

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

Protein-Protein-Interaktionen im PER- Komplex des molekularen zirkadianen Oszillators

Dissertation

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

vorgelegt von
Valerie Rudenko

2025

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

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

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). DOI: 10.3390/ijms22073787.

Zusammenfassung

Die zirkadiane Uhr der Säugetiere ermöglicht eine Anpassung an den Tag-Nacht-Rhythmus durch die Erzeugung endogener Oszillationen im 24h-Rhythmus in Physiologie und Verhalten. Die innere Uhr ist hierarchisch aufgebaut und besteht aus einem Haupttaktgeber im Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus, der durch Lichteinfall auf die Netzhaut mit der Umwelt synchronisiert wird. Über ihn erfolgt dann ebenfalls die Synchronisation der peripheren Oszillatoren in nahezu allen Körperzellen.

Der zentrale molekulare Wirkmechanismus der zirkadianen Uhr beruht auf einer transkriptionell-posttranslationalen Rückkopplungsschleife. Zusammen mit anderen Uhrenproteinen nehmen die Proteine PER2, CSNK1D und GAPVD1 hierbei eine zentrale Rolle durch die Bildung des PER-Komplexes ein. Die Hauptaufgabe dieses Komplexes besteht in der inhibitorischen Regulation der Genexpression durch die Uhrenproteine CLOCK und BMAL1.

Die Funktionen des PER-Komplexes und die molekularen Interaktionen der beteiligten Proteine sind bislang noch nicht ausreichend erforscht. Das Ziel dieses Projekts war es, herauszufinden, wie die Proteine PER2, CSNK1D und GAPVD1 interagieren, und wie ihre Interaktion voneinander abhängt.

Es wurden transient transfizierte HEK-293T-Zellen und bereits generierte Klone der humanen Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 verwendet, die entweder CSNK1D und PER2 oder CSNK1D und PER2 Δ , eine PER2-Mutante ohne CSNK1D-Bindungsdomäne, exprimieren. Mittels Fluoreszenzmikroskopie sollte die Lokalisation von CSNK1D und PER2/PER2 Δ visualisiert werden. Die Interaktionen zwischen den beteiligten Proteinen wurden mit Co-Immunpräzipitation untersucht.

In der Fluoreszenzmikroskopie wurde deutlich, dass sich die Lokalisation von PER2 Δ im Gegensatz zu der von PER2 verändert. PER2 Δ befindet sich nicht wie PER2 vornehmlich im Zellkern, sondern im Bereich der Zellmembranen. Weiterhin konnte durch Co-Immunpräzipitation gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen CSNK1D und GAPVD1 nicht von PER2 abhängt. Schließlich wurde in dieser Arbeit erneut bestätigt, dass die Phosphorylierung durch CSNK1D zum Abbau von PER2 führt. Obwohl PER2 Δ nicht mehr stabil mit CSNK1D interagieren kann, unterliegt es einem vermehrten Abbau, der durch Hemmung der CSNK1D mit PF670462 stark vermindert werden kann.

Summary

The mammalian circadian clock enables adaptation to the day-night rhythm by generating endogenous oscillations with 24h-rhythmicity in physiology and behaviour. The circadian clock is hierarchically organized and consists of a master clock in the nucleus suprachiasmaticus (SCN) of the hypothalamus, which is synchronised with the environment by light that falls on the retina. The SCN also synchronises the peripheral oscillators in almost all body cells.

The central molecular mechanism is based on a transcriptional-posttranslational feedback loop. Together with other clock proteins, the proteins GAPVD1, PER2 and CSNK1D play an important role by forming the PER complex. The main function of this complex is the inhibitory regulation of gene expression mediated by the clock proteins CLOCK and BMAL1.

The functions of the PER complex and the molecular interactions of the proteins involved have not yet been sufficiently explored. The aim of this project was to find out how the proteins CSNK1D, PER2 and GAPVD1 interact and how their interactions depend on each other.

Transiently transfected HEK-293T cells and pre-existing clones of the human fibrosarcoma cell line HT1080 overexpressing either CSNK1D and PER2 or CSNK1D and PER2 Δ , a PER2 mutant lacking the CSNK1D binding domain, were used. Fluorescence microscopy was used to visualise the localisation of CSNK1D and PER2/PER2 Δ . The interactions of the involved proteins were investigated by co-immunoprecipitation.

Fluorescence microscopy showed that the localisation of PER2 Δ changed in comparison to PER2. PER2 Δ is no longer located primarily in the nucleus, but near the cell membranes. Furthermore, by co-immunoprecipitation we show that the interaction between CSNK1D and GAPVD1 does not depend on PER2. Finally, our work confirms that phosphorylation by CSNK1D leads to the degradation of PER2. Despite the lack of a stable interaction with CSNK1D, PER2 Δ is subject to increased degradation and can be stabilised by inhibiting CSNK1D with PF670462.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
BMAL1/ARNTL	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein</i>
β-TrCP	<i>Beta-transducin repeat-containing protein</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CLOCK	<i>Circadian locomotor output cycles protein kaput</i>
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CP-Zelle	Caseinkinase- und Period 2 überexprimierende Zelle
CPΔ-Zelle	Caseinkinase- und Period 2 mit Deletion Δ489-618 überexprimierende Zelle
CRH	<i>Corticotropin-Releasing-Hormon</i>
CRY	Cryptochrom
CRY1	Cryptochrom 1
CRY2	Cryptochrom 2
CSNK1D	Casein kinase I isoform delta
CSNK1E	Casein kinase I isoform epsilon
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-box	<i>Enhancer Box</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FASP	<i>Familial advanced sleep-phase</i>
FASPS	<i>Familial advanced sleep-phase</i> Syndrom
FCS	Fetales Kälberserum
GAPVD1	<i>GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GnRH	Gonadotropin- <i>Releasing</i> -Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	Menschliche embryonale Nierenzellen
HT	Menschliche Fibrosarkom-Zelllinie
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
ipRGC	Intrinsische photosensitiven retinalen Ganglienzellen
mRNA	Messenger-RNA
n	Stichprobenumfang
P-Zelle	Period2-überexprimierende Zelle
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween TM 20
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PER	Period
PER1	<i>Period circadian protein homolog 1</i>
PER2	<i>Period circadian protein homolog 2</i>
qPCR	Quantitative PCR
RAB5	<i>Ras-related protein Rab-5A</i>

REV-ERBa/NR1D1

RNA

ROR

SCN

SDS

SDS-PAGE

SIK3

TAE

TBS-(T)

TEMED

TGS

TRH

tRFP

WT

Nuclear receptor subfamily 1 group D member 1

Ribonukleinsäure

RAR-related orphan receptor

Suprachiasmatischer Nucleus

Natriumdodecylsulfat

Natriumdodecylsulfat-

Polyacrylamidgelelektrophorese

Salt-inducible kinase 3

Tris-Acetat-EDTA

Tris-gepufferte Salzlösung (plus Tween)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Tris-Glycin-SDS

Thyreotropin-Releasing-Hormon

Rot fluoreszierendes Protein

Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Die innere Uhr des Menschen	1
1.1.1. Makroskopische Struktur der zirkadianen Uhr.....	2
1.1.2. Der molekulare Aufbau der zirkadianen Uhr	3
1.1.3. Die Proteine des zytoplasmatischen PER-Komplexes	4
1.2. Ziele der Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1. Material.....	10
2.1.1. Zellkultur.....	10
2.1.1.1. Zelllinien	10
2.1.1.2. Lösungen und Medien	11
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien	12
2.1.3. Puffer und Stammlösungen	13
2.1.4. Nukleinsäuren.....	13
2.1.5. Antikörper	14
2.1.6. Sonstige Proteine	15
2.1.7. Kits	15
2.1.8. Sonstige Materialien	16
2.1.9. Geräte	16
2.1.10. Software	17
2.2. Methoden	18
2.2.1. Zellkultur.....	18
2.2.1.1. Kultivierung humaner Zellen	18
2.2.1.2. Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen	18
2.2.1.3. Behandlung von Zellen mit dem CSNK1D-Inhibitor PF-670462	19
2.2.1.4. Behandlung von Zellen mit Autophagie- und Proteasom-Inhibitoren....	19
2.2.2. Mikroskopie	20
2.2.2.1. Fluoreszenzmikroskopie	20

2.2.3.	Proteinanalytik	20
2.2.3.1.	Immunpräzipitation	20
2.2.3.2.	Herstellung von Gesamtzelllysaten für Western-Blot	21
2.2.3.3.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.2.3.4.	Western Blot – Elektrophoretischer Transfer und Immunochemische Detektion.....	22
2.2.4.	Nachweis und Quantifizierung von Nukleinsäuren	22
2.2.4.1.	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	22
3.	Ergebnisse.....	24
3.1.	Charakterisierung der Interaktion zwischen CSNK1D, PER2 und GAPVD1 in HEK- 293T-Zellen	24
3.1.1.	Subzelluläre Lokalisation von PER2 und CSNK1D	24
3.1.2.	Proteinexpressionslevel von CSNK1D, PER2, und GAPVD1.....	25
3.1.3.	mRNA-Transkription von <i>Per2-Gfp</i> und <i>Csnk1d-Trfp</i>	25
3.1.4.	Die Interaktion zwischen GAPVD1, PER2 und CSNK1D	27
3.2.	Charakterisierung der Interaktion zwischen CSNK1D, PER2 und GAPVD1 in HT1080-Zellen.....	30
3.2.1.	Subzelluläre Lokalisation von PER2 und CSNK1D	31
3.2.2.	Proteinexpressionslevel von CSNK1D, PER2, und GAPVD1.....	33
3.2.3.	Interaktion zwischen GAPVD1, PER2 und CSNK1D.....	34
3.3.	Aufklärung der Ursache für die fehlende Expression von PER2 Δ -GFP.....	37
3.3.1.	mRNA-Expression der Transgene CSNK1D-tRFP, PER2-GFP und PER2 Δ -GFP	37
3.3.2.	Analyse des proteosomalen und Autophagie-abhängigen Abbaus von PER2 Δ	38
3.3.3.	Destabilisierung von PER2 Δ durch CSNK1D-abhängige Phosphorylierung	39
3.4.	Analyse der GAPVD1-CSNK1D-Interaktion nach CSNK1D-Inhibition durch PF670462.....	39
4.	Diskussion	42
4.1.	Einfluss der CSNK1D-Bindungsdomäne auf die subzelluläre Lokalisation von PER2.....	42

4.2.	Mögliche Gründe für die stark reduzierte Proteinmenge von PER2 Δ in HEK-293T- und HT1080-Zellen	43
4.3.	Zusammenspiel der Interaktion zwischen CSNK1D, GAPVD1 und PER2.....	46
4.4.	Einfluss der Interaktionen von GAPVD1, PER2 und CSNK1D auf ihre eigenen posttranslationalen Modifikationen.....	46
4.5.	Die Bedeutung von Proteininteraktionen für die innere Uhr des Menschen.....	48
4.6.	Schlussfolgerung	49
4.7.	Ausblick	50
	Literaturverzeichnis.....	52
	Danksagung	63

1. Einleitung

1.1. Die innere Uhr des Menschen

Fast das gesamte Leben auf der Erde unterliegt einem 24h-Rhythmus, welcher durch den periodischen Licht-Dunkel-Wechsel zustande kommt. Um sich an diese äußeren Umstände anpassen und rhythmisch auftretende Veränderungen antizipieren zu können, besitzen der Mensch und nahezu alle anderen Lebewesen auf der Erde eine endogene zirkadiane Uhr (Aschoff 1965).

Alle zirkadianen Uhren sind durch drei zentrale Eigenschaften charakterisiert: Freilauf, *Entrainment* und die Fähigkeit zur Temperaturkompensation (Narasimamurthy und Virshup 2017). Freilauf wird definiert als die Fähigkeit der zirkadianen Uhr bei konstanten Umweltbedingungen, ohne sich ändernde äußere Einflüsse, eine gleichbleibende Rhythmizität zu generieren. Es wurde festgestellt, dass die natürliche Periodenlänge der menschlichen inneren Uhr im Schnitt ca. 24,5 Stunden beträgt. Auf den ersten Blick scheint dies im Widerspruch zu dem 24h-Rhythmus der Erdrotation zu stehen, weshalb hier eine weitere Eigenschaft der inneren Uhr zum Tragen kommt. Im Alltag reagiert die zirkadiane Uhr auf extrinsische Einflüsse, so genannte Zeitgeber, welche die Phase der inneren Uhr den Umständen entsprechend verschieben und somit eine genaue Anpassung an den 24h-Rhythmus der Erde ermöglichen. Dieser Vorgang wird *Entrainment* genannt. Neben Licht als Hauptzeitgeber spielen beispielsweise Temperaturveränderungen oder metabolische Signale ebenfalls eine Rolle (Aschoff 1965, 1984). Die dritte Eigenschaft zirkadianer Uhren ist die Temperaturkompensation. Darunter versteht man die Unabhängigkeit der Periodenlänge, die unter anderem von chemischen Reaktionsgeschwindigkeiten innerhalb des molekularen Oszillators bestimmt wird, in Bezug auf die Umgebungstemperatur (Pittendrigh 1954; Hastings und Sweeney 1957).

Die Relevanz und der Einfluss der inneren Uhr zeigen sich vor allem an den rhythmisch ablaufenden physiologischen Prozessen im gesamten Organismus. Es verlaufen ganze Stoffwechselwege und zelluläre Expressionsprogramme der Leber, der Niere, des Herzens und der Lunge in einem zirkadianen Rhythmus (Zhang et al. 2014). Entsprechend der notwendigen zeitlichen Koordination in gesunden Menschen können fehlgesteuerte zirkadiane Stoffwechselwege ebenso mit Krankheiten assoziiert sein. Bei Schichtarbeitenden treten im Vergleich zu Personen, die nur tagsüber arbeiten, beispielsweise gehäuft Diabetes mellitus Typ II, Adipositas und Magengeschwüre auf (Knutsson 2003). Ebenso scheint auch das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöht zu sein (Thosar et al. 2018).

Die Forschungen der letzten Jahre über die Zusammenhänge von zirkadianer Uhr und menschlicher Gesundheit ermöglichen die Modifikation medizinischer Therapien im Sinne von „Chronotherapien“. Es wurde festgestellt, dass viele, oft verordnete Medikamente, zirkadiane Gene und Proteine zum Ziel haben. Bei kurzen Medikament-Halbwertzeiten kann somit durch eine zeitlich abgestimmte Einnahme eine bessere Wirkung erzielt werden (Zhang et al. 2014). Hermida et al. konnten beispielsweise in einer Studie zeigen, dass bei Personen mit milder Hypertonie ohne deutlichen nächtlichen Blutdruckabfall, die abendliche *Low-Dose-Cyclooxygenase-Hemmer* Applikation eine stärkere Blutdruck-Senkung bewirkt als die morgendliche Medikamenteneinnahme (Hermida et al. 2005).

1.1.1. Makroskopische Struktur der zirkadianen Uhr

Die innere Uhr des Menschen und anderer Säugetiere ist hierarchisch aufgebaut (Abb. 1). Der Haupttaktgeber im Gehirn befindet sich im Bereich des Hypothalamus. Dort ist, neben dem dritten Ventrikel über dem Chiasma Opticum, der *Nucleus suprachiasmaticus* (SCN) lokalisiert (Hastings et al. 2019). Über Lichteinfall auf die intrinsisch photosensitiven retinalen Ganglienzellen (ipRGC) und das dort exprimierte Melanopsin, werden über den retinohypothalamischen Trakt Lichtsignale an den SCN weitergeleitet (Freedman et al. 1999; Berson et al. 2002; Gooley et al. 2001). Die dort lokalisierten, autonom oszillierenden Neuronen senden vorwiegend Efferenzen zu verschiedenen Bereichen im Hypothalamus, Thalamus und Hirnstamm. Von dort aus erfolgt die Synchronisation der peripheren Oszillatoren über neuroendokrine Achsen, wie beispielsweise das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), das Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) und das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) (Kalsbeek und Buijs 2002). Ebenso haben die Licht-abhängige Melatonin-Sekretion und Veränderungen der Körpertemperatur Einfluss auf die peripheren Uhren (Kalsbeek et al. 2011). Läsionen im Bereich des SCNs führen dementsprechend nicht zu einem vollständigen Verlust der zirkadianen Rhythmik, sondern nur zur Asynchronität der peripheren zirkadianen Uhren, welche weiterhin eigenständig oszillieren (Yoo et al. 2004).

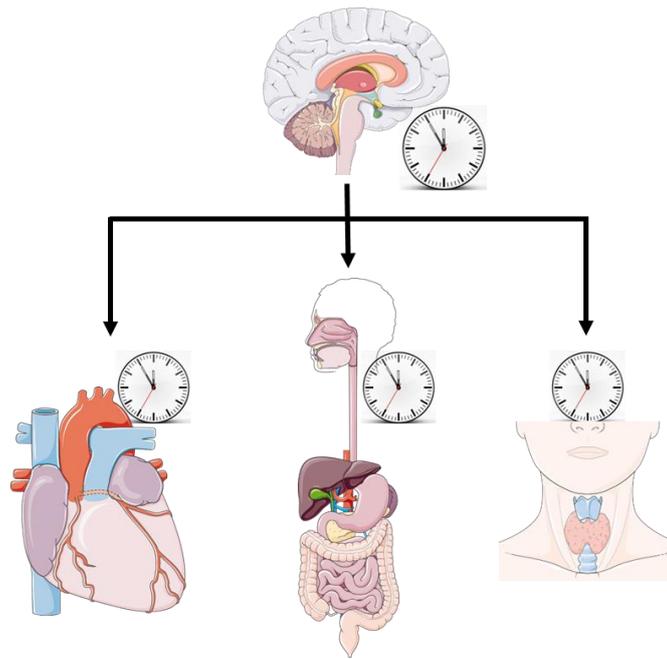


Abb. 1: Hierarchischer Aufbau der inneren Uhr von Säugetieren

Die innere Uhr des Menschen ist hierarchisch aufgebaut. Der Haupttaktgeber sitzt im Nucleus suprachiasmaticus im Hypothalamus, wird über Lichteinfall gesteuert und synchronisiert von dort alle peripheren Uhren und damit biologische Prozesse im Körper (Die Abbildung wurde zum Teil unter Verwendung von Servier Medical Art erzeugt, bereitgestellt von Servier, lizenziert unter einer Creative Commons Attribution 3.0 unportierter Lizenz).

1.1.2. Der molekulare Aufbau der zirkadianen Uhr

Auf molekularer Ebene funktionieren zirkadiane Oszillatoren mithilfe von transkriptionell-translationellen Rückkopplungsschleifen. Die aktivierenden Transkriptionsfaktoren CLOCK (*Circadian locomotor output cycles protein kaput*) und BMAL1 bzw. ARTNL (*Arylhydrocarbon Receptor nuclear translocator-like protein*) und die Repressoren PER1, PER2 (*Period circadian protein homolog 1 bzw. 2*), CRY1 und CRY2 (*Cryptochrome-1 bzw. 2*) stellen die Kernbestandteile der zentralen Rückkopplungsschleife dar (Vitaterna et al. 1994; Tei et al. 1997; Gekakis et al. 1998; van der Horst, G T et al. 1999).

Im Mausmodell bilden CLOCK und BMAL1 ein Heterodimer, welches Morgens an E-Box-Elemente im Promotorbereich von *Per1/2*- und *Cry1/2*-Genen bindet (Gekakis et al. 1998; Lee et al. 2001). Die translationierten Proteine PER1/2 und CRY1/2 akkumulieren im Cytoplasma und treten gegen Abend gemeinsam mit der Caseinkinase 1 delta (CSNK1D) als PER-Komplex in den Nukleus ein (Lee et al. 2001; Kume et al. 1999; Brown et al. 2005; Aryal et al. 2017). PER und CRY-Proteine interagieren anschließend mit CLOCK:BMAL1, bilden somit den nukleären PER-Komplex und hemmen über Nacht die weitere *Per*- und *Cry*-Genexpression (Duong et al. 2011; Padmanabhan et al. 2012). Über posttranslationale Mechanismen, wie beispielsweise Phosphorylierung mit anschließender Degradierung von

PER1/2 und CRY1/2, kann am nächsten Tag ein neuer zirkadianer Zyklus beginnen (Gallego und Virshup 2007) (Abb. 2).

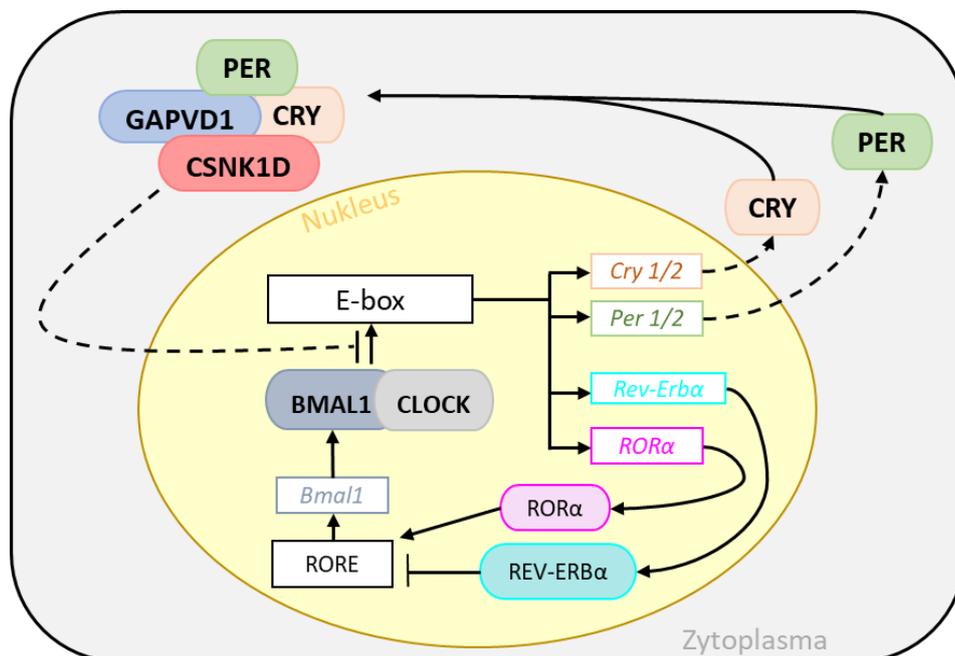


Abb. 2: Molekularer Aufbau des zirkadianen Oszillators

Transkriptionell-translationelle Rückkopplungsschleifen bilden den molekularen Oszillator. Das Heterodimer CLOCK:BMAL1 aktiviert die Expression der Uhrenproteine CRY, PER, REV-ERB α und ROR α . CRY und PER bilden außerhalb des Zellkerns einen Komplex mit CSNK1D/E und GAPVD1. Dieser hemmt anschließend die weitere Expression der zuvor genannten Proteine im Zellkern. Die Expression von BMAL1 wird über REV-ERB α und ROR α beeinflusst (Aryal et al. 2017).

1.1.3. Die Proteine des zytoplasmatischen PER-Komplexes

Wie zuvor aufgeführt entstehen im Verlauf des zirkadianen Zyklus zytoplasmatische PER-Komplexe, welche die Proteine PER1-3, CRY1-2, CSNK1D und das erst vor kurzem entdeckte GAPVD1 (*GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1*) beinhalten (Aryal et al. 2017). Mutationen und Funktionshemmung dieser Proteine können beispielsweise zu Veränderungen der zirkadianen Periodenlänge führen (Etchegaray et al. 2009; Eng et al. 2017; Toh et al. 2001; Aryal et al. 2017), was die Relevanz der Bindung zwischen PER2, CSNK1D und GAPVD1 für die Aufrechterhaltung der drei Haupteigenschaften der inneren Uhr (Freilauf, Entrainment und Temperaturkompensation) verdeutlicht.

GAPVD1

GAPVD1 ist 2006 von Hunker et al. im Zusammenhang mit Endozytose identifiziert worden. Das Protein enthält eine VSP9- bzw. Rab-GEF-Domäne, welche über einen

GDP/GTP-Austausch RAB5 aktiviert und dadurch einen geschwindigkeitslimitierenden Einfluss auf die Pinozytose und die rezeptorvermittelte Endozytose hat. Die zweite funktionelle Domäne ist eine Ras-GAP-Domäne, über welche GAPVD1 das Protoonkogen Ras mittels Hydrolyse des gebundenen GTP inaktivieren kann (Hunker et al. 2006; Kim et al. 2019). Es scheint mit Hilfe dieser Domäne an der Ubiquitinierung des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) beteiligt zu sein (Su et al. 2007). Im Bereich der Clathrin-vermittelten Endozytose ist GAPVD1 sogar unabhängig von der Verbindung zur zirkadianen Uhr ein Substrat der CSNK1D. Die Regulation erfolgt hierbei über die Phosphorylierung von GAPVD1 (Guillen et al. 2020).

Passend zu den bisherigen Erkenntnissen in Bezug auf die Funktion von GAPVD1 lokalisiert dieses an kleinen intrazellulären Vesikeln, welche ebenfalls RAB5 enthalten und ist ebenso mit der Plasmamembran der Zellen assoziiert (Hunker et al. 2006) wie auch im Zytosol zu finden (Hermle et al. 2018).

CSNK1D

CSNK1D gehört zu den Serin- und Threoninkinasen (Graves et al. 1993). Der C-Terminus der CSNK1D übernimmt vor allem regulatorische Aufgaben, durch die sich dort befindende Autoinhibitionsdomäne (Graves und Roach 1995). Der schrittweise regulierbare Phosphorylierungs- und Aktivitätszustand des Enzyms wird von Proteinphosphatasen, durch die CSNK1D selbst oder durch andere Kinasen bestimmt (Rivers et al. 1998; Giamas et al. 2007; Xu et al. 2019). Mittels Konformationsänderungen wird so das katalytische Zentrum freigegeben, sodass Substrate binden können (Longenecker et al. 1996; Guo et al. 2019).

CSNK1D konnte bereits in vielen Organen in unterschiedlichen Konzentrationen nachgewiesen werden (Xu et al. 2019). Auf zellulärer Ebene befindet sie sich im Zytosol, vermehrt in den perinukleären Regionen in der Nähe des Golgiapparates. Temporär assoziiert sie mit dem Nukleus, Membranen, Rezeptoren, Transportvesikeln, Zentrosomen und Zytoskelettkomponenten (Behrend et al. 2000; Xu et al. 2019; Guillen et al. 2020).

Entsprechend breit sind die Funktionsbereiche der CSNK1D angelegt. So ist sie neben ihren Aufgaben innerhalb des zirkadianen Rhythmus auch bei DNA-Schäden und Zellstress hochreguliert. Ebenso ist sie am Zellzyklus, in der Mitose und Meiose beteiligt und von großer Bedeutung für Signalwege, welche der Zellproliferation, -differenzierung und der Gewebemöostase dienen. In Folge dessen sind Fehlregulationen und Mutationen innerhalb der CSNK1D mit Tumorgenesen, neurologischen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Morbus Alzheimer, Parkinson und ALS, und metabolischen Erkrankungen assoziiert (Xu et al. 2019).

PER2

Bei PER2 handelt es sich, wie bereits erwähnt, um einen negativen Transkriptionsregulator für CLOCK:BMAL1 (Yu et al. 2002; Chen et al. 2009). PER2 befindet sich in nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers. In peripheren Uhren und dem zentralen Oszillator weist das Protein robuste zirkadiane Rhythmen auf, mit einem *Per2*-mRNA-Maximum am Abend. Durch gezielte Lichtexposition ist es jedoch möglich in Teilen des SCNs, unabhängig von der Tageszeit, einen Anstieg der *Per2*-mRNA zu induzieren (Shearman et al. 1997; Yan et al. 1999; Lee et al. 2001).

Je nach Zelllinie lokalisiert PER2 entweder im Nukleus oder im Zytoplasma (Vielhaber et al. 2000). Der PER2 Transport vom Zytoplasma in den Nukleus findet mittels PER2-Dimerisierung, entweder mit sich selbst oder mit CRY1, als Teil des PER-Komplexes statt (Hong und Tyson 1997; Miyazaki et al. 2001; Lee et al. 2001).

Außerhalb der zirkadianen Uhr konnten bisher nur wenige PER2-Funktionen nachgewiesen werden. So konnten Fu et al. einen Zusammenhang zwischen onkogenen Erkrankungen und einer *Per2*-Gendelektion feststellen. Daraus kann geschlossen werden, dass PER2 an DNA-Reparatur-Mechanismen und insbesondere der Tumorsuppressorexpression beteiligt sein könnte (Fu et al. 2002). Ebenso scheint PER2 in der Autophagie involviert zu sein und diese bei Hochregulation des Proteins zu hemmen (Kalfalah et al. 2016). Weiterhin konnte in *Drosophila* gezeigt werden, dass *Per*-Mutanten Defizite im Langzeitgedächtnis aufwiesen, während eine *Per*-Überexpression zu einer Verbesserung von diesem führte (Sakai et al. 2004).

Die Interaktion von CSNK1D, GAPVD1 und PER2 im zytoplasmatischen PER-Komplex

Innerhalb der zirkadianen Uhr ist das Zusammenwirken von GAPVD1, CSNK1D und PER2 noch nicht vollständig geklärt. Bereits festgestellt worden ist, dass GAPVD1 und PER2 Substrate der CSNK1D sind. Die Periodenlänge der inneren Uhr kann mit Hilfe der Wechselwirkungen der Proteine untereinander angepasst und reguliert werden (Camacho et al. 2001; Guillen et al. 2020).

Die Aktivität der Kinase selbst wird vor allem durch (Auto)-Phosphorylierung am Carboxy-Terminus beeinflusst.

Die Abbaurate und damit die Stabilität von PER2 wird durch den sogenannten *Phosphoswitch* reguliert (Camacho et al. 2001). PER2 besitzt zwei Phosphorylierungscluster: Die „*Familial Advanced Sleep Phase Syndrome*“-Stelle (FASPS-Stelle) und die Phosphodegron-Stelle. Der Phosphorylierungszustand beider Stellen wird durch die kombinierte zirkadiane Aktivität der Protein Phosphatase 1 und der CSNK1D und CSNK1E reguliert. Letztere können über Konformationsänderungen ihre

Substratselektivität in Abhängigkeit von zellulären Signalen entweder an die FASPS- oder Phosphodegron-Stelle anpassen (Narasimamurthy et al. 2018; Philpott et al. 2020).

Die sequenzielle Phosphorylierung wird durch PER2-Primingkinasen eingeleitet, bei welchen es sich ebenfalls um die CSNK1D und CSNK1E handelt. Die Phosphorylierung der FASPS-Stelle trägt zur Proteinstabilität bei, indem PER2 eine Konformationsänderung durchläuft und damit die Phosphorylierungsstellen der Phosphodegron-Stelle blockiert (Zhou et al. 2015; Narasimamurthy et al. 2018). Die ebenfalls stufenweise erfolgende Phosphorylierung der Phosphodegron-Stelle führt zu einer Öffnung der Proteinstruktur und somit gesteigerter proteosomaler Proteindegradation mittels β -TrCP, einer E3-Ligase (Shanware et al. 2011; Eide et al. 2005; Gallego et al. 2006; Chiu et al. 2011).

Die PER2-Phosphorylierung hat ebenso einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins. Studien zeigen, dass die Phosphorylierung der FASPS-Stelle zu einer vermehrten nukleären Retention führt. Der PER2-Abbau verläuft jedoch vornehmlich im Zytosol, entsprechend kann das Protein zusätzlich durch dessen Lokalisation entweder stabilisiert oder vermehrt abgebaut werden (Vanselow et al. 2006; Ohsaki et al. 2008).

Diese Clusterphosphorylierungen von PER2 scheinen maßgebend für die Regulierung der Geschwindigkeit der inneren Uhr zu sein, da so der Proteinabbau bei Bedarf verzögert werden kann (Chiu et al. 2011). Dementsprechend führt eine Mutation an der Phosphodegron-Stelle, welche die regelrechte Phosphorylierung behindert, zu einer Verlängerung der Periodendauer, aufgrund des stabileren Proteins (Masuda et al. 2020).

Erst 2017 konnte auch GAPVD1 als Substrat der CSNK1D nachgewiesen werden. Das Protein ist fester Bestandteil des zytoplasmatischen PER-Komplexes, während dies auf den nukleären PER-Komplex nicht mehr zutrifft. Aufgrund der bisher bekannten GAPVD1-Funktionen, liegt die Vermutung nahe, dass es auch hier den Proteintransport und die Bildung des PER-Komplexes beeinflusst, somit also regulatorische Aufgaben übernimmt (Aryal et al. 2017).

GAPVD1 besitzt in seinen intrinsisch ungeordneten Regionen insgesamt 38 CSNK1D-Phosphorylierungsstellen. Eine vermehrte CSNK1D-abhängige Phosphorylierung fördert hierbei vermehrt die Endozytose in der Zelle (Guillen et al. 2020). In Bezug auf die Proteinstabilität könnten insbesondere die in Ibrahim et al identifizierten Phosphorylierungsstellen 3 und 5 eine große Relevanz haben – ihr Phosphorylierungsstatus ist eng korreliert mit einem schnelleren oder verzögerten Proteinabbau. Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die CSNK1D rhythmisch an GAPVD1 gebunden ist und für dessen Phosphorylierung von PER2 benötigt wird. PER2 scheint hierzu mit der Autoinhibitionsdomäne der CSNK1D zu interagieren und auf diese Weise die Enzymfunktion zu regulieren (Ibrahim et al. 2021).

Die Relevanz der korrekt abgestimmten Interaktion dieser Proteine wird deutlich, wenn ihre Funktion beeinflusst wird. Etchegaray et al. und weitere Forschungsgruppen konnten feststellen, dass eine dysfunktionale CSNK1D zu erhöhten PER2-Leveln führt. Der verlangsamte Abbau von PER2 lässt sich auf die fehlende Phosphorylierung seitens der CSNK1D zurückführen. Dadurch kommt es zu Proteinakkumulation und somit einer prolongierten PER2-induzierten negativen Rückkopplung. Damit einhergehend kam es zu einer Verlängerung der Periodenlänge (Etchegaray et al. 2009; Isojima et al. 2009; Nakajima et al. 2015). In ähnlicher Weise konnte gezeigt werden, dass eine CSNK1D-Überexpression oder eine gezielte Mutation an einer Phosphorylierungsstelle, welche die Kinaseaktivität steigert, zu einer vermehrten PER2-Degradierung führen kann (Eng et al. 2017; Mieda et al. 2016). Ebenso können Mutationen in PER2 zu Veränderungen in der zirkadianen Rhythmik führen. Eine Mutation an der Phosphodegron-Stelle, welche die regelrechte Phosphorylierung behindert, führt zu einer Verlängerung der Periodendauer (Masuda et al. 2020). Mutationen in der FASPS-Stelle, welche eine wichtige Bindungsregion für CSNK1D/E enthält, führt zu einer verkürzten Periodenlänge. Diese macht sich klinisch im *Familial Advanced Sleep Phase Syndrome* (FASPS) bemerkbar (Toh et al. 2001). Zuletzt konnte gezeigt werden, dass ebenso ein GAPVD1-Gen-Knockdown die zirkadiane Uhr beeinflussen kann – es kommt zu einer signifikanten Verlängerung der Periodenlänge (Aryal et al. 2017).

1.2. Ziele der Arbeit

Der zytoplasmatische PER-Komplex nimmt eine tragende Rolle innerhalb der zirkadianen Uhr des Menschen ein. Zum aktuellen Zeitpunkt ist er jedoch noch nicht ausreichend erforscht. Insbesondere die Interaktionen der Proteine untereinander werfen noch viele Fragen auf. So wurde erst 2017 mit GAPVD1 ein neuer Bestandteil des Komplexes identifiziert und auch erst vor kurzem das Modell des CSNK1D-PER2-Phosphoswitch zur PER2-Regulation vorgeschlagen. Diese experimentelle Arbeit soll zur weiteren Untersuchung des PER-Komplexes beitragen, mit besonderem Fokus auf die direkte Interaktion zwischen GAPVD1 und CSNK1D und deren Abhängigkeit von PER2.

Hierzu sollen bereits generierte HT1080-Zelllinien mit stabil exprimiertem PER2-GFP und/oder CSNK1D-tRFP und eine weitere Zelllinie, die PER2-GFP ohne CSNK1D-Bindungsdomäne exprimiert, verwendet werden. Diese Zellen sollen mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Proteinverteilungsmuster und mittels Immunpräzipitation auf ihre Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden.

Das Ziel dieses Projekts war es herauszufinden, wie GAPVD1, CSNK1D und PER2 miteinander interagieren, und insbesondere ob die Interaktion zwischen GAPVD1 und CSNK1D durch PER2 vermittelt oder beeinflusst wird.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Ausgangszelllinie	Beschreibung	Zelllinienbezeichnung
HT1080	Humane Fibrosarkomzellen, DSMZ, #DSM ACC 315 Braunschweig, Deutschland	HT1080 oder HT WT
	HT1080 Zellen, mit stabiler CSNK1D-GFP-Expression, Puromycin-resistent	HT1080 CSNK1D-GFP oder HT1080 C
	HT1080 Zellen, mit stabiler Per2-GFP-Expression, Puromycin-resistent	HT1080 Per2-GFP oder HT1080 P
	HT1080 Zellen, mit stabiler Per2-GFP-Expression und Deletion Δ 489-618, Puromycin-resistent	HT1080 Per2-GFP oder HT1080 P Δ
	HT1080 Zellen, mit stabiler CSNK1D-tRFP- und Per2-GFP-Expression, Puromycin-resistent	HT1080 CSNK1D-GFP-Per2-GFP oder HT1080 CP
	HT1080 Zellen, mit stabiler CSNK1D-tRFP und Per2-GFP-Expression und Deletion Δ 489-618, Puromycin-resistent	HT1080 CSNK1D-tRFP-Per2-GFP oder HT1080 CP Δ
	HEK-293T	Humane embryonale Nierenzellen
	HEK-293T Zellen, mit transienter Per2-GFP-Expression	HEK-293T Per2-GFP oder HEK-293T P

	HEK-293T Zellen, mit transienter CSNK1D-tRFP und Per2-GFP-Expression	HEK-293T CSNK1D-TRFP-Per2-GFP oder HEK-293T CP
	HEK-293T Zellen, mit transienter CSNK1D-tRFP und Per2-GFP-Expression und Deletion Δ 489-618	HEK-293T CSNK1D-tRFP-Per2-GFP oder HEK-293T CP Δ

2.1.1.2. Lösungen und Medien

Tabelle 2: Verwendete Lösungen

Bezeichnung	Hersteller/Herstellungsort
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Fetales Kälber-Serum (FCS)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin- (10.000U/ml) und Streptomycinlösung (100 μ g/ml)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (Ca ²⁺ -; Mg ²⁺ -frei)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Puromycin	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05%)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA

Tabelle 3: Verwendete Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfriermedium	10% DMSO, 90% FCS
Nährmedium	DMEM+GlutaMAX-I mit 10% FCS, jeweils 100U/ml Penicillin und Streptomycin
Selektionsmedium	DMEM+GlutaMAX-I mit 10% FCS, jeweils 100U/ml Penicillin und Streptomycin und 0,4 μ g/ml Puromycin

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Amidoschwarz	Serva, Heidelberg, Deutschland
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol-Blau	Merck, Darmstadt, Deutschland
CAPS	Sigma, St. Louis, USA
Chloroquin	Sigma, St. Louis, USA
dH ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, St. Louis, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Z-Leu-Leu-Leu-al (MG 132)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumchlorid	VWR International, West Chester, Pennsylvania, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP-40	Fluka, Seelze, Deutschland
PF-670462	Sigma, St. Louis, USA
Polyacrylamid Rotiophorese Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polysorbat20 (Tween20)	Sigma, St. Louis, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel, Schweiz
Protease-Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel, Schweiz
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma, St. Louis, USA

2.1.3. Puffer und Stammlösungen

Tabelle 5: Verwendete Puffer und Stammlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Anode 1 Puffer	0,3M Tris-Cl (pH 10,4), 20% MeOH
Anode 2 Puffer	25mM Tris-Cl (pH 10,4), 10% MeOH
Elutionspuffer (1ml)	50mM Tris (pH 6,8), 50mM DTT, 1% SDS, 10% Glycerol, 1x 25fach EDTA freier Proteaseinhibitor, 1x 20facher Phosphataseinhibitor
Kathode-Puffer	70mM CAPS/NaOH (pH 10,5)
5x Laemmli-Puffer	Tris/HCl pH6, 156,25mM; 25% Glycerin; 5% SDS, 50mM DTT, 10ml H ₂ O
1x Laemmli-Ladepuffer (1ml)	200µl 5x Laemmli-Puffer, 100µl 10% SDS, 10µl DTT, 10µl Pefa, 680µl PBS
Lysepuffer mit hohem Salzgehalt	500mM NaCl, 50mM Tris (pH 8,0), 1% SDS, 1x 25fach EDTA freier Proteaseinhibitor, 1x 20facher Phosphataseinhibitor, dH ₂ O
Lysepuffer mit niedrigem Salzgehalt	50mM Tris (pH 8,0), 1% SDS, 1x 25fach EDTA freier Proteaseinhibitor, 1x 20facher Phosphataseinhibitor, dH ₂ O
10x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)	1,5M NaCl; 0,2M Tris
TBS-T (1l)	100ml 10xTBS; 1ml Tween20 (0,1%), 899ml H ₂ O
10x TGS-Puffer (Tris-Glycin-SDS-Puffer)	0,25M Tris; 1,92M Glycin; 1% SDS
1x TGS-Puffer	100ml 10x TGS; 900ml H ₂ O

2.1.4. Nukleinsäuren

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Beschreibung	Plasmidname
Per2-GFP	pMCC-hPer2-GFP-P
CSNK1D-tRFP und Per2-GFP	pMCC-CSNK1D-tRFP-Per2-GFP-P
CSNK1D-tRFP- und Per2-GFP- mit Deletion Δ489-618	pMCC-CSNK1D-tRFP-Per2 d489-618-GFP-P

Beschreibung	Aminosäuresequenz
5-GFP Primer	5'-gga gta caa cta caa cag cca ca-3'
3-GFP Primer	5'-agt tca cct tga tgc cgt tct t-3'
5-TagRFP Primer	5'-gaa aga atc aag gag gcc gac aaa-3'
3-TagRFP Primer	5'-ttt gct agg gag gtc gca gta tc-3'
5-GAPDH Primer	5'-tcc atg aca act ttg gta tcg-3'
3-GAPDH Primer	5'-cag tct tct ggg tgg cag tga-3'
5-Bactin Primer	5'-cgc gag aag atg acc cag atc-3'
3-Bactin Primer	5'-cac agc ctg gat agc aac gt-3'

2.1.5. Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Antigen	Ursprung	Verdünnung (WB/IP)	Art	Quelle/ID
Anti-CSNK1D	CSNK1D	Maus	1:2.000/4µg	Primär	ab85320, Abcam, Cambridge, UK
Anti-Rap6	GAPVD1/ Rap6	Kaninchen	1:750-1:1.000/4µg	Primär	NBP1-19156, Novus Biologicals, Centennial, USA
Anti-GFP	GFP	Lama	-/4µg	Primär	90910001U- 01, Chromotek, Planegg- Martinsried, GER
JL8	GFP		1:500-1:1.000/4µg	Primär	632380, Takara Bio Clontech, Mountain View, USA
Anti-Per2	Per2	Kaninchen	1:500-1:1.000/2µg	Primär	20359-1-AP, Proteintech,

					Rosemont, USA
Anti-Per2	Per2	Maus	1:5.000/-	Primär	67513-1-Ig, Proteintech, Rosemont, USA
Anti-Kaninchen	Kaninchen-Antikörper	Esel	1:10.000/-	Sekundär	NA934V, GE Healthcare, Chicago, USA
Anti-Maus	Maus-Antikörper	Schaf	1:40.000/4µg	Sekundär	NA931V, GE Healthcare, Chicago, USA

2.1.6. Sonstige Proteine

Tabelle 8: Verwendete sonstige Proteine

Protein	Hersteller
Bovines Serum Albumin	Sigma, St. Louis, USA
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.7. Kits

Tabelle 9: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
Effectene Transfection Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
µMACS Protein A/G MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific, Nürnberg, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SYBR® Green Mastermix	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.8. Sonstige Materialien

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Color Prestained Protein Standard, Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
15ml BD Falcon Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
50ml BD Falcon Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Gel Kassetten Novex, 1mm	Invitrogen, Carlsbad, USA
Immobilon-P (PVDF) Transfermembran	Millipore, Bedford, USA
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche, Mannheim, Deutschland
μ-Slide 2 well	Ibdi, Martinsried, Deutschland
μ-Slide 8 well	Ibdi, Martinsried, Deutschland
6-Well-Mikrotiterplatte	VWR, Radnor, USA
Parafilm	Pechiney PLastic Packaging, Chicago, USA
Whatman Filterpapier	GEHealthcare, Buckinghamshire, England
Zellkulturflasche (klein, T25)	Thermo Scientific, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturflasche (groß, T175)	Thermo Scientific, Nürnberg, Deutschland

2.1.9. Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
96x Ölimmersionsobjektiv	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Hera Cell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Countless®-Cell-Counter	Invitrogen, Carlsbad, Deutschland
Feinwaage AE-166	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 100“	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Heizblock QBT	Grant, Labexchange, Burladingen, Deutschland
Luminescent image analyzer LAS4000	Fujifim, Tokyo, Japan
High-Performance real-time PCR with LightCycler® Systems	Roche, Mannheim, Deutschland
pH-Meter Climatic 766	Knick, Berlin, Deutschland

Sonotrode Mikrospitze MS 72	Bandelin, Berlin, Deutschland
Sterilbank Herae Safe	Haraeus, Hanau, Deutschland
TransBlot SD SemiDry Transfer Cell	BioRad, Hercules, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG, München, Deutschland
Wasserbad WB20	Medingen, Dresden, Deutschland
Zentrifuge „Rotixa 50 RS“	Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.10. Software

Tabelle 12: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop	Adobe, San José, Kalifornien, Vereinigte Staaten
MS Office	Microsoft, Redmont, Washington, USA
LAS4000	Fujifilm, Tokyo, Japan
MetaMorph V6 3r6	Molecule Devices, Sunnyvale, USA
Multi-Gauge	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, England

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kultivierung humaner Zellen

Die Kultivierung der verwendeten humanen Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Luft. Genutzt wurden humane Fibrosarkomzellen „HT-1080“ und humane embryonale Nierenzellen „HEK-293T“.

Mittels einer stabilen Transfektion mit einem tricistronischen Konstrukt, wurden bereits im Vorfeld spezielle klonale HT1080-Zelllinien hergestellt. Die HT1080-CP-Zelllinie, welche nachfolgend nur noch als CP bezeichnet werden wird, enthielt das Plasmid pMccCSNK1D-tRFP-Per2-GFP-P (Abb. 16) (Ibrahim et al. 2021). Die HT1080-CP Δ -Zelllinie, im Folgenden nur noch als CP Δ bezeichnet, wurde durch Transfektion des Plasmids pMccCSNK1D-tRFP-PER2 d489-618-GFP-P hergestellt (Abb. 17) (Ibrahim et al. 2021). Der Unterschied in den beiden Plasmiden liegt in der Deletion der Aminosäuren 489-618 im Bereich der CSNK1D-Bindungsdomäne von PER2. Bei korrektem Einbau in die Zell-DNA kann dank diesem Konstrukt davon ausgegangen werden, dass die drei Cistronen auf einer mRNA transkribiert werden. Somit werden in jeder transfizierten Zelle die tRFP-markierte Caseinkinase im ersten Cistron und das GFP-markierte PER2(Δ) im zweiten Cistron exprimiert. Das dritte Cistron beinhaltet das Puromycinresistenz-Gen, welches die Selektion der Klone ermöglichte. Die HT1080-Wildtypzellen, welche ebenfalls weiter passagiert und in Experimenten genutzt worden sind, werden im Folgenden „HT-WT“ genannt.

Sowohl die HT1080- als auch die HEK-293T-Zellen wurden im Nährmedium (siehe Tabelle 3 in Material) passagiert. Das Selektionsmedium der stabil transfizierten HT-Zellen enthielt zusätzlich noch 0,4 μ g/ml Puromycin. Die Passage der Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage unter sterilen Bedingungen. Hierzu wurde das alte Nährmedium verworfen, die Zellen wurden mit phosphatgepuffertes Salzlösung gewaschen und anschließend mit Hilfe von 0,05% Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Daraufhin erfolgte die Resuspension und Verdünnung der Zellen, je nach Zelldichte mit anschließender Überführung in eine neue Zellkulturflasche.

Falls die entsprechenden Zelllinien in den darauffolgenden Tagen für Experimente eingesetzt werden sollten, wurden diese in größeren Zellkulturflaschen passagiert und anschließend kultiviert, bis die benötigte Zelldichte erreicht war.

2.2.1.2. Transiente Transfektion von HEK-293T-Zellen

Zur transienten Transfektion der Zellen wurden tricistronische Plasmide genutzt, welche in stabilen Transfektionen bereits erfolgreich verwendet worden waren: pMccCSNK1D-tRFP-PER2-GFP-P, pMccCSNK1D-tRFP-PER2 d489-618-GFP-P und pMccPER2-GFP-P

(Abb. 16-18) (Ibrahim et al. 2021). Die sich auf dem dritten Cistron befindende Puromycin-resistenz spielte bei transienten Transfektionen keine Rolle, da keine Selektion erfolgte.

Die transiente Transfektion erfolgte unter Verwendung des *Effectene Transfection Reagent-Kits* in der HEK-293T-Zelllinie. Hierzu wurden die Zellen am Vortag mit einer Verdünnung von ca. 1:5 in 175cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach Herstelleranweisung erfolgte am nächsten Tag die Transfektion von 5µg Plasmid-DNA mit Inkubation der Transfektionskomplexe für 48 Stunden. Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion wurden im Anschluss fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, Western-Blot und qPCR angefertigt.

2.2.1.3. Behandlung von Zellen mit dem CSNK1D-Inhibitor PF-670462

Um die CSNK1D zu hemmen wurden die HT1080-Zellen mit PF-670462 behandelt. Hierbei handelt es sich um einen selektiven CSNK1D und CSNK1E-Inhibitor. Hierzu wurden die Zellen in Zellkulturflaschen angezüchtet bis die benötigte Zelldichte erreicht war. Der Kinase-Inhibitor wurde daraufhin dem Nährmedium hinzugefügt in der Zielkonzentration von 10µmol. Nach 18-stündiger Inkubation der Zellen mit dem PF-versetzten Medium, wurde dieses verworfen, die Zellen wurden mit Phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen, mit 0,05% Trypsin/EDTA gelöst und in neuem Medium resuspendiert. Danach erfolgte die Vorbereitung der Zellen auf die darauffolgende Immunpräzipitation (siehe Material und Methoden – Immunpräzipitation).

2.2.1.4. Behandlung von Zellen mit Autophagie- und Proteasom-Inhibitoren

Zur Hemmung der Autophagie und der Proteasomen in den Zellen wurde bei der wöchentlichen Erhaltungskultur die Zellzahl von CP und CPΔ-Zellen mittels *Countess®-Cell-Counter* bestimmt. Neben der normalen Passage wurde ein Teil mit einer Zielzelldichte von 2×10^5 auf eine 6-*Multiwell*-Platte ausgesät. Am übernächsten Tag erfolgte der Mediumwechsel und den zu behandelnden Zellen wurde Medium mit den entsprechend konzentrierten Inhibitoren hinzugegeben: Chloroquin 50µM und MG132 reihenverdünnt je 2µM, 10 µM und 50µM. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden im Brutschrank wurden die Zellen geerntet und Gesamtzelllysate zur weiteren Proteinanalytik hergestellt. Zudem wurden ebenfalls Proben der unbehandelten Zellen für eine später erfolgte qPCR entnommen und bei -20°C bis zur entsprechenden Verwendung gelagert.

2.2.2. Mikroskopie

2.2.2.1. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der transient und stabil transfizierten Zelllinien und Charakterisierung ihrer Proteinverteilung wurde das Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop mit 63x/1,25 NA (numerische Apertur), Ölimmersionsobjektiv verwendet. Die Zellen wurden auf *ibidi* μ -slides ausgesät und nach ca. 24 Stunden mikroskopiert. Die tRFP-Fluoreszenz wurde im Wellenlängenbereich von 550-575nm angeregt und im Bereich von 590-650nm ermittelt. Die Anregung der GFP-Fluoreszenz erfolgte im Wellenlängenbereich von 470-490nm und wurde im Bereich von 500-550nm ermittelt.

2.2.3. Proteinanalytik

2.2.3.1. Immunpräzipitation

In Vorbereitung auf eine Immunpräzipitation (IP) wurden die entsprechenden Zellen in Zellkulturflaschen bis zur Erreichung einer hohen Zelldichte angezüchtet. Am Tag der IP wurde das alte Medium verworfen und die Zellen geerntet. Die suspendierten Zellen wurden drei Minuten lang bei 1200rpm zentrifugiert und der entstandene Mediumüberstand vorsichtig abgesaugt. Es folgte ein erneuter Waschvorgang des Zellpellets mit PBS und anschließender Zentrifugation bei 1200rpm für drei Minuten. Der PBS-Überstand wurde ebenfalls verworfen. Mit Hilfe des gekühlten TritonR x-100-Lysepuffers wurden die Zellen lysiert und die entstandenen, in Eis gelagerten Lysate bei 20% Geräteleistung jeweils drei Mal für 10 Sekunden sonifiziert. Danach wurden die Zelllysate für 30 Minuten erneut auf Eis gelagert und alle 10 Minuten mit Hilfe des Vortex Genie 2 durchmischt. Zur Sedimentierung des Zelldebris wurden die Proben in Eppendorfgefäße überführt und für 30 Minuten bei 13.300rpm zentrifugiert. Es entstand ein Flüssigkeitsüberstand, welcher in neue Glasröhrchen überführt worden ist, von welchen separat 50-75 μ l für den Input entnommen worden sind. Bei ca. 4mg Protein pro Zellkulturflasche wurde die restliche Flüssigkeit dann mit jeweils 2-4 μ g polyklonalem Antikörper (RAP6- bzw. CSNK1D-Antikörper) oder 1-2 μ g monoklonalem Antikörper (Anti-GFP) und 120 μ l Protein A/G *MicroBeads* versetzt, um die für die IP benötigten Proteine magnetisch zu markieren. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C unter kontinuierlicher Schüttelbewegung mittels des *VWR® Nutating Mixers*. Am darauffolgenden Tag wurden die μ -Columns in die magnetischen *μ MACS™ Separators* platziert und mit jeweils 200 μ l des Triton-X-100-Lysepuffers gespült. Dann erfolgte die Umfüllung der Probenflüssigkeit in die magnetischen Säulen, wobei die magnetisch markierten Proteine in der Säule haften blieben. Anschließend wurden zur Aufreinigung zwei Lysepuffer, einer mit hohem und einer mit niedrigem Salzgehalt, verwendet. Die während der Probenbefüllung der magnetischen Säulen und des

Waschvorgangs entstandene Flüssigkeit wurde jeweils verworfen. Zur Ablösung der magnetisch markierten Proteine wurde den Säulen 20µl eines bei 95°C erhitzten Elutionspuffers hinzugefügt; es folgte eine fünfminütige Inkubation. Anschließend wurden weitere 70µl des Elutionspuffers auf die Säule gegeben, das daraufhin anfallende Immunpräzipitat mit dem gesuchten Protein in einem frischen Eppendorfgefäß gesammelt und bis zur Verwendung bei -20°C verwahrt.

2.2.3.2. Herstellung von Gesamtzelllysaten für Western-Blot

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen auf einer 6-Well-Platte bis zur benötigten Zelldichte angezüchtet und anschließend geerntet. Die Zellzahl wurde mit dem *Countess®-Cell-Counter* ermittelt und die Zellsuspensionen in Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden für drei Minuten bei 1200rpm zentrifugiert, der Mediumüberstand wurde verworfen und die verbliebenen Zellpellets je nach zuvor bestimmter Zellzahl mit 1x Laemmli-Puffer resuspendiert. Hierbei wurden für je 10⁶ Zellen 100µl 1x Laemmli-Puffer benutzt. Zuletzt wurden die Lysate für jeweils 10 Sekunden bei 20% Geräteleistung sonifiziert und bei -20°C für die nachfolgende Proteinanalytik gelagert.

2.2.3.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteine in den gewonnenen Immunpräzipitaten oder den Gesamtzelllysaten auftrennen und analysieren zu können, wurde das Verfahren der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) genutzt. Hierfür wurden in einer *Novex-Gel-Kassette* Trenngele gegossen, welche, je nach zu bestimmendem Protein, unterschiedliche Acrylamid-Anteile enthielten. Zur Bestimmung von GAPVD1 enthielt das Trenngel 8%, für PER2 10% und für CSNK1D 12% Acrylamid. Nach ausreichender Polymerisierung wurden die Trenngele mit einem Sammelgel mit 4% Acrylamid-Anteil übergossen und ein Gelkamm mit der benötigten Geltaschen-Anzahl eingefügt.

Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht wurde die Kassette mit dem polymerisierten Gel in eine *Novex-Mini-Cell-Gelkammer* gespannt und diese wurde anschließend mit 1x TGS-Laufpuffer befüllt. Die zu analysierenden Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend, nach einer vorher festgelegten Reihenfolge, mit 10⁵-Zellen pro Probe in die Geltaschen gefüllt. Zusätzlich wurde eine Geltasche mit dem Standardgrößenmarker *Color Prestained Protein Standard, Broad Range* befüllt, welcher später eine Größenbestimmung der Proteinbanden erlauben sollte. Bis die Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreichte erfolgte die Gelelektrophorese bei 60V, danach wurde die Spannung auf 150V erhöht. Die PER2- und CSNK1D-Gele liefen, bis die blaue Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Um die

Trennung des phosphorylierten und unphosphorylierten GAPVD1 und damit den GAPVD1-Größen-Shift besser darstellen zu können, lief das 8%-Gel bis die Markierung für 80kDa das Ende des Gels erreicht hatte.

2.2.3.4. Western Blot – Elektrophoretischer Transfer und Immunochemische Detektion

Für den elektrophoretischen Transfer der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, wurde das *TransBlot SemiDry* Transfer-System von BioRad genutzt. Hierzu wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert, in dH-2O gewaschen und in Transferpuffer gegeben. Das Gel wurde aus der Gelkassette gelöst und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Die Blotkammer wurde wie folgt aufgebaut: Auf die Grundplatte (Anode) wurden drei in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere gelegt, auf diese wurden die PVDF-Membran und danach das Gel positioniert und anschließend wurden noch fünf weitere, auch in Transferpuffer getränkte, Filterpapiere aufgelegt. Zur Vermeidung von Luftblasen wurde mit einer Messpipette über die Whatman-Filterpapiere gerollt. Zum Abschluss wurde das System mit der Deckelplatte (Kathode) verschlossen. Der Transfer erfolgte bei 100mA. Die Dauer richtete sich nach der zu übertragenden Proteingröße: Für GAPVD1 45 Minuten, für PER2 37 Minuten und für die CSNK1D 25 Minuten.

Nach der Proteinübertragung auf die Membran wurde diese in 5%-Milchpulver-TBS-T über Nacht bei 4°C blockiert. Am Tag darauf wurde die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur in 5% BSA/TBS-T, mit darin gelöstem Primärantikörper, geschwenkt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde der Sekundärantikörper auf die Membran gegeben, welcher ebenfalls in BSA/TBS-T gelöst war. Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten bei 37°C. Im Anschluss wurde die Membran erneut drei Mal mit TBS-T gewaschen.

Zur Proteinbandendetektion wurde das *Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate*-Kit genutzt. Nach Herstellerangaben wurden die Nachweisreagenzien A und B vermischt und auf die Membran gegeben. Nach vier-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss wurden die Chemilumineszenzsignale anschließend mit Hilfe des Kamerasystems *ImageQuant LAS-400* nachgewiesen und fotografiert.

2.2.4. Nachweis und Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.2.4.1. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Zum Nachweis und zur Vervielfältigung spezifischer RNA-Sequenzen wurde das Verfahren der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet. Ziel

war es herauszufinden, ob die verwendeten GFP oder tRFP-markierten Plasmide, sowohl nach transienter als auch stabiler Transfektion, auf mRNA-Ebene überexprimiert werden. Der Probengewinn fand nach Zellerntung vor der Zelllyse statt. Ein Teil der suspendierten Zellen wurde in ein neues, steriles Eppendorfgefäß überführt, zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

Um die benötigte RNA aus den Zellen gewinnen zu können, wurde das *RNeasy Mini Kit* von Qiagen genutzt. Die Zellen wurden nach Herstellerangaben zunächst lysiert und in einer *Quiashredder* Säule zentrifugiert, sodass nicht benötigte Zellbestandteile verworfen werden konnten. Die gewonnene RNA wurde dann unter Verwendung der Zentrifuge und einer RNA-Säule in mehreren Schritten aufgereinigt und zum Schluss eluiert. Die Eluate wurden bei -20°C eingefroren.

Die Vorbereitung und das Pipettieren für die qPCR erfolgte immer auf Eis, um so RNase-Aktivität vorbeugen zu können. Zunächst wurde die RNA aliquotiert, sodass RNA-Proben von 0,5ng/µl entstanden. Ein *SYBR Green Mastermix* wurde angesetzt. Dieser enthielt Reverse Transkriptase, thermostabile DNA-Polymerasen, Desoxyribonukleotidphosphate, *SYBR Green*, RNase-freies Wasser und einen *Forward* und *Reverse Primer*. Die ausgewählten Primer-Oligonukleotide besaßen die DNA-Sequenzen, die die GFP- und tRFP-mRNA beidseits flankieren. Zur Normierung der Ergebnisse wurden ebenfalls je zwei Primer für die universell gleich exprimierten Gene bActin und GAPDH verwendet.

Die PCR-Platte wurde daraufhin mit dem *SYBR Green Mastermix* und der verdünnten RNA befüllt, mit jeweils drei Replikaten pro Probe. Anschließend erfolgte die PCR und die Quantifizierung der RNA mittels LightCycler® 96 von Roche (siehe Material und Methoden) nach einem im Gerät eingestellten Ablaufprotokoll. Zunächst wurde die RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase, deren Aktivierung bei 95°C und optimale Arbeitstemperatur bei 50°C lag, in cDNA umgeschrieben. Die entstandene cDNA diente dann als Template für die folgende PCR. Diese bestand aus mehreren Zyklen, welche auf sich drei wiederholenden Schritten beruhten. Zunächst erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 94°C zur Auftrennung der cDNA-Stränge, durch die darauffolgende Absenkung der Temperatur auf 57°C lagerten sich die Primer an den freien Strängen an. Im Anschluss erfolgte die Elongationsphase 72°C, in welcher die DNA-Polymerase die Stränge mit den fehlenden Nukleotiden ergänzte und somit die DNA amplifizierte. Dank des *SYBR Greens*, welches bei der Synthese des neuen Strangs eingebaut wurde, konnte man die RNA-Zunahme mit dem Fluoreszenzanstieg messen.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Interaktion zwischen CSNK1D, PER2 und GAPVD1 in HEK-293T-Zellen

In dieser Arbeit sollte die Interaktion zwischen CSNK1D, PER2 und GAPVD1 untersucht werden. Im Mittelpunkt stand insbesondere die Frage, ob die Interaktion zwischen GAPVD1 und CSNK1D von der Interaktion zwischen CSNK1D und PER2 abhängig ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden zunächst HEK-293T Zellen als experimentelles System verwendet. Diese gehören zu den sehr schnell wachsenden und einfach zu kultivierenden Zelllinien, welche in der Lage sind, große Proteinmengen zu produzieren. Zu Beginn erfolgte eine transiente Transfektion von bereits hergestellten tricistronischen Plasmiden (siehe Material und Methoden), von denen alle exprimierten Gene in eine einzige mRNA transkribiert und somit in jeder Zelle beide Proteine gleichmäßig exprimiert werden. Verwendet wurden Zellen die transient CSNK1D-tRFP und PER2-GFP (CP)- oder CSNK1D-tRFP und PER2 Δ -GFP (CP Δ) exprimieren. PER2 Δ unterscheidet sich von PER2 durch die Deletion der Aminosäuren 489-618. Bei der fehlenden Aminosäuresequenz handelt es sich um den Bereich, der für die CSNK1D-Bindungsdomäne in PER2 kodiert. So konnten Akashi und Kollegen bereits in der Maus zeigen, dass die entsprechende Deletion die Bindung von CSNK1D und PER2 weitestgehend verhindert (Akashi et al. 2002).

Ziel der folgenden Experimente war es, diese Mutante nun ebenfalls in humanen Zellen zu etablieren, um mit ihrer Hilfe eine potenzielle Abhängigkeit der Interaktion zwischen CSNK1D und GAPVD1 von der Bindung von CSNK1D an PER2 zu untersuchen.

Zur Überprüfung des Transfektionserfolgs wurden die exprimierten Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Die transfizierten Zellen wurden darüber hinaus mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, um deren subzelluläre Lokalisation zu bestimmen. Protein-Protein-Interaktionen zwischen CSNK1D, PER2 und GAPVD1 wurden mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) analysiert. Zum Nachweis der mRNA-Expression der transient exprimierten Gene wurde das Verfahren der qPCR genutzt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.

3.1.1. Subzelluläre Lokalisation von PER2 und CSNK1D

Um sicher zu stellen, dass die Zielproteine PER2-GFP und CSNK1D-tRFP in den Zellen exprimiert werden und sich in den gleichen Zellbereichen befinden wie die jeweiligen endogenen Proteine, wurde die Proteinexpression und -lokalisation 24h nach transienter Transfektion durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb.3A). Die Expression von GFP

und tRFP ist deutlich zu erkennen, was auf eine erfolgreiche Transfektion und damit einhergehende Expression von CSNK1D-tRFP und PER2-GFP hindeutet. Bei gleichzeitiger Expression von CSNK1D-tRFP und PER2-GFP lokalisiert PER2-GFP vor allem im Nukleus und teilweise auch im Bereich membranhaltiger Zellstrukturen. Bei gleichzeitiger Expression beider Proteine mit fehlender CSNK1D-Bindungsdomäne in PER2-GFP, befindet sich dieses vor allem in der Nähe membranhaltiger Zellstrukturen. CSNK1D-tRFP lokalisiert unabhängig von der CSNK1D-Bindungsdomäne in PER2-GFP punktuell im Zytoplasma, gemäß früherer Studien wahrscheinlich im Bereich des Zentrosoms (Behrend et al. 2000).

3.1.2. Proteinexpressionslevel von CSNK1D, PER2, und GAPVD1

Die transient transfizierten Zellen wurden ebenfalls mittels Western-Blot untersucht, um sowohl die Proteinexpression nachzuweisen als auch den möglichen Einfluss auf die GAPVD1-Expression zu analysieren (Abb. 3B). So sieht man im Vergleich zu den jeweiligen endogenen Proteinen in WT-Zellen deutlich unterschiedliche Proteinmengen der transient exprimierten Proteine CSNK1D-tRFP, PER2-GFP und PER2 Δ -GFP.

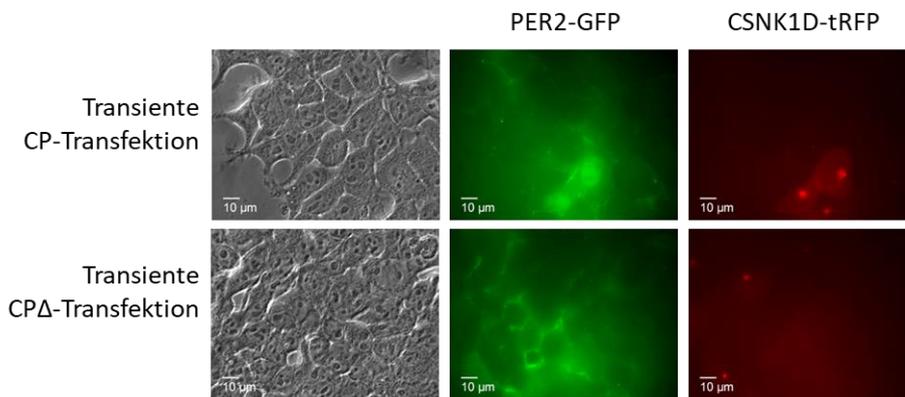
Die transient exprimierte CSNK1D-tRFP weist ein höheres Molekulargewicht auf als die endogene Kinase. Zudem kann man quantitativ deutlich mehr Protein nachweisen als in WT-Zellen. Die endogene CSNK1D scheint in diesen Zellen hyperphosphoryliert zu sein, da ein zusätzliches Signal zwischen der endogenen CSNK1D und CSNK1D-tRFP zu erkennen ist. Die GAPVD1-Expression scheint in HEK-293T-Zellen keinem Einfluss durch die Expression von PER2-GFP und CSNK1D-tRFP zu unterliegen. Zur Detektion von PER2-GFP wurde ein GFP-Antikörper verwendet. Wie zu erwarten, lässt sich mit diesem Antikörper kein endogenes PER2 nachweisen. Das transient exprimierte PER2-GFP ist in CP-Zellen nachzuweisen. In der Mutante mit deletierter CSNK1D-Bindungsdomäne gelingt jedoch kein Proteinnachweis.

3.1.3. mRNA-Transkription von *Per2-Gfp* und *Csnk1d-Trfp*

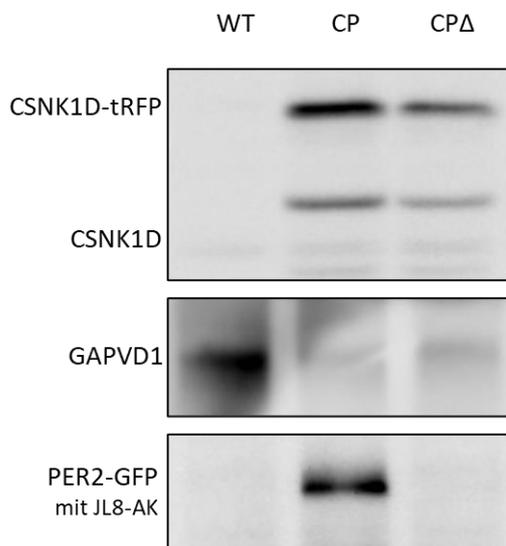
Da bei der Transfektion ein tricistronisches Plasmid verwendet wurde, und sich trotz der fehlenden PER2 Δ -GFP-Bande deutliche CSNK1D-tRFP-Signale in denselben CP Δ -Zellen erkennen lassen, kann man bereits jetzt schlussfolgern, dass die Transfektion erfolgreich gewesen ist und das Fehlen von PER2 Δ -GFP in der Zelle möglicherweise auf einen posttranskriptionellen Effekt zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen und transkriptionelle Ursachen für das fehlende Signal auszuschließen, erfolgte eine qPCR-Analyse.

Die qPCR erfolgte mit *Gfp*- und *Trfp*-Primern, um so die transient exprimierten Gene *Per2-Gfp* und *Csnk1d-Trfp* auf transkriptioneller Ebene analysieren zu können. Die Auswertung der erhaltenen Schwellenzyklus-Werte zeigt eine eindeutige mRNA-Transkription von *Per2Δ-Gfp*, trotz fehlendem Proteinnachweis im Western Blot (Abb.3C). Beide Plasmide CP und CPΔ rufen eine annähernd vergleichbare Expression von *Trfp*- und *Gfp*-mRNA hervor, die durch deren Fusion mit dem C-terminalen Ende der jeweiligen Gene auch zu einer Expression der *Csnk1d*- und *Per2*-Gene führen müsste.

A



B



C

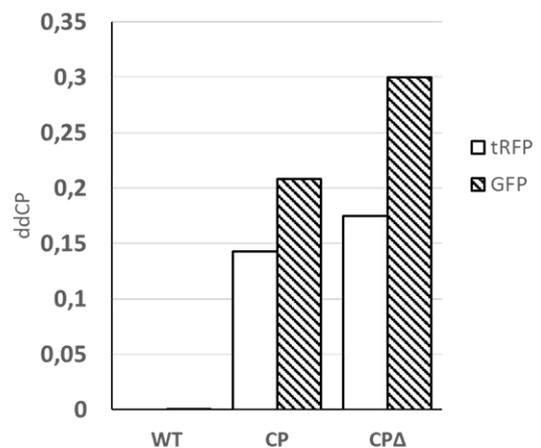


Abb. 3: Charakterisierung der Expression von CSNK1D, PER2 und GAPVD1 in transient transfizierten HEK-293T Zellen

(A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender, transient transfizierter HEK-293T-Zellen. Obere Reihe: Transient transfizierte CP-Zellen in Durchlichtaufnahme, grüner Fluoreszenz zum Nachweis von PER2-GFP und roter Fluoreszenz zum Nachweis von CSNK1D-tRFP. Untere Reihe: Transient transfizierte CPΔ-Zellen in Durchlichtaufnahme, grüner Fluoreszenz zum Nachweis von PER2-GFP und roter Fluoreszenz zum Nachweis von CSNK1D-tRFP. (n=3). **(B)** Repräsentative Western-Blot-Analyse von transient transfizierten HEK-293T-Zellen. Von links nach rechts: HEK-293T-Wildtypzellen, transient transfizierte CP-Zellen und

transient transfizierte CP Δ -Zellen. Oben: Western-Blot Analyse von CSNK1D-tRFP unter Verwendung eines CSNK1D-Antikörpers; Mitte: Western-Blot Analyse von GAPVD1 unter Verwendung eines GAPVD1-Antikörpers; Unten: Western-Blot Analyse von PER2-GFP unter Verwendung eines JL8-Antikörpers. (C) qPCR-Analyse zur Quantifikation von *Per2-Gfp*-mRNA und *Csnk1d-Trfp*-mRNA auf transkriptioneller Ebene in transient transfizierten HEK-293T-Zellen. (n=1)

3.1.4. Die Interaktion zwischen GAPVD1, PER2 und CSNK1D

Sowohl die Fluoreszenzmikroskopie als auch der Western-Blot der Gesamtzelllysate bestätigen, dass die transiente Transfektion erfolgreich war und CSNK1D und PER2 überexprimiert werden. PER2 Δ war nicht durch Western-Blot nachweisbar, wird aber zumindest auf mRNA-Ebene exprimiert und generiert ein Fluoreszenzsignal. Es wäre daher möglich, dass PER2 Δ exprimiert wird, aber aus anderen Gründen, wie beispielsweise Unlöslichkeit oder proteolytische Abspaltung von GFP, nicht das erwartete Signal im Western-Blot zeigt. Im nächsten Schritt sollte das Bindungsverhalten der drei Proteine mittels Immunpräzipitation überprüft werden, wobei bereits in Betracht gezogen wurde, dass die fehlende Expression vom PER2 Δ -Protein im Western-Blot im Anschluss komplementäre experimentelle Strategien erforderlich machen könnte.

Zu Beginn erfolgte eine GAPVD1-IP. GAPVD1 lässt sich in WT-, CP und CP Δ -Zellen nachweisen. Die Expressionsmenge und auch die Proteingröße sind hierbei weitgehend unabhängig von der Expression von PER2-GFP und CSNK1D-tRFP oder deren wechselseitiger Bindung (Abb. 4). CSNK1D interagiert in allen Zellen mit GAPVD1. Das an GAPVD1 gebundene CSNK1D-tRFP ist in CP und CP Δ im Vergleich zur gebundenen endogenen CSNK1D in WT-Zellen erhöht, was wahrscheinlich auf die höhere Expression von CSNK1D-tRFP zurückzuführen ist. Eine Co-Präzipitation und somit Bindung von PER2 und PER2 Δ an GAPVD1 kann nicht nachgewiesen werden. Die Western-Blot-Signale für PER2 und PER2 Δ in Abb. 4A sind unspezifisch, da sie sich ebenso in den WT-Zellen befinden und zur PER2-Detektion ein GFP-Antikörper verwendet worden ist. Es fällt auf, dass auch in den Ganzzelllysaten PER2 nur in CP-Zellen exprimiert wird (Abb. 4B).

Weiterhin lässt sich feststellen, dass die Interaktion zwischen GAPVD1 und CSNK1D in diesem Experiment nicht von der Interaktion zwischen PER2 und CSNK1D beeinflusst wird. GAPVD1 bindet in CP und CP Δ -Zellen eine vergleichbare Menge CSNK1D (Abb. 4A), wobei in CP Δ -Zellen gar keine PER2 Δ -Expression nachgewiesen werden kann. In jedem Fall könnte PER2 Δ nicht die Bindung von GAPVD1 an CSNK1D vermitteln, da ihm die Caseinkinase-Bindungsdomäne fehlt und es selbst nicht mit CSNK1D interagieren kann.

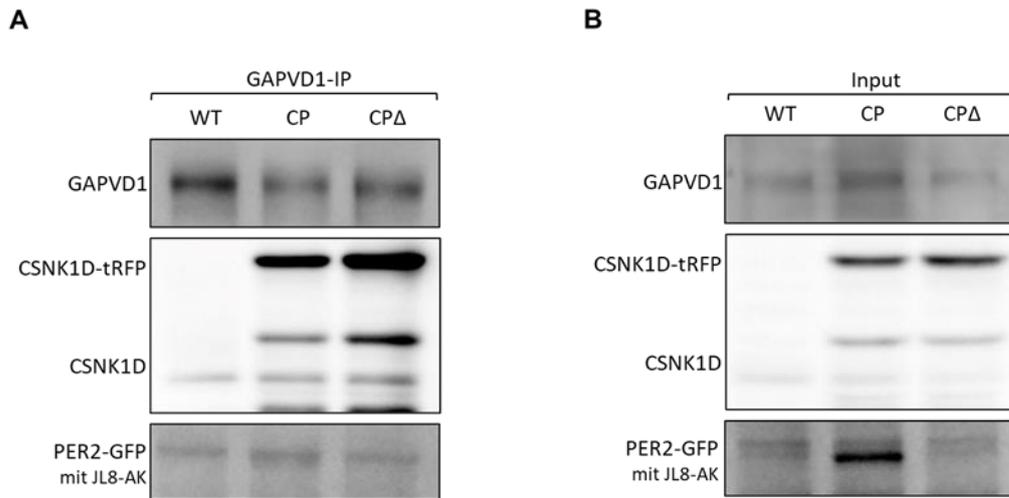


Abb. 4: Überprüfung der Interaktion zwischen GAPVD1 und CSNK1D oder PER2 in transient transfizierten HEK-293T Zellen mittels GAPVD1-IP

(A) Repräsentative Western-Blot-Analyse einer GAPVD1-IP transient transfizierter HEK-293T-Zellen. Oben: Western-Blot Analyse nach GAPVD1-IP unter Verwendung eines GAPVD1-Antikörpers; Mitte: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten CSNK1D(-tRFP) unter Verwendung eines CSNK1D-Antikörpers; Unten: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten PER2-GFP unter Verwendung eines JL8-Antikörpers. (B) Ganzzelllysate transient transfizierter HEK-293T-Zellen.

Da Epitope durch Protein-Protein-Wechselwirkungen unzugänglich sein können und die Mengenverhältnisse der beteiligten Proteine eine Rolle für eine effiziente Co-IP spielen können, wurden im nächsten Schritt weitere Immunpräzipitationen gegen die Proteine CSNK1D und GFP (zur Immunpräzipitation von PER2) durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die Expression von PER2-GFP die Interaktion der endogenen Proteine GAPVD1 und CSNK1D beeinflusst, wurde zusätzlich die Zelllinie „P“ hinzugezogen und ebenfalls transient transfiziert. Diese Zelllinie exprimiert ausschließlich PER2-GFP und wurde in Ibrahim et al. zur Identifikation von mit PER2 interagierenden Proteinen, darunter auch GAPVD1, verwendet (Ibrahim et al. 2021).

Nach erfolgter CSNK1D-IP ist in WT-, CP, CPΔ- und P-Zellen die endogene CSNK1D zu erkennen (Abb. 5A). In allen Zellen bindet die CSNK1D an GAPVD1. In CP und CPΔ scheint GAPVD1 hyperphosphoryliert zu sein, da dessen obere Bande im Vergleich zur unteren Bande deutlich stärker ist als in WT und P-Zellen. Auch nach IP von CSNK1D wird die GAPVD1-CSNK1D Interaktion nicht durch PER2 beeinflusst. Wie zuvor ist die Interaktion von GAPVD1 und CSNK1D in CP und CPΔ-Zellen annähernd gleich, ebenso besteht kein Unterschied zwischen WT und P-Zellen. Die Expression von PER2-GFP beeinflusst also weder die Interaktion von GAPVD1 mit überexprimierter CSNK1D-tRFP noch der endogenen CSNK1D.

Eine Bindung von PER2 an CSNK1D ist erwartungsgemäß nur in CP und P-Zellen sichtbar. Hier fällt auf, dass das gebundene PER2 in CP-Zellen ein höheres Molekulargewicht zu haben scheint als in Zellen, die nur PER2-GFP exprimieren. Das lässt

auf eine Phosphorylierung des Proteins durch CSNK1D schließen, mit damit einhergehender Verlangsamung des Laufverhaltens bei der SDS-Gelelektrophorese. In den CP Δ -Zellen ist PER2 erneut nicht im Ganzzelllysate nachzuweisen (Abb.5B).

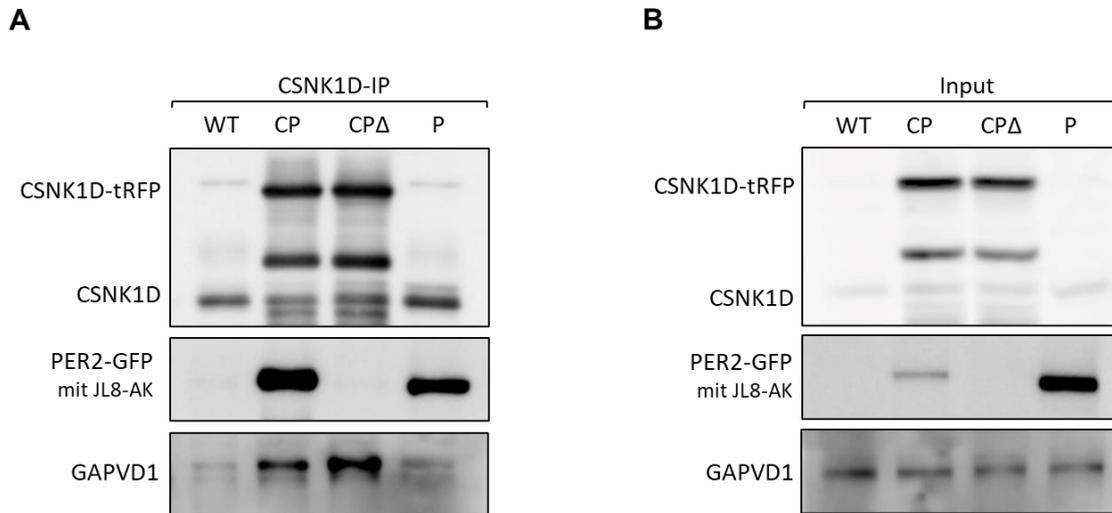


Abb. 5: Überprüfung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 oder PER2 in transient transfizierten HEK-293T Zellen mittels CSNK1D-IP

(A) Repräsentative Western-Blot-Analyse einer CSNK1D-IP transient transfizierter HEK-293T-Zellen. Oben: Western-Blot Analyse nach CSNK1D(-tRFP)-IP unter Verwendung eines CSNK1D-Antikörpers; Mitte: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten PER2-GFP unter Verwendung eines JL8-Antikörpers; Unten: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten GAPVD1 unter Verwendung eines GAPVD1-Antikörpers (B) Ganzzelllysate transient transfizierter HEK-293T-Zellen.

Zuletzt wurde eine PER2-Immunpräzipitation durchgeführt. Im Vergleich zwischen CP- und P-Zellen scheint die Expression von CSNK1D-tRFP einen Einfluss auf die PER2-Proteinmenge zu haben. Wird CSNK1D überexprimiert, ist die PER2-Konzentration im Ganzzelllysate und damit auch in der Immunpräzipitation geringer. CSNK1D und PER2 interagieren in CSNK1D-tRFP und/oder PER2-GFP exprimierenden Zellen. GAPVD1 ist in keiner der Zelllinien an PER2 gebunden. Somit scheint GAPVD1 in transient transfizierten HEK-293T-Zellen nicht oder nur in sehr geringen Mengen mit PER2(Δ) eine Proteinbindung einzugehen.

Selbst bei einer PER2-Immunpräzipitation gelingt weder in den IP-Proben noch im Ganzzelllysate ein PER2 Δ -Nachweis (Abb. 6A und B). Trotz Deletion der CSNK1D-Bindungsdomäne in PER2 sind geringe Mengen von CSNK1D in der PER2-Immunpräzipitation nachweisbar. Die Proteinmengen zwischen CP und CP Δ unterscheiden sich jedoch deutlich voneinander. Die dennoch gebundene CSNK1D in CP Δ suggeriert, dass die Präzipitation von einer geringen, aber nicht ausreichend detektierbaren Menge PER2 möglich gewesen sein könnte, und dass die fehlende Detektion des Proteins auch andere Gründe haben könnte.

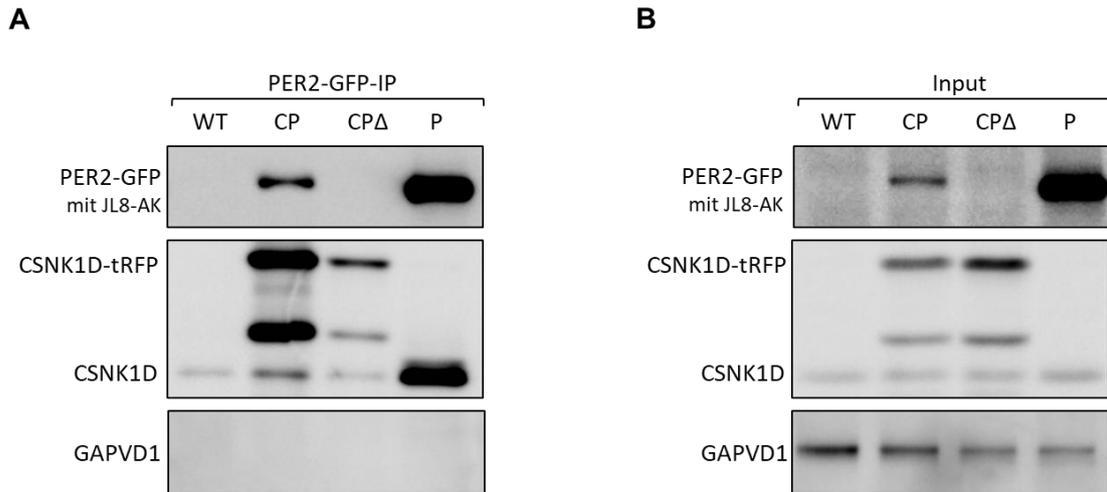


Abb. 6: Überprüfung der Interaktion von PER2-GFP und CSNK1D oder GAPVD1 in transient transfizierten HEK-293T Zellen mittels PER2-GFP-IP

(A) Repräsentative Western-Blot-Analyse einer PER2-GFP-IP transient transfizierter HEK-293T-Zellen. Oben: Western-Blot Analyse PER2-GFP-IP unter Verwendung eines JL8-Antikörpers; Mitte: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten CSNK1D-tRFP unter Verwendung eines CSNK1D-Antikörpers; Unten: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten GAPVD1 unter Verwendung eines GAPVD1-Antikörpers **(B)** Ganzzelllysate transient transfizierter HEK-293T-Zellen. (n=2)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 nicht wesentlich von der PER2-CSNK1D-Bindung beeinflusst wird, da GAPVD1 sowohl mit endogener als auch überexprimierter CSNK1D unabhängig von einer gleichzeitigen Expression von PER2-GFP (mit oder ohne Caseinkinase-Bindungsdomäne) in gleicher Stärke interagiert.

3.2. Charakterisierung der Interaktion zwischen CSNK1D, PER2 und GAPVD1 in HT1080-Zellen

In den bisherigen Experimenten in HEK-293T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von PER2 und CSNK1D die Bindung zwischen GAPVD1 und CSNK1D nicht beeinflusst. PER2Δ konnte jedoch, aus bisher noch nicht geklärten Ursachen, weder in den Ganzzelllysaten noch in der IP nachgewiesen werden.

Zum Ausschluss der transienten Transfektion und der HEK-293T-Zellen als Ursachen für das fehlende PER2Δ sollten daraufhin weitere Co-Immunpräzipitationen in HT1080-Zellen erfolgen. Diese weisen im Gegensatz zu HEK-293T-Zellen einen korrekten Satz von 46 Chromosomen auf. Weiterhin existieren von dieser Zellart bereits stabil transfizierte Klone, bei denen ebenfalls die in den HEK-293T verwendeten tricistronischen Plasmide zum Einsatz kamen.

Die subzelluläre Lokalisation der in den verschiedenen HT1080-Zelllinien exprimierten Proteine wurde ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Untersuchung der

Protein-Protein-Interaktionen zwischen GAPVD1, PER2 und CSNK1D erfolgte durch Co-Immunpräzipitation. Der Nachweis der mRNA-Expression der stabil exprimierten Gene erfolgte mittels qPCR.

3.2.1. Subzelluläre Lokalisation von PER2 und CSNK1D

Abbildung 7 zeigt die Immunfluoreszenzaufnahmen der unterschiedlichen Zelllinien. Es ist eine deutliche kompartmentabhängige GFP- und tRFP-Expression zu erkennen, welche auf eine erfolgreiche Expression von PER2-GFP und CSNK1D-tRFP schließen lässt. Die exprimierten Proteine sind genauso lokalisiert wie die entsprechenden endogenen Proteine in vorangegangenen Studien (Aryal et al. 2017; Behrend et al. 2000).

CSNK1D-tRFP befindet sich im Zytoplasma und ist besonders im Bereich des Zentrosoms konzentriert (Abb. 7A und B). In den CP Δ -Zellen scheint sie ebenfalls verstärkt im Bereich des Zentrosoms lokalisiert zu sein, hier lässt sich jedoch im Gegensatz zu CP-Zellen zusätzlich ein schwaches Signal im Zellkern feststellen.

PER2-GFP befindet sich in den P- und CP-Zellen vor allem im Nukleus und im Zytoplasma. In den P Δ - und CP Δ -Zelllinien ist die Lokalisation des Proteins deutlich verändert, es lassen sich Anreicherungen im Bereich membranhaltiger Zellstrukturen und auch im Zytoplasma erkennen (Abb. 7A und B).

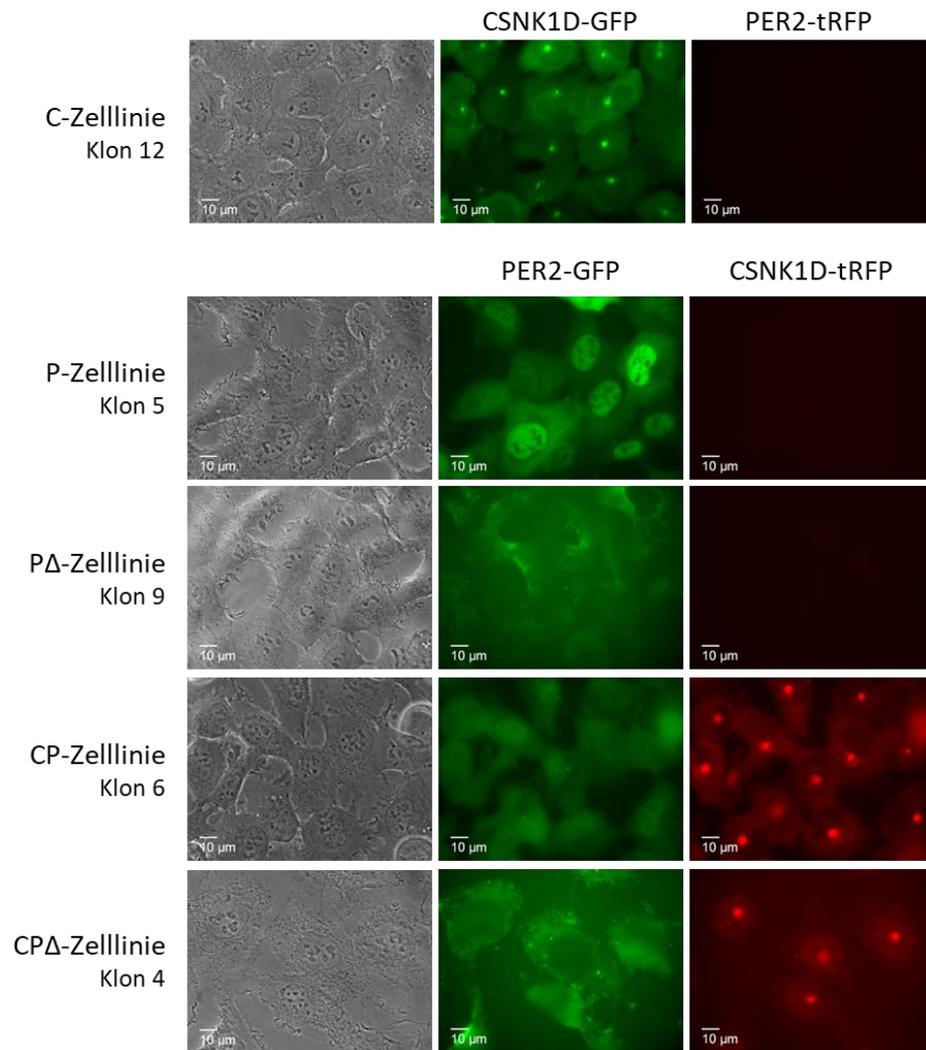
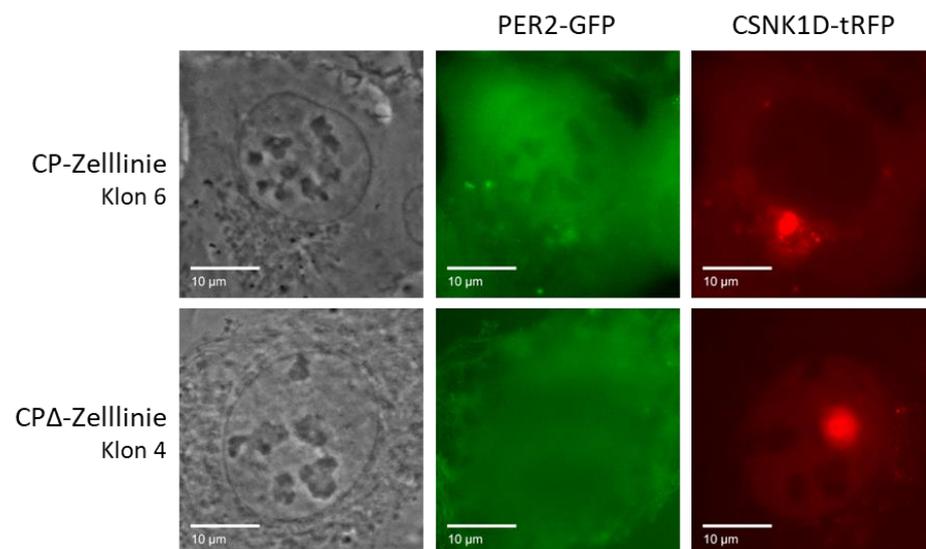
A**B**

Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von PER2, PER2 Δ und CSNK1D

(A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahmen lebender, stabil transfizierter HT1080-Zellen. Linke Reihe: Durchlichtaufnahme transient transfizierter C-, P-, P Δ -, CP- und CP Δ Zellen. Mittlere Reihe: In der ersten Zeile C-Zellen in grüner Fluoreszenz zum Nachweis von CSNK1D-GFP. Darunter folgend weitere Zelllinien-Aufnahmen in grüner Fluoreszenz zum Nachweis von PER2-GFP. Rechte Reihe: Zelllinien-Aufnahmen in roter Fluoreszenz zum Nachweis von CSNK1D-tRFP. (B) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Detailaufnahmen einzelner lebender, stabil transfizierter HT1080-Zellen. Obere Reihe: CP-Zelle in Durchlichtaufnahme, grüner Fluoreszenz und roter Fluoreszenz zum Nachweis von PER2(Δ)-GFP und CSNK1D-tRFP. Untere Reihe: CP Δ -Zelle in Durchlichtaufnahme, grüner Fluoreszenz und roter Fluoreszenz zum Nachweis von PER2(Δ)-GFP und CSNK1D-tRFP. (n=3)

3.2.2. Proteinexpressionslevel von CSNK1D, PER2, und GAPVD1

Es erfolgte ebenso eine Untersuchung der stabil transfizierten Zellen durch Western Blot-Analyse (Abb. 8). Die Proteinexpression unterscheidet sich zwischen den unterschiedlichen Zelllinien. In CP- und CP Δ -Zellen lässt sich neben der endogenen auch die exprimierte CSNK1D-tRFP nachweisen.

PER2 wird nur in CP-Zellen exprimiert. Durch die Verwendung eines GFP-Antikörpers zur Proteindetektion ist der Nachweis des endogenen PER2 nicht möglich. Wie bereits in den HEK-293T-Zellen kann ebenso in HT1080-Zellen kein PER2 Δ nachgewiesen werden.

GAPVD1 ist in allen Zelllinien vorhanden, weist aber unterschiedliche Proteingrößen auf, welche man an den Bandenhöhen im SDS-Gel erkennen kann. In CP liegt GAPVD1 wahrscheinlich hyperphosphoryliert vor, da im Vergleich zu Wildtyp-Zellen eine zusätzliche, langsamere laufende Bande zu erkennen ist. In CP Δ -Zellen sind beide Banden zu sehen.

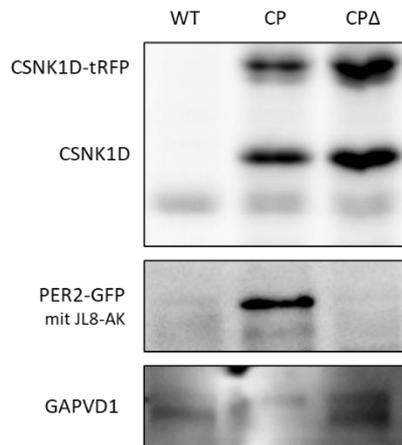


Abb. 8: Charakterisierung der Proteine CSNK1D, PER2 und GAPVD1 in stabil transfizierten HT1080- Zellen

Repräsentative Western-Blot-Analyse von stabil transfizierten HT1080-Zellen. Von links nach rechts: HT1080-Wildtypzellen, stabil transfizierte CP-Zellen und CP Δ -Zellen. Oben: Western-Blot Analyse von CSNK1D(-tRFP) unter Verwendung eines CSNK1D-Antikörpers; Mitte: Western-Blot Analyse von PER2(-GFP) unter Verwendung eines JL8-Antikörpers. Unten: Western-Blot Analyse von GAPVD1 unter Verwendung eines GAPVD1-Antikörpers.

3.2.3. Interaktion zwischen GAPVD1, PER2 und CSNK1D

Das Ergebnis der GAPVD1-Immunpräzipitation mit HT1080-WT-, CP- und CP Δ -Zellen ist ähnlich dem in HEK-293T-Zellen. GAPVD1 ist in allen Zelllinien nachweisbar. Es weist allerdings im Gegensatz zum vorherigen Experiment (Abb. 8) weder im Immunpräzipitat noch im Ganzzelllysate Unterschiede in der Proteingröße auf. Grund hierfür ist eine kürzere Laufzeit und damit verbundene geringere Größenauftrennung bei der SDS-Gelelektrophorese (Abb.9).

CSNK1D interagiert unabhängig von der Bindung an PER2 in allen Zelllinien mit GAPVD1. Im Gegensatz zum Ergebnis in HEK-293T-Zellen (Abb. 4A) ist in HT1080 eine Proteinbindung zwischen PER2 und GAPVD1 in CP-Zellen nachweisbar. In CP Δ -Zellen kann man jedoch erneut weder im Ganzzelllysate noch im Immunpräzipitat der GAPVD1-IP PER2 Δ nachweisen.

Zusammenfassend kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass auch in HT1080-Zellen eine Interaktion zwischen GAPVD1 und CSNK1D unabhängig von der PER2-CSNK1D-Bindung stattfindet. Die an GAPVD1 gebundene CSNK1D-Menge ist in den Zelllinien CP und CP Δ annähernd gleich.

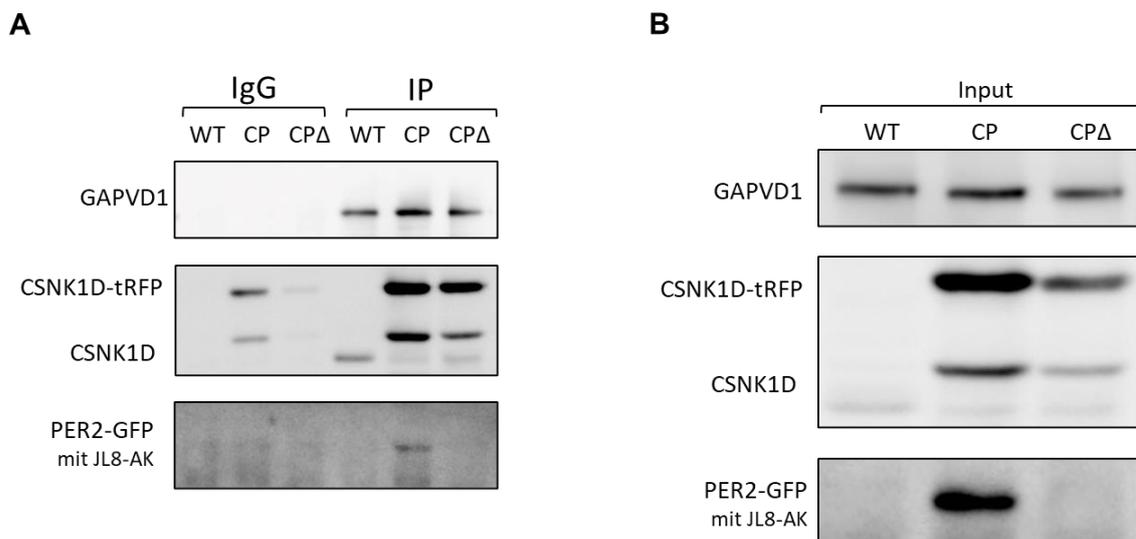


Abb. 9: Überprüfung der Interaktion zwischen GAPVD1 und CSNK1D oder PER2 in stabil transfizierten HT1080-Zellen mittels GAPVD1-IP

(A) Repräsentative Western-Blot-Analyse einer GAPVD1-IP stabil transfizierter HT1080-Zellen. Oben: Western-Blot Analyse nach GAPVD1-IP unter Verwendung eines GAPVD1-Antikörpers; Mitte: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten CSNK1D(-tRFP) unter Verwendung eines CSNK1D-Antikörpers; Unten: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten PER2-GFP unter Verwendung eines JL8-Antikörpers. (B) Ganzzelllysate stabil transfizierter HT1080-Zellen. (n=3)

In der darauffolgenden CSNK1D-Immunpräzipitation lässt sich die endogene CSNK1D und CSNK1D-tRFP in allen drei Zelllinien nachweisen. Die endogene CSNK1D weist in CP

und CP Δ -Zellen ein höheres Molekulargewicht auf, was erneut auf eine Hyperphosphorylierung der Kinase hindeutet. In CP-Zellen bindet die CSNK1D an PER2. Ebenso besteht eine Proteinbindung CSNK1D-GAPVD1 in WT-, CP- und CP Δ -Zellen. Die Proteinüberexpression von CSNK1D scheint jedoch einen Einfluss auf die GAPVD1-Menge und -Größe zu haben, welche an CSNK1D gebunden ist. So ist aufgrund der Proteinsignalstärke und des Laufmusters im Westernblot zu sehen, dass deutlich mehr GAPVD1 in CP und CP Δ -Zellen zu finden ist, welches zudem auch in HT1080-Zellen hyperphosphoryliert vorliegt. Dies scheint bei erneut fehlendem PER2 Δ in CP Δ unabhängig von der Expression von PER2-GFP zu sein.

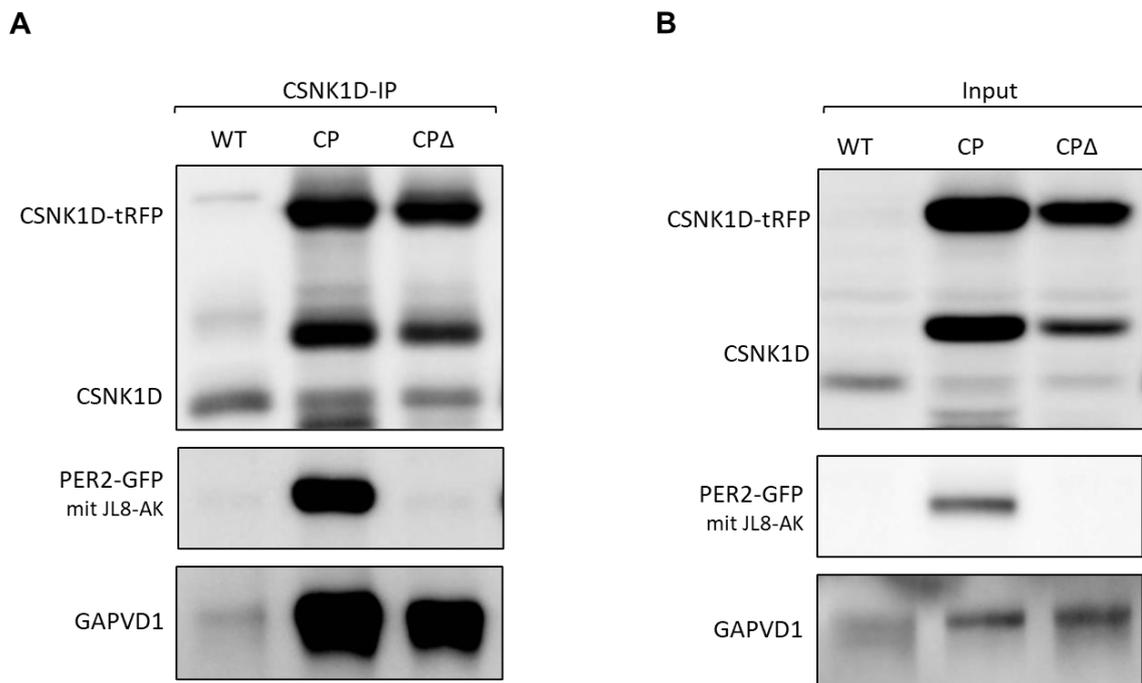


Abb. 10: Überprüfung der Interaktion von CSNK1D und GAPVD1 oder PER2 in stabil transfizierten HT1080-Zellen mittels CSNK1D-IP

(A) Repräsentative Western-Blot-Analyse einer CSNK1D-IP stabil transfizierter HT1080-Zellen. Oben: Western-Blot Analyse nach CSNK1D(-tRFP)-IP unter Verwendung eines CSNK1D-Antikörpers; Mitte: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten PER2-GFP unter Verwendung eines JL8-Antikörpers; Unten: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten GAPVD1 unter Verwendung eines GAPVD1-Antikörpers. **(B)** Ganzzelllysate stabil transfizierter HT1080-Zellen. (n=3)

Anschließend wurde eine PER2-IP zusätzlich mit der Zelllinie P durchgeführt (Abb.11A). PER2 wird in CP- und P-Zellen exprimiert. PER2 Δ ist jedoch auch in HT1080-CP Δ -Zellen, weder im Input noch in der Immunpräzipitation nachweisbar (Abb. 11B).

Zu erkennen ist, dass unabhängig von der Expression von CSNK1D-tRFP eine Proteinbindung zwischen PER2 und CSNK1D in CP- und P-Zellen besteht. Selbst in CP Δ -Zellen lässt sich eine geringe Menge co-präzipitierter CSNK1D-tRFP erkennen. Im

Gegensatz zu CP-Zellen ist die Menge an CSNK1D aber deutlich reduziert; dementsprechend ist nicht klar, ob es sich nicht vielleicht um ein unspezifisches Hintergrundsignal handelt.

Eine Bindung von PER2 und GAPVD1 kann erneut nicht nachgewiesen werden.

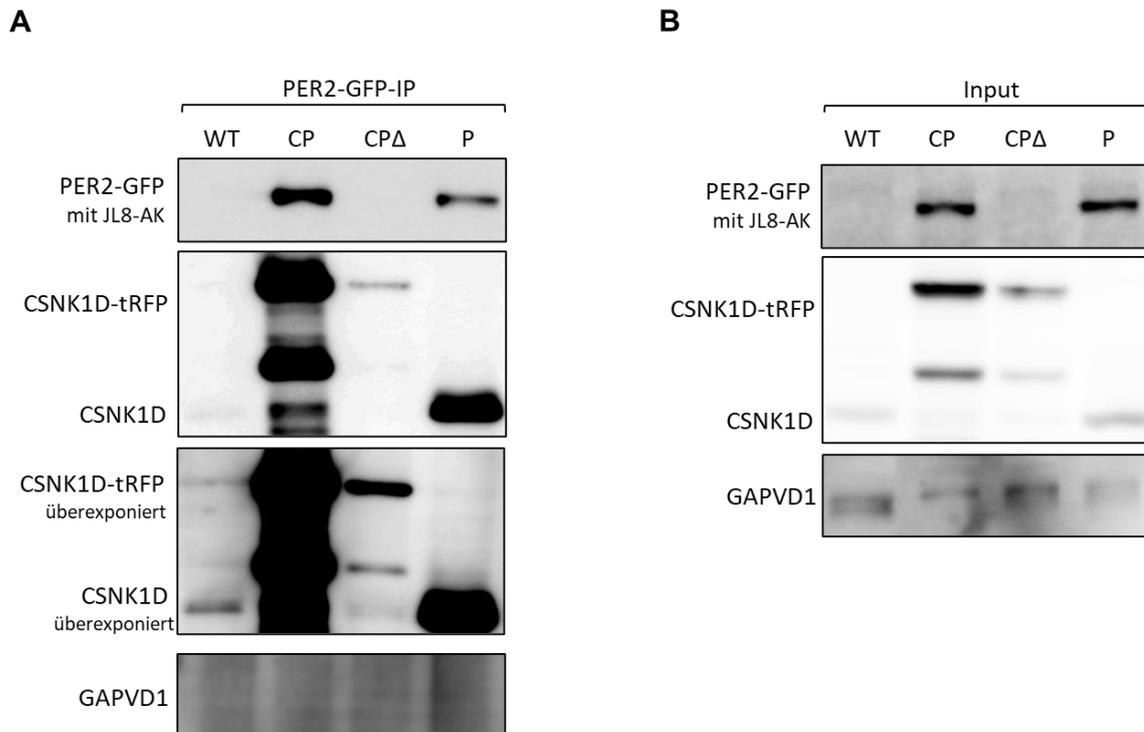


Abb. 11: Überprüfung der Interaktion zwischen PER2-GFP und CSNK1D oder GAPVD1 in stabil transfizierten HT1080-Zellen mittels PER2-GFP-IP

(A) Repräsentative Western-Blot-Analyse einer PER2-GFP-IP transient transfizierter HEK-293T-Zellen. Oben: Western-Blot Analyse nach PER2-GFP-IP unter Verwendung eines JL8-Antikörpers; Mitte: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten CSNK1D-tRFP unter Verwendung eines CSNK1D-Antikörpers, standard- und überexponiert; Unten: Western-Blot Analyse der co-präzipitierten GAPVD1 unter Verwendung eines GAPVD1-Antikörpers. **(B)** Ganzzelllysate stabil transfizierter HT1080-Zellen. (n=1)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Fluoreszenzmikroskopie den Nachweis der spezifischen und funktionell scheinenden Lokalisation der exprimierten Proteine PER2-GFP und CSNK1D-tRFP erbracht hat. CSNK1D befindet sich im Bereich des Zentrosoms. PER2 ist gleichmäßig im Zellkern und Zytoplasma verteilt, während PER2Δ diffuser erscheint und vor allem im Zytoplasma und an membranhaltigen Strukturen zu finden ist.

Die Immunpräzipitationen in den verschiedenen stabil transfizierten HT1080-Zelllinien lassen darauf schließen, dass eine robuste Interaktion zwischen GAPVD1 und CSNK1D besteht, welche wie auch in HEK293T-Zellen, unabhängig von der CSNK1D-PER2-Bindung, zu sein scheint. Ebenso konnte vereinzelt auch eine Bindung zwischen GAPVD1

und PER2 nachgewiesen werden. Wie bereits in HEK-293T-Zellen ist auch in HT1080 CP Δ -Zellen kein PER2 Δ -GFP detektierbar.

3.3. Aufklärung der Ursache für die fehlende Expression von PER2 Δ -GFP

Die Ergebnisse der Co-Immunpräzitationen in HT1080-Zellen sind mit denen in HEK293T-Zellen vergleichbar. Trotz der stabilen Transfektion und der Verwendung einer anderen Zelllinie war es weder im Ganzzelllysate noch in den Immunpräzitationen möglich PER2 Δ nachzuweisen (vgl. Abb. 3-11).

Auf der Suche nach einer Erklärung für das fehlende PER2 Δ Signal, mussten sowohl transkriptionelle als auch translationale Ursachen für das Fehlen des Proteins im Western Blot bedacht werden. Daher wurde in den HT1080-Zellen, wie bereits zuvor in den HEK-Zellen, eine qPCR zur Bestimmung der mRNA-Menge der stabil transfizierten Transgene durchgeführt. Eine weitere mögliche Ursache für das fehlende PER2 Δ war eine durch die Deletion ausgelöste verminderte Stabilität des Proteins mit einer daraus resultierenden, sehr effizienten Proteindegradation. Zur Inhibition des Proteinabbaus wurde Chloroquin zur Autophagiehemmung und MG132 zur Proteasomhemmung genutzt. Weiterhin ist bereits bekannt, dass die Stabilität von PER2 auch von der CSNK1D-Aktivität und von dem entsprechenden Phosphorylierungsstatus der Stabilisierungs- oder Degradierungsdomäne abhängig ist (Camacho et al. 2001). Daher wurde die PER2-Stabilität ebenfalls nach der CSNK1D-Hemmung mit Hilfe von PF-670462 untersucht.

3.3.1. mRNA-Expression der Transgene CSNK1D-tRFP, PER2-GFP und PER2 Δ -GFP

Zur Analyse der getaggen überexprimierten Gene auf transkriptioneller Ebene wurden erneut *Trfp*- und *Gfp*-Primer verwendet. In der Auswertung der Schwellenzyklus-Werte lässt sich in CP- und CP Δ -Zellen eine deutliche Expression von *Trfp*- und *Gfp*-mRNA feststellen (Abb.12). Letztere ist in CP Δ -Zellen geringer exprimiert als in CP-Zellen. Dennoch wird *Per2 Δ* -mRNA exprimiert, da die detektierte *Gfp*-mRNA mit dem C-terminalen Ende des *Per2 Δ* -Gens fusioniert ist.

Somit liegt die Ursache für die fehlende Proteinexpression von PER Δ -GFP nicht an fehlender mRNA-Expression des Transgens.

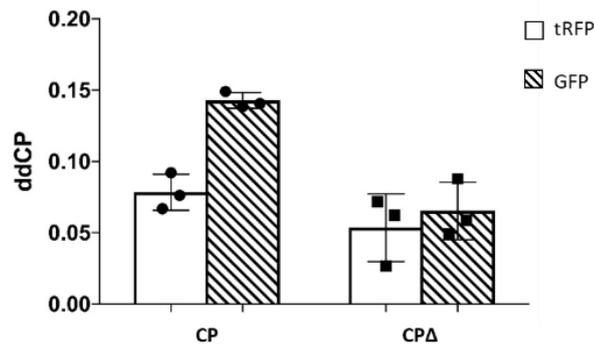


Abb. 12: Überprüfung der mRNA-Expression von PER2Δ durch qPCR

qPCR-Analyse zur Quantifikation von *Per2-Gfp*-mRNA und *Csnk1d-Trfp*-mRNA in stabil transfizierten HT1080 CP- und CPΔ-Zellen. (n=3)

3.3.2. Analyse des proteosomalen und Autophagie-abhängigen Abbaus von PER2Δ

Um einen vermehrten Proteinabbau als Ursache für die stark reduzierte PER2Δ-Proteinmenge zu überprüfen, wurde die Autophagie in CP- und CPΔ-Zellen mit Hilfe von Chloroquin und proteosomaler Abbau durch MG132 gehemmt. Als Kontrolle wurden unbehandelte CP- und CPΔ-Zellen analysiert.

Die Hemmung des proteosomalen Abbaus führte zur Stabilisierung von PER2-Protein (Abb. 13A). Die Hemmung des Autophagie-abhängigen Abbaus scheint im Vergleich zu unbehandelten Zellen keinen Einfluss auf die Proteinstabilität zu haben (Abb. 13A). Die Hemmung des proteosomalen als auch des Autophagie-abhängigen Proteinabbaus in CPΔ-Zellen führt zur Stabilisierung von PER2Δ-Protein (Abb. 13B). Somit scheint sich der Verdacht zu bestätigen, dass eine verminderte Proteinstabilität durch einen erhöhten Proteinabbau die Ursache des bisher fehlenden PER2Δ-Nachweises bei der Proteinanalyse ist.

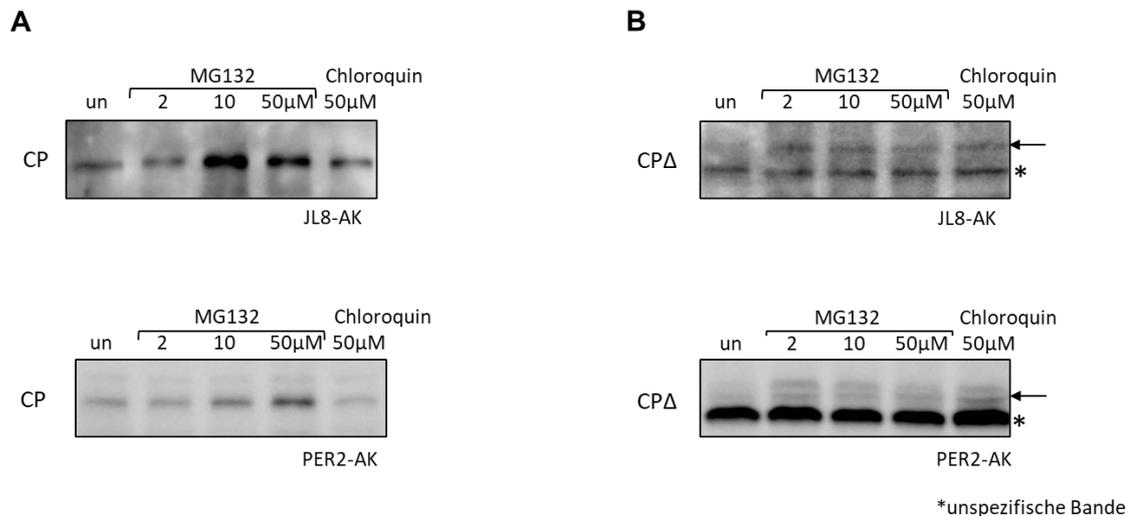


Abb. 13: Inhibition des proteasomalen oder Autophagie-abhängigen Abbaus führt zu einer höheren Menge an PER2Δ-GFP-Protein

(A) Repräsentative Western-Blot-Analyse von HT1080-CP-Zellen, nach Inkubation der Zellen mit MG132 in aufsteigender Konzentration von 2, 5 und 50μM und 50μM Chloroquin für 6 Stunden. Das Blotting erfolgte im oberen Teil mit JL-8- und im unteren mit PER2-Antikörper. (B) Repräsentative Western-Blot-Analyse von HT1080-CPΔ-Zellen, nach Inkubation der Zellen mit MG132 in aufsteigender Konzentration von 2, 5 und 50μM und 50μM Chloroquin für 6 Stunden. Die Detektion erfolgte im oberen Teil mit JL-8- und im unteren mit PER2-Antikörper. (n=3)

3.3.3. Destabilisierung von PER2Δ durch CSNK1D-abhängige Phosphorylierung

Neben Autophagie-abhängigem und proteasomalem Abbau würde ebenso CSNK1D-abhängige Phosphorylierung als Ursache für den Proteinabbau von PER2Δ in Frage kommen (Camacho et al. 2001). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die CSNK1D in CP- und CPΔ-Zellen gehemmt.

Nach Hemmung der CSNK1D-Aktivität durch PF670462 war zu erkennen, dass etwas mehr CSNK1D-Protein in den Zellen vorhanden war. Darüber hinaus waren stark erhöhte Mengen von PER2 und PER2Δ-Protein nachzuweisen. Im Gegensatz zur Analyse von Zelllysaten ohne vorherige CSNK1D-Hemmung gelingt nach PF670462-Behandlung der Nachweis von PER2Δ sogar im Ganzzelllysat (Abb 14B).

3.4. Analyse der GAPVD1-CSNK1D-Interaktion nach CSNK1D-Inhibition durch PF670462

Da PER2Δ-Protein nach Inhibition von CSNK1D in nachweisbaren Mengen in Zellen akkumuliert, ist es unter diesen Bedingungen möglich die Bindung zwischen GAPVD1 und CSNK1D in Abhängigkeit der PER2-CSNK1D Interaktion zu analysieren. Nach Hemmung

der Kinaseaktivität von CSNK1D wird PER2 weniger stark abgebaut und die Menge des an CSNK1D gebundenen PER2 in CP-Zellen ist deutlich erhöht.

Darüber hinaus ist GAPVD1, das in CP-Zellen normalerweise hyperphosphoryliert vorliegt nach PF670462-Behandlung ähnlich wie in CPΔ schwächer phosphoryliert (Abb. 14B). Wichtig ist allerdings, dass CSNK1D auch in Anwesenheit von PER2Δ an GAPVD1 bindet, was bedeutet, dass die Bindung auch in diesem Fall nicht von der Interaktion zwischen CSNK1D und PER2 abhängt. Weiterhin lässt sich kein großer Unterschied in der GAPVD1-Menge zwischen behandelten CP und CPΔ-Zellen erkennen. Entsprechend scheint die CSNK1D-PER2-Bindung nur einen Einfluss auf die posttranslationale Phosphorylierung von GAPVD1 zu haben, nicht jedoch auf die Interaktion von CSNK1D mit GAPVD1 (Abb. 14A).

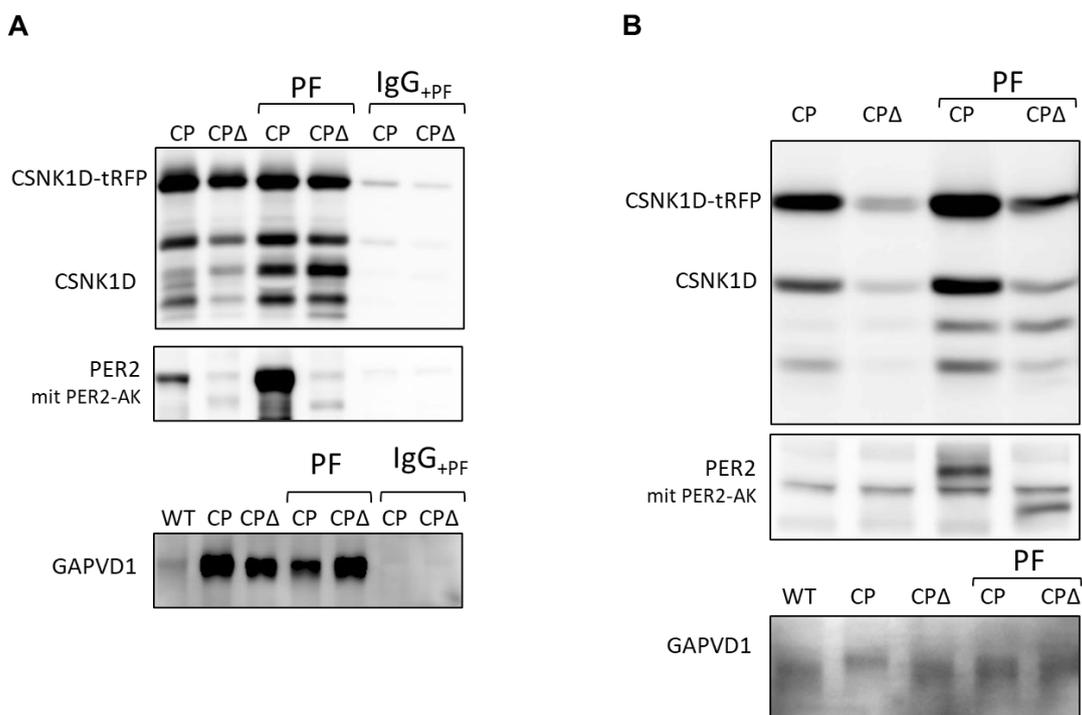


Abb. 14: CSNK1D-Immünpräzipitation nach CSNK1D-Inhibition zur Stabilisierung von PER2Δ-GFP

(A) Repräsentative Western-Blot-Analyse von CSNK1D-Immünpräzipitationen nach Inkubation von HT1080-CP- und CPΔ-Zellen mit 10μmol PF-670462 für 18h. Von links nach rechts: Immünpräzipitation unbehandelter CP- und CPΔ Zellen, mit PF-670462 behandelte CP und CPΔ-Zellen und Kontroll-IgG-Immünpräzipitation mit PF-670462 behandelte CP und CPΔ-Zellen. Zusätzlich in der GAPVD1-Co-IP: unbehandelte Wildtypzellen. **(B)** Repräsentative Western-Blot-Analyse von Ganzzellextrakten von HT1080-CP und CPΔ-Zellen. Von links nach rechts: Unbehandelte CP und CPΔ-Zellen und mit PF-670462 behandelte CP und CPΔ-Zellen.

Da nun eine Möglichkeit gefunden worden war, die PER2 Δ -Menge in den Zellen zu erhöhen, erfolgte im Anschluss eine PER2-Immunpräzipitation mit vorheriger Hemmung von CSNK1D durch PF670462, hauptsächlich um die Abhängigkeit der PER2-CSNK1D Interaktion vom Vorhandensein der CSNK1D-Bindungsdomäne in PER2 zu überprüfen.

Auch in CP-Zellen besteht eine starke Proteinbindung zwischen CSNK1D und PER2 (Abb. 15A). Eine Bindung von GAPVD1 an PER2 konnte auch nach Hemmung der CSNK1D-Aktivität in keiner Zelllinie nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führt auch die deutliche Erhöhung der PER2 Δ -Proteinmenge zu keiner verstärkten Interaktion mit CSNK1D.

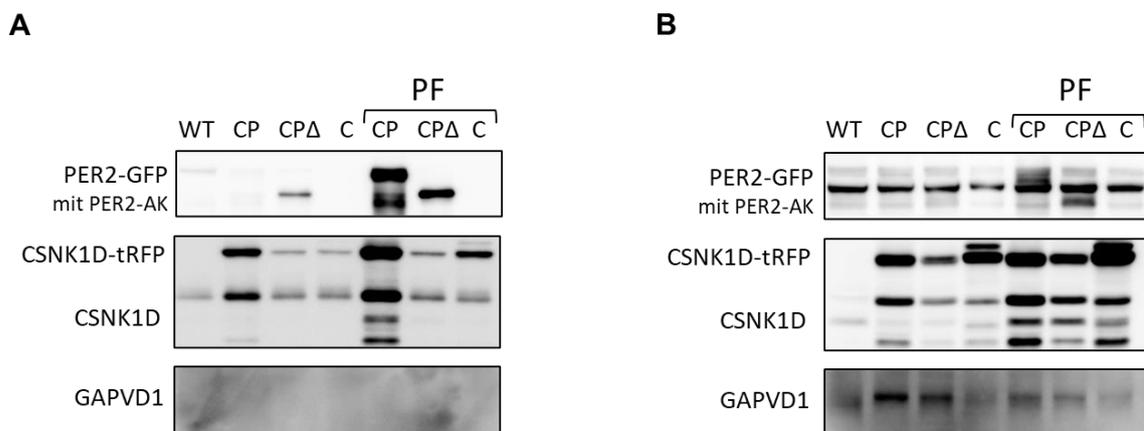


Abb. 15: PER2-GFP-Immunpräzipitation nach CSNK1D-Inhibition zur Stabilisierung von PER2 Δ -GFP

(A) Repräsentative Western-Blot-Analyse der PER2-GFP-Immunpräzipitationen nach Inkubation von HT1080-CP-, CP Δ - und C-Zellen mit 10 μ mol PF-670462 für 18h. Von links nach rechts: Immunpräzipitation unbehandelter WT-, CP-, CP Δ - und C- Zellen und mit PF-670462 behandelter CP-, CP Δ - und C-Zellen. (B) Repräsentative Western-Blot-Analyse von Ganzzellextrakten von HT1080-CP-, CP Δ - und C-Zellen mit 10 μ mol PF-670462 für 18h. Von links nach rechts: Ganzzelllysate unbehandelter WT-, CP-, CP Δ - und C- Zellen und mit PF-670462 behandelter CP-, CP Δ - und C-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mangelnde mRNA-Expression als Ursache für die extrem schwache Expression von PER2 Δ -Protein ausgeschlossen werden konnte, da die entsprechende mRNA in HEK-293T- und HT1080-Zellen eindeutig nachgewiesen werden konnte. Die Ursache für die extrem geringen Mengen an PER2 Δ ist wahrscheinlich die inhärente Instabilität des Proteins. Hemmung des proteasomalen oder Autophagie-abhängigen Abbaus oder der Kinase-Aktivität von CSNK1D kann zu Stabilisierung von PER2 Δ führen, welche eine Detektion des Proteins im Western Blot zulässt. Dadurch konnte schlussendlich bestätigt werden, dass die Interaktion zwischen CSNK1D und GAPVD1 unabhängig von einer stabilen PER2-CSNK1D-Bindung zu sein scheint.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es aufzuklären, wie die Proteine CSNK1D, PER2 und GAPVD1 innerhalb des PER-Komplexes interagieren. In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass Interaktionen von jeweils zwei Proteinen zwischen allen Proteinen bestehen. Es war jedoch unklar, ob alle Interaktionen direkt zwischen den beteiligten Proteinen stattfinden, oder ob es indirekte Interaktionen gibt, bei denen eines der Proteine eine Art „Brückenfunktion“ besitzt.

Zunächst stellte sich heraus, dass die verwendete Mutante PER2 Δ einem vermehrten Abbau unterliegt, da ohne künstliche Stabilisierung kein Proteinsignal in Ganzzelllysaten oder Immunpräzipitaten detektiert werden konnte. Ausreichende Expression von PER2 Δ war jedoch eine Voraussetzung, um die Abhängigkeit der GAPVD1-CSNK1D-Bindung von der Interaktion zwischen PER2 und CSNK1D untersuchen zu können. Nachdem es schließlich gelungen war, durch Hemmung der Casein-Kinase-Aktivität von CSNK1D mit PF670462 PER2 Δ ausreichend zu stabilisieren, stellte sich heraus, dass PER2 keine „Brückenfunktion“ bei der Bindung von GAPVD1 und CSNK1D einnimmt. Diese Arbeit unterstützt daher die Hypothese, dass zumindest die Interaktion zwischen CSNK1D und GAPVD1 direkt ist und nicht von PER2 abhängt. PER2 nimmt jedoch zusammen mit CSNK1D eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung von GAPVD1 ein.

4.1. Einfluss der CSNK1D-Bindungsdomäne auf die subzelluläre Lokalisation von PER2

Zur Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von CSNK1D und PER2(Δ) in den CP und CP Δ -Zelllinien wurde sowohl für HT1080-Zelllinien als auch für transient transfizierte HEK-293T-Zellen die Immunfluoreszenzmikroskopie genutzt. In HEK-293T-Zellen war PER2 bei gleichzeitiger Transfektion von CSNK1D vor allem im Nukleus und zum Teil im Zytoplasma lokalisiert. Dieselbe Verteilung sah man auch in HT1080-P- und CP-Zelllinien. Dies entsprach dem bekannten Verteilungsmuster von PER2 (Aryal et al. 2017). PER2 Δ wies sowohl in HEK-293T als auch in HT1080-Zellen eine andere Lokalisation auf. Das mutierte PER2 Δ -Protein war vor allem an membranhaltigen Zellstrukturen sowie im Zytoplasma zu finden. Womöglich verhindert die fehlende CSNK1D-Bindungsdomäne den Eintritt von PER2 Δ in den Nukleus, indem die dafür notwendige PER2-Dimerisierung mit sich selbst oder mit CRY1 verhindert wird (Lee et al. 2001). Da PER2 an der nukleären negativen Rückkopplungsschleife der Uhrenproteine beteiligt ist, könnte der fehlende Zellkerneintritt des Proteins zu einer verminderten Hemmung der Uhrenproteintranskription und damit zu veränderten Parametern des zellulären circadianen Oszillators führen.

Im Gegensatz dazu entsprach die Verteilung der CSNK1D in allen Zellen der Erwartung. CSNK1D befand sich mehrheitlich im Zytoplasma mit einer deutlich sichtbaren Anreicherung im Bereich des Zentrosoms (Behrend et al. 2000) (Abb. 3a, 7).

4.2. Mögliche Gründe für die stark reduzierte Proteinmenge von PER2 Δ in HEK-293T- und HT1080-Zellen

CSNK1D/E, PER1-3 und GAPVD1 bilden mit CRY1/2 zytoplasmatische PER-Komplexe (Aryal et al. 2017). Es war bereits bekannt, dass GAPVD1 ein Interaktionspartner von PER2 und auch ein Substrat der CSNK1D ist (Guillen et al. 2020; Ibrahim et al. 2021). Dennoch war zu Beginn noch weitgehend unklar, wie die drei Proteine sich gegenseitig beeinflussen und wie ihre Bindung jeweils voneinander abhängt. Das Interaktionsverhalten von PER2, CSNK1D und GAPVD1 sollte daher durch Immunpräzipitationen der beteiligten Proteine in HEK-293T-Zellen, in denen CSNK1D-tRFP und PER2(Δ)-GFP transient exprimiert wurden als auch in HT1080-Zellen, die CSNK1D-tRFP und PER2(Δ)-GFP stabil exprimieren, untersucht werden.

Eine wichtige Voraussetzung, um Proteininteraktionen durch Co-Immunopräzipitation untersuchen zu können, ist die robuste Expression aller beteiligten Proteine. In der ersten Versuchsreihe war es jedoch nicht möglich transient oder stabil transfiziertes PER2 Δ in Zellen durch Western-Blot-Analyse nachzuweisen. Als Ursache hierfür kamen unterschiedliche Möglichkeiten in Betracht, beispielsweise fehlende Antikörperbindung an das Zielprotein PER2 Δ , mangelnde mRNA- oder Proteinexpression von PER2 Δ oder erhöhte Proteinabbauraten von PER2 Δ , bedingt durch die Deletion der CSNK1D-Bindungsdomäne.

Zum Nachweis von PER2(Δ)-GFP wurde der JL8-Antikörper verwendet, der an den GFP-Teil des Fusionsproteins bindet. Die Entstehung eines PER2(Δ)-Signals ist demnach abhängig davon, dass das Fusionsprotein intakt ist und insbesondere der GFP-Teil vorhanden ist. Es kann bei Fusionsproteinen jedoch zur posttranslationalen Abspaltung von GFP kommen, wie in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte (Reus, P. 2020). In den Immunpräzipitaten sowohl aus HEK-293T- als auch aus HT1080-Zellen ließ sich im Ganzzelllysat nur PER2-GFP nachweisen, ein Nachweis von PER2 Δ -GFP gelang nicht. Sollte GFP daher abgespalten werden, wäre dieser Effekt spezifisch für PER2 Δ . Gegen eine Abspaltung von GFP spricht jedoch, dass in den Western-Blots kein freies GFP nachgewiesen werden konnte, und dass die subzelluläre Verteilung des fluoreszenten PER2(Δ)-GFP-Signals nicht der von freiem GFP entsprach. Darüber hinaus konnte nach Inhibition des Proteinabbaus PER2 Δ mit dem JL8-Antikörper nachgewiesen werden.

Möglich wäre auch gewesen, dass die mRNA des *Per2Δ-Gfp*-Gens nicht exprimiert würde. Dieser Hypothese widerspricht jedoch, dass mittels qPCR ein eindeutiger *Trfp*- und *Gfp*-mRNA-Nachweis in allen Zellen gelang. Die Antwort lag schließlich in erhöhtem Proteinabbau spezifisch des PER2Δ-Proteins. Nachdem proteasomaler oder Autophagie-abhängiger Proteinabbau durch MG132 bzw. Chloroquin gehemmt worden war, waren unter beiden Bedingungen deutlich erhöhte Mengen von PER2Δ-Protein im Western-Blot detektierbar. Daraus ergab sich die Frage, warum die Deletion der Casein-Kinase-Bindungsdomäne den Abbau des mutierten Proteins derart beschleunigt.

Eine Möglichkeit ist, dass es aufgrund des fehlenden Proteinabschnitts zu einer Konformationsänderung von PER2Δ kommt, welche wiederum zu einem vermehrten Proteinabbau mittels Autophagosomen und Proteasomen führt, indem Bereiche, die besonders sensibel für Proteasen sind, exponiert werden. Auch Akashi und Kollegen konnten bei der Untersuchung der Interaktion zwischen Casein-Kinasen und PER-Proteinen zeigen, dass Proteasomenhemmung mittels MG-132 zu einer Stabilisierung der PER-Proteine führte (Akashi et al. 2002).

Es ist auch bekannt, dass CSNK1D und CSNK1E die Abbaugeschwindigkeit von PER-Proteinen beeinflussen.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen bestätigen, dass CSNK1D PER2 phosphoryliert. PER2-Protein hat bei Co-Expression mit CSNK1D sowohl in HEK-293T- als auch in HT1080-Zellen ein erhöhtes Molekulargewicht, was am ehesten durch posttranslationale Phosphorylierung zu erklären ist. Im PER2-Protein besteht eine räumliche Nähe der in PER2Δ deletierten Aminosäuren der CSNK1D-Bindungsdomäne zu den FASP- und Phosphodegron-Domänen in PER2. Die FASP-Domäne führt über die gezielte, CSNK1D/E-abhängige Phosphorylierung von Serin-Resten zu einer Stabilisierung von PER2. Entfällt diese Phosphorylierung jedoch, wie es im *Familial advanced sleep phase syndrome* (FASPS) aufgrund einer Mutation eines der beteiligten Serine zu Glycin der Fall ist, so ist die Stabilität des Proteins stark reduziert, was ultimativ zu einer Verschiebung der zirkadianen Phase in den betroffenen Personen führt (Narasimamurthy und Virshup 2017; Toh et al. 2001). Durch die fehlende CSNK1D-Bindungsdomäne in PER2Δ ist eine stabile Bindung zwischen CSNK1D und PER2 nicht möglich. Man kann jedoch nicht ausschließen, dass schwache Wechselwirkungen bestehen bleiben, die es CSNK1D ermöglichen PER2 zu phosphorylieren. Dementsprechend konnten durch Immunpräzipitation von PER2-GFP in den CPΔ-Zellen geringe Mengen an co-präzipitierter CSNK1D nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, dass möglicherweise eine deutlich schwächer gebundene CSNK1D die Phosphorylierung von PER2Δ ermöglicht. Bedingt durch die fehlende CSNK1D-Bindungsdomäne sind im

PER2 Δ -Protein die FASP- und die Phosphodegron-Stellen räumlich wesentlich näher angeordnet als im PER2-Wildtyp-Protein. Dadurch könnte es aus rein sterischen Gründen zu einer relativ geringeren Phosphorylierung der FASPS-Seite bzw. einer relativ höheren Phosphorylierung der Degron Seite kommen, was einen stark erhöhten Proteinabbau zur Konsequenz hätte (Eide et al. 2005; Reischl et al. 2007). Dass eines oder mehrere dieser Szenarien zutreffen könnten, zeigt sich darin, dass die Hemmung von CSNK1D durch PF670462 in einer starken Akkumulation von CSNK1D resultierte, was schlussendlich die Analyse der GAPVD1-CSNK1D-Interaktion mit bzw. ohne stabile Rekrutierung von CSNK1D durch PER2 ermöglichte.

Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass es außer CSNK1D noch andere Kinasen gibt, die PER2 an der Phosphodegron-Stelle phosphorylieren. Neben CSNK1D/E wurde beispielsweise von *Salt-inducible kinase 3* (SIK3) gezeigt, dass sie PER2 phosphorylieren und damit dessen Stabilität beeinflussen kann (Hayasaka et al. 2017).

Neben dem mutierten PER2 Protein wurde in den hier verwendeten HEK-293T und HT1080-Zellen auch die CSNK1D überexprimiert. Es war bereits nachgewiesen worden, dass die PER-Protein-Menge durch gleichzeitige Überexpression von Caseinkinase signifikant reduziert wird (Akashi et al. 2002). Im Rahmen dieses Projektes ergaben sich in den durchgeführten Immunpräzipitationen ebenfalls Hinweise darauf, dass insbesondere die Überexpression von CSNK1D einen vermehrten PER2-Abbau induziert. Man konnte in den PER2-GFP-Immunpräzipitaten aus den HEK-293T-Zellen ein deutlich stärkeres Signal für PER2-GFP in den Zellklonen, die nur PER2-GFP exprimieren als in den CP-Zellen mit zusätzlich überexprimierter CSNK1D, detektieren (Abb. 6A).

Interessant ist ebenfalls, dass die Kinaseaktivität der CSNK1D und damit auch die Bindungsaffinität gegenüber anderen Proteinen von dessen C-terminaler Phosphorylierung abhängig ist, welche unter anderem durch Autophosphorylierung erfolgt (Rivers et al. 1998). Meine Arbeitsgruppe hat bereits gezeigt, dass PER2 der Autoinhibition der CSNK1D am C-Terminus entgegenzuwirken scheint (Ibrahim et al. 2021). So kommt es möglicherweise bei CSNK1D-tRFP-exprimierenden Zellen zu einer Kettenreaktion: Die überexprimierte, sich selbst hyperphosphorylierende und damit hypoaktive Caseinkinase weist bei geringer Restbindung an PER2, trotz fehlender Bindungsdomäne, eine geringere Aktivität an der FASP-Stelle von PER2 auf. PER2 Δ besitzt wiederum durch die Deletion der Aminosäuren der Casein-Kinase-Bindungsdomäne bereits ein höheres Instabilitätspotential und kann möglicherweise aufgrund der fehlenden Bindungsdomäne keinen inhibitorischen Einfluss auf die CSNK1D ausüben.

4.3. Zusammenspiel der Interaktion zwischen CSNK1D, GAPVD1 und PER2

Nach Hemmung der CSNK1D mit PF670462 konnte PER2 Δ in CP und CP Δ -Zellen nachgewiesen werden. Anschließend konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen CSNK1D und GAPVD1 unabhängig von PER2 stattfinden kann. Bei der Immunpräzipitation von CSNK1D ließ sich sowohl in CP als auch in CP Δ -Zellen co-präzipitiertes GAPVD1 detektieren.

Interessanterweise konnte in den zuvor erfolgten Immunpräzipitationen ohne CSNK1D-Hemmung nur unter bestimmten Bedingungen eine Bindung zwischen GAPVD1 und PER2 nachgewiesen werden, und zwar durch GAPVD1-IP mit HT1080-Zellen. Durch IP von PER2 wurde GAPVD1 dagegen nicht co-präzipitiert. Nach CSNK1D-Hemmung und dadurch höherer PER2-Proteinmenge war ebenfalls keine GAPVD1-Bindung nachweisbar. Dies widerspricht einem Teil der bisherigen Forschungsergebnisse. Aryal und Kollegen konnten ebenfalls durch Immunpräzipitationen zeigen, dass PER2 und GAPVD1 im Zytoplasma miteinander interagieren (Aryal et al. 2017). Ebenso konnte meine Arbeitsgruppe mittels Massenspektrometrie und Western Blot nachweisen, dass GAPVD1 und PER2 in menschlichen HT1080-Zellen aneinander gebunden sind (Ibrahim et al. 2021). Die fehlende Nachweisbarkeit der Bindung zwischen PER2 und GAPVD1 in der Western Blot Analyse spezifisch nach PER2-IP wurde in meiner Arbeitsgruppe jedoch ebenfalls wiederholt gezeigt, sowohl in Zellen als auch mit in vitro exprimierten Proteinen. Weshalb die PER2-GAPVD1-Interaktion nur nach GAPVD1-IP nachzuweisen ist, bleibt unklar. Möglicherweise blockiert der GFP-Antikörper zumindest teilweise eine für die Interaktion mit GAPVD1 wichtige Interaktionsdomäne. Alternativ wäre vorstellbar, dass GAPVD1 ausschließlich Heterodimere mit PER2 bildet, PER2 jedoch zusätzlich Homodimere und Komplexe mit anderen Proteinen, wodurch die Mehrzahl der präzipitierten PER2-Moleküle kein GAPVD1 gebunden hätte.

4.4. Einfluss der Interaktionen von GAPVD1, PER2 und CSNK1D auf ihre eigenen posttranslationalen Modifikationen

Neben dem Interaktionsverhalten der drei Proteine im zytoplasmatischen PER-Komplex konnte im Rahmen dieses Projekts auch gezeigt werden, dass sich CSNK1D, PER2 und GAPVD1 gegenseitig beeinflussen können. Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, scheinen eine wichtige Rolle im Aufbau und Ablauf der inneren Uhr des Menschen einzunehmen und so konnte dieses Projekt weitere mögliche Erklärungsansätze für die genauen molekularen Mechanismen aufzeigen.

PER2 und CSNK1D scheinen einen Einfluss auf die posttranslationale Phosphorylierung von GAPVD1 zu haben. Diese ist abhängig von der Expression der beiden Proteine: Wenn CSNK1D und PER2 überexprimiert werden und miteinander interagieren, lässt sich hyperphosphoryliertes GAPVD1 nachweisen (Ibrahim et al. 2021). Dieses Ergebnis konnte in diesem Projekt reproduziert werden. In HT1080 CP-Zellen weist GAPVD1 eine höhere Masse auf als in Wildtyp oder CPΔ-Zellen. Entsprechend bestätigt sich die Annahme, dass für die posttranslationale Modifikation von GAPVD1 zwei Voraussetzungen notwendig sind: Die Überexpression von CSNK1D und PER2 und die Interaktion beider Proteine miteinander. Sobald besagte Interaktion nicht mehr gegeben ist, wie beispielsweise in CPΔ-Zellen, fällt der Anteil des hyperphosphoryliert vorliegenden GAPVD1 deutlich geringer aus (Abb. 8, 10A, 14). Womöglich stimuliert die Bindung von PER2 an CSNK1D die Aktivität der Kinase. Nach PF-induzierter Hemmung der CSNK1D in CP-Zellen sieht man entsprechend, dass der Anteil des hyperphosphorylierten GAPVD1 ähnlich gering ist, wie in CPΔ-Zellen, obwohl eine Bindung zwischen CSNK1D und PER2 besteht (Abb. 14A). Man muss jedoch bedenken, dass durch PF670462 die Phosphorylierung aller beteiligter Proteine beeinflusst wird, möglicherweise hat dies Konsequenzen für deren Interaktionsverhalten, wie beispielsweise die Bindung zwischen CSNK1D und PER2 und auch die Bindung von GAPVD1 an CSNK1D. Dies bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Die posttranslationale Phosphorylierung von GAPVD1 durch die Interaktion von CSNK1D und PER2 könnte einen Einfluss auf die Länge des zirkadianen Zyklus haben. Guillen und Kollegen konnte bereits zeigen, dass eine fehlende, beziehungsweise verminderte Phosphorylierung von GAPVD1 dessen Endozytose-Funktion hemmt, ähnlich einem GAPVD1 Knockdown (Guillen et al. 2020). Neben der Endozytosefunktion ist auch die Stabilität von GAPVD1 abhängig von dessen Phosphorylierungsstatus, welcher durch die Interaktion mit CSNK1D und PER2 beeinflusst wird (Ibrahim et al. 2021). Da GAPVD1 nur im Zytoplasma ein Teil des PER-Komplexes ist (Aryal et al. 2017), hat die Phosphorylierung des Proteins möglicherweise einen Einfluss auf die Bindung von GAPVD1 an den PER-Komplex. So könnte die Geschwindigkeit von dessen Zellkerneintritt beeinflusst werden, woraus sich eine verzögerte Autoinhibition der BMAL1- und CLOCK-Genexpression und damit eine Verlängerung des zirkadianen Zyklus ergeben könnte.

Eine weitere Funktion von GAPVD1 innerhalb des zytoplasmatischen PER-Komplexes könnte ebenfalls die Regulation der PER2-Phosphorylierung sein, welche eine wichtige Stellschraube für den reibungslosen Ablauf der zirkadianen Rhythmik darstellt. Womöglich muss bei bestehender Bindung von PER2 an GAPVD1 erst GAPVD1 durch die CSNK1D/E phosphoryliert werden, bevor die Phosphorylierung von PER2 erfolgen kann. Progressive Phosphorylierung von GAPVD1 würde zu dessen Destabilisierung führen, wodurch mit

fortschreitender Zeit immer weniger GAPVD1 an den PER-Komplex gebunden wäre und CSNK1D/E dazu übergehen könnte, PER2 zu phosphorylieren.

Es ist bereits bekannt, dass die PER2-Phosphorylierung über den Phosphoswitch-Mechanismus abläuft und dadurch die Proteinstabilität beeinflusst. Mittels einer Konformationsänderung in der CSNK1D wird entweder präferentiell die FASPS oder die Phosphodegron-Stelle von PER2 phosphoryliert und damit die Proteinstabilität verändert (Philpott et al. 2020). Eine Mutation an der Phosphodegron-Stelle von PER2 und damit eine verminderte Phosphorylierung hat somit ein stabileres Protein zur Folge und auch eine verlängerte zirkadiane Periodenlänge. Die Stabilität von PER2 reguliert die Stabilität von CRY und auch des PER-Komplexes und spielt somit eine wichtige Rolle in der Kontrolle der zirkadianen Periodenlänge (Masuda et al. 2020). Zusätzlich wurde vor kurzem festgestellt, dass über eine negative Rückkopplungsschleife durch CSNK1D stabilisiertes PER2 eine hemmende Wirkung auf die CSNK1D-Aktivität hat (Philpott et al. 2023).

In diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass CSNK1D ein Signal für den PER2(Δ)-Abbau generiert, da eine gezielte Hemmung der CSNK1D die Stabilisierung von PER2(Δ) zur Folge hatte. Ob dieser Abbau durch den Phosphoswitch-Mechanismus erklärt werden kann, liegt zwar nahe, kann jedoch nicht mit den hier erfolgten Immunpräzipitationen mit Sicherheit bestätigt werden und bedarf noch weiterer Experimente.

4.5. Die Bedeutung von Proteininteraktionen für die innere Uhr des Menschen

In dieser Arbeit wurde deutlich, dass die Interaktion von CSNK1D, PER2 und GAPVD1 eine wichtige Rolle für eine störungsfreie Funktionsweise der inneren Uhr des Menschen spielen könnte, da Veränderungen der Stabilität, Phosphorylierung oder Interaktion dieser Proteine miteinander zu schnellerem oder langsamerem Proteinabbau und damit zu Verschiebungen der Periodenlänge führen könnten.

Durch diese fein abgestimmten Mechanismen der Interaktionen und gegenseitigen Phosphorylierungen innerhalb der inneren Uhr, lassen sich ihre drei Haupteigenschaften Freilauf, Temperaturkompensation und *Entrainment* erklären. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Veränderung der Substrataffinität der CSNK1D einer erhöhten Temperatur mit daraus resultierender erhöhter Reaktionsgeschwindigkeit entgegenwirkt: So ist die Affinität zu CSNK1D-ADP dann deutlich höher als zu CSNK1D-ATP (Shinohara et al. 2017). Physiologisch kommt es bei Erhöhung der Umgebungstemperatur ebenso zu einem verlangsamten PER2-Abbau, um so einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit entgegenwirken zu können (Zhou et al. 2015). Bei Verringerung der Umgebungstemperatur führt ein stabileres PER2 zu einer deutlich geringeren Erhöhung der

Reaktionsgeschwindigkeit, als eigentlich notwendig wäre, um einen stabile zirkadiane Periodenlänge aufrechterhalten zu können, wie es in Zellen ohne durch eine Punktmutation stabilisiertes PER2 der Fall ist. Entsprechend ist eine ausreichende Temperaturkompensation bei veränderten Phosphorylierungsmustern von PER2 nicht mehr möglich (Masuda et al. 2020).

Neben den Konsequenzen für die zirkadiane Rhythmik konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Veränderungen von CSNK1D oder PER2 auch weitere Folgen für einen Organismus haben können. Eine hyperaktive CSNK1D wird mit der Entstehung und vermehrten Metastasierung von Krebs in Verbindung gebracht. PER2 scheint eine wichtige Rolle im Bereich der Tumorsuppression einzunehmen. Mausmutanten, deren PER2-Expression gehemmt ist, sind nach radioaktiver Strahleneinwirkung deutlich anfälliger für die Entstehung von Tumoren als Mäuse mit einer normalen PER2-Expression (Fu et al. 2002). Ebenfalls scheint es Verbindungen zur Entwicklung vom metabolischen Syndrom, Drogenabhängigkeit und Alzheimer zu geben. Auch hier bietet die gezielte Hemmung der CSNK1D entsprechende neue Therapieansätze (Francisco und Virshup 2022).

4.6. Schlussfolgerung

Es lässt sich festhalten, dass die Feinregulation der inneren Uhr des Menschen und insbesondere der zytoplasmatische PER-Komplex noch nicht vollständig verstanden sind. In diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass die im PER-Komplex enthaltenen Proteine CSNK1D und GAPVD1 unabhängig von der Bindung zwischen CSNK1D und PER2 miteinander interagieren. Die CSNK1D-PER2-Interaktion ist jedoch wichtig für die posttranslationale Phosphorylierung von GAPVD1. Diese könnte für die Feinregulation der circadianen Rhythmik notwendig sein, womöglich über einen schnelleren bzw. verzögerten Eintritt des PER-Komplex in den Zellkern. Ebenso beeinflussen sich auch CSNK1D und PER2 gegenseitig. Eine fehlende Bindung zwischen den beiden Proteinen verhindert den Eintritt von PER2 in den Nukleus, wie man an den Immunfluoreszenzaufnahmen sehen kann. Daraus kann aufgrund der fehlenden negativen Rückkopplung womöglich eine verlängerte Periodendauer resultieren. Ebenso scheint die überexprimierte CSNK1D primär für den Abbau von PER2 verantwortlich zu sein, am ehesten über den aus anderen Arbeiten bekannten Phosphoswitch-Mechanismus. Durch die Deletion der CSNK1D-Bindungsdomäne in PER2 wird das Protein sehr instabil und unterliegt daher einem noch stärkeren Abbau, welcher sich durch die Hemmung von Proteasomen, der Autophagie und gezielt der CSNK1D mit Hilfe von PF670462 temporär vermindern lässt. Die Stabilität von PER2 wird entsprechend ebenfalls wichtig für die Feinregulierung der Periodenlänge der inneren Uhr sein. Die in früheren Arbeiten bereits gezeigte Interaktion zwischen PER2 und

GAPVD1 konnte nur teilweise reproduziert werden, mögliche Ursachen hierfür bedürfen noch weiterer Experimente.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit somit zeigen, dass die Interaktion zwischen CSNK1D, GAPVD1 und PER2 unabhängig voneinander stattfindet, die Proteine sich gegenseitig jedoch stark modifizieren und beeinflussen können. Dies scheint zwingende Voraussetzung für die korrekte Funktion der inneren Uhr des Menschen zu sein.

4.7. Ausblick

Grundlage für den Nachweis, dass die Interaktion von GAPVD1 und CSNK1D unabhängig von der Bindung von CSNK1D an PER2 ist, war die Stabilisierung von PER2 Δ , die durch Hemmung von CSNK1D erreicht wurde. Da auf diesem Weg nicht nur die Phosphorylierung von PER2 sondern die CSNK1D-abhängige Phosphorylierung aller beteiligter Proteine blockiert wurde, wäre es wichtig zu ergründen, wo mögliche Ursachen in der erhöhten Instabilität von PER2 Δ liegen könnten, um das Experiment auf andere Weise durchführen zu können. Zum Nachweis einer deletionsbedingten Konformationsänderung könnte eine vergleichende Strukturanalyse von PER2 und PER2 Δ sowie der Interaktion von PER2 mit CSNK1D erfolgen, beispielsweise durch AlphaFold oder eine Röntgenstrukturanalyse. Anschließend könnte man die Bindung von CSNK1D an PER2 nicht mittels Deletion der gesamten Bindungsdomäne, sondern durch Mutation einzelner Aminosäuren beeinflussen, bei der die Proteinstruktur fast vollständig erhalten bleiben sollte. Im besten Fall könnte man so eine stabile PER2-Mutante ohne funktionelle CSNK1D-Bindungsdomäne erzeugen, wodurch sich die Verwendung eines CSNK1D-Inhibitors erübrigen würde. Weiterhin wäre es möglich das Experiment in Zellen durchzuführen, in denen PER2 durch Knockdown oder Knockout ausgeschaltet wurde.

Ausgehend von den hier erhaltenen Ergebnissen stellt sich die Frage, welche Rolle GAPVD1 für die Funktionsweise des molekularen Oszillators spielt. Da GAPVD1 und CSNK1D unabhängig von PER2 miteinander interagieren können, wäre es möglich, dass der GAPVD1-CSNK1D-Komplex ein Zwischenprodukt bei der Bildung des PER-Komplex spielt, und GAPVD1 dabei die Kinaseaktivität von CSNK1D und/oder die Interaktion mit anderen Proteinen des PER-Komplex reguliert. Deletion von GAPVD1 gefolgt von Untersuchung der molekularen Zusammensetzung des PER-Komplex sowie der Funktionsweise des molekularen Oszillators sollten in dieser Hinsicht aufschlussreich sein.

Natürlich erfordert der PER-Komplex als Hauptbestandteil der inneren Uhr noch weitere Erforschung. Insbesondere im Hinblick auf die zentralen Eigenschaften der circadianen Uhr, Temperaturregulation, Freilauf und Entrainment wäre es interessant zu erfahren, wo sich die jeweiligen Schnittstellen auf molekularer Ebene befinden. Nach

aktuellem Wissensstand scheint die Regulation der molekularen Uhr hauptsächlich durch Phosphorylierungen und Rückkopplungsschleifen zu erfolgen. In Zukunft könnte es möglich sein, zirkadianen Rhythmusstörungen und anderen mit der inneren Uhr assoziierten Erkrankungen, beispielsweise der Veränderung des Schlaf-/Wachrhythmus im Alter, entgegenzuwirken, indem man posttranslationale Modifikationen und Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb des PER-Komplex beeinflusst (Kalfalah et al. 2016).

Literaturverzeichnis

- 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.
- 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, J. (1965): CIRCADIAN RHYTHMS IN MAN. In: *Science (New York, N.Y.)* 148 (3676), S. 1427–1432. DOI: 10.1126/science.148.3676.1427.
- Aschoff, J. (1984): Circadian timing. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 423, S. 442–468. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1984.tb23452.x.
- Behrend, L.; Stöter, M.; Kurth, M.; Rutter, G.; Heukeshoven, J.; Deppert, W.; Knippschild, U. (2000): Interaction of casein kinase 1 delta (CK1delta) 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.
- Brown, Steven A.; Ripperger, Juergen; Kadener, Sebastian; Fleury-Olela, Fabienne; Vilbois, Francis; Rosbash, Michael; Schibler, Ueli (2005): PERIOD1-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5722), S. 693–696. DOI: 10.1126/science.1107373.
- Camacho, F.; Cilio, M.; Guo, Y.; Virshup, D. M.; Patel, K.; Khorkova, O. et al. (2001): Human casein kinase Idelta phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. In: *FEBS letters* 489 (2-3), S. 159–165. DOI: 10.1016/s0014-5793(00)02434-0.
- Chen, Rongmin; Schirmer, Aaron; Lee, Yongjin; Lee, Hyeongmin; Kumar, Vivek; Yoo, Seung-Hee et al. (2009): Rhythmic PER abundance defines a critical nodal point for negative feedback within the circadian clock mechanism. In: *Molecular cell* 36 (3), S. 417–430. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.10.012.
- Chiu, Joanna C.; Ko, Hyuk Wan; Edery, Isaac (2011): NEMO/NLK phosphorylates PERIOD to initiate a time-delay phosphorylation circuit that sets circadian clock speed. In: *Cell* 145 (3), S. 357–370. DOI: 10.1016/j.cell.2011.04.002.

- Duong, Hao A.; Robles, Maria S.; Knutti, Darko; Weitz, Charles J. (2011): A molecular mechanism for circadian clock negative feedback. In: *Science (New York, N.Y.)* 332 (6036), S. 1436–1439. DOI: 10.1126/science.1196766.
- Eide, Erik J.; Woolf, Margaret F.; Kang, Heeseog; Woolf, Peter; Hurst, William; Camacho, Fernando et al. (2005): Control of mammalian circadian rhythm by CKepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. In: *Molecular and cellular biology* 25 (7), S. 2795–2807. DOI: 10.1128/MCB.25.7.2795-2807.2005.
- Eng, Gracie Wee Ling; Edison; Virshup, David M. (2017): Site-specific phosphorylation of casein kinase 1 δ (CK1 δ) regulates its activity towards the circadian regulator PER2. In: *PLoS one* 12 (5), e0177834. DOI: 10.1371/journal.pone.0177834.
- 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.
- Francisco, Joel C.; Virshup, David M. (2022): Casein Kinase 1 and Human Disease: Insights From the Circadian Phosphoswitch. In: *Frontiers in molecular biosciences* 9, S. 911764. DOI: 10.3389/fmolb.2022.911764.
- Freedman, M. S.; Lucas, R. J.; Soni, B.; Schantz, M. von; Muñoz, M.; David-Gray, Z.; Foster, R. (1999): Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5413), S. 502–504. DOI: 10.1126/science.284.5413.502.
- Fu, Loning; Pelicano, Helene; Liu, Jinsong; Huang, Peng; Lee, Cheng (2002): The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. In: *Cell* 111 (1), S. 41–50. DOI: 10.1016/s0092-8674(02)00961-3.
- Gallego, Monica; Kang, Heeseog; Virshup, David M. (2006): Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2. In: *The Biochemical journal* 399 (1), S. 169–175. DOI: 10.1042/BJ20060678.
- Gallego, Monica; Virshup, David M. (2007): Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 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 (New York, N.Y.)* 280 (5369), S. 1564–1569. DOI: 10.1126/science.280.5369.1564.

- Giamas, Georgios; Hirner, Heidrun; Shoshiashvili, Levani; Grothey, Arnhild; Gessert, Susanne; Kühl, Michael et al. (2007): Phosphorylation of CK1delta: identification of Ser370 as the major phosphorylation site targeted by PKA in vitro and in vivo. In: *The Biochemical journal* 406 (3), S. 389–398. DOI: 10.1042/BJ20070091.
- Gooley, J. J.; Lu, J.; Chou, T. C.; Scammell, T. E.; Saper, C. B. (2001): Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. In: *Nature neuroscience* 4 (12), S. 1165. DOI: 10.1038/nn768.
- Graves, P. R.; Haas, D. W.; Hagedorn, C. H.; DePaoli-Roach, A. A.; Roach, P. J. (1993): Molecular cloning, expression, and characterization of a 49-kilodalton casein kinase I isoform from rat testis. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (9), S. 6394–6401.
- Graves, P. R.; Roach, P. J. (1995): Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (37), S. 21689–21694. DOI: 10.1074/jbc.270.37.21689.
- Guillen, Rodrigo X.; Beckley, Janel R.; Chen, Jun-Song; Gould, Kathleen L. (2020): CRISPR-mediated gene targeting of CK1 δ/ϵ leads to enhanced understanding of their role in endocytosis via phosphoregulation of GAPVD1. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 6797. DOI: 10.1038/s41598-020-63669-2.
- Guo, Gaili; Wang, Kankan; Hu, Shan-Shan; Tian, Tian; Liu, Peng; Mori, Tetsuya et al. (2019): Autokinase Activity of Casein Kinase 1 δ/ϵ Governs the Period of Mammalian Circadian Rhythms. In: *Journal of biological rhythms* 34 (5), S. 482–496. DOI: 10.1177/0748730419865406.
- Hastings, J. W.; Sweeney, B. M. (1957): ON THE MECHANISM OF TEMPERATURE INDEPENDENCE IN A BIOLOGICAL CLOCK. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 43 (9), S. 804–811. DOI: 10.1073/pnas.43.9.804.
- Hastings, Michael H.; Maywood, Elizabeth S.; Brancaccio, Marco (2019): The Mammalian Circadian Timing System and the Suprachiasmatic Nucleus as Its Pacemaker. In: *Biology* 8 (1). DOI: 10.3390/biology8010013.
- Hayasaka, Naoto; Hirano, Arisa; Miyoshi, Yuka; Tokuda, Isao T.; Yoshitane, Hikari; Matsuda, Junichiro; Fukada, Yoshitaka (2017): Salt-inducible kinase 3 regulates the mammalian circadian clock by destabilizing PER2 protein. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.24779.
- Hermida, Ramón C.; Ayala, Diana E.; Calvo, Carlos; López, José E.; Mojón, Artemio; Rodríguez, Marta; Fernández, José R. (2005): Differing administration time-dependent

- effects of aspirin on blood pressure in dipper and non-dipper hypertensives. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 46 (4), S. 1060–1068. DOI: 10.1161/01.HYP.0000172623.36098.4e.
- 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.
- Hong, C. I.; Tyson, J. J. (1997): A proposal for temperature compensation of the circadian rhythm in *Drosophila* based on dimerization of the per protein. In: *Chronobiology international* 14 (5), S. 521–529. DOI: 10.3109/07420529709001473.
- 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). DOI: 10.3390/ijms22073787.
- Kalfalah, Faiza; Janke, Linda; Schiavi, Alfonso; Tigges, Julia; Ix, Alexander; Ventura, Natascia et al. (2016): Crosstalk of clock gene expression and autophagy in aging. In: *Aging* 8 (9), S. 1876–1895. DOI: 10.18632/aging.101018.
- Kalsbeek, Andries; Buijs, Ruud M. (2002): Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. In: *Cell and tissue research* 309 (1), S. 109–118. DOI: 10.1007/s00441-002-0577-0.
- Kalsbeek, Andries; Yi, Chun-Xia; Cailotto, Cathy; La Fleur, Susanne E.; Fliers, Eric; Buijs, Ruud M. (2011): Mammalian clock output mechanisms. In: *Essays in biochemistry* 49 (1), S. 137–151. DOI: 10.1042/bse0490137.
- Kim, Hwan; Oh, Hyejin; Oh, Young Soo; Bae, Jeomil; Hong, Nan Hyung; Park, Su Jung et al. (2019): SPIN90, an adaptor protein, alters the proximity between Rab5 and Gapex5 and facilitates Rab5 activation during EGF endocytosis. In: *Experimental & molecular medicine* 51 (7), S. 1–14. DOI: 10.1038/s12276-019-0284-5.
- Knutsson, Anders (2003): Health disorders of shift workers. In: *Occupational medicine (Oxford, England)* 53 (2), S. 103–108. DOI: 10.1093/occmed/kqg048.

Kume, K.; Zylka, M. J.; Sriram, S.; Shearman, L. P.; Weaver, D. R.; Jin, X. 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.

Lee, C.; Etchegaray, J. P.; Cagampang, F. R.; Loudon, A. S.; Reppert, S. M. (2001): Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. In: *Cell* 107 (7), S. 855–867. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00610-9.

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.

Masuda, Shusaku; Narasimamurthy, Rajesh; Yoshitane, Hikari; Kim, Jae Kyoung; Fukada, Yoshitaka; Virshup, David M. (2020): Mutation of a PER2 phosphodegron perturbs the circadian phosphoswitch. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (20), S. 10888–10896. DOI: 10.1073/pnas.2000266117.

Miyazaki, K.; Mesaki, M.; Ishida, N. (2001): Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. In: *Molecular and cellular biology* 21 (19), S. 6651–6659. DOI: 10.1128/MCB.21.19.6651-6659.2001.

Narasimamurthy, Rajesh; Hunt, Sabrina R.; Lu, Yining; Fustin, Jean-Michel; Okamura, Hitoshi; Partch, Carrie L. et al. (2018): CK1 δ/ϵ protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (23), S. 5986–5991. DOI: 10.1073/pnas.1721076115.

Narasimamurthy, Rajesh; Virshup, David M. (2017): Molecular Mechanisms Regulating Temperature Compensation of the Circadian Clock. In: *Frontiers in neurology* 8, S. 161. DOI: 10.3389/fneur.2017.00161.

Ohsaki, Kanae; Oishi, Katsutaka; Kozono, Yuko; Nakayama, Keiko; Nakayama, Keiichi I.; Ishida, Norio (2008): The role of {beta}-TrCP1 and {beta}-TrCP2 in circadian rhythm generation by mediating degradation of clock protein PER2. In: *Journal of biochemistry* 144 (5), S. 609–618. DOI: 10.1093/jb/mvn112.

Padmanabhan, Kiran; Robles, Maria S.; Westerling, Thomas; Weitz, Charles J. (2012): Feedback regulation of transcriptional termination by the mammalian circadian clock PERIOD complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6094), S. 599–602. DOI: 10.1126/science.1221592.

Philpott, Jonathan M.; Freeberg, Alfred M.; Park, Jiyoung; Lee, Kwangjun; Ricci, Clarisse G.; Hunt, Sabrina R. et al. (2023): PERIOD phosphorylation leads to feedback inhibition of

CK1 activity to control circadian period. In: *Molecular cell* 83 (10), 1677-1692.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2023.04.019.

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* 9. DOI: 10.7554/eLife.52343.

Pittendrigh, C. 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.

Reischl, Silke; Vanselow, Katja; Westermark, Pål O.; Thierfelder, Nadine; Maier, Bert; Herzog, Hanspeter; Kramer, Achim (2007): Beta-TrCP1-mediated degradation of PERIOD2 is essential for circadian dynamics. In: *Journal of biological rhythms* 22 (5), S. 375–386. DOI: 10.1177/0748730407303926.

Reus, P. 2020: Gegenseitige Regulation von PER-Komplex-Komponenten: Kontrolle der GAPVD1-Phosphorylierung durch PER2 und CSNK1D. Heinrich-Heine-Universität

Rivers, A.; Gietzen, K. F.; Vielhaber, E.; Virshup, D. M. (1998): Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (26), S. 15980–15984. DOI: 10.1074/jbc.273.26.15980.

Sakai, Takaomi; Tamura, Takuya; Kitamoto, Toshihiro; Kidokoro, Yoshiaki (2004): A clock gene, period, plays a key role in long-term memory formation in Drosophila. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (45), S. 16058–16063. DOI: 10.1073/pnas.0401472101.

Shanware, Naval P.; Hutchinson, John A.; Kim, Sang Hwa; Zhan, Lihong; Bowler, Michael J.; Tibbetts, Randal S. (2011): Casein kinase 1-dependent phosphorylation of familial advanced sleep phase syndrome-associated residues controls PERIOD 2 stability. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (14), S. 12766–12774. DOI: 10.1074/jbc.M111.224014.

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.

Shinohara, Yuta; Koyama, Yohei M.; Ukai-Tadenuma, Maki; Hirokawa, Takatsugu; Kikuchi, Masaki; Yamada, Rikuhiko G. et al. (2017): Temperature-Sensitive Substrate and Product Binding Underlie Temperature-Compensated Phosphorylation in the Clock. In: *Molecular cell* 67 (5), 783-798.e20. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.08.009.

Su, Xiong; Kong, Chen; Stahl, Philip D. (2007): GAPex-5 mediates ubiquitination, trafficking, and degradation of epidermal growth factor receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (29), S. 21278–21284. DOI: 10.1074/jbc.M703725200.

Tei, H.; Okamura, H.; Shigeyoshi, Y.; Fukuhara, C.; Ozawa, R.; Hirose, M.; Sakaki, Y. (1997): Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. In: *Nature* 389 (6650), S. 512–516. DOI: 10.1038/39086.

Thosar, Saurabh S.; Butler, Matthew P.; Shea, Steven A. (2018): Role of the circadian system in cardiovascular disease. In: *The Journal of clinical investigation* 128 (6), S. 2157–2167. DOI: 10.1172/JCI80590.

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.

van der Horst, G T; Muijtjens, M.; Kobayashi, K.; Takano, R.; Kanno, S.; Takao, M. et al. (1999): Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. In: *Nature* 398 (6728), S. 627–630. DOI: 10.1038/19323.

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 & development* 20 (19), S. 2660–2672. DOI: 10.1101/gad.397006.

Vielhaber, E.; Eide, E.; Rivers, A.; Gao, Z. H.; Virshup, D. M. (2000): Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. In: *Molecular and cellular biology* 20 (13), S. 4888–4899. DOI: 10.1128/MCB.20.13.4888-4899.2000.

Vitaterna, M. H.; King, D. P.; Chang, A. M.; Kornhauser, J. M.; Lowrey, P. L.; McDonald, J. D. et al. (1994): Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. In: *Science (New York, N.Y.)* 264 (5159), S. 719–725. DOI: 10.1126/science.8171325.

Xu, Pengfei; lanes, Chiara; Gärtner, Fabian; Liu, Congxing; Burster, Timo; Bakulev, Vasily et al. (2019): Structure, regulation, and (patho-)physiological functions of the

stress-induced protein kinase CK1 delta (CSNK1D). In: *Gene* 715, S. 144005. DOI: 10.1016/j.gene.2019.144005.

Yan, L.; Takekida, S.; Shigeyoshi, Y.; Okamura, H. (1999): Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light. In: *Neuroscience* 94 (1), S. 141–150. DOI: 10.1016/s0306-4522(99)00223-7.

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.

Yu, Wangjie; Nomura, Masahiko; Ikeda, Masaaki (2002): Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. In: *Biochemical and biophysical research communications* 290 (3), S. 933–941. DOI: 10.1006/bbrc.2001.6300.

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.

Anhang

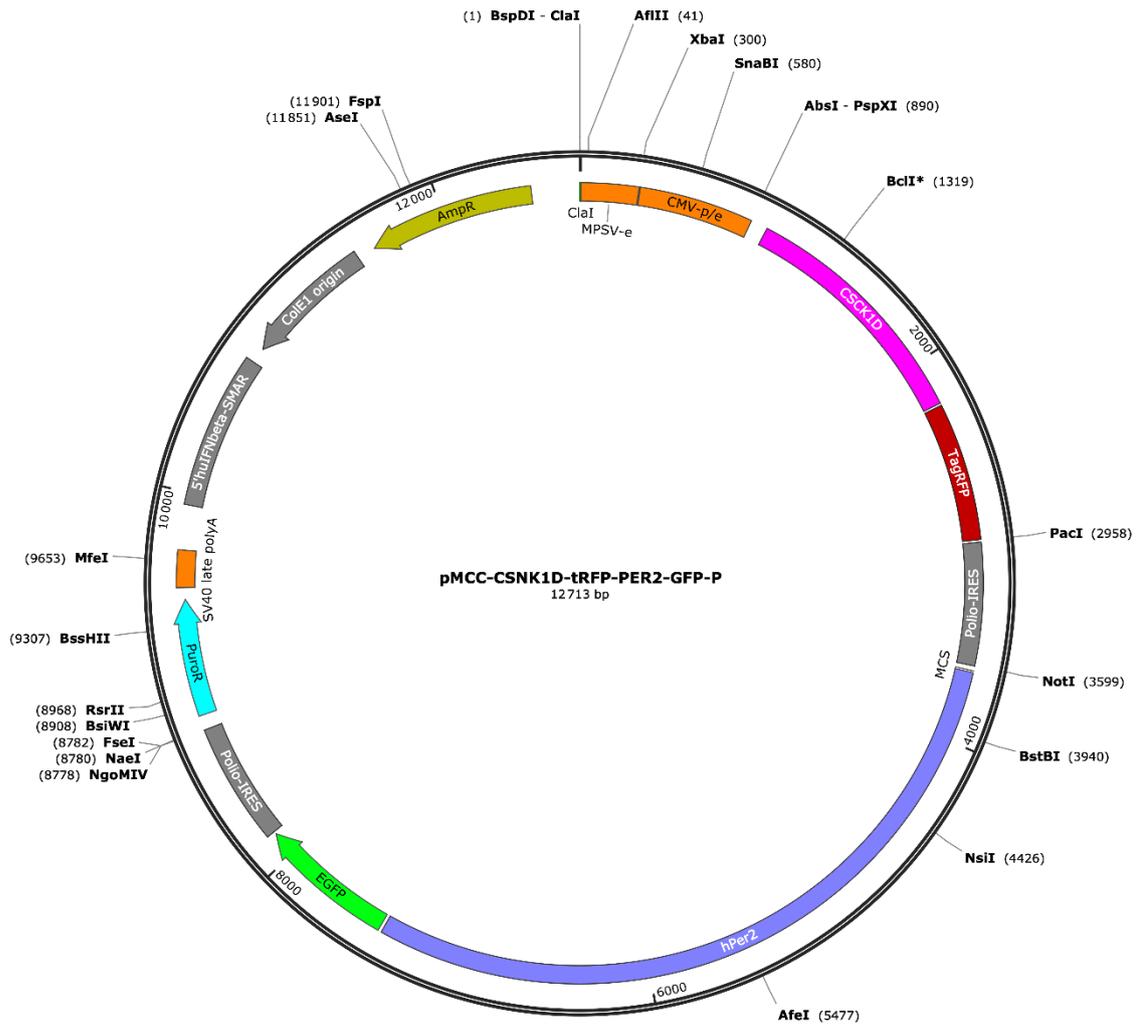


Abb. 16: Plasmid-Vektorkarte CP-Zelllinie (pMccCSNK1D-tRFP-Per2-GFP-P) (Ibrahim et al. 2021)

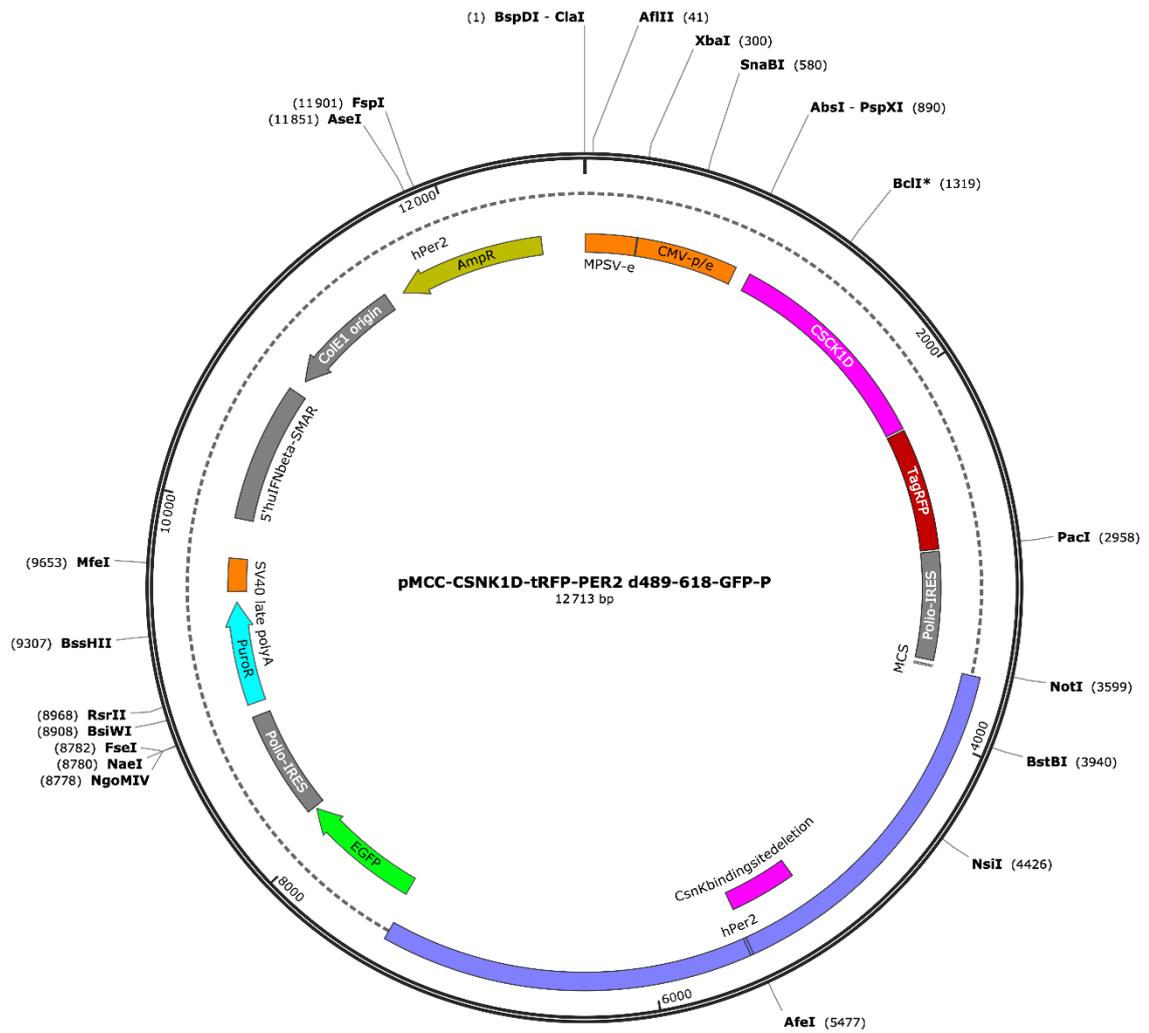


Abb. 17: Plasmid-Vektorkarte CPA-Zelllinie (pMccCSNK1D-tRFP-PER2 d489-618-GFP-P)
(Ibrahim et al. 2021)

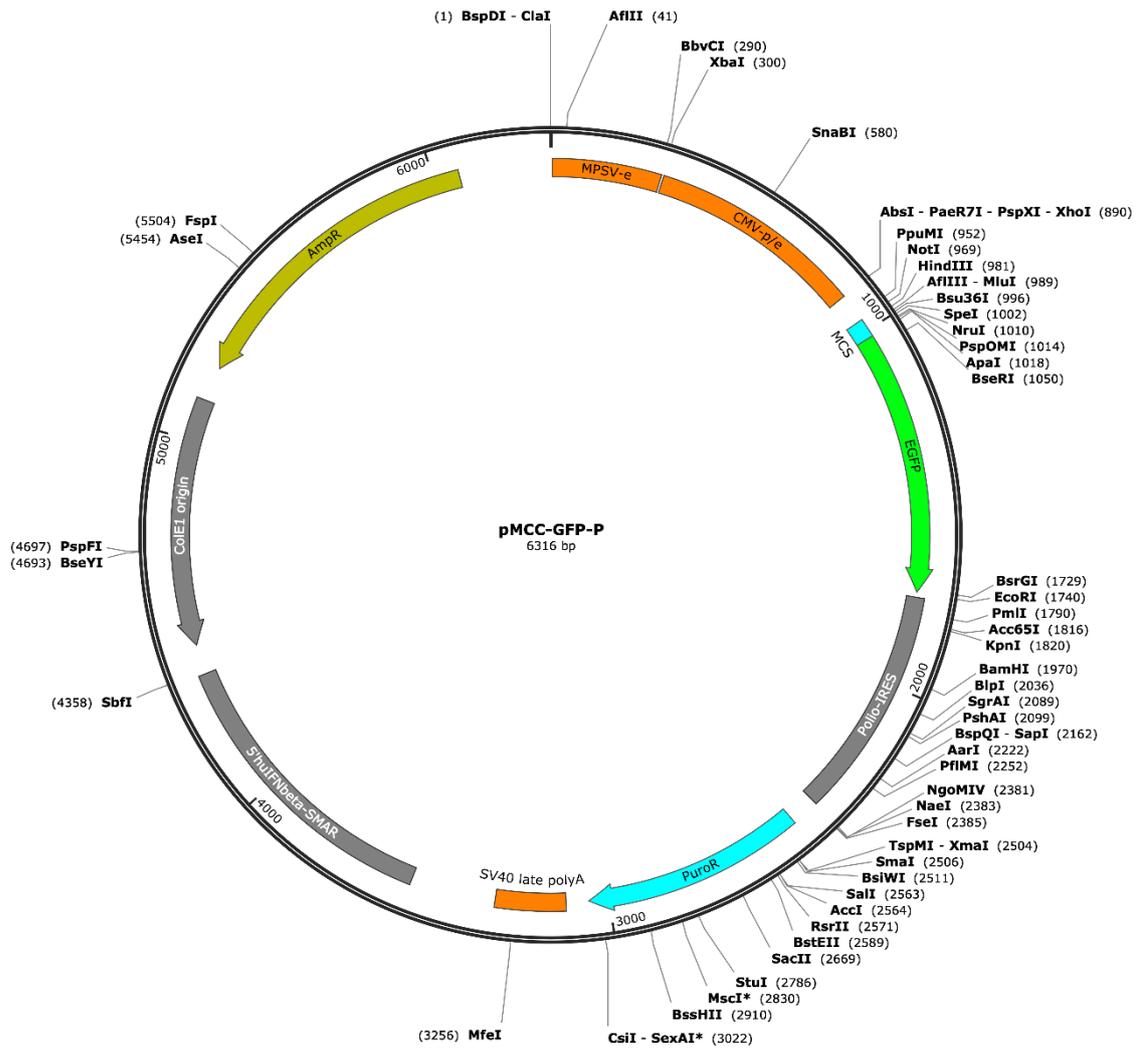


Abb. 18: Plasmid-Vektorkarte P-Zelllinie (pMccPER2-GFP-P) (Ibrahim et al. 2021)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben. Angefangen bei meinem Doktorvater Herrn Professor Hans Reinke, der es mir ermöglichte, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Ich bedanke mich vor allem für seine hervorragende fachliche und menschliche Betreuung und dass er stets ein offenes Ohr für jegliche Anliegen hatte.

Ich danke Herrn Professor Björn Stork für die komplikationslose Betreuung als Zweitgutachter.

Vielen Dank auch an Herrn Professor Fritz Boege für die Möglichkeit diese Dissertation am Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik umsetzen zu dürfen.

Zudem möchte ich mich vor allem bei Faiza bedanken. Ihre Einarbeitung, ihre stets zuverlässige Betreuung, ihr Engagement und ihre wertvollen Ideen und Tipps haben die Fertigstellung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht.

Mein weiterer Dank gilt Hussam, Ellen, Christian, Elke und Birgit für die spannende und auch lustige Zeit im Labor, für ihre Unterstützung, Begleitung und Motivation in den letzten Jahren. Vielen Dank an Christina, die nicht nur die beste Laborpartnerin, sondern auch eine große Stütze in dieser Zeit war, beziehungsweise immer noch ist.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern für ihre bedingungslose Liebe und ihren stetigen Rückhalt danken, welche mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben. Vielen Dank an alle meine Freunde und vor allem an Carlo für die Unterstützung bei dieser Dissertation, im Leben allgemein und für unsere jahrelange Freundschaft.