlichen Brustkrebs-Subtypen amplifiziert oder überexprimiert wird und dass der spezifische CSNK1D-Inhibitor SR-3029 selektiv zur Apoptose von CSNK1D-überexprimierenden Brustkrebszellen, zur Hemmung des Tumorwachstums und einer längeren Überlebenszeit führt. Darüber hinaus berichten sie, dass CSNK1D-exprimierende Brustkrebszellen mit dem Wnt-/ $\beta$ -Catenin-Signalweg verbunden sind, was dadurch unterstützt wird, dass die Ausschaltung oder Hemmung von CSNK1D die Expression von endogenen  $\beta$ -Catenin/TCF-Zielgenen schwächt und die Apoptose von Brustkrebszellen eingeleitet werden kann. Interessanterweise zeigen auch über 70 % der Patienten mit papillären Nierenzellkarzinom und etwa 50 % der Patienten mit Blasenkrebs eine erhöhte Genamplifikation von *Csnk1d* und eine erhöhte CSNK1D-Expression in Datensatzanalysen (Rosenberg et al. 2015). Darüber hinaus ist CSNK1D nicht nur in primären Brustkrebstumoren, sondern auch in metastatischen Lymphknoten und in triple negativen Brustkrebszellen stark exprimiert (Toffoli et al. 2014; Bar et al. 2018). Die Ausschaltung von CSNK1D bewirkt in triple negativen Brustkrebszellen eine

Hemmung der Zellmigration und -Invasion und erhöht die Expression von *Tight Junction*-Bestandteilen, weshalb angenommen wird, dass CSNK1D die Metastasierung beeinflussen kann und seine Rolle im Einklang mit den anderen Autoren ein wichtiges therapeutisches Ziel darstellt (Bar et al. 2018). Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse identifizierte einen positiven statistischen Zusammenhang zwischen Nachtarbeit als circadianer Störung und Brustkrebsrisiko bei Kurzzeitrhythmschichtarbeiterinnen, der bei der Brustkrebsvorsorge bedacht werden sollte (Manouchehri et al. 2021).

Eine bioinformatische Analyse identifizierte differenziell exprimierte Rhythmusgene (DERG) in Zusammenhang mit dem hepatozellulärem Leberkarzinom, zu denen *Csnk1d* gehört (Liu et al. 2021). Mit einer hohen Expression von CSNK1D bei Patienten mit hepatozellulärem Leberkarzinom war eine niedrigere Überlebensrate verbunden, weshalb CSNK1D als Biomarker genauer untersucht und diagnostisch eingesetzt werden könnte (Liu et al. 2021).

CSNK1D wird aber auch mit Stoffwechselkrankheiten assoziiert und könnte als mögliches therapeutisches Ziel weiter erforscht und genutzt werden, da die CSNK1D-abhängige Phosphorylierung von *Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Coactivator 1-alpha* (PGC-1 $\alpha$ ) seine Transkriptionsfunktion in Hepatozyten und somit auch die Induktion der Glukoneogenese-Genexpression hemmt (Li et al. 2011). In Modellen für ernährungsbedingte und genetische Adipositas verbesserte die tägliche Verabreichung eines CSNK1D-Inhibitors die Glukosetoleranz (Cunningham et al. 2016). Darüber hinaus wird CSNK1D beispielsweise im subkutanen und omentalen Fettgewebe krankhaft adipöser Patienten exprimiert und diese Expression korreliert mit der von Adiponektin, welches durch CSNK1D phosphoryliert wird (Xu et al. 2015) und dessen Plasmalevel bei Adipositas vermindert ist (Arita, Y., et al. 1999).

Durch Hemmung von CSNK1D wird die basale und insulinstimulierte Glukoseaufnahme in Adipozyten erhöht, weshalb eine Involvierung von CSNK1D in dem adipozytären Stoffwechsel angenommen wird (Xu et al. 2015).

Außerhalb der Tumorgenese könnten spezifische Hemmstoffe von CSNK1D therapeutisch auch bei Drogenabhängigkeit und Alkoholmissbrauch eingesetzt werden, da CSNK1D/E-spezifische Inhibitoren im Tiermodell den rückfallartigen Alkoholkonsum verhindern und zu einem schwächeren drogensuchendem Verhalten bei Ratten führen, die trainiert sind, sich das Opioid Fentanyl zu verabreichen (Perreau-Lenz et al. 2012; Wager et al. 2014).

Auch GAPVD1 ist an pathologischen Prozessen beteiligt und könnte als Therapieziel in Zukunft genauer erforscht werden. So wurden kürzlich Mutationen in GAPVD1 und *Ankyrin Repeat and FYVE Domain Containing 1* (ANKFY1) von Patienten mit hereditärem nephrotischen Syndrom als eine neue genetische Ursache beschrieben (Hermle et al. 2018). Die Autoren zeigten, dass die beiden Proteine Interaktionspartner sind und in Podozyten exprimiert werden, wobei Mutationen in GAPVD1 diese Interaktion abschwächen. Mit Nephrin besteht eine weitere Protein-Protein-Interaktion von GAPVD1, welche ebenfalls durch Mutationen in GAPVD1 beeinträchtigt wird (Hermle et al. 2018). Während Mutationen in GAPVD1 von Patienten mit nephrotischen Syndrom die ANKFY1- und Nephrin-Interaktion schwächen, stärken sie andererseits die Bindung von GAPVD1 an aktives RAB5 (Hermle et al. 2018). Abschließend konnten die Autoren GAPVD1 und ANKFY1 als erforderlich für die Podozytenmigration in Nephrozyten identifizieren und auf diese Weise darlegen, dass Mutationen dieser Gene eine funktionelle Bedeutung im nephrotischen Syndrom haben (Hermle et al. 2018).

Interessanterweise wurde GAPVD1 auch als einer von fünf *Gen-Loci* entdeckt, die mit einem Risiko für obstruktive Schlafapnoe assoziiert sind und zeigen, dass diese Erkrankung eine genetische Komponente hat (Strausz et al. 2021).

In der Behandlung der Multiplen Sklerose sind drei SNPs in der Nähe von GAPVD1 mit dem Ansprechen und Wirkmechanismus von Interferon beta (IFN- $\beta$ ) assoziiert (Mahurkar et al. 2017) und der SNP rs2291858 steht in einer neueren Studie im Fokus der Forschungen (Khademi et al. 2021). Die GAPVD1-Expression ist bei *Responder*-Patienten mit Multipler Sklerose und INF- $\beta$ -Therapie im Vergleich zu *Non-Responder*-Patienten signifikant höher und auch die Verteilung der Expression von GAPVD1 in verschiedenen Genotypen der *Responder*- und *Non-Responder*-Patienten zeigt einen signifikanten Unterschied mit der höchsten mRNA-Konzentration im AA-Genotyp der *Responder*-Gruppe (Khademi et al. 2021). Der GAPVD1-Genotypstatus könnte somit zur Vorhersage für das Ansprechen auf eine INF- $\beta$ -Therapie dienen, um Patienten einer besser abgestimmten Therapie zuzuführen (Khademi et al. 2021).

CSNK1D und GAPVD1 sind beide auch in neurologische Pathologien eingebunden. So konnte gezeigt werden, dass GAPVD1 in Hirngewebe von Patienten mit Alzheimer-Demenz stark erhöht ist und die Regulierung der Membranassoziation von GAPVD1 Presenilin 1 (PS1)-abhängig ist (Scheper et al. 2007; Scheper et al. 2004). Mutationen in PS1 sind eine häufige Ursache für familiäre Alzheimer-Demenz (Schellenberg et al.

1992; St George-Hyslop et al. 1992; van Broeckhoven et al. 1992; Sherrington et al. 1995). Auch das Proteinlevel von CSNK1D ist im *Hippocampus* von Alzheimer Patienten im Vergleich zu Kontrollen als 30-fach erhöht nachgewiesen (Ghoshal et al. 1999) und der Grad der Hochregulierung des CSNK1D mRNA-Gehalts korreliert mit dem Grad der regionalen Pathologie (Yasojima et al. 2000). Darüber hinaus kolokalisiert CSNK1D mit neurofibrillären Läsionen und granulovakuolären Degenerationskörpern im *Hippocampus* von Alzheimer Patienten, sodass CSNK1D einen Biomarker bei Alzheimer-Demenz darstellen könnte (Ghoshal et al. 1999). Das Tau-Protein wurde als Hauptbestandteil neurofibrillärer *Tangles* in Gehirngewebe mit Alzheimer identifiziert (Grundke-Iqbal et al. 1986) und CK1 ist mit Tau-Filamenten assoziiert (Kuret et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass CSNK1D Tau phosphoryliert und seine Bindung an Mikrotubuli verhindert (Li et al. 2004). So ist eine Kombination der Aktivitäten von CSNK1D und der Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK3B) für mehr als drei Viertel der in Tau identifizierten Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen verantwortlich, weshalb CSNK1D in der Pathogenese von Alzheimer involviert ist und ein mögliches Therapieziel sein kann (Hanger et al. 2007). Neuere Studien-Ergebnisse mit Einsatz des CSNK1D/E-Inhibitors PF-670462 zeigen im Alzheimer-Mausmodell ein verbessertes Arbeitsgedächtnis, die Normalisierung des circadianen Verhaltensrhythmus und damit das Potenzial zur Behandlung von kognitiven und circadianen Störungen bei Patienten mit Alzheimer (Adler et al. 2019).

## 5.4 Schlussfolgerung

Durch den PLA konnte eine lokale Nähe von unter 40 nm zwischen CSNK1D und GAPVD1 *in vivo* nachgewiesen werden, sodass eine Protein-Protein-Interaktion dieser Proteine angenommen werden kann.

Die Erkenntnis dieser Interaktion hat dazu beitragen können, die bedeutsamen Funktionen von CSNK1D in der circadianen Uhr noch genauer in den Fokus zu nehmen. Vor allem seit dem Nachweis, dass GAPVD1 durch CSNK1D phosphoryliert wird (Ibrahim et al. 2021), sollten zukünftig die Auswirkungen und möglichen Funktionsänderungen dieser posttranslationalen Modifikation auf GAPVD1 untersucht werden. Insbesondere stellt sich die Frage, welche Auswirkungen die Phosphorylierung von GAPVD1 auf den Ablauf der circadianen Uhr hat. So könnten Untersuchungen mit Genvarianten von GAPVD1 mit veränderten

Phosphorylierungsstellen helfen, den Einfluss von GAPVD1 auf die molekulare Uhr besser zu verstehen. Auch stellt sich die Frage, inwieweit die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 ursächlich für die im vorherigen Kapitel beschriebenen Einflüsse auf Organfunktionen und Krankheitsgenese hat. Vertiefende Untersuchungen in dieser Richtung werden Erkenntnisse liefern, die unter Umständen neue Therapieansätze eröffnen können.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adler, Paula; Mayne, Janice; Walker, Krystal; Ning, Zhibin; Figeys, Daniel (2019): Therapeutic Targeting of Casein Kinase 1 $\delta/\epsilon$  in an Alzheimer's Disease Mouse Model. In: *Journal of proteome research* 18 (9), S. 3383–3393. DOI: 10.1021/acs.jproteome.9b00312.
- Akashi, Makoto; Tsuchiya, Yoshiki; Yoshino, Takao; Nishida, Eisuke (2002): Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. In: *Molecular and cellular biology* 22 (6), S. 1693–1703. DOI: 10.1128/MCB.22.6.1693-1703.2002.
- Alam, M. S. (2018): Proximity Ligation Assay (PLA). In: *Curr Protoc Immunol* 123 (1), e58. DOI: 10.1002/cpim.58.
- Algar, W. Russ; Hildebrandt, Niko; Vogel, Steven S.; Medintz, Igor L. (2019): FRET as a biomolecular research tool - understanding its potential while avoiding pitfalls. In: *Nat Methods* 16 (9), S. 815–829. DOI: 10.1038/s41592-019-0530-8.
- Alsemarz, Azam; Lasko, Paul; Fagotto, François (2018): Limited significance of the in situ proximity ligation assay. DOI: <https://doi.org/10.1101/411355>
- Arita, Y., et al. (1999): Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. In: *Biochemical and biophysical research communications* 257 (1), S. 79–83. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0255.
- Aryal, Rajindra P.; Kwak, Pieter Bas; Tamayo, Alfred G.; Gebert, Michael; Chiu, Po-Lin; Walz, Thomas; Weitz, Charles J. (2017): Macromolecular Assemblies of the Mammalian Circadian Clock. In: *Molecular cell* 67 (5), 770-782.e6. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.07.017.
- Aschoff, Jürgen (1965): Circadian Rhythms in Man. In: *Science (New York, N.Y.)* 148 (3676), S. 1427–1432. DOI: 10.1126/science.148.3676.1427.
- Aschoff, Jürgen (1981): Freerunning and Entrained Circadian Rhythms. In: Jürgen Aschoff (Hg.): *Biological Rhythms*. Boston, MA: Springer US, S. 81–93.
- Bagchi, S.; Fredriksson, R.; Wallen-Mackenzie, A. (2015): In Situ Proximity Ligation Assay (PLA). In: *Methods Mol Biol* 1318, S. 149–159. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5\_15.
- Balsalobre, A.; Brown, S. A.; Marcacci, L.; Tronche, F.; Kellendonk, C.; Reichardt, H. M. et al. (2000): Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (5488), S. 2344–2347. DOI: 10.1126/science.289.5488.2344.
- Balsalobre, Aurélio; Damiola, Francesca; Schibler, Ueli (1998): A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells. In: *Cell* 93 (6), S. 929–937. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81199-X.
- Bar, Isabelle; Merhi, Ahmad; Larbanoix, Lionel; Constant, Manuel; Haussy, Sandy; Laurent, Sophie et al. (2018): Silencing of casein kinase 1 delta reduces migration and metastasis of triple negative breast cancer cells. In: *Oncotarget* 9 (56), S. 30821–30836. DOI: 10.18632/oncotarget.25738.
- Bara, Ana-Claudia; Arber, Sara (2009): Working shifts and mental health--findings from the British Household Panel Survey (1995-2005). In: *Scandinavian journal of work, environment & health* 35 (5), S. 361–367. DOI: 10.5271/sjweh.1344.

- Baron, Kelly Glazer; Reid, Kathryn J. (2014): Circadian misalignment and health. In: *International review of psychiatry (Abingdon, England)* 26 (2), S. 139–154. DOI: 10.3109/09540261.2014.911149.
- Behrend, Lars; Stöter, Martin; Kurth, Marion; Rutter, Gabriel; Heukeshoven, Jochen; Deppert, Wolfgang; Knippschild, Uwe (2000): Interaction of casein kinase 1 delta (CK1δ) with post-Golgi structures, microtubules and the spindle apparatus. In: *European Journal of Cell Biology* 79 (4), S. 240–251. DOI: 10.1078/S0171-9335(04)70027-8.
- Berson, David M.; Dunn, Felice A.; Takao, Motoharu (2002): Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. In: *Science (New York, N.Y.)* 295 (5557), S. 1070–1073. DOI: 10.1126/science.1067262.
- Brockschmidt, C.; Hirner, H.; Huber, N.; Eismann, T.; Hillenbrand, A.; Giamas, G. et al. (2008): Anti-apoptotic and growth-stimulatory functions of CK1 delta and epsilon in ductal adenocarcinoma of the pancreas are inhibited by IC261 in vitro and in vivo. In: *Gut* 57 (6), S. 799–806. DOI: 10.1136/gut.2007.123695.
- Brown, Steven A.; Zumbrunn, Gottlieb; Fleury-Olela, Fabienne; Preitner, Nicolas; Schibler, Ueli (2002): Rhythms of Mammalian Body Temperature Can Sustain Peripheral Circadian Clocks. In: *Current Biology* 12 (18), S. 1574–1583. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)01145-4.
- Bucci, Cecilia; Parton, Robert G.; Mather, Ian H.; Stunnenberg, Henk; Simons, Kai; Hoflack, Bernard; Zerial, Marino (1992): The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. In: *Cell* 70 (5), S. 715–728. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90306-W.
- Buijs, R. M.; Wortel, J.; van Heerikhuizen, J. J.; Feenstra, M. G.; Horst, G. J. ter; Romijn, H. J.; Kalsbeek, A. (1999a): Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. In: *The European journal of neuroscience* 11 (5), S. 1535–1544. DOI: 10.1046/j.1460-9568.1999.00575.x.
- Buijs, Ruud M.; Hermes, Michael H.L.J.; Kalsbeek, Andries (1999b): The suprachiasmatic nucleus—paraventricular nucleus interactions: A bridge to the neuroendocrine and autonomic nervous system. In: *Advances in Brain Vasopressin*, Bd. 119: Elsevier (Progress in Brain Research), S. 365–382.
- Casjens, Swaantje; Brenscheidt, Frank; Tisch, Anita; Beermann, Beate; Brüning, Thomas; Behrens, Thomas; Rabstein, Sylvia (2022): Social jetlag and sleep debts are altered in different rosters of night shift work. In: *PLoS ONE* 17 (1), e0262049. DOI: 10.1371/journal.pone.0262049.
- Castel, M.; Belenky, M.; Cohen, S.; Ottersen, O. P.; Storm-Mathisen, J. (1993): Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. In: *The European journal of neuroscience* 5 (4), S. 368–381. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1993.tb00504.x.
- Chavrier, Philippe; Parton, Robert G.; Hauri, Hans Peter; Simons, Kai; Zerial, Marino (1990): Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. In: *Cell* 62 (2), S. 317–329. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90369-P.
- Cheong, J. K.; Nguyen, T. H.; Wang, H.; Tan, P.; Voorhoeve, P. M.; Lee, S. H.; Virshup, D. M. (2011): IC261 induces cell cycle arrest and apoptosis of human cancer cells via CK1δ/ε and Wnt/β-catenin independent inhibition of mitotic

- spindle formation. In: *Oncogene* 30 (22), S. 2558–2569. DOI: 10.1038/onc.2010.627.
- Cheong, Jit Kong; Virshup, David M. (2011): Casein kinase 1: Complexity in the family. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 43 (4), S. 465–469. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.12.004.
- Cunningham, Peter S.; Ahern, Siobhán A.; Smith, Laura C.; da Silva Santos, Carla S.; Wager, Travis T.; Bechtold, David A. (2016): Targeting of the circadian clock via CK1 $\delta/\epsilon$  to improve glucose homeostasis in obesity. In: *Sci Rep* 6, S. 29983. DOI: 10.1038/srep29983.
- Damiola, F.; Le Minh, N.; Preitner, N.; Kornmann, B.; Fleury-Olela, F.; Schibler, U. (2000): Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. In: *Genes & development* 14 (23), S. 2950–2961. DOI: 10.1101/gad.183500.
- Debaize, L.; Jakobczyk, H.; Rio, A. G.; Gandemer, V.; Troadec, M. B. (2017): Optimization of proximity ligation assay (PLA) for detection of protein interactions and fusion proteins in non-adherent cells: application to pre-B lymphocytes. In: *Mol Cytogenet* 10, S. 27. DOI: 10.1186/s13039-017-0328-2.
- DeCoursey, Patricia J.; Krulas, Jill R.; Mele, Gary; Holley, Daniel C. (1997): Circadian Performance of Suprachiasmatic Nuclei (SCN)-Lesioned Antelope Ground Squirrels in a Desert Enclosure. In: *Physiology & Behavior* 62 (5), S. 1099–1108. DOI: 10.1016/S0031-9384(97)00263-1.
- Dibner, C.; Schibler, U.; Albrecht, U. (2010): The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. In: *Annu Rev Physiol* 72, S. 517–549. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135821.
- Donaldson, Julie G. (2015): Immunofluorescence Staining. In: *Current Protocols in Cell Biology* 69 (1):4.3.1.-4.3.7. DOI: 10.1002/0471143030.cb0403s69.
- Eide, Erik J.; Woolf, Margaret F.; Kang, Heeseog; Woolf, Peter; Hurst, William; Camacho, Fernando et al. (2005): Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. In: *Molecular and cellular biology* 25 (7), S. 2795–2807. DOI: 10.1128/MCB.25.7.2795-2807.2005.
- Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. (2001): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. In: *Nature* 411, S. 494-498. DOI: 10.1038/35078107.
- Elion, Elaine A. (2007): Detection of protein-protein interactions by coprecipitation. In: *Current protocols in protein science* Chapter 19, Unit 19.4. DOI: 10.1002/0471140864.ps1904s49.
- Etchegaray, Jean-Pierre; Machida, Kazuhiko K.; Noton, Elizabeth; Constance, Cara M.; Dallmann, Robert; Di Napoli, Marianne N. et al. (2009): Casein kinase 1 delta regulates the pace of the mammalian circadian clock. In: *Molecular and cellular biology* 29 (14), S. 3853–3866. DOI: 10.1128/MCB.00338-09.
- Evan, G. I.; Lewis, G. K.; Ramsay, G.; Bishop, J. M. (1985): Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. In: *Molecular and cellular biology* 5 (12), S. 3610–3616. DOI: 10.1128/mcb.5.12.3610-3616.1985.
- Falchi, Fabio; Cinzano, Pierantonio; Duriscoe, Dan; Kyba, Christopher C. M.; Elvidge, Christopher D.; Baugh, Kimberly et al. (2016): The new world atlas of artificial

- night sky brightness. In: *Science advances* 2 (6), e1600377. DOI: 10.1126/sciadv.1600377.
- Finger, Anna-Marie; Dibner, Charna; Kramer, Achim (2020): Coupled network of the circadian clocks: a driving force of rhythmic physiology. In: *FEBS Letters* 594 (17), S. 2734–2769. DOI: 10.1002/1873-3468.13898.
- Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. (1998): Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. In: *Nature* 391 (6669), S. 806–811. DOI: 10.1038/35888.
- Flotow, H.; Graves, P. R.; Wang, A. Q.; Fiol, C. J.; Roeske, R. W.; Roach, P. J. (1990): Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. In: *Journal of Biological Chemistry* 265 (24), S. 14264–14269. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)77295-5.
- Förster, Th. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Ann. Phys.* 437 (1-2), S. 55–75. DOI: 10.1002/andp.19484370105.
- Foster, R. G.; Provencio, I.; Hudson, D.; Fiske, S.; Grip, W. de; Menaker, M. (1991): Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). In: *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology* 169 (1), S. 39–50. DOI: 10.1007/BF00198171.
- Fredriksson, Simon; Gullberg, Mats; Jarvius, Jonas; Olsson, Charlotta; Pietras, Kristian; Gústafsdóttir, Sigrún Margrét et al. (2002): Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. In: *Nat Biotechnol* 20 (5), S. 473–477. DOI: 10.1038/nbt0502-473.
- Gallego, Monica; Virshup, David M. (2007): Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2), S. 139–148. DOI: 10.1038/nrm2106.
- Gekakis, N.; Staknis, D.; Nguyen, H. B.; Davis, F. C.; Wilsbacher, L. D.; King, D. P. et al. (1998): Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. In: *Science* 280 (5369), S. 1564–1569. DOI: 10.1126/science.280.5369.1564.
- Ghoshal, Nupur; Smiley, John F.; DeMaggio, Anthony J.; Hoekstra, Merl F.; Cochran, Elizabeth J.; Binder, Lester I.; Kuret, Jeff (1999): A New Molecular Link between the Fibrillar and Granulovacuolar Lesions of Alzheimer's Disease. In: *The American Journal of Pathology* 155 (4), S. 1163–1172. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65219-4.
- Graves, P. R.; Roach, P. J. (1995): Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. In: *Journal of Biological Chemistry* 270 (37), S. 21689–21694. DOI: 10.1074/jbc.270.37.21689.
- Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Tung, Y. C.; Quinlan, M.; Wisniewski, H. M.; Binder, L. I. (1986): Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13), S. 4913–4917. DOI: 10.1073/pnas.83.13.4913.
- Gu, Fangyi; Han, Jiali; Laden, Francine; an Pan; Caporaso, Neil E.; Stampfer, Meir J. et al. (2015): Total and cause-specific mortality of U.S. nurses working rotating night shifts. In: *American journal of preventive medicine* 48 (3), S. 241–252. DOI: 10.1016/j.amepre.2014.10.018.

- Guillaumond, Fabienne; Dardente, Hugues; Giguère, Vincent; Cermakian, Nicolas (2005): Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. In: *Journal of biological rhythms* 20 (5), S. 391–403. DOI: 10.1177/0748730405277232.
- Guillen, Rodrigo X.; Beckley, Janel R.; Chen, Jun-Song; Gould, Kathleen L. (2020): CRISPR-mediated gene targeting of CK1 $\delta/\epsilon$  leads to enhanced understanding of their role in endocytosis via phosphoregulation of GAPVD1. In: *Sci Rep* 10 (1), S. 6797. DOI: 10.1038/s41598-020-63669-2.
- Gullberg, Mats; Gústafsdóttir, Sigrún M.; Schallmeiner, Edith; Jarvius, Jonas; Bjarnegård, Mattias; Betsholtz, Christer et al. (2004): Cytokine detection by antibody-based proximity ligation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (22), S. 8420–8424. DOI: 10.1073/pnas.0400552101.
- Guo, Hongnian; Brewer, Judy McKinley; Champhekar, Ameya; Harris, Ruth B. S.; Bittman, Eric L. (2005): Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8), S. 3111–3116. DOI: 10.1073/pnas.0409734102.
- Hanger, Diane P.; Byers, Helen L.; Wray, Selina; Leung, Kit-Yi; Saxton, Malcolm J.; Seereeram, Anjan et al. (2007): Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (32), S. 23645–23654. DOI: 10.1074/jbc.M703269200.
- Hannibal, Jens; Ding, Jian M.; Chen, Dong; Fahrenkrug, Jan; Larsen, Philip J.; Gillette, Martha U.; Mikkelsen, Jens D. (1997): Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) in the Retinohypothalamic Tract: A Potential Daytime Regulator of the Biological Clock. In: *J. Neurosci.* 17 (7), S. 2637–2644. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-07-02637.1997.
- Hannibal, Jens; Hindersson, Peter; Knudsen, Sanne M.; Georg, Birgitte; Fahrenkrug, Jan (2002): The Photopigment Melanopsin Is Exclusively Present in Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide-Containing Retinal Ganglion Cells of the Retinohypothalamic Tract. In: *J. Neurosci.* 22 (1), RC191-RC191. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-j0002.2002.
- Haraszi, Réka Ágnes; Ella, Krisztina; Gyöngyösi, Norbert; Roenneberg, Till; Káldi, Krisztina (2014): Social jetlag negatively correlates with academic performance in undergraduates. In: *Chronobiology international* 31 (5), S. 603–612. DOI: 10.3109/07420528.2013.879164.
- Hattar, S.; Liao, H. W.; Takao, M.; Berson, D. M.; Yau, K. W. (2002): Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. In: *Science* 295 (5557), S. 1065–1070. DOI: 10.1126/science.1069609.
- Hegazy, M.; Cohen-Barak, E.; Koetsier, J. L.; Najor, N. A.; Arvanitis, C.; Sprecher, E. et al. (2020): Proximity Ligation Assay for Detecting Protein-Protein Interactions and Protein Modifications in Cells and Tissues in Situ. In: *Curr Protoc Cell Biol* 89 (1), e115. DOI: 10.1002/cpcb.115.
- Hermle, Tobias; Schneider, Ronen; Schapiro, David; Braun, Daniela A.; van der Ven, Amelie T.; Warejko, Jillian K. et al. (2018): GAPVD1 and ANKFY1 Mutations

- Implicate RAB5 Regulation in Nephrotic Syndrome. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 29 (8), S. 2123–2138. DOI: 10.1681/ASN.2017121312.
- Hildebrandt, Michelle A. T.; Reyes, Monica E.; Lin, Moubin; He, Yonggang; Nguyen, Son V.; Hawk, Ernest T.; Wu, Xifeng (2016): Germline Genetic Variants in the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway as Predictors of Colorectal Cancer Risk. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 25 (3), S. 540–546. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0834.
- Hirano, Arisa; Fu, Ying-Hui; Ptáček, Louis J. (2016): The intricate dance of post-translational modifications in the rhythm of life. In: *Nature structural & molecular biology* 23 (12), S. 1053–1060. DOI: 10.1038/nsmb.3326.
- Hirner, Heidrun; Günes, Cagatay; Bischof, Joachim; Wolff, Sonja; Grothey, Arnhild; Köhl, Marion et al. (2012): Impaired CK1 delta activity attenuates SV40-induced cellular transformation in vitro and mouse mammary carcinogenesis in vivo. In: *PLoS ONE* 7 (1), e29709. DOI: 10.1371/journal.pone.0029709.
- Hopp, Thomas P.; Prickett, Kathryn S.; Price, Virginia L.; Libby, Randell T.; March, Carl J.; Pat Cerretti, Douglas et al. (1988): A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification. In: *Nat Biotechnol* 6 (10), S. 1204–1210. DOI: 10.1038/nbt1088-1204.
- Hoyle, Nathaniel P.; Seinkmane, Estere; Putker, Marrit; Feeney, Kevin A.; Krogager, Toke P.; Chesham, Johanna E. et al. (2017): Circadian actin dynamics drive rhythmic fibroblast mobilization during wound healing. In: *Science translational medicine* 9 (415), S. 1-25. DOI: 10.1126/scitranslmed.aal2774.
- 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. In: *Biochemical and biophysical research communications* 340 (3), S. 967–975. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.12.099.
- Ibrahim, Hussam; Reus, Philipp; Mundorf, Anna Katharina; Grothoff, Anna-Lena; Rudenko, Valerie; Buschhaus, Christina et al. (2021): Phosphorylation of GAPVD1 Is Regulated by the PER Complex and Linked to GAPVD1 Degradation. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7), 3787. DOI: 10.3390/ijms22073787.
- Inuzuka, Hiroyuki; Tseng, Alan; Gao, Daming; Zhai, Bo; Zhang, Qing; Shaik, Shavali et al. (2010): Phosphorylation by casein kinase I promotes the turnover of the Mdm2 oncoprotein via the SCF(beta-TRCP) ubiquitin ligase. In: *Cancer Cell* 18 (2), S. 147–159. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.06.015.
- Islam, Zobida; Hu, Huanhuan; Akter, Shamima; Kuwahara, Keisuke; Kochi, Takeshi; Eguchi, Masafumi et al. (2020): Social jetlag is associated with an increased likelihood of having depressive symptoms among the Japanese working population: the Furukawa Nutrition and Health Study. In: *Sleep* 43 (1), S. 1-7. DOI: 10.1093/sleep/zsz204.
- Isojima, Yasushi; Nakajima, Masato; Ukai, Hideki; Fujishima, Hiroshi; Yamada, Rikuhiko G.; Masumoto, Koh-hei et al. (2009): CKepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the

- mammalian circadian clock. In: *PNAS* 106 (37), S. 15744–15749. DOI: 10.1073/pnas.0908733106.
- Isono, Erika; Schwechheimer, Claus (2010): Co-immunoprecipitation and protein blots. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 655, S. 377–387. DOI: 10.1007/978-1-60761-765-5\_25.
- Jares-Erijman, Elizabeth A.; Jovin, Thomas M. (2003): FRET imaging. In: *Nat Biotechnol* 21 (11), S. 1387–1395. DOI: 10.1038/nbt896.
- Johnson, Carl Hirschie; Elliott, Jeffrey A.; Foster, Russell (2003): Entrainment of circadian programs. In: *Chronobiology international* 20 (5), S. 741–774. DOI: 10.1081/cbi-120024211.
- Kalfalah, F.; Janke, L.; Schiavi, A.; Tigges, J.; Ix, A.; Ventura, N. et al. (2016): Crosstalk of clock gene expression and autophagy in aging. In: *Aging (Albany NY)* 8 (9), S. 1876–1895. DOI: 10.18632/aging.101018.
- Kategaya, Lorna S.; Hilliard, Aisha; Zhang, Louying; Asara, John M.; Ptáček, Louis J.; Fu, Ying-Hui (2012): Casein Kinase 1 Proteomics Reveal Prohibitin 2 Function in Molecular Clock. In: *PLoS ONE* 7 (2): e31987. DOI: 10.1371/journal.pone.0031987.
- Keller, Maren; Mazuch, Jeannine; Abraham, Ute; Eom, Gina D.; Herzog, Erik D.; Volk, Hans-Dieter et al. (2009): A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. In: *PNAS* 106 (50), S. 21407–21412. DOI: 10.1073/pnas.0906361106.
- Kessler, S. W. (1975): Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 115 (6), S. 1617–1624.
- Khademi, Bahareh; Khorrami, Mehdi; Ayromlou, Hormoz; Rikhtegar, Reza; Moghadam, Ehsan Aghaei; Tahmasebivand, Mahsa et al. (2021): An interdependence between GAPVD1 gene polymorphism, expression level and response to interferon beta in patients with multiple sclerosis. In: *Journal of neuroimmunology* 353, S. 577507. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2021.577507.
- Knappik, A.; Plückthun, A. (1994): An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. In: *BioTechniques* 17 (4), S. 754–761.
- Knippschild, U.; Milne, D. M.; Campbell, L. E.; DeMaggio, A. J.; Christenson, E.; Hoekstra, M. F.; Meek, D. W. (1997): p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. In: *Oncogene* 15 (14), S. 1727–1736. DOI: 10.1038/sj.onc.1201541.
- Knippschild, Uwe; Gocht, Andreas; Wolff, Sonja; Huber, Nadine; Löhler, Jürgen; Stöter, Martin (2005): The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. In: *Cellular signalling* 17 (6), S. 675–689. DOI: 10.1016/j.cellsig.2004.12.011.
- Kume, Kazuhiko; Zylka, Mark J.; Sriram, Sathyanarayanan; Shearman, Lauren P.; Weaver, David R.; Jin, Xiaowei et al. (1999): mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. In: *Cell* 98 (2), S. 193–205. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81014-4.

- Kuret, J.; Johnson, G. S.; Cha, D.; Christenson, E. R.; DeMaggio, A. J.; Hoekstra, M. F. (1997): Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain. In: *Journal of neurochemistry* 69 (6), S. 2506–2515. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69062506.x.
- Kuroda, Kouichi; Kato, Michiko; Mima, Joji; Ueda, Mitsuyoshi (2006): Systems for the detection and analysis of protein-protein interactions. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 71 (2), S. 127–136. DOI: 10.1007/s00253-006-0395-5.
- Kurreck, Jens (2009): RNA interference: from basic research to therapeutic applications. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 48 (8), S. 1378–1398. DOI: 10.1002/anie.200802092.
- La Fleur, Susanne E.; Kalsbeek, Andries; Wortel, Joke; Buijs, Ruud M. (2000): Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. In: *Brain Research* 871 (1), S. 50–56. DOI: 10.1016/S0006-8993(00)02423-9.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* (227), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lee, Choogon; Etchegaray, Jean-Pierre; Cagampang, Felino R.A.; Loudon, Andrew S.I.; Reppert, Steven M. (2001): Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. In: *Cell* 107 (7), S. 855–867. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00610-9.
- Lee, Hyeon-min; Chen, Rongmin; Kim, Hyukmin; Etchegaray, Jean-Pierre; Weaver, David R.; Lee, Choogon (2011): The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. In: *PNAS* 108 (39), S. 16451–16456. DOI: 10.1073/pnas.1107178108.
- Lehman, M. N.; Silver, R.; Gladstone, W. R.; Kahn, R. M.; Gibson, M.; Bittman, E. L. (1987): Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. In: *J. Neurosci.* 7 (6), S. 1626–1638. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.07-06-01626.1987.
- Leone, María Juliana; Sigman, Mariano; Golombek, Diego Andrés (2020): Effects of lockdown on human sleep and chronotype during the COVID-19 pandemic. In: *Current biology : CB* 30 (16), R930-R931. DOI: 10.1016/j.cub.2020.07.015.
- Leuchowius, Karl-Johan; Weibrecht, Irene; Söderberg, Ola (2011): In situ proximity ligation assay for microscopy and flow cytometry. In: *Current protocols in cytometry* Chapter 9, Unit 9.36. DOI: 10.1002/0471142956.cy0936s56.
- Levandovski, Rosa; Dantas, Giovana; Fernandes, Luciana Carvalho; Caumo, Wolnei; Torres, Iraci; Roenneberg, Till et al. (2011): Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. In: *Chronobiology international* 28 (9), S. 771–778. DOI: 10.3109/07420528.2011.602445.
- Li, Guibin; Yin, Haishan; Kuret, Jeff (2004): Casein kinase 1 delta phosphorylates tau and disrupts its binding to microtubules. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (16), S. 15938–15945. DOI: 10.1074/jbc.M314116200.
- Li, Siming; Chen, Xiao-Wei; Yu, Lei; Saltiel, Alan R.; Lin, Jiandie D. (2011): Circadian metabolic regulation through crosstalk between casein kinase 1 $\delta$  and

- transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$ . In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 25 (12), S. 2084–2093. DOI: 10.1210/me.2011-1227.
- Linz, Dominik; Arzt, Michael; Baumert, Mathias (2021): Keep your rhythm during rotational night work shifts! In: *European heart journal* 42 (40), S. 4189–4191. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab623.
- Liu, Huaifeng; Gao, Yu; Hu, Shangshang; Fan, Zhengran; Wang, Xianggang; Li, Shujing (2021): Bioinformatics Analysis of Differentially Expressed Rhythm Genes in Liver Hepatocellular Carcinoma. In: *Frontiers in genetics* 12, S. 680528. DOI: 10.3389/fgene.2021.680528.
- Liu, Jidong; Carmell, Michelle A.; Rivas, Fabiola V.; Marsden, Carolyn G.; Thomson, J. Michael; Song, Ji-Joon et al. (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. In: *Science (New York, N.Y.)* 305 (5689), S. 1437–1441. DOI: 10.1126/science.1102513.
- Lodhi, Irfan J.; Chiang, Shian-Huey; Chang, Louise; Vollenweider, Daniel; Watson, Robert T.; Inoue, Mayumi et al. (2007): Gapex-5, a Rab31 guanine nucleotide exchange factor that regulates Glut4 trafficking in adipocytes. In: *Cell metabolism* 5 (1), S. 59–72. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.12.006.
- Longenecker, K. L.; Roach, P. J.; Hurley, T. D. (1996): Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for phosphate recognition. In: *Journal of Molecular Biology* 257 (3), S. 618–631. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0189.
- Lowrey, P. L.; Shimomura, K.; Antoch, M. P.; Yamazaki, S.; Zemenides, P. D.; Ralph, M. R. et al. (2000): Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. In: *Science (New York, N.Y.)* 288 (5465), S. 483–492. DOI: 10.1126/science.288.5465.483.
- Mahurkar, S.; Moldovan, M.; Suppiah, V.; Sorosina, M.; Clarelli, F.; Liberatore, G. et al. (2017): Response to interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients: a genome-wide association study. In: *The pharmacogenomics journal* 17 (4), S. 312–318. DOI: 10.1038/tpj.2016.20.
- Maidstone, Robert J.; Turner, James; Vetter, Celine; Dashti, Hassan S.; Saxena, Richa; Scheer, Frank A. J. L. et al. (2021): Night shift work is associated with an increased risk of asthma. In: *Thorax* 76 (1), S. 53–60. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2020-215218.
- Manouchehri, E.; Taghipour, A.; Ghavami, V.; Ebadi, A.; Homaei, F.; Latifnejad Roudsari, R. (2021): Night-shift work duration and breast cancer risk: an updated systematic review and meta-analysis. In: *BMC women's health* 21 (1), S. 89. DOI: 10.1186/s12905-021-01233-4.
- Maritzen, Tanja; Löhler, Jürgen; Deppert, Wolfgang; Knippschild, Uwe (2003): Casein kinase I delta (CKIdelta) is involved in lymphocyte physiology. In: *European Journal of Cell Biology* 82 (7), S. 369–378. DOI: 10.1078/0171-9335-00323.
- Millar-Craig, MichaelW; Bishop, CharlesN; Raftery, E.B (1978): Circadian variation of blood-pressure. In: *The Lancet* 311 (8068), S. 795–797. DOI: 10.1016/S0140-6736(78)92998-7.
- Milne, D. M.; Looby, P.; Meek, D. W. (2001): Catalytic activity of protein kinase CK1 delta (casein kinase 1delta) is essential for its normal subcellular localization. In: *Experimental cell research* 263 (1), S. 43–54. DOI: 10.1006/excr.2000.5100.

- Mocanu, Maria-Magdalena; Váradi, Tímea; Szöllosi, János; Nagy, Peter (2011): Comparative analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay (PLA). In: *Proteomics* 11 (10), S. 2063–2070. DOI: 10.1002/pmic.201100028.
- Moore, R. Y.; Lenn, N. J. (1972): A retinohypothalamic projection in the rat. In: *The Journal of comparative neurology* 146 (1), S. 1–14. DOI: 10.1002/cne.901460102.
- Moore, Robert Y.; Eichler, Victor B. (1972): Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. In: *Brain Research* 42 (1), S. 201–206. DOI: 10.1016/0006-8993(72)90054-6.
- Mundorf, Anna Katharina (2021): Überprüfung der Interaktion des Uhrenproteins PER2 mit dem Protein GAPVD1 durch Proximity Ligation Assay. Online verfügbar unter <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=58507>, zuletzt geprüft am 26.08.2023.
- Narasimamurthy, Rajesh; Hunt, Sabrina R.; Lu, Yining; Fustin, Jean-Michel; Okamura, Hitoshi; Partch, Carrie L. et al. (2018): CK1 $\delta/\epsilon$  protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch. In: *PNAS* 115 (23), S. 5986–5991. DOI: 10.1073/pnas.1721076115.
- Narasimamurthy, Rajesh; Virshup, David M. (2021): The phosphorylation switch that regulates ticking of the circadian clock. In: *Molecular cell* 81 (6), S. 1133–1146. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.01.006.
- Nielsen, E.; Severin, F.; Backer, J. M.; Hyman, A. A.; Zerial, M. (1999): Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. In: *Nature cell biology* 1 (6), S. 376–382. DOI: 10.1038/14075.
- Niu, Shu-Fen; Chung, Min-Huey; Chu, Hsin; Tsai, Jui-Chen; Lin, Chun-Chieh; Liao, Yuan-Mei et al. (2015): Differences in cortisol profiles and circadian adjustment time between nurses working night shifts and regular day shifts: A prospective longitudinal study. In: *International journal of nursing studies* 52 (7), S. 1193–1201. DOI: 10.1016/j.ijnurstu.2015.04.001.
- Panda, Satchidananda; Antoch, Marina P.; Miller, Brooke H.; Su, Andrew I.; Schook, Andrew B.; Straume, Marty et al. (2002a): Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. In: *Cell* 109 (3), S. 307–320. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00722-5.
- Panda, Satchidananda; Sato, Trey K.; Castrucci, Ana Maria; Rollag, Mark D.; DeGrip, Willem J.; Hogenesch, John B. et al. (2002b): Melanopsin (Opn4) Requirement for Normal Light-Induced Circadian Phase Shifting. In: *Science (New York, N.Y.)* 298 (5601), S. 2213–2216. DOI: 10.1126/science.1076848.
- Paranjpe, Dhanashree A.; Sharma, Vijay Kumar (2005): Evolution of temporal order in living organisms. In: *Journal of circadian rhythms* 3 (1), S. 7. DOI: 10.1186/1740-3391-3-7.
- Partch, Carrie L.; Green, Carla B.; Takahashi, Joseph S. (2014): Molecular architecture of the mammalian circadian clock. In: *Trends in cell biology* 24 (2), S. 90–99. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.07.002.
- Perreau-Lenz, Stéphanie; Vengeliene, Valentina; Noori, Hamid R.; Merlo-Pich, Emilio V.; Corsi, Mauro A.; Corti, Corrado; Spanagel, Rainer (2012): Inhibition of the casein-kinase-1- $\epsilon/\delta$  prevents relapse-like alcohol drinking. In:

- Petrenko, Volodymyr; Gandasi, Nikhil R.; Sage, Daniel; Tengholm, Anders; Barg, Sebastian; Dibner, Charna (2020): In pancreatic islets from type 2 diabetes patients, the dampened circadian oscillators lead to reduced insulin and glucagon exocytosis. In: *PNAS* 117 (5), S. 2484–2495. DOI: 10.1073/pnas.1916539117.
- Philpott, Jonathan M.; Narasimamurthy, Rajesh; Ricci, Clarisse G.; Freeberg, Alfred M.; Hunt, Sabrina R.; Yee, Lauren E. et al. (2020): Casein kinase 1 dynamics underlie substrate selectivity and the PER2 circadian phosphoswitch. In: *eLife* 2020; 9: e52343. DOI: 10.7554/eLife.52343.
- Pittendrigh, Colin S. (1954): On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 40 (10), S. 1018–1029. DOI: 10.1073/pnas.40.10.1018.
- Pittendrigh, Colin S. (1960): Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 25, S. 159–184. DOI: 10.1101/sqb.1960.025.01.015.
- Pittendrigh, Colin S. (1981): Circadian Systems: Entrainment. In: Jürgen Aschoff (Hg.): *Biological Rhythms*. Boston, MA: Springer US, S. 95–124.
- Preitner, Nicolas; Damiola, Francesca; Luis-Lopez-Molina; Zakany, Jozsef; Duboule, Denis; Albrecht, Urs; Schibler, Ueli (2002): The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB $\alpha$  Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. In: *Cell* 110 (2), S. 251–260. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00825-5.
- Ralph, M. R.; Foster, R. G.; Davis, F. C.; Menaker, M. (1990): Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. In: *Science (New York, N.Y.)* 247 (4945), S. 975–978. DOI: 10.1126/science.2305266.
- Ralph, M. R.; Menaker, M. (1988): A mutation of the circadian system in golden hamsters. In: *Science (New York, N.Y.)* 241 (4870), S. 1225–1227. DOI: 10.1126/science.3413487.
- Rand, Tim A.; Petersen, Sean; Du, Fenghe; Wang, Xiaodong (2005): Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. In: *Cell* 123 (4), S. 621–629. DOI: 10.1016/j.cell.2005.10.020.
- Reid, K. J.; Chang, A. M.; Dubocovich, M. L.; Turek, F. W.; Takahashi, J. S.; Zee, P. C. (2001): Familial advanced sleep phase syndrome. In: *Archives of neurology* 58 (7), S. 1089–1094. DOI: 10.1001/archneur.58.7.1089.
- Reinke, H.; Asher, G. (2019): Crosstalk between metabolism and circadian clocks. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 20 (4), S. 227–241. DOI: 10.1038/s41580-018-0096-9.
- Richter, Julia; Rudeck, Steven; Kretz, Anna-Laura; Kramer, Klaus; Just, Steffen; Henne-Bruns, Doris et al. (2016): Decreased CK1 $\delta$  expression predicts prolonged survival in colorectal cancer patients. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 37 (7), S. 8731–8739. DOI: 10.1007/s13277-015-4745-8.
- Richter, Julia; Ullah, Kalim; Xu, Pengfei; Alscher, Vanessa; Blatz, Annette; Peifer, Christian et al. (2015): Effects of altered expression and activity levels of CK1 $\delta$

- and  $\epsilon$  on tumor growth and survival of colorectal cancer patients. In: *International journal of cancer* 136 (12), S. 2799–2810. DOI: 10.1002/ijc.29346.
- Roenneberg, Till; Wirz-Justice, Anna; Mellow, Martha (2003): Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. In: *Journal of biological rhythms* 18 (1), S. 80–90. DOI: 10.1177/0748730402239679.
- Röhl, Thomas; Kurreck, Jens (2006): RNA interference in pain research. In: *Journal of neurochemistry* 99 (2), S. 371–380. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04082.x.
- Rosenberg, Laura H.; Lafitte, Marie; Quereda, Victor; Grant, Wayne; Chen, Weimin; Bibian, Mathieu et al. (2015): Therapeutic targeting of casein kinase 1 $\delta$  in breast cancer. In: *Science translational medicine* 7 (318), 318ra202. DOI: 10.1126/scitranslmed.aac8773.
- Ruby, N. F.; Dark, J.; Heller, H. C.; Zucker, I. (1996): Ablation of suprachiasmatic nucleus alters timing of hibernation in ground squirrels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18), S. 9864–9868. DOI: 10.1073/pnas.93.18.9864.
- Saitoh, Y.; Matsui, Y.; Nihonmatsu, I.; Kawamura, H. (1991): Cross-species transplantation of the suprachiasmatic nuclei from rats to siberian chipmunks (*Eutamias sibiricus*) with suprachiasmatic lesions. In: *Neuroscience Letters* 123 (1), S. 77–81. DOI: 10.1016/0304-3940(91)90162-M.
- Sakaguchi, K.; Saito, S.; Higashimoto, Y.; Roy, S.; Anderson, C. W.; Appella, E. (2000): Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (13), S. 9278–9283. DOI: 10.1074/jbc.275.13.9278.
- Sann, Sharon B.; Crane, Matthew M.; Lu, Hang; Jin, Yishi (2012): Rabx-5 regulates RAB-5 early endosomal compartments and synaptic vesicles in *C. elegans*. In: *PLoS ONE* 7 (6), e37930. DOI: 10.1371/journal.pone.0037930.
- Sato, Miyuki; Sato, Ken; Fonarev, Paul; Huang, Chih-Jen; Liou, Willis; Grant, Barth D. (2005): *Caenorhabditis elegans* RME-6 is a novel regulator of RAB-5 at the clathrin-coated pit. In: *Nature cell biology* 7 (6), S. 559–569. DOI: 10.1038/ncb1261.
- Sato, Trey K.; Panda, Satchidananda; Miraglia, Loren J.; Reyes, Teresa M.; Rudic, Radu D.; McNamara, Peter et al. (2004): A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. In: *Neuron* 43 (4), S. 527–537. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.07.018.
- Schellenberg, G. D.; Bird, T. D.; Wijsman, E. M.; Orr, H. T.; Anderson, L.; Nemens, E. et al. (1992): Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5082), S. 668–671. DOI: 10.1126/science.1411576.
- Scheper, W.; Hoozemans, J. J. M.; Hoogenraad, C. C.; Rozemuller, A. J. M.; Eikelenboom, P.; Baas, F. (2007): Rab6 is increased in Alzheimer's disease brain and correlates with endoplasmic reticulum stress. In: *Neuropathology and applied neurobiology* 33 (5), S. 523–532. DOI: 10.1111/j.1365-2990.2007.00846.x.
- Scheper, Wiep; Zwart, Rob; Baas, Frank (2004): Rab6 membrane association is dependent of Presenilin 1 and cellular phosphorylation events. In: *Brain*

- research. *Molecular brain research* 122 (1), S. 17–23. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2003.11.013.
- Schitteck, Birgit; Sinnberg, Tobias (2014): Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. In: *Molecular cancer* 13, S. 231. DOI: 10.1186/1476-4598-13-231.
- Shearman, Lauren P.; Zylka, Mark J.; Weaver, David R.; Kolakowski, Lee F.; Reppert, Steven M. (1997): Two period Homologs: Circadian Expression and Photic Regulation in the Suprachiasmatic Nuclei. In: *Neuron* 19 (6), S. 1261–1269. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80417-1.
- Sherrington, R.; Rogaev, E. I.; Liang, Y.; Rogaeva, E. A.; Levesque, G.; Ikeda, M. et al. (1995): Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. In: *Nature* 375 (6534), S. 754–760. DOI: 10.1038/375754a0.
- Shieh, Sheau-Yann; Ikeda, Masako; Taya, Yoichi; Prives, Carol (1997): DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2. In: *Cell* 91 (3), S. 325–334. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80416-X.
- Soderberg, O.; Gullberg, M.; Jarvius, M.; Ridderstrale, K.; Leuchowius, K. J.; Jarvius, J. et al. (2006): Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. In: *Nat Methods* 3 (12), S. 995–1000. DOI: 10.1038/nmeth947.
- 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. In: *Methods* 45 (3), S. 227–232. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.06.014.
- St George-Hyslop, P.; Haines, J.; Rogaev, E.; Mortilla, M.; Vaula, G.; Pericak-Vance, M. et al. (1992): Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. In: *Nature genetics* 2 (4), S. 330–334. DOI: 10.1038/ng1292-330.
- Stephan, F. K.; Zucker, I. (1972): Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (6), S. 1583–1586. DOI: 10.1073/pnas.69.6.1583.
- Stokkan, K. A.; Yamazaki, S.; Tei, H.; Sakaki, Y.; Menaker, M. (2001): Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. In: *Science (New York, N.Y.)* 291 (5503), S. 490–493. DOI: 10.1126/science.291.5503.490.
- Strausz, Satu; Ruotsalainen, Sanni; Ollila, Hanna M.; Karjalainen, Juha; Kiiskinen, Tuomo; Reeve, Mary et al. (2021): Genetic analysis of obstructive sleep apnoea discovers a strong association with cardiometabolic health. In: *European Respiratory Journal* 57 (5): 2003091. DOI: 10.1183/13993003.03091-2020.
- Stryer, L. (1978): Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. In: *Annual review of biochemistry* 47, S. 819–846. DOI: 10.1146/annurev.bi.47.070178.004131.
- Stryer, L.; Haugland, R. P. (1967): Energy transfer: a spectroscopic ruler. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58 (2), S. 719–726. DOI: 10.1073/pnas.58.2.719.

- Takahashi, J. S. (2017): Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. In: *Nat Rev Genet* 18 (3), S. 164–179. DOI: 10.1038/nrg.2016.150.
- Tang, Zhenyuan; Takahashi, Yoshinori (2018): Analysis of Protein-Protein Interaction by Co-IP in Human Cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1794, S. 289–296. DOI: 10.1007/978-1-4939-7871-7\_20.
- Toffoli, Sébastien; Bar, Isabelle; Abdel-Sater, Fadi; Delrée, Paul; Hilbert, Pascale; Cavallin, Frédéric et al. (2014): Identification by array comparative genomic hybridization of a new amplicon on chromosome 17q highly recurrent in BRCA1 mutated triple negative breast cancer. In: *Breast cancer research : BCR* 16 (6), S. 466. DOI: 10.1186/s13058-014-0466-y.
- Toh, K. L.; Jones, C. R.; He, Y.; Eide, E. J.; Hinz, W. A.; Virshup, D. M. et al. (2001): An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. In: *Science (New York, N.Y.)* 291 (5506), S. 1040–1043. DOI: 10.1126/science.1057499.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (9), S. 4350–4354. DOI: 10.1073/pnas.76.9.4350.
- Tsai, I-Chun; Woolf, Margaret; Neklason, Deborah W.; Branford, William W.; Yost, H. Joseph; Burt, Randall W.; Virshup, David M. (2007): Disease-associated casein kinase I delta mutation may promote adenomatous polyps formation via a Wnt/beta-catenin independent mechanism. In: *International journal of cancer* 120 (5), S. 1005–1012. DOI: 10.1002/ijc.22368.
- Ueda, Hiroki R.; Chen, Wenbin; Adachi, Akihito; Wakamatsu, Hisanori; Hayashi, Satoko; Takasugi, Tomohiro et al. (2002): A transcription factor response element for gene expression during circadian night. In: *Nature* 418 (6897), S. 534–539. DOI: 10.1038/nature00906.
- van Broeckhoven, C.; Backhovens, H.; Cruts, M.; Winter, G. de; Bruylant, M.; Cras, P.; Martin, J. J. (1992): Mapping of a gene predisposing to early-onset Alzheimer's disease to chromosome 14q24.3. In: *Nature genetics* 2 (4), S. 335–339. DOI: 10.1038/ng1292-335.
- Vanselow, Katja; Vanselow, Jens T.; Westermarck, Pål O.; Reischl, Silke; Maier, Bert; Korte, Thomas et al. (2006): Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). In: *Genes Dev.* 20 (19), S. 2660–2672. DOI: 10.1101/gad.397006.
- Vetter, Céline; Dashti, Hassan S.; Lane, Jacqueline M.; Anderson, Simon G.; Schernhammer, Eva S.; Rutter, Martin K. et al. (2018): Night Shift Work, Genetic Risk, and Type 2 Diabetes in the UK Biobank. In: *Diabetes care* 41 (4), S. 762–769. DOI: 10.2337/dc17-1933.
- Virshup, D. M.; Eide, E. J.; Forger, D. B.; Gallego, M.; Harnish, E. Vielhaber (2007): Reversible protein phosphorylation regulates circadian rhythms. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72, S. 413–420. DOI: 10.1101/sqb.2007.72.048.
- Wager, Travis T.; Chandrasekaran, Ramalakshmi Y.; Bradley, Jenifer; Rubitski, David; Berke, Helen; Mente, Scot et al. (2014): Casein kinase 1δ/ε inhibitor PF-5006739 attenuates opioid drug-seeking behavior. In: *ACS chemical neuroscience* 5 (12), S. 1253–1265. DOI: 10.1021/cn500201x.

- Walker, W. H., 2nd; Walton, J. C.; DeVries, A. C.; Nelson, R. J. (2020): Circadian rhythm disruption and mental health. In: *Transl Psychiatry* 10 (1), S. 28. DOI: 10.1038/s41398-020-0694-0.
- Wang, Ningjian; Sun, Ying; Zhang, Haojie; Wang, Bin; Chen, Chi; Wang, Yuying et al. (2021a): Long-term night shift work is associated with the risk of atrial fibrillation and coronary heart disease. In: *European heart journal* 42 (40), S. 4180–4188. DOI: 10.1093/eurheartj/ehab505.
- Wang, P.; Yang, Y.; Hong, T.; Zhu, G. (2021b): Proximity ligation assay: an ultrasensitive method for protein quantification and its applications in pathogen detection. In: *Appl Microbiol Biotechnol* 105 (3), S. 923–935. DOI: 10.1007/s00253-020-11049-1.
- Winkler, B. Sophia; Oltmer, Franziska; Richter, Julia; Bischof, Joachim; Xu, Pengfei; Burster, Timo et al. (2015): CK1δ in lymphoma: gene expression and mutation analyses and validation of CK1δ kinase activity for therapeutic application. In: *Front. Cell Dev. Biol.* 3, S. 9. DOI: 10.3389/fcell.2015.00009.
- Wittmann, Marc; Dinich, Jenny; Mellow, Martha; Roenneberg, Till (2006): Social jetlag: misalignment of biological and social time. In: *Chronobiology international* 23 (1-2), S. 497–509. DOI: 10.1080/07420520500545979.
- Wong, Patricia M.; Hasler, Brant P.; Kamarck, Thomas W.; Muldoon, Matthew F.; Manuck, Stephen B. (2015): Social Jetlag, Chronotype, and Cardiometabolic Risk. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100 (12), S. 4612–4620. DOI: 10.1210/jc.2015-2923.
- Xu, Pengfei; Fischer-Posovszky, Pamela; Bischof, Joachim; Radermacher, Peter; Wabitsch, Martin; Henne-Bruns, Doris et al. (2015): Gene expression levels of Casein kinase 1 (CK1) isoforms are correlated to adiponectin levels in adipose tissue of morbid obese patients and site-specific phosphorylation mediated by CK1 influences multimerization of adiponectin. In: *Molecular and cellular endocrinology* 406, S. 87–101. DOI: 10.1016/j.mce.2015.02.010.
- Xu, Ying; Padiath, Quasar S.; Shapiro, Robert E.; Jones, Christopher R.; Wu, Susan C.; Saigoh, Noriko et al. (2005): Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. In: *Nature* 434 (7033), S. 640–644. DOI: 10.1038/nature03453.
- Yamamoto, Takuro; Nakahata, Yasukazu; Soma, Haruhiko; Akashi, Makoto; Mamine, Takayoshi; Takumi, Toru (2004): Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. In: *BMC molecular biology* 5, S. 18. DOI: 10.1186/1471-2199-5-18.
- Yamazaki, S.; Numano, R.; Abe, M.; Hida, A.; Takahashi, R.; Ueda, M. et al. (2000): Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. In: *Science (New York, N.Y.)* 288 (5466), S. 682–685. DOI: 10.1126/science.288.5466.682.
- Yasojima, Koji; Kuret, Jeff; DeMaggio, Anthony J.; McGeer, Edith; McGeer, Patrick L. (2000): Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. In: *Brain Research* 865 (1), S. 116–120. DOI: 10.1016/S0006-8993(00)02200-9.
- Yoo, Seung-Hee; Ko, Caroline H.; Lowrey, Phillip L.; Buhr, Ethan D.; Song, Eun-joo; Chang, Suhwan et al. (2005): A noncanonical E-box enhancer drives mouse Period2 circadian oscillations in vivo. In: *Proceedings of the National Academy*

*of Sciences of the United States of America* 102 (7), S. 2608–2613. DOI: 10.1073/pnas.0409763102.

- Yoo, Seung-Hee; Yamazaki, Shin; Lowrey, Phillip L.; Shimomura, Kazuhiro; Ko, Caroline H.; Buhr, Ethan D. et al. (2004): PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (15), S. 5339–5346. DOI: 10.1073/pnas.0308709101.
- Zhang, Ray; Lahens, Nicholas F.; Ballance, Heather I.; Hughes, Michael E.; Hogenesch, John B. (2014): A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (45), S. 16219–16224. DOI: 10.1073/pnas.1408886111.
- Zhou, Min; Kim, Jae Kyoung; Eng, Gracie Wee Ling; Forger, Daniel B.; Virshup, David M. (2015): A Period2 Phosphoswitch Regulates and Temperature Compensates Circadian Period. In: *Molecular cell* 60 (1), S. 77–88. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.08.022.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Fritz Boege für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit im Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik durchführen zu können.

Besonders möchte ich mich auch bei meinem Erstbetreuer Hans bedanken, der mich durch sein umfassend fachliches Wissen und viele produktive Gespräche durch meine Doktorarbeit begleitet hat.

Außerdem möchte ich Faiza meinen Dank aussprechen, die eine große Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit war und die bei blanken Nerven immer weiter wusste.

Ein weiterer Dank gilt Björn, der das Koreferat als Zweitbetreuer übernommen hat.

Dem gesamten Forschungsteam des Zentrallabors danke ich von Herzen für eure uneingeschränkte Unterstützung, das Heranführen an die Forschung und viele unvergessliche, schöne und lustige Momente, die wir zusammen hatten. Vielen Dank Christian, Hussam, Birgit, Elke, Ellen, Eva, Gabi, Eleonora, Laura und Stefan.

Vielen Dank Anna für unsere gute Freundschaft und deine Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern, Brüdern und Johannes, die mir das Studium ermöglicht haben und ohne deren Rückhalt und Zuversicht ich die teilweise schwierigen Phasen des Studiums nicht gemeistert hätte.