

1. Einleitung

Im Jahr 1729 beobachtete der französische Astronom Jean Jacques-Ortous de Marian eine unterschiedliche Ausrichtung der Blütenblätter während des Tages und während der Nacht. Er untersuchte weiter, ob dieses „Verhalten“ der Pflanze eine einfache Antwort auf das Sonnenlicht ist, indem er eine Pflanze ins Dunkle stellte. Er fand heraus, dass die Pflanze weiterhin ihre täglichen, rhythmischen Bewegungen aufwies, selbst in der Abwesenheit von Sonnenlicht. Die Ergebnisse von de Marian wurden von Charles Darwin erweitert. In seinem Buch „The Power of Movement in Plants“ bezeichnete er das nächtliche Stadium, in dem die Blätter der Pflanze zusammengefaltet waren, als „Schlaf“. Darwin stellte die Hypothese auf, dass es sich bei dem nächtlichen Zusammenfallen der Blätter um ein Verhalten zur Einsparung von Energiereserven handele. Neuere Forschungsergebnisse bestätigten Darwins Annahme.

„...a rose is not necessarily an unqualifiedly rose...it is a different biochemical system at noon and at midnight”- Colin Pittendrigh, 1965.

Auch diesem Zitat ist zu entnehmen, dass in Pflanzen am Tag andere biochemische Prozesse ablaufen als in der Nacht. Auch in anderen Lebewesen, wie z. B. bei Säugetieren, dem Menschen, aber auch bei Insekten ist eine rhythmische Änderung von physiologischen und biochemischen Vorgängen bei Tag und Nacht zu beobachten. Ein rhythmisches Verhalten stellt somit in der Geschichte der Evolution einen entscheidenden Selektionsvorteil bei der Nutzung und Regeneration von Energiereserven dar. Bei diesen Prozessen ist Licht ein zentraler Faktor.

Zur Erforschung biologischer Rhythmen hat sich ein spezieller Zweig der Biologie entwickelt (griech.: Lehre von der belebten Natur), der unter dem Begriff Chronobiologie zusammengefasst ist (Chronos = griech.: Zeit). Die Initiation biologischer Rhythmen wird durch endogene Reize gesteuert. Taktgebende, innere Uhren werden dabei mit der Umwelt synchronisiert. Derartige Systeme können über bestimmte Zeiträume auch in Abwesenheit des Zeitgebers aufrechterhalten werden (Aschoff, 1965).

1.1 Aufbau der biologischen Uhr

Biologische Uhren funktionieren nach einem allgemeinen Grundprinzip. Ein externes Eingangssignal, die sogenannte Zeitgeberinformation, besonders Licht, wird über Photorezeptoren oder chemische Sensoren an die endogene Uhr übermittelt. Dabei kommt es zur periodischen Synthese und Degradation von regulatorischen Proteinen. Endogene Uhren sind somit schwingende Systeme, deshalb wurde der Begriff Oszillator eingeführt. Diese

Betrachtungsweise rührt aus der universellen Funktionsweise von biologischen Uhren. Nach dem Eingang eines Signals wie Licht oder Temperatur wird ein biochemischer Prozess (z. B. Transkription eines bestimmten Gens) ausgelöst, der nach dem Erreichen eines Maximums durch Autoinhibition wieder abfällt und schließlich zum Erliegen kommt, bis der Prozess erneut ausgelöst wird. Die Synchronisation des Oszillators findet im Falle der zirkadianen Rhythmik u. a. durch die Zeitgeber Licht und Temperatur des Hell-Dunkel-Zyklus statt (s. Abb.1.1). Endogene Oszillatoren laufen sowohl auf Transkriptions- und Translationsebene als auch auf posttranslationaler Ebene ab.

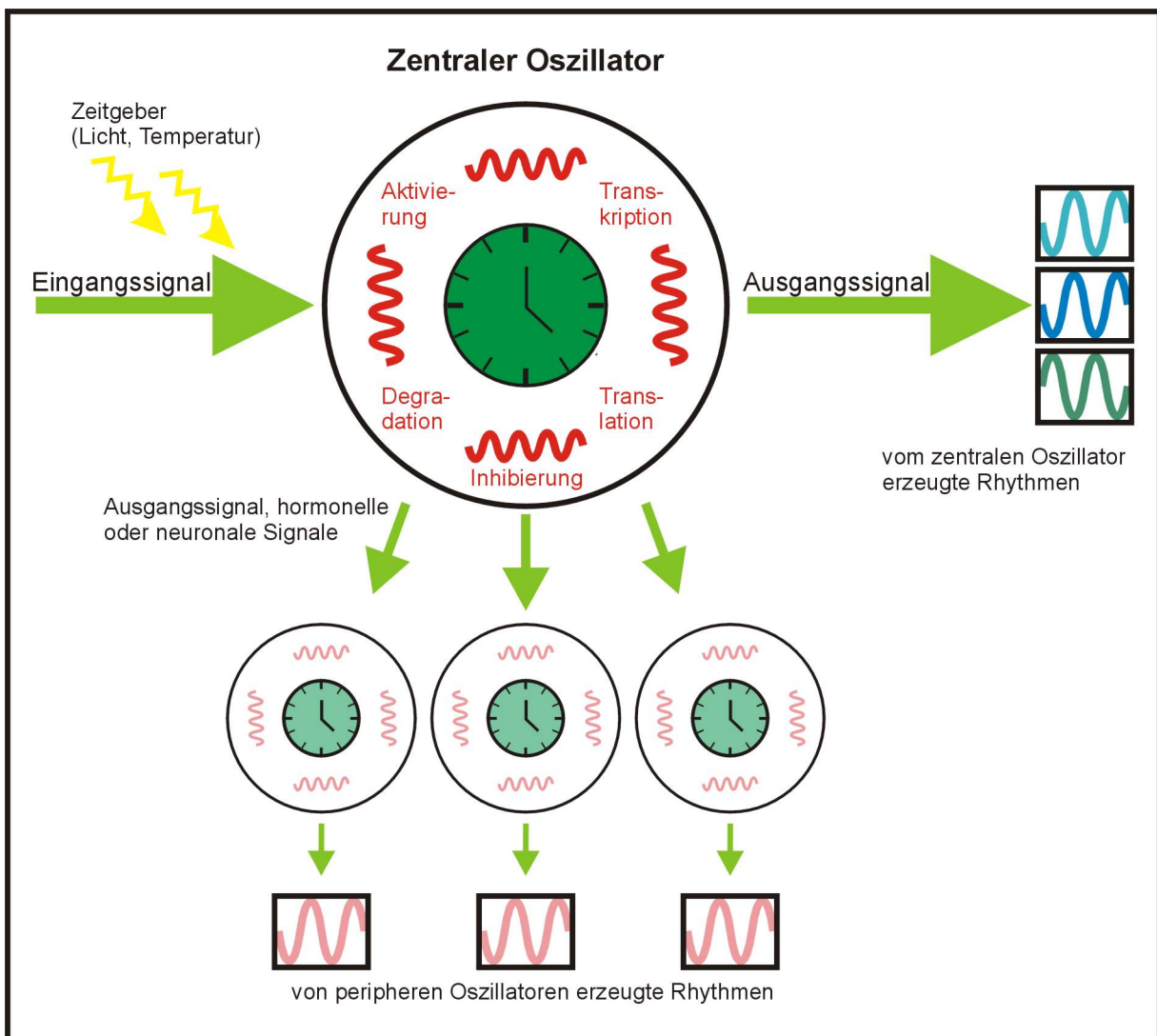


Abb.1.1: Schematische Darstellung des Prinzips der biologischen Uhr.

Externe Eingangssignale (*Input*) synchronisieren den zentralen Oszillator (*circadiane master clock*) über transkriptionelle, translationelle und posttranslationale Regulationsmechanismen mit der Umwelt. Die erzeugten rhythmischen Ausgangssignale (*Output*) wirken auf Stoffwechsel, Entwicklung und Verhalten des Organismus. Des Weiteren dienen die Ausgangssignale bei höheren Organismen zur Synchronisation peripherer Oszillatoren (verändert nach Cermakian & Corsi, 2000).

Die Oszillation erfolgt durch positive und negative Rückkopplungsschleifen. Proteine, die an den molekularen Oszillatoren beteiligt sind, werden als „Uhrenproteine“ bezeichnet. Die Funktion dieser Rückkopplungsschleifen ist es, die Transkription von „Uhrenprotein-abhängigen Genen“ (s. Kap. 1.2) dem Eingangssignal entsprechend zu regulieren, wodurch es zur Repression oder zur Aktivierung bestimmter Gene kommt. Ferner werden durch die Synchronisation des Oszillators Translokationsereignisse und die Stabilität bestimmter Uhrenproteine kontrolliert. Schließlich erzeugt der endogene Oszillator Ausgangssignale, welche auf den Stoffwechsel, die Entwicklung und das Verhalten des Organismus Auswirkung haben (Bell-Pedersen *et al.*, 2006, Young *et al.*, 2001).

Im Folgenden sollen einige Beispiele für das Vorkommen und die Auswirkungen von zirkadianen Uhren genannt werden. Die Honigbiene (*Apis mellifera*) nutzt die zirkadiane Rhythmik in ihrem Sozialverhalten und zur Orientierung auf dem Weg vom Bienenstock zur Futterquelle (Moore *et al.*, 1998). Ein weiteres Beispiel für die Einwirkung zirkadianer Rhythmen bei Insekten ist die Bewegungsaktivität (Hall, 2003). Auch beim Menschen spielen zirkadiane Rhythmen eine Rolle, beispielsweise beim Schlaf-/ Wachrhythmus (Beersma, *et al.*, 2006). Die Entstehung von Krebs kann bei einer Störung des humanen zirkadianen Rhythmus gefördert werden (Gracia-Saenz *et al.*, 2006, Levi *et al.*, 2006). Ebenso unterliegt die Regulation des Melatoninspiegels der Steuerung der biologischen Uhr (Arendt, 2006). Ferner können die Ursachen für psychische Erkrankungen wie Depressionen in der arhythmischen Oszillation der biologischen Uhr zu finden sein. Das oben beschriebene Modell der zirkadianen Uhr ist sowohl bei einzelligen und prokaryotischen Organismen als auch bei höherentwickelten, eukaryotischen Lebewesen zu finden (Harriet *et al.*, 1999, Bell-Pedersen *et al.*, 2005). Das Modell des zirkadianen Oszillators wird dadurch komplexer, dass auch Ausgangssignale den endogenen Oszillator als Eingangssignale beeinflussen können, und dass neben dem zentralen Oszillator mehrere periphere Oszillatoren vorliegen, die bei höher entwickelten Lebewesen über den gesamten Organismus verteilt existieren können (Brown & Schibler, 1999). Die Synchronisation dieser Oszillatoren findet einerseits autonom mit einem eigenen Rhythmus statt, andererseits können derartige Oszillatoren auch durch hormonelle und neuronale Signale auch vom zentralen Oszillator beeinflusst und synchronisiert werden (Glossop & Hardin, 2002). Ebenfalls ist eine Kopplung der Oszillatoren untereinander möglich.

Pflanzen stellen bei der Organisation der peripheren Uhr und der Zentraluhr eine Ausnahme dar. Hier existiert keine übergeordnete Zentraluhr, und die endogenen Uhren sind über den gesamten Organismus verteilt. Bei Tieren hingegen werden die Oszillatoren vor allem dem

zentralen Nervensystem zugeordnet. Diese sind verstärkt in Regionen des visuellen Systems zu finden. Bei Insekten wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sind derartige Oszillatoren besonders in lateralen Neuronen zu finden. In Wirbeltieren kommen sie in Kreuzungen der Sehnerven im suprachiasmatischen Nukleus (SCN) des Hypothalamus vor (Glossop & Hardin 2002).

1.2 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus der Chronobiologie

Die Prozesse der biologischen Uhr liegen in evolutionär hochkonservierter Form vor und werden an folgenden Organismen modellhaft untersucht: Roter Brotschimmel (*Neurospora crassa*), Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*), Maus (*Mus musculus*) und Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*). Die Proteine der zirkadianen Uhr von *D. melanogaster* sind neben den Proteinen der zirkadianen Uhr aus der Maus Gegenstand der Forschung der AG Wolf. In dieser Arbeit wurden Versuche mit den Proteinen von *D. melanogaster* durchgeführt. Das System der biologischen Uhr aus *D. melanogaster* liegt in Säugetieren konserviert vor und hat sich für Studien der zirkadianen Uhr als geeignet erwiesen (Hindricks, 2003). Die Fruchtfliege besitzt zwar ein relativ einfaches Zentralnervensystem, dennoch sind die beobachteten Verhaltensmuster komplex genug, dass sie auf andere Organismen übertragbar sind. Die Erforschung der zirkadianen Rhythmik erfolgte dabei durch Beobachtungen der Bewegungsaktivität der Fliege (Pittendrigh, 1969).

Zum ersten Mal wurde 1971 aus *D. melanogaster* ein Gen der Zentraluhr mit dem Namen *period* charakterisiert (Konopka & Benzer, 1971). Beim Vorhandensein von Mutationen des Gens *period* konnte ein verändertes Verhaltensmuster in der zeitlichen Bewegungsaktivität beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde ebenfalls eine neurogenetische Untersuchung von Fruchtfliegen bezüglich des Gens *period* durchgeführt (Benzer, 1971). Es folgte die Klonierung des Gens *period* und die Analyse von produzierten mRNA- und Proteinmengen sowie von Translokationsereignissen des Genprodukts PERIOD in den Zellkern in Abhängigkeit von der Tageszeit (Liu *et al.*, 1988, Meyer *et al.*, 2006). Weitere Gene und ihre entsprechenden Produkte, die am zirkadianen Rhythmus beteiligt sind, wurden entdeckt und konnten schließlich im Gehirn von der Fliege lokalisiert werden. Die 40 Neuronen, in denen der zentrale Oszillator lokalisiert ist, werden durch Neurite miteinander verbunden (Blau, 2001). Das primäre Charakteristikum des zentralen Oszillators von *D. melanogaster* ist das Vorkommen der beiden Uhrenproteine TIMELESS (TIM) und PERIOD (PER) in hohen Konzentrationen (Zerr *et al.*, 1990). Des Weiteren werden von den Zellen nicht nur PERIOD

und TIMELESS, sondern auch die anderen Proteine der zirkadianen Uhr, wie z. B. CLOCK gebildet (Meyers *et al.*, 1996, Hunter-Ensor *et al.*, 1996, Hardin *et al.*, 1994, Houl *et al.*, 2005, Kaneko *et al.*, 2000). Ferner konnten in *D. melanogaster* weitere periphere Oszillatoren durch Luziferase-Reportergen-Analysen lokalisiert werden. Derartige Oszillatoren befinden sich in Augen, Beinen und Flügeln des Tieres. Die Versuche zeigten, dass dort eine besonders hohe Konzentration von Uhrenproteinen vorliegt (Blau & Rothenfluh, 1999) (s. Abb. 1.2 und 1.3). Es ist zu erwähnen, dass zirkadiane Oszillatoren selbst in Gewebekulturen von *D. melanogaster* durch Licht ablaufen. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Oszillatoren unabhängig voneinander und autonom schwingen (Plautz *et al.*, 1997, Meyer *et al.*, 2006). Die peripheren Oszillatoren, die für das lokale Ausgangssignal verantwortlich sind, können wie beispielsweise bei den Antennen über den sensorischen *Input* reguliert werden. Es wurde herausgefunden, dass die Aktivität des Antennennervs, einschließlich der Empfindlichkeit auf Geruchsstoffe, zirkadianen Schwankungen unterworfen ist (Krishnan *et al.*, 1999, Tanoue *et al.*, 2004).

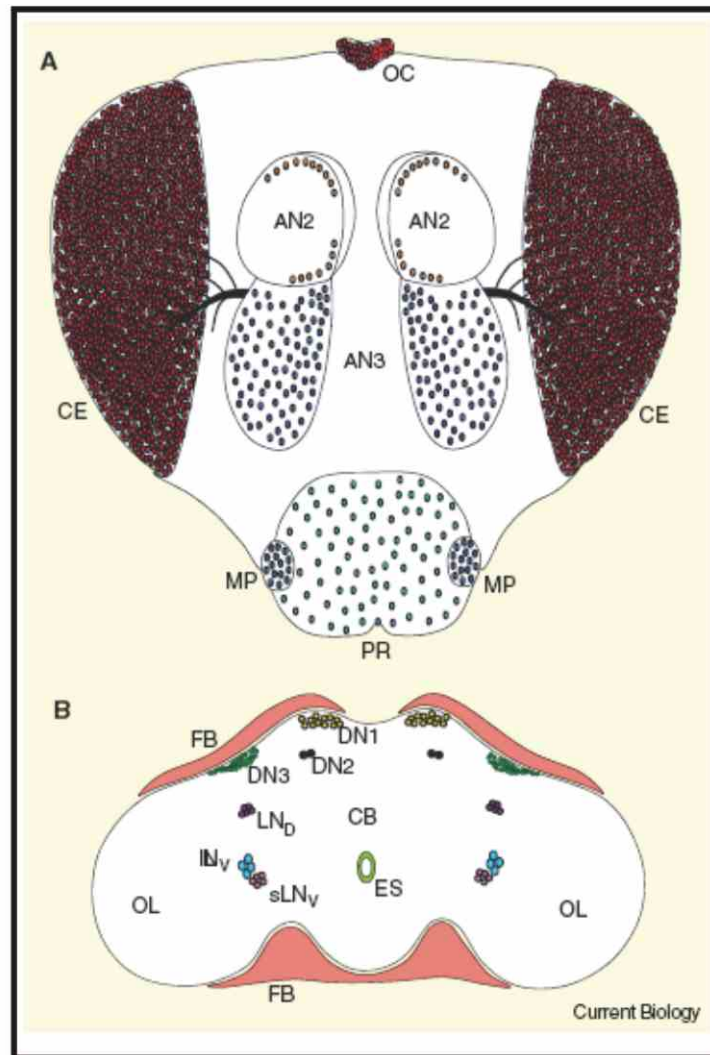


Abb.1.2: Die Verteilung von zentralen und peripheren Uhren in *Drosophila melanogaster*.

A Gezeigt ist eine schematische Kopf- und Gehirnanatomie von *D. melanogaster*. Die am Oszillator beteiligten Gehirnbereiche sind farbige gekennzeichnet und konnten durch die Expressionsmuster der Uhrenproteine für PERIOD und TIMELESS lokalisiert werden (Panda *et al.*, 2002) (Helfrich-Forster, 2003).

OC = Ocellen; CE = Facettenaugen; AN2 = Zweites Antennensegment, AN3 = drittes Antennensegment; MP = maxillare Palpen; PR = Proboscis.

B Im Gehirn von *Drosophila melanogaster* sind an folgenden Stellen zirkadiane Oszillatoren zu finden: Es ist ein frontaler Schnitt durch das Gehirn von *Drosophila melanogaster*. CB = Zentralhirn; OL = optische Lappen; FB = Fettkörper; ES = Ösophagus; LN_D = Dorsal laterale Neuronen; ILN_v = große ventral laterale Neuronen; sLN_v = kleine ventral laterale Neuronen; DN1 = Dorsales Neuron 1s; DN2 = Dorsales Neuron 2s; DN3 = Dorsales Neuron 3s (Helfrich-Forster, 2003).

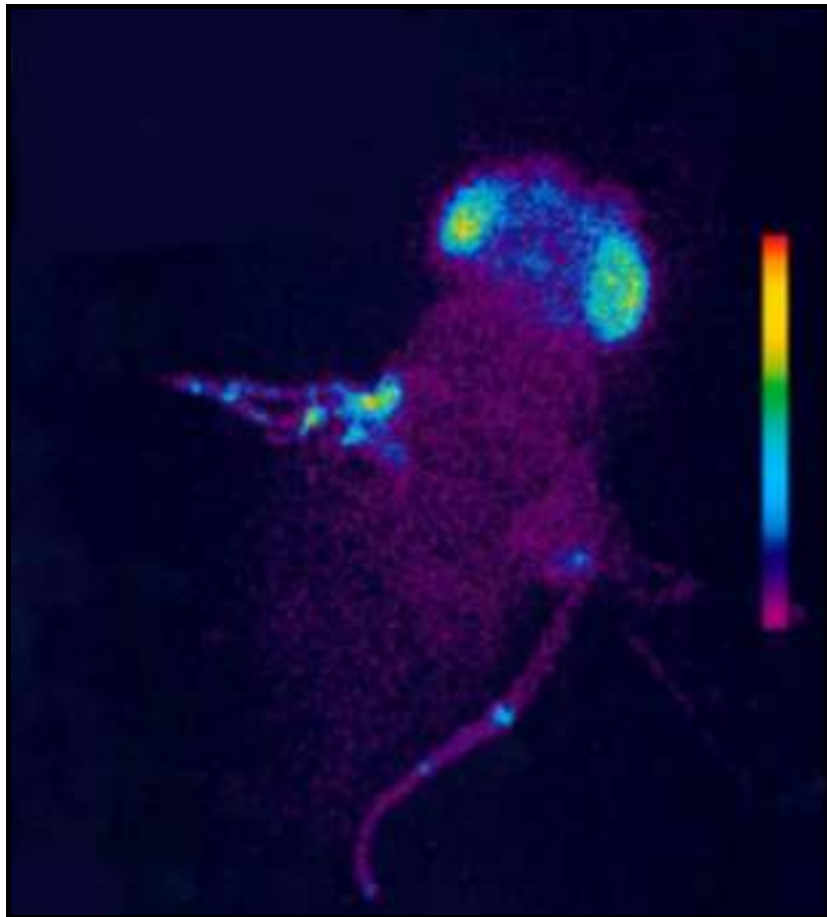


Abb. 1.3: Detektion von zentralen und peripheren Oszillatoren in *Drosophila melanogaster*

Die Expression des Gens für das Uhrenprotein PERIOD konnte im gesamten Organismus von *Drosophila melanogaster* sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Luziferase-Reportergen unter Kontrolle des Promotors für das Gen *period* gebracht (nach Brandes *et al.*, 1996).

1.3 Die molekularen Grundlagen des zentralen Oszillators von *Drosophila melanogaster* - die PER/TIM- Rückkopplungsschleife

Durch genetische Untersuchungen konnte der zentrale Oszillator von *Drosophila melanogaster* aufgeklärt werden. Durch die Identifikation von Phänotypen, die auf Grund von Mutationen in den Genen, die für Uhrenproteine kodieren, einen veränderten zirkadianen Rhythmus aufwiesen, war es möglich, ein Modell des zentralen Oszillators zu entwickeln (s. Abb. 1.4).

Die Uhrenproteine CLOCK (CLK) und CYCLE (CYC) bilden Heterodimere aus und binden an regulatorische DNA-Elemente, sogenannten E-Boxen (Yu *et al.*, 2006). Dort verbleiben sie von der Mitte des Tages bis zur frühen Nacht. Durch die Bindung der beiden Proteine an die E-Boxen, aktivieren sie die Transkription der Gene *period* und *timeless* (Darlington *et al.*, 1998, Hao *et al.*, 1997 McDonald *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2001; Zerr *et al.*, 1990).

Die Mengen von *per* und *tim* Transkripten erreichen am Nachmittag ein Maximum, wo hingegen die Proteine PER und TIM erst in den späten Abendstunden in hohen Konzentrationen nachweisbar sind (Hardin *et al.*, 1990; Zerr *et al.*, 1990; Edery *et al.*, 1994; Sehgal *et al.*, 1995; Hunter-Ensor *et al.*, 1996; Myers *et al.*, 1996; Zeng *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2006). Diese Verzögerung der Akkumulation der beiden Uhrenproteine im Zytosol resultiert aus der phosphorylierungsabhängigen Destabilisierung von PER durch die Kinase DOUBLETIME (DBT) und die Kinase CK2 (Price *et al.*, 1998; Kloss *et al.*, 1998; Akten *et al.*, 2006; Nawathean *et al.*, 2004). Die Degradation von TIM erfolgt in den frühen Morgenstunden und ist u. a. lichtabhängig. Bei diesem Vorgang geht TIM zunächst eine Bindung mit dem Blaulichtrezeptor CRYPTOCHROM (CRY) ein (Stanewski *et al.*, 1998). Die Destabilisierung von TIM kommt durch die Kinase JETLAG (JET) zu Stande (Koh *et al.*, 2006). Die Phosphorylierung von TIM durch JET erfolgt erst nachdem TIM an CRY gebunden hat. Nach der Phase des Abbaus von phosphoryliertem PER folgt die Phase der PER Stabilisierung durch Bindung von TIM. Des Weiteren wird PER durch die Aktivität der Phosphatase PP2a stabilisiert. DBT bleibt an PER gebunden. Es bildet sich ein heterotrimerer Komplex aus PER, DBT und TIM aus, welcher durch die Kernporen in den Zellkern transloziert wird. Davor wird TIM durch die Kinase SHAGGY (SGG) phosphoryliert und PER durch CK2. Auf diese Weise wird PER für den heterotrimeren Komplex aktiviert (Lin *et al.*, 2002; Akten *et al.*, 2003; Martinek *et al.*, 2001; Kloss *et al.*, 2001; Ashmore *et al.*, 2003; Shafer *et al.*, 2002). PER bindet im Kern an CLK und CYC. Die Funktion von DBT und TIM bei diesem Prozess ist noch nicht bekannt (Lesley *et al.*, 2003). Im Zellkern wird PER von DBT weiter phosphoryliert. Durch Bindung an die Transkriptionsfaktoren CLK und CYC inhibiert PER seine eigene Bildung. Gleichzeitig wird die Transkription des Gens für TIM inhibiert. *In vivo* Experimente zeigten, dass PER die CLK-CYC-abhängige Transkription dadurch unterdrückt, dass PER an CLK bindet und somit die DNA-Bindungsaffinität des CLK-CYC-Komplexes herabsetzt (Lee *et al.*, 1999). Die Akkumulation von nichtphosphoryliertem CLK im Kern (Wangjie *et al.*, 2006) setzt einen neuen Zyklus in Gang (Cyran *et al.*, 2003; Blau *et al.*, 1999; Glossop *et al.*, 2003).

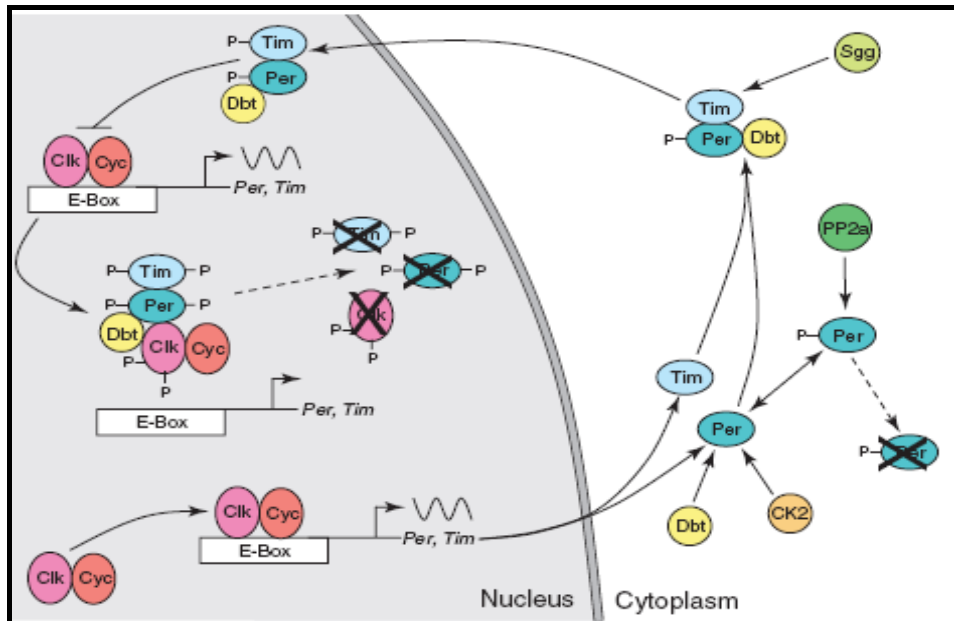


Abb. 1.4: Modell der Per/Tim – Rückkopplungsschleife.

CLK-CYC Heterodimere binden an E-Boxen und aktivieren die Transkription von *per* und *tim*. Sobald PERIOD synthetisiert wird, wird das Protein durch die Kinasen DBT und CK2 phosphoryliert, dies führt zum Abbau von PER. Bindet TIM an phosphoryliertes PER, so bleibt PER an DBT gebunden, und der proteolytische Abbau von PER unterbleibt. PER wird ebenfalls durch PP2a stabilisiert, wodurch an PER gebundene Phosphate entfernt werden. Der heterotrimere Komplex aus DBT, PER und TIM wird durch die Kinase SHAGGY (SGG) und der Kinase CK2 phosphoryliert, wodurch der Komplex in den Zellkern transportiert wird. Der trimere PER-TIM-DBT-Komplex bindet an CLK und CYC, welche als Folge dessen von der DNA abdissoziieren.

Durch Phosphorylierung durch DBT werden CLK und PER destabilisiert und abgebaut. Der Abbau von TIM erfolgt im Gegensatz hierzu durch Tyrosinphosphorylierung. Die Akkumulation von nichtphosphoryliertem CLK im Zellkern führt zu einer Heterodimerisierung mit dem Protein CYC.

Dadurch wird ein neuer Zyklus induziert. Durchgezogene Linie mit Pfeil = einzelner Schritt im Uhrenzyklus; blockierte Linie = inhibierende Interaktion; gewellte Linie = *tim*, *per*-mRNA; doppelte Pfeile = reversible Phosphorylierung; gestrichelte Linie = proteasomaler Abbau; X = abgebautes Protein; P = Phosphat (Hardin, 2005).

1.4 Eine Übersicht über das Tandem-PAS-Domänen-Protein PERIOD

Das Gen *period* konnte durch molekulargenetische Analysen zirkadianer Rhythmen als erstes Uhrenglied von *Drosophila melanogaster* identifiziert werden (Konopka & Benzer, 1971; Bargiello *et al.*, 1984; Zehring *et al.*, 1984). Während des in Kapitel 1.3. beschriebenen zentralen Oszillators der biologischen Uhr von *D. melanogaster* bilden das Genprodukt dPER zusammen mit einem zweiten essentiellen Uhrenprotein dTIM heterodimere Komplexe aus. Dies geschieht während des Ablaufs positiver und negativer Rückkopplungsschleifen und der Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren dCLK und CYC. Dabei reguliert dPER seine

eigene Transkription. dPER enthält als dominierendes Element zwei PAS Domänen, PAS-A und PAS-B (s. Abb. 1.5 und 1.6). Derartige Domänen kommen in Proteinen von allen Organismen als häufiges Motiv vor (Zhulin *et al.*, 1997). PAS-Domänen spielen eine wichtige Rolle bei der Protein-Protein-Interaktion. Der Name der PAS-Domänen rührt von den Proteinen, in denen sie zum ersten Mal beschrieben wurden: PERIOD, ARNT und SIM (s. Anhang) (Taylor & Zhulin 1999; Pellequer *et al.*, 1998; Nambu *et al.*, 1996). PAS-Domänen sind meist Bestandteile von Multidomänenproteinen und sind somit mit mehreren Regulationsdomänen kombiniert. Dies ist der Grund für die vielen unterschiedlichen Funktionen, die von PAS-Domänen erfüllt werden (Ponting & Arvind, 1997; Yi-Zhoang *et al.*, 2000). Die Darstellung der Domänenstruktur von dPER zeigt u. a. die Bereiche, mit denen die Interaktionen mit DBT und TIM, bedingt durch PAS-Domänen, vermittelt werden (s. Abb. 1.5) (Saez *et al.*, 1996; Gekakis *et al.* 1995; Kloss *et al.*, 2001). Weiterhin spielen die PAS-Domänen auch bei der Homodimerisierung des Proteins dPER eine wichtige Rolle (Yilidiz *et al.*, 2005). In der Nähe des N-Terminus von dPER befindet sich eine „nukläre Lokalisationssequenz“ (NLS) sowie eine zytosolische Lokalisationsdomäne (CLD). Man vermutet, dass dPER durch Wechselwirkung der CLD mit einem anderen, momentan noch unbekanntem Protein im Zytosol zurückgehalten wird (Saez & Young, 1996). Dem Transport von PER-TIM-Komplexen in den Kern liegt wahrscheinlich folgender Mechanismus zu Grunde: Die CLD von PER wird durch dTIM-Bindung so maskiert, dass der Import in den Kern durch strukturelle Freilegung der NLS vermittelt werden kann. Ein anderes Modell besagt, dass der Kern Im- und Export auch ohne das Vorhandensein von TIM im Gleichgewicht steht. Dabei ist der Export auf einen CRM1- (*chromosome region maintenance I*) vermittelten Exportweg zurückzuführen (Nawathean & Rosbash, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dPER in Abwesenheit von dTIM, aber in Anwesenheit von DBT und CKII eine Repressoraktivität besitzt. Resultierend aus dieser Vorstellung besitzt dTIM eine Funktion als Stabilisator von dPER.

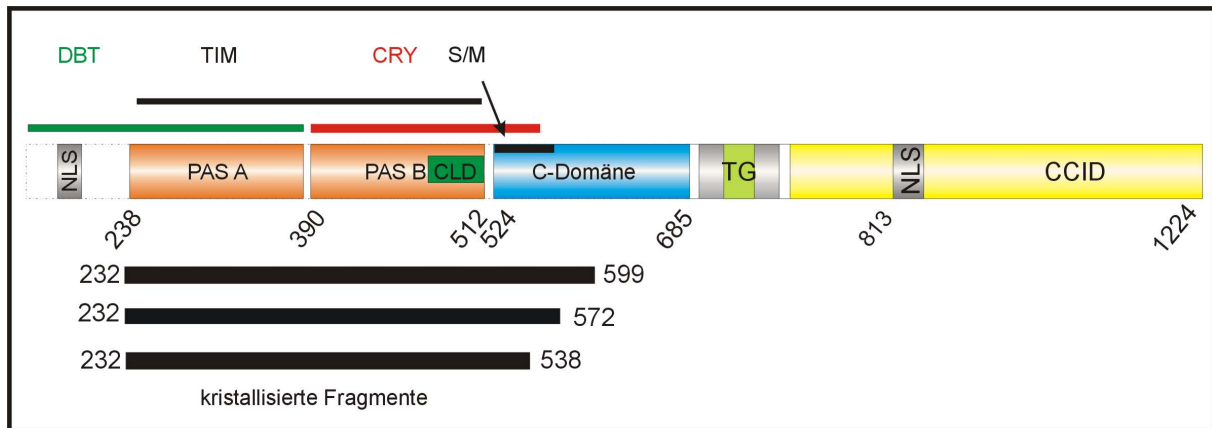


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von dPERIOD. In der Zeichnung ist die Lage der PAS-Domänen dargestellt sowie die Bindungsstellen von DBT, TIM und dCRY. Des Weiteren sind die Kernlokalisationssignale (NLS) sowie die zytosolische Lokalisationsdomäne (CLD), die CLK-CYC-Inhibierungsdomäne (CCID) und die TG-Region (Threonin-Glycin-Wiederholungsregion) dargestellt. Ferner ist die S/M-Region (*short-mutable-region*) eingezeichnet. Die kristallisierten Fragmente sind als schwarze Balken gekennzeichnet. Die Zahlen beziehen sich auf die Nummern der Aminosäuren.

1.4.1 Die Röntgen-Struktur des Tandem-PAS-Domänen-Proteins PERIOD

Mittels der Methode der Röntgenkristallographie konnte die Struktur eines PER-Fragments (Aminosäuren 232-599) (Yildiz *et al.*, 2005) ermittelt werden. Das Fragment enthält beide PAS-Domänen A und B (s. Abb. 1.6 a). Auch die Struktur der stark konservierten C-Domäne des Proteins (Aminosäuren 524-599) (Colot *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 1995) konnte teilweise ermittelt werden.

Die Struktur von dPERIOD (dPER) stellt ein Homodimer dar. Dabei interagiert die PAS-A-Domäne von Molekül 1 mit der PAS-B-Domäne von Molekül 2 (s. Abb. 1.6) und umgekehrt. Beide PAS-Domänen zeigen ein fünfsträngiges, antiparalleles β -Faltblatt (β A- β E). Dieses wird einseitig von mehreren α -Helices flankiert (α A- α C). In jedem Monomer sind die PAS-A und die PAS-B-Domäne durch eine kurze Verbindung (Aminosäuren 377-389) miteinander verknüpft. Beide PAS-Domänen haben in etwa die gleiche Orientierung (s. Abb. 1.6 a). Im intramolekularen Interaktionsbereich der PAS-A und der PAS-B-Domäne fassen die Helices α A' und α A'* gegen die Stränge β C, β D und β E sowie Helix α C. Neben den PAS-Domänen weist jedes Monomer zwei lange C-terminale α -Helices (α E und α F) auf, die Teil der konservierten C-Domäne sind und somit eine wichtige Rolle beim zirkadianen Rhythmus einnehmen. Die α E-Helix verläuft dabei parallel zur α C-Helix und bedeckt damit die Kerndomäne von PAS-B. Im Gegensatz dazu zeigt die α F-Helix von der PAS-B-Domäne weg. Die α F-Helix von Molekül 2 zeigt einen Knick und verläuft quer über die β -Faltblattstruktur der PAS-A-Domäne von Molekül 1. Die erweiterte α F-Helix von Molekül 1

bedeckt die PAS-A-Domäne von Molekül 2, eines symmetrieverwandten Dimers im Kristall. Die C-terminal von der α F-Helix gelegenen Aminosäuren 575-599 sind ungeordnet und schließen die S/M-Region (short mutable-Region) ein (Yildiz *et al.*, 2005). Von dem dPER-Fragment 232-572 (dPER Δ S/M) (s. Abb. 1.5) wurde eine ähnliche Struktur gelöst. In der dPER Δ S/M-Struktur zeigt die α F-Helix von Molekül 1 ebenfalls einen Knick wie die α F-Helix von Molekül 2 und bedeckt die PAS-A-Domäne von Molekül 2.

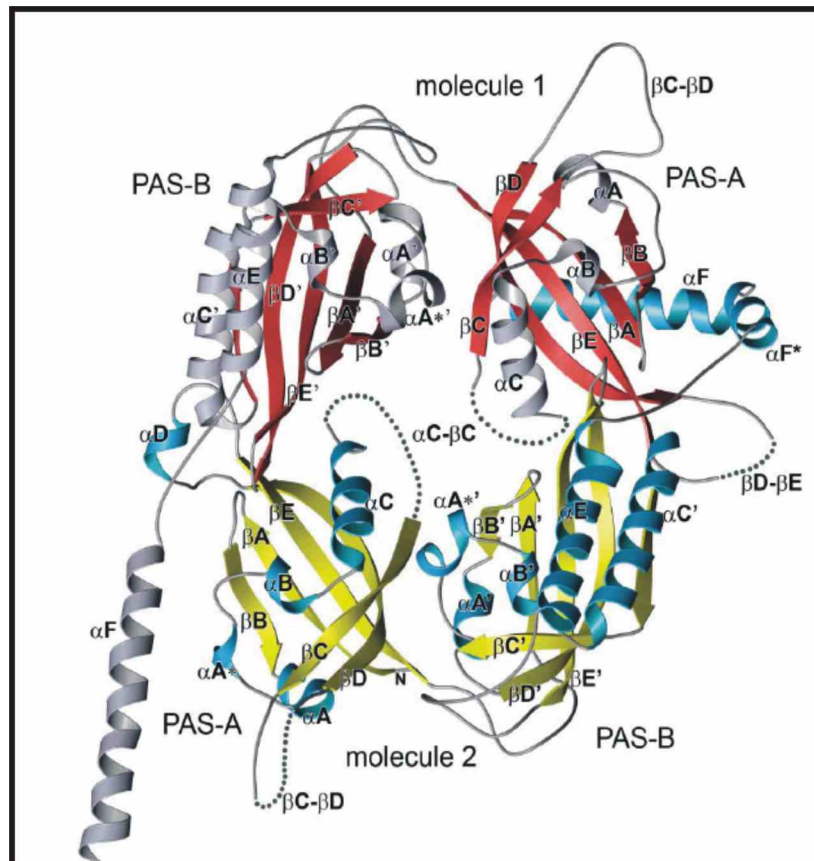


Abb. 1.6 a: Kristallstruktur des dPERIOD-Fragments Aminosäuren 232-599:

Gezeigt ist die Bänderdarstellung des Proteins eines dPER Homodimeren. Molekül 1 ist in den Farben rot und grau dargestellt, Molekül 2 in den Farben gelb und blau. Die Dimerisierung von dPERIOD wird über die PAS-Domänen vermittelt sowie über die am C-Terminus befindliche Helix (α F) eines Moleküls mit der PAS-A-Domäne des anderen Moleküls (Yildiz *et al.*, 2005).

1.4.2 Funktion der PAS-Domänen und der C-terminalen α -Helix (α F) des Uhrenproteins dPER bei der Dimerisierung.

Die PAS-Domänen von dPER sind besonders wichtig für die Dimerisierung des Proteins. Dieses bildet Homodimere aus. Die Dimerisierung wird wie folgt über die PAS-Domänen vermittelt (Yildiz *et al.*, 2005, Zheng *et al.*, 1995). Die PAS-A-Domäne der einen Untereinheit des Proteins interagiert mit der PAS-B-Domäne der zweiten Untereinheit. Die Dimerisierung des Moleküls wird durch die Interaktion der C-terminal gelegenen α -Helix (α F) eines Moleküls mit der PAS-A-Domäne des anderen Moleküls vermittelt. Dabei spielen bestimmte Aminosäuren der PAS-A-Domäne und der α F-Helix eine wichtige Rolle. Beispielsweise führt ein Austausch der Aminosäure Valin (V) 243 zu Aspartat (D) phänotypisch zu einem 29 h Rhythmus in *Drosophila melanogaster*. Ferner ist dieses Ereignis temperaturabhängig (Konopka & Benzer 1971; Gekakis *et al.*, 1995). Diese Mutante wird in der Literatur mit *per^L* (L = *engl. long*) bezeichnet. Die Kristallstruktur des Proteins legt nahe, dass dieses durch Schwächung der Interaktion zwischen der α F-Helix und der PAS-A zu erklären ist. Hefe-II-Hybrid-Studien und Coimmunopräzipitationen unterstützen dieses Modell (Huang *et al.*, 1993 und 1995). Neben der α F-Helix wird das dPER-Dimer durch das Tryptophan 482 stabilisiert. Dieses befindet sich in der β D'- β E'-Schleife der PAS-B-Domäne. Die Seitenkette des Tryptophans 482 ist in die hydrophobe Bindetasche in der PAS-A-Domäne des dimerisierenden Moleküls einbezogen (s. Abb. 1.6.b). Das Tryptophan 482 bildet van der Waals-Kontakte zu den umgebenden hydrophoben Aminosäureresten der PAS-A-Region aus. Ferner bildet sich eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoff der Seitenkette des Tryptophans 482 und der Carbonylgruppe von Glycin 249 aus (s. Abb. 1.6.b). Mittels der Methode der analytischen Ultrazentrifugation konnte der K_D -Wert des kristallisierten Fragments (0,2 μ M) ermittelt werden (persönliche Kommunikation AG Wolf). Ein Austausch der Aminosäure Tryptophan (W) 482 zu Glutaminsäure (E) (s. Abb. 1.7) erhöhte den K_D -Wert auf 4,0 μ M (persönliche Kommunikation AG Wolf). Auch spielen bestimmte Aminosäuren auf der C-terminalen α F-Helix bei der Wechselwirkung mit der PAS-A-Domäne eine entscheidende Rolle. Die Mutation der Aminosäure Met560 zu Aspartat (s. Abb. 1.8) erhöht den K_D -Wert von dPER um den Faktor 30 (persönliche Kommunikation AG Wolf). Diese Mutation scheint die Interaktion der C-terminalen α F-Helix mit der PAS-A-Domäne wesentlich zu beeinträchtigen, da hier eine zusätzliche negative Ladung in den Interaktionsbereich eingeführt wird. Die vollständige Entfernung der C-terminalen α F-Helix führte bei niedrigen Konzentrationen zur Monomerisierung des Moleküls. Bei der analytischen Ultrazentrifugation konnte eine Dimerisierung von PER erst bei einer

Konzentration von 200 μM nachgewiesen werden (persönliche Kommunikation AG Wolf). Dies zeigt, dass die αF für die Ausbildung eines Dimers essentiell ist. Bekannt ist, dass die Interaktion zwischen der αF -Helix und der PAS-A Domäne auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht (Yildiz *et al.*, 2005) (s. Kap. 1.3 u. Abb. 1.6.c). Weiterhin sind die Aminosäuren auf den PAS-Domänen von dPER, die für die Interaktion mit dTIM verantwortlich sind, nicht bekannt.

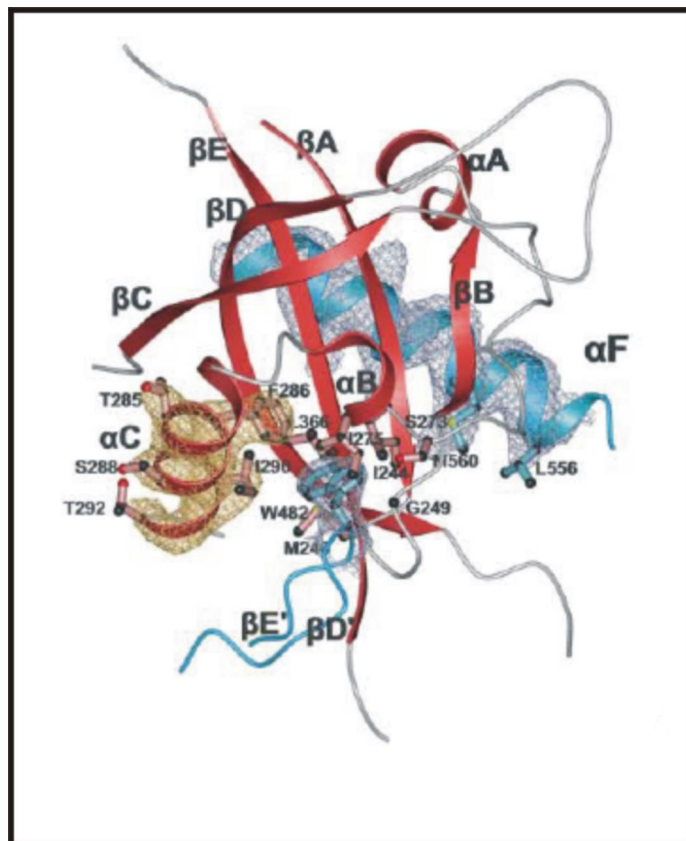


Abb. 1.6.b Die PAS-A-Trp 482 Interaktionsstelle von dPERIOD 232-599.

Die PAS-A-Domäne von Molekül 1 (rot) ist zusammen mit der αF -Helix und dem $\beta\text{D}'$ - E' - β -Schleife mit Trp482 gezeigt. Trp482 (blau), die PAS-A-Reste Ile244, Met246, Gly249, Ser273, Ile275, Phe286, Ile290 und Leu336 umgeben Trp482. Die Reste der Aminosäuren Met560 und Leu556 der αF -Helix sind in blau dargestellt. Die Aminosäurereste Ser285, Thr288 und Ser292 (pink) sind als atomares Stäbchenmodell gezeigt (Yildiz *et al.*, 2005).

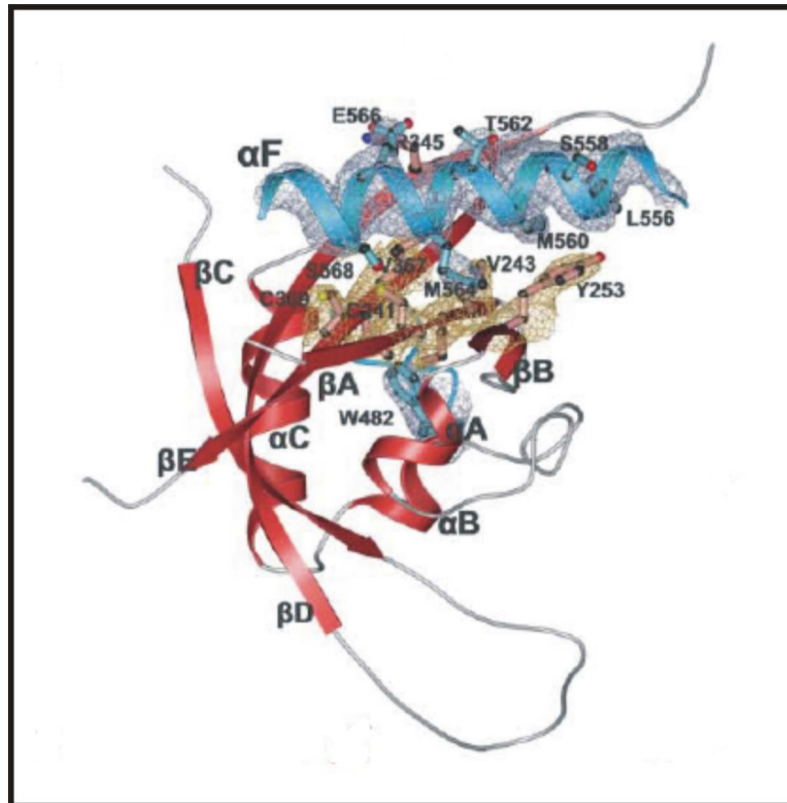


Abb. 1.6.c: Die PAS-A- α F-Interaktionsregion

Valin243, Tyr253, Arg345, Val367, Cys241 und Cys369 der PAS-A Domäne sowie die Aminosäuren Met560, Met564, Ser568, Ser558, Thr562 und Glu366 der α F sind als atomares Stäbchenmodell dargestellt. Val243 und Met560 wurden für die Dimerisierungsstudien mutiert. (Yildiz *et al.*, 2005).

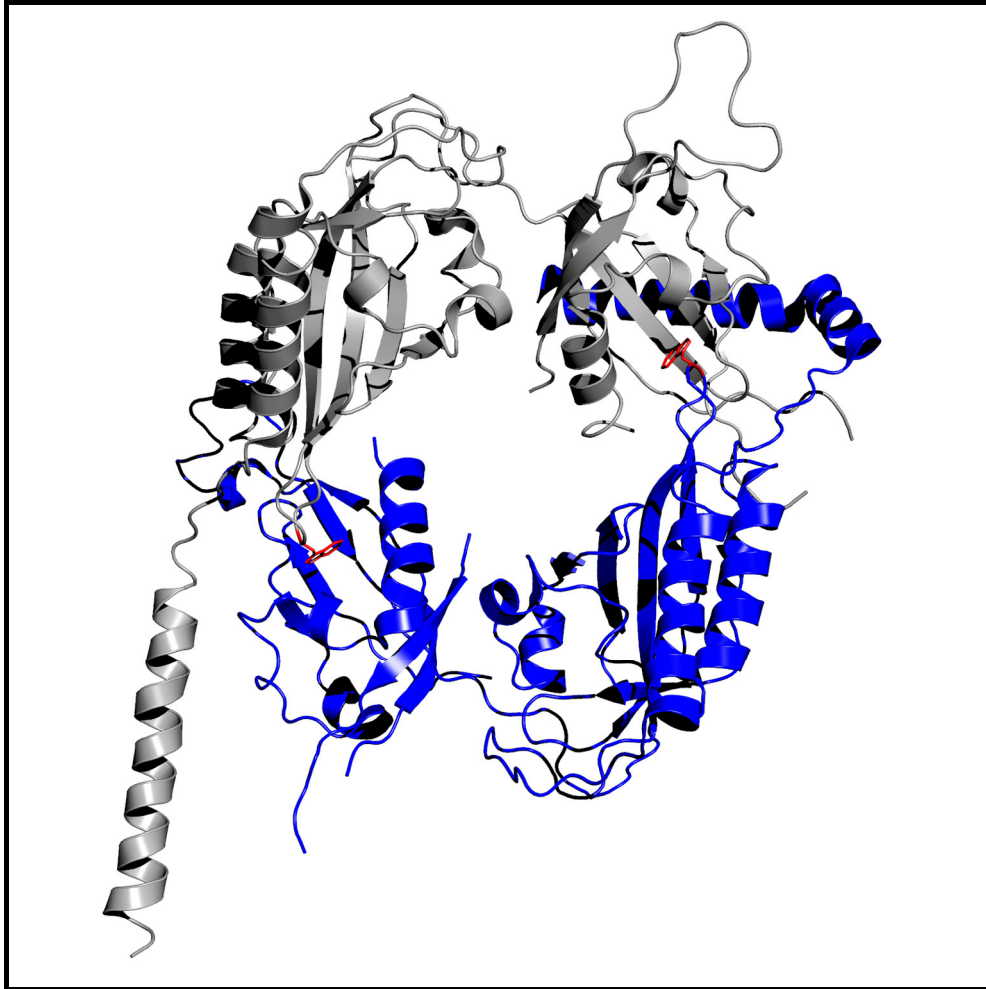


Abb. 1.7 Darstellung der Position Trp482 im dPERIOD-Fragment 232-599

Die Abbildung zeigt das kristallisierte Fragment von dPERIOD 232-599. Die Aminosäure Tryptophan (W) an der Position 482 ist in rot dargestellt und als Stäbchenmodell hervorgehoben. Die Position der Aminosäure befindet sich in dem Bereich der PAS-A-Bindetasche. Das Tryptophan wurde zu Glutaminsäure mutiert, was eine Zunahme des K_D -Wertes um Faktor 10 gegenüber dem Wildtyp zur Folge hat. Molekül 1: grau, Molekül 2: blau (Abbildung erstellt mit Pymol)

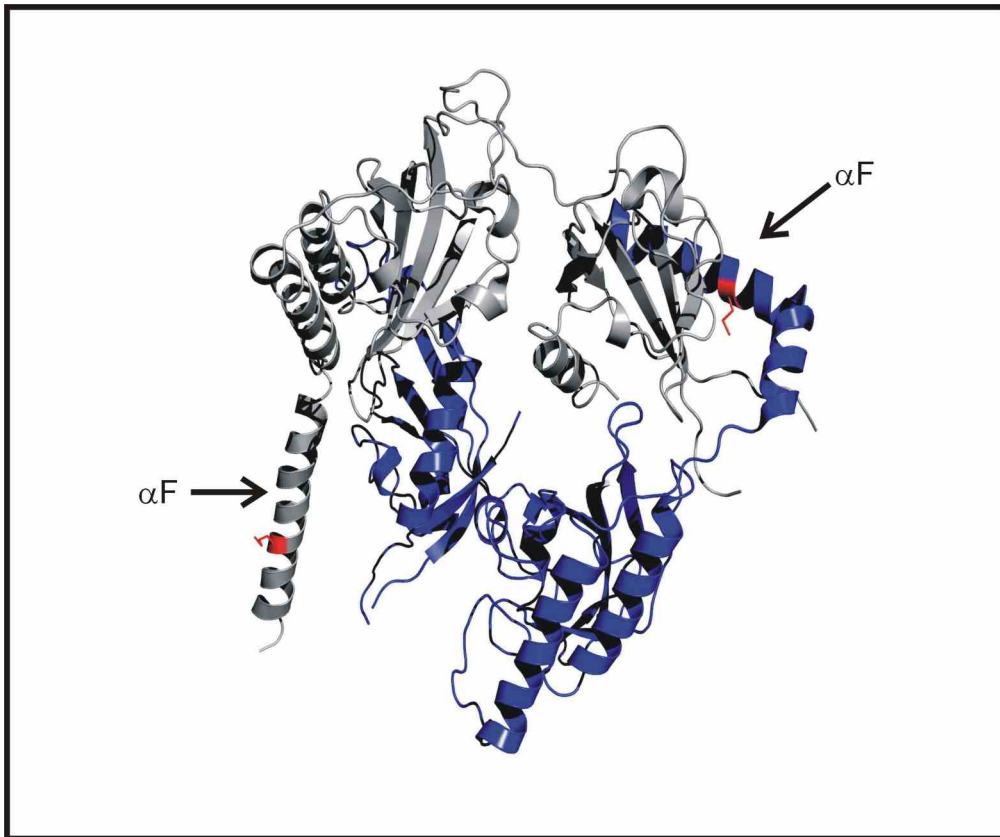


Abb. 1.8: Darstellung der Position Met560 im dPERIOD-Fragment 232-599

Die Abbildung zeigt das kristallisierte Fragment von dPERIOD 232-599. Die Aminosäure Methionin (M) an der Position 560 in der C-terminalen α -Helix (α F) ist in rot dargestellt. Die Aminosäure M560 wechselwirkt mit der PAS-A-Domäne. Das an dieser Position befindliche Methionin wurde zu Aspartat (D) mutiert. Der K_D -Wert des als Dimer vorliegenden Proteinfragments erhöhte sich um Faktor 30 gegenüber dem Wildtyp. Die Veränderung des K_D -Wertes zeigt, dass diese Aminosäure für die Dimerisierung des Moleküls essentiell ist. Molekül 1: grau, Molekül 2: blau (Abbildung erstellt mit Pymol)

1.5. Wechselwirkungen von dPERIOD mit dem Uhrenprotein dTIMELESS

In Kapitel 1.3 wurde dPER als essentieller Interaktionspartner von dTIM beschrieben. Durch Gekakis *et al.*, 1995 konnte der Bindungsbereich kartiert werden, der bei der Interaktion mit dTIM wichtig ist. Dabei wurden verschiedene Fragmente von dPER (233-685; 233-390; 238-490; 530-648) mit zwei Fragmenten von dTIM (92-922 und 505-1155) im Hefe-II-Hybrid-System untersucht (s. Abb. 1.9). Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass der dTIM-Bindungsbereich auf der PAS-A-Region von dPER in den Grenzen von 233-390 liegen musste (Gekakis *et al.*, 1995). Durch weitere Versuche konnten schließlich die Aminosäuren 233-365 als Bindungsbereich kartiert werden. Dieser Bereich konnte (Yildiz *et al.*, 2005) in der Kristallstruktur als PAS-A-Domäne identifiziert werden. Bei der Interaktion von dTIM und dPER wird die CLD-Domäne (zytosolische Lokalisationsdomäne) von dPER (Aminosäuren 452-512) verdeckt, gleichzeitig aber die nukläre Lokalisationsdomäne (NLS)

zugänglich. Dies legte einen weiteren Bindungsbereich von dPER an dTIM nahe (Voshall *et al.*, 1994). Der weitere dTIM-Bindungsbereich von dPER konnte auf der CLD-Region lokalisiert werden (Saez *et al.*, 1996). Ferner wurde gezeigt, dass die Aminosäuren 715-914 von dTIM an der Interaktion mit der CLD-Domäne, die Aminosäuren 505-578 von dTIM an der Interaktion mit der PAS-A-Domäne von dPER beteiligt sind (s. Abb.1.10). Dies wurde durch Interaktionstests herausgefunden (Saez *et al.*, 1996). Dabei wurden verschiedene Fragmente von dPER als GST-Fusion an eine Matrix gekoppelt und mit diversen S^{35} -markierten dTIM-Fragmenten inkubiert und anschließend durch SDS-PAGE und Autoradiographie detektiert (s. Abb. 1.11).

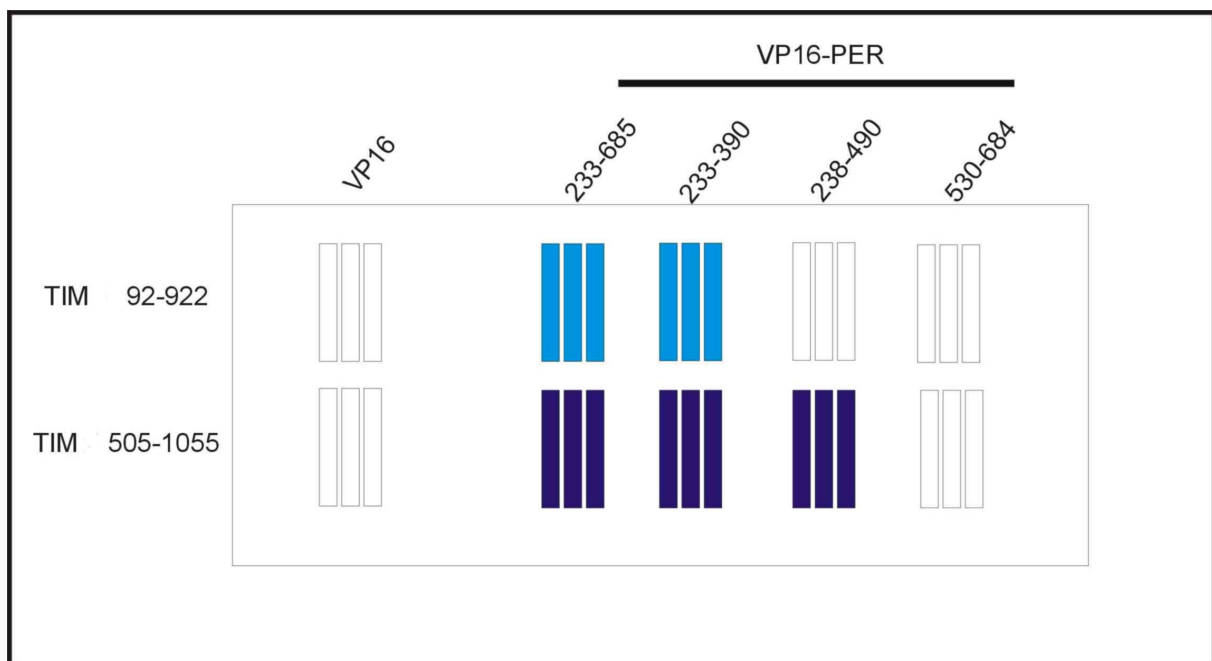
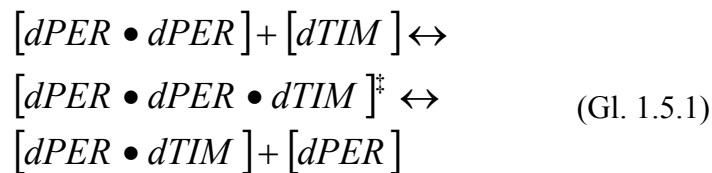


Abb.1.9 Schematische Darstellung der Ergebnisse der Hefe-II-Hybrid-Studien mit verschiedenen dPER-Fragmenten und den dTIM-Fragmenten 92-922 und 505-1155 zur Kartierung des Bindungsbereichs auf dPER nach Gekakis *et al.* (1995). Die Negativkontrolle (VP16 mit den entsprechenden dTIM-Fragmenten) zeigt weder Wachstum noch eine β -Galaktosidase-Aktivität (Indikator für Interaktion). Bei einer Bindung von dPER 233-685 an TIM 92-922 zeigt sich eine schwache, bei der Bindung des gleichen Fragments an dTIM 505-1055 eine starke Interaktion. Das Fragment 233-390 weist eine schwache Interaktion mit dTIM 92-922 und eine starke Interaktion mit dTIM 505-1055 auf. dPER 238-490 zeigte keine Interaktion mit dTIM 92-922, mit dTIM 505-1055 war eine starke Interaktion erkennbar. Das dPER-Fragment 530-648 interagiert mit keinem der beiden dTIM-Fragmente. Somit wurde der dTIM-Bindungsbereich auf dPER den Aminosäuren 233-390 zugeordnet. Eine starke β -Galaktosidase-Aktivität und somit eine starke Bindung ist durch dunkelblaue, eine schwache durch hellblaue Farbe der Kolonien dargestellt. Das Fehlen der Interaktion von dPER 238-490 mit dTIM 92-922 ist auffällig, da fast beide für die Interaktion notwendigen PAS-Domänen vorhanden sind. Ferner sind auch alle dPER-Bindungsbereiche auf dem dTIM-Fragment vorhanden.

Strukturelle Informationen zeigen jedoch, dass der auf der PAS-A-Domäne befindliche Bindungsbereich für dTIM (233-365) (Gekakis *et al.*, 1995) durch die C-terminale α F-Helix verdeckt wird (Yildiz *et al.*, 2005). Ein Verlust der C-terminalen α F-Helix führt jedoch zum Zerfall des Homodimers bei Konzentrationen unter 200 μ M (persönliche Kommunikation AG Wolf). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde für die Interaktion von dTIM mit dPER die Hypothese entwickelt, dass die C-terminale α -Helix (α F) von dPER bei der Bindung von dTIM entweder verdrängt und somit der Bindungsbereich auf der PAS-A Domäne von dPER zugänglich wird, oder aber für die Bindung von dTIM nötig ist. Dabei wird dPER nun in seiner monomeren Form durch die Interaktion mit dTIM stabilisiert (s. Abb. 1.10) Diesem Modell liegt folgende Theorie zu Grunde (Gl. 1.5.1):



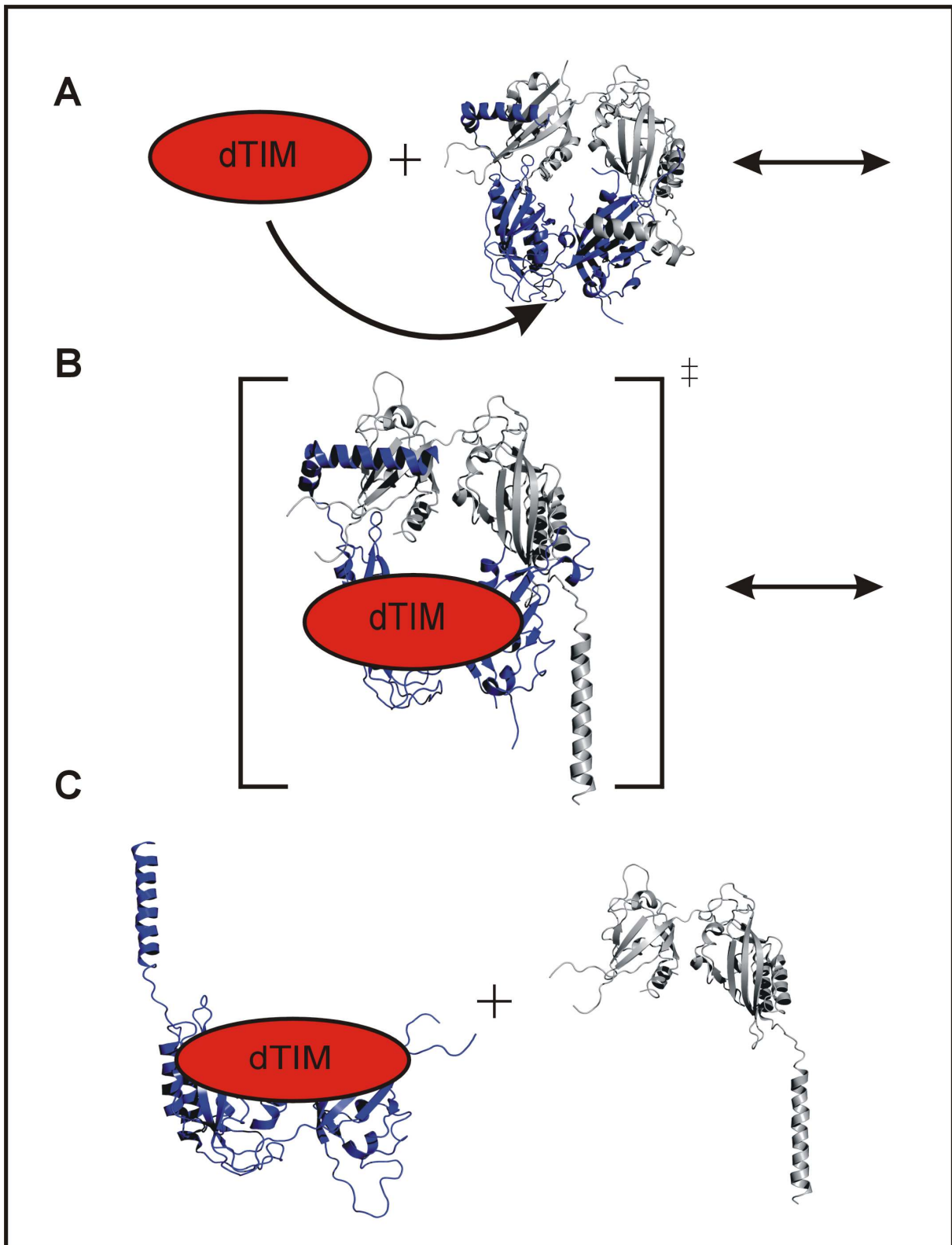


Abb. 1.10: Bindungshypothese von dTIM an die PAS-Domänen von dPER

A: Durch die beiden α -Helices liegt dPER als Dimer vor. B: dTIM verdrängt die C-terminale α F von dPER, sodass die PAS-A-Domäne für die Bindung frei wird. C: Gleichzeitig interagiert dTIM mit der weiteren Bindungsstelle auf der CLD-Domäne. An Stelle der α -Helices stabilisiert nun dTIM die monomere Struktur von dPER. Für dieses Modell wurden die Strukturen der Untereinheiten von dPER₂₃₂₋₅₉₉ und von dPER Δ S/M verwendet. Molekül 1 grau, Molekül 2 blau. (Abbildung erstellt mit Pymol).

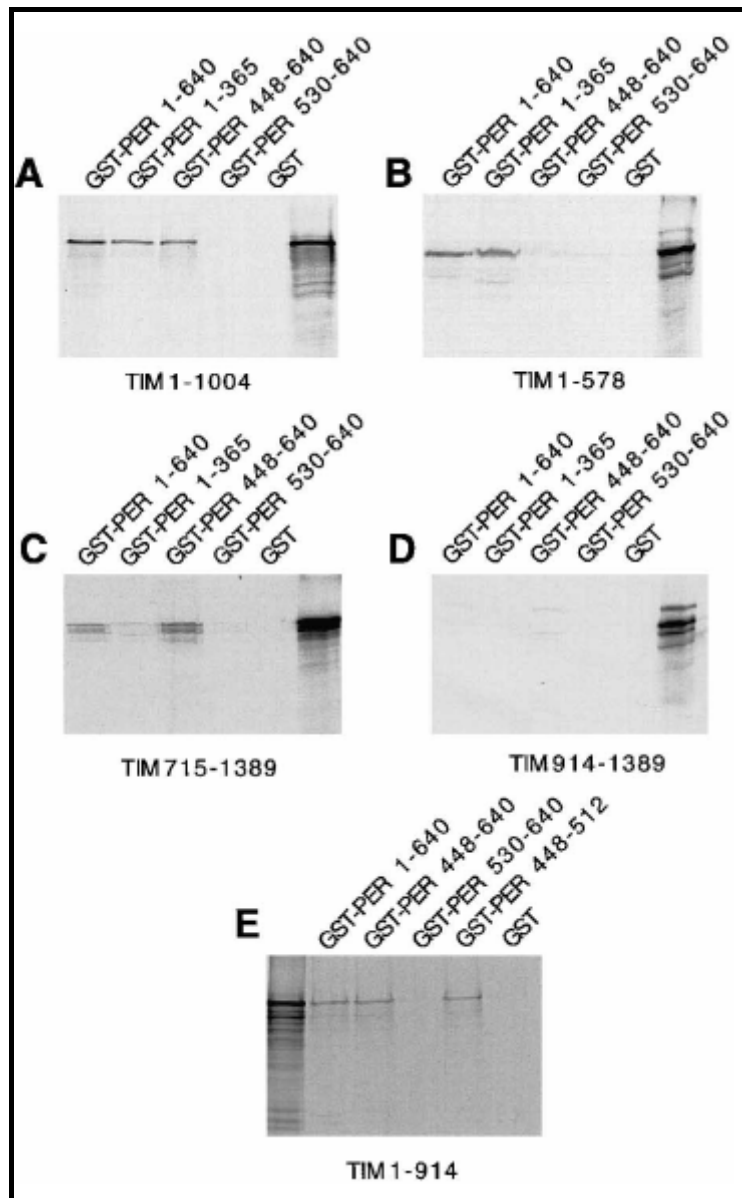


Abb.1.11 Interaktionstests von GST-fusionierten dPER Fragmenten mit verschiedenen Fragmenten von dTIM. Verschiedene dPER-Fragmente (s. Abb.) wurden mit S^{35} -markierten dTIM-Fragmenten unterschiedlicher Länge zur Interaktion gebracht und durch SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht. Das Ergebnis zeigt einen weiteren dTIM Interaktionsbereich von dPER im Bereich von Aminosäure 453-511. Der Bereich der Aminosäuren 715-914 von dTIM ist an der Bindung beteiligt. Dieser entspricht dem Bereich der Kernlokalisationsdomäne (CLD) von dPER (Saez *et al.*, 1996).

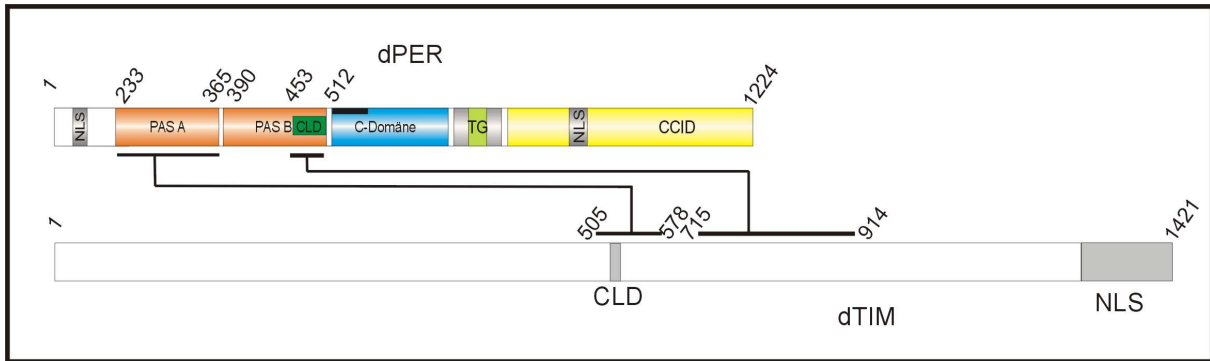


Abb. 1.12: Übersicht über die Bindungsbereiche von dTIM und dPER

dPER verfügt über zwei Bindungsbereiche für dTIM. Der erste dTIM-Bindungsbereich von dPER befindet sich in der PAS-A-Region. Hier interagieren die Aminosäuren 233-365 mit dem Bereich 505-578 von dTIM. Ein weiterer Bindungsbereich befindet sich bei dPER in der PAS-B-Region. Hier sind die Aminosäuren 453-512 an der Interaktion mit den Aminosäuren 715-914 von dTIM beteiligt.

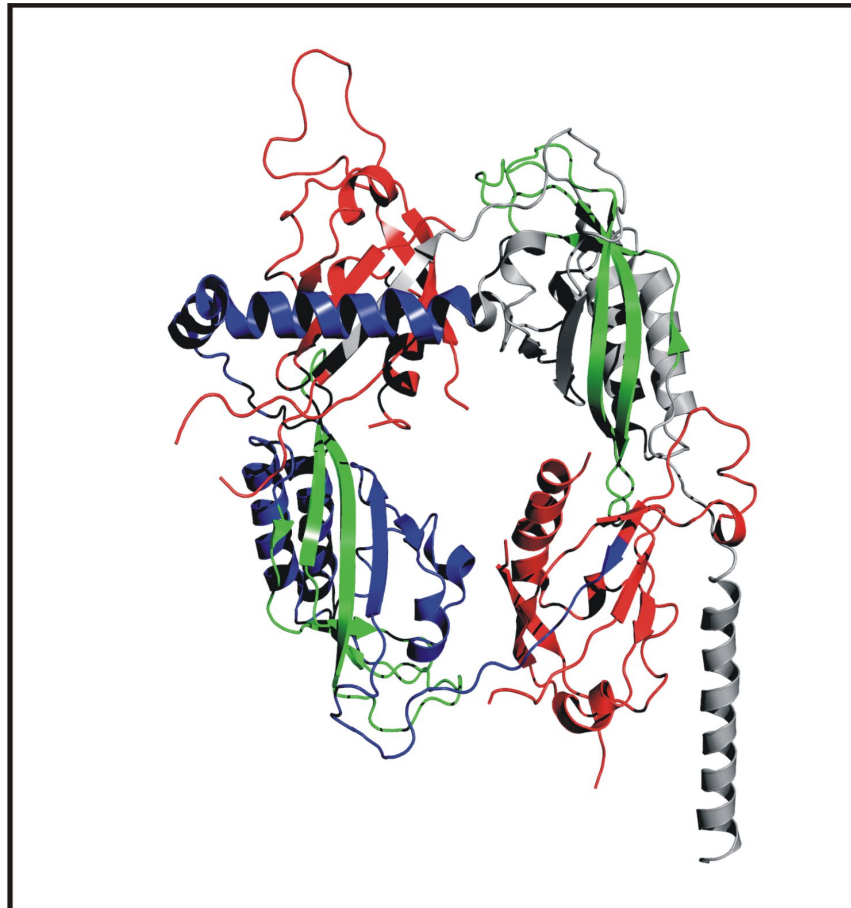


Abb. 1.13: Übersicht über die hypothetischen dTIM-Bindungsbereiche von dPER 232-599

Dargestellt ist die Struktur von dPER 232-599. Die Bindungsstelle auf der PAS-A 233-365 Region ist in rot dargestellt, die Bindungsstelle auf der CLD-Region 453-511 ist in grüner Farbe markiert. Molekül 1: grau, Molekül 2:blau (Abbildung erstellt mit Pymol)

Zielsetzung:

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die intramolekularen Wechselwirkungen von dPER sowie über die Vorgänge bei der Bindung des Interaktionspartners dTIM zu gewinnen. Dazu sollte zunächst die genetische Information des dPER-Fragments 538-576 (α F-Helix) kloniert, exprimiert und schließlich das Genprodukt gereinigt werden. Mit dem erhaltenen Proteinfragment sollten Bindungsstudien mit der PAS-A-Region von dPER durchgeführt werden. Ferner war die Ermittlung der Bindungskinetik ein Ziel dieser Arbeit. Als Methoden waren die ITC und die Oberflächen-Plasmon-Resonanz vorgesehen.

In einem weiteren Projekt sollte die Kinetik der Homodimerisierung von dPER ermittelt werden. Hierfür wurden sowohl der dPER-Wildtyp als auch diverse Mutanten untersucht. Die K_D -Werte der Homodimerisierungsreaktionen sind bereits aus Experimenten mit der analytischen Ultrazentrifugation bekannt. Durch die Methode der Fluoreszenzspektroskopie und der Polarisation sollten die Werte der Dissoziationskonstante (k_{off}) ermittelt werden. Zudem galt es innerhalb dieses Projektes, eine weitere Methode zur Ermittlung und Reproduktion der K_D -Werte zu etablieren.

Eine weitere Zielsetzung war es, die Bindung von dTIM an dPER unter Verwendung des Hefe II-Hybrid-Systems genauer zu untersuchen. Dabei sollte die Rolle der α F-Helix von dPER bei der Interaktion mit dem Bindungspartner dTIM geklärt werden. Durch spezifischen Austausch von Aminosäuren der PAS-A-Domäne von dPER bestand die Aufgabe, deren Relevanz bei der Bindung mit dTIM herauszufinden.

2. Material

2.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius (Göttingen)
Brutschrank	Biotron (Hilden)
DNA-Gelelektrophoresekammern	Werkstatt MPI Dortmund
Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax-2)	ISA Instruments (Stanmore, UK)
Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax-3)	ISA Instruments (Stanmore, UK)
FPLC	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Falkon-Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen)
Inkubator	HAT Infors GmbH (Überlach Palenberg)
Leuchttisch	Faust (Schaffhausen, CH)
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikrofluidizer	Microfluidics (Newton, USA)
PCR-Gerät Mastercycler	Eppendorf (Hamburg)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Rotoren (JA 10-17)	Beckman (München)
Spannungsquellen (Power Pac 300)	BioRad (München)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
UV/Vis-Spektralphotometer	UVIKON 933 Kontron (Neufahrn)
Ultraschallgerät (450)	Branson
Sequenzierer (ABI PRISM 3700)	Applied Biosystems (Langen)
Zentrifugen (J2-HC, J2-HS und Avanti30)	Beckman (München)
Minigel-System	Biorad (München)
Filme	Fuji-Film (Tokyo)
Konzentratoren	Amicon (XXX)
BIAcore 1000-Gerät	BIAcore AB, Uppsala, Schweden

2.2 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Aldrich (Steinheim), Amersham-Pharmacia (Freiburg), Applichem (Düsseldorf), Baker (Deventer, Niederlande), Fluka (Neu-Ulm), GEBRU (Gaiberg), Hampton Research (Laguna Niguel, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Genomed (Bad Oeynhausen), Merck (Darmstadt), Pharma Waldhof (Düsseldorf), Quiagen (Hilden), Riedel-

de-Haën (Seelze), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) sowie Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.3 Enzyme

DNase I	Roche (Mannheim)
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen (Hilden)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach)
Trypsin	Sigma (Deishofen)
PreScission-Protease	eigene Herstellung
Lysozym	Sigma (Deishofen)

Tabelle 2.3.1: Verwendete Restriktionsenzyme

Name	Sequenz
<i>Bam</i> H1	G↓GATCC
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG

2.4 Reagenzienkits und Größenstandards

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAgen Midiprep Kit	Qiagen (Hilden)
Genomed Gel Extraction Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Genomed Maxiprep Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Phusion Mutagenesis Kit	New England Biolabs (Schwalbach)

Tabelle 2.4.1.1: Verwendete SDS-PAGE Größenstandards

Name	Größen/kDa
6M ¹	116; 97,6; 66; 45; 36; 29; 24
7M ¹	66; 45; 36; 29; 24; 20,1; 14,2
M7+6 ¹	205; 116; 97,6; 66; 45; 36; 29; 24; 20,1; 14,2
<i>Prestained</i> ¹	175; 83; 62; 47,5; 32,5; 25; 16,5; 6,5

¹Sigma (Deisenhofen)

Tab. 2.4.1.2: Verwendete DNA-Größenstandards

Name	Größen/bp
1 kb Leiter¹	10000; 8000; 6000; 5000; 4000; 3000; 2500; 2000; 1500; 1000; 750; 500
100 bp Leiter²	1000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100

¹ Genecraft (Lüdinghausen) ² Invitrogen (Karlsruhe)

2.5 Verwendete Säulenmaterialien

Gluthation-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Superdex 200	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Superdex 75	Amersham Pharmacia (Freiburg)
Ni ²⁺ -NTA Agarose	Qiagen (Hilden)
Amylose-Harz	New England Biolabs (Schwalbach)
ECL plus Western Blotting Detection System	Amersham Pharmacia (Freiburg)

2.6 Verwendete Pufferlösungen

2.6.1 Verbrauchslösungen

TAE-Puffer (1x)

Tris-Acetat (pH 8,3)	40 mM
EDTA	0,5 mM

SDS-PAGE-Laufpuffer

Tris-HCl pH 8,8	25 mM (30 g)
Glycin	192 mM (140 g)
SDS	0,1 % (m/v)

DNA-Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Saccarose	40% (w/v)
Glycerin	50%

SDS-PAGE Probenpuffer (4x)

Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
Glycerin	10% (v/v)
SDS	3% (w/v)
β-Mercaptoethanol	8% (w/v)
Bromphenolblau	1 Spatelspitze

2.6.2 Lösungen zur Reinigung von Proteinen mit Hexahistidin-Fusionsanteil

Lysepuffer

Imidazol	10 mM
NaCl	300 mM
Tris-HCl	50 mM
pH	8,0

Elutionspuffer

Imidazol	500 mM
NaCl	300 mM
Tris-HCl	50 mM
pH	8,0

2.6.3 Lösungen zur Reinigung von Proteinen mit GST-Rest

Lysepuffer für GST-Proteine

NaCl	400 mM
Tris-HCl	50 mM
β -Mercaptoethanol	14 mM
EDTA	1 mM
Glycerol	5%
pH	7,7

Wasch-Puffer für GST-Proteine

NaCl	200 mM
Tris-HCl	50 mM
β -Mercaptoethanol	14 mM
Glycerol	5%
pH	7,7

ATP-Puffer

NaCl	200 mM
Tris-HCl	50 mM
β -Mercaptoethanol	14 mM
ATP	1 mM
MgCl ₂	10 mM
Glycerol	5%
pH	7,7

Gluthation-Puffer

NaCl	200 mM
Tris-HCl	50 mM
β -Mercaptoethanol	14 mM
Gluthation	20 mM
Glycerol	5%
pH	7,7

2.6.4 Allgemeine Lösungen zur Proteinreinigung und Charakterisierung

Laufpuffer für die Größenausschluss-Chromatographie

NaCl	200 mM
HEPES	25 mM
DTE	2 mM
pH	7,7

Matrix für MALDI-TOF

TFA 0,1%	50%
Acetonitril	50%
Sinapinsäure	1 Spatelspitze

Hochsalzpuffer für matrixunterstützte Interaktionstests zur Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen

NaCl	500 mM
Hepes	25 mM
DTE	2 mM
Glycerol	5%
pH 7,7	

Lösungen zur Westernblotanalyse

TG-Puffer 1x

Tris	25 mM
Glycin	0,2 mM
Methanol	2%

TBS-Lösung 10x

Tris-HCl	100 mM
NaCl	1,5 mM
pH 7,3	

TBS-Lösung 1x

Tris-HCl	100 mM
NaCl	1,5 mM
pH 7,3	

TBS-T-Lösung 1x

Tris-HCl	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	1%

2.7 Verwendete Antikörper

Tab. 2.7.1 Übersicht über verwendete Antikörper

Anti-GST	IgG aus Maus	1:2000	Amersham Pharmacia
Anti-Maus	IgG aus Kaninchen HRP gekoppelt	1:10000	Sigma

2.8. Verwendete Antibiotika

Tab. 2.8.1 Übersicht über verwendete Antibiotika

	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg/µl
Chloramphenicol	25 mg/µl
Kanamycin	50 µg/µl

2.9 Verwendete Medien

2.9.1 Medien zur Anzucht von Bakterien:

LB-Medium:

(Luria-Bertani-Medium)

Bacto-Trypton	12 g/L
NaCl	10 g/L
Baktopepton	10 g/L
pH 7,5 eingestellt mit NaOH	
Hefeextrakt	5 g/L

TB-Medium

Terrific Broth	
Hefeextrakt	24 g/L
pH 7,5	
Glycerin	0,4 % (v/v)
KH ₂ PO ₄	2,31 g/L
K ₂ HPO ₄	12,54 g/L

LB-Agarose-Platten

Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Bacto Agar	15 g

Autoklavieren

Anschließend Zugabe von Antibiotika

2.9.2 Medien zur Anzucht von Hefen

YPD-Medium

Pepton	2 % (w/v)
Hefe-Extrakt	1 %
Glukose	2 % (w/v)

SD-Ura-His,-Trp-Platten

YNB	6,7 g
20x Aminosäuremix	5 ml
Adenin (4mg/ml)	1 ml
L-Lysin (15mg/ml)	0,2 ml
Glukose (20%)	10 ml
Agar	2 g
ddH ₂ O	ad 100 ml

Aminosäuremix (20x)

L-Arginin	0,5 mg/ml
L-Aspartat	2,5 mg/ml
L-Glutamat	2,5 mg/ml
L-Methionin	0,5 mg/ml
L-Prolin	0,2 mg/ml
L-Phenylalanin	1,25 mg/ml
L-Serin	9,4 mg/ml
L-Threonin	5,0 mg/ml
L-Tyrosin	0,75 mg/ml
L-Valin	2,75 mg/ml

SD –Ura, –His, –Trp, -Leu-Platten

20x Aminosäuremix	5 ml
Adenin (4mg/ml)	1 ml
L-Lysin (15mg/ml)	0,2 ml
Glukose (20%)	10 ml
Agar	2 g
ddH ₂ O	ad 100 ml

SGal –Ura, -His, -Trp, -Leu-Platten

YNB	6,7 g
20x Aminosäuremix	5 ml
Adenin (4mg/ml)	1 ml
L-Lysin (15mg/ml)	0,2 ml
Galaktose (20%)	10 ml
Raffinose (20%)	10 ml
Agar	2 g

SD/Xgal –Ura, –His, –Trp-Platten

20x Aminosäuremix	5 ml
Adenin (4mg/ml)	1 ml
L-Lysin (15 mg/ml)	0,2 ml
L-Leuzin (15 mg/ml)	0,4 ml
Glukose (20%)	10 ml
Xgal (20 mg/ml, in DMF)	
Phosphat-Puffer (20x)	5 ml
Agar	2 g
ddH ₂ O	ad 100 ml

SGal /Xgal –Ura, -His, -Trp-Platten

YNB	6,7 g
20x Aminosäuremix	5 ml
Adenin (4mg/ml)	1 ml
L-Lysin (15mg/ml)	0,2 ml
Galaktose (20%)	10 ml
Raffinose (20%)	10 ml
Agar	2 g

Phosphatpuffer (20x) pH 7,0; Angaben für 200 ml

Na₂HPO₄x₂H₂O 18,6 g

Na₂H₂PO₄x₂H₂O 13,6 g

YPD-Platten

zu YPD-Medium (s. Kap. 2.9.2)

2% Agar hinzufügen

2.10 verwendete Mikroorganismen und Zellen

weitere Lösungen für die Arbeiten mit Hefen sind unter 3.2.5 aufgeführt.

2.10.1 verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
TG1	<i>K12, supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB), F'[traD36, proAB⁺, lacI^f, lac ZΔM15]</i>	Promega, Mannheim
BL21(DE3)	<i>B, F⁻ hsdSB (rB⁻, mB⁻) gal dcm ompTλ(DE3)</i>	Novagen, Schwalbach
BL21Rosetta	<i>F⁻ ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm lac (DE3) pRARE (Cm^R)</i>	Stratagene

2.10.2 verwendete Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Quelle
EGY 48	<i>MATa, trp1, his3, ura3, 6ops-LEU2</i>	(Invitrogen, Karlsruhe)
EGY 191	<i>MATa, trp1, his3, ura3, 6ops-LEU2</i>	(Invitrogen, Karlsruhe)

2.11 Verwendete Oligonukleotide

2.11.1 Verwendete Oligonukleotide für die Einführung von Mutationen

Bezeichnung

dPER_V243D_s: 5' -GCTTCTGCGACATCTCCATGCAC-3'

dPER_V243D_as: 5' -GTGCATGGAGATGTTCGCAGCAGAAGC-3'

dPER_V367D_C369R_s: 5' -CACCAACATGCTGCTCGACATCCGCGCCACTCCGA
TCAA-3'

dPER_V367D_C369R_as: 5' -CTTGATCGGAGTGGCGCGGATGTTCGAGCAGCATGT
TGGTG-3'

dPER_E494R_s: 5' -CCTTCTGGAGACCAGATGGACCAGCTTCG-3'

dPER_E494R_as: 5' -CGAAGCTGGTCCATCTGGTCTCAAGAAGG-3'

dPER_H492S_R494D_s: 5' -GAATTTGTCGTCGGAAGCCATGACGTCTTTCAGGG
AC-3'

dPER_H492S_R494D_as: 5' -GTCCCTGAAAGACGTCATGGCTTCCGACGACAAATT-3'

2.11.2 verwendete flankierende Oligonukleotide

Bezeichnung

dPER_G232_EcoRI_s: 5' -CGTAGAATTTCGGGGAGCGGGTGAAGGAG-3'
dPER_V538_XhoI_as: 5' -CCGCTCGAGTCACACCGTCTCCGCCAGGC-3'

2.11.3 Oligonukleotide für inverse PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Mutationen

Bezeichnung

dPER_V243D_as: 5' -TGTCTTCCTTCACCCGCTC-3'
dPER_E494R_as: 5' -ACGTAGCAACCGTTCTGGAT-3'
dPER_H492S_R494D_as: 5' -CAGCTTGCGGGACCATGGA-3'

2.11.4 Oligonukleotide zur Amplifikation des Fragments *dper* 538-576

Bezeichnung

dPER α F_BamHI_s: 5' -CAGTGGATCCGTGTCCCGTCCGTCGGAA-3'
dPER α F_EcoRI_as: 5' -CGTAGAATTCTCACAGCTCCAGCTTGAGATCC-3'

2.12 verwendete Vektoren

Bezeichnung

Beschreibung

pJG 4-5	<i>amp^R</i> -Vektor für Hefe-II-Hybrid-Studien <i>trp</i> , <i>leu</i>
pEG 202	<i>amp^R</i> -Vektor für Hefe-II-Hybrid-Studien <i>his</i>
pSH18-34	Helferplasmid für Hefe-II-Hybrid-Studien <i>ura</i>
pGEX-6p2	Expressionsvektor für GST fusionierte rekombinante Proteine
pET-28a-TEV	Expressionsvektor für rekombinante Proteine mit

2.13 verwendete Konstrukte

Tab. 2.13.1: Übersicht über alle verwendeten Konstrukte

Name	Schnittstellen	Vektor	Quelle
<i>dper232-538</i>	<i>EcoRI / XhoI</i>	<i>pGEX-6p2</i>	Sven Hennig
<i>dper232-538</i>	<i>EcoRI / XhoI</i>	<i>pJG 4-5</i>	Sven Hennig
<i>dper232-572</i>	<i>EcoRI / XhoI</i>	<i>pJG 4-5</i>	Sven Hennig
<i>dtim481-908</i>	<i>EcoRI / XhoI</i>	<i>pEG 202</i>	Sven Hennig
<i>dper232-599W482E</i>	<i>EcoRI / XhoI</i>	<i>pGEX-6p2</i>	Sven Hennig
<i>dper232-599M560D</i>	<i>EcoRI / XhoI</i>	<i>pGEX-6p2</i>	Sven Hennig
<i>dper232-599M560D W482E</i>	<i>EcoRI / XhoI</i>	<i>pGEX-6p2</i>	Sven Hennig
<i>dper 538-576</i>	<i>EcoRI / BamHI</i>	<i>pGEX-6p2</i>	diese Arbeit
<i>dper 538-576</i>	<i>EcoRI / BamHI</i>	<i>pET- 28a-TEV</i>	diese Arbeit
<i>dper232-538V367DC369R</i>	<i>EcoRI / XhoI</i>	<i>pJG 4-5</i>	diese Arbeit

3.0 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung von Plasmid DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die Plasmid Mini-, Midi- und Maxiprepsysteme der Firma Qiagen verwendet. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip der Isolierung der DNA beruht auf dem System der alkalischen Zell-Lyse mit anschließender Fällung der Proteine durch KOAc/SDS. Die Reinigung der Plasmid-DNA aus dem Überstand der Fällung erfolgte mittels Anionenaustauscherchromatographie.

3.1.2 Bestimmung der Konzentration von DNA

Die Konzentration und Reinheit von DNA erfolgte durch Vermessung der Probe mit einem Photometer (Firma Eppendorf). Die Konzentration der DNA-Lösung wurde über das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Der Konzentrationswert errechnet sich anhand des Absorptionswertes bei 260 nm auf der Grundlage, dass die OD_{260} 1 beträgt, wenn die DNA-Lösung eine Konzentration von 50 µg/ml hat. Bei Proteinen sind die aromatischen Aminosäuren für eine Absorption bei 280 nm verantwortlich. Über das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} lässt sich eine Aussage über die Kontamination der Probe mit Proteinen erhalten (Aasubel *et al.*, 1995). Liegt eine reine DNA-Lösung vor, so beträgt der Quotient 1,8-2,0.

3.1.3 Trennung von DNA in Agarosegelen

DNA-Moleküle wandern auf Grund ihrer negativen Ladung im Deoxyribose-Phosphat-Rückgrat im elektrischen Feld zur Anode. Dabei ist die Geschwindigkeit der Wanderung der DNA dem Logarithmus ihrer Größe proportional. Das hier beschriebene Verhalten ermöglicht es, DNA-Fragmente ihrer Größe nach in einem Agarosegel zu trennen. Weitere wichtige Parameter für die Wanderung sind die Stromstärke, die Pufferbedingungen, der pH-Wert und die Konzentration der Agarose im Gel. Zur Herstellung der verwendeten Agarosegele wurde abgewogene Agarose in 100 ml 1 x TAE Puffer (s Kap. 2.6.1) aufgekocht und nach dem Erstarren ebenfalls mit 1 x TAE Puffer bedeckt. Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/6 Volumen des DNA-Gel-Ladepuffers versetzt und in die Taschen im Gel pipettiert. Die im Gel getrennte DNA wurde in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und schließlich unter UV-Licht sichtbar gemacht. Alle Gele wurden photographisch dokumentiert.

3.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach erfolgter Agarosegelelektrophorese wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem Gelextraktionskit der Firma Genomed nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das Prinzip der Reinigung ist hier die Anionenaustauscher-Chromatographie. Die Elution erfolgte mit 2x 15 µl warmem ddH₂O.

3.1.5 Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction / PCR)

Die Methode der PCR ermöglicht eine selektive Vervielfältigung (Amplifikation) eines DNA-Abschnitts. Dabei ist lediglich Voraussetzung, dass die Enden des Abschnitts bekannt sind. Die Kenntnis dieser Sequenzen ist deshalb notwendig, um kurze Oligonukleotide zu konstruieren, die sich spezifisch an diese Sequenzen anlagern. An diesen Oligonukleotiden beginnt die DNA-Synthese. Gleichzeitig wird der Bereich der DNA-Synthese durch die Oligonukleotide begrenzt. Die einzelnen Schritte der PCR können in Denaturierung, Annealing und Elongation aufgeteilt werden. Bei der Denaturierung werden zunächst bei einer Temperatur von 96°C die beiden DNA-Doppelstränge voneinander getrennt. Im nächsten Schritt, dem Annealing, lagern sich die Oligonukleotide an ihre komplementären Sequenzen an. Die Temperatur, bei der sich die Oligonukleotide an ihre entsprechenden komplementären Sequenzen anlagern, wird als Annealing-Temperatur bezeichnet und ist abhängig von der Sequenz der Oligonukleotide. Sie kann überschlagsweise mit folgender Formel berechnet werden $T_m = (4 \times [G + C]) + (2 \times [A + T])$ °C. Nach diesem Schritt wird die Temperatur auf das für die eingesetzte DNA-Polymerase Temperaturoptimum erhöht. Dabei beginnt die DNA-Polymerase mit dem Anfügen der Deoxyribonukleotidtriphosphate an das 3'-Ende der Oligonukleotide. Dieser Vorgang wird als Elongation bezeichnet. Die Elongationstemperatur betrug 72°C. Nach dem Abschluss der semikonservativen Replikation begann der Zyklus erneut. Nach 25 Reaktionszyklen wurde ein finaler Elongationsschritt von 10 Min bei 72°C durchgeführt, um unvollständig amplifizierte PCR-Produkte zu komplettieren. Bei der PCR wird eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet, hier die *Taq*-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Eine andere häufig verwendete thermostabile Polymerase ist die *Pfu*-Polymerase. Ein Beispielansatz ist in Tabelle 3.1. aufgeführt.

Tab.: 3.1. Zusammensetzung eines präparativen PCR-Ansatzes

Volumen/ μ l	Bestandteil
3	Matritzen DNA (150 ng/ μ l)
5	5'-Oligonukleotid (<i>sense</i>) (10 mM)
5	3'-Oligonukleotid (<i>antisense</i>) (10 mM)
1	<i>Pfu</i> Polymerase 2U/ μ l
3	dNTP-Mix (Clonotech, Heidelberg) 10 mM
5	<i>Pfu</i> -Puffer 10x (Clonotech, Heidelberg)
37	μ l ddH ₂ O

3.1.6 Einfügen von Mutationen in DNA mittels überlappender Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde verwendet, um Mutationen in ein DNA-Fragment des Gens *period* aus *Drosophila melanogaster* einzufügen und zu amplifizieren. Hierzu bedarf es sowohl Oligonukleotide, welche die wildtypische DNA am 5'- und am 3'-Ende flankieren, als auch mutagene Oligonukleotide, die im zu verändernden Sequenzbereich die veränderte Basenabfolge aufweisen. Diese lagern sich unvollständig an die zu amplifizierende DNA an, so dass es bei der Amplifikation durch die *Pfu*-DNA Polymerase zum Einbau von anderen Nukleotiden kommt. Zur Erstellung einer Mutation bedarf es drei Schritte. Zunächst wird die wildtypische Matritzen-DNA mit einem 5'- mutagenen („sense“ s) Oligonukleotid und einem 3'-flankierenden („antisense“ as) Oligonukleotid amplifiziert (s. Abb. 3.1 A). Parallel dazu erfolgt eine Reaktion mit einem 5'-flankierenden („sense“) und einem 3'-mutagenen („antisense“) Oligonukleotid (s. Abb. 3.1.B). Mit diesen so entstandenen PCR-Produkten wird eine dritte Reaktion durchgeführt. Dabei lagern sich die komplementären Sequenzen aneinander und bilden 5' bzw. 3' überhängende einzelsträngige Enden (s. Abb. 3.1 C). Die Polymerase vervollständigt im ersten Reaktionsschritt diese einzelsträngigen, überhängenden Bereiche. In den folgenden Schritten wird das durch die flankierenden Oligonukleotide begrenzte, mutierte Fragment amplifiziert und exponentiell vervielfältigt.

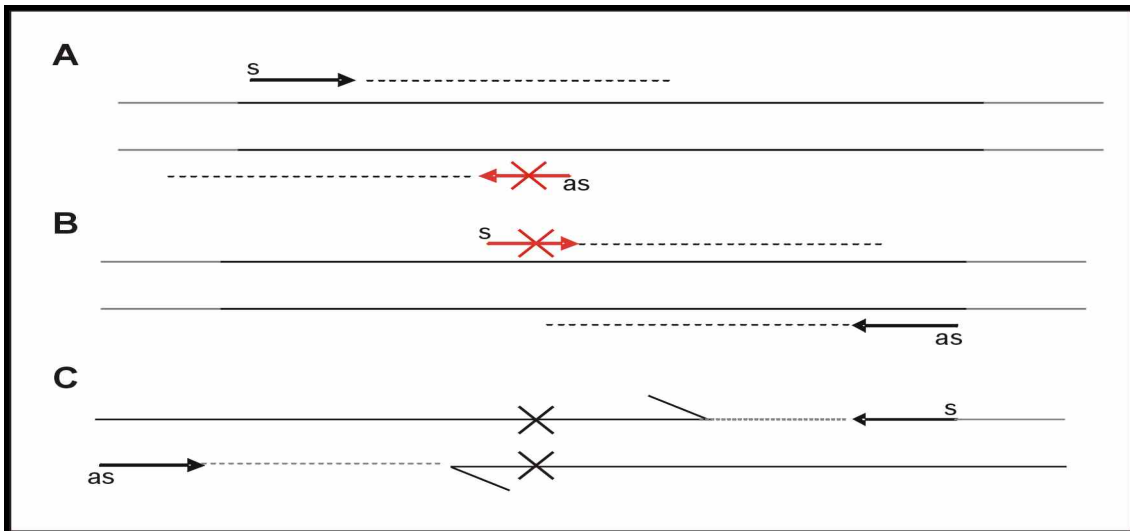


Abb. 3.1: Das Prinzip der überlappenden PCR

Die flankierenden Oligonukleotide sind in schwarz, die mutagenen in rot dargestellt. Mit den Produkten der ersten beiden Reaktionen A und B, wird in der dritten Reaktion C die Mutation in das gesamte Fragment eingebaut und amplifiziert. s = „sense“ (Oligonukleotid in 5'-Richtung), as = „antisense“ (Oligonukleotid in 3'-Richtung)

3.1.7 Die Methode der QC-PCR (Quick Change –PCR), verändert nach Stratagene®

Um Mutationen an bestimmten Stellen in ein Gen einzufügen, wurde die Methode der Quick-Change PCR verwendet. Diese beruht auf demselben Prinzip wie die unter 3.1.5 beschriebene PCR, nur dass hier 5' (*sense*) - und 3' (*antisense*)- mutagene Oligonukleotide genutzt werden. Auf diese Weise werden in die Matrizen-DNA Mutationen in Form von ausgetauschten Basen eingefügt und amplifiziert. Bei dem hier eingesetzten Plasmid handelte es sich um den Hefevektor pJG4-5 mit der Sequenz von *dperiod232-538* (6473 bp). Das erhaltene PCR-Produkt umfasste den gesamten Vektor mit dem Genfragment, das nun die entsprechenden Mutationen enthielt. Die PCR-Produkte wurden mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* verdaut, um ursprüngliche, parentale und methylierte DNA abzubauen. Es folgte eine Transformation des Vektors in TG1-Zellen, in denen dieser vermehrt wurde. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch eine Mini-Präparation (siehe 3.1.1) isoliert und durch Sequenzierung überprüft. Der Reaktionsansatz und das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 3.2 und 3.3 zusammengefasst.

Tab. 3.2: Zusammensetzung der QC-PCR, verändert nach dem Protokoll von Stratagene®:

Konzentrationen und Volumina	Bestandteile
5 – 50 ng DNA	Wildtyp DNA
10 nM	5'- mutagene Oligonukleotide (<i>sense</i>)
10 nM	3'- mutagene Oligonukleotide (<i>antisense</i>)
5 µl	10x Puffer
2 U/µl	<i>Pfu</i> -Polymerase
10 µM	dNTPs-Mix 2 mM
ad 50 µl	ddH ₂ O

Tabelle 3.3: Programm der QC-PCR verändert nach dem Protokoll von Stratagene®:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	
Denaturierung	95	30 “	16 Zyklen
Denaturierung	95	30 “	
Hybridisierung	55	60 “	
Elongation	72	15 ‘	
	72	10 ‘	

3.1.8 Methode der mutagenen PCR nach dem „Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit“, (New England Biolabs)

Die Methode wurde genutzt, um Mutationen in das Gen für das Protein dPERIOD 232-538 einzubringen und ihre Auswirkungen auf die Bindung des Interaktionspartners TIMELESS im Yeast-II-Hybrid-System zu untersuchen. Zur Erzeugung der Mutationen wurden die vom Hersteller angegebenen Mengen der Reagenzien verwendet und eine DNA-Menge von 50 ng eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt, die dNTPs in einer Konzentration von 10 mM. Die Temperatur für das Anlagern der Oligonukleotide betrug 55°C. Die PCR-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Das Prinzip dieser mutagenen PCR ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Es beruht auf der Methode der inversen PCR. Das 5'- Oligonukleotid trägt die Mutation und bindet an Position +1 an den kodierenden Strang. Das 3'-Oligonukleotid bindet entsprechend an der Position -1 an den gegenläufigen DNA-Strang (s. Abb. 3.2). Die Enden beider Oligonukleotide liegen sich exakt an der gleichen Stelle auf der zu amplifizierenden DNA gegenüber. Es entsteht somit ein lineares PCR-Produkt, welches die Mutation trägt und keine

überhängenden Enden aufweist. Da beide Enden des Produkts auf Grund der entsprechend beschaffenen Oligonukleotide am 5'-Ende phosphoryliert sind, konnten diese mit Hilfe einer dem Kit beiliegenden Ligase wieder zirkuliert werden. Hierzu wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 5 µl vom Hersteller mitgeliefertem 2 x Reaktionspuffer gemischt und mit 0,5 µl Ligase versetzt. Nach fünf Minuten Inkubationszeit folgte eine Transformation des religierten PCR-Produkts in Zellen des Klonierungsstamms TG1. Der Reaktionsansatz und das PCR Programm sind in Tabelle 3.4 und 3.5 aufgeführt.

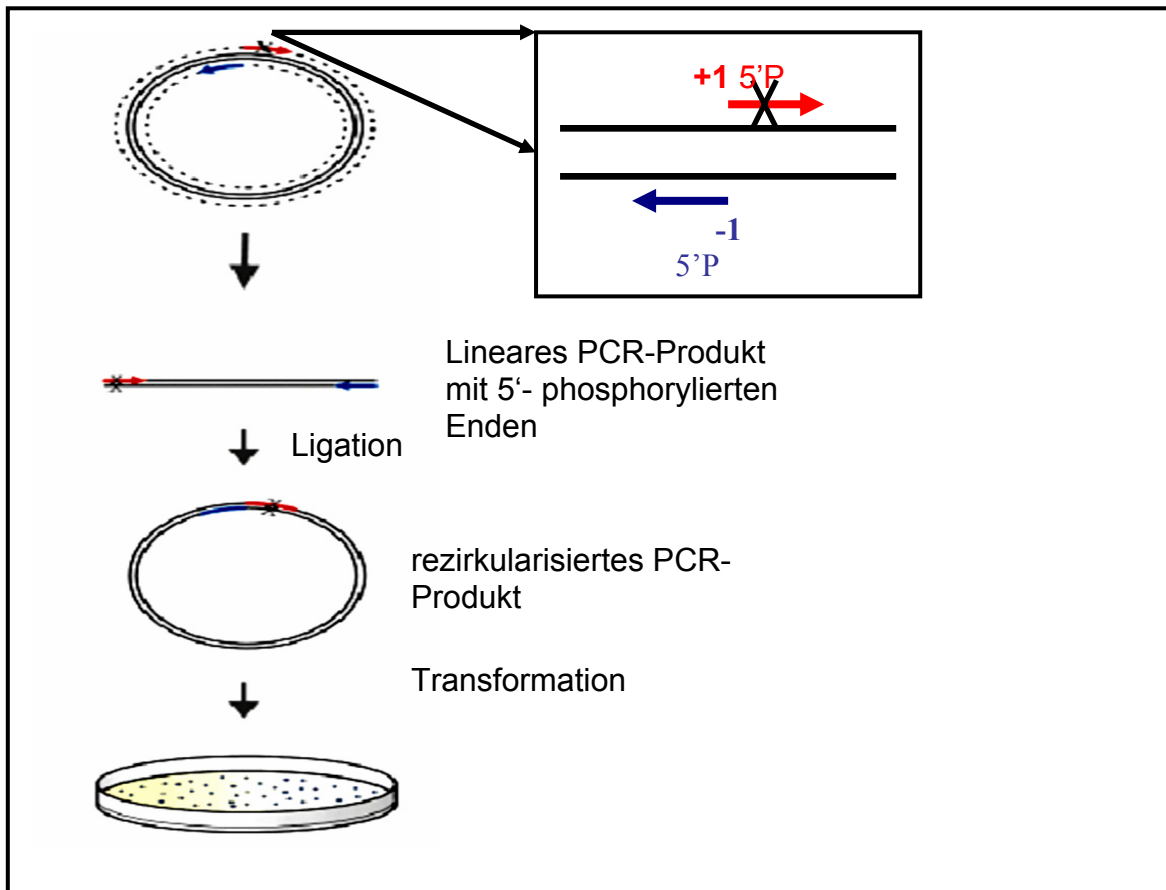


Abb. 3.2: Das Prinzip der mutagenen PCR nach dem „Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit“: Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass ihre Enden sich genau gegenüberliegen und an den 5'-Enden phosphoryliert sind. Dies ist in der Abbildung noch einmal in vergrößerter Form dargestellt. Die Mutation, die im vorwärts gerichteten Oligonukleotid vorhanden ist, ist durch ein schwarzes Kreuz gekennzeichnet. Es entsteht ein lineares PCR-Produkt, welches rezirkularisiert und schließlich transformiert werden kann.

Tab. 3.4: Programm der mutagenen PCR nach dem „Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit“

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	
Denaturierung	98	30 “	25 Zyklen
Denaturierung	98	30 “	
Hybridisierung	55	30 “	
Elongation	72	3,5 ‘	
	72	10 ‘	

Tab. 3.5 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die mutagene PCR nach dem „Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit“

Bestandteile	Volumen/50 µl Reaktion	Endkonzentration
ddH ₂ O	28,5 µl	
5x Phusion HF-Puffer	10,0 µl	1x
10 mM dNTP	1,0 µl	200 µM
5'- Oligonukleotid (mutiert)	2,5 µl	0,5 µM
3'- Oligonukleotid	2,5 µl	0,5 µM
Wildtyp DNA	5,0 µl	50 ng
Phusion Hot Start Polymerase HF (2 U/µl)	0,5 µl	0,02 U/µl

3.1.9 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung von PCR Produkten u. a. von Enzymen oder Matritzen-DNA wurde ein PCR-Reinigungs-Kit der Firma Genomed verwendet, und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reinigung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte über Anionenaustauscher-Chromatographie. Die Elution der DNA erfolgte mit 2 x 15 µl warmem ddH₂O.

3.1.10 Restriktion von DNA

Der enzymatische Verdau von DNA durch Endonukleasen wird als Restriktion bezeichnet. Das wichtigste Merkmal der Restriktionsendonukleasen der Klasse II ist, dass es für jedes Enzym eine spezifische Erkennungssequenz gibt. Jedes Enzym schneidet die DNA nur an einer bestimmten Stelle. Die Enzyme benötigen Magnesium als Cofaktor, das durch den Puffer gestellt wird. Die Sequenzen, an denen die Restriktionsendonukleasen schneiden,

umfassen 4-8 Nukleotide und sind Palindrome. Bei der Spaltung des DNA-Doppelstranges entstehen entweder glatte Enden („blunt ends“), oder Enden mit Überhängen am 3'- oder 5'-Ende („sticky ends“). Beim Ansatz einer Restriktion wird die benötigte Menge an DNA, Puffer und Enzymen in entsprechenden Verhältnissen pipettiert und mit ddH₂O auf das gewünschte Volumen eingestellt. Die Inkubation findet bei 37°C für 2-3 Stunden statt. Die Reinigung der geschnittenen DNA erfolgte durch PCR-Reinigung (s. Kap. 3.1.9) oder Auftrag und anschließendes Ausschneiden aus einem Agarosegel (s. Kap. 3.1.3). Für die Reaktion wurde die 1,5 fache Menge an Enzym zum Ansatz pipettiert. Eine analytische Restriktion wurde in einem Volumen von 40 µl durchgeführt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Ein Reaktionsansatz mit zwei Restriktionsendonukleasen enthielt folgende Komponenten:

Plasmid DNA: 2-4 µg

Reaktionspuffer (10x): 2 µl

Restriktionsendonuklease I: 2 µl

Restriktionsendonuklease II: 2 µl

BSA (10x) 2 µl

ddH₂O ad 40 µl

Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz mit 4 µl Probenpuffer (6x) versetzt oder durch Hitzeinaktivierung abgebrochen. Für präperative Ansätze wurden größere DNA-Mengen (2-4 µg) verwendet. Das eingesetzte Enzymvolumen lag dabei unter 1/10 des Gesamtvolumens.

Die für den Restriktionsansatz benötigten Enzymmengen ergaben sich aus der Anzahl der Schnittstellen in der zu schneidenden DNA, der eingesetzten DNA Menge und der Anzahl der Schnittstellen in λ-DNA (Referenzgenom):

$$\frac{[Größe\ Bezugs\ DNA]}{[Größe\ Plasmid\ DNA]} \times \frac{[Zahl\ der\ Schnittstellen\ im\ Plasmid]}{[Zahl\ der\ Schnittstellen\ in\ Bezugs\ DNA]} \times \frac{[eingesetzte\ Plasmid\ DNA]}{[1\ \mu g\ Bezugs\ DNA]} = U$$

U: Umsatzrate des Enzyms in µmol/s

3.1.11 Klonierung von PCR-Fragmenten

Soll ein PCR-Produkt kloniert werden, so ist es möglich, an den 5'- und 3'- Enden der Oligonukleotide Restriktionsschnittstellen anzufügen. Restriktionsendonukleasen benötigen neben ihren Erkennungssequenzen einen Basenüberhang an den 5'- Enden, um ihre optimale Aktivität zu entwickeln. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden nach der Reinigung mit

einem entsprechenden Reagenzien-Kit (s. Kap. 2.4) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. Nach einer weiteren Reinigung erfolgte eine Ligation in ein Plasmid.

3.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen werden eingesetzt, um die Ausbildung von Polydiester-Bindungen zwischen DNA-Fragmenten, die zuvor durch Restriktionsenzyme geschnitten wurden, zu katalysieren. Dabei wird die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen katalysiert. Bei dieser Reaktion wird die hydrolytisch entstandene Phosphodiesterbrücke zwischen 3'-OH und 5'-Phosphatgruppe wieder geschlossen. Schneidet man beispielsweise einen Vektor und ein PCR-Fragment mit den gleichen Restriktionsenzymen, so kann man durch eine Ligase beide DNA-Moleküle ligieren und auf diese Weise rekombinante DNA-Moleküle erstellen.

3.1.13 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung erhaltener Kolonien auf positive Klone fand die Methode der PCR Verwendung. Hierzu wurde eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte abgenommen und in einem PCR-Gefäß (Eppendorf) mit einem analytischen PCR-Ansatz abgestrichen. Bei diesen Reaktionen dient die Plasmid-DNA der ausgestrichenen Bakterienkolonie als Matrizen-DNA. Der PCR-Ansatz enthielt für das zu überprüfende Genfragment spezifische Oligonukleotide. Anstelle der unter 3.1.5 verwendeten *Pfu*-Polymerase wurde die *Taq*-Polymerase (1000 bp/min) eingesetzt. Anschließend folgte eine Analyse der durch die PCR erhaltenen Amplifikate durch Agarose-Gelelektrophorese. Kolonien, die ein spezifisches Amplifikat zeigten, wurden für weitere Versuche verwendet.

3.1.14 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode

Die Sequenzierungsmethode des Kettenabbruchs nach Sanger (1975, 1992) beruht im Wesentlichen auf der enzymatischen Vervielfältigung von DNA. Bei der Methode wird ausgehend von einem Oligonukleotid ein Komplementärstrang zu einer einzelsträngigen DNA synthetisiert. In vier getrennten Ansätzen befinden sich jeweils eines der vier Dideoxynukleotide (ddNTPs: ddCTP, ddTTP, ddGTP und ddATP). Durch zufälligen Einbau dieser ddNTPs an den jeweiligen Positionen der Sequenz kommt es zum Kettenabbruch. Auf diese Weise entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge. Durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese können die Fragmente aufgetrennt werden. Die Sequenzierungen erfolgten nach der „Big Dye“-Terminatormethode, bei der unterschiedliche fluoreszenzmarkierte

Dideoxynukleotide zum Einsatz kommen. Diese Methode ermöglicht eine Sequenzierung in einem Ansatz. Ferner enthielt der Ansatz die AmpliTaq-Polymerase FS (Applied Biosystems, Langen). Ein Reaktionsansatz von 20 µl bestand aus folgenden Komponenten:

150-300 ng Plasmid DNA

3,2 pmol Oligonukleotide

4,0 µl Terminormix (Big Dye Terminator Kit)

Tabelle 3.6: Programm der Sequenzier-PCR:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	
Denaturierung	96	30 ‘‘	
Denaturierung	96	30 ‘‘	25 Zyklen
Hybridisierung	50	15 ‘‘	
Elongation	60	4 ‘	
	4	∞	

Vor der Auftrennung der Sequenzierungsprodukte wurde das PCR-Produkt mit Ethanol gefällt. Dazu wurden 2 µl EDTA (125 mM), 2 µl NaAc (3 M, pH 4,7) und 25 µl Ethanol (100%) zum Sequenzierungsansatz hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten folgte ein 30 minütiger Zentrifugationsschritt (4°C, 13000 rpm). Das auf diese Weise erhaltene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Trocknen des Pellets erfolgte bei Raumtemperatur. Die Analyse der Sequenzierprodukte fand nach der Methode der Kapillarelektrophorese in einem ABI PRISM 3700 DNA-Analyser statt (Applied Biosystems, Langen).

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung von kompetenten *Escherichia coli* Bakterien wurde die TSS-Methode nach Chung (Chung *et al.*, 1998) gewählt. Dazu wurde eine Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli*-Stamms auf eine OD₆₀₀ von 0,1 in LB-Medium verdünnt. Die Kultur inkubierte man bis zum Erreichen der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ von 0,4-0,5). Anschließend fand eine Inkubation bei 4°C für 20 Minuten statt. Im Anschluss daran wurde ein Zentrifugationsschritt bei 1200 xg für 5 Minuten durchgeführt. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet in 1/10 des Ursprungsvolumens in TSS resuspendiert. Nach dem Aliquotieren der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

Tab. 3.7: Zusammensetzung des TSS-Mediums: In LB-Medium ohne eingestellten pH, vor Gebrauch, sterilfiltriert (45 µm)

Zusammensetzung TSS	
PEG 8000	10%
DMSO	5%
MgCl ₂ *6H ₂ O	50 mM
LB-Medium	85%

3.2.2 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA

Zu den auf Eis aufgetauten, kompetenten *E. coli*- Zellen wurden 0,5 µg - 2 µg DNA gegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C und eine weitere Inkubation auf Eis für fünf Minuten. Im nächsten Schritt setzte man den Zellen 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum zu und ließ diese 30 Minuten bei 37°C wachsen. Die Zellen wurden bei 5000 rpm für zwei Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Es folgte das Resuspendieren des Zellpellets im Restvolumen (100µl) Medium und das Ausplattieren auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.3 Langfristige Lagerung von Bakterien

Zur langfristigen Lagerung von *E. coli*-Klonen wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurde eine unter Selektionsbedingungen gehaltene Übernachtskultur mit sterilem Glycerin 50% (v/v) versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.4 Lithium-Acetat Transformation von Hefen

Für eine Transformation wurde eine Übernachtskultur des jeweiligen Hefe-Stammes mit YPD-Medium in 10 ml auf einer OD_{600} von 0,1 verdünnt und bei 30°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,7 kultiviert. Anschließend erfolgte die Ernte der Hefezellen bei 2000 xg für 4 Minuten, gefolgt von einem Waschschrift mit 5 ml ddH₂O. Das erhaltene Sediment wurde in 0,1 M Lithium-Acetat resuspendiert und für zwei Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 240 µl PEG3350 (50% (w/v)), 36 µl 1 M Li-Acetat, 20 µl Herings-Sperma-DNA (10 mg/ml, zuvor 5 Minuten bei 95°C gekocht) und 3 µg der zu transformierenden DNA aufgenommen. Bei den zu transformierenden Vektoren handelte es sich um pJG4-5, pEG202 und pSH18-34 bzw. ihre rekombinanten Derivate. Anschließend wurde der Versuchsansatz auf 350 µl mit ddH₂O aufgefüllt und für eine Minute gemischt und bei 30°C und 40°C für jeweils 20 Minuten bzw. 23 Minuten inkubiert. Es folgte das Pelletieren der Zellen (3000 rpm, 2 min) und das Resuspendieren in 250 µl ddH₂O. Die transformierten Hefezellen wurden auf 30°C äquilibrierte SD-Ura,-His,-Trp-Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 30°C.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Expression von Proteinen in *E. coli*.

Zur Expression von Proteinen in *E. coli*-Zellen wurde zuvor das Plasmid mit dem Gen für das entsprechende rekombinante Protein in einen geeigneten Expressionsstamm transformiert. Dabei wurden die *E. coli*-Expressionsstämme Rosetta und BL21(DE3) verwendet. Der Expressionsstamm Rosetta verfügt über ein Plasmid mit einem Gen für eine Resistenz gegen Chloramphenicol. Auf diesem Plasmid befindet sich die genetische Information für seltene tRNAs. Zum Animpfen wurde eine Übernachtskultur in LB- oder TB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker erstellt (37°C, 160 rpm). Die Hauptkultur umfasste 5-10 Liter TB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker und wurde mit der Übernachtskultur angeimpft. Das zuvor in die Bakterien transformierte Plasmid mit der genetischen Information für das zu produzierende Protein verfügte über einen IPTG-induzierbaren Promotor. Die Kultur inkubierte man bei 37°C und 160 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,7 oder 1,0 und induzierte anschließend mit 0,03 mM IPTG. Im Anschluss daran wurde die Temperatur von 37°C auf 18°C heruntergeregelt und über Nacht inkubiert. Die Ernte erfolgte bei 4000 rpm für 10 Minuten. Die Zellpellets wurden in EDTA-haltigem Lysepuffer (s. Kap. 2.6.3) resuspendiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.2 Testexpression von rekombinanten Proteinen

Zur Analyse der Überexpression wurden verschiedene Klone unter selektiven Bedingungen in 100 ml TB-Medium mit 10% aus einer überwachsenen Übernachtskultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 160 rpm und 37°C. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7-1,0 wurde die Expression des Gens für das rekombinante Protein mit 0,1 mM IPTG induziert. Es wurden Proben zunächst vor und dann stündlich während der Induktion entnommen und gelelektrophoretisch analysiert.

3.3.3 Löslichkeitstests von Proteinen

Zum Testen der Löslichkeit des Fusionsproteins wurden 1 ml Kulturvolumen bei 6000 rpm abzentrifugiert und in 500 µl Lysepuffer (s. Kapitel 2.6.3) aufgenommen. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von einer Spatelspitze Lysozym und 1 mM PMSF. Von Pellet und Überstand wurde eine 20 µl Probe genommen und mit 80 µl 1 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Analyse der Proben erfolgte gelelektrophoretisch.

3.3.4 Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Der Aufschluss von Zellen des Bakterienstamms *E. coli* fand durch Aufnahme des Zellpellets in 15 ml Lysepuffer mit 1 mM PMSF sowie DNase statt. Anschließend wurden die Zellen mittels Fluidizer aufgeschlossen. Bei dieser Methode werden die Zellen mittels Druck durch eine kleine Öffnung gepresst und somit mechanisch aufgeschlossen. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 28000 rpm für 30 min bei 4°C.

3.3.5 Reinigung von GST-fusionierten Proteinen über GSH-Säulen

Die Reinigung von GST-fusionierten Proteinen erfolgte affinitätschromatographisch über Glutathion-Sepharose-Säulen (s. Abb. 3.3.) der Firma Amersham. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung von Glutathion-S-Transferase (26 kDa) an das auf der Matrix der Säule immobilisierte Glutathion. Das sich im löslichen Überstand eines *E. coli* Zelllysates (s. Kap.3.3.4) befindende GST-fusionierte, rekombinante Protein wurde an der zuvor mit vier Säulenvolumina Lysepuffer (s. Kap. 2.6.3) äquilibrierten GSH-Matrix der Säule gebunden. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde die Säule mit vier Säulenvolumina Lysepuffer und anschließend mit dem gleichen Volumen Waschpuffer gewaschen (s. Kap. 2.6.3). Die Elution erfolgte mit 1,5 Säulenvolumen Glutathion-Puffer (vergl. Kap. 2.6.3) in 5 ml Fraktionen. Diesem Schritt liegt eine kompetitive Verdrängung des Proteins von den

Bindestellen der Säulenmatrix zu Grunde. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und die proteinhaltigen Proben wurden vereint.

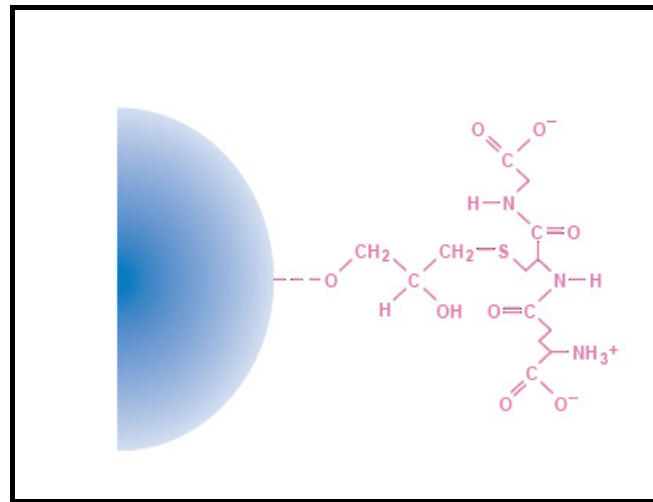


Abb. 3.3 Struktur der Glutathion-Sepharose.

Die Struktur von Glutathion ist komplementär zur Glutathion-S-Transferase-Bindungsdomäne des GST-Fusionsproteins (The GST-Fusion-System, Amersham Biosciences).

3.3.6 Reinigung von Proteinen mit Hexahistidin-fusionsanteil

Die Reinigung von Proteinen mit Hexahistidin-fusionsanteil erfolgte affinitätschromatographisch über Ni^{2+} -NTA-Agarose. Die Methode basiert auf der Bindung der Histidinreste an divalente Kationen, in diesem Fall Nickel-Ionen. Zunächst wurde der lösliche Teil eines Zelllysats im jeweiligen Lysepuffer (s. Kap. 2.6.3) für Hexahistidin-fusionierte Proteine auf eine aus Ni^{2+} -NTA-Agarose bestehende äquilibrierte Affinitätssäule bei einem Fluss von 1 ml/min gegeben. Diese hatte Nickel-Ionen durch Chelatisierung mittels Nitrilotriazetatgruppen (NTA) gebunden. Die Bindung der mit Hexahistidin-Anteil ausgestatteten Proteine erfolgte dabei durch Komplexierung von einem Ni^{2+} -Ion durch zwei Histidinreste. Die Entfernung unspezifischer Bindungen an die Affinitätsmatrix erfolgte durch Waschen der Säule mit Lysepuffer für Hexahistidin-fusionierte Proteine mit 10 mM Imidazol. Über einen linearen Gradienten, der mit Lysepuffer mit 10 -100 mM Imidazol durchgeführt wurde (15 Säulenvolumina) und einer anschließenden Stufenelution mit 500 mM Imidazol erfolgte die Elution der Säule. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert, die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereint.

3.3.7 Größenausschlusschromatographie

Bei der Methode der Größenausschlusschromatographie wird die Trennung eines heterogenen Molekülgemisches durch die Parameter Größe und Molekülgestalt in einer porösen Polymermatrix bewerkstelligt. Die Methode der Größenausschlusschromatographie wurde sowohl für präparative als auch analytische Zwecke eingesetzt. Die Säulendimensionen, die zur Erstellung dieser Arbeit verwendet wurden, betrug 16/60 (Säulendurchmesser 16 mm, Länge der Säule: 60 cm). Die Säulen enthielten Sephadex S200 und S75 *prep-grade* Material (Amersham-Pharmacia, Freiburg). Für einen Lauf wurde das zuvor konzentrierte Protein (siehe Kap. 3.3.13) auf die zuvor mit entsprechendem Laufpuffer (s. Kap. 2.6.4) äquilibrierten Säule injiziert. Bei einem Fluss von 1 ml/min erfolgte die Elution in einzelne Fraktionen nach Erreichen des Ausschlussvolumens. Die Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereint. Für analytische Läufe wurden die molekularen Massen fraktionierter Proteine durch den Vergleich mit zuvor für die entsprechende Säule erstellten Größenstandard ermittelt.

3.3.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Methode der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Trennung von Proteingemischen und der Bestimmung von Molekulargewichten von Proteinen genutzt. Die Proben werden bei der Vorbereitung 5 Minuten bei 100°C in SDS (Natriumdodecylsulfat) und β -Mercaptoethanol-haltigem Puffer (s. Kap. 2.6.1) inkubiert. Die Nettoladung des Proteins ist abhängig von der Sequenz der Aminosäuren und vom pH-Wert und kann positiv oder negativ sein. In einem elektrischen Feld wandert ein Protein in Abhängigkeit seiner Nettoladung, seiner Größe und seiner Form. β -Mercaptoethanol ist in der Lage, Disulfidbrücken in Proteinen zu reduzieren. SDS maskiert die Ladungen des Proteins. Somit verliert das Protein seine Tertiärstruktur und zerfällt in seine Untereinheiten. Die Folge dieser Behandlung ist, dass die Proteine linearisieren und sich in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht trennen lassen. Die Wanderungstrecke ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Deswegen ist es möglich, Eichgeraden mit bekannten Proteinen zu erstellen (Marker), durch die man auf die Molekulargewichte der Proteine in der Probe zurückschließen kann. Bevor die Proteinproben aufgetragen wurden, inkubierte man sie in SDS-Probenpuffer (s. Kap. 2.6.1) bei 100°C für 5 Minuten. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, zentrifugierte man die Proben nach dem Kochen für 4 Minuten bei

Raumtemperatur und 10000 xg. Die Proben wurden im Gel bei einer Stromstärke von 40 mA getrennt. Es folgte eine Färbung in Coomassie Brilliant Blau.

3.3.9 Polyacrylamidgelelektrophorese für Proteine und Peptide < 10 kDa

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese für kleine Proteine und Peptide wurden spezielle Gele mit wenig SDS in der Zusammensetzung und kleinen Gelporen genutzt, um eine Trennung im elektrischen Feld zu erreichen. Auf diese Weise können kleine Proteine und Peptide besser im Gel detektiert werden. Es wurde eine Gelrezeptur nach Schägger und von Jagow (Schägger *et al.*, 1988) genutzt. Verwendete 10% Gele wiesen folgende Zusammensetzung auf:

Tab. 3.8: Zusammensetzung 10% Gele nach Schägger und von Jagow (für 2 Gele)

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid 30%	3,27 ml	0,85 ml
1 M Tris-HCl, pH 8,8	3,33 ml	1,24 ml
ddH ₂ O	3,4 ml	3,11 ml
10% (w/v) APS	50 µl	33 µl
TEMED	10 µl	4 µl

Tab.3.9: Zusammensetzung des Kathodenpuffers:

Kathodenpuffer für (1L) pH 8,8	
Tris HCl	12,11 g
Tricine	17,82 g
SDS	1 g

Tab.3.10: Zusammensetzung des Anodenpuffers:

Anodenpuffer	
121,1 g	Tris-HCl (2 M)

Tab. 3.11: Zusammensetzung des Schägger-Jagov Probenpuffers (2 x*):

Schägger-Jagov Probenpuffer	
2,0 ml	1 M Tris-HCl
2,4 ml	Glycerol (entspr. 3 g)
0,80 g	SDS (entspr. 4 ml 20%)
0,31 g	DTT
0,002 g	Coomassie Blue

*Auf 10 ml aufgefüllt

3.3.10 Detektion von Proteinen durch Western-Blotting

Die Technik der Western-Blot-Analyse besteht darin, gelelektrophoretisch getrennte Proteine aus dem Gel auf eine proteinbindende Nitrozellulose- oder PVDF-Membran zu überführen. Der Transfer fand bei 300 mA für 15 – 60 Minuten nach dem Tank-Blot-Verfahren statt. Anschließend konnten die auf die Membran transferierten Proteine mit Antikorperschaftetert werden (s. Kap. 2.7). Vor dem Auftragen des ersten Antikorperschaftetert erfolgte ein Blockierungsschritt mit 10% Magermilchpulver in TBS (s. Kap. 2.6.4), um Bindungsstellen auf der Membran für den Antikorperschaftetert unzugänglich zu machen. Bei den Primär-Antikorperschaftetert handelte es sich um einen Anti-GST-Antikorperschaftetert (1:2000) aus der Maus. Als Sekundär-Antikorperschaftetert wurde ein an Peroxidase gekoppelter Antikorperschaftetert aus der Ziege in einer Konzentration von 1:10000 verwendet. Die Detektion erfolgte durch ein spezielles Entwicklungssystem (ECL plus Western Blotting Detection System) der Firma Amersham Biosciences.

3.3.11 Enzymatische Spaltung von Fusionsanteilen rekombinanter Proteine

Die Abspaltung des Fusionsanteils gereinigter His- oder GST-Fusionsproteine erfolgte enzymatisch durch die Verwendung von speziellen Proteasen. Bei GST-Fusionsproteinen wurde die PreScission-Protease, im Fall von Hexahistidinresten die TEV-Protease verwendet. Die PreScission-Protease spaltet spezifisch zwischen den Aminosäuren Glutamin und Glycin in der Erkennungssequenz LGVLFQ↓GP, die TEV-Protease spaltet ebenfalls zwischen Glutamin und Glycin, allerdings in der Sequenz ENLYFQ↓G. Die Spaltungen erfolgten durch Inkubation des Fusionsproteins mit der entsprechenden Menge Protease für mindestens 4 h bei 4°C. Die Trennung der geschnittenen Fragmente der Fusionsproteine erfolgte durch Gelfiltration.

3.3.12 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinquantifizierung wurde durch ein von Bradford (1976) entwickeltes Verfahren an Hand einer BSA-Eichgeraden durchgeführt. Ferner wurde die Konzentration von Proteinlösungen photometrisch über die OD_{280} bestimmt. Mit dem erhaltenen Wert konnte über das Lambert-Beersche Gesetz die Konzentration der Lösung errechnet werden.

3.3.13 Ultrafiltration zur Konzentration von Proteinen

Die Konzentrierung von Proteinen erfolgte mit Hilfe von Ultrafiltrationseinheiten der Firma Amicon nach Herstellerangaben. Diese Einheiten besitzen eine semipermeable Membran mit einem definierten Porengrößenbereich. Die Proteinlösung wurde bei 4000 rpm bei 4°C im Zentrifuge zentrifugiert. Bei dieser Methode wurden Moleküle, die kleiner waren als die Poren, entfernt und durch gleichzeitige Volumenabnahme konnte die Proteinlösung konzentriert werden.

3.3.14 Matrixunterstützte Interaktionstests zur Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen (GST-Pulldown-Experimente)

Die Methode beruht auf der Affinitätschromatographie. Die Methode wurde verwendet um festzustellen, ob Protein-Protein Wechselwirkungen zwischen zwei postulierten Interaktionspartnern vorliegen. SDS-Proben des Versuchsablaufs wurden im Anschluss gelelektrophoretisch analysiert. Dafür immobilisierte man einen als GST-Fusionsprotein vorliegenden Interaktionspartner an eine magnetische GSH-Matrix (2h/4°C). Nach einem Waschschrift wurde zu der magnetischen GSH-Matrix eine Proteinlösung mit dem anderen Interaktionspartner hinzugegeben. Nach dem Waschen erfolgte die Elution mit 20 mM Gluthation.

3.3.15 Das Hefe-II-Hybrid-System

Mit der Methode des Hefe-II-Hybrid Systems ist es möglich, Protein-Protein-Interaktionen zu studieren. Bei dieser Methode wird der modulare Aufbau von Transkriptionsfaktoren, bestehend aus einer DNA-bindenden und einer aktivierenden Domäne, ausgenutzt. Dafür wird ein Gen für eine Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors mit dem des einen der beiden potentiellen Bindungspartner als Fusion coexprimiert. Auf einem anderen Plasmid

befindet sich die genetische Information für die DNA-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors und für den anderen potentiellen Interaktionspartner. Auch hier findet eine Coexpression als Fusion statt. Kommt es zur Interaktion der beiden Bindungspartner, so kommen die DNA-bindende- und die aktivierende Domäne des Transkriptionsfaktors miteinander in Kontakt. Der Transkriptionsfaktor bindet an die Promotorregion eines spezifischen Reportergens und aktiviert dieses.

Im verwendeten Hefe-II-Hybrid-System wurde die DNA-bindende Domäne des LexA-Proteins aus *E. coli* verwendet. Als Aktivierungsdomäne (AD) diente das synthetisch saure Peptid B42 (Ruden *et al.*, 1991). Die *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme EGY 48 und EGY 191 wurden mit den Plasmiden pEG 202, pJG4-5 und pSH18-34 transformiert.

Das Plasmid pEG202, ein Derivat des 202+PL (Ruden *et al.*, 1991), besitzt einen konstitutiv aktiven ADH-Promotor (Alkohol-Dehydrogenase-Promotor), so dass die Expression der DNA-bindenden-Domäne (DBD) des LexA als Fusion mit einem Interaktionspartner sowie *HIS3* als metabolischen Selektionsmarker stattfindet (s. Abb. 3.4 A 2). Die DNA, die den zweiten Interaktionspartner kodiert, wird in die MCS des pJG4-5 eingebracht. Die Expression des Gens für das B42 fusionierte Protein wird über den *GAL1*-Promotor reguliert (s. Abb. 3.4 A 1). Ist Galaktose anwesend, so wird eine Expressionkassette synthetisiert, welche vor dem Gen für das Interaktionsprotein eine nukleäre Lokalisationssequenz (SV409) (Nukleus-Import) und die aktivierende B42 Domäne enthält. *TRP1* wird in diesem Plasmid als metabolischer Hefe-Selektionsmarker verwendet. Das Plasmid pSH18-34, des LR1 Δ 1 (West *et al.*, 1987) diente als Reporterplasmid und besitzt ein LexA-Operator-*lacZ*-Fusionsgen. Das *lacZ*-Gen kodiert für die aus *E. coli* stammende β -Galaktosidase, die aus dem farblosen Substrat Xgal (5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid) enzymatisch Galaktose und den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol freisetzt, wodurch Zellkolonien blau erscheinen (s. Abb 3.4 B 1 und 2). Als Selektionsmarker verfügt das Plasmid über das Gen *URA3*. Die für die Versuche verwendeten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme EGY 48 und EGY 191 haben eine Trp-, His- und Ura-Auxotrophie. Des Weiteren verfügen beide Stämme über ein genomisches Reporterelement, da die UAS (*upstream activating sequence*) des endogenen *LEU2* durch LexA-Operatoren ersetzt ist. Zum Nachweis von schwachen Protein-Protein-Interaktionen ist dabei EGY48 mit 6 LexA-Operatoren geeignet, wo hingegen zum Nachweis von starken Protein-Protein-Interaktionen der EGY191 mit 2 LexA-Operatoren besser geeignet ist. Die Anzeige, dass eine Protein-Protein-Interaktion vorliegt, ist das Wachstum der Hefen auf Leuzin-Mangelmedium sowie eine Blaufärbung der Zellen bei Vorhandensein von XGal/SGal-haltigem Medium.

A

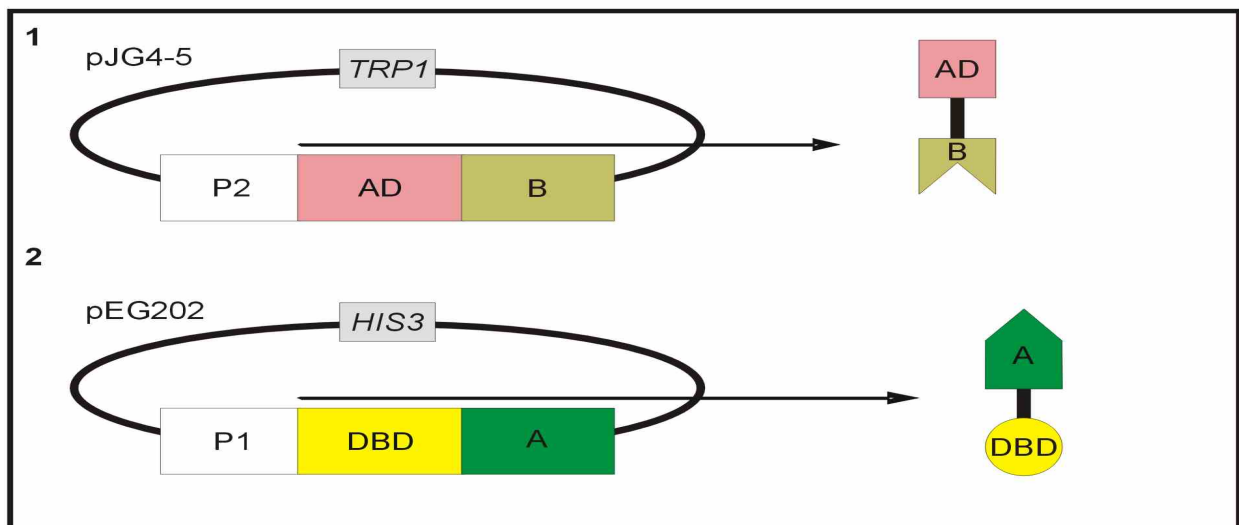


Abb 3.4.A: Komponenten des Hefe-II-Hybrid-Systems

1. Das Plasmid pJG4-5 kodiert für eine mRNA eines Fusionsproteins aus der aktivierenden B42-Domäne (AD) und dem zweiten Interaktionspartner. 2. Das Plasmid pEG 202 kodiert eine Sequenz für ein Fusionsprotein aus DNA-bindender Domäne (DBD) des LexA-Promotors und des ersten Interaktionspartners. P1, P2 = zwei Promotorregionen, *TRP1*, *HIS3* = Selektionsmarker

B

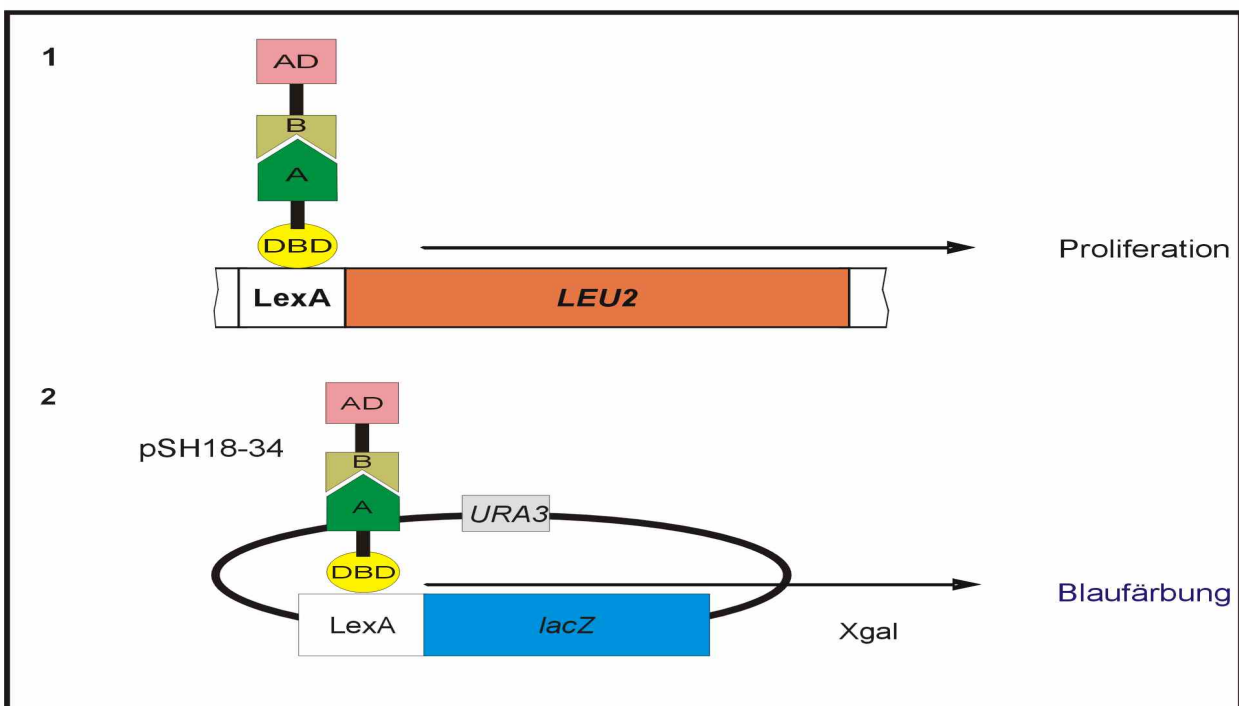


Abb 3.4 B: Durchführung des Hefe-II-Hybrid-Untersuchung

1. Binden beide Interaktionspartner aneinander, so werden die aktivierende- und die DNA-bindende Domäne so nah aneinander gebracht, dass sie als Transkriptionsaktivator an den LexA-Promotor binden und die Transkription des für die Leuzinsynthese wichtigen Gens *leu2* ermöglichen. 2. Gleichzeitig aktivieren sie das Reportergen *lacZ*, dessen Genprodukt die β -Galaktosidase ist. Diese setzt die Substanz XGal um, wodurch es zu einer Blaufärbung kommt. *URA3*= Selektionsmarker.

3.3.15.1 Durchführung der Hefe-II-Hybrid-Untersuchung

Nach der Transformation der jeweiligen *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme EGY 48 und EGY 191 mit dem Reporterplasmid pSH18-34 und beiden Plasmiden, die für die Zielproteine kodieren, erfolgte eine Selektion auf SD-Ura-His-Trp-Medium (s. Kap. 2.9.2). Zur Kontrolle transformierte man rekombinantes pEG202 zusammen mit dem Leervektor pJG4-5. Zur Testung der Aktivierung des LexA-fusionierten Proteins wurden die Transformanden auf SD-Ura-His-Trp-Leu-Medium umgestrichen (s. Kap. 2.9.2). Nur durch Galactose wird die Leuzinsynthese bei Anwesenheit des B42-fusionierten Proteins induziert. Deshalb findet die Leuzinsynthese nicht auf SD-Ura-His-Trp-Leu-Medium statt. Aus diesem Grund sollten die Transformanden auf diesem Medium nicht profilieren. Ein Umstreichen auf SD/SGal-Ura-His-Trp-Leu sollte Proliferation der Transformanden hervorrufen, die Leuzin-Biosynthese wird durch Galaktose induziert.

Befindet sich SGal/XGal-Ura-His-Trp auf den Platten, sollten blaue Kolonien wachsen, bei SD/XGal-Ura-His-Trp weiße Kolonien (s. Abb. 3.5 A-C).

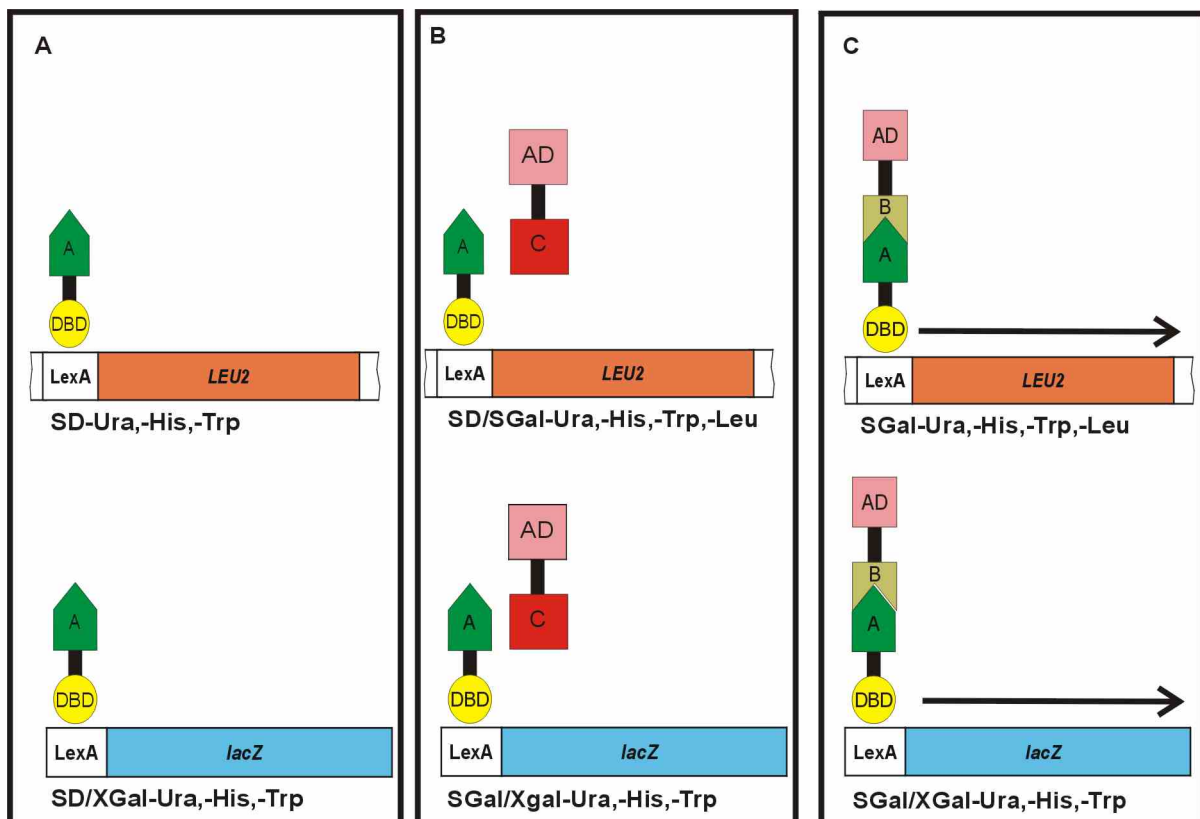


Abb. 3.5: Interaktionsstudie mit dem Hefe Zwei-Hybrid-System

- A Keine Expression des B42-fusionierten Proteins
- B Es findet Expression des B42-fusionierten Proteins statt, es liegt aber keine Interaktion mit dem LexA-fusionierten Protein vor. Es kommt zu keinem Ablesen der Reportergene.
- C Die Reportergene werden durch Interaktion der beiden Fusionsproteine transkribiert.

3.4 Biophysikalische Methoden

3.4.1 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) wurde verwendet, um Wärmetönungen zu messen, die bei biochemischen Reaktionen ablaufen. Die Methode wurde hier besonders dafür verwendet, um Dimerisierungsenthalpien der Mutante des Proteins dPERIOD (dPER 232-599 W482E) aus *Drosophila melanogaster* zu ermitteln. Ein ITC-Gerät besteht im Wesentlichen aus zwei Zellen, welche mit einem Differentialtemperatursensor versehen sind. Über eine, an der Spitze ausgeformte Injektionsnadel mit angeschlossenem Kolben und motorgetriebenem Stempel kann eine Ligandenlösung schrittweise in eine Zelle injiziert werden. Die dabei frei werdende Wärme wird über eine Heizleistung der Referenzzelle kompensiert. Eine zu dieser Heizleistung proportionale Spannung wird als Messsignal aufgezeichnet. Durch Vergleich mit einer einmalig durchgeführten Referenzmessung und Integration über die Zeit kann aus dem Messsignal schließlich die pro Injektion freigewordene Wärme errechnet werden (s. Gl. 3.4.1.1-3.4.1.8)

Es gilt:



sowie im Gleichgewicht

$$K_D = \frac{k_{on}}{k_{off}} \quad (\text{Gl. 3.4.1.3})$$

K_D in Abhängigkeit von der Wärmetönung:

$$K_D = \frac{[AA]}{[A] \cdot [A]} \quad (\text{Gl. 3.4.1.4})$$

$$\Delta G = -RT \ln K_D \quad (\text{Gl. 3.4.1.5})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Gl. 3.4.1.6})$$

$$\Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_D \quad (\text{Gl. 3.4.1.7})$$

$$\Rightarrow C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right) \quad (\text{Gl. 3.4.1.8})$$

3.4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde im Rahmen dieser Diplomarbeit zur Charakterisierung von Proteinen eingesetzt. Bei dieser Methode wird in der Probe mit einer bestimmten

Wellenlänge ein Fluorophor, hier ein Tryptophan, angeregt und die resultierende Fluoreszenz gemessen. Man unterscheidet dabei Excitationspektren und Emissionsspektren.

Im Fall von Excitationspektren wird die Probe mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt und die Fluoreszenz bei einer festgelegten Wellenlänge detektiert. Bei Aufnahmen von Emissionsspektren hingegen erfolgt die Anregung bei konstanter Wellenlänge und die Detektion bei verschiedenen Wellenlängen. Aus den erhaltenen Werten lassen sich Maxima der resultierenden Strahlung ermitteln.

Fluoreszenzspektren wurden an einem FluoroMax-II Spektrometer (Spex Industries, Edison, NJ, USA) in Quarzglasküvetten (1 cm Schichtdicke) aufgenommen. Die Spaltbreite für Excitations- und Emissionsspalte betrug jeweils 1 mm bzw. 2 mm. Es wurden Fluoreszenzspektren zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Signaländerung des Proteins dPERIOD bzw. seiner Mutanten W482E und M560D aufgenommen. Hierzu wurde die Tryptophan-Fluoreszenz mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 360 nm verwendet. Mit der Methode sollte der Übergang vom dimeren zum monomeren Zustand beobachtet werden (vgl. Gl. 3.4.1.4) (Thakur *et al.*, 2006). Bei einer Erhöhung der Konzentration in der Küvette ändert sich die Quantenausbeute. Das Fluorophor hat im monomeren und im dimeren Zustand eine unterschiedliche chemische Umgebung. Deswegen sind die Emissionseigenschaften in den beiden Zuständen unterschiedlich. Es wurden die Spektren von verschiedenen Konzentrationen des Proteins aufgenommen und die Veränderung der Tryptophan-Fluoreszenz beobachtet. Um die Spektren miteinander vergleichen zu können, wurde die relative Fluoreszenz auf 1 normiert, da die Quantenausbeute auf Grund der unterschiedlichen Konzentrationen der Proben variierte. Zur Messung von Kinetiken (s. Kap. 4.3.1) wurde die Veränderung der Fluoreszenz über die Zeit gemessen (Winter & Noll, 2004).

3.4.3 Aufnahme von Polarisationspektren

Die Polarisation ist abhängig von den Freiheitsgraden eines Fluorophors und von der Masse des Moleküls, aber unabhängig von der Konzentration. Monomerisiert ein Molekül, nehmen die Freiheitsgrade des Moleküls zu und somit die Polarisation ab. Bei einer Dimerisierung nimmt folglich die Polarisation zu. Physikalisch gesehen stellt Fluoreszenzlicht eine transversale, sogenannte Dipolstrahlung dar. Diese hat in Bezug auf das emittierende Molekül, hier ein Tryptophan, eine definierte Richtung. Wird linear polarisiertes Licht auf

eine Probe mit gelösten, isotrop verteilten Fluorophoren eingestrahlt, so ist auch das emittierte Fluoreszenzlicht wieder polarisiert. Die Methode wurde genutzt, um Kinetiken von Übergängen vom monomeren zum dimeren Zustand bei Uhrenproteinen zu untersuchen. Ferner fand diese Methode zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten durch Titration Verwendung. Die Polarisation ist definiert durch den Zusammenhang (s. Gl. 3.4.3.1):

$$P_0 = \frac{I_{vv} - I_{vh}}{I_{vv} + I_{hh}} \quad (\text{Gl. 3.4.3.1})$$

I_{vv} , I_{vh} = Komponenten des Fluoreszenzlichts

P_0 = Polarisation

3.4.4 Massenspektrometrie

Unter dem Begriff der Massenspektrometrie werden Analysetechniken zusammengefasst, die zur Bestimmung von Molekülmassen im Hochvakuum dienen. Ein Massenspektrometer besteht aus den folgenden drei essentiellen Komponenten: Die Ionenquelle, in der Ionen aus der zu analysierenden Probe erzeugt werden, dem Massenanalysator, in welchem die Ionen nach ihrem Masse / Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt werden und zuletzt den Detektor, welcher das Massenspektrum liefert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Massenspektrometer des Typs Voyager DE Pro (Applied Biosystems) verwendet. Hierbei handelte es sich um ein MALDI-Massenspektrometer (*matrix-associated-laser-desorptions-ionization-mass-spectrometer*) (Karas & Hillenkamp, 1988). Dieses Gerät besitzt ein Flugrohr, das sogenannte TOF (*time of flight*), das als Massenanalysator genutzt wird. Tritt ein Ion in das Flugrohr ein, wird seine Geschwindigkeit in Richtung des Beschleunigermodus erhöht (s. Gl. 3.4.4.1-3). In der Theorie besitzen alle Ionen die gleiche kinetische Energie (E_{kin}):

$$E_{kin} = \frac{1}{2} m \times v^2 = z \times e \times U \quad (\text{Gl. 3.4.4.1})$$

Geschwindigkeit (v), mit der die Ionen durch das Flugrohr driften, ist gleich der zurückgelegten Strecke (L) pro Zeit (t). Somit ergibt sich:

$$\frac{1}{2} m \times L^2 \times 1/t^2 = z \times e \times U \quad (\text{Gl. 3.4.4.2})$$

Das Masse/Ladungsverhältnis ergibt sich wie folgt nach einer mathematischen Umformung der obigen Gleichung:

$$m/z = 2 \times e \times U \times t^2 / L^2 \quad (\text{Gl. 3.4.4.3})$$

M = Masse des Ions
 v = Geschwindigkeit des Ions nach der Bezugsstrecke
 z = Ladungszahl
 U = Spannung
 e = Elementarladung

Für die Vorbereitung der Probe wurden 5 μl der zu untersuchenden Proteinlösung mit 5 μl 0,2 % TFA (Trifluoressigsäure) gemischt. Von diesem Gemisch wurde ein Mikroliter mit 9 Mikrolitern Matrix aus Sinapinsäure versetzt. Die verwendete Matrix enthielt 50% einer 0,1% TFA-Lösung und 50% Acetonitril. In diese Lösung wurde eine Spatelspitze Sinapinsäure gegeben. Es wurde ein Mikroliter auf die Proben-Platte des Geräts aufgetragen.

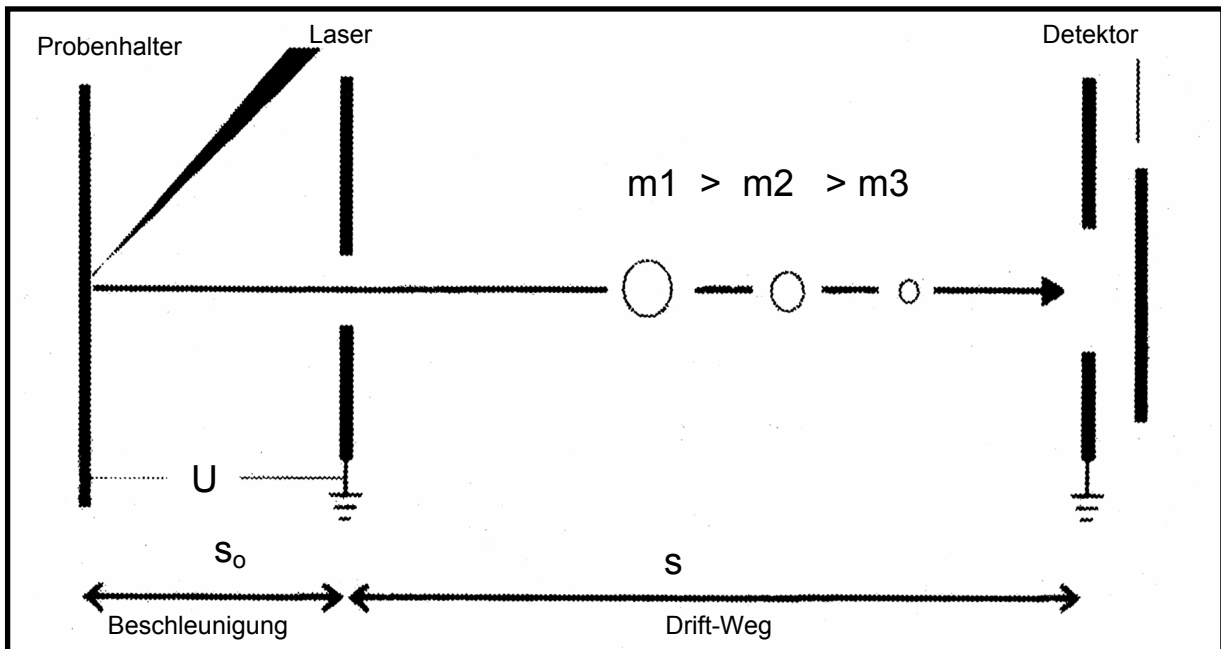


Abb. 3.5.2.1: Prinzip der MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Durch einen Laserstrahl werden Ionen der zu analysierenden Probe erzeugt, und durch eine Hochspannung (U) beschleunigt (s_0). Durch eine Öffnung treten die Ionen in das Flugrohr (TOF) ein, wo sie entsprechend ihrem Masse / Ladungsverhältnis getrennt werden. Ionen mit hoher Masse durchwandern den Driftweg (s) langsamer, als kleinere. Schließlich treffen die Ionen der Größe nach auf einen Detektor. (Aus dem Skript zum Praktikum „Biophysikalische Methoden“ der WWU Münster)

3.4.5 Untersuchung von Protein-Interaktionen durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Mit Hilfe eines BIAcore-Gerätes kann die Bindung eines Analyten an einem auf einem goldbeschichteten Chip immobilisierten Molekül gemessen werden (Schuck, 1997). Der Vorteil dieser Methode bei der Interaktionsanalyse besteht darin, dass keiner der beiden Interaktionspartner in irgendeiner Form, z.B. durch Radioaktivität oder fluoreszierende

Gruppen, markiert werden muss. Ferner kann die Reaktion in Echtzeit verfolgt werden und es sind von den Reaktanden nur geringe Mengen nötig. Die Detektion erfolgt durch Massenzunahme und damit verbundener Veränderung des Brechungsindex in der Nähe der Oberfläche der Trägermatrix.

Das System besteht aus einem Sensorchip, einem Laser, der polarisiertes Licht emittiert, einem Diodenarray-Detektor und einem automatischen Flusssystem. Das polarisierte Licht wird keilförmig mit Hilfe eines Prismas auf den Sensorchip fokussiert. An der Grenzfläche zwischen Glas und Goldfilm wird polarisiertes Licht unter Bedingungen der Totalreflektion eingestrahlt. Dieser Sensorchip besteht aus einer Glasschicht, die mit einer dünnen Goldschicht belegt ist. Darüber liegt eine Matrix, an der ein Fängermolekül immobilisiert werden kann. Eine Lösung des Analyten wird durch ein Flusssystem in eine Messzelle geleitet. Die Messzelle wird durch die Oberfläche des Sensorchips verschlossen. Die Bindung des Analyten wird durch das optische System detektiert. Das eingestrahelte, monochromatische Licht wird an der Goldschicht reflektiert. Ein Teil des Lichts dringt als sogenannte evaneszente Welle in die Goldschicht ein, wobei die elektrische Feldstärke der evaneszenten Welle in Form einer e-Funktion abnimmt. Diese evaneszente Welle kann nun das Elektronengas (Plasmon) der Goldschicht in Richtung der Grenzfläche anregen. Dieses Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz tritt nur bei einem bestimmten Einfallswinkel auf, der abhängig von der optischen Dichte der Matrix ist. Das reflektierte Licht weist unter dem entsprechenden Ausfallswinkel ein Intensitätsminimum auf, das als SPR-Winkel (*Surface Plasmon Resonance*) von dem Diodenarray detektiert wird. Bindet ein Analyt an das in der Matrix immobilisierte Fängermolekül, so ändert sich die optische Dichte, wodurch sich der SPR-Winkel ändert. Das BIAcore Gerät misst diesen SPR-Winkel als RU (*resonance units*). 1000 RU entsprechen einer Verschiebung des SPRWinkels um 360 Winkelsekunden bzw. einer Massenänderung in der Matrix von 1 ng/mm^2 .

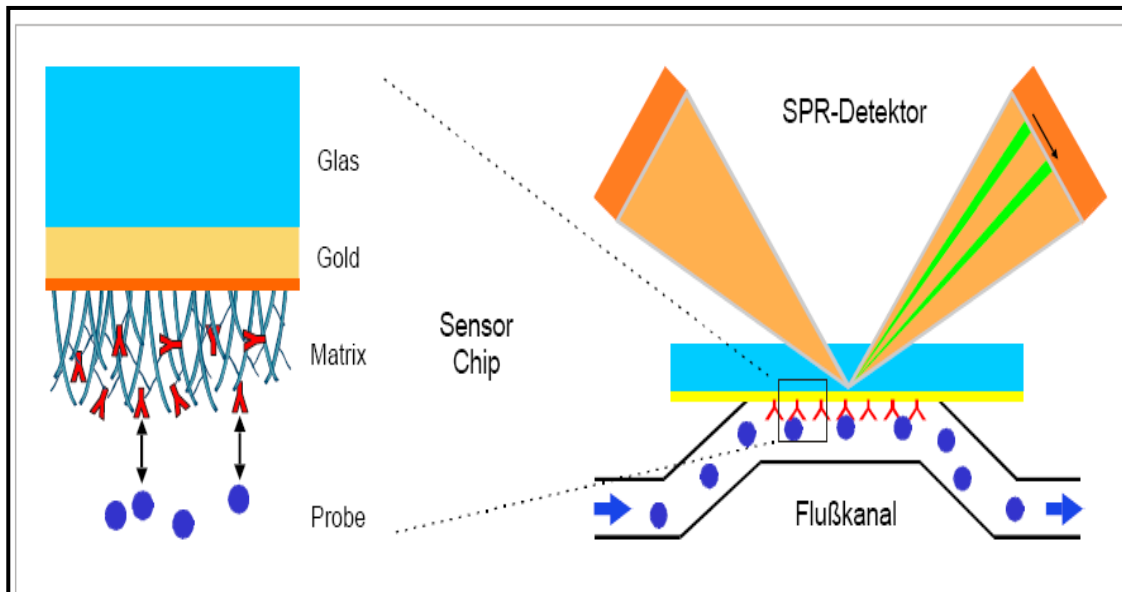


Abb. 3.4.5.1: Das Messprinzip der Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger, einer Goldfolie und einer Oberflächenmatrix. Bei Auftreffen des monochromatischen Lichtstrahls wird in der dünnen Goldschicht eine evaneszente Welle angeregt. Der optische SPR (Oberflächen-Plasmon-Resonanz) Detektor liegt an der Glasseite des Chips und misst die optischen Dichte der Matrix, die sich bei der Bindung eines Liganden ändert. Änderungen von weniger als 1 pg/mm^2 werden angezeigt (Quelle: BIACORE[®] Freiburg).

4. Ergebnisse

Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte ist unter Kapitel 2.13 aufgeführt. Die genannten Zahlenwerte beziehen sich auf Aminosäuren. Die Sequenzen der in dieser Diplomarbeit verwendeten Uhrenproteine sind im NCBI (National Center of Biotechnology information) unter folgenden Nummern zu finden: dPER: P07663).

4.1.1 Klonierung und Expression des Period-Fragments dPER 538-576 (α F) im prokaryotischen System *Escherichia coli*

Um die genaue Funktion der C-terminalen α F-Helix von dPERIOD untersuchen zu können, ist es notwendig, die genetische Information für diesen Proteinbereich in einen Expressionsvektor zu klonieren und in einem geeigneten System zu exprimieren. Das o. g. Fragment von dPER wurde in den Expressionsvektor pGEX-6p2 kloniert und als GST-Fusion exprimiert. Die verwendeten Oligonukleotide sind unter 2.11.4 aufgeführt. Die Klonierung erfolgte über die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI. Abb.4.1.1. zeigt ein 3% Agarosegel einer Kontrollrestriktion des Vektors pGEX-6p2 bei 4890 bp und dem DNA-Fragment für dPER 538-576 (α F) bei 120 bp. Das Konstrukt wurde in Zellen des *E. coli*-Stamms Rosetta transformiert (s. Kap. 3.1.11).

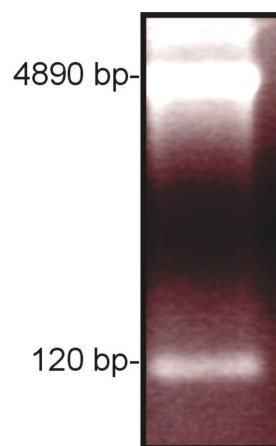


Abb. 4.1.1 Kontrollrestriktion des dPERIOD Konstruktes pGEX-6p2-dPER 538-576.

Es sind zwei distinkte Banden bei ~5000 bp und 120 bp zu beobachten, wobei die höher molekulare Bande den Vektor mit 4890 bp und die niedrigmolekulare bei 120 bp dem *dper* 538-576-Genfragment entspricht. Es wurden die Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Bam*HI verwendet.

Um die optimalen Expressionsbedingungen für das Fusionsprotein herauszufinden, wurde eine Testexpression (s. Kap. 3.3.2) in einem Volumen von 100 ml unter selektiven Bedingungen in TB-Medium durchgeführt. Die Probennahme erfolgte nach 0 h, 4 h, 6 h, 8 h und 16 h. Die Expression erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen, die Induktion der

Expression fand bei 0,1 mM IPTG und einer OD_{600} von 1,0 statt. In Abbildung 4.1.2 sind die Ergebnisse der Testexpression bei 20°C und bei 25°C dargestellt. Die Proben wurden auf ein 15% SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Nach gelelektrophoretischer Analyse der Proben konnte durch anschließende Coomassiefärbung in der Probe, die nach 4 h Induktionsdauer genommen wurde, bei 20°C und 25°C im Gel eine Bande bei 24 kDa und bei 30 kDa detektiert werden. Die 30 kDa Bande deutet auf Expression von GST- α F (30,8 kDa) hin, wohingegen die Bande bei 24 kDa auf eine zusätzliche Expression von GST (26 kDa) hinweist. Nach 8 h Expression nimmt die Intensität der oberen Bande bei 30 kDa ab und ist nach 16 h Expression gar nicht mehr erkennbar. Die Intensität der unteren Bande (26 kDa) bleibt ab der 4 Stunde über die gesamte beobachtete Induktionsdauer stabil. Die Intensität der oberen Bande bei 30 kDa ist wesentlich schwächer als die der unteren Bande bei 24 kDa.

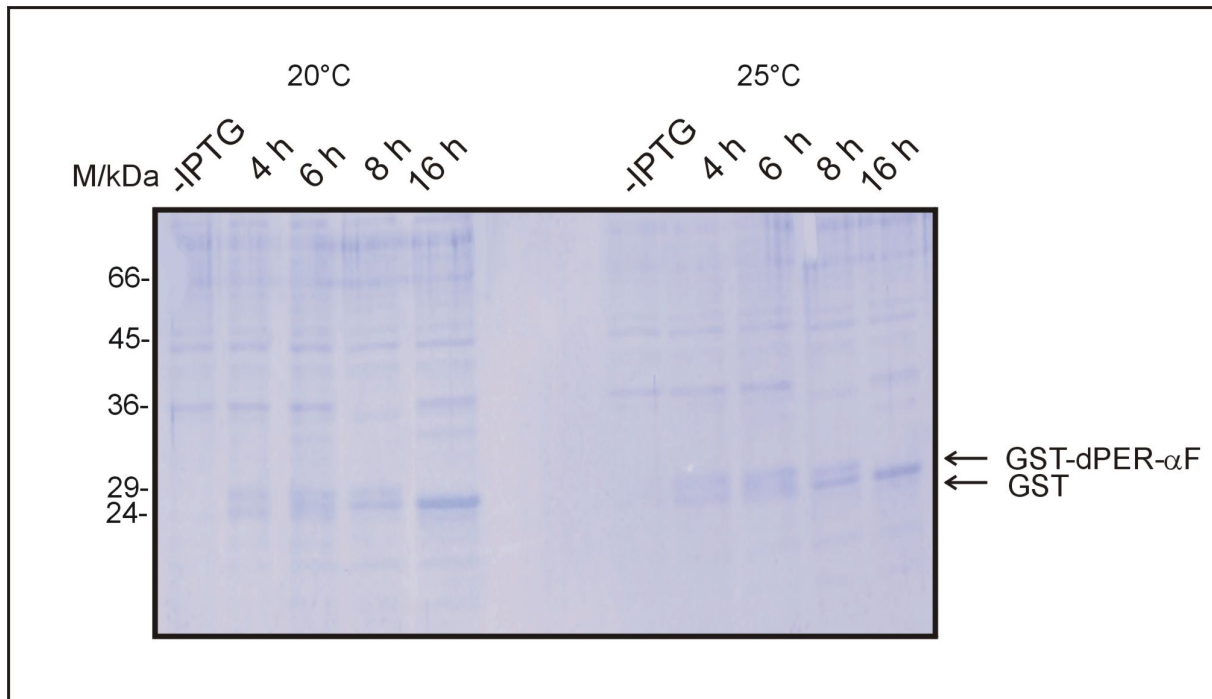


Abb.4.1.2: Ergebnisse des Expressionstests von dPER 538-576 (α F) als GST-Fusion bei 20°C und 25°C .

Nach 4 h ist bei 24 kDa eine Bande für GST und bei 30 kDa eine Bande, die auf das Fusionsprotein hindeutet, zu erkennen. Nach 8 h Expression ist die Bande bei 30 kDa nicht mehr zu erkennen. Die Proben wurden in einem 15% SDS-Gel analysiert.

In Abbildung 4.1.3 sind die Ergebnisse des Expressionstests bei 30°C und 37°C dargestellt. Auch hier ist nach 4 h Expression eine Bande bei 24 kDa, die auf GST-Expression hindeutet, zu erkennen und eine Bande bei 30 kDa, die auf Expression des Fusionsproteins hindeutet. Bei 30°C ist die Bande im Bereich von 30 kDa weniger intensiv als die Bande bei 24 kDa. Nach 8 h Expression nimmt die Intensität der Bande bei 30 kDa ab. Nach 16 h Expression ist bei 30°C nur die Bande bei 24 kDa überexprimiert, die Bande 30 kDa ist nicht mehr

erkennbar. Bei 37°C ist von 4 h bis 16 h eine konstante Zunahme der Überexpression des Fusionsproteins, Bande bei 30 kDa erkennbar. Gleichzeitig nimmt nach 4 h auch die Expression von GST zu. Für die folgenden Versuche wurde die Überexpression des Fusionsproteins GST- α F bei 37°C, 160 rpm und in *E. coli*-Zellen des Stamms Rosetta in TB-Medium durchgeführt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die bei 30°C und 37°C erhalten wurden, ist die Intensität der Banden bei 20°C und 25 °C wesentlich schwächer. Ebenso ist die Intensität der Bande bei 30 kDa, die auf das Fusionsprotein hindeutet, schwächer.

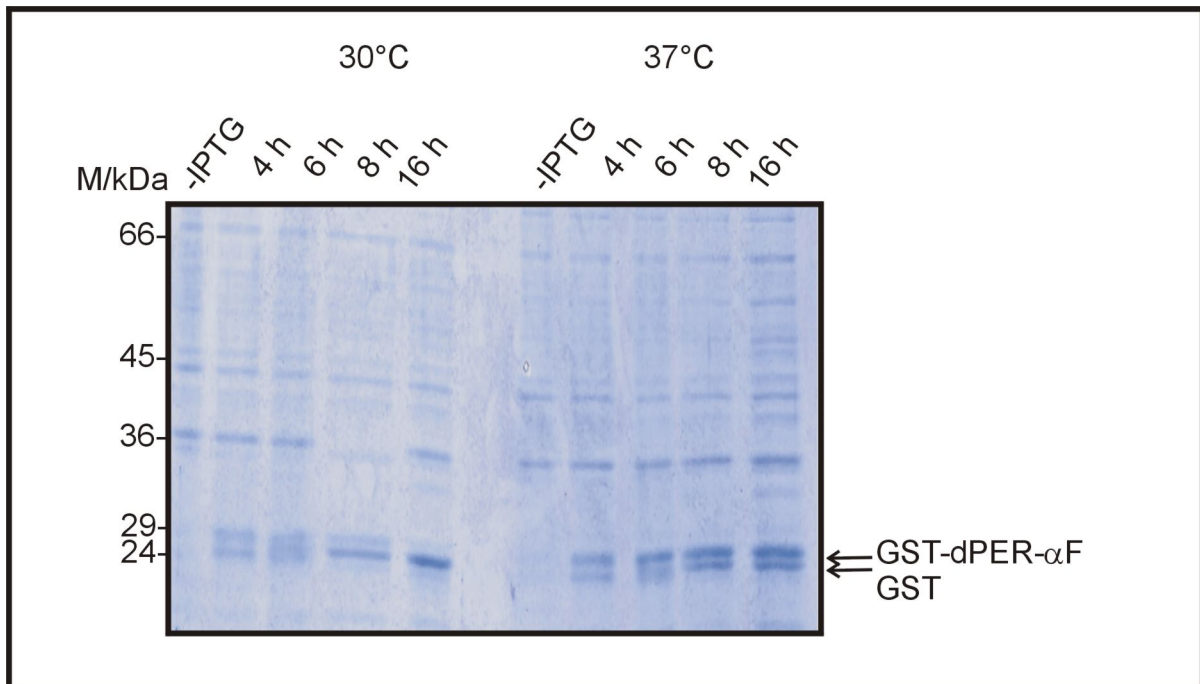


Abb. 4.1.3: Ergebnisse des Expressionstests von dPER 538-576 als GST-Fusion bei 30°C und 37°C

Nach 4 h ist bei 24 kDa eine Bande für GST und bei 30 kDa eine Bande für das Fusionsprotein zu erkennen. Bei 30°C ist nach 16 h keine Bande bei 30 kDa mehr zu beobachten. Bei 37°C ist jedoch eine konstante Zunahme der Überexpression des Fusionsproteins (30,8 kDa) zu erkennen. Gleichzeitig nimmt bei 37°C die Überexpression der Bande bei 24 kDa zu. Die Analyse erfolgte auf einem 15% Gel (Größenangaben in kDa).

Im nächsten Versuchsschritt zur Erstellung eines Reinigungsprotokolls für das dPER-Fragment 538-576 wurde ein Löslichkeitstest durchgeführt. Dieser hatte zum Ziel herauszufinden, ob GST- α F auch löslich und somit aus dem Überstand einer zuvor lysierten Probe einer Kultur isolierbar ist. Hierzu wurden 2 ml Zellkultur nach 8 h Induktion mit 0,1 mM IPTG induziert, anschließend geerntet und wie unter Kap. 3.3.3 beschrieben, lysiert. Dazu wurde das Zellpellet in Lysepuffer aufgenommen (siehe Kap. 2.6.3) und die Zellen lysiert. Nach einer Zentrifugation des Lysats folgte eine gelelektrophoretische Untersuchung des Pellets und des Überstandes (s. Kap. 3.3.8). Für den Löslichkeitstest wurde ein Puffer mit folgender Zusammensetzung verwendet: 400 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 14 mM β -

Mercaptoethanol und 1 mM EDTA (vergl. Kap. 2.6.3). In Abbildung 4.1.4 sind die Ergebnisse dargestellt: In den Proben der Pellets ist besonders bei 30°C Fusionsprotein bei 30 kDa und GST bei ca. 24 kDa in Form einer Bande zu erkennen. Bei jeder Expressionsbedingung ist in der Probe des Überstands eine Bande für das Fusionsprotein bei 30 kDa und für GST bei 24 kDa zu erkennen. Ferner ist Abb. 4.1.4 zu entnehmen, dass der Anteil an Fusionsprotein im löslichen Überstand bei den Zellen am Höchsten ist, die bei 37°C kultiviert wurden. Somit wurde für weitere Expressionen von GST- α F eine Temperatur von 37°C gewählt.

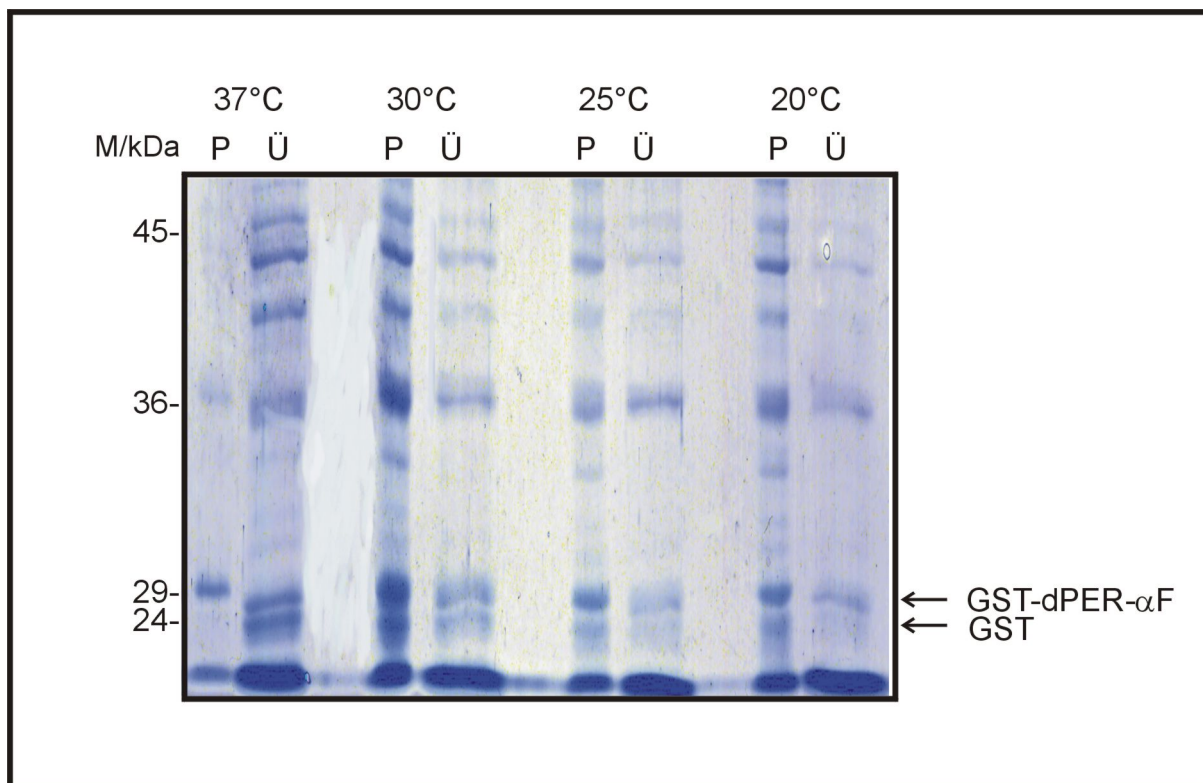


Abb.4.1.4 Löslichkeitstest für das Fusionsprotein GST-dPERIOD 538-576

Zur Überprüfung der Löslichkeit wurden die Pellets (P) und der lösliche Überstand (Ü) von Zelllysaten, die bei unterschiedlichen Expressionstemperaturen nach 8h genommen wurden, untersucht. Die Analyse der Proben erfolgte auf einem 15%-igen SDS-Gel. Das Ergebnis zeigt einen hohen Anteil an Fusionsprotein (MW 30 kDa) im löslichen Überstand. Dieser Anteil ist in der Kulturprobe am Höchsten, bei der die Zellen bei 37°C kultiviert wurden. Der Anteil an Fusionsprotein im Pellet ist bei 37°C vergleichsweise gering.

Mit den Ergebnissen von Expressions- und Löslichkeitsstudien wurde eine Reinigung (s. Kap. 3.3.5) mit dem Protein dPER 538-576 (α F) durchgeführt. Das Kulturvolumen der Anzucht betrug 5 Liter, die eingesetzte IPTG-Menge für die Induktion betrug 0,03 mM. Nach der Aufnahme des Zellpellets in Lysepuffer (siehe Kap. 2.6.3) folgte eine mechanische Lyse der Bakterien (s. Kap.3.3.4). Anschließend wurde die Suspension, wie in Kap. 3.3.4 beschrieben, abzentrifugiert. Abbildung 4.1.5 (s. S 66) fasst den Verlauf der Proteinreinigung zusammen. Die Proben wurden auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und

elektrophoretisch analysiert (s. Kap. 3.3.8). Nach der Induktion der Genexpression durch IPTG ist eine Bande bei 26 kDa für GST und eine bei 30 kDa für das Fusionsprotein zu erkennen. Das Gesamtlysat (G) der Bakterien zeigt eine starke Expression des Fusionsproteins und von GST. Die Probe des löslichen Überstands (Ü) des Zelllysats zeigt einen hohen Gehalt von Proteinen bei 26 kDa und 30 kDa, die Mengen an Fusionsprotein und GST im Pellet (P) sind annähernd gleich. Der lösliche Überstand des Zelllysats wurde auf eine GSH-Säule gegeben (siehe Kap. 3.3.5). Im Durchlauf der GSH-Säule (D) und in der Probe des darauffolgenden Waschschritts (W) ist kein Fusionsprotein im Gel nachweisbar. Nach der Elution wurde das Eluat konzentriert (siehe Kap. 3.3.13) und es erfolgte eine Größenausschlusschromatographie (S 200 16/60) (s. Kap. 3.3.7). Durch diesen Schritt wurde das Protein in einen anderen Puffer (siehe Kap. 2.6.4) überführt. Ferner sollte versucht werden, die Proteine GST und GST- α F durch die Methode der Größenausschlusschromatographie zu trennen. Abbildung 4.1.6 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der gesammelten Fraktionen. Das aufgetragene Proteingemisch aus GST (MW 26 kDa) und dem Fusionsprotein GST- α F (30,8 kDa) konnte durch diese Methode nicht voneinander getrennt werden. Besonders in der Probe des Auftrags auf die Säule der Größenausschlusschromatographie (A GF) zeigte sich, dass bei der Expression eine hohe Menge GST (26 kDa), aber nur eine vergleichsweise geringe Menge Fusionsprotein (30,8 kDa) entstanden ist.

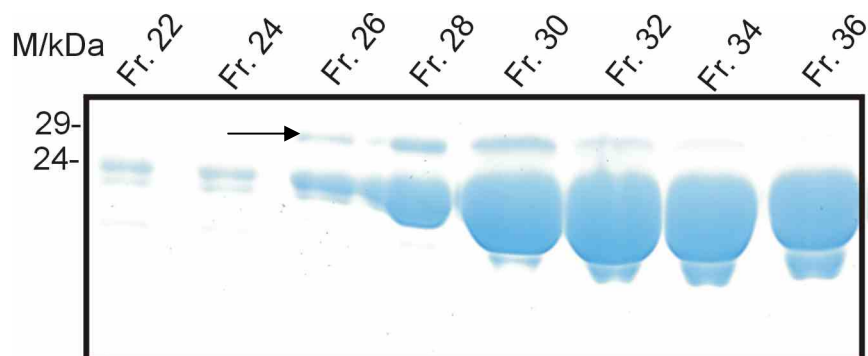


Abb. 4.1.6 Gelelektrophoretische Analyse der gesammelten Fraktionen der Größenausschlusschromatographie

In den Proben der Fraktionen 26-32 ist GST- α F (30,8 kDa) zu erkennen sowie GST (26 kDa). Das Fusionsprotein ist durch einen schwarzen Pfeil markiert. Die Proteine wurden nicht voneinander getrennt. Die Analyse erfolgte auf einem 12%-igen SDS Gel.

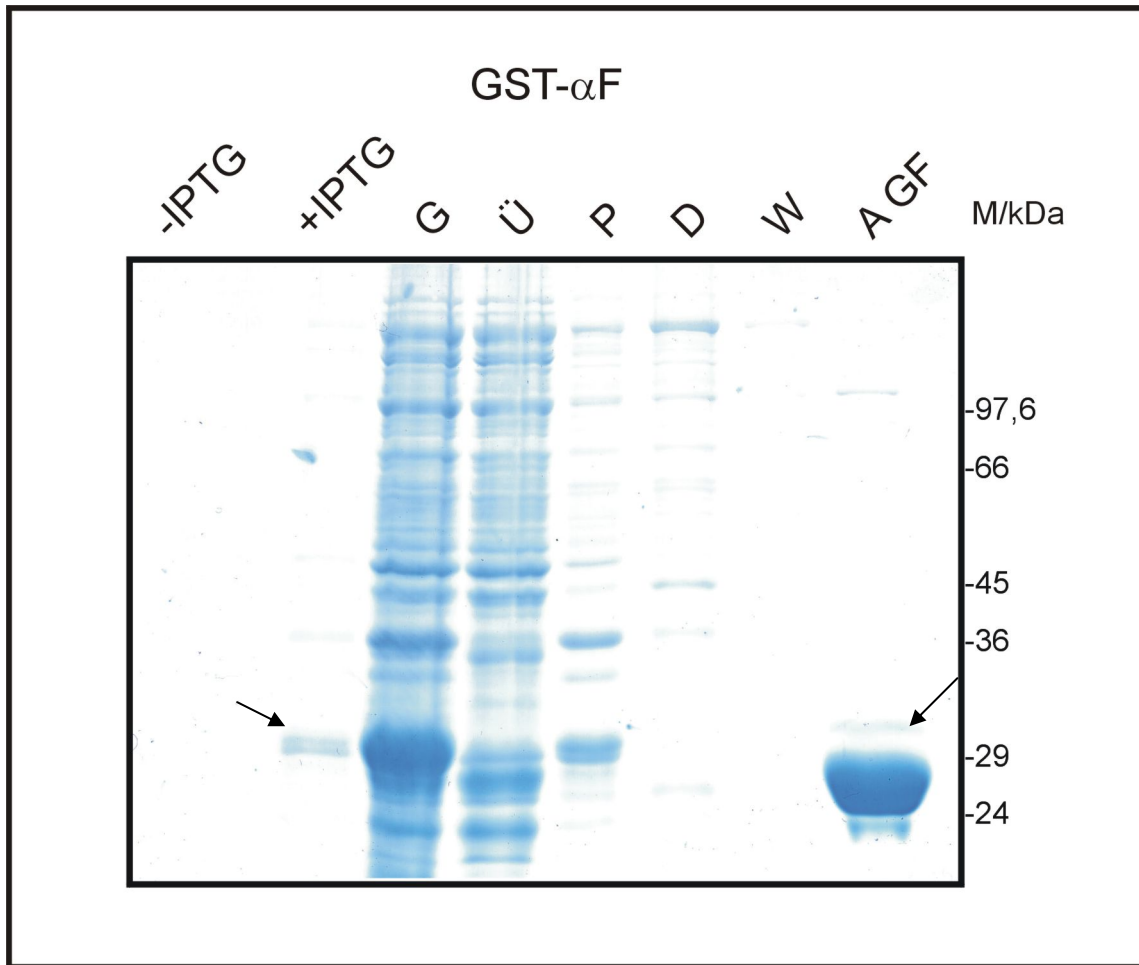


Abb. 4.1.5 Reinigung des Fusionsproteins GST- α F mittels GSH-Affinitätsmatrix

Nach der Zugabe von IPTG ist deutlich eine Expression des Fusionsproteins in Form einer Bande bei 30 kDa zu erkennen. Im Gesamtlysats der Zellen (**G**) ist zu erkennen, dass neben reinem GST viel Fusionsprotein synthetisiert worden ist. Das Fusionsprotein befindet sich im löslichen Überstand des Zelllysats (**Ü**), im Pellet (**P**) ist annähernd gleich viel zu finden. In der Probe des Durchlaufs der Säule (**D**) ist nur wenig Fusionsprotein zu erkennen und beim Waschschrift (**W**) ist gar kein Fusionsprotein nachweisbar. Nach dem Konzentrieren ist in der Lösung viel GST und eine vergleichsweise geringe Menge Fusionsprotein GST- α F zu finden (**A GF**). Mit der konzentrierten Proteinlösung wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die Proben wurden auf einem 12%-igen SDS-Gel analysiert. Das Fusionsprotein ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Nach der Größenausschlusschromatographie wurden die Fraktionen gelelektrophoretisch untersucht und die proteinhaltigen Proben vereinigt (s. Kap. 3.3.7). Nach einem weiteren Konzentrationsschritt wurde die Konzentration der Proteinlösung, wie unter Kapitel 3.3.12 beschrieben, bestimmt. Die Proteinausbeute betrug 28 mg/ml, insgesamt wurden 84 mg Protein gereinigt. Es ist zu berücksichtigen, dass der Großteil des gereinigten Proteins aus GST bestand (s. Abb. 4.1.5 u 4.1.6). Im darauffolgenden Versuchsschritt wurde die Proteinlösung für mindestens 4 h bei 4°C mit der Protease Prescission verdaut, um den GST-Anteil vom Fusionsprotein GST- α F abzuspalten (siehe 3.3.11). Nach jeder Stunde wurde eine Probe genommen, die mittels MALDI-MS (s. Kap. 3.4.4) und SDS-PAGE analysiert wurde. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.1.7 sowie 4.1.8 dargestellt. dPER 538-576 (α F) ist in einem 18%-igen Tris-Tricin Gel (siehe Kap. 3.3.9) als Bande bei 4,8 kDa zu erkennen. Sein Anteil nimmt über die Zeit zu. In der Probe, die nach der Inkubation über Nacht gemessen wurde, ist die Bande bei 4,8 kDa schwächer im Vergleich mit der Probe nach 4 h. Ferner ist in jeder Probe eine erheblich größere Menge GST als Bande bei 24 kDa zu sehen. Die Massenspektren der MALDI-MS-Analyse zeigen einen Peak bei 4,8 kDa. Nach der Spaltung des Fusionsproteins wurde das in der Probe vorhandene GST über eine 5 ml GSH-Säule aus der Lösung entfernt. Nach diesem Schritt konnte das reine dPER-Fragment α F nicht mehr nachgewiesen werden. Es zeigte sich kein Peak im Schreiberausdruck der FPLC-Anlage, ebenso war das Protein in einer Elutionsfraktion nicht nachzuweisen. Weder eine gelelektrophoretische Untersuchung aller Fraktionen brachte einen Erfolg noch eine vorherige Konzentration aller Fraktionen. Die Detektion des Eluats erfolgte bei 280 nm. Auch durch eine Beobachtung des Eluats der GSH-Säule bei einer Wellenlänge von 254 nm (Peptidkette des Proteins) konnte das Proteinfragment dPER538-576 (α F) nicht detektiert werden.

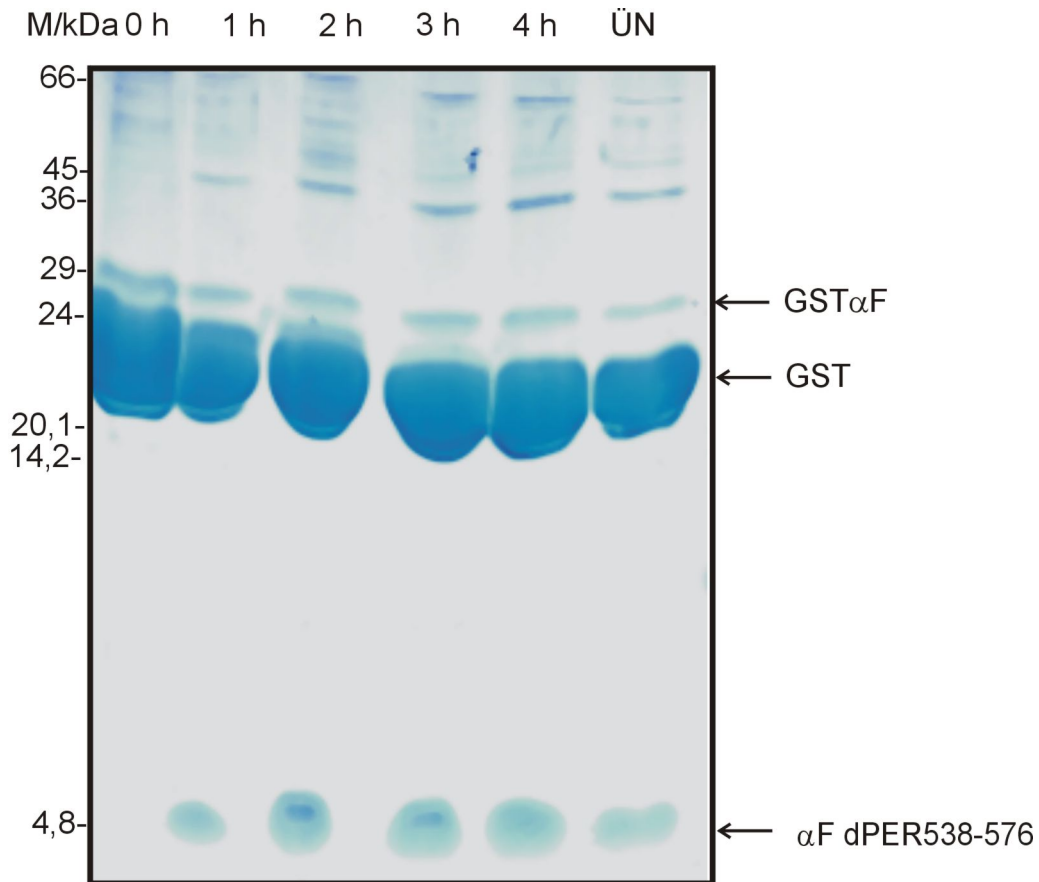
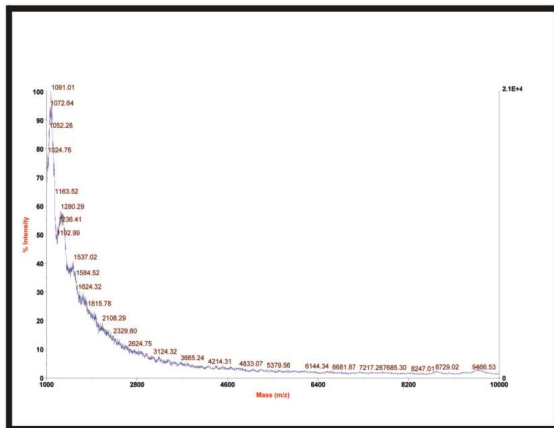
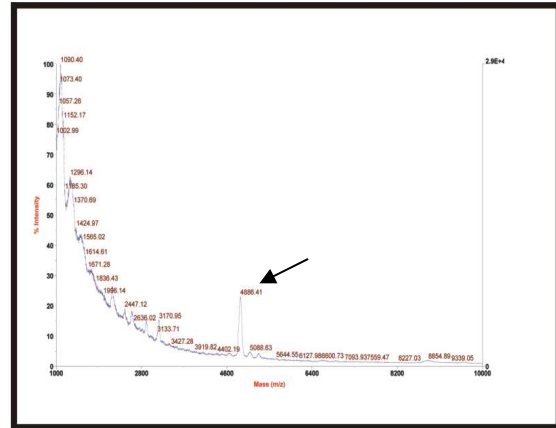


Abb. 4.1.7 Ergebnisse des Verdaus von GSTdPER 538-576 mit Precision-Protease:

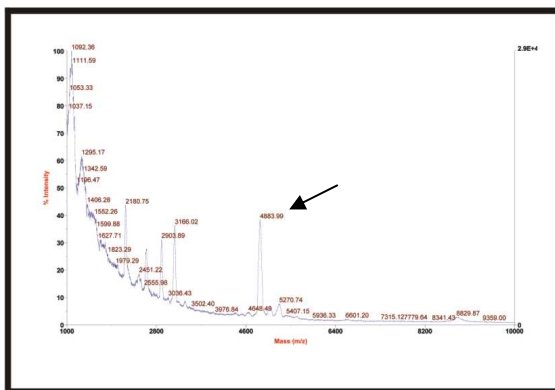
Bereits nach einer Stunde Inkubationszeit ist im Gel eine Bande bei 4,8 kDa zu erkennen, die genau der Größe des Proteins dPER 538-576 (α F) entspricht. Ferner ist eine erheblich größere Menge GST (24 kDa) zu erkennen. Im Vergleich zur Menge an GST ist die Menge an enthaltenem dPER 538-576 (α F) gering. Die Menge an dPER 538-576 (α F) nimmt über die Zeit hin zu. Die Analyse der Proben erfolgte auf einem 18%-igen Tris-Tricine Gel.



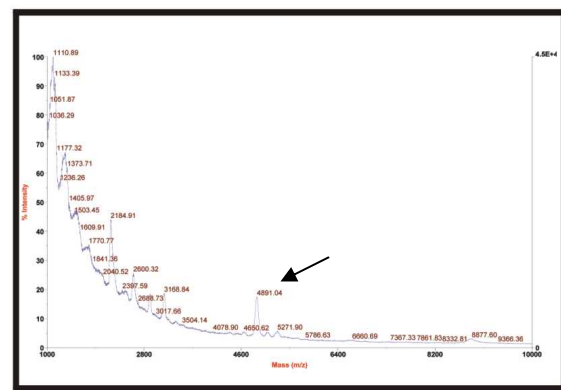
1.



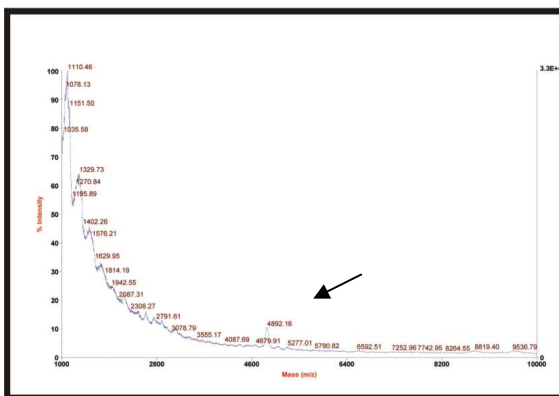
2.



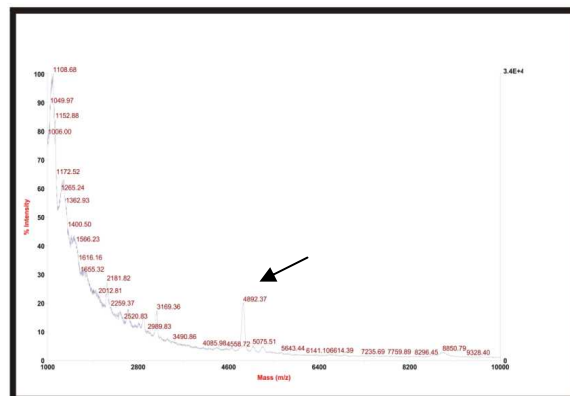
3.



4.



5.



6.

Abb. 4.1.8: Massenspektren (MALDI-MS) der Proben des Verdaus von GSTdPERIOD 538-576 mit Precision-Protease: 1. vor Zugabe der Precision Protease, 2. nach 1 h Inkubation, 2) 2 h Inkubation 3) 3 h Inkubation 4) 4 h Inkubation 5) 5 h Inkubation. 6) Inkubation über Nacht. Nach 1 h ist im Spektrum ein Peak bei 4,8 kDa (schwarzer Pfeil) zu erkennen. Diese Größe entspricht dem Molekulargewicht des gesuchten Proteinfragments dPERIOD 538-576 (α F).

4.2. Interaktionstest zwischen αF (dPERIOD 538-576) und dPERIOD $\Delta\alpha F$ (232-538)

Wie unter Kap. 1.4.2 beschrieben, ist die C-Terminale Helix (αF) des Uhrenproteins dPERIOD unerlässlich für seine Dimerisierung (Yildiz *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurden Versuche durchgeführt, um die Bindung der αF an die PAS A-Domäne von dPERIOD zu quantifizieren und eine Kinetik der Bindung zu erstellen.

4.2.1 Durchführung Interaktionsstudien von GST- αF mit dPERIOD 232-538

Mit der Pull-Down-Methode (s. Kap. 3.3.14) sollte zunächst nachgewiesen werden, ob eine Bindung der GST αF und der PAS A Domäne von dPER $\Delta\alpha F$ (232-538) stattfindet. Dazu wurde GST-fusionierte αF -Helix an eine magnetische GSH-Matrix gekoppelt und anschließend mit dPER $\Delta\alpha F$ inkubiert. Die hierzu verwendete GST fusionierte αF -Helix wurde, wie unter Kapitel 3.1 beschriebene, gereinigt. Auch hier konnte aus den unter Kapitel 4.1 genannten Gründen nur ein Gemisch aus GST und GST-fusionierter αF eingesetzt werden. Als Negativkontrollen wurde die magnetische GSH-Matrix mit gereinigtem GST und dPER $\Delta\alpha F$ sowie nur mit dPER $\Delta\alpha F$ inkubiert. Damit sollte sichergestellt werden, dass es nicht zu einer Bindung zwischen GST und dPER $\Delta\alpha F$ sowie zu einer Bindung zwischen der Matrix und dPER $\Delta\alpha F$ kommt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.1 dargestellt. Der Versuch wurde, wie unter 3.3.14 beschrieben, durchgeführt. Es wurden 30 μl GSH Matrix eingesetzt. Es konnten von einem Mikroliter Matrix insgesamt 7 μg Protein gebunden werden. Somit wurden von dPER $\Delta\alpha F$ 0,21 mg eingesetzt, von der GST- und der GST- αF -Lösung ebenfalls 0,21 mg. Nach jedem Inkubations-/Waschschritt wurde eine Probe des Überstands genommen und gelelektrophoretisch analysiert.

In Spur 1 befindet sich eine Probe des Überstands der unbehandelten Matrix in Puffer. Spur 2 zeigt eine Probe nach der Inkubation der Matrix mit GST αF . Im hier analysierten Überstand ist eine Bande bei 30 kDa zu erkennen. Spur 3 enthält eine Probe nach der Inkubation der Matrix mit GST. Auch hier konnte ungebundenes Protein im Gel nachgewiesen werden. In der Spur ist eine Bande bei 26 kDa zu sehen. Nach der Inkubation mit dem Bindungspartner dPER $\Delta\alpha F$ ist in Spur 4 bei 36 kDa eine Bande zu erkennen. Ferner ist auch in den Spuren 5 und 6 eine Bande vorhanden, da dieser Bindungspartner im Überschuss eingesetzt wurde. Die Proben des Hochsalzschritts in den Spuren 7, 8 und 9 zeigen keine Proteinbanden. Die Ergebnisse der Elution sind in den Spuren 10, 11 und 12 dargestellt. In Spur 10 sind keine Proteinbanden zu beobachten, hier wurde eine Probe von dPER $\Delta\alpha F$ nach Inkubation mit der

Matrix aufgetragen. Spur 11 zeigt eine Proteinbande bei 30 kDa und eine weitere ist bei 24 kDa vorhanden. Spur 12 zeigt das Ergebnis der Inkubation von GST und dPER $\Delta\alpha$ F, hier kann eine Bande bei 24 kDa GST beobachtet werden.

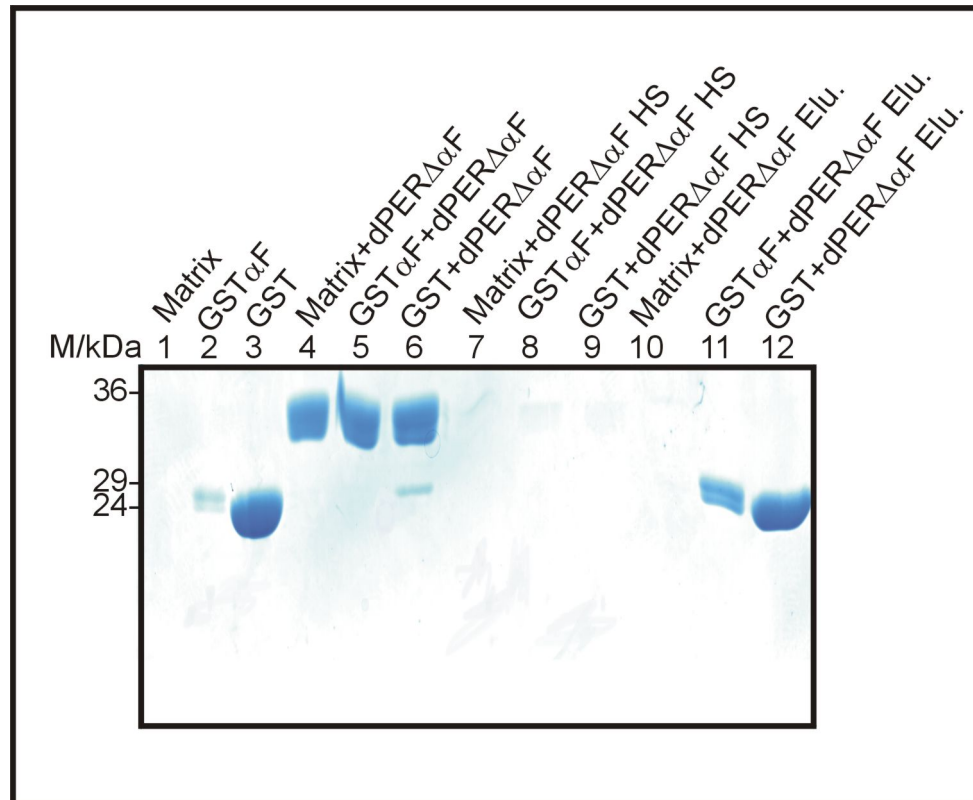


Abb. 4.2.1. Ergebnisse der Interaktionsstudien mit einer magnetischen GSH-Matrix

Die Inkubation der GSH-Matrix mit GST (26 kDa) und GST α F (30,8 kDa) zeigt, dass beide Proteine im Überschuss eingesetzt wurden (Spur 2-3). Spur 2 zeigt eine Bande bei 30 kDa und eine bei 26 kDa. Des Weiteren wurde auch der Interaktionspartner dPER $\Delta\alpha$ F in Niedrigsalz-Puffer im Überschuss eingesetzt (Spur 4, 5, 6), es sind Banden bei 36 kDa zu erkennen. Die Proben des Hochsalzschritts zeigen keine Proteinbanden. In Spur 10 ist ebenfalls keine Proteinbande zu erkennen. Spur 11 weist zwei nah beieinander liegende Banden bei 26 kDa und 30 kDa auf. In Spur 12 ist keine Bande erkennbar. HS = Hochsalz, Elu.= Elution

4.2.2 Erstellung einer Bindungskinetik zwischen dPER $\Delta\alpha$ F und der α F-Helix mittels Oberflächen-Plasmonresonanz.

Um eine Bindungskonstante sowie die Dissoziations- (k_{off}) und Assoziationskonstante (k_{on}) zwischen dPER $\Delta\alpha$ F und der α F herauszufinden, wurde die α F als GST-Fusion an eine entsprechende Matrix eines Chips gekoppelt (siehe Kap. 3.4.5). Um die Stärke der postulierten Wechselwirkung mit der PAS A-Domäne messen zu können, wurde dPER $\Delta\alpha$ F an der mit GST- α F besetzten Matrix vorbeigespült. In Abbildung 4.2.2 sind die Ergebnisse dargestellt. Kurz nach Auftragen der dPER $\Delta\alpha$ F ist ein unmittelbarer Anstieg des SPR-Signals

zu Beginn der Injektion zu beobachten (ca. 1200 s). Nach Beendigung der Injektion erkennt man einen plötzlichen Abfall des SPR-Signals (ca. 1600 s). Während der Messung ist keine Änderung des SPR-Signals zu beobachten, was im Falle einer Bindung der beiden Proteine zu erwarten gewesen wäre.

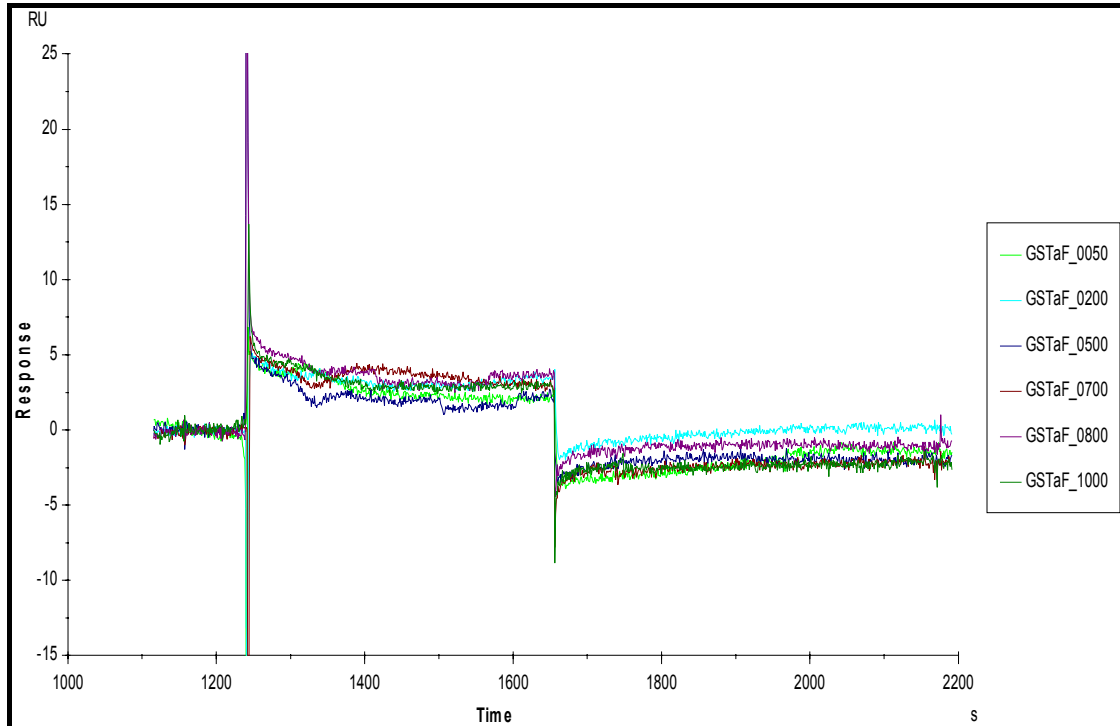


Abb.4.2.2: Ergebnisse der Oberflächenplasmonresonanz zum Erstellen einer Bindungskinetik zwischen der α F-Helix (dPERIOD 538-576) und der PAS-A Domäne von dPERIOD 232-538. Es wurde GST- fusionierte α F-Helix eingesetzt und an die Matrix des Chips gekoppelt. Anschließend wurde dPER Δ α F in verschiedenen Konzentrationen an die gesättigte Matrix gebracht, um die Interaktion zwischen dPER Δ α F und der α F-Helix zu messen.

4.3 Erstellung von Monomerisierungskinetiken von Wildtyp und Mutanten des Uhrenproteins dPERIOD 232-599 durch Fluoreszenzspektroskopie

Zur Erstellung von Monomerisierungskinetiken wurde die Methode der Fluoreszenzspektroskopie genutzt. Als optische Sonde dienten die im Protein vorhandenen Tryptophane. Es wurden sowohl Fluoreszenz- als auch Polarisationspektren aufgenommen (Kap. 3.4.2 und 3.4.3). Zunächst wurden von dPER 232-599 WT und den Mutanten M560D sowie W482E Fluoreszenzspektren aufgenommen. Dabei wurde die Tryptophan-Fluoreszenz verwendet. Bei dem Versuch kamen Lösungen unterschiedlicher Konzentration des Proteins zum Einsatz. Mittels einer Verdünnungsreihe wurde die Änderung der Tryptophanfluoreszenz gemessen, indem man die Konzentration schrittweise bis unter den Wert des entsprechenden K_D erniedrigte. Der Versuch wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die Methode zur

Messung von Monomerisierungskinetiken geeignet ist. Im Falle einer Monomerisierung erwartet man eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums bzw. eine Änderung des Polarisations signals

4.3.1 Aufnahme von Fluoreszenzspektren von dPERIOD 232-599, sowie ausgewählter Mutanten

Die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums des dPER Wildtyps ($K_D = 0,2 \mu\text{M}$) ergab keine Änderung in der Fluoreszenz. Es zeigt sich keine Verschiebung des Maximums bei Verringerung der Konzentrationen. Alle Spektren liegen mitunter deckungsgleich übereinander. Die Analyse der Daten ergab, dass das Spektrum der Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ bereits ein starkes Rauschen aufwies. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3.1.1 dargestellt (siehe Kap. 3.4.2 und 3.4.3).

Die gleiche Messung wurde mit der dPER-Mutante W482E ($K_D = 4,0 \mu\text{M}$) (unveröffentlicht) durchgeführt, die ein Tryptophan weniger besitzt. Allerdings ist auch hier das Spektrum der Probe unterhalb einer Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ verrauscht. Auch die Verschiebung der Maxima ist nicht zu erkennen. Stattdessen ist eine Verbreiterung des Spektrums hin zu höheren Wellenlängen zu beobachten. Die Messergebnisse sind in Abbildung 4.3.1.2 dargestellt. Des Weiteren wurden Spektren mit der dPER-Mutante M560D (232-599) ($K_D = 7,0 \mu\text{M}$) durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3.1.3 und 4.3.1.4 dargestellt. Es ist eine gleichmäßige Verschiebung der Maxima zu höheren Wellenlängen bei niedriger werdenden Konzentrationen zu beobachten. Die Werte des Spektrums, das bei einer Konzentration von $0,02 \mu\text{M}$ aufgenommen wurde, wiesen ebenfalls Rauschen auf. Die Daten des Spektrums, das bei einer Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ aufgenommen wurde, zeigten kein Rauschen. Es konnte eine Rot-Verschiebung von 335 nm auf 342 nm beobachtet werden. Die Proben wurden nach dem Einstellen der entsprechenden Konzentration vor der Messung über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. In Abbildung 4.3.1.4 ist die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine kinetische Messung durchgeführt und die Veränderung der Fluoreszenz einer $0,4 \mu\text{M}$ Lösung der dPER M560D-Mutante über die Zeit beobachtet. Die Anregung erfolgte bei 280 nm , die Detektion bei 340 nm . Gleichzeitig wurde eine Kontrollmessung durchgeführt. Hierzu inkubierte man eine Proteinlösung gleicher Konzentration über Nacht im Dunkeln und beobachtete anschließend das Fluoreszenzsignal über die Zeit. In beiden Messungen sind die gleichen Anfangswerte sowie eine Abnahme des Fluoreszenzsignals zu beobachten (s. Abb. 4.3.1.5).

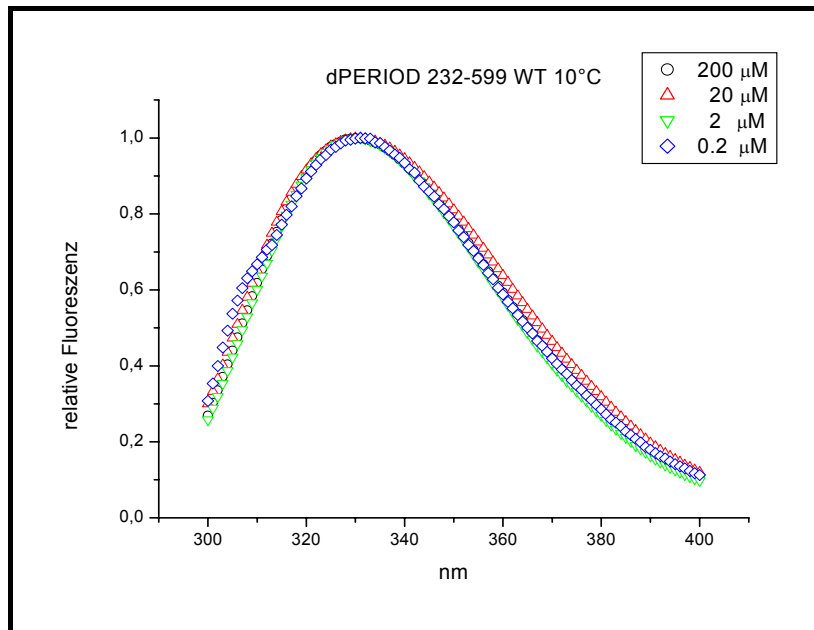


Abb. 4.3.1.1: Fluoreszenzspektrum von dPER 232-599 WT ($K_D = 0,2 \mu\text{M}$) bei unterschiedlichen Konzentrationen. Die Maxima der Spektren verschieben sich nicht bei Erniedrigung der Konzentration. Das Spektrum der Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ zeigt starkes Rauschen. Als optische Sonde dienen die Tryptophane des Proteins. Die Aufnahme des Spektrums wurde bei 10°C durchgeführt. Das Spektrum der Probe der Konzentration $200 \mu\text{M}$ ist verdeckt.

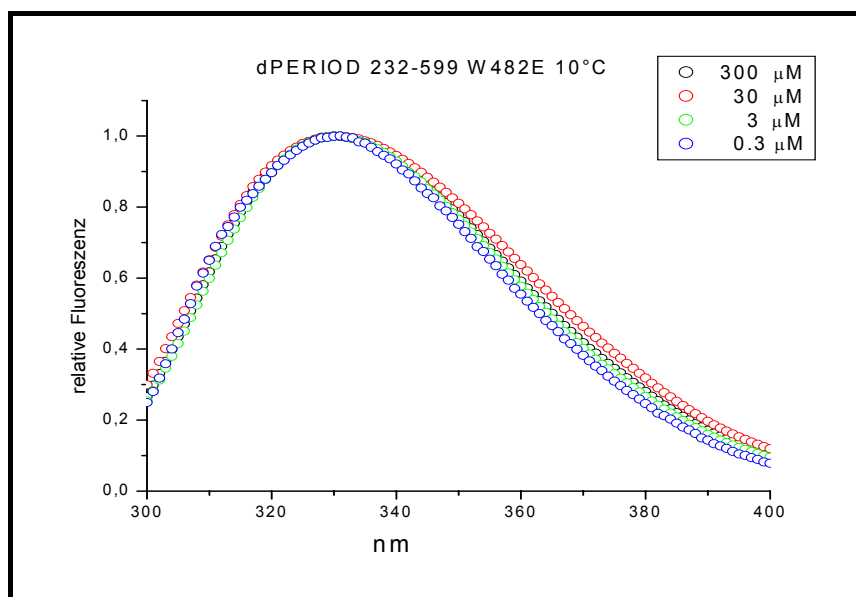


Abb. 4.3.1.2: Fluoreszenzspektrum von dPER 232-599 W482E ($K_D = 4,0 \mu\text{M}$) bei unterschiedlichen Konzentrationen. Bei den aufgenommenen Spektren ist keine Verschiebung der Maxima zu beobachten. Das Spektrum der Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ zeigte starkes Rauschen. Als optische Sonde diente hier das Tryptophan des Proteins. Die Messung wurde bei 10°C durchgeführt.

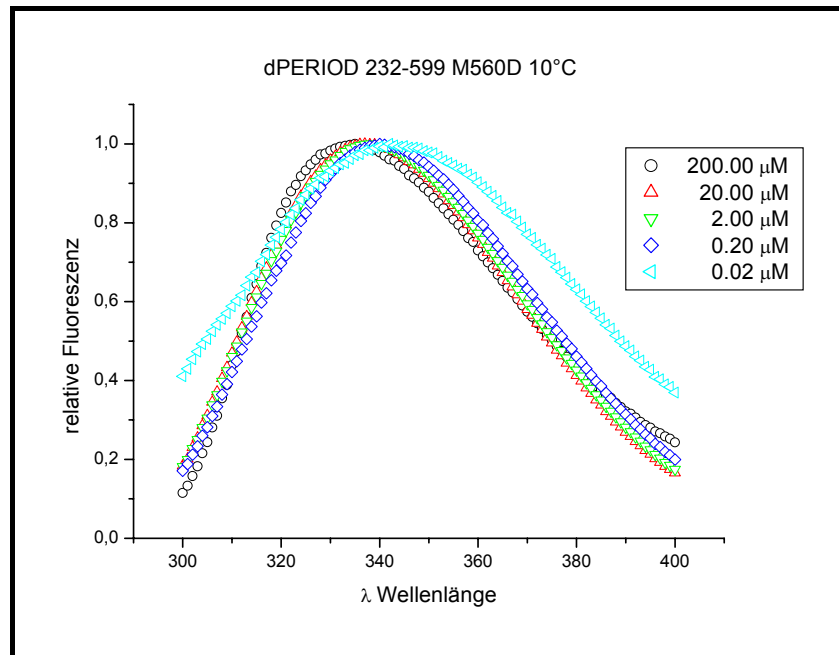


Abb. 4.3.1.3: Fluoreszenzspektrum von dPER 232-599 M560D ($K_D = 7,0 \mu\text{M}$) bei unterschiedlichen Konzentrationen. Die Spektren zeigen eine konstante Verschiebung zu höheren Wellenlängen, je niedriger die Konzentration des eingesetzten Proteins wird. Insgesamt kann eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 7 nm beobachtet werden. Das Spektrum, das bei einer Konzentration von $0.02 \mu\text{M}$ aufgenommen wurde ist teilweise verrauscht. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 10°C durchgeführt. Als optische Sonde dienten die Tryptophane des Proteins.

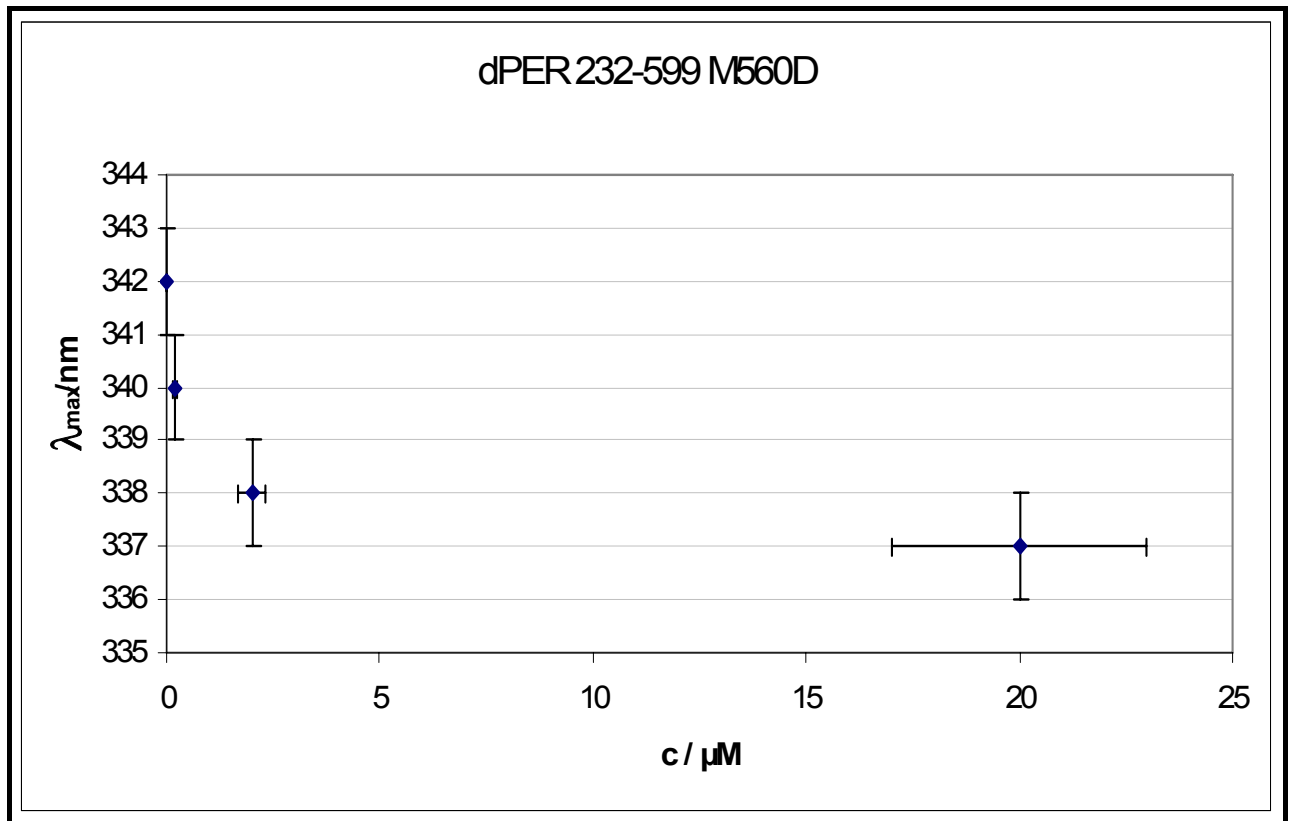


Abb. 4.3.1.4: Auftrag der Konzentration von dPER 232-599 M560D gegen das Fluoreszenzmaximum: Das Maximum der Tryptophanfluoreszenz verschiebt sich bei niedrigeren Konzentrationen zu höheren Wellenlängen (vergl. Abb. 4.3.1.3). Die Probe der Konzentration 200 μM ist nicht dargestellt.

Da bei der Vermessung der dPER Mutante M560D eine Änderung des Fluoreszenzmaximums zu beobachten war, wurde eine kinetische Messung durchgeführt. Dazu wurde die Änderung des Signals der Tryptophanfluoreszenz einer Proteinlösung in einer Konzentration von 0,4 μM über die Zeit gemessen. Dazu wurde eine mit Puffer gefüllte Küvette im Spektrometer bei 10°C äquilibriert. Nach dem Einstellen der Temperatur wurde eine entsprechende Menge der Proteinlösung hinzupipettiert und die Messung sofort gestartet. Als Kontrollmessung wurde eine Lösung gleicher Konzentration im Dunkeln inkubiert und anschließend die gleiche Messung durchgeführt. Beide Messungen wiesen die gleichen Werte und den gleichen Abfall des Fluoreszenzwertes auf. Die Probe wurde bei 280 nm angeregt, die Detektion erfolgte bei 340 nm.

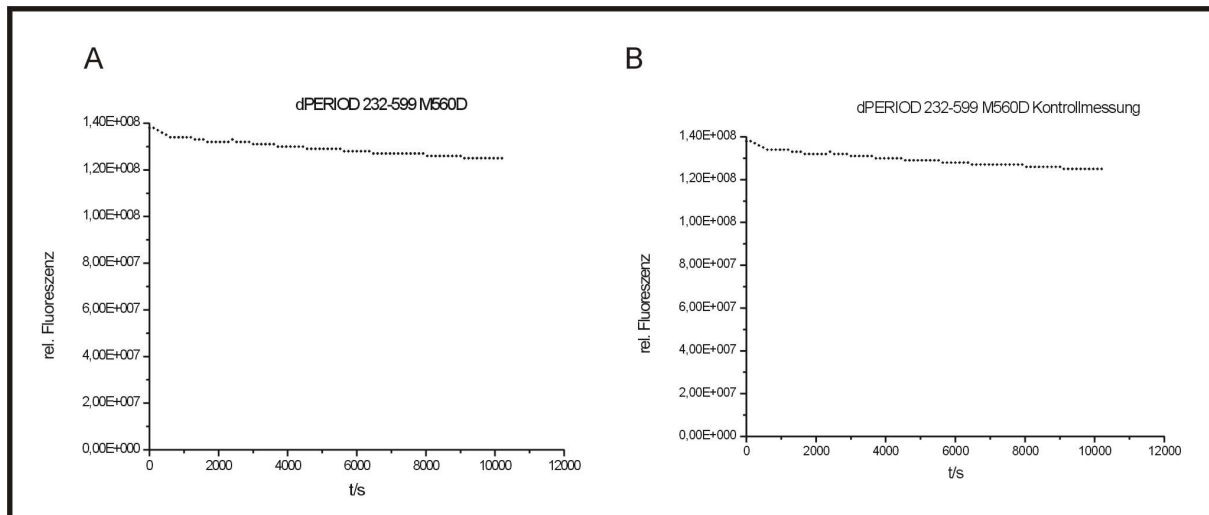


Abb. 4.3.1.5 Beobachtung der Fluoreszenzänderung von dPER M560D (232-599) über die Zeit. Der Verlauf des Graphen zeigt eine stetige Abnahme der relativen Tryptophanfluoreszenz von $1,38 \cdot 10^8$ auf $1,25 \cdot 10^8$. Die Kontrollmessung lieferte den gleichen Abfall der relativen Tryptophanfluoreszenz. Die Konzentration der Probe betrug $0,4 \mu\text{M}$. Die Messung wurde bei einer Temperatur von 10°C durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 280 nm , die Detektion erfolgte bei 340 nm .

4.4. Erstellung einer Dissoziationskonstanten K_D von dPER 232-599 WT und dPER 232-599 M560D durch Titration

In einem weiteren Versuch sollten die bereits durch analytische Ultrazentrifugation ermittelten Daten (persönliche Kommunikation AG Wolf, unveröffentlicht) der Dissoziationskonstanten von dPER 232-599 und dPER 232-599 M560D durch Titration (s. Kap. 3.4.3) erneut ermittelt und verifiziert werden. Beide Proteine liegen oberhalb ihres K_D als Dimer vor, darunter als Monomer. Dazu wurde in eine mit Puffer gefüllte Küvette schrittweise Protein hinzutitriert und die Änderung der Polarisierung bei 10°C gemessen. Die Abbildungen 4.4.1 und 4.4.2 zeigen die Ergebnisse. Bei dPER 232-599 konnte ein Anstieg des Polarisationswertes bei einer Konzentration von $0,4 \mu\text{M}$ von $0,29$ auf $0,39$ beobachtet werden. Der durch analytische Ultrazentrifugation herausgefundene K_D betrug $0,2 \mu\text{M}$. Bei der Mutante M560D konnte ein Anstieg des Polarisationswertes um $0,2$ Polarisierungseinheiten bei einer Konzentration von $13 \mu\text{M}$ beobachtet werden. Für die Versuche wurde die Eigenschaft der Tryptophanfluoreszenz genutzt (unveröffentlicht). Die Anregung erfolgte bei 280 nm , die Detektion bei 340 nm .

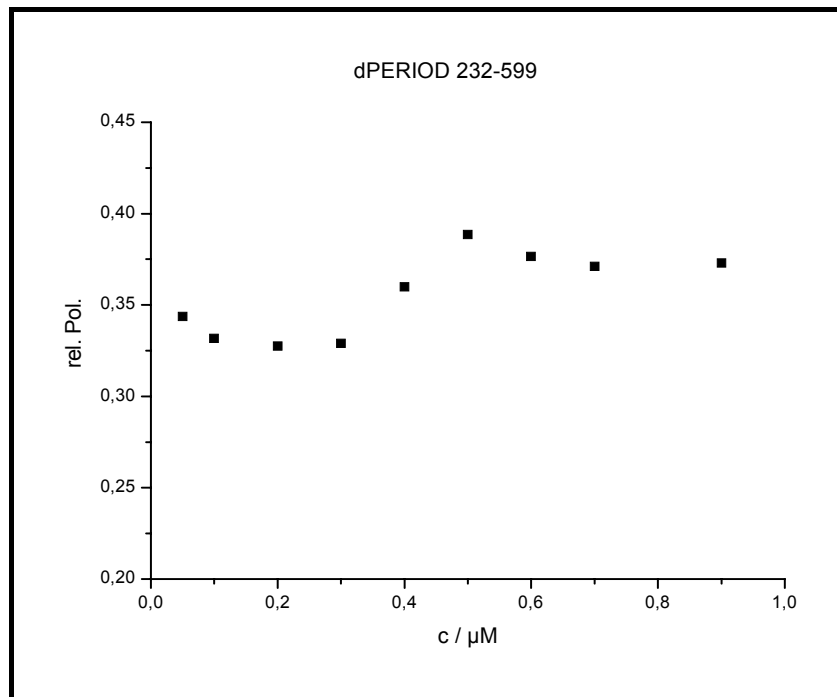


Abb. 4.4.1 Ermittlung der Dissoziationskonstanten von dPER 232-599 WT durch Titration. Bei dem Versuch wurde die Änderung der Polarisation bei steigender Konzentration gemessen. Bei einer Konzentration von 0,4 μM konnte ein Anstieg des Polarisationswertes von 0,29 auf 0,39 beobachtet werden. Die Detektion erfolgte bei 340 nm, die Anregung bei 280 nm. Die Messtemperatur betrug 10°C.

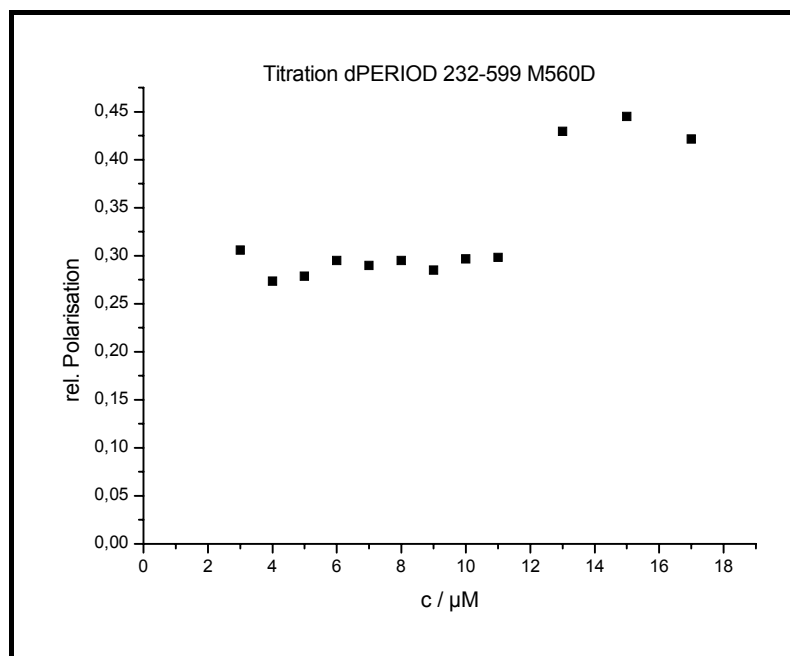


Abb. 4.4.2 Ermittlung der Dissoziationskonstanten von dPER 232-599 M560D durch Titration. Bei dem Versuch wurde die Änderung der Polarisation bei steigender Konzentration gemessen. Bei einer Konzentration von 12,5 μM konnte ein Anstieg des Polarisationswertes um 0,2 Polarisationseinheiten beobachtet werden. Die Detektion erfolgte bei 340 nm, die Anregung bei 280 nm. Die Messtemperatur betrug 10 °C.

4.5 Erstellung einer Monomerisierungskinetik von dPERIOD 232-599 und dPERIOD 232-599 M560D mittels Polarisation

Zur Bestimmung einer Kinetik des Übergangs vom dimeren zum monomeren Zustand wurde eine Proteinlösung, deren Konzentration unterhalb des K_D -Wertes lag mit der Methode der Polarisation (s. Kap. 3.4.3) über die Zeit beobachtet. In diesem Versuch wurde der Wildtyp des Uhrenproteins dPER mit den Fragmentgrenzen 232-599 verwendet sowie die Mutante M560D dieses Proteins mit den gleichen Fragmentgrenzen. Die Konzentration der Probe des Wildtyps betrug $0,1 \mu\text{M}$, die Konzentration der untersuchten Probe der Mutante M560D betrug $0,4 \mu\text{M}$. Auch hier wurde zunächst eine mit Puffer gefüllte Küvette im Gerät bei 10°C äquilibriert. Nach dem Einstellen der Temperatur wurde ein entsprechendes Volumen der Proteinlösung hinzupipettiert und nach dem Mischen die Messung sofort gestartet. Dabei wurde die Veränderung des Polarisationssignals über die Zeit beobachtet. Die Anregung erfolgte bei 280 nm , die Emission wurde bei 340 nm gemessen, da in diesem Wellenlängenbereich eine Fluoreszenzänderung zu beobachten war (s. Abb. 4.3.1.3). Des Weiteren wurde eine Kontrollmessung durchgeführt. Dazu wurde eine Probe gleicher Konzentration über Nacht bei 10°C im Dunkeln inkubiert und anschließend gemessen. Mit dieser Messung sollte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Effekt einer Fluoreszenzabnahme um eine Bleichung des Tryptophans handelt. Man erwartete bei den Kontrollmessungen einen konstanten Wert für das Polarisationsignal. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5.1 und 4.5.2 dargestellt. In beiden Fällen ist sowohl bei der Kontrollmessung als auch bei der Hauptmessung ein konstanter und annähernd gleicher Abfall des Polarisationssignals zu erkennen. Der Abfall der Kurven der Übernacht-Messungen und der Kontrollmessungen sind identisch. Bei der Beobachtung des Polarisationssignals der dPER-Mutante M560D ergeben sich für den Abfall des Polarisationssignals die gleichen Ergebnisse wie für den Wildtyp (siehe Abb. 4.5.1-2).

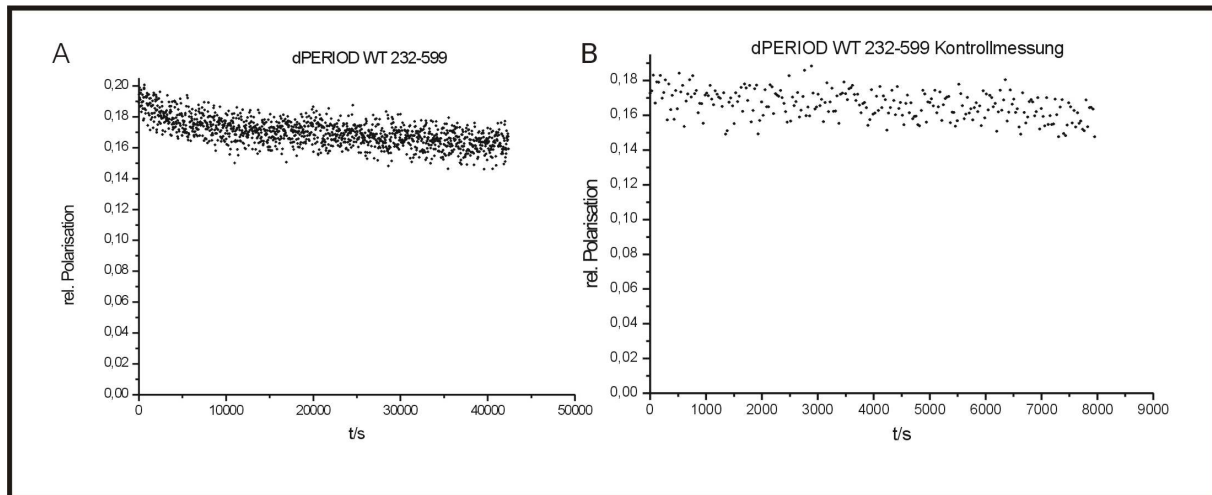


Abb. 4.5.1: Beobachtung des Polarisationsignals einer 0,1 μM Lösung von dPER 232-599 über die Zeit. Für die Messung wurde die Tryptophanfluoreszenz ausgenutzt. Es ist eine konstante Abnahme des Polarisationsignals zu beobachten, auch die Kontrollmessung zeigt eine annähernd gleiche Abnahme des Polarisationsignals. Weitere Angaben sind in Text 4.5 zu finden. Die Messungen wurden bei 10°C durchgeführt.

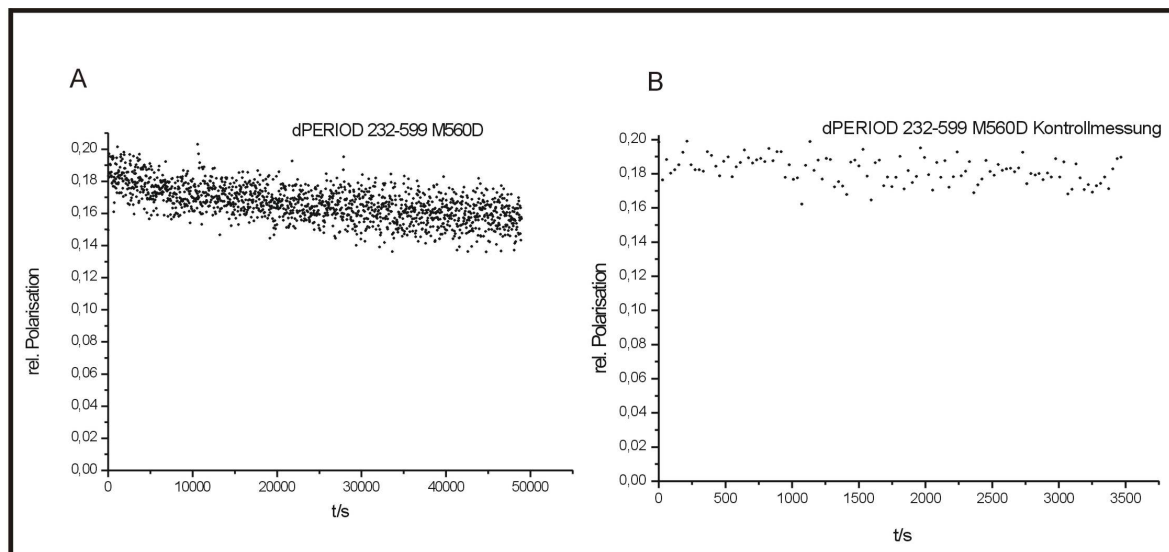


Abb.4.5.2: Beobachtung des Polarisationsignals einer 0,4 μM Lösung von dPER 232-599 M560D über die Zeit. Für die Messung wurde die Eigenschaft der Tryptophanfluoreszenz genutzt. Bei der Messung ist eine konstante Abnahme des Polarisationsignals zu beobachten, dies gilt auch für die Kontrollmessung (violett). Die Messtemperatur betrug 10°C. Die Ergebnisse sind in Text 4.5 ausgeführt.

4.6 Ergebnisse des Interaktionstests zwischen dPERIOD 232-538 und dTIM 481-908 mit dem Hefe-II-Hybrid System

Das Hefe-II-Hybrid-System dient zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen (Fields & Song 1989, Fields & Sternglanz 1994). Um herauszufinden, welche Aminosäuren auf der PAS-A-Domäne an der Interaktion zwischen dPER und TIM beteiligt sind, wurden Mutationen in die PAS A Domäne (Gekakis *et al.*, 1995, Ylidiz *et al.*, 2005) des Uhrenproteins dPER eingeführt und mittels der Hefe-II-Hybrid-Methode (Fields & Song 1989, Fields & Sternglanz 1994) untersucht. Der Bindungsbereich von dPER, der an der Interaktion mit seinem Bindungspartner TIM beteiligt ist, wurde bereits 1995 von Gekakis und Mitarbeitern kartiert (Gekakis *et al.*, 1995, Saez *et al.*, 1998). Es wurde herausgefunden, dass die Fragmentgrenzen 233-390 für die Bindung zwischen beiden Proteinen notwendig sind (s. Kap. 1.5 und Abb 1.12). Welche Aminosäuren aber genau an der Bindung beteiligt sind, ist nicht bekannt. Deswegen wurden im Period Fragment 232-538 (dPER $\Delta\alpha$ F) Mutationen erzeugt und anschließend im Hefe-II-Hybridssystem (s. Kap. 3.3.15) untersucht. Des Weiteren wurde untersucht, ob der Bereich 538-576 (α F) von dPER die Bindung an TIM beeinflusst. Damit sollte die Hypothese, wie die Bindung zwischen PER und TIM genau funktioniert (s. Kap. 1.5) und welche Rolle die α F-Helix dabei übernimmt, überprüft werden. Dazu wurde der Bereich dPER 232-538 (dPER $\Delta\alpha$ F) als B42-Fusion (aktivierende Domäne) in den Vektor pJG4-5 kloniert. Ebenso wurde dPER 232-572 (dPER Δ S/M) in denselben Hefevektor (pJG4-5) als B42-Fusion kloniert. Ferner erfolgte eine Klonierung des TIM Fragments 481-908 in den Hefevektor pEG202 als LexA-Fusion (DNA-bindende Domäne). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5.1 zusammengefasst. Es wurden ebenfalls Negativkontrollen zu den Interaktionstests durchgeführt, indem die entsprechenden Leervektoren in die Hefezellen transformiert wurden. Für die o. g. Versuche wurden ein sensitiver (EGY 48, für schwache Proteininteraktionen) und ein weniger sensitiver Hefestamm (EGY 191, für starke Proteininteraktionen) eingesetzt (siehe Kap. 3.3.15). Die Versuchsergebnisse waren jedoch in beiden Stämmen identisch. Eine erste Selektion wurde auf SD-U-H-W-Mangelmedium durchgeführt (Abbildung 4.6.2). Alle Transformanden, die das Reporterplasmid pSH18-34 (s. Kap. 3.3.15.1) sowie die für die Interaktionspartner kodierenden Plasmide aufgenommen hatten, zeigten keine Proliferation auf SD-U-H-W-L-Medium (Leuzin-Mangelmedium). Dagegen fand Wachstum auf galaktosehaltigem Medium statt; Galaktose ist der Induktor für die B42-fusionierten dPERIOD-Konstrukte. Auf XGal-U-H-W Medium, wurde die Expression der B42-Fusion getestet. In keinem der Fälle ist hier eine Blaufärbung der Hefekolonien zu beobachten.

4.6.1 Rolle der α F-Helix von dPERIOD bei der Bindung von TIM

Abbildung 4.6.2 zeigt eine Blaufärbung der Hefe-Zellen (EGY 48) auf XGal/SGal-haltigem Medium, die mit dPER Δ α F und TIM 481-908 transformiert und im Hefe-II-Hybridsystem untersucht wurden. Bei Hefezellen vom gleichen Stamm, die mit dPER Δ S/M und TIM 481-908 transformiert wurden, ist ebenfalls eine Blaufärbung zu erkennen. Bei dPER Δ S/M ist die C-terminale α F noch vorhanden. Die Blaufärbung ist in beiden Fällen gleich stark, und auch der weniger sensitive Hefestamm EGY 191 zeigte bei diesem Versuch eine Blaufärbung auf SGal/XGal-haltigem Selektionsmedium.

4.6.2 Beteiligung einzelner Aminosäuren der PAS A Domäne von dPERIOD 232-538 an der Interaktion mit TIM 481-908

In diesem Versuch wurden in die Gensequenz dPER Δ α F mittels überlappender PCR (s. Kap. 3.1.6-3.1.8) zwei Mutationen auf der PAS A-Domäne eingefügt. Abbildung 4.5.1 zeigt in 3-dimensionaler Darstellung die Positionen, an denen die Mutationen eingefügt wurden (dPER Δ α F V367D C369R). Dabei wurde ein Austausch des an der Position 367 befindlichen Valins (V) gegen eine Asparaginsäure (D) durchgeführt sowie ein Austausch eines Cysteins (C) an der Stelle 369 gegen ein Arginin (R). Somit wurde eine unpolare Aminosäure (V) gegen eine negativ geladene Aminosäure (D) und eine weitere unpolare Aminosäure (C) gegen eine basische Aminosäure (R) ausgetauscht. Arginin verfügt über eine wesentlich längere Seitenkette als Cystein. Somit fand nicht nur ein Ladungsaustausch statt, sondern auch eine Veränderung der sterischen Bedingungen hinsichtlich der Größe von Cystein und Arginin. Die beschriebene mutierte Form von dPER Δ α F wurde zusammen mit TIM im Hefe-II-Hybridsystem untersucht. Abbildung 4.5.2 zeigt, dass eine Blaufärbung der Hefezellen des sensitiven Stamms EGY 48 auf SGal/XGal-haltigem Selektionsmedium stattfindet. Dies deutet auf eine Interaktion beider Proteinfragmente hin, die nicht von den eingebrachten Mutationen gestört wird. Die Negativkontrolle aus dPER V367D C369R und dem Leervektor zeigt keine Blaufärbung. Es ist somit keine Proteininteraktion bei den Negativkontrollen in Form einer Autoaktivierung vorhanden. Ferner ist in Abbildung 4.5.2 zu beobachten, dass alle Transformanten auf SD-Mangelmedium wachsen. Zudem zeigt sich, dass Autoaktivierungen vorgebeugt werden kann, indem die transformierten Hefezellen nach dem Umstreichen auf SGal/XGal-haltiges Selektionsmedium zunächst für 10 h bei 20°C und anschließend bei 30°C gelagert wurden.

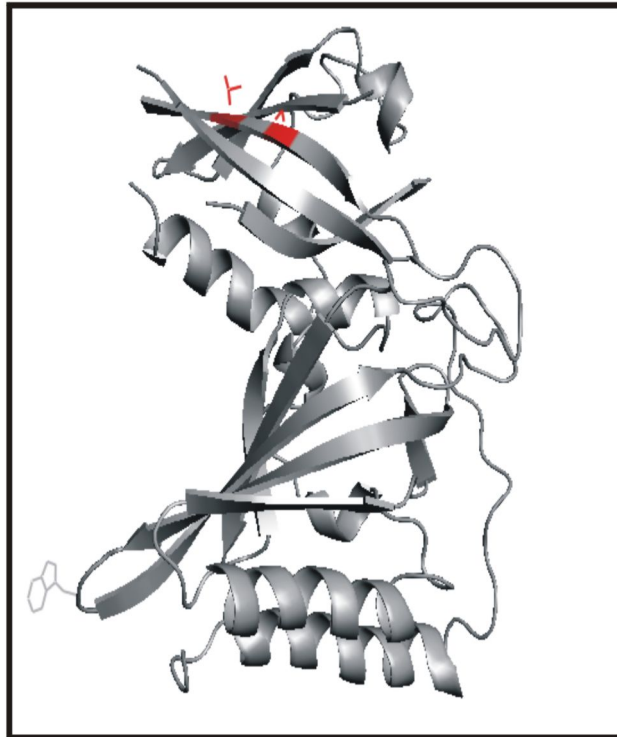


Abbildung 4.6.1: 3D-Darstellung der Position der eingefügten Mutationen in dPERIOD 232-538 (dPER $\Delta\alpha$ F)

In dem dreidimensionalen Molekülmodell von dPER 232-538 sind die Aminosäuren V367 und C369 auf der PAS A Domäne in roter Farbe dargestellt. Sie wurden durch eine Asparaginsäure an der Stelle 367 und durch ein Arginin an der Stelle 369 ausgetauscht.

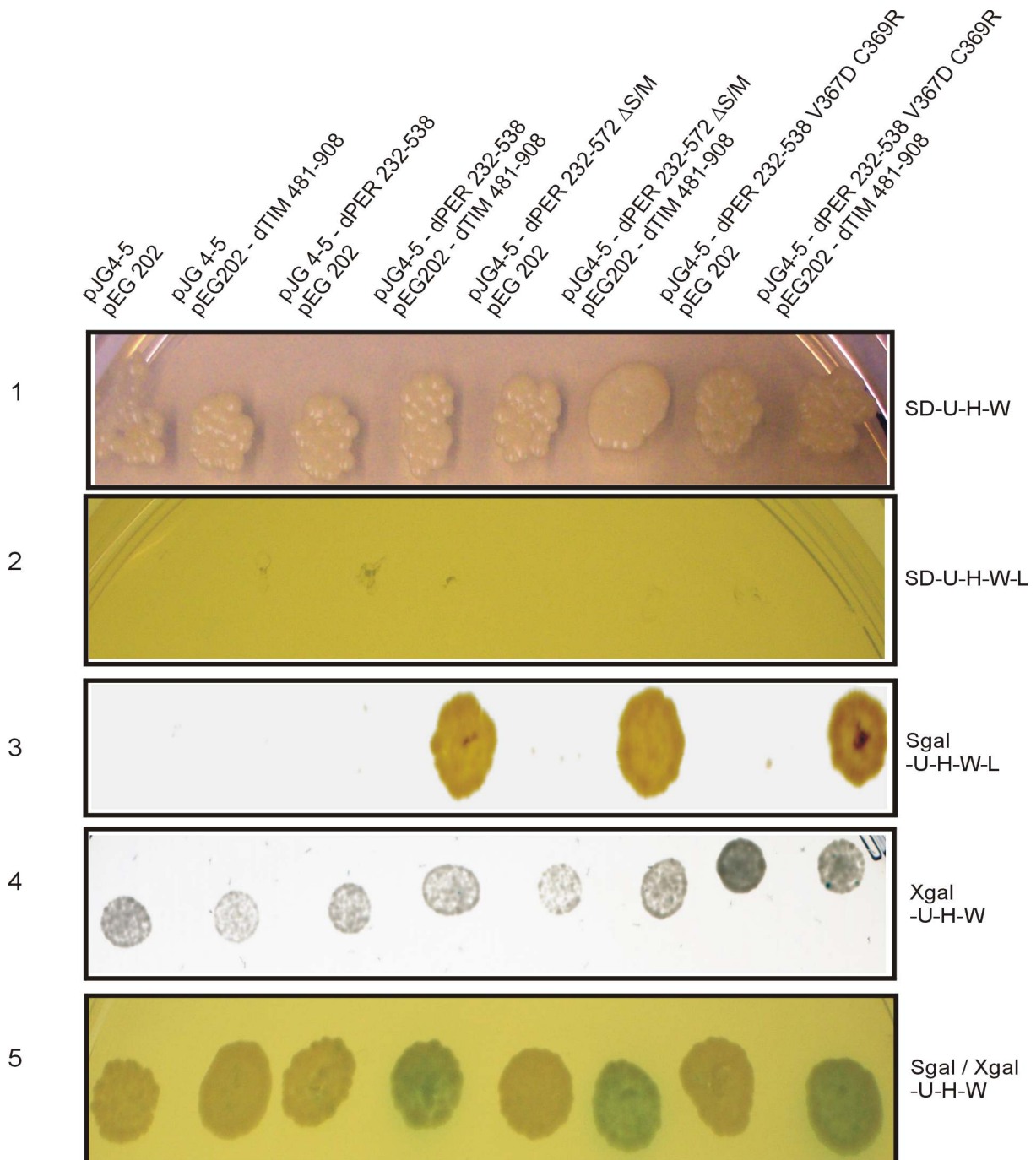


Abb. 4.6.2: Interaktionstest mit dPERIOD 232-538 (dPER $\Delta\alpha$ F), dPERIOD 232-572 (dPER Δ S/M) und dPERIOD 232-538(dPER $\Delta\alpha$ F) V367D C369R mit TIM 481-908 im Hefe-II-Hybrid-System (*S. cerevisiae*-Stamm EGY 48): Nach dem Ausstreichen der Transformationsansätze auf Selektionsplatten wurden diese zur Auswertung der Interaktion auf Testplatten umgestrichen. Dabei wurde die Aktivierung der beiden verwendeten Reporter betrachtet. Bei Induktion der B42-fusionierten Konstrukte sowie des nicht-fusionierten B42 (Negativkontrolle) durch Galaktose färbten sich die Transformanden blau auf XGal-haltigem Medium bzw. wuchsen auf Leuzinmangelmedium (siehe dPER $\Delta\alpha$ F, dPER Δ S/M und dPER $\Delta\alpha$ F V367D C369R mit TIM 481-908). Bei Abwesenheit von Galaktose war weder Färbung (XGal-haltiges Medium) noch Proliferation (Leuzin-Mangelmedium) der Transformanden erkennbar.

5. Diskussion und Ausblick

Durch die zirkadiane Rhythmik wird es Organismen ermöglicht, ihren Metabolismus und ihre physiologischen Verhaltensweisen einem 24 Stunden-Tag entsprechend anzugleichen und zu regulieren. Diese Rhythmik wird durch zellautonome Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleifen generiert. Molekulare Daten liefern zusammen mit *in vitro* Studien Möglichkeiten zur Aufklärung der Mechanismen. In dieser Arbeit wurde das zentrale Uhrenprotein dPER aus *Drosophila melanogaster* mit biochemischen und biophysikalischen Methoden untersucht.

5.1 Klonierung und Expression des Period-Fragments dPER 538-576 (αF) im prokaryotischen System *Escherichia coli*

Aus strukturellen Daten geht hervor, dass der Bereich 538-576 für die Dimerisierung des Uhrenproteins dPERIOD von hoher Relevanz ist (Yildiz *et al.*, 2005). Um die intermolekulare Bindung der αF -Helix an die PAS-A-Region genauer zu untersuchen, sollte das Fragment dPER538-576 (αF) gereinigt werden. Neben einer biochemischen Charakterisierung des Proteinfragments durch Massenspektrometrie, analytischer Größenausschlusschromatographie und Aufnahme eines CD-Spektrums sollte das erhaltene Proteinfragment in einem ITC-Experiment als Bindungspartner für dPER $\Delta\alpha F$ dienen, um somit eine Bindungskonstante (K_D) zwischen der αF -Helix und der PAS-A-Region zu ermitteln. Weiterhin sollte die Bindungskinetik zwischen der αF -Helix und der PAS-A-Region durch Polarisation und SPR herausgefunden werden. Hierzu wurde zunächst die Gensequenz für das Proteinfragment in den Vektor pGEX-6p2 kloniert und anschließend als GST-Fusion exprimiert und gereinigt.

Aus dem in Abb. 4.1.1 dargestellten Ergebnis einer Kontrollrestriktion und der Sequenzierung ist zu schließen, dass die Klonierung von der Gensequenz für die αF -Helix von dPER in den Vektor pGEX-6p2 als GST-Fusion funktioniert hat. Die Banden im Gel entsprachen den erwarteten Restriktionsfragmenten. Die Bande mit der Größe von 120 bp konnte erwartungsgemäß als *per538-576* (αF) und die Bande bei 4890 bp für den Vektor pGEX-6p2 identifiziert werden.

Die Expressionstests zeigten, dass bei 37°C und 16 h Induktion die höchsten Mengen von GST- αF (30,8 kDa) produziert wurden. Dies zeigte die Bande bei 30 kDa im Gel. Gleichzeitig konnte auch eine erhebliche Menge an GST (26 kDa) als Bande bei ca. 24 kDa im Gel detektiert werden (s. Abb. 4.1.3). Eine Expression von *dper538-576* (αF) als GST-Fusion

allein war unter den hier ausgewählten Bedingungen nicht möglich. Es ist nicht auszuschließen, dass die genetische Information für die dPER- α F-Helix durch seltene Kodone festgelegt ist, und somit seltene tRNAs für die Translation erforderlich sind (Kane 2002). Insbesondere sind manche Kodone für Leuzin und Arginin, verglichen mit den übrigen tRNAs für diese Aminosäuren, unterrepräsentiert. Die α F von dPER enthält insgesamt vier Arginine und fünf Leucine (s. Abb. 5.1). Selbst ein einzelnes seltenes Kodon kann bereits Probleme bei der Synthese des Proteins bereiten. Zur Vermeidung eines solchen Phänomens wurden Zellen des *E. coli*-Stamms Rosetta verwendet, welcher über ein pLysSRARE-Plasmid (s. Kap. 2.10.2) verfügt (Dong *et al.*, 1996). Das Plasmid verfügt über die genetische Information für seltene tRNAs sowie über ein Gen für eine Chloramphenicolresistenz als Selektionsmarker.

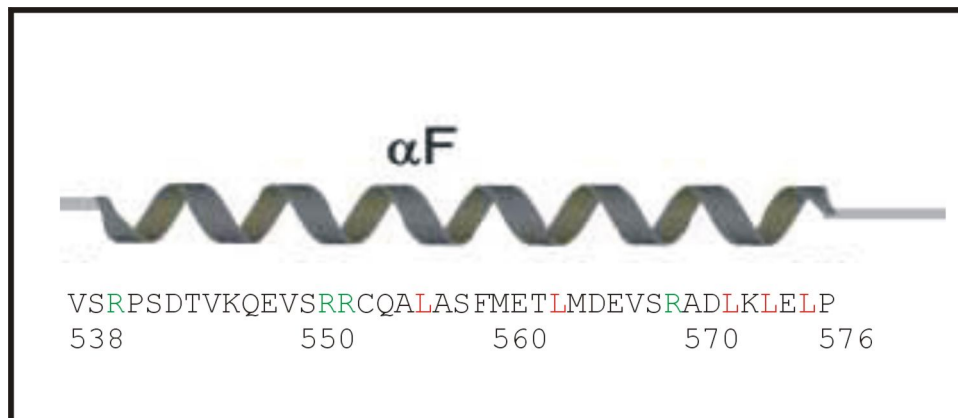


Abb. 5.1: Proteinsequenz von der α F-Helix von dPER 538-576.

Die Sequenz weist vier Arginine (grün) und fünf Leucine (rot) auf. Diese Aminosäuren werden teilweise durch seltene Triplets kodiert. Somit sind auch wenige entsprechende tRNAs in der Zelle vorhanden, was zu einer schwachen Expression des Proteins führen kann.

Des Weiteren können durch seltene Kodone Pausen bei der Translation entstehen, welche zu einer Verschiebung des Leserahmens führen (Siple *et al.*, 1993). Findet dieses Phänomen direkt beim Übergang von der mRNA-Sequenz für GST zu der von α F statt, kann dies ein Grund für den Abbruch der Translation nach GST sein. Der Schub im Leserahmen kann eine Translation eines Stop-Kodons bewirkt haben.

Bei den gewählten Expressionstemperaturen 20°C und 25°C (s. Abb 4.1.2) verschwindet die Bande für GST- α F (30.8 kDa) schon nach 8 h nach der Induktion mit 0,1 mM IPTG. Die Expression des rekombinanten Proteins bei diesen Temperaturen ist wesentlich schwächer als bei 37°C nach 8 h. Die Ergebnisse der Expression des Gens für das Fusionsprotein bei 30°C sind mit denen bei 20°C und 25°C vergleichbar (s. Abb. 4.1.3). Auch hier ist das GST-Fusionsprotein in Form einer Bande bei 30 kDa nach 16 h bei der gelelektrophoretischen

Untersuchung der Probe nicht mehr zu detektieren. Lediglich die Bande von GST bei 24 kDa ist nach 16 h noch zu beobachten, was auf einen Abbau des Fusionsproteins zurückzuführen ist. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass das Fusionsprotein nicht stabil zu sein scheint, was eine Erklärung für die niedrige Ausbeute ist. Ferner ist die gesamte Expression bei Temperaturen von 20°C und 25°C geringer. Dieser Befund ist darauf zurückzuführen, dass die Prozesse der Proteinbiosynthese bei diesen Temperaturen langsamer ablaufen. Aus den in Abb. 4.1.2 und Abb. 4.1.3 gezeigten Ergebnissen ist somit zu schließen, dass GST- α F bei den Temperaturen 20°C, 25°C und 30°C nicht dauerhaft stabil ist. Verglichen mit der Menge an synthetisiertem GST, ist die Menge an Fusionsprotein bei diesen Temperaturen wesentlich geringer. Eine Expressionstemperatur von 37°C und eine Expressionsdauer von 16 h sind für eine hohe Syntheserate von GST- α F unerlässlich. Die produzierte Menge an Fusionsprotein war im Vergleich zu der produzierten Menge an GST gering. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für den hohen Anteil an synthetisiertem GST ist, dass ein zufälliger Teil der transformierten Plasmide über keine DNA-Sequenz für GST- α F verfügte. Der Löslichkeitstest (s. Abb. 4.1.4) zeigt, dass der Großteil des Fusionsproteins sich in den Proben des löslichen Überstands befand. Das Fragment des Uhrenproteins dPER 538-576 (α F), bestand nur aus 40 Aminosäuren und hatte ein Molekulargewicht von 4,8 kDa. Die Größe des Protein-Fragments war somit gering im Vergleich zu GST (26 kDa). GST ist ein häufig verwendeter Affinitätsrest, der u. a. die Löslichkeit des daran fusionierten Proteins steigert (Smyth *et al.*, 2003). Besonders bei den analysierten Proben der Kultur, die bei 37°C inkubiert wurde, war zu erkennen, dass sich der gesamte Anteil an GST (Bande bei ca. 24 kDa) im löslichen Überstand befand. Im Gegensatz dazu war ein Teil des synthetisierten Fusionsproteins trotz des GST-Fusionsanteils im Pellet zu finden. Es ist denkbar, dass die α F die Löslichkeit von GST herabsetzt und deswegen nur ein Teil des Fusionsproteins in Lösung zu finden ist. Die Aminosäuren der dPER- α F-Helix sind zu einem großen Teil hydrophob. Die Zellpellets der Kulturen, die bei einer geringeren Temperatur als 37°C inkubiert wurden, wiesen einen höheren Anteil an GST- α F-Helix und GST auf als der lösliche Überstand. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Lyse der Zellen mittels Lysozym nicht bei allen Proben gleich gut funktioniert hat. Der hohe Anteil an gelöster GST α F-Helix bei 37°C zeigt (s. Abb. 4.1.4), dass die gewählten Pufferbedingungen zur Aufnahme des Zelllysats (s. Kap 2.6.3) sich als geeignet erwiesen haben.

Bei der Reinigung der GST-fusionierten α F-Helix (s. Abb. 4.1.5) war im Zellpellet eine erheblich höhere Menge Fusionsprotein zu beobachten als im löslichen Überstand. Eine Bande für reines GST (26 kDa) ist im Pellet jedoch nicht erkennbar. Diese Beobachtung

bestätigt die Annahme, dass das Fusionsprotein wesentlich schlechter löslich ist als reines GST. Vergleicht man die Intensitäten der Banden von GST und von GST- α F des löslichen Überstands und des Pellets, so zeigt sich, dass die Syntheserate beider Proteine gleich hoch war. Die Probe des Säulendurchlaufs und des Waschschrattes der GSH-Säule zeigt weder eine Bande für reines GST noch eine Bande für das Fusionsprotein. Dieses Ergebnis zeigt, dass die gesamte GST-fusionierte α F-Helix sowie das gesamte reine GST im löslichen Überstand an die GSH-Matrix gebunden hatte. Die Probe des Auftrags auf eine Säule für Größenausschlusschromatographie (s. Kap. 3.3.7) verdeutlichte erneut das Mengenverhältnis von GST und Fusionsprotein. Die auf die Säule aufgetragene Menge an GST-fusionierter α F-Helix war verglichen mit der Stärke der Bande von reinem GST sehr gering (s. Abb. 4.1.5). Die Trennung der beiden im Auftrag enthaltenen Proteine war durch die Größenausschlusschromatographie nicht möglich (s. Abb. 4.1.6). Ein Grund dafür kann die annähernd gleiche Größe der beiden Proteine GST (26 kDa) und GST- α F-Helix (30,8 kDa) sein. Des Weiteren können Dimerisierungen zwischen den GST-Molekülen Ursache dafür sein, dass eine Trennung mittels Größenausschlusschromatographie nicht möglich war (Morera *et al.*, 2006).

Der anschließende Verdau des konzentrierten Eluats mit der Protease Precission zeigt, dass das dPER-Fragment α F synthetisiert worden ist (s. Abb. 4.1.7). Ferner bestätigt die gelelektrophoretische Analyse der Proben den Befund, dass eine erhebliche Menge an GST und im Gegensatz dazu eine geringe Menge an Fusionsprotein produziert wurde. Dieses Ergebnis konnte durch die Daten der MALDI-Massenspektrometrie bestätigt werden (s. Abb. 4.1.8). Nach Zugabe der Precission-Protease konnte bereits nach einer Stunde ein Peak bei 4,8 kDa beobachtet werden. Auch in der Probe, die nach der Inkubation über Nacht genommen wurde, konnte noch ein Peak bei 4,8 kDa beobachtet werden. Die gleiche Probe des Precission-Verdaus wies im Gel, verglichen mit den übrigen Proben, eine weniger intensive Bande bei 4,8 kDa auf. Dies kann als Hinweis dafür interpretiert werden, dass bereits ein Teil der α F abgebaut worden ist. Die unterschiedlich hohen Peaks in den gezeigten Massenspektren sind vermutlich auf Messungenauigkeiten des Gerätes zurückzuführen.

Die Ergebnisse bestätigten die Richtigkeit der gewählten Anzucht- und Expressionsbedingungen. Die α F-Helix konnte im Gel als auch in der Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Dieser Befund wird besonders beim Verdau des GST-fusionierten Proteins dPER538-576 mit der Precission Protease in Abb. (4.1.7) deutlich. Hier war eine erhebliche Menge an GST und im Gegensatz dazu eine geringe Menge GST-fusionierte α F im

Gel zu erkennen. Verglichen mit einem herkömmlichen hochprozentigen SDS-Gel war die Trennung mit einem 18%-igen Tris-Tricin Gel (Schägger *et al.*, 1988) am saubersten und das Peptid mit einem Molekulargewicht von 4,8 kDa am besten sichtbar. Nach dem Versuch, das in hoher Konzentration vorhandene GST mittels einer GSH-Säule zu trennen, konnte die α F-Helix nicht mehr nachgewiesen werden. Auch ein Peak auf dem Schreiberausdruck war nicht zu erkennen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das Peptid allein nicht stabil zu sein scheint. Auch nach der Durchführung einer Größenausschlusschromatographie konnte das dPER-Fragment nicht nachgewiesen werden. Eine Umklonierung der genetischen Information für das Proteinfragment in einen pET-Vektor gelang, es konnte jedoch keine Expression des entsprechenden Gens nachgewiesen werden. Auch die Expression des Gens für die dPER- α F-Helix mit einem Hexahistidinrest hätte nichts an der Stabilität des Proteins geändert. Somit konnten keine weiteren Versuche mit dem Proteinfragment dPER α F-Helix durchgeführt werden.

5.2 Matrixunterstützter Interaktionstest zwischen α F und dPER $\Delta\alpha$ F

Der in Abb. 4.2.1 gezeigte Interaktionstest zwischen der GST-fusionierten dPER- α F-Helix und PAS-A-Region von dPER 232-538 (dPER $\Delta\alpha$ F) zeigt, dass mit der Methode des matrixunterstützten Interaktionstests (s. Kap. 3.3.14) keine Interaktion zwischen den Proteinen nachweisbar ist. Im Falle des Zustandekommens einer Bindung hätte im Gel bei der Elution in Spur 11 eine Bande bei ca. 39 kDa für dPER $\Delta\alpha$ F 232-538 (41 kDa) und eine Bande von 30,8 kDa für die GST-fusionierte dPER- α F-Helix zu sehen sein müssen. Eine unspezifische Wechselwirkung der GST-fusionierten α F-Helix mit GST ist nicht zu erkennen (vgl. Abb. 4.2.1). Die Proben des Waschschriffs mit Hochsalzpuffer (s. Kap. 2.6.4) zeigen, dass alle unspezifischen Bindungen beseitigt worden sind (s. Abb. 4.2.1, Spur 7; 8; 9). Auch konnte gezeigt werden, dass keine unspezifischen Bindungen von dPER $\Delta\alpha$ F an GST oder die Matrix stattfinden (s. Abb. 4.2.1 Spur 10 und 12). Die durch strukturelle Daten gezeigte Interaktion der α F mit der PAS-Region (s. Abb. 1.10) konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden (Yildiz *et al.*, 2005). Eine mögliche Erklärung ist, dass die α F als GST-Fusionsprotein nicht gefaltet ist und somit keine Interaktion mit der PAS-A-Region des Bindungspartners dPER $\Delta\alpha$ F stattfinden konnte. Bei zukünftigen Versuchen sollte deshalb ein anderer Fusionsrest für die α F getestet werden. Eine Möglichkeit zur Klärung einer korrekten Faltung der α F-Helix wäre in Zukunft die Durchführung einer Kristallisation des Fusionsproteins (Ye Q *et al.*, 2005, Smyth, 2003) und die Ermittlung der Röntgenstruktur.

Ferner ist eine intermolekulare Interaktion der αF mit dem Fusionspartner GST möglich, sodass keine Bindung mit der PAS-Region von dPER $\Delta\alpha F$ stattfinden kann. Es ist zu beachten, dass kein reines Fusionsprotein an die Matrix gebunden wurde, sondern stets Verunreinigungen mit GST vorlagen (s. Kap. 4.1). Eventuell war die Konzentration von vorhandener αF zu gering, um eine im Gel nachweisbare Menge dPER $\Delta\alpha F$ zu binden. Der Versuch kann die Hypothese einer Selbstfaltung von der αF -Helix, die erst bei Kontakt zur PAS-A-Region stattfindet (s. Kap. 1.4.2), weder bestätigen noch widerlegen. Auf Grund der strukturellen Daten (Yildiz *et al.*, 2005) und den Ergebnissen der Dimerisierungsstudien (unveröffentlicht AG Wolf) ist auszuschließen, dass die αF nicht mit der PAS-A Region wechselwirkt oder bei der Dimerisierung keine Rolle spielt. Die Dimerisierungsstudien, in denen verschiedene dPER-Fragmente und Mutanten durch Ultrazentrifugation analysiert wurden, zeigten, dass dPER $\Delta\alpha F$ erst bei sehr hohen Konzentrationen dimerisiert ($K_D = 200 \mu M$) (persönliche Kommunikation AG Wolf).

5.2.1 Erstellung einer Bindungskinetik zwischen dPER $\Delta\alpha F$ (dPER 232-538) und der αF -Helix (dPER 538-576) mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz.

Die gleichen, unter Kapitel 5.2 aufgeführten Gründe sind ebenfalls eine Erklärung dafür, warum es nicht möglich war, mittels SPR (BIAcore) eine Bindungskonstante K_D sowie eine Kinetik der Bindung zu ermitteln (s. Abb. 4.2.2). Aus den Daten der BIAcore-Messung ist abzuleiten, dass keine Interaktion zwischen den beiden Interaktionspartnern dPER $\Delta\alpha F$ und αF zu beobachten ist. Die starken Änderungen des Spannungsbogens zu Beginn der Injektion des Interaktionspartners dPER $\Delta\alpha F$ sowie bei Beendigung der Injektion sind als Injektionsdefekte zu interpretieren. Im Falle einer Bindung wäre ein wesentlich höherer RU-Wert (*ResonanceUnit*) zu erwarten gewesen. Mit dieser Methode konnte unter den verwendeten Versuchsbedingungen keine Wechselwirkung der GST-fusionierten dPER- αF -Helix mit dPER $\Delta\alpha F$ festgestellt werden. Der Versuch bestätigt die Ergebnisse aus den vorangegangenen Interaktionsexperimenten (s. Kap. 5.2). Die bereits vorhanden Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation mit dPER und dPER $\Delta\alpha F$ lassen jedoch die Vermutung zu, dass die αF -Helix einen wichtigen Beitrag innerhalb des K_D -Wertes von $0,2 \mu M$ leistet (Yildiz *et al.*, 2005, persönliche Kommunikation AG Wolf).

5.3 Erstellung von Monomerisierungskinetiken von Wildtyp und Mutanten des Uhrenproteins dPERIOD 232-599 durch Fluoreszenzspektroskopie

Im dimeren Zustand sind die Tryptophane von dPER nicht solvenzzugänglich und somit nicht auf der Oberfläche des Proteins exponiert (s. Abb. 5.3.1). Im Falle einer Monomerisierung von dPER wird Trp482 solvenzzugänglich und ändert somit seine chemische Umgebung. Bei Anregung durch eine Wellenlänge von 280 nm (s. Kap. 3.4.2) zeigten die Tryptophane ein anderes Fluoreszenzsignal als in der hydrophoben Umgebung innerhalb des Proteins. Durch Absorption der eingestrahlten Wellenlänge sowie durch Quenchingeffekte, die durch Stöße mit Molekülen des Lösungsmittels zu Stande kommen, kommt es zu einer Rotverschiebung bei der emittierten Wellenlänge (Atkins, 2001). Die Beobachtung der Änderung der Tryptophanfluoreszenz ist eine häufig benutzte Methode um strukturelle Änderungen oder Protein-Protein-Wechselwirkungen zu studieren (Winter & Noll 1998, López *et al.*, 2005, Brewer *et al* 2006, Nemeč *et al.*, 2006).

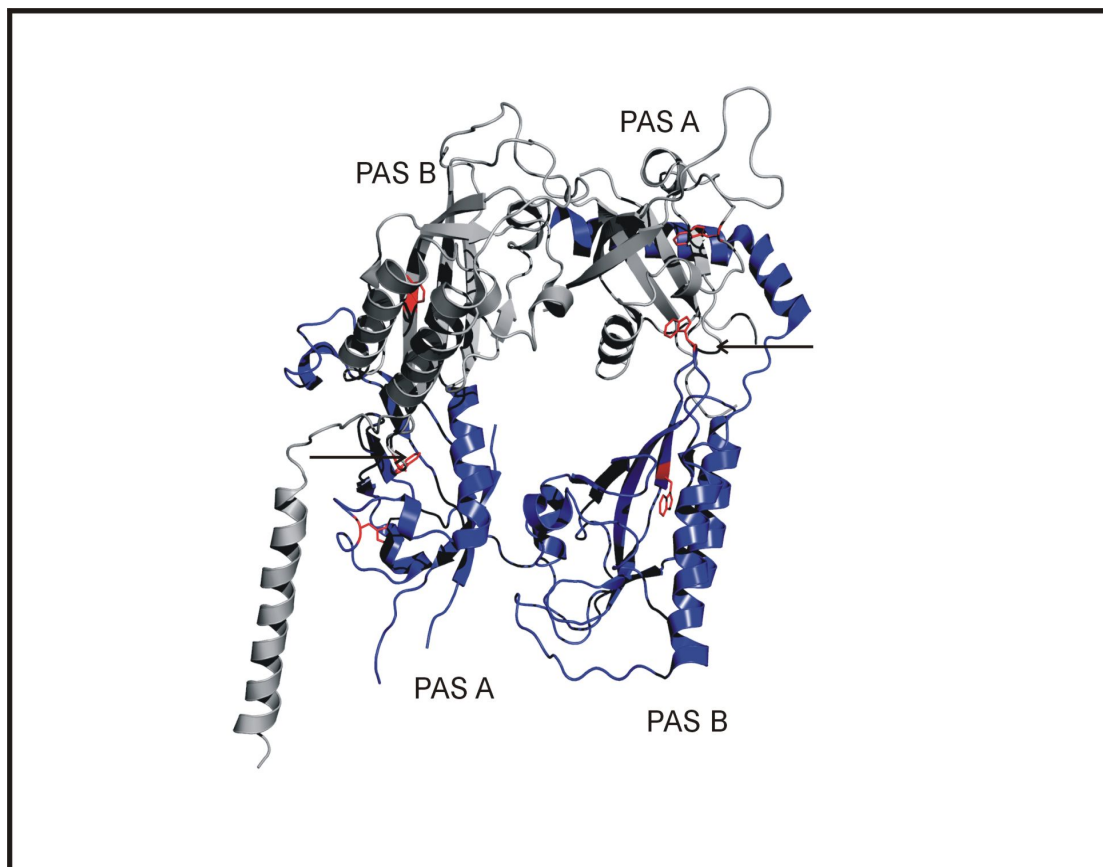


Abb. 5.3.1: Position der Tryptophane in dPER 232 -599

Für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren wurden die Tryptophane von dPER 232-599 als Fluorophore benutzt. Sie sind in Molekül 1 (grau) und Molekül 2 (blau) in rot hervorgehoben. Im dimeren Zustand sind die Tryptophane auf der Innenseite des Proteins und somit nicht solvenzzugänglich. Monomerisiert das Molekül, erwartet man eine Veränderung der chemischen Umgebung von Trp482, welches an der Dimerisierung beteiligt ist. Dieser Effekt führt zu einer Rotverschiebung im Emissionsspektrum. Trp482 von Molekül 1 und 2, siehe schwarzer Pfeil.

5.3.1 Aufnahme von Fluoreszenzspektren von dPERIOD 232-599, sowie ausgewählter Mutanten

Durch die Verringerung der Konzentration von dPER 232-599 wt konnte keine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums erreicht werden (s. Abb 4.4.1.1). Die Ergebnisse zeigten, dass es nicht möglich war, ein Fluoreszenzspektrum dieses Proteins bei einer Konzentration unter 0,2 μM aufzunehmen. Da der K_D von dPER 232-599 selbst 0,2 μM beträgt, ist auch keine Veränderung des Fluoreszenzmaximums zu erwarten. Aus diesem Befund ist zu schließen, dass die im Protein vorhandenen Tryptophane ihre Umgebung nicht verändert haben und somit bei allen Konzentrationen sich das Fluoreszenzmaximum nicht zu einer höheren Wellenlänge verschiebt.

Bei der Aufnahme der Spektren von dPER 232-599 W482E ist ebenfalls keine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zu erkennen. Dies kann unter anderem an dem Nichtvorhandensein von Trp482 in dieser Mutante liegen (s. Abb. 4.5.1). Die übrigen Tryptophane sind wesentlich weiter im inneren des Proteins und somit auch im Falle einer Monomerisierung wesentlich schlechter solvenzzugänglich. Auch hier war es nicht möglich ein Spektrum einer Konzentration unterhalb von 0,2 μM aufzunehmen. Das Spektrum zeigte starkes Rauschen und auch eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums konnte nicht festgestellt werden. Der K_D -Wert von dPER 232-599 W482E beträgt 4,0 μM (unveröffentlicht AG Wolf). Eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums bei einer Konzentrationen $< 4,0$ μM ist auf Grund des fehlenden Tryptophans nicht möglich. Den Ergebnissen nach zu urteilen, ändert sich die Umgebung der vorhandenen Tryptophane nicht ausreichend, sodass es zu keiner detektierbaren Fluoreszenzänderung kommt. Eine weitere Möglichkeit, dennoch einen Übergang von Dimer zu Monomer zu beobachten, ist die Fluoreszenz bei einer tolerierbaren höheren Temperatur, z. B. 20°C, zu beobachten (Winter & Noll, 1998).

Bei der Vermessung der dPER Mutante M560D (Fragmentgrenzen 232-599) war eine Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums bei der Verringerung der Konzentration von 2,0 μM zu beobachten (s.Abb. 4.4.1.3) (Thakur *et al.*, 2006). Dies ist auf eine Veränderung der chemischen Umgebung der Tryptophane zurückzuführen. Im Gegensatz zu der Mutante dPER W482E verfügt diese Mutante wie der Wildtyp über das Tryptophan an der Position 482. Der K_D – Wert der dPer-Mutante M560D beträgt 7,0 μM . Somit fand ein Übergang von Dimer zu Monomer bei einer wesentlich höheren Konzentration statt. Ferner ist zu bemerken, dass mit dieser Mutante ein Fluoreszenzspektrum bei einer Konzentration von 0,2 μM und 0,02 μM aufgenommen werden konnte. Es wurde beobachtet, dass die Messung der 0,02 μM konzentrierten Probe zwar ein leichtes Rauschen aufwies, es war aber dennoch möglich, ein

konkretes Maximum zu bestimmen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass bei dPER wt und dPER W482E bei 0,2 μM das Gleichgewicht zwischen Dimer und Monomer sich noch nicht ausreichend auf die Seite des Monomers verschoben hatte, weswegen noch keine chemische Veränderung der Umgebung der Tryptophane stattfand. Insgesamt konnte bei der Messung der dPER M560D Mutante eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums um 7 nm von 335 nm auf 342 nm zu höheren Wellenlängen beobachtet werden. Dieser Effekt ist auf eine Änderung der chemischen Umgebung der Tryptophane auf Grund der Monomerisierung des Proteins zurückzuführen. (Atkins 2001, Galla 1998). Der Vergleich der Spektren von dPER W482E und M560D zeigt, dass ein bestimmtes Tryptophan, hier Trp482, an einer bestimmten Position einen dominierenden Einfluss auf die Fluoreszenz hat (Vanhooren *et al.*, 2006). Auch die Position der Tryptophane und ihre Orientierung zueinander im Protein ist bei der Fluoreszenz von Relevanz (Saha *et al.*, 2006). Die Ergebnisse zeigten, dass für die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums von dPER das Tryptophan an Position 482 unerlässlich ist. Diese Aminosäure scheint den Fluoreszenz-Effekt im Protein zu dominieren. Der Auftrag der Konzentration gegen das Fluoreszenzmaximum (s. Abb. 4.3.1.4) lässt den Schluss zu, dass eine Verschiebung des Gleichgewichts vom Dimer hin zum Monomer beobachtet wurde.

Es ist somit prinzipiell möglich, mittels Fluoreszenzspektroskopie den Übergang vom dimeren in den monomeren Zustand bei dPER zu beobachten. Im Falle der Veränderung der chemischen Umgebung der Tryptophane und einer daraus resultierenden Freisetzung im Solvenz kommt es zu einer Rotverschiebung im Spektrum, was hier bei der Monomerisierung des Homodimers dPER der Fall ist (s. Abb. 4.3.1.3-4.3.1.4).

Da sich die Änderung der Tryptophanfluoreszenz auch für das Studium von Kinetiken eignet (López *et al.*, 2005), wurde das Fluoreszenzsignal einer 0,4 μM dPER M560D-Lösung über die Zeit bei einer Wellenlänge von 340 nm beobachtet (s. Abb. 4.3.1.5). Bei dieser Wellenlänge ist eine besonders starke Verschiebung im Fluoreszenzspektrum zu sehen (s. Abb. 4.4.4.3). Die Ergebnisse zeigten sowohl in der Messung als auch in der Kontrollmessung einen gleichen Abfall der Fluoreszenz (vgl. Kap. 4.3.1 und 3.4.2). Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, dass es sich bei der beobachteten Fluoreszenzabnahme um ein Ausbleichen des Fluorophors (hier ein Tryptophan) handeln muss. Den Ergebnissen der Emissionsspektren zu Folge, wäre jedoch eine Zunahme der Fluoreszenz zu erwarten gewesen. Möglicherweise findet der Übergang von Dimer zu Monomer so schnell statt, dass eine Messung in einer Stop-Flow Apparatur ein brauchbares Ergebnis geliefert hätte. Dieses Experiment sollte zukünftig noch erfolgen. Die Anregung der Tryptophane mit einer Wellenlänge von 280 nm

ist gerechtfertigt, da die mit dieser Wellenlänge gleichzeitig angeregten Tyrosine von der Fluoreszenz der Tryptophane überlagert werden (Winter & Noll, 1998).

5.3.2 Erstellung einer Dissoziationskonstanten K_D von dPERIOD 232-599 und dPERIOD 232-599 M560D durch Titration

Durch analytische Ultrazentrifugation konnten bereits K_D -Werte (Dissoziationskonstanten) von dPER 232-599 (Yildiz *et al.*, 2005) und diversen Mutanten ermittelt werden. In dieser Arbeit gelang es, die Methode der Polarisation für die Ermittlung der Dissoziationskonstanten zu verwenden und zu etablieren (s. Abb. 4.4.1 und 4.4.2). Grund für die Etablierung dieser Methode war, dass es nicht gelang, die K_D -Werte der dPER Mutante W482E und dPER wt mittels ITC (s Kap. 3.5.1) zu reproduzieren. Dazu wurde eine definierte Menge des Proteins durch das Gerät in die mit Puffer gefüllte Messzelle injiziert. Die Intention war, einen Übergang vom monomeren in den dimeren Zustand mittels Wärmetönung zu beobachten. Es konnte jedoch kein Signal ermittelt werden. Meistens wiesen die Messungen nur Rauschen auf oder lieferten keine brauchbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Bei der Titration von dPER wt konnte mittels Polarisation ein Übergang vom monomeren zum dimeren Zustand bei einer Konzentration von 0,4 μM beobachtet werden. Diese Beobachtung entspricht dem unter Kapitel 3.4.3 beschriebenen Prinzip der Polarisation. Mit dem gleichen Verfahren konnte bereits in anderen Arbeiten eine Dissoziationskonstante hergeleitet und der Übergang vom monomeren zum dimeren Zustand beobachtet werden (Dafforn *et al.*, 1999). Der mittels analytischer Ultrazentrifugation ermittelte K_D -Wert betrug 0,2 μM . Somit war es möglich, mittels Polarisation den K_D -Wert relativ genau abzuschätzen. Bei der Ermittlung des K_D -Wertes von dPER M560D wurde ein Übergang vom monomeren zum dimeren Zustand bei einer Konzentration von 12 μM gemessen. Der mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmte K_D -Wert betrug 7,0 μM . Dies Ergebnis unterscheidet sich zwar um 5 μM , dennoch ist dieser Wert bereits in der richtigen Größenordnung (persönliche Kommunikation AG Wolf). Als Fazit stellte sich die Methode als geeignet heraus, den K_D -Wert von dPER und mit Einschränkungen auch der dPER-Mutante M560D abzuschätzen. Die Methode kann durchaus für weitere Mutanten verwendet werden. Mit Rückblick auf die Fluoreszenzspektren der dPER Mutante W482E bleibt die Einschränkung, dass die zu untersuchenden dPER Mutanten über das Tryptophan 482 verfügen sollten (s. Kap. 5.3.1).

5.3.3 Erstellung einer Monomerisierungskinetik von dPERIOD 232-599 und dPEROD 232-599 M560D unter Verwendung der Methode der Polarisation

Für die Erstellung einer Kinetik für den Übergang zwischen Monomer und Dimer wurden Proteinlösungen von dPER (232-599) wt und dPER (232-599) M560D mit einer Konzentration unterhalb des K_D -Wertes erstellt und nach der Verdünnung die Änderung des Polarisationssignals über die Zeit gemessen (s. Abb. 4.5.1-4.5.2). Die Messung wurde sofort nach Einstellen der Verdünnung gestartet. Für Kinetiken von Zustandsveränderungen von Proteinen ist Tryptophan bereits als optische Sonde verwendet worden (Sridevi *et al.*, 2000, Park *et al.*, 2000). Ebenfalls ist die Methode der Polarisation zu Studien von Konformationszuständen in Proteinen bekannt (Nishimoto *et al.*, 1998) sowie zum Studium von Monomer-Polymerübergängen verwendet worden (Dafforn *et al.*, 1999). Die Ergebnisse zeigten (s. Abb. 4.5.1- 4.5.2), dass bei beiden Proteinen ein Abfall des Polarisationssignals zu beobachten war. Dieser Befund entsprach den Erwartungen, da bei einer Monomerisierung des Proteins das Fluorophor (hier das Tryptophan) mehr Freiheitsgrade einnehmen kann als im dimeren Zustand (s. Kap 3.4.3). Gleichzeitig jedoch lieferte die im Dunkeln inkubierte Kontrollmessung ebenfalls einen Abfall des Signals. Hier wäre ein konstantes Polarisationsignal als Folge des vollständigen monomeren Zustands zu erwarten gewesen. Dies ist ein Hinweis dafür, dass es sich bei dem beobachteten Abfall des Polarisationssignals um ein Ausbleichen des Tryptophans handelt. Eine mögliche Lösung des Problems ist bei zukünftigen Versuchen, einen Fluoreszenzmarker an dPER zu koppeln (Winter & Noll 1998, Lata *et al.*, 2006). Allerdings darf durch den Fluoreszenzmarker der K_D - Wert von dPER nicht verändert werden (s. Abb. 4.5.1- 4.5.2).

5.4 Zur Funktion der α F-Helix von dPERIOD bei der Bindung von TIMELESS

Die Ergebnisse zeigten, dass eine spezifische Interaktion von dTIM 481-908 mit dPER $\Delta\alpha$ F sowie dPER Δ S/M stattfindet. Die strukturellen Daten von dPER (Yildiz *et al.*, 2005) zeigen, dass die durch Gekakis (s. Abb. 1.9 und 1.6a) bereits kartierte dTIM-Bindungsregion von dPER, Aminosäure 233 bis Aminosäure 365, durch die α F-Helix verdeckt ist (Gekakis *et al.*, 1995). Dieser Bereich befindet sich in der PAS-A-Region von dPER (s Abb. 1.6a). Nach diesen Ergebnissen ist die PAS-A Region für die Interaktion mit dTIM nicht frei. Die in Kapitel 1.5 beschriebene Bindungshypothese von dPER mit dTIM konnte in diesem Versuch experimentell bestätigt werden. Sowohl die Klone dPER $\Delta\alpha$ F / dTIM 481-908 als auch dPER Δ S/M / dTIM481-908 zeigten eine Interaktion der Proteine dPER und dTIM in Form einer Blaufärbung der Kolonien. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die α F-Helix für die

Bindung von dTIM an dPER nicht notwendig ist. Nach den Strukturdaten (Yildiz *et al.*, 2005) und den Ergebnissen der analytischen Ultrazentrifugation (nicht veröffentlicht) über die Funktion der α F-Helix, monomerisiert das Homodimer dPER in Abwesenheit der α F-Helix bei Konzentrationen $< 200\mu\text{M}$. Aus der nachgewiesenen Interaktion von dPER Δ S/M mit dTIM ist zu schließen, dass die Interaktion der beiden Proteine auch bei Vorhandensein der α F-Helix stattfindet. Dem zufolge legt das Modell nahe, dass dTIM die α F-Helix verdrängt und an deren Stelle die Stabilisierung von dPER übernimmt (s. Abb 1.10). Da der gleiche Versuch mit dem weniger sensitiven Stamm EGY 191 ebenfalls eine Blaufärbung zeigte, ist davon auszugehen, dass es sich um eine starke Protein-Protein-Interaktion zwischen dPER Δ S/M und dTIM handelt.

5.4.1 Beteiligung einzelner Aminosäuren der PAS A Domäne von dPERIOD 232-538 an der Interaktion mit TIMELESS 481-908

In einem weiteren Versuch sollte herausgefunden werden, welche Aminosäuren auf der PAS-A-Region von dPER für die Bindung von dTIM verantwortlich sind. Mittels mutagener PCR wurden bei dPER die Aminosäuren 367 und 369 ausgetauscht (s. Kap. 4.5.2 u. 3.1.6). Der entsprechende Klon wies weiterhin eine Blaufärbung auf. Dieser Befund zeigt, dass der Austausch der beiden Aminosäuren nicht ausreichte, um eine Interaktion mit dem Bindungspartner dTIM zu verhindern. Im Falle einer Inhibierung der Bindung durch den Austausch der Aminosäuren hätte keine Blaufärbung der Klone vorliegen dürfen. Ferner ist zu berücksichtigen, dass neben der PAS-A-Region auch noch die CLD-Region (453-511) von dPER einen dTIM-Bindungsbereich aufweist (Saez *et al.*, 1996). Möglicherweise reicht die Interaktion von dTIM mit der CLD-Region aus, selbst wenn die PAS-A-Domäne von dPER auf Grund von Mutationen nicht mehr gebunden werden kann. Der Interaktionbereich von dTIM 715-914 ist fast vollständig in dem für das Experiment verwendeten dTIM-Fragment 481-908 enthalten (s. Abb. 5.4.1 u. 1.12). Aus diesem Grund war geplant, noch weitere Mutanten zu erstellen und sowohl im Bindungsbereich der PAS-A-Region als auch im Bindungsbereich der PAS-B bzw. der CLD-Region Mutationen einzufügen. Mit keiner der unter Kapitel 3.1 aufgeführten mutagenen PCR-Methoden konnten weitere Mutationen erzeugt werden. Für zukünftige Versuche sollten deshalb auf jeden Fall weitere mutagene PCR-Methoden etabliert werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Fliegen mit der Mutation V243D in der PAS-A-Region von dPER einen 29 h statt eines 24 h Tages-Rhythmus aufwiesen (Curtin *et al.*,

1995). Diese Mutation wird als *per^L* bezeichnet. Dieser verlängerte Tagesrhythmus wird bei Fliegen mit der *per^L* - Mutation durch eine Erhöhung der Umgebungstemperatur begünstigt (Curtin *et al.*, 1995). Dieser Befund konnte in Hefe-II-Hybrid-Studien ebenfalls *in vitro* nachgewiesen werden. Die Stärke der Interaktion der Proteine dPER^L und dTIM konnte hier an Hand der Stärke der β -Galaktosidase-Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen beobachtet werden. Einen Unterschied in der Stärke der Protein-Protein-Interaktion von dPER $\Delta\alpha$ F V367DC369R und dTIM481-908 bei unterschiedlichen Temperaturen konnte nicht nachgewiesen werden. Ein Unterschied in der β -Galaktosidase-Aktivität war weder bei einer Inkubation von 20°C noch bei 30°C erkennbar. Die erzeugte Mutante scheint somit auch nicht temperaturabhängig zu sein. Diese Versuche bestätigten, dass die PAS-A-Region von dPER für die Bindung von dTIM von hoher Bedeutung ist. Für eine genaue Identifizierung der daran beteiligten Aminosäuren ist allerdings in Zukunft die Erstellung weiterer Mutationen in dPER notwendig. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für eine Interaktion zwischen dTIM und dPER ein wesentlich kleinerer Bereich von dTIM ausreicht, um eine Bindung zu erzeugen, als bisher verwendet wurde (vgl. Saez *et al.*, 1996, Gekakkis *et al.*, 1995) (s. Abb. 1.12). Somit können auch die Aminosäuren, die für eine Interaktion mit dPER notwendig sind, weiter eingegrenzt werden (s. Abb. 1.12).

5.4.2 Ergebnisse des Interaktionstests zwischen dPERIOD $\Delta\alpha$ F und dTIMELESS 481-908 mit dem Hefe-II-Hybrid-System

Alle Klone zeigen auf SD-Mangelmedium (-U-H-W) Wachstum, woraus zu schließen ist dass die Transformation der Hefezellen erfolgreich war (s. Abb. 4.5.2). Aus der Blaufärbung der Klone dPER $\Delta\alpha$ F / dTIM 481-908, dPER Δ S/M / dTIM 481-908 und dPER $\Delta\alpha$ F V367D C369R / dTIM 481-908 ist zu schließen dass eine Interaktion zwischen beiden Proteinen stattfindet. Bei den übrigen Klonen, die als Negativkontrollen fungierten, fand Wachstum auf SGal/XGal-haltigem Medium statt (s. Kap. 2.9.2). Sie zeigten aber keine Blaufärbung. Somit lagen keine Autoaktivierungen bei den Negativkontrollen vor. Das Vorliegen einer Interaktion der Proteine dPER und dTIM wird weiterhin durch das Wachstum der Klone dPER $\Delta\alpha$ F / dTIM481-908, dPER Δ S/M / dTIM 481-908 und dPER $\Delta\alpha$ F V367D C369R / dTIM481-908 auf SGal-haltigem Leuzinmangelmedium bestätigt. Die Klone der Negativkontrollen zeigten keine Proliferation, da ohne die Interaktion von DNA-bindender Domäne (DBD) mit der aktivierenden Domäne (AD) das Gen für die Leuzinsynthese nicht aktiviert wird (s. Kap. 3.3.15). Der gleiche Interaktionstest wurde auch in Hefezellen des Stamms EGY191 durchgeführt, der im Gegensatz zu dem in Abb. 4.5.2 gezeigten Stamm EGY48 weniger sensitiv ist (s. Kap. 3.3.15). Die Ergebnisse waren identisch, woraus hervorgeht, dass es sich

um eine starke Interaktion zwischen den Proteinen handeln muss. Die Proliferation der Klone auf XGal-haltigem Medium (s. Kap. 2.9.2) entsprach ebenfalls den Erwartungen, da alle Klone keine Blaufärbung zeigten. Lediglich der Klon dPER $\Delta\alpha$ F V367D C369R / dTIM 481-908 zeigte eine äußerst schwache Autoaktivierung. Dies kann einerseits durch einen zufälligen Abbau der farblosen Substanz XGal erklärt werden. Ein anderer Grund könnte eine äußerst schwache Expression der Gene für die beiden Proteine sein und eine daraus resultierende Wechselwirkung der beiden Proteine mit dem LexA-Promotor. Auffällig war, dass die Klone dPER $\Delta\alpha$ F / dTIM 481-908 und dPER Δ S/M / dTIM 481-908 keine Spuren einer Autoaktivierung zeigten, woraus zu schließen ist, dass die Blaufärbung weniger Kolonien durch einen zufälligen Abbau der instabilen Substanz XGal entstanden ist.

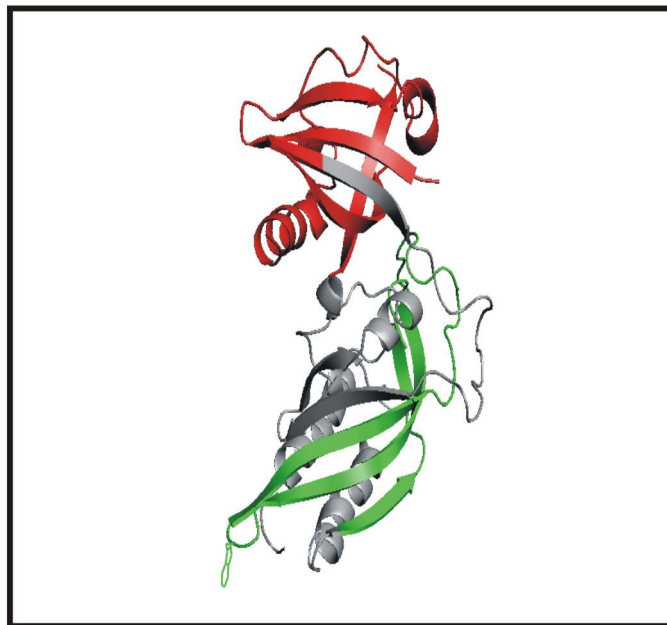


Abb. 5.4.1: Postulierte Bindestellen von dTIM in dPER $\Delta\alpha$ F.

Dargestellt ist die Struktur von dPER $\Delta\alpha$ F, dieses Protein fand auch in den Hefe-II-Hybrid-Studien Verwendung. Die Bindungsstelle auf der PAS-A 233-365 Region ist in rot dargestellt, die Bindungsstelle auf der CLD-Region 453-511 ist in grüner Farbe markiert (Abbildung erstellt mit Pymol).

Zusammenfassung:

Zirkadiane Uhren sind intrinsische, Zeit-aufrechterhaltene Systeme, die sich in den meisten Organismen entwickelt haben. Durch sie wird die Oszillation von Verhalten und physiologischen Prozessen auf molekularer Ebene reguliert. In der vorliegenden Arbeit wurde das Uhrenprotein dPERIOD (dPER) der molekularen Uhr von *Drosophila melanogaster* biochemisch und biophysikalisch charakterisiert.

Die Reinigung der C-terminalen α F-Helix von dPER, die bei der Dimerisierung und eventuell auch bei der Bindung von TIMELESS eine wichtige Rolle spielt, erwies sich als problematisch. Nach dem Abspalten des GST-Fusionsanteils konnte die α F-Helix nicht isoliert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass das dPER-Fragment ohne GST-Fusionsanteil nicht stabil ist. Die Expression und Reinigung der α F-Helix mit einem C-terminalen Hexahistidin-Fusionsanteil war ebenfalls nicht erfolgreich. Eine Bindungskinetik zwischen der PAS-A-Region von dPER und der α F-Helix konnte nicht ermittelt werden.

Zur Erstellung einer Dimerisierungskinetik von dPER wt und diversen dPER-Mutanten mittels Tryptophan-Fluoreszenz konnten wichtige Vorversuche gemacht werden. Bei der Titration von dPER 232-599 wt sowie der Mutante dPER 232-599 M560D konnte durch Beobachtung des Polarisationsignals ein Übergang von der monomeren in die dimere Form ermittelt werden. Die Werte des Übergangs entsprachen mit Einschränkungen den durch die analytische Ultrazentrifugation erhaltenen Dissoziationskonstanten. Bei der Aufnahme von Tryptophan-Emissionsspektren konnte ein Übergang vom monomeren in den dimeren Zustand in Form einer Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums nur bei der dPER M560D-Mutante beobachtet werden. Kinetische Messungen mittels Fluoreszenzspektroskopie oder Polarisation scheiterten auf Grund einer Bleichung des als Fluorophor verwendeten Tryptophans.

Mit der Methode des Hefe-II-Hybrid-Systems wurde das aus strukturellen Informationen abgeleitete Bindungsmodell von dPER und TIM experimentell überprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass die C-terminale α F-Helix von dPER die Bindung von TIM an die PAS-A-Region nicht beeinträchtigt. Eine Aussage über die Aminosäuren, die bei der TIM-Bindung von dPER essentiell sind, konnte nicht getroffen werden, da nur der Austausch von zwei Aminosäuren der PAS-A-Domäne gelang. Dieser Austausch beeinträchtigte die Bindung jedoch nicht.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	
°C	Temperatur in Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
ADH	Alkoholdehydrogenase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	AHR <i>nuclear translocator</i>
Bp	basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
C-Terminus	Carboxyterminus
CYC	CYCLE
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
DBT	Doubletime
dCLK	CLOCK
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dPER	PERIOD
DTE	1,4-Diethioerythriol
dTIM	TIMELESS
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethydiamintetraessigsäure
<i>et al</i>	<i>et alia</i>
FPLC	<i>fast performance liquid chromatographie</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GSH	reduzierte Form von Glutathion
GST	Glutathion S-Transferase
His ₆	Hexahistidinrest
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
lat.	Lateinisch
LB	Luria Bertani
M	molar
mA	Milliampère
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MCS	<i>engl. multiple cloning site</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter

NaOH	Natronlauge
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
Nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PER	PERIOD
<i>Pfu</i>	<i>pyrococcus furiosus</i>
pI	isoelektrischer Punkt
pmol	Pikomol
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>round per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGG	SHAGGY
SIM	Genprodukt des <i>single-minded</i> locos von <i>D. melanogaster</i>
SPR	<i>surface-plasmon-resonance</i>
T	ThyminTAE Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris-buffered-saline</i>
<i>TBST</i>	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin

Bei den Aminosäuren wurde wahlweise der Ein-Buchstaben-Code oder der Drei-Buchstaben-Code verwendet mit folgenden Abkürzungen verwendet.

Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code	Name der Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleicin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin

T
V
W
Y

Tre
Val
Trp
Tyr

Threonin
Valin
Tryptophan
Tyrosin

6. Literatur

Akten, B., Jauch, E., Genova, G.K., Kim E.Y., Edery, I., Raabe, T., & Jackson, F.R. A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat. Neurosci* 6, 251-257.

Arendt J, Melatonin and human rhythms *Chronobiology Int.* 23 (1-2) 21-37 Review (2006).

Aschhoff, J. Circadian Rhythms in Man. *Science* 148, 1427-1432 (1965).

Ashmore, L.J., Sathyanarayanan, S., Silvestre, D.W., Emerson, M.M., Schotland, P., and Sehgal, A., Novel insights into the regulation of the timeless protein. *J. Neurosci.* 23, 7810-7819 (2003).

Atkins P. Kurzlehrbuch der physikalischen Chemie VCH Viley Verlag Weinheim, (2001).

Ausubel, F.M, Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (Eds) (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, New York.

Bargellio, T.A., Jackson, F.R., and Young, M.W. Restoration of circadian behavioral rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 312, 752-754 (1984).

Beersma D.G., Gordjin M.C. Circadian control of the sleep wake cycle. *Physiol Behav.* Oct 17; (2006).

Bell-Pedersen D, Cassone V, Earnst D J, Golden S, Hardin P, Thomas T, Zoran M, Circadian Rhythms from multiple Oscillators: Lessons from diverse Organisms. *Natur Reviews Genetics* 6, 544- 556 (2005).

Benzer S. From the gene to behavior. *JAMA* 218: 1015-1022, (1971).

Blau J. The *Drosophila* circadian clock. What we know and what we don't know. *Semin Cell Dev Biol* 12: 287-293 (2001)

Blau J. & Rothenfluh A. Siesta-time is in the genes. *Neuron* 24: 7-9, (1999).

Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).

Brandes C, Plautz JD, Stanewsky R, Jaminson CF, Straume M, Wod KV, Kay SA, Hall JC. Novel features of *Drosophila* period transcription revealed by realtime luciferase reporting. *Neuron* 16, 687-692 (1996).

Brewer Y.B., Ballin J.D., Fialcowitz-White E.F., Blackshear P.J., and Wilson G.M. Substrate Binding of conformational changes in the RNA-Binding Domain of tristetraprolin assessed by Fluoreszenz spectrometry of tryptophane mutants. *Biochemistry* Nov 21; 45(46): 13807-13817 (2006).

Brown SA & Schibler U. The ins and outs of circadian timekeeping *Current opinion in Genetics & Development* vol. 9, no. 5, 7, pp. 588-594 (1999).

Ceriani, M.F. Darlington, T.K., Stakins, D., Mas, P., Petti, A.A, Weitz, C.J., and Kay, S.A. Light-dependent sequestration of TIMELESS and CRYPTOCHROME. *Science* 285, 553-556 (1999).

Cermakian N & Sassone Corsi, P. Multilevel of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, 59-67 (2000).

Chang, D.C., Reppert, S.M., A novel C-terminal domain of drosophila PERIOD inhibits dCLOCK: CYCLE-mediated transcription. *Curr Biol.* Apr 29;13(9):758-62 (2003).

Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Apr;86(7):2172-5 (1989).

Colot H.V, Hall J.C., Rosbash M. Interspecific comparison of the *period* gene 1988 of *Drosophila* reveals large blocks of non-conserved coding DNA. *EMBO J.* Dec 1;(12):3929-37 (1988).

Curtin K.D., Huang Z.J., Rosbash M. Temporally regulated nuclear entry of the *Drosophila* period protein contributes to the circadian clock. *Neuron.* Feb;14(2):365-72 (1995).

Dafforn T.R., Mahadeva R., Elliot P.R., Pasupathy S., Lomas D.A. A Kinetic Mechanism for the Polymerisation of α_1 -Trypsin. *Biol Chem Vol* 249 No. 149548-9555 (1999).

Darlington T.K, Wager-Smith K, Ceriani, M. F, Stakins, D. Gekakis N., Steeves, T.D., Takahashi, J.S. & Kay S. A., Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280, 1599-1603

Dong H., Nilsson L., Kurland C.G., Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates, *J. Mol. Biol.* 260 649-633 (1996).

Ederly, I., Zwiebel, L.J., Dembinska, M.E., and Rosbash, M., Temporal phosphorylation of the *Drosophila period* protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2260-2264 (1994).

Fields S. & Song O. a novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340 245-246 (1989).

Fields S. & Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics* 10 (8), 286-292 (1994).

Gala J.-H., *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1988).

Gekakis N., Saez L., Delahaye-Brown A.M., Myers M.P., Sehgal A., Young M.W., Weitz, C.J. Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science* 270, 811-815 (1995).

Glossop NR, Hardin PE. Central and peripheral circadian oscillator mechanisms. *Science* (2006).

Gracia-Saenz JA, Martin M, Maestro M, Vidauretta M, Veganzones S, Villalobos L, Rodriguez-Lajusticia L, Rafael S, Sanz-Cassla TM, Casado A, Sastre J, Arroyo M., Diaz-Robeo E. Circulating tumoral cells lack circadian rhythm in hospitalized metastatic breastcancer patients Clin Transl Oncol 11, 826-829

Gu Y.Z., Hogenesh J.B. & Bradfield C.A. The PAS Superfamily: Sensors of environmental and developmental signals. Annu Rev Pharmacol. Toxicol. 40:451-61 (2000).

Hall JC, Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila melanogaster* and other insects. Adv. Genet. 48: 1-280 (2003).

Hao, H., Allen, D.L., and Hardin, P.E., A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. Mol. Cell. Biol. 17, 3687-3693

Hardin PE, Analysis of period mRNA cycling in *Drosophila* head and body tissues indicates that body oscillators behave differently from head oscillators. Mol Cell Biol. 14(11): 7211-8 (1994).

Hardin, P.E., Hall J.C., and Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. Nature 343, 536-540 (1990).

Helfrich-Foster C, The neuroarchitecture of the circadian clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. Microsc. Res. Tech. 62, 94-102

Hendricks JC. Invited review: Sleeping flies don't lie: the use of *Drosophila melanogaster* to study sleep and circadian rhythms. J. Appl. Physiology. Apr;94(4): 1660-72; discussion 1673 (2003).

Houl JH, Yu W, Dudek SM, Hardin PE. PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-Box binding regulate circadian transcription. Genes Dev 20(6): 723-733 (2006).

Houl JH, Yu W, Dudek SM, Hardin PE. *Drosophila* CLOCK is constitutively expressed in oscillator and non-oscillator cells. J Biol Rhythms 21(2): 93-103 (2006).

Huang Z.J., Edery I., Rosbash M. PER Protein interactions and temperature compensation of a circadian clock in *Drosophila*. Science. Feb 24;267(5201):1169-72. (1995)

Huang Z.J., Edery I., Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. Nature. Jul 15;364(6434):259-62 (1993)

Huntor-Ensor M, Ousley A, Sehgal A. Regulation of the *Drosophila* protein TIMELESS suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. Cell 84, 677-685 (1996).

Kane F.J. Effects of rare codon clusters on high level expression of heterologous protein of *Escherichia coli*. Curr Opin in Biotechnol 6: 494-500.

Kaneko M, Park JH, Cheng Y, Hardin PE, Hall JC. Disruption of synaptic transmission Clock-gene-product oscillations in circadian pacemaker cells of *Drosophila* cause abnormal behavioural rhythms. J. Neurobiol. 43(3): 207-33 (2000).

- Karas M.**, Hillenkamp F. Laser desorption ionisation of proteins with molecular mass exceeding 10000 Daltons. *Analytical Chemistry* 60, 2299-2301 (1988).
- Kloss, B.**, Price J. L., Saez L., Blau J., Rothenfluh, A., Wesley, C.S., and Young, M.W. The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon. *Cell* 94, 97-100 (1998).
- Kloss, B.**, Rothenfluh, A., Young, M.W., and Saez, L. Phosphorylation of *period*, and *timeless* in the *Drosophila* K clock. *Neuron* 30, 699-706
- Kloss B.**, Rothenfluh A., Young M.W., Saez I. Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double time, period and timeless in the *Drosophila* clock. *Neuron* Jun; 30(3): 699-706 (2001).
- Konopka RJ & Benzer S.** Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 2112-2116 (1971).
- Krishnaen B**, Dryer SE, and Hardin PE. Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature* 400: 375-378, (1999).
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- Lee, C.**, Bae, K., and Edery, I. PER and TIM inhibit the DNA binding activity of a *Drosophila* CLOCK/CYCLE/DBMAL1 heterodimer without disrupting formation of the heterodimer: a basis for circadian transcription. *Mol. Cell Biol.* 19, 5316-5325.
- Levi F**, Chronotherapeutics: the relevance of timing in cancer therapy *Cancer Causes Control.* 4: 611-621 (2006).
- Lin, J.M.**, Kliman, V.L., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M., & Allada, R. A role for casein kinase 2alpha in the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 420, 816-820 (2002).
- Liu X**, Lorenz L., Yu QN, Hall JC and Rosbach N. Spatial and temporal expression of the *period* gene in *Drosophila* circadian system. *Genes Dev* 2: 228-238 (1988).
- Lopéz V.**, Alarcón R., Orellana S.M., Enriquèz P., Uribe E., Martínèz J., and Carvajal N. Insights into the interaction of human arginase II with substrate and manganese ions by site-directed mutagenesis and kinetic studies. *FEBS Journal* 272 4540-4548 (2005).
- Martinek, S.**, Inonog, S., Manoukian, A.S., & Young, M.W., (2001). A role of the segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 105, 769-779.
- McDonald, M.J.**, Rosbash, M., and Emery, P. Wild-type circadian rhythmicity is dependent on closely spaced E boxes in the *Drosophila* timeless promoter. *Mol. Cell Biol.* 21, 1207-1217 (2001).
- Meyer P**, Saez L, Young MW PER-TIM Interaction in living *Drosophila* cells: an interval timer of the circadian clock. *Science* 313; 311(5758): 226-229 (2006).

Meyers MP, Wager-Smith K., Rothenfluh-Hilfiker A & Young MW. Light induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. *Science* 271, 1737-1741 (1999).

Moore D, Cheesemann IM, Angel JE, Fahrbach SE, Robinson GE. Timekeeping in the honey bee colony: Integration of circadian clocks and division of labor. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43: 147-160 (1998).

Morera Y., Lamdan H., Bequet M., Ayala M., Rojas G., Munoz Y., Gavilando J.V. Biologically active vascular endothelial growth factor as a bacterial recombinant glutathione S-transferase fusion protein. *Biotechnol Appl Biochem* 2006 Apr;44(Pt 1):45-53.

Nambu J.R., Chen W., Hu S., and Crews S.T. The *Drosophila melanogaster* similar bHLH-PAS gene encodes a protein related to human hypoxia-inducible factor 1 alpha and *Drosophila* single-minded. *Gene* 172, 249-254 (1996).

Nawathan, P., and Rosbash, M., The doubletime and CKII kinases collaborate to potentiate *Drosophila* PER transcriptional repressor activity. *Mol. Cell* 13, 213-223 (2004).

Nemec K., Pande A.H., Qin S., Bieber Urbauer R.J., Tan S., Moe D., and Tatulian S.A. Structural and functional effects of tryptophanes inserted into the Membrane binding sites of human group IIA Phospholipase A₂. *Biochemistry* 45, 12448-12460 (2006).

Nishimoto E., Yamashita S., Szabo A.G. and Imoto T. Internal motion of lysozyme studied by time resolved depolarization of tryptophan residues. *Biochem* 37, 5599-5607 (1998).

Panda S., Sato T.K., Castrucci, A.M., Pollag, M.D., DeGrip W.L., Hogenesch J. B., Provencio I., Kay S.A., Melanopsin (Opn4) requirement for a normal light-induced circadian phase shifting. *Science*. Dec 13;298(5601):2213-6 (2002).

Park, Y.D., Huang K and Zhou H.M., Reactivation and Refolding of reassociated dimers of rabbit muscle creatine kinase. *J Prot Chem* Jan;20(1);67-72 (2001).

Pellequer J.L., Wager-Smith K.A., Kay S.A., and Getzoff E.D. Photoactive yellow protein: a structural prototype for three-dimensional fold of the PAS-domain superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 5884-5890 (1998).

Plautz, JD, Kaneko M, Hall JC & Kay S.A. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila melanogaster*. *Science* 278, 1632-1635.

Pointing C.P. & Arvind L. PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Curr. Biol.* / R674-R677 (1997).

Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M, Kloss B. & Young, M.W., *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94, 83-84 (1998).

Q Ye, Singh V.K., Blonde, J.D., Jia, Z. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the GST fused human Bri3 N-terminal domain. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* Jan 1;61(Pt1):62-4. (2005).

Rothenfluh, A. Young, M.W., and Saez, L. A TIMELESS-independent function for PERIOD proteins in the *Drosophila* clock. *Neuron* 26, 505-514 (2000).

Ruden D.M., Ma J., Li Y., Wood K & Ptashne M. Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequence. *Nature* 350, 250-252 (1991).

Saez L., & Young, M.W., Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless *Neuron* 17, 911-920 (1996).

Sanger F. & Coulson A.R., A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94, 441-448 (1975).

Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1977. 24, 104-108 (1992).

Schägger H., Aquilia H., Von Jagow G. Coomassie blue-sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for direct visualisation of polypeptides during electrophoresis. *Aug* 15;173(1):201-5 (1988).

Schuck P., Reliable determination of binding affinity and kinetics using surface plasmon resonance biosensors. *Curr Opin in Biotechnol* Aug8(4):478-486.

Sehgal, A., Rothenfluh Hilfiker, A., Hunter-Ensor, M., Chen, Y., Myers, M.P., and Young, M.W. Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting cycles in *period* gene autoregulation. *Science* 270, 808-810 (1995).

Shafer; O.T., Rosbash, M., and Truman, J.W., Sequential nuclear accumulation of clock proteins period and timeless in the pacemaker neurons of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci* 22, 5946-5954 (2002).

Siple J., Gollant E., Increased ribosomal accuracy increases a ribosome frameshifting at a 'hungry' codon. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5469-5473 (1993).

Smyth D.R., Mrozkiwiewicy, m.K., McGrath, W.J., Listwan P., Kobe P. Crystal structures of fusion proteins with large affinity tags. *Protein Sci.* Jul;12(7):1312-22 (2003)

Sridevi K., Junjeja J., Bhuyan A.K., Krishnamoorthy G., and J.B. Udgaonkar. The slow folding reaction of Barstar. The core tryptophane region attains tight packing before Substantial secondary and tertiary structure formation and final compaction of the polypeptide chain. *J Mol Biol* 302, 492-485 (2000).

Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbash, M., and Hall, J.C. The *cry^b* mutation identifies cryptochrome as circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95, 681-692 (1998).

Tanoue S, Krishanen P, Krishanen B, Dryer SE Hardin PE. Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfactory rhythms in *Drosophila*. *Curr Biol.* Apr 20;14(8): 638-49 (2004).

Thakur K.G., Anagha Maduhusdan Joshi and Gopal B., Structural and biophysical studies on two promoter recognition domains of the extracytoplasmic function σ factor σ^C from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bio Chem* (Jan 2006).

Vanhooren A., Illyes E., MAjer Z., Hanssens I., Fluorescence contributes of the individual Trp residues in goat α -lactalbumin. *Biochemica et Biophysica Acta* 1764 1586-1591 (2006).

Wang, G. K., Ousley, A., Darlington, T.K., Chen, D., Chen, Y., W., Hickman, L.J., Kay, S.A., and Sehgal, A. Regulation of the cycling of *timeless (tim)* RNA. *J. Neurobiol.* K 47, 161-175 (2001).

West RWJr., Yocum RR., Ptashne M., *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Mol. Cell. Biol.* 2467-2478 (1984).

Winter R. & Noll F. *Methoden der biophysikalischen Chemie* Teubner Verlag Stuttgart, (1998).

Yildiz, O,Doi, M., Yujnowsky I, Cardone L., Berndt A., Hennig S., Schulze S., Urbanke C., Sassne Corsi P., Wolf E. Crystal structure and interactions of the PAS repeat region of the *Drosophila* clock protein PERIOD. *Mol Cell.* Jan /; 17(1): 69-82 (2005).

Young M.W., Kay S, Time Zones: A comparative genetics of circadian clocks. *Natur Reviews Genetics* 2, 702-715 (2001)

Yu, W., Zheng H., Houl J.H., Dauwalder B., and Hardin P.E. PER dependent rhythms in CLK phosphorylation and circadian transcription. *Genes Dev.* 2006 Mar 15; 20(6): 723-733.

Zehring, W.A., Wheeler D.A., Reddy P., Konopka R.J., Kyriacou C.P., Rosbash M., Hall J.C. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmic to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 39, 369-367 (1984).

Zeng, H., Qian, Z., Myers, M.P., and Rosbash, M. A light-entrainment for the *Drosophila melanogaster* circadian clock. *Nature* 380, 129-135 (1996).

Zerr DM, Hall JC, Rosbash M, Siwicki KK Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS of *Drosophila*. *J Neurosci* 10(8): 2749-62 (1990).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Aufbau der biologischen Uhr	1
1.2 <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus der Chronobiologie	4
1.3 Die molekularen Grundlagen des zentralen Oszillators von <i>Drosophila melanogaster</i> - die PER/TIM- Rückkopplungsschleife	7
1.4 Eine Übersicht über das Tandem-PAS-Domänen-Protein PERIOD	9
1.4.1 Die Röntgen-Struktur des Tandem-PAS-Domänen Proteins PERIOD	11
1.4.2 Funktion der PAS-Domänen und der C-terminalen α -Helix (αF) des Uhrenproteins dPER bei der Dimerisierung	13
1.5 Wechselwirkungen von dPERIOD mit dem Uhrenprotein dTIMELESS	17
 Zielsetzung	 23

2. Material

2.1 Geräte	24
2.2 Chemikalien	24
2.3 Enzyme	25
2.4 Reagenzienkits und Größenstandards	25
2.5 verwendetes Säulenmaterial	26
2.6 verwendete Pufferlösungen	26
2.6.1 Verbrauchslösungen	26
2.6.2 Lösungen zur Reinigung von Proteinen mit Hexahistidin-Fusionsanteil	27
2.6.3 Lösungen zur Reinigung von Proteinen mit GST-Rest	27
2.6.4 Allgemeine Lösungen zur Proteinreinigung und Charakterisierung	27
2.7 Verwendete Antikörper	28
2.8 Verwendete Antibiotika	28
2.9 Verwendete Medien	29
2.9.1 Medien zur Anzucht von Bakterien	29
2.9.2 Medien zur Anzucht von Hefen	29
2.10 Verwendete Mikroorganismen und Zellen	31
2.10.1 Verwendete Bakterienstämme	31
2.10.2 Verwendete Hefestämme	31
2.11 Verwendete Oligonukleotide	31
2.11.1 Verwendete Oligonukleotide zum Einfügen von Mutationen	31
2.11.2 Verwendete flankierende Oligonukleotide	32
2.11.3 Oligonukleotide für inverse PCR-Reaktionen zur Erzeugung von Mutationen	32
2.11.4 Oligonukleotide zur Amplifikation des Fragments <i>dper</i> 538-576	32
2.12 Verwendete Vektoren	32
2.13 Verwendete Konstrukte	33

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden	34
3.1.1 Isolierung von Plasmid DNA	34
3.1.2 Bestimmung der Konzentration der DNA	34
3.1.3 Trennung von DNA in Agarosegelen	34
3.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	35
3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion	35
3.1.6 Einfügen von Mutationen mittels überlappender PCR	36
3.1.7 Die Methode der QC-PCR (Quick Change –PCR), verändert nach Stratagene®	37
3.1.8 Methode der mutagenen PCR nach dem „Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit“, (New England Biolabs)	38
3.1.9 Reinigung von PCR-Produkten	40
3.1.10 Restriktion von DNA	40
3.1.11 Klonierung von PCR-Fragmenten	41
3.1.12 Ligation von PCR-Fragmenten	42
3.1.13 Kolonie-PCR	42
3.1.14 DNA-Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	42
3.2 Mikrobiologische Methoden	43
3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	43
3.2.2 Transformation von chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA	44
3.2.3 Langfristige Lagerung von Bakterien	44
3.2.4 Lithium-Acetat Transformation von Hefen	45
3.3 Proteinbiochemische Methoden	45
3.3.1 Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	45
3.3.2 Testexpression von rekombinanten Proteinen	46
3.3.3 Löslichkeitstests von Proteinen	46
3.3.4 Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen	46
3.3.5 Reinigung von GST-fusionierten Proteinen über GSH-Säulen	46
3.3.6 Reinigung von Proteinen mit Hexahistidinfraktionsanteil	47
3.3.7 Größenausschlusschromatographie	48
3.3.8 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.3.9 Polyacrylamidgelelektrophorese für Proteine und Peptide < 10 kDa	49
3.3.10 Detektion von Proteinen durch Western-Blotting	50
3.3.11 Enzymatische Spaltung von Fusionsanteilen rekombinanter Proteine	50
3.3.12 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	51
3.3.13 Ultrafiltration zur Konzentration von Proteinen	51
3.3.14 Matrixunterstützte Interaktionstests zur Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen	51
3.3.15 Das Hefe-II-Hybrid-Systems	51
3.3.15.1 Durchführung der Zwei-Hybrid-Untersuchung	54

3.4 Biophysikalische Methoden	55
3.4.1 Isotherme Titrationskalorimetrie	55
3.4.2 Fluoreszenz-Spektroskopie	55
3.4.3 Aufnahme von Polarisationspektren	56
3.4.4 Massenspektrometrie	57
3.4.5 Untersuchung von Protein-Interaktionen durch Oberflächen Plasmon Resonanz	58

4.0 Ergebnisse

4.1 Klonierung und Expression des Period-Fragments dPER 538-576 (α F) im prokaryotischen System <i>Escherichia coli</i>	61
4.2. Interaktionstest zwischen α F (dPERIOD 538-576) und dPERIOD $\Delta\alpha$ F (232-538)	70
4.2.1 Durchführung Interaktionsstudien von GST- α F mit dPERIOD 232-538	70
4.2.2 Erstellung einer Bindungskinetik zwischen dPER $\Delta\alpha$ F und der α F-Helix mittels Oberflächen-Plasmonresonanz	71
4.3 Erstellung von Monomerisierungskinetiken von Wildtyp und Mutanten des Uhrenproteins dPERIOD 232-599 durch Fluoreszenzspektroskopie	72
4.3.1 Aufnahme von Fluoreszenzspektren von dPERIOD 232-599, sowie ausgewählter Mutanten	73
4.4 Erstellung einer Dissoziationskonstanten K_D von PERIOD 232-599 WT und dPERIOD 232-599M560D durch Titration	77
4.5 Erstellung einer Monomerisierungskinetik von dPERIOD 232-599 und dPEROD 232-599 M560D mittels Polarisation	79
4.6 Ergebnisse des Interaktionstests zwischen dPERIOD 232-538 und dTIM 481-908 mit dem Hefe II Hybrid System	81
4.6.1 Rolle der α F-Helix von dPERIOD bei der Bindung von TIM	82
4.6.2 Beteiligung einzelner Aminosäuren der PAS A Domäne von dPERIOD 232-538 an der Interaktion mit TIM 481-908	82

5.0 Diskussion und Ausblick

5.1 Klonierung und Expression des Period-Fragments dPER 538-576 (α F) im prokaryotischen System <i>Escherichia coli</i>	84
5.2 Matrixunterstützter Interaktionstest zwischen α F und dPER $\Delta\alpha$ F	88
5.2.1 Erstellung einer Bindungskinetik zwischen dPER $\Delta\alpha$ F dPER 232-538) und der α F-Helix (dPER 538-576) mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz	89

5.3	Erstellung von Monomerisierungskinetiken von Wildtyp und Mutanten des Uhrenproteins dPERIOD 232-599 durch Fluoreszenzspektroskopie	90
5.3.1	Aufnahme von Fluoreszenzspektren von dPERIOD 232-599, sowie ausgewählter Mutanten	91
5.3.2	Erstellung einer Dissoziationskonstanten K_D von dPERIOD 232-599 und dPERIOD 232-599 M560D durch Titration	93
5.3.3	Erstellung einer Monomerisierungskinetik von dPERIOD 232-599 und dPERIOD 232-599 M560D unter Verwendung der Methode der Polarisation	94
5.4	Zur Funktion der α F-Helix von dPERIOD bei der Bindung von TIMELESS	94
5.4.1	Beteiligung einzelner Aminosäuren der PAS A Domäne von dPERIOD 232-538 an der Interaktion mit TIMELESS 481-908	95
5.4.2	Ergebnisse des Interaktionstests zwischen dPERIOD Δ α F und dTIMELESS 481-908 mit dem Hefe II Hybrid System	96
	Zusammenfassung	98
	Anhang	99

Danksagung

Zum Abschluss der Diplomarbeit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

- Prof. Dr. rer. nat. Alfred Wittinghofer, der es mir ermöglicht hat, in seiner Abteilung für strukturelle Biologie meine Diplomarbeit anfertigen zu dürfen.
- Prof. Dr. M. Bähler für die freundliche Übernahme der Fernbetreuung meiner Diplomarbeit am Max-Planck-Institut.
- Dr. Eva Wolf für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in ihrer Arbeitsgruppe und die mir dadurch eröffneten wissenschaftlichen Möglichkeiten.

Alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe „Uhrenproteine“ haben ein großes Lob und meinen aufrichtigen Dank verdient:

- Sven für sein stets offenes Ohr für meine ständigen Fragen und seine sprichwörtliche „Engelsgeduld“, ohne die ich des Öfteren „kopflös“ geworden wäre und der mir auch in Problemfällen(!!!) geduldig zur Seite stand.
- Tilo für sein sonniges Gemüt, seine stetige Hilfsbereitschaft, besonders bei meinen Fragen zur Spektroskopie und seiner Gesellschaft bei der Einnahme der mittäglichen kulinarischen Genüsse in der Mensa.
- Nicole für ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihr freundliches, ausgeglichenes Gemüt.
- Helena, die mir wiederholt bei der Analyse von Gelen auf die Sprünge geholfen und mich schon morgens mit ihrer guten Laune aufgebaut hat.
- Christiane für ihre Mithilfe bei der Massenspektrometrie und ihre stets guten Ratschläge für preiswertes Einkaufen.
- Julia für die Tipps für Tris-Tricine-Gele und die guten Gespräche in den Arbeitspausen.

Ferner bedanke ich mich bei:

- Michael Lammers für die Hilfe mit der ITC
- Silke Götze für die Einarbeitung in das Programm Endnote und ihre gute Laune
- Marcos für die guten Ratschläge bei der BIACORE-Messung
- Thorsten für die Hilfe bei der Hilfe bei der Polarisierung und den Dienst als Taxifahrer bei nächtlichen Schlechtwetterlagen.
- Christoph für die kompetente Hilfe bei der Polarisierung

- Daniel für viele gute wissenschaftliche und persönliche Ratschläge, den literarischen Freitag und für die gute Organisation bei der Nachtschicht am MPI.
- Mona für ihre freundliches, mitfühlendes Wesen, ihr unerwartet großes Interesse zu den Fragen der Wissenschaft

Auch in meinem privaten Umfeld schulde ich einigen Leuten Dank:

- Dr. Thomas Roddey für die geistige und geistliche Unterstützung in den letzten Monaten und den vielen tiefschürfenden Gesprächen in der KHG, bei denen mir erneute bewusst wurde, dass Naturwissenschaft und Religion keine Gegensätze darstellen müssen.
- Meinen Freunden aus Münster, Gütersloh, Dortmund und Umgebung und allen Freunden und Bekanntschaften aus dem StudiVZ und der Deutsche Bahn, die mich immer wieder aufgeheitert haben.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Großmutter, die mir mein Studium erst ermöglicht haben, für ihr stets offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte und für die gute Pflege und Verpflegung im heimatlichen Gütersloh.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe.

Münster, den _____

DIPLOMARBEIT

**Vorgelegt zur Erlangung des Grades eines Diplom-Biologen an der
Fakultät für Biologie der Westf. Wilhelms Universität Münster**

Biochemische Charakterisierung von Uhrenproteinen

von

Philipp Peterburs

angefertigt am

Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

Abteilung für Strukturelle Biologie

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Alfred Wittinghofer

Koreferent: Prof. Dr. Martin Bähler