

Untersuchungen zu den Uhrproteinen
PERIOD und TIMELESS aus der
Fruchtfliege *Drosophila*
melanogaster



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III - BIOLOGIE
UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT
REGENSBURG

vorgelegt von
Johannes Landskron
aus
Regensburg
2007

Promotionsgesuch eingereicht am: 18.7.2007

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ralf Stanewsky

Universität Regensburg,

Queen Mary University of London

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Erster Gutachter: Prof. Dr. Ralf Stanewsky

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Charlotte Förster

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Gernot Längst

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Federica Sandrelli, Eran Tauber, Mirko Pegoraro, Gabriella Mazzotta, Paola Cisotto, Johannes Landskron, Ralf Stanewsky, Alberto Piccin, Ezio Rosato, Mauro Zordan, Rodolfo Costa and Charalambos P. Kyriacou, 2007 A Molecular Basis for Natural Selection at the *timeless* Locus in *Drosophila melanogaster*. *Science* 316: 1898-1900.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Innere Uhren sind eine Anpassung an die Bedingungen auf der Erde	9
1.2	Die Grundstruktur von inneren Uhren	11
1.3	<i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus für die circadiane Rhythmik	13
1.4	Der molekulare Oszillator von <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.5	Die Uhrneuronen sind für das rhythmische Verhalten verantwortlich	19
1.6	Der Aufbau und die Funktion von PERIOD	21
1.6.1	Domänen von PER und deren Funktion	21
1.6.2	Hinweise für die Homodimerisierung von PER	23
1.6.2.1	Ältere Studien, die auf eine Homodimerisierung hinweisen	23
1.6.2.2	Die Aufklärung der 3D-Struktur der PAS-Domäne von PER	25
1.7	Mechanismen der Temperaturkompensation	28
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	29
1.8.1	Untersuchung der transgenen Fliegenlinie 21-32	29
1.8.2	Untersuchung der Funktion des PER:PER-Homodimers	30
1.8.3	Untersuchung eines Nuclear Export Signals in PER	31

2	Materialien und Methoden	32
2.1	Molekularbiologische Methoden	32
2.1.1	PCR, Sequenzierung und Sequenzanalyse	32
2.1.2	Klonierung allgemein	34
2.1.3	Klonierung der <i>per</i> -Konstrukte	35
2.1.3.1	Ausgangsvektoren	35
2.1.3.2	Herstellung der TAGs	36
2.1.3.3	Klonierung der <i>per</i> -Konstrukte ohne Mutationen	36
2.1.3.4	Klonierung der Konstrukte mit Basenaustauschen	37
2.1.4	Westernblot	38
2.1.4.1	Proteinpräparation und Gelelektrophorese	38
2.1.4.2	Proteinpräparation mit Dephosphorylierung der Proteine	39
2.1.4.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.1.4.4	Semidryblot	39
2.1.4.5	Antikörperfärbung und Detektion	40
2.1.5	Immunocopräzipitation (CoIP)	40
2.1.6	Messung der Transkription von <i>per</i> -Konstrukten	42
2.1.6.1	RNA-Präparation und reverse Transkription	42
2.1.6.2	Realtime-PCR und Auswertung	42
2.2	Genetische Methoden	44
2.2.1	Fliegenstämme	44
2.2.2	Fliegenaufzucht	46
2.2.3	Remobilisierung des <i>P</i> -Elements von 21-32	46
2.2.4	Herstellung Transgener Fliegen	47
2.2.4.1	DNA-Mikroinjektion in Fliegenembryos	47
2.2.4.2	Herstellung genetisch stabiler Transformanten	48

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	5
2.2.5 Herstellung doppelt homozygoter Transformanten der <i>per</i> -Konstrukte für die CoIP	50
2.2.5.1 Remobilisierung von <i>per-M560D-c-myc</i>	50
2.2.5.2 Erzeugung doppelt homozygoter Linien	51
2.3 <i>in vivo</i> -Biolumineszenzmessung	52
2.4 Messung der Lokomotoraktivität	52
2.5 Immunhistochemische Färbungen	56
2.5.1 Präabsorption des polyclonalen PER-Serums	56
2.5.2 Kryoschnitte von Fliegenköpfen und Antikörperfärbung	56
2.5.3 Bestimmung der PER-Lokalisation	57
3 Ergebnisse	58
3.1 Zwei unterschiedliche Allele von <i>tim</i> exprimieren zwei TIM-Isoformen	58
3.1.1 Untersuchungen der Linie 21-32	58
3.1.1.1 Das Protein TIM zeigt auf Westernblots ein anormales Laufverhalten	58
3.1.1.2 Das Gen <i>CG6328</i> beeinflusst TIM nicht	60
3.1.1.3 Der Western blot-Phänotyp korreliert mit zwei <i>tim</i> -Allelen	62
3.1.2 Phosphorylierung ist nicht die Ursache der zwei TIM-Banden	64
3.1.3 Untersuchung verschiedener wildtypischer und transgener Fliegenlinien in Hinblick auf die Expression der TIM-Isoformen	65
3.2 Herstellung und Untersuchung der <i>period</i> -Transformanten	68
3.2.1 Herstellung der transgenen Fliegenlinien	68
3.2.1.1 Klonierung der <i>per</i> -Konstrukte	68
3.2.1.2 Erzeugung der <i>per</i> -Transformanten	70

3.2.2	Analyse der rekombinanten PER-Proteine mit Westernblot	71
3.2.2.1	Die Transformanten zeigen unterschiedliche Expressionslevel von PER	71
3.2.2.2	Zeitliche Analyse der PER-Expression	73
3.2.3	Quantifizierung der mRNA der <i>per</i> -Konstrukte ausgewählter Transformanten	76
3.2.4	Untersuchung der Dimerisierung von PER – gegenseitige Beeinflussung verschiedener PER-Varianten untereinander	78
3.2.5	Untersuchung der Dimerisierung von PER mit CoIP	80
3.2.5.1	Die Proteinmenge in Tieren mit jeweils einer Kopie der Konstrukte ist zu gering für die CoIP	80
3.2.5.2	Herstellung doppelt homozygoter Transformanten	81
3.2.5.3	PER interagiert mit sich und TIM	82
3.2.5.4	Der Austausch M560D schwächt die Homodimerisierung, aber nicht die Bindung mit TIM	84
3.2.6	Analyse des Lokomotorverhaltens der <i>per</i> -Transformanten	85
3.2.6.1	Verhalten der Kontrollen <i>y w</i> und <i>y per⁰¹ w</i>	85
3.2.6.2	Die Konstrukte <i>per-HA</i> und <i>per-c-myc</i> retten den <i>per⁰¹</i> -Verhaltensphänotyp gut	88
3.2.6.3	Der Basenaustausch M560D verschlechtert die Rhythmizität der Tiere	92
3.2.6.4	PER mit den Austauschen R345E, W482E oder W482E mit M560D führt nicht zu <i>per⁺</i> -Verhalten	95

3.2.6.5	Verhalten der Fliegenlinien mit mutiertem Nuclear Export Signal, I530A	104
3.2.7	Untersuchung der zellulären PER-Lokalisation in der Nuclear Export Signal Mutante	111
4	Diskussion	114
4.1	Untersuchung der <i>tim</i> -Allele <i>ls-tim</i> und <i>s-tim</i>	114
4.1.1	Zwei postulierte Isoformen von TIM werden tatsächlich exprimiert	114
4.1.2	Durch die Mobilisierung des <i>P</i> -Elements während der <i>P</i> -Mutagenese wurde das <i>ls-tim</i> -Allel eingekreuzt . . .	116
4.1.3	Die zufällige Verteilung der Allele ermöglichte deren Entdeckung	117
4.1.4	<i>ls-tim</i> macht fit für den Winter	118
4.2	Untersuchung der <i>per</i> -Transformanten	119
4.2.1	Die Funktion des PER:PER-Homodimers	119
4.2.1.1	Die <i>per</i> -Konstrukte ohne Basenaustausch retten den <i>per⁰</i> -Phänotyp gut	119
4.2.1.2	Der Aminosäureaustausch M560D schwächt die Rhythmizität des Lokomotorverhaltens und die Homodimerisierung	120
4.2.1.3	Die Austausche R345E, W482E und die Doppelmutante W482E-M560D verursachen einen <i>per⁰</i> -ähnlichen Phänotyp	121
4.2.1.4	Die PER-TIM-Interaktion kann für die unterschiedlichen Phänotypen verantwortlich sein	123
4.2.1.5	Die Funktion des PER:PER-Homodimers . .	126
4.2.1.6	Ein besseres Verständnis von <i>per^L</i>	128
4.2.2	Bestätigung eines neuen Nuclear Export Signal in PER	130

4.2.3	Neue Erkenntnisse über die Funktion von PER und Möglichkeiten zur Regulation der Temperaturkompensation	132
4.2.4	Ausblick	135
5	Zusammenfassung	136
	Abbildungsverzeichnis	139
	Tabellenverzeichnis	142
	Literaturverzeichnis	143
A	Zusatzinformationen	155
B	Dank	166
C	Erklärung	168

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Innere Uhren sind eine Anpassung an die Bedingungen auf der Erde

Im Laufe der Evolution hat sich das Leben auf der Erde ständig neuen Lebensräumen und wechselnden Umweltbedingungen angepasst. Nur eine Umweltbedingung ist dabei konstant geblieben und bestimmt bis heute maßgeblich das Leben der meisten Organismen: Der Wechsel zwischen Tag und Nacht. Sehr früh in der Evolution hat sich herausgestellt, dass eine Anpassung an diesen Umwelteinfluss die biologische Fitness entscheidend verbessert. Daher besitzen nahezu alle rezenten Organismen – von Einzellern bis zu den Säugetieren – eine innere Uhr, die den Tagesablauf der Organismen steuert.

Bereits im 18. Jahrhundert wurde die circadiane Rhythmik bei Pflanzen entdeckt. De Mairan beschrieb die circadiane Blattbewegung der Mimose (*Mimosa pudica*, de Mairan, 1729), die sich auch in konstanter Dunkelheit fortsetzt und Carl von Linné pflanzte 1745 seine Blumenuhr im botanischen Garten von Uppsala. Aufgrund der Koevolution zwischen Bestäuber und Pflanze öffnen etliche Pflanzen ihre Blüten nur zu bestimmten, artspezifischen Tages-

zeiten. Von Linné nutzte diese Beobachtung und arrangierte entsprechende Blumen in Form eines Ziffernblattes so, dass er anhand der geöffneten Blüten die Uhrzeit abgelesen konnte. Heute dienen Vertreter der unterschiedlichsten Äste des Stammbaumes als Modellorganismen für die circadiane Rhythmik. Neben der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (siehe unten) dienen z.B. *Synechococcus*, ein Vertreter der Cyanobakterien (Review: Iwasaki and Kondo, 2004), Brotschimmel (*Neurospora crassa*, Review: Dunlap and Loros, 2006), der Kreuzblütler *Arabidopsis thaliana* (Review: Gardner *et al.*, 2006) und Vertreter der Säuger, wie die Maus (Review: Ko and Takahashi, 2006) als Modellorganismen.

Obwohl die auffälligste Funktion der inneren Uhr bei Tieren darin besteht, den Aktivitäts- und Ruhephasenrhythmus zu steuern, geht die Bedeutung der inneren Uhr und der Einfluss auf den Organismus weit darüber hinaus. Sie dient vor allem dazu, den Organismus auf die zu erwartenden Anforderungen rechtzeitig vorzubereiten. Daher stehen sehr viele physiologische Bereiche unter der Kontrolle der inneren Uhr, wie z.B. der Stoffwechsel und Teile des Immunsystems, um nur zwei zu nennen (Panda *et al.*, 2002).

Dass eine gut funktionierende innere Uhr tatsächlich einen Selektionsvorteil bietet, wurde eindrucksvoll in Versuchen an Cyanobakterien gezeigt. Verschiedene Kulturen, deren innere Uhren aufgrund einer Mutation im selben Gen unterschiedliche Periodenlängen haben, wurden miteinander gemischt und in verschiedenen künstlichen Licht / Dunkel-Zyklen kultiviert. Nach 27 Tagen in Kultur zeigte sich, dass von dem ursprünglichen Gemisch aus zwei Stämmen nur noch ein Stamm in der Kultur vorhanden war, nämlich der Stamm dessen Periode der inneren Uhr näher an der Dauer der Licht / Dunkel-Zyklen lag. Dieser Stamm war in der Lage den anderen Stamm zu überwachsen (Ouyang *et al.*, 1998).

1.2 Die Grundstruktur von inneren Uhren

Die innere Uhr ist ein Mechanismus zur Messung der Zeit, der ähnlich einer Uhr im technischen Sinn, durch äußere Einflüsse, sogenannte Zeitgeber, gestellt werden kann. Diese Zeitgeber ergeben sich aus den Folgen des Tag-Nacht-Rhythmus. Der wichtigste Zeitgeber ist Licht, aber auch der Temperaturunterschied zwischen Tag und Nacht, sowie bei höheren Organismen soziale Einflüsse, wie z.B. die Nahrungsaufnahme (Stephan *et al.*, 1979), sind in der Lage die innere Uhr neu zu stellen. Diesen Vorgang bezeichnet man in der circadianen Rhythmik als *Entrainment*. Obwohl die Zeitgeber in der Natur die innere Uhr täglich neu synchronisieren, ist die innere Uhr auch in der Lage unter konstanten Bedingungen, ohne äußere (exogene) Zeitgeber, mit einer Periodenlänge τ von ca. 24 h weiterzulaufen. Wie auch bei einer Uhr im technischen Sinn, besitzt also die innere Uhr einen Oszillator, der selbständig „tickt“. Die tägliche Synchronisation in der Natur durch die Zeitgeber ist aber wahrscheinlich auch der Grund, warum die innere Uhr unter konstanten Bedingungen meist nur eine Periodenlänge von ca. 24 h aufweist. Da es in der Natur einen Zustand ohne Zeitgeber nicht gibt, fand im Laufe der Evolution keine Optimierung der Freilaufperiode auf genau 24 h statt (Mohr and Schopfer, 1992).

Der Oszillator erzeugt im Signalausgang (Output) messbare, unter konstanten Bedingungen ungefähr täglich ablaufende (circadiane) Rhythmen z.B. in der Genexpression, in Aktivität / Ruhe und Änderungen des Stoffwechsels. Der Mechanismus, der der inneren Uhr zugrunde liegt lässt sich also folglich in drei funktionale Bereiche gliedern: (Signaleingang) Input – Oszillator – Output (siehe Abb. 1.1).

Um den Anforderungen in der Natur gerecht zu werden, muss die innere Uhr noch über eine weitere Fähigkeit verfügen, die Temperaturkompensation. Die Temperatur unterliegt in der Natur ja nicht nur einer circadianen

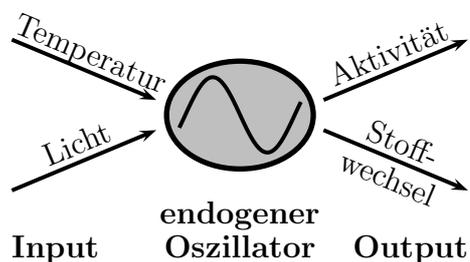


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der drei funktionalen Teile des circadianen Systems. Der temperaturkompensierte endogene Oszillator wird laufend über exogene Zeitgeber wie Licht und Temperatur mit der Umwelt synchronisiert und erzeugt messbare Rhythmen z.B. im Verhalten oder in biochemischen Prozessen.

Schwankung zwischen Tag und Nacht sondern auch einer saisonalen Schwankung, bestimmt durch generell kältere Temperaturen im Winter und wärmere Temperaturen im Sommer. Zudem gibt es im Sommer kalte und im Winter vergleichsweise warme Tage.

Biochemische Prozesse, auf denen auch die innere Uhr beruht, sind in ihrer Reaktionsgeschwindigkeit stark temperaturabhängig. Eine Erhöhung der Temperatur führt üblicherweise zu einer zwei- bis dreifachen Reaktionsgeschwindigkeit. Würde diese Gesetzmäßigkeit auch für die innere Uhr als Ganzes gelten, so würde sich die Geschwindigkeit mit steigender Temperatur erhöhen und sich die Periodenlänge damit verkürzen, womit die innere Uhr unbrauchbar wäre. Die innere Uhr ist jedoch in der Lage über einen weiten Temperaturbereich die Periodenlänge relativ konstant zu halten (Pittendrigh, 1954, siehe Kap. 1.7).

Die innere Uhr verfügt also über drei grundlegende Eigenschaften. Sie ist (i) über äußere Reize, „Zeitgeber“, mit der Umwelt synchronisierbar, (ii) sie verfügt über einen endogenen Oszillator, der unter konstanten Bedingungen mit einer Periodenlänge von ca. 24 h weiterläuft, und (iii) sie ist temperaturkompensiert, also in der Lage die Periodenlänge über einen weiten Temperaturbereich konstant zu halten (Pittendrigh and Bruce, 1957).

1.3 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus für die circadiane Rhythmik

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist aus zahlreichen Gründen, wie z.B. einfache Zucht, kurze Generationsdauer, leichte genetische Manipulierbarkeit, einer der wichtigsten Modellorganismen in der Biologie. Auch in der Erforschung der circadianen Rhythmik spielt *Drosophila* daher eine entscheidende Rolle.

Bisher sind in der Fliege vier verschiedene Rhythmiken bekannt. Am besten untersucht ist die Rhythmik der Lokomotoraktivität (siehe Kap. 2.4 und 3.2.6). Daneben gibt es die Schlupfrhythmik, wobei mit *Schlüpfen* in diesem Fall das Schlüpfen des adulten Tieres aus der Puppe gemeint ist. Die Tiere sind nach dem Schlüpfen bis zur vollständigen Aushärtung des Chitinpanzers sehr anfällig gegenüber Austrocknung. Das Schlüpfen findet daher bevorzugt in den frühen Morgenstunden statt, wenn die Temperatur noch niedrig und die Luftfeuchtigkeit relativ hoch ist (Pittendrigh, 1954).

Des Weiteren ist eine circadiane Rhythmik in der Sensitivität der Antennen gegenüber Duftstoffen bekannt. Diese zeigt sich in der Amplitude der elektrischen Signale der Antenne als Reaktion auf Duftstoffe (Krishnan *et al.*, 1999). Neu veröffentlicht wurde Anfang dieses Jahres eine Rhythmik in der Morphologie der Enden der Motorneuronen, welche die Flugmuskulatur innervieren. Die Synapsen dieser Motorneuronen sind am Tag signifikant größer als in der Nacht, auch unter konstanten Bedingungen. Erstaunlich an dieser Rhythmik ist die Tatsache, dass die betroffenen Zellen selbst über kein zelleigenes circadianes System verfügen (Mehnert *et al.*, 2007).

Der wichtigste, und am besten untersuchte Zeitgeber des circadianen Systems von *Drosophila* ist der Wechsel zwischen Licht und Dunkelheit. Licht ist unter anderem in der Lage über einen Photorezeptor direkt den molekularen Oszillator zu beeinflussen (siehe Kap. 1.4). Es wird daher bei der

Erforschung der Funktionsweise der inneren Uhr meist als Zeitgeber verwendet. Die Fliegen werden dabei in einem künstlichem Licht / Dunkel-Zyklus (LD, 12 h Licht, 12 h Dunkelheit) gehalten. Die Zeitangabe in diesem System erfolgt über die *Zeitgebetime* (ZT). Zum Zeitpunkt ZT0 geht das Licht an, bei ZT12 beginnt die Dunkelphase. Konstante Dunkelheit wird mit DD angegeben, Dauerlicht mit LL. Neben Licht können auch kleine Temperaturschwankungen von nur 3 °C als Zeitgeber vom Organismus erkannt und zur Synchronisation des Oszillators verwendet werden (Wheeler *et al.*, 1993).

1.4 Der molekulare Oszillator von *Drosophila melanogaster*

Die Untersuchung der molekularen und genetischen Mechanismen der inneren Uhr begann vor über 30 Jahren mit der Isolierung von drei Fliegenlinien, bei denen sowohl die Rhythmik des Lokomotorverhaltens, als auch des Schlüpfens gestört ist (Konopka and Benzer, 1971). Es stellte sich heraus, dass es sich um drei unterschiedliche Mutationen im selben Gen, *period* (*per*) handelt. Die Linie *per⁰¹* zeigt kein rhythmisches Verhalten mehr, bei den Anderen kommt es zu einer Periodenverlängerung (*per^L*) und zu einer Periodenverkürzung (*per^S*). Bei *per^L* ist außerdem die Temperaturkompensation (siehe Kap. 1.7) gestört, da sich die Periodenlänge im Lokomotorverhalten bei steigender Temperatur verlängert (18 °C: 27,1 h, 25 °C: 29,6 h, 29 °C: 31,4 h, Huang *et al.*, 1995). Die Sequenzanalyse der drei *per*-Allele zeigte, dass es sich um drei Punktmutationen handelt, wobei die Mutation in *per⁰¹* ein verfrühtes Stoppcodon erzeugt und damit zu einem verkürztem Polypeptid führt (Baylies *et al.*, 1987). Mittlerweile sind mehr als ein Dutzend Gene bekannt, für die eine Beteiligung am circadianen System nachgewiesen werden konnte und ihre Anzahl steigt stetig.

Mechanistisches Grundprinzip der inneren Uhr, nicht nur von *Drosophila melanogaster*, ist die genetische negative Rückkopplungsschleife basierend auf folgendem Prinzip: Ein Gen wird abgelesen (transkribiert) und das dann in der Translation gebildete Protein hemmt die Transkription des eigenen Gens. In der inneren Uhr der Fliege sind bisher zwei solcher Schleifen, die ineinander greifen, bekannt und gut untersucht. Mehrere Arbeitsgruppen haben jedoch kürzlich ein neues Gen (*clockwork orange*) isoliert, das eine dritte negative Rückkopplungsschleife darstellen könnte (Lim *et al.*, 2007, Matsumoto *et al.*, 2007 und Kadener *et al.*, 2007).

Die erste Schleife besteht im wesentlichen aus vier Faktoren, den beiden basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren *Clock* (*Clk*, Allada *et al.*, 1998) und *cycle* (*cyc*, Rutila *et al.*, 1998) und dem Repressor *per* und dessen Bindungspartner *timeless* (*tim*, Sehgal *et al.*, 1994). Die Proteine CLK und CYC dimerisieren mittels ihrer PAS-Domänen (PER-ARNT-SIM, Crews and Fan, 1999), binden an die E-Boxen der Promotoren von *per*, *tim* und anderer *ccgs* (clock controlled gene) und aktivieren so deren Transkription (Darlington *et al.*, 1998). Bei ZT15 erreichen die mRNAs beider Gene ihr Expressionsmaximum und 4-6 h Stunden später die Proteine. Nach der Translation halten sich beide Proteine zuerst im Cytoplasma auf, wo sie auch dimerisieren. Der Heterodimer trennt sich jedoch wieder, worauf PER und TIM getrennt in den Zellkern gehen, wo sie erneut dimerisieren (Meyer and Young, 2006). Im Zellkern bindet der Komplex, wahrscheinlich über PER, an den CLK:CYC-Komplex an, der sich daraufhin von der DNA löst, worauf die Transkription von *per*, *tim* und anderer *ccgs* eingestellt wird (Chang and Reppert, 2003). In S2-Zellen wurde jedoch auch gezeigt, dass PER in Abwesenheit von TIM in der Lage ist eine CLK:CYC aktivierte Transkription zu reprimieren (Rothenfluh *et al.*, 2000, Weber and Kay, 2003, Nawathean and Rosbash, 2004). Dies weist darauf hin, dass die Repressoraktivität von PER:TIM hauptsächlich auf PER zurückzuführen ist.

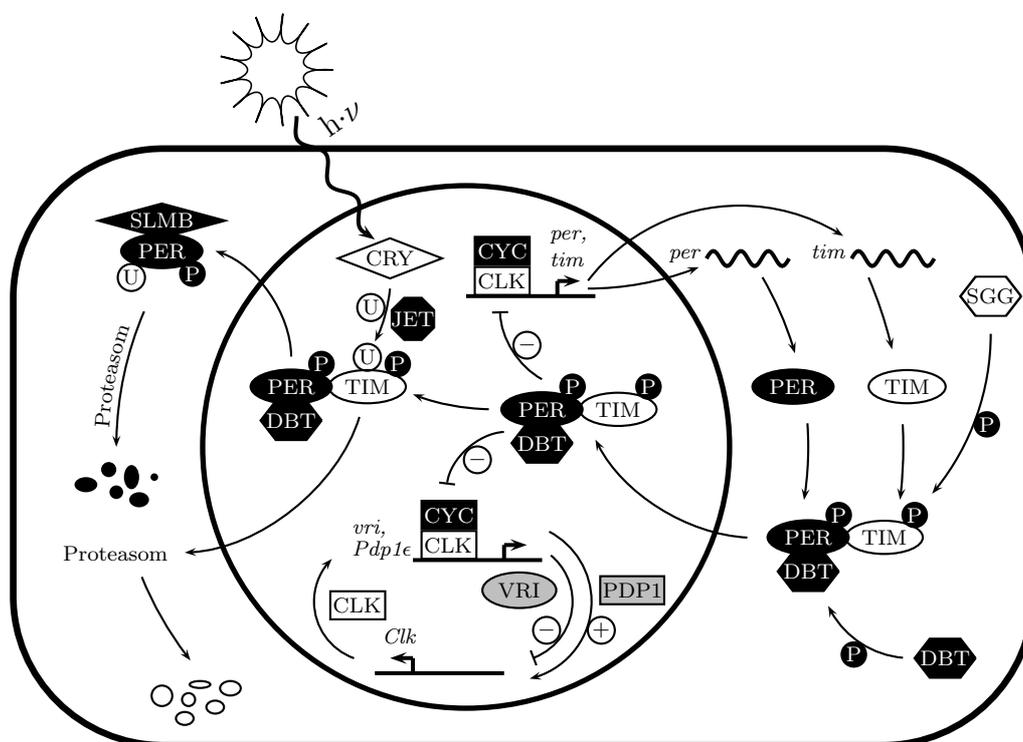


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des molekularen Oszillators von *Drosophila melanogaster*. Abkürzungen siehe Text. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nicht alle Faktoren, die am molekularen Oszillator beteiligt sind, dargestellt.

In einer zweiten Schleife wird die Transkription von *Clk* durch den Aktivator Par Domain Protein 1 ϵ (PDP1) und den Repressor VRILLE (VRI) reguliert. Sowohl *Pdp1*, als auch *vri* sind *ccgs*, die durch den CLK:CYC-Komplex aktiviert werden. Sowohl die *vri*-mRNA, als auch das VRI-Protein erreichen jedoch das Maximum 3-6 h vor der *Pdp1*-mRNA und dem PDP1-Protein, wodurch VRI in der Lage ist die Expression von *Clk* zu hemmen. Erst dann kann durch die verzögerte Akkumulation von PDP1 die *Clk*-Expression wieder gestartet werden (Cyran *et al.*, 2003). Die Expression des Partners von CLK, CYC, findet jedoch kontinuierlich statt. Das *cyc*-mRNA-Level unterliegt keiner circadianen Schwankung (Rutila *et al.*, 1998).

Zudem gibt es neben PER und TIM noch einen weiteren Repressor, der durch

das Gen *clockwork orange* (*cwo*) kodiert wird (Lim *et al.*, 2007, Matsumoto *et al.*, 2007 und Kadener *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu PER:TIM, deren Repression über die Bindung an CLK:CYC vonstattengeht, bindet CWO direkt an die E-boxen in den Promotorregionen. CWO kann dadurch sowohl die eigene, als auch die Transcription anderer *ccgs* direkt beenden und bildet somit eine weitere negative Rückkopplung. Es wird angenommen, dass *cwo*-abhängige Rückkopplung die Amplitude der Schwingung der molekularen Uhr reguliert (Lim *et al.*, 2007).

PER unterliegt während der Zeit einer steigenden Phosphorylierung, durch zwei Kinasen, der Casein Kinase 2 (CK2, Lin *et al.*, 2005) und DOUBLE-TIME (DBT, Kloss *et al.*, 1998), die im Cytoplasma beginnt und sich im Zellkern fortsetzt. Durch die steigende Phosphorylierung wird PER destabilisiert und schließlich durch die Ubiquitin Ligase SLIMB (SLMB, Grima *et al.*, 2002) zum Abbau durch das Proteasom markiert. Auf PER wirkt jedoch auch eine Phosphatase durch direkte Dephosphorylierung stabilisierend ein. Es handelt sich dabei um die Protein Phosphatase 2A (PP2A, Sathyanarayanan *et al.*, 2004), die aus den Untereinheiten TWINS (TWS) und WIDERBORST (WDB) besteht. Ferner scheinen die beiden Proteine DBT und PP2A auch CLK zu phosphorylieren bzw. dephosphorylieren. DBT gelangt in einem Komplex mit PER in den Zellkern, und bei der Bindung des DBT:PER:TIM-Komplexes an CLK:CYC, wird neben PER auch CLK phosphoryliert, was zum Abbau von PER und CLK führt (Kim and Ederly, 2006, Yu *et al.*, 2006). TIM wird von der Kinase SHAGGY (SGG), dem *Drosophila*-Ortholog der des Säugerproteins Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3) phosphoryliert, was vor allem seinen Kerneintritt bewirkt. (Martinek *et al.*, 2001).

Das System, wie es bisher dargestellt ist, ist zwar schon in der Lage, selbständig zu schwingen, es fehlen jedoch noch die Schnittstellen mit den Zeitgebern, die eine Synchronisation mit der Umwelt ermöglichen. Über die Synchroni-

sation des molekularen Oszillators mit dem Zeitgeber Licht ist mittlerweile einiges bekannt. Der Blaulichtrezeptor CRYPTOCHROME (CRY, Stanewsky *et al.*, 1998) wird durch Licht aktiviert und bindet dann TIM (Ceriani *et al.*, 1999, Busza *et al.*, 2004), was zu einem Abbau über das Proteasom führt (Naidoo *et al.*, 1999, Grima *et al.*, 2002). Vermittelt wird dieser Prozess durch das Protein JETLAG (JET, Koh *et al.*, 2006, Peschel *et al.*, 2006), das unter anderem für die Ubiquitinierung von TIM wichtig ist (Koh *et al.*, 2006). Dieser durch Licht forcierte Abbau von TIM, zusammen mit der Hyperphosphorylierung, bewirkt dann auch den Abbau von PER.

Neben CRY, das direkt Einfluss auf den molekularen Oszillator nimmt, gibt es in der Fliege noch weitere Photorezeptoren, die an der Übertragung des Lichts in die innere Uhr beteiligt sind: Die Komplexaugen, die Ocellen und das Hofbauer-Buchner-Äuglein (H-B-eyelet, Hofbauer and Buchner, 1989). Erst in Abwesenheit dieser Photorezeptoren und CRY sind Fliegen nicht mehr in der Lage mit Licht / Dunkel-Zyklen zu synchronisieren (Helfrich-Förster *et al.*, 2001).

Über den Mechanismus der circadianen Thermorezeption ist nur wenig bekannt. Einzig die Beteiligung des neu isolierten Gens *nocte* (*no circadian temperature entrainment*) und der Phospholipase C (PLC), in der Fliege kodiert durch das Gen *norpA*, an diesem Vorgang ist gesichert (Glaser and Stanewsky, 2005).

Neben diesem Prozess und der Beteiligung an der Phototransduktion, wo NORPA über G-Proteine durch photoaktiviertes Rhodopsin aktiviert wird (Hardie and Raghu, 2001), spielt *norpA* auch eine Rolle bei der Anpassung an saisonale Änderungen der Temperatur und Photoperiode (Collins *et al.*, 2004 und Majercak *et al.*, 2004). Diese Anpassung an die saisonalen Schwankungen stellt ein temperaturabhängiges Spliceereignis der *per*-mRNA dar. Es handelt sich dabei um ein nicht translatiertes Intron im 3' UTR, das entweder vorhanden ist (Typ A) oder durch Splicen entfernt wird (Typ B'). Bei 18 °C

wird verstärkt Typ B' gebildet, bei 29 °C Typ A. Die Bildung von Typ B' bei kalten Temperaturen führt zu einer verfrühten PER-Akkumulation und einer Bevorzugung der Lichtphase im LD-Verhalten vor allem bei kurzen Lichtphasen (Majercak *et al.*, 1999).

1.5 Die Uhrneuronen sind für das rhythmische Verhalten verantwortlich

Viele Gewebe der Fruchtfliege verfügen über autonome innere Uhren, die anhand der rhythmischen Expression von *per* und *tim* nachgewiesen werden können. Mit Hilfe von Reportergenen wie *luciferase* oder *GFP*, die die Expression von *per* widerspiegeln, wurden verschiedene isolierte Körperteile von *Drosophila* auf rhythmische Biolumineszenz untersucht. Dabei wurde im Kopf, den Antennen, dem Thorax, dem Abdomen, im Flügel und in Beinen rhythmische Biolumineszenz nachgewiesen (Plautz *et al.*, 1997). Auch in den Malpighischen Gefäßen konnte durch Antikörperfärbungen eine rhythmische Expression von PER und TIM nachgewiesen werden (Gibultowicz and Hege, 1997). Die größte Gruppe an Zellen mit *per*- und *tim*-Expression im Kopf sind die Photorezeptorzellen im Komplexauge mit über 12.000 Zellen (Helfrich-Förster, 2002). Im Vergleich dazu ist die Zahl der Zellen, die das rhythmische Lokomotorverhalten bestimmen mit ca. 150 Zellen eher gering. Bei dieser Gruppe *per*- und *tim*-exprimierender Zellen handelt es sich um die sog. Uhrneuronen, die im Zentralgehirn der Fliege lokalisiert sind.

Diese Neuronen werden aufgrund ihrer Lage und Größe traditionell in sechs Gruppen eingeteilt: Drei Gruppen lateraler Neurone, (LN) und drei Gruppen dorsaler Neurone (DN) (Ewer *et al.*, 1992, Frisch *et al.*, 1994, Kaneko and Hall, 2000, Helfrich-Förster, 2003). Die lateralen Neuronen setzen sich aus den dorsalen (LN_d), den kleinen ventralen (s-LN_v) und den großen ventralen

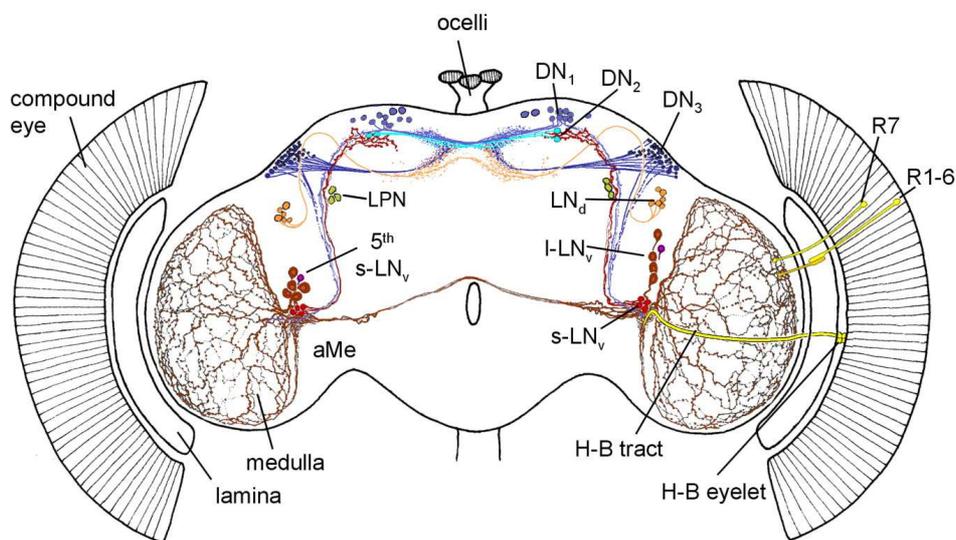


Abbildung 1.3: Lokalisation der Uhrneuronen im Fliegenhirn (Abb. aus Helfrich-Förster *et al.*, 2007). Laterale Neuronen: LN_d (orange), $l-LN_v$ und $s-LN_v$ (rot), und 5^{th} $s-LN_v$ (violett); dorsale Neuronen: DN_1 , DN_2 , DN_3 (blau); lateral posteriore Neuronen: LPN (grün); aMe: akzessorische Medulla; H-B: Hofbauer-Buchner, R: Photorezeptorzellen.

($l-LN_v$) lateralen Neuronen zusammen. Bei diesen Zellen handelt es sich um die Hauptschrittmacherzellen, denn diese Zellen sind notwendig und ausreichend, rhythmisches Lokomotorverhalten, auch in Abwesenheit von Zeitgebern zu erzeugen (Ewer *et al.*, 1992, Frisch *et al.*, 1994). Sowohl die $s-LN_v$, als auch die $l-LN_v$ exprimieren das Gen *pigment dispersing factor* (*pdf*, Renn *et al.*, 1999) mit dessen Hilfe auch die Projektionen dieser Zellen aufgeklärt werden konnten (Helfrich-Förster, 1995). Einzige Ausnahme bildet die sog. 5^{th} $s-LN_v$, welche keine PDF-Expression zeigt (Kaneko *et al.*, 1997). Das Neuropeptid PDF ist wichtig für die Aufrechterhaltung von rhythmischem Verhalten in konstanten Bedingungen. Eine Nullmutation des *pdf*-Gen führt zu einer Periodenverkürzung im Lokomotorverhalten und die Tiere werden mit der Zeit arhythmisch (Renn *et al.*, 1999).

Die dorsalen Neuronen unterteilen sich in die DN_1 , DN_2 und DN_3 . Ihre Funktion ist weniger gut verstanden. Sie tragen zwar zum rhythmischen Verhalten

unter LD-Bedingungen bei (Veleri *et al.*, 2003, Klarsfeld *et al.*, 2004) sind jedoch dafür nicht zwingend notwendig (Ewer *et al.*, 1992, Frisch *et al.*, 1994). Die Lokomotoraktivität von *Drosophila* unter LD-Bedingungen ist durch zwei Aktivitätspeaks gekennzeichnet, dem Morgenpeak und dem Abendpeak (siehe Kap.: 2.4 und 3.2.6). Der Morgenpeak scheint hauptsächlich von den s-LN_v, gesteuert zu werden, während für den Abendpeak einige LN_d, die 5th s-LN_v und Teile der DN₁ beteiligt sind (Grima *et al.*, 2004, Stoleru *et al.*, 2004, Rieger *et al.*, 2006).

Neu hinzugekommen ist die Gruppe der lateral posterioren Neuronen (LPN, Shafer *et al.*, 2006), die vielleicht eine Rolle bei der Synchronisation mit Temperaturzyklen spielen (Yoshii *et al.*, 2005).

1.6 Der Aufbau und die Funktion von PERIOD

1.6.1 Domänen von PER und deren Funktion

Über einen Zyklus der inneren Uhr hinweg interagiert das Protein PERIOD mit verschiedenen anderen Faktoren der inneren Uhr und wechselt außerdem vom Cytoplasma in den Zellkern. Es verfügt daher über eine Vielzahl verschiedener Domänen, die diese Interaktionen, sowie den Kompartimentswechsel, vermitteln (siehe Abb. 1.4).

Als erster Interaktionspartner von PER wurde in einem Yeast-two-Hybrid-Screen das Protein TIMELESS isoliert (Gekakis *et al.*, 1995). Als notwendiger Bereich für eine Bindung von PER an TIM wurden die Aminosäuren (AA) 233-365 in PER identifiziert. Es scheint jedoch noch einen zweiten Interaktionsbereich zu geben, AA 448-512, der mit einem Cytoplasma Lokalisationssignal (CLD, siehe unten) zusammenfällt (Saez and Young, 1996). Außerdem wird PER durch das Homolog der Casein Kinase Iε DOUBLE-

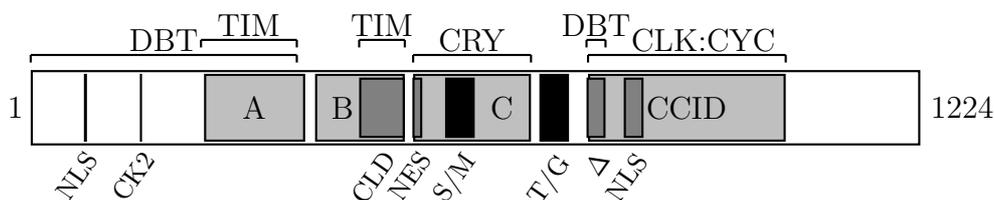


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von PERIOD. Über dem Protein sind die Interaktionspunkte mit DOUBLETIME (DBT), TIMELESS (TIM), CRYPTOCHROM (CRY) und CLOCK:CYCLE (CLK:CYC) dargestellt. NLS: Nuclear Localization Domain, CK2: Phosphorylierungsstelle der Casein Kinase 2 (Ser149, 151 und 153), A: PAS-A, B: PAS-B, CLD: Cytoplasmatic Localization Domain, NES: Nuclear Export Signal, S/M: Short Mutable Region, C: C-Domain, T/G: Threonine/Glycine Repeat Region, Δ : Region wichtig für Phosphorylierung und Kerntransport, CCID: CLOCK:CYCLE Inhibition Domain.

TIME phosphoryliert. DBT kann an die AA 1-365 von PER binden (Kloss *et al.*, 1998) und destabilisiert PER durch Phosphorylierung. Außerdem wird von der Region Δ (AA 761-787) (Nawathean *et al.*, 2007) angenommen, dass sie ebenfalls Interaktionen mit DBT vermittelt. Sie ist für die Phosphorylierung und den Kerntransport wichtig. Eine Phosphorylierung durch Casein Kinase 2 (CK2) findet an den Serinen 149, 151 und 153 statt (Lin *et al.*, 2005). Die Interaktionspunkte mit der Protein Phosphatase 2a (PP2a) sind noch nicht bekannt, liegen aber wahrscheinlich im Bereich der Interaktionspunkte von PER mit DBT und CK2 (Sathyanarayanan *et al.*, 2004).

Seine Funktion als Transkriptionsrepressor erfüllt PER im Zellkern durch seine Bindung an den aus CLOCK und CYCLE bestehenden Transkriptionsfaktorkomplex CLK:CYC. PER bindet mit der CLK:CYC Inhibition Domain (CCID, AA 764-1034) an die Transkriptionsaktivatoren CLK:CYC, wodurch sich diese vermutlich von der DNA lösen und stoppt dadurch die eigene Transkription, sowie die von *tim* und anderer Gene (Chang and Reppert, 2003). Der Wechsel des PER-Proteins aus dem Cytoplasma in den Kern wird neben der Phosphorylierung noch durch weitere Domänen und Signalsequenzen

im PER-Protein gesteuert. Experimentell bestätigt sind bisher zwei, die Cytoplasmatic Localization Domain (CLD, Saez and Young, 1996) und ein Nuclear Localization Signal in der CCID (Chang and Reppert, 2003). Das CLD umfasst auch eine Interaktionsdomäne von PER mit dem Protein TIM (siehe oben). Durch eine Bindung von TIM an PER wird diese Domäne wahrscheinlich verdeckt, und PER kann vermittelt durch das NLS in den Zellkern wandern. Aufgrund von Sequenzhomologien vermutet man in PER noch ein weiteres Kernlokalisierungssignal (NLS: AA 73-77, Chang and Reppert, 2003), sowie ein Nuclear Export Signal (NES), das einen Kernexport vermitteln könnte. Ein solches NES findet sich auch in den homologen PER-Proteinen der Maus (mPER1, mPER2 und mPER3) im Anschluss an ein CLD (Vielhaber *et al.*, 2005). Seine Fuktionalität ist jedoch experimentell noch nicht bewiesen.

Eine weitere wichtige Domäne des PER-Proteins ist die Threonine/Glycine Repeat Region (T/G). Dieser Bereich ist in seiner Länge variabel und beginnt mit der AA 697. Die T/G-Region ist ein Bereich der eine Rolle bei der Temperaturkompensation, und damit bei der Anpassung an verschiedene Klimazonen, spielt (Sawyer *et al.*, 1997, siehe Kap. 1.7).

1.6.2 Hinweise für die Homodimerisierung von PER

1.6.2.1 Ältere Studien, die auf eine Homodimerisierung hinweisen

Bereits vor einiger Zeit wurde untersucht, ob das PERIOD-Protein einen physiologisch wichtigen Homodimer bildet. In zwei Studien (Huang *et al.*, 1993 und 1995) wurde die Dimerisierung von PER-Fragmenten, die hauptsächlich aus den PAS-Domänen PAS-A und PAS-B bestehen, untersucht.

In der ersten Studie (Huang *et al.*, 1993) wurde durch Coimmunopräzipitation (CoIP) gezeigt, dass *in vitro* transkribierte und translatierte PER-Fragmente dimerisieren können, wenn sie jeweils eine vollständige PAS-Do-

mäne (A und B) besitzen. In dieser Studie wurde außerdem die *per^L*-Mutation (Konopka and Benzer, 1971, Baylies *et al.*, 1987) untersucht. Es wurde gezeigt, dass ein Austausch der Aminosäure Valin243 in ein Aspartat (D, *per^L*) oder in ein Arginin (R) eine Dimerisierung der Fragmente fast gänzlich verhindert. Der Austausch in die ebenfalls neutrale Aminosäure Leucin führte nur zu einer verminderten Dimerisierung. Den ersten Hinweis auf eine Homodimerisierung von vollständigem PER in der Fliege erbrachte eine CoIP von einem rekombinanten PER- β -Galactosidase durch PER-HA in Proteinextrakten von Fliegenköpfen, die beide rekombinanten Proteine gleichzeitig exprimierten. Im Präzipitat der CoIP konnte β -Gal-Aktivität nachgewiesen werden. Die Dimerisierung ist in der Fliege wohl außerdem auf einen biologischen Prozess zurückzuführen, da sich im Präzipitat keine β -Gal-Aktivität detektieren ließ, wenn für die CoIP zwei Proteinextrakte gemischt wurden, wobei jeder Extrakt nur eines der beiden rekombinanten Proteine enthielt. Im Gegensatz zu den PER-Fragmenten scheint also eine Homodimerisierung des vollständigen PER-Proteins in der Fliege keine zufällige Zusammenlagerung der Moleküle zu sein, sondern ein Prozess an dem wahrscheinlich noch andere Faktoren beteiligt sind.

In der zweiten Studie (Huang *et al.*, 1995) wurde die Dimerisierung der wildtypischen Fragmente im Yeast-two-Hybrid-System bestätigt. Es zeigte sich außerdem, dass die Dimerisierung der Mutanten V243D und V243R stark temperaturabhängig ist. PER-V243D und PER-V243R können in der Hefe nur bei 25 °C, nicht aber bei 30 °C oder 37 °C mit sich selbst dimerisieren. Eine Dimerisierung der Mutanten mit PER-Fragmenten ohne Austausch ist in der Hefe bei 25 °C und 30 °C möglich. Durch CoIP-Experimente, wieder mit den oben beschriebenen Fragmenten, bei verschiedenen Temperaturen (16 °C, 25 °C und 30 °C) wurde diese Temperatursensitivität für V243D bestätigt. V243D dimerisiert nur bei 16 °C, V243R dagegen bei keiner der drei Temperaturen.

Diese Erkenntnisse führten zu der Vermutung, dass die Periodenverlängerung, sowie die gestörte Temperaturkompensation von *per^L*-Tieren auf ein geändertes Homodimerisierungsverhalten von PER zurückzuführen ist. Der PER-Homodimer wurde damit zu einem möglichen Ausgangspunkt für die Untersuchung der Temperaturkompensation der inneren Uhr.

Dass PER in Fliegenköpfen tatsächlich in einem Komplex von mehr als einem Protein vorliegt, wurde durch Ultrazentrifugation und Gelfiltration nachgewiesen (Zeng *et al.*, 1996). CoIP-Experimente mit Tieren die sowohl MYC-, als auch HA-getagtes PER exprimierten, zeigten, dass PER zu einem kleinen Prozentsatz als Homodimer vorliegt. Die Homodimerisierung wurde zu den Zeitpunkten ZT16 ZT20 und ZT2 durchgeführt und bei allen Zeitpunkten konnte ein Homodimer nachgewiesen werden. Die Menge des Homodimers ist jedoch sehr gering und unterliegt in seiner Menge keiner zeitlichen Schwankung. Als Hauptinteraktionspartner von PER wurde daraufhin das Protein TIMELESS identifiziert (Zeng *et al.*, 1996). Neben der in *per^L* beeinträchtigten PER-Homodimerisierung ist auch die Interaktion mit TIM schwächer und stark temperaturabhängig (Gekakis *et al.*, 1995). Der Phänotyp von *per^L* ist daher wahrscheinlich nicht nur auf die veränderte Homodimerisierung, sondern auch auf die temperaturabhängige Heterodimerisierung mit TIM zurückzuführen. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde dem PER-Homodimer keine physiologische Bedeutung mehr zugesprochen.

1.6.2.2 Die Aufklärung der 3D-Struktur der PAS-Domäne von PER

Erst die Aufklärung der 3D-Struktur eines PER-Fragments (Aminosäuren 232-599), welches sowohl die PAS-Domänen, als auch einen Teil der C-Domäne enthielt, brachte den PER:PER-Homodimer wieder ins Spiel (Yildiz *et al.*, 2005). Das Fragment lag im Kristall als Dimer vor (siehe Abb. 1.5). Als Basis für die Dimerisierung wurden zwei Strukturen ermittelt. Jedes Frag-

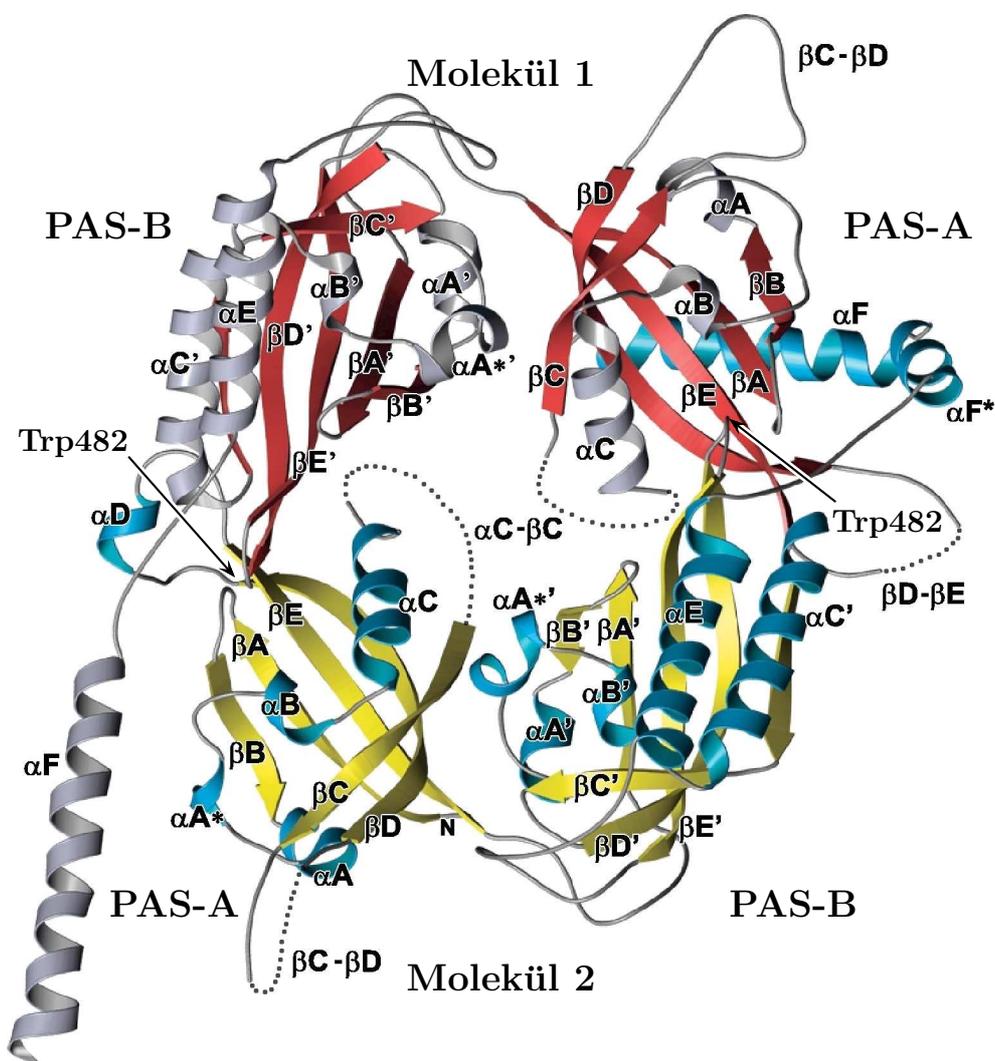


Abbildung 1.5: 3D-Struktur des PERIOD-Fragments aus Yildiz *et al.*, (2005). Dargestellt ist die Dimerisierung von zwei Molekülen, Molekül 1 (rot, grau) und Molekül 2 (gelb, blau). Die Tryptophane Trp482 (Pfeile) sind auf der Schleife $\beta D'-\beta E'$ lokalisiert und ragen in eine hydrophobe Tasche, die aus βA , αB und αC gebildet wird. Die αF von Molekül 2 ragt hinter die β -Faltblätter der PAS-A von Molekül 1 und bildet dadurch das αF -Interface. Die αF von Molekül 1 ist keiner Interaktion beteiligt.

ment bildet durch die Aminosäuren Ile244, Met246, Gly249 (βA), Ser273, Ile275 (αB) und Phe286, Ile290 (αC) eine hydrophobe Tasche, in welche die Seitenkette des Trp482 des anderen Fragments hineinragt. Außerdem

biegt sich die α F-Helix von einem Molekül (in Abb. 1.5 Molekül 2) hinter die β -Faltblätter der PAS-A-Domäne des anderen Moleküls. Das daraus entstehende α F-Interface wird durch eine Salzbrücke zwischen Arg345 (PAS-A, β D) und Glu566 (α F), sowie durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Val243 mit Met560 und Met564 stabilisiert (siehe Abb. 1.5 und schematische Darstellung in Abb. 1.6). Die α F-Helix des anderen Moleküls (in Abb. 1.5 Molekül 1) scheint keine solche Interaktion auszubilden. Die Aufklärung

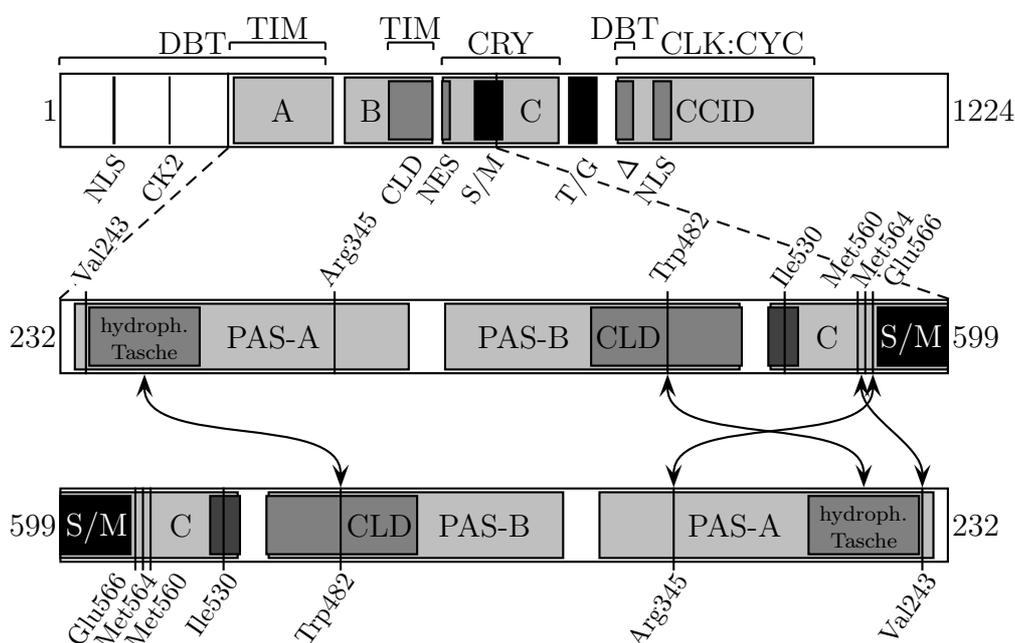


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung von PERIOD, dem kristallisierten Fragment und der Interaktionspunkte im PER:PER-Homodimer. Über dem vollständigen Protein (1-1224) sind die Interaktionspunkte mit DOUBLETIME (DBT), TIMELESS (TIM), CRYPTOCHROM (CRY) und CLOCK:CYCLE (CLK:CYC) dargestellt. Darunter ist das kristallisierte Fragment (232-599) mit den Interaktionspunkten des Homodimers dargestellt. NLS: Nuclear Localization Domain, CK2: Phosphorylierungsstelle der Casein Kinase 2 (Ser149, 151 und 153), A: PAS-A, B: PAS-B, CLD: Cytoplasmatic Localization Domain, NES: Nuclear Export Signal, S/M: Short Mutable Region, C: C-Domain, T/G: Threonine/Glycine Repeat Region, CCID: CLOCK:CYCLE Inhibition Domain, hydroph. Tasche: hydrophobe Tasche.

der 3D-Struktur liefert damit auch eine Bestätigung und Erklärung für die vorangegangenen Studien von Huang und Kollegen (1993, 1995). Auch im 3D-Model ist Val243 durch die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen wichtig für die Stabilisierung des Dimers. Die Einführung einer Ladung an dieser Position durch einen Austausch in ein negativ geladenes Aspartat oder ein positiv geladenes Arginin unterbindet diese hydrophoben Wechselwirkungen und führt damit zu einer Destabilisierung des Dimers.

1.7 Mechanismen der Temperaturkompensation

Die Temperatur auf der Erde unterliegt, wie oben beschrieben, einer starken Schwankung. Bei biochemischen Reaktionen hat eine Temperaturerhöhung um 10 °C eine doppelte bis dreifache Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge. Die innere Uhr benötigt daher Mechanismen, die Periodenlänge trotz wechselnder Temperaturen relativ konstant zu halten.

Eine wichtige Rolle dabei spielt das Gen *per*. Das PER-Protein besitzt eine Domäne, die sich aus sich abwechselnden Threoninen und Glycinen zusammensetzt, die Threonine/Glycine Repeat Region (T/G). Dieser Bereich spielt eine Rolle bei der Temperaturkompensation. In der Natur kommen vorwiegend zwei Formen dieser T/G-Region vor. Fliegen, die ein Allel mit 17 Wiederholungen, (T/G)₁₇ tragen, zeigen bei hohen Temperaturen eine Periode näher bei 24 h als Tiere mit 20 Wiederholungen (T/G)₂₀. Tiere mit (T/G)₂₀ haben jedoch eine bessere Temperaturkompensation über einen grösseren Temperaturbereich. (T/G)₁₇ ist daher in der Natur vorwiegend in Nordafrika anzutreffen, (T/G)₂₀ in Nordeuropa, wo eine stärkere Temperaturschwankung herrscht.

Wie in Kap. 1.6.2 erwähnt, zeigten die Untersuchungen der Mutation *per^L*, dass eine Reihe weiterer biochemischer Prozesse am Mechanismus der Tem-

peraturkompensation beteiligt sein kann. Es wurde gezeigt, dass PER-Fragmente, die PAS-Domänen besitzen zum Einen einen Homodimer bilden können, zum Anderen aber auch in der Lage sind, mit PER-Fragmenten die die C-Domäne enthalten, zu dimerisieren. Da die per^L -Mutation die Homodimerisierung temperaturabhängig schwächt und die Interaktion mit der C-Domäne temperaturabhängig stärkt, wurde für die Temperaturkompensation ein Modell basierend auf diesen beiden Dimerisierungen vorgeschlagen. Es wurde vermutet, dass es eine intramolekulare Interaktion zwischen der PAS- und der C-Domäne gibt, die in Konkurrenz mit der Homodimerisierung steht. Eine temperaturbedingte Verschiebung des Gleichgewichts zwischen diesen Interaktionen wäre dann in der Lage andere, von der Temperatur beeinflusste Effekte, wie vielleicht die Kernlokalisierung, auszugleichen (Huang *et al.*, 1995).

Neben PER:PER-Homodimerisierung scheint in per^L auch die PER:TIM-Heterodimerisierung temperaturabhängig gestört zu sein. Die Stabilität des PER:TIM-Komplexes wurde daher ebenfalls mit der Temperaturkompensation in Verbindung gebracht (Gekakis *et al.*, 1995). Zudem ist die Mutation tim^{SL} (Supressor of per^L) in der Lage ist den per^L -Phänotyp zu unterdrücken (siehe Diskussion Kap. 4.2.1.6, Rutila *et al.*, 1996). Dies favorisiert die PER:TIM-Interaktion als mögliche Komponente der Temperaturkompensation. Trotz dieser verschiedenen Ansätze ist der Mechanismus der Temperaturkompensation jedoch weitgehend unverstanden.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

1.8.1 Untersuchung der transgenen Fliegenlinie 21-32

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Landskron, 2002) wurde eine *P*-Element-Mutagenese mit einem *luciferase*-Konstrukt durchgeführt. Dabei wurde das Konstrukt *pTrap-luc* vom *X*-Chromosom auf die Autosomen mobili-

siert. Ziel war es, durch Messung der LUCIFERASE-Aktivität der erzeugten Fliegenlinien, Linien zu isolieren, bei denen eine Insertion in ein circadian reguliertes Gen stattgefunden hatte.

Eine der isolierten Linien ist 21-32. Diese Linie zeigt in LD eine rhythmische LUCIFERASE-Aktivität, mit einem nächtlichen Maximum. Die Biolumineszenz dieser Linie steht unter der Kontrolle der inneren Uhr, da nach Einkreuzen eines *X*-Chromosoms mit *per*⁰¹ keine rhythmische Biolumineszenz mehr gemessen werden kann. Das Konstrukt ist 66 bp vor dem Transkriptionsstart des Gens *CG6328* (93F2-93F6) auf Chromosom 3 inseriert. Homozygot verursacht das Insertionschromosom Sterilität. Messungen der Lokomotoraktivität ergaben außerdem ein reduziertes rhythmisches Verhalten. In DD sind nur 50 % der Tiere mit einer Kopie des Insertionschromosoms rhythmisch, von den homozygoten Tieren nur 17 %.

Durch geeignete Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob *CG6328* ein *ccg* ist, also ein Gen, das unter der Kontrolle der inneren Uhr steht, oder vielleicht sogar selbst ein Bestandteil des molekularen Oszillators.

1.8.2 Untersuchung der Funktion des PER:PER-Homodimers

Die Aufklärung der 3D-Struktur der PAS-Domänen des Proteins PERIOD zeigte, dass PER im Kristall als Homodimer vorliegt, und bestätigte damit ältere Studien, die auf eine Homodimerisierung hinweisen. Die 3D-Struktur offenbarte zudem mögliche Interaktionspunkte, die auch in der Fliege diese Homodimerisierung vermitteln könnten.

Durch die Herstellung transgener Fliegen, die getagte rekombinante PER-Proteine exprimieren, sollte die Möglichkeit geschaffen werden, eine Homodimerisierung von PER in der Fliege zu untersuchen. Außerdem sollte durch die Einführung verschiedener Mutationen in diese Proteine eine Dimerisie-

rung gezielt verringert oder ganz unterbunden werden. Auf diese Weise soll geklärt werden, ob, und wenn ja, welche physiologische Bedeutung der Homodimer in Fliegen hat. Besonders die mögliche Beteiligung am Mechanismus der Temperaturkompensation soll geklärt werden, da die molekularen Hintergründe dieses wichtigen Aspekts der inneren Uhr immer noch weitgehend unverstanden sind.

1.8.3 Untersuchung eines Nuclear Export Signals in PER

Untersuchungen der PERIOD-Proteine der Maus (mPER1, mPER2 und mPER3) zeigten, dass diese Proteine im Anschluss an die Cytoplasmatic Localization Domain (CLD) ein Nuclear Export Signal (NES) besitzen. Sequenzvergleiche ergaben, dass das *Drosophila* PER wahrscheinlich ebenfalls über ein derartiges Signal verfügt (Vielhaber *et al.*, 2001). Durch die Erzeugung transgener Tiere, die ein rekombinantes PER mit einer Mutation im putativen NES exprimieren, soll untersucht werden, ob es sich dabei tatsächlich um ein funktionelles NES handelt.

Kapitel 2

Materialien und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 PCR, Sequenzierung und Sequenzanalyse

PCR			Sequenzreaktion		
Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95 °C	60 s	1	96 °C	30 s
30	95 °C	45 s	28	96 °C	10 s
	55 °C	30 s		55 °C	10 s
	72 °C	60 s		68 °C	4 min
1	72 °C	5 min			

Tabelle 2.1: Reaktionszyklen der PCR und der Sequenzreaktion.

Für PCR wurde ausschließlich *Thermus aquaticus* Polymerase (Taq^+) unter folgenden Reaktionsbedingungen verwendet: 20 mM Tris HCl pH 8,75, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $MgSO_4$, 0,1 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA), Primer je 0,4 μM , Desoxiribonucleosidtriphosphate je 0,4 mM, DNA-Matrize, 1,5 μl Taq^+ in 50 μl Gesamtvolumen. Die DNA-Matrize bil-

Primer	Sequenz	Verwendung
tim1957-S tim568-AS	GTGGTTGCGTAATGCCCTGG GCACCGTCAGATTGACGA	<i>ls-tim</i> / <i>s-tim</i>
JO-S JO-AS	GGGTATCGTTACTTGGCTGC GGATGATGTCTCGACTTCC	$P[w^+]^{21-32}$ - Revertanten
per3823-S per4295-AS	CACCTTCTGCGTGATGCTGC CTTCATTACCGTCTCGTAGG	R345E
per4187-S per4666-AS	CAGTGCCTGGGCTATCTGC CTCCTGCTTGACCGTGTCGG	W482E
per4522-S per5354-AS	GCAGTGCAACGTCTTCGAGG TCTCCATCTCGTCGTTGTGC	I530A, M560D
per6129-S per6506-S per7291-AS HA-test c-myc-test	TGATGTACCAGCCGATGCC CTGCAGCAGCAGCAATCCCG GTGGTTTCGATGTTTGAACCC CGTAATCGGGCACATCGTAGG CCTCGCTGATCAGCTTCTGCT	HA- bzw. <i>c-myc</i> -TAG

Tabelle 2.2: Oligonukleotide, die für PCR und Sequenzreaktionen verwendet wurden. Das *tim*-Primerpaar stammt aus der Arbeit von Shobi Veleri, die *per*-Primer aus der Arbeit von Franz Glaser. Mit dem Primerpaar JO-S (270 bp vor $P[w^+]^{21-32}$) und JO-AS (250 bp nach $P[w^+]^{21-32}$) wurde der ehemalige Insertionsort des *P*-Elements nach der Remobilisierung untersucht. Die Orientierung der TAGs in den *per*-Konstrukten wurde mit den Primerpaaren HA- bzw. MYC-test / per6129-S bzw. per7291-AS überprüft. Sequenziert wurden die Insertionsorte der TAGs mit dem Primerpaar per6506-S / per7291-AS. Mit den übrigen *per*-Primern wurden die angegebenen Mutationen sequenziert.

deten dabei entweder 10-50 ng Plasmid-DNA oder 1 μ l genomische Fliegen-DNA, die nach der *Single-fly DNA prep* Methode (Gloor *et al.*, 1993) hergestellt wurde. Die Amplifikation fand in einem *T1 Gradient* oder *T3* Thermocycler (Biometra) statt, Programm siehe Tab. 2.1. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte durch DNA-Gelelektrophorese (Sambrook and Rus-

sel, 2001), und anschließende Gelextraktion (*QIAquick Gel Extraction Kit*, QUIAGEN).

Sequenzreaktionen wurden entweder mit PCR-Produkten oder Plasmiden unter Verwendung des *BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits* (Applied Biosystems, Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1977)) durchgeführt. Aufgetrennt wurden die Produkte von der Firma GENEART, Regensburg, Biopark II.

Die Analyse der Chromatogramme erfolgte mit dem Computerprogramm *BioEdit* (Hall, 1999), die Analyse der Sequenzen mit dem Softwarepaket *Lasergene v5*, DNASTAR. Datenbankvergleiche wurden auf den Internetseiten <http://ncbi.nlm.nih.gov/> und <http://flybase.net/> durchgeführt.

2.1.2 Klonierung allgemein

Die für Klonierungen verwendeten Restriktionsenzyme, sowie die Ligase waren bis auf *SanDI* (Stratagene) und *SgfI* (Promega) von der Firma New England Biolabs (NEB). Die Reaktionsbedingungen wurden entsprechend der Beschreibung des jeweiligen Enzyms eingestellt. Bestand bei der Ligase-reaktion die Möglichkeit der Religation, so wurde der entsprechende Vektor zusätzlich mit *CIAP* (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*, Fermentas) behandelt. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte wie oben beschrieben. Bei Ligationen wurden ca. 50 ng Vektor, sowie ein dreifacher molarer Überschuß an Insert eingesetzt.

Die Transformationen erfolgten in *XL1 Blue* heatshock-kompetente Zellen (Stratagene) unter Verwendung des Protokolls für diese Zellen. DNA-Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab wurden mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QUIAGEN) hergestellt. Für Plasmidpräparationen im grösseren Maßstab wurde das *QIAfilter Plasmid Midi Kit* (QUIAGEN) verwendet.

Bei der Klonierung von PCR-Fragmenten wurden diese, nach der Aufreinigung, zuerst mit dem *pGEM-T Easy Vector System I* (Promega) subkloniert.

2.1.3 Klonierung der *per*-Konstrukte

2.1.3.1 Ausgangsvektoren

Ausgangspunkt für die Klonierung der *period*-Konstrukte waren die Vektoren *-1313-34-hs-per* und *rec4*, die freundlicherweise von Paul Hardin zur Verfügung gestellt wurden. Der Vektor *-1313-34-hs-per* basiert auf einem $pP\{CaSpeR-4\}$ (Thummel und Pirotta, 1991), bei dem die *HindIII*, *PstI*, *SalI*, *XhoI* und *HpaI* Schnittstellen entfernt worden waren. Er enthält die gesamte *per*-cDNA, sowie eine 2,1 kb lange genomische Downstream-Sequenz (*HindIII* / *EcoRI*), und das -1313-34 *per*-Promotorfragment zusammen mit einem 250 bp langen *hsp70*-Promotor (Hao *et al.*, 1997 und 1999). Der Vektor *rec4* basiert auf einem *pBluescript KS⁻* (Stratagene), der das *XhoI* / *EcoRI*-Fragment (*hsp70*-Promotor, *per*-cDNA und genomische Sequenz) des *-1313-34-hs-per* enthält.

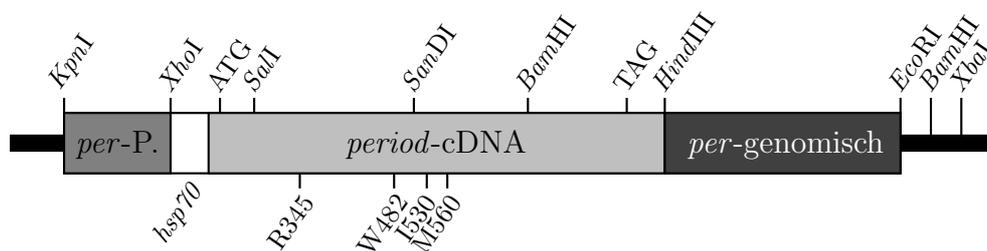


Abbildung 2.1: Restriktionskarte des Ausgangsvektors *-1313-34-hsp-per*, der von Paul Hardin zur Verfügung gestellt wurde. *KpnI* und *XbaI* sind die Enzyme, mit denen der dargestellte Bereich in den $pP\{CaSpeR-4\}$ (7,9 kb) kloniert wurde. Der Bereich zwischen *EcoRI* und *XbaI* stammt aus dem Vektor *pBluescript KS⁻* (durch Klonierung aus *rec4*). Abkürzungen: *per*-P.: *per*-Promotor (-1313-34), *hsp70*: *hsp70*-Promotor. Abstände: *KpnI* / *XhoI*: ~ 1 kb, *XhoI* / *SalI*: $\sim 0,5$ kb, *SalI* / *SanDI*: $\sim 1,2$ kb, *SanDI* / *BamHI*: $\sim 1,1$ kb, *BamHI* / *HindIII*: $\sim 1,4$ kb, *HindIII* / *EcoRI*: $\sim 2,1$ kb.

Von Masao Doi wurden freundlicherweise die Vektoren *pAc-dPer-I530A* und *pAc-dPer-M560D* zur Verfügung gestellt, die auf dem *pAc5.1/V5-HIS B* (Invitrogen) basieren und Basenaustausche in der *period*-cDNA tragen, die im

PERIOD-Protein die Aminosäurenaustausche Isoleucin-530-Alanin (I530A) und Methionin-560-Aspartat (M560D) verursachen.

2.1.3.2 Herstellung der TAGs

Die TAGs wurden durch Hybridisierung von je zwei Oligonukleotiden hergestellt. Jeweils 150 pmol der Oligonukleotide HA2-S und HA2-AS, sowie MYC2-S und MYC2-AS (Tab. 2.3) wurden in *T4 DNA Ligase* Puffer (NEB) mit *T4 Polynucleotide Kinase* (NEB) am 5'-Ende für die spätere Ligation phosphoryliert. Anschließend wurden die Reaktionen 5 min in 1 l Wasserbad aufgekocht und im Wasserbad langsam auf 4 °C abgekühlt. Dadurch wurde zum Einen die *T4 Polynucleotide Kinase* inaktiviert und zum Anderen die Hybridisierung durchgeführt.

2.1.3.3 Klonierung der *per*-Konstrukte ohne Mutationen

Zunächst wurde das 4,2 kb *XhoI* / *HindIII*-Fragment aus dem *rec4* in einen *pBluescript KS⁺* (Stratagene) kloniert (*pKS-per*). In *pKS-per* wurde anschließend mit Hilfe des *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) kurz vor dem Stopcodon in *per* mit den Primern Aat-S und Aat-AS (Tab. 2.3) eine *AatII*-Restriktionsstelle erzeugt (*pKS-per-Aat*). In diese *AatII*-Schnittstelle wurden daraufhin die beiden hybridisierten TAGs, *HA* und *c-myc*, ligiert (*pKS-per-HA*, *pKS-per-c-myc*). Die Sequenz der TAGs wurde so gewählt, dass nach einer Insertion die *AatII*-Stelle nicht mehr vorhanden ist. Der korrekte Einbau der TAGs wurde durch Test-PCR und Sequenzierung (Tab. 2.2) überprüft.

Nachdem mit den Primern Bam-weg-S und Bam-weg-AS (Tab. 2.3) bei einem *pBluescript KS⁺* die *BamHI*-Restriktionsstelle entfernt worden war (*pkS-Bam⁻*) wurde das 2,1 kb *HindIII* / *EcoRI*-Fragment aus *rec4* in diesen Vektor kloniert (*pKS-pgs-Bam⁻*). Durch Klonierung des 2,1 kb großen *HindIII* / *XbaI*-Fragments aus dem *pKS-pgs-Bam⁻* in die Vektoren *pKS-per-HA* und

pKS-per-c-myc wurden dann die Vektoren *rec4-HA-Bam*⁻ und *rec4-c-myc-Bam*⁻ erzeugt. Im Ausgangsvektor *-1313-34-hs-per* wurde daraufhin das 3,5 kb *Bam*HI / *Xba*I-Fragment mit den entsprechenden Fragmenten aus *rec4-HA-Bam*⁻ und *rec4-c-myc-Bam*⁻ ausgetauscht, was die beiden Konstrukte *per-HA* und *per-c-myc* erzeugte.

2.1.3.4 Klonierung der Konstrukte mit Basenaustauschen

Name	Sequenz
HA2-S	TTACCCCTACGATGTGCCCGATTACGCCTACGT
HA2-AS	AGGCGTAATCGGGCACATCGTAGGGGTAAACGT
MYC2-S	TGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGATCTGTACGT
MYC2-AS	AGAGATCCTCCTCGCTGATCAGCTTCTGCTCAACGT
Aat-S	CCAGACACAGCACGGGGAC CGTCT AGTAGCCACACCCGC
Aat-AS	GCGGGTGTGGCTACTAG ACGT CCCCGTGCTGTGTCTGG
Bam-weg-S	CCGCTCTAGAACTAGTG AAT CCCCCGGGCTGCAG
Bam-weg-AS	CTGCAGCCCGGGGATT CACT AGTTCTAGAGCGG
R345E-S	CCTGGGGCTCACCTT CG AGGAGGCTCCGGAGGAG
R345E-AS	CTCCTCCGGAGCCTC TC GGAAGGTGAGCCCCAGG
W482E-S	AGCTTCGTCAATCCAG AGT CCCGCAAGCTGG
W482E-AS	CCAGCTTGCGGGACT CT GGATTGACGAAGCT

Tabelle 2.3: Oligonukleotide, die für die Erzeugung der Punktmutationen und die Herstellung der TAGs für die *period*-Konstrukte verwendet wurden. Basenaustausche sind durch Fettdruck gekennzeichnet.

Im Vektor *pKS-per* wurden mit den Primerpaaren R345E-S / R345E-AS und W482E-S / W482E-AS (Tab. 2.3) die Basenaustausche Arginin-345-Glutamat und Tryptophan-482-Glutamat erzeugt (*pKS-per-R345E* und *pKS-per-W482E*). Die *Xho*I / *Bam*HI-Fragmente (2,9 kb) aus diesen Vektoren wurden dann jeweils in *per-HA* und *per-c-myc* ausgetauscht: *per-R345E-*

HA, *per-R345E-c-myc*, *per-W482E-HA* und *per-W482E-c-myc*. Der dabei auch freiwerdende *pBluescript KS⁺* etwa gleicher Grösse (3 kb) wurde mit *DraI* verdaut.

Die *SanDI* / *BamHI*-Fragmente (1,1 kb) aus den Vektoren *pAc-dPer-I530A* und *pAc-dPer-M560D* wurden jeweils in den Konstrukten *per-HA* und *per-c-myc* ausgetauscht: *per-I530A-HA*, *per-I530A-c-myc*, *per-M560D-HA* und *per-M560D-c-myc*.

Das 1,7 kb lange *XhoI* / *SanDI*-Fragment aus *pKS-per-W482E* wurde jeweils in den Konstrukten *per-M560D-HA* und *per-M560D-c-myc* ausgetauscht, was die Konstrukte *per-W482E-M560D-HA* und *per-W482E-M560D-c-myc* erzeugte. Das Vorhandensein der Basenaustausche wurde durch Sequenzierung (Tab. 2.2) überprüft.

2.1.4 Westernblot

2.1.4.1 Proteinpräparation und Gelelektrophorese

Drei bis vier Tage alte Tiere wurden für mindestens drei Tage in einem künstlichen Rhythmus aus 12 h Licht / 12 h Dunkelheit (LD) bei 25 °C gehalten und zu den entsprechenden Zeitgeberzeiten in flüssigem Stickstoff abgesammelt. Durch Vortexen wurden die Köpfe abgetrennt und auf Trockeneis abgezählt. Für die einzelnen Experimente wurden unterschiedliche Mengen von Fliegenköpfen verwendet. Wird im Ergebnisteil nicht gesondert darauf hingewiesen, so wurden für TIM- und PER-Nachweise in wildtypischen Fliegen 25 Köpfe und für Nachweise von PER in den Transformantenlinien der *per*-Konstrukte 25, 35 oder 50 Köpfe verwendet.

Die Köpfe wurden in 50 μ l Homogenisierungspuffer (20 mM HEPES pH 7,5, 100 mM KCl, 5 % Glycerin, 10 mM EDTA, 0,1 % Triton-X 100, 20 mM β -Glycerophosphat, 0,1 mM Natriumvanadat (Na_3VO_4), 0,5 mM PMSF, 20 μ g/ml Aprotinin, 1 mM DTT, 5 μ g/ml Leupeptin, 5 μ g/ml Pepstatin A)

homogenisiert. Nach zweimaliger Zentrifugation (6 min bei 16000 g) wurde der Überstand mit 10 μ l 5 \times DGLP (0,31 mM Tris, 10 % SDS, 50 % Glycerin, 25 % β -Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau) versetzt, und 3 min bei 96 °C aufgeköcht.

2.1.4.2 Proteinpräparation mit Dephosphorylierung der Proteine

Die Fliegenköpfe wurden wie oben beschrieben abgezählt. Die Proteinextraktion fand in einem Homogenisierungspuffer statt, der im Gegensatz zum oben beschriebenen, kein Na_3VO_4 und nur 1 mM EDTA enthielt. Vor dem Aufkochen in DGLP wurden die Proteine mit λ -Protein-Phosphatase (λ -PPase, NEB) entsprechend der Herstellerinformation dephosphoryliert.

2.1.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine wurden in einem 16 \times 18 cm großen Polyacrylamidgel bei 55 V über einen Zeitraum von 17 h aufgetrennt (Sammelgel: 4,5 % Acrylamid [Acrylamid:Bisacrylamid 75:1], 0,1 M Tris pH 6,8, 0,1 % SDS; Trenngel: 6 % Acrylamid [Acrylamid:Bisacrylamid 75:1], 0,39 M Tris pH 8,8, 0,1 % SDS; Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS).

2.1.4.4 Semidryblot

Auf der Kathode der Blotapparatur wurde der Blot wie folgt aufgebaut: drei Lagen Whatman 3MM Chromatographiepapier, Polyacrylamidgel, Nitrocellulosemembran (*Protran BA85 45 μ m*, Schleicher und Schuell), drei Lagen Whatmanpapier. Das Papier und die Membran wurden vor dem Blotten mit SDBB (Semi-Dry-Blotting-Buffer, 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,0375 % SDS) getränkt. Geblottet wurde für 1 h bei einer Stromstärke von 400 mA ($\sim 4 \text{ mA} / \text{cm}^2$).

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen mit PonceauS gefärbt um

die Übertragung zu überprüfen. Entfärbt wurde durch mehrere Waschschrirte mit zuerst Wasser, und dann TBST (Tris Buffered Saline mit Tween-20: 140 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 0,05 % Tween-20). Mit 1 % BSA Fraktion V in TBST wurden die Membranen daraufhin 2 h geblockt.

2.1.4.5 Antikörperfärbung und Detektion

Direkt nach dem Blocken wurden die Membranen über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe Tab. 2.4) in 5 % Magermilchpulver in TBST gefärbt. Nach 5-6 Waschschrirten (insgesamt ca. 30 min) mit TBST erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (Tab. 2.4) in 5 % Magermilchpulver in TBST. Nach abermals 5-6 Waschschrirten erfolgte die Detektion des sekundären Antikörpers mit Hilfe des *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce) auf *Hyperfilm MP* Filmen (Amersham).

Bei Färbungen mit einem zweiten primären Antikörper wurden die Membranen nach der Detektion mit TBST gewaschen und erneut geblockt. Die weiteren Färbungen wurden dann, wie oben beschrieben, durchgeführt.

2.1.5 Immunocopräzipitation (CoIP)

Die CoIP wurde nach einem Protokoll von P. Emery durchgeführt (Busza *et al.*, 2004). Alle Zentrifugationen und Inkubationen wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Proben (ZT20) wurden bei allen Arbeitsschrirten durch Aluminiumfolie vor Licht geschützt.

Pro Probe wurden 20 μ l Beads (*Protein G Sepharose Fast Flow Beads*, Amersham) bei 2000 rpm (322 g Biofuge Pico, Heraeus) abzentrifugiert, mit 1 ml Extraktionspuffer (20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM KCl, 5 % Glycerin, 0,05 % NP40, 1 mM DTT, 20 mM β -Glycerophosphat, 0,1 mM Na₃VO₄, 5 mM PMSF, 20 μ g/ml Aprotinin, 5 μ g/ml Leupeptin, 5 μ g/ml Pepstatin A) gewaschen und mit 5 μ l Antikörper (Anti-C-MYC, siehe Tab. 2.4) in 1 ml

Antigen	Wirt	Markierung	Verdünnung	Referenz / Quelle
PER (978-1)	Kaninchen	-	1:10000	Stanewsky <i>et al.</i> , 1997A
TIM	Ratte	-	1:10000	M. Rosbash
TIM	Ratte	-	1:2500	I. Edery
HA.11 (16B12)	Maus	-	1:1000	Covance (HIS Diagnostics GmbH)
C-MYC (9E10)	Maus	-	1:1000	Covance (HIS Diagnostics GmbH)
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	HRP	1:100000	Pierce
Ratte IgG (H+L)	Ziege	HRP	1:25000	Pierce
Maus IgG	Schaf	HRP/ECL	1:2000	Amersham

Tabelle 2.4: Antikörper für den Proteinnachweis auf Membranen.

Extraktionspuffer für 1 h auf 4 °C rotierend inkubiert. Danach wurden die Beads abzentrifugiert (2000 rpm) und der Überstand abgenommen. Die Beads wurden danach pro Probe in 40 μ l Extraktionspuffer resuspendiert.

Pro Probe wurden $2 \times 200 \mu$ l Fliegenköpfe (ZT20) in je 400 μ l Extraktionspuffer homogenisiert, zweimal 5 min bei 16000 g zentrifugiert und vereinigt. 20 μ l der vereinigten Überstände wurden mit $5 \times$ DGLP aufgeköcht (siehe oben) und als Kontrolle auf -80 °C eingefrohren. Der restliche Überstand wurde dann mit 20 μ l antikörpergekoppelter Beads rotierend über Nacht inkubiert.

Die Beads wurden dann 2 min bei 2000 rpm abzentrifugiert. 20 μ l des Überstands wurden wiederum, wie oben beschrieben, als Kontrolle aufgehoben. Nach dreimaligem Waschen mit 750 μ l Extraktionspuffer wurden die Beads in 30 μ l Extraktionspuffer resuspendiert und mit 8 μ l $5 \times$ DGLP aufgeköcht. Der Nachweis der an die Beads gebundenen Proteine erfolgte dann mit SDS-Gelelektrophorese und Westernblot (siehe oben).

2.1.6 Messung der Transkription von *per*-Konstrukten

2.1.6.1 RNA-Präparation und reverse Transkription

Wird nicht gesondert darauf hingewiesen, so fanden alle Arbeitsschritte bei 4 °C oder auf Eis statt. 30 Köpfe (ZT15) wurden in 250 μ l Trifast (Peq-lab) homogenisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand mit 50 μ l Chloroform / Isoamylalkohol (49:1) durch Vortexen vermischt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 20 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase mit Isopropanol gemischt und die RNA bei -80 °C gefällt. Die RNA wurde dann durch eine 15 min Zentrifugation mit 11000 rpm präzipitiert und mit 75 % Ethanol gewaschen (5 min, 8000 rpm). Nach dem Trocknen wurde die RNA in 12 μ l Wasser gelöst.

Die reverse Transkription fand mit dem *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben statt. In die Reaktion zur Beseitigung von genomischen DNA-Verunreinigungen (*gDNA Wipeout Buffer*) wurde die gesamte RNA-Präparation eingesetzt. Die daraus resultierenden 14 μ l wurden wiederum vollständig in die reverse Transkription mit Oligohexanukleotiden eingesetzt.

Von den 20 μ l cDNA-Lösung wurde daraufhin 1 μ l in einer PCR (siehe oben) auf Verunreinigungen durch genomische DNA getestet. Dabei wurde ein Primerpaar (Inv-S / Inv-AS) gegen das Gen *Invadolysin* verwendet (siehe Tab. 2.5). Inv-S bindet in Exon 6, Inv-AS in Exon 8 von *Invadolysin*. Im Fall von genomischer DNA ist das PCR-Produkt 746 bp lang, im Fall von cDNA nur 625 bp, da zwei Introns mit 55 bp bzw. 66 bp fehlen.

2.1.6.2 Realtime-PCR und Auswertung

Die Realtime-PCR wurde in 20 μ l LightCycler-Kappilaren (Roche) mit dem *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) in einem LightCycler (Roche)

durchgeführt. Für jede Probe wurde eine Reaktion mit einem Primerpaar gegen das housekeeping Gen α *Tubulin84B* und eine Reaktion mit einem Primerpaar gegen die *per*-Konstrukte angesetzt (siehe Tab. 2.5). Pro Reaktion wurde 1 μ l cDNA eingesetzt. Um Pippetierfehler bei der Zugabe der cDNA zu vermeiden, wurde für jede Probe ein Mastermix angesetzt, dem dann die jeweiligen Primer zugegeben wurden.

Primer	Sequenz	gDNA	cDNA
Inv-S	CTCGAGCAGGGATGTATAGAGCG	746 bp	625 bp
Inv-AS	AGATCTCTGTCCGGAGAGCATTAGCAC		
Tub-S	TCCTTGTCGCGTGTGAAACA	710 bp	221 bp
Tub-AS	GTGCTTGCCAGCTCCAGTCT		
per-LS-1	ACCGAAAGCTGAAGAGCATG	116 bp	116 bp
per-LS-2	GACCCCAAGCACCGAAAGCTG	135 bp	135 bp
c-myc-test	CCTCGCTGATCAGCTTCTGCT		

Tabelle 2.5: Primer, die für die Real-Time-PCR und zum Testen der cDNA verwendet wurden. Das Primerpaar Inv-S und Inv-AS, gegen das Gen *Invadolysin*, wurde zum Testen der cDNA auf Verunreinigungen durch genomische DNA verwendet. Das Primerpaar Tub-S und Tub-AS bindet an α *Tubulin84B* und wurde als interne Kontrolle (housekeeping Gen) bei der Realtime-PCR verwendet. per-LS-1 und per-LS-2 wurden jeweils in Kombination mit c-myc-test verwendet. Auf diese Kombination beziehen sich auch die Angaben der Produktlängen bei den Primern per-LS-1 und per-LS-2.

Während der PCR (siehe Tab. 2.6) im LightCycler wurde nach jedem PCR-Zyklus die Zunahme der Fluoreszenz (siehe Abb. 2.2) des Farbstoffes SYBR Green gemessen. SYBR Green bindet nur an doppelsträngige DNA und kann nur dann zur Fluoreszenz angeregt werden. Die Stärke der Fluoreszenz verhält sich daher proportional zur Menge des PCR-Produktes.

Für die Berechnung der relativen cDNA-Menge wurde der CT-Wert (Crossing Time) verwendet. Der CT gibt an, bei welcher Zyklenzahl die Fluoreszenz

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95 °C	15 min
40	95 °C	15 s
	56 °C	30 s
	72 °C	20 s

Tabelle 2.6: PCR-Programm für die cDNA-Amplifikation im LightCycler. Der 15 minütige 95 °C-Schritt dient zur Auftrennung der Doppelstränge der cDNA und zur Aktivierung der Polymerase.

reszenz und damit das PCR-Produkt einen festgelegten Schwellenwert übersteigt (siehe Abb. 2.2). Für jede Probe wurde dann die Differenz (ΔCT) aus den CTs von Zielgen und housekeeping Gen ermittelt, die relative RNA-Menge ergibt sich aus der Potenz des $-\Delta CT$ zur Basis 2:

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{housekeeping Gen}} \quad \text{Relative RNA-Menge: } 2^{-\Delta CT}$$

Zum Vergleich mehrerer Proben wurden die verschiedenen relativen RNA-Mengen eines Experiments normalisiert, wobei der höchste Wert auf 1 gesetzt wurde. Aus den normalisierten RNA-Mengen mehrerer Experimente wurde dann der Durchschnitt, sowie der SEM berechnet.

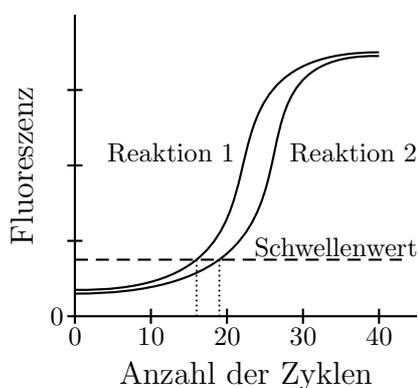


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines LightCycler-Experiments mit einer Probe. Reaktion 1 ist mit dem Primerpaar für das housekeeping Gen, Reaktion 2 mit dem Primerpaar für das Zielgen. Die Schnittpunkte der Fluoreszenzkurven mit dem Schwellenwert ergeben die beiden CT-Werte (Crossing Time) in Reaktionszyklen.

2.2 Genetische Methoden

2.2.1 Fliegenstämme

CantonS: Wildtypstamm *Canton Spezial* (Konopka *et al.*, 1989).

y Df(1)w: Kontroll- und Ausgangsstamm, mit *y w* abgekürzt (Lindsley and Zimm, 1992).

X-90: Fliegenlinie mit *P*-Element-Insertion (*luc-sniffer*) auf *y w*-X-Chromosom (Stempfl *et al.*, 2002).

GAB, Nov75: Wildtypstämme mit dem Allel *tim-ls* auf Chromosom 2 (Sandrelli *et al.*, 2007).

ATDD, B16: Wildtypstämme mit dem Allel *tim-s* auf Chromosom 2 (Sandrelli *et al.*, 2007).

21-32: Fliegenlinie mit *pTrap-luc*-Insertion auf Chromosom 3 vor dem Gen *CG6328* (93F2-93F6).

T27L, T29L: Fliegenlinien mit einem L-TIM exprimierenden Konstrukt im genetischen Hintergrund von *tim⁰* (Tauber *et al.*, 2007).

T28S, T30S: Fliegenlinien mit einem S-TIM exprimierendem Konstrukt im genetischen Hintergrund von *tim⁰* (Tauber *et al.*, 2007).

P[LS-TIM]: Transgener Stamm mit einem *ls-tim*-Konstrukt in *tim⁰* (Tauber *et al.*, 2007).

46B: Fliegenlinie mit *P[ls-tim]*-Insertion im genetischen Hintergrund von *tim⁰* (Sandrelli *et al.*, 2007).

$\frac{Df(3R)-4H, p^p}{TM3, Sb^1 Ser^I}$: Defizienz 93D1-93F8, Bloomington №: 5805 (Lindsley and Zimm, 1992).

y w ;; Ki Δ2-3: *y w* mit *Kinked* und der *P*-Element-Transposase homozygot auf Chromosom 3 (Lindsley and Zimm, 1992).

y w ;; $\frac{H}{TM3}$: *y w* mit *Hairless* über dem Balancerchromosom *TM3, Sb¹* (Lindsley and Zimm 1992).

$y\ per^{01}\ w$: *period*-Nullmutante in $y\ w$ -Hintergrund. (Konopka and Benzer, 1971).

$y\ per^{01}\ w ; \frac{Bl}{CyO}$: $y\ per^{01}\ w$ mit *Bristle* über dem Balancer *Curly of Oster* (Lindsley and Zimm, 1992).

$y\ per^{01}\ w ; \frac{H}{TM6B}$: $y\ per^{01}\ w$ mit *Hairless* über dem Balancer *TM6B*, D^3 (Lindsley and Zimm, 1992).

2.2.2 Fliegenaufzucht

Die Fliegen wurden bei 18 °C oder 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 % in Gläsern auf einem Nahrungsbrei, bestehend aus 0,8 % Agar, 2,2 % Rübensirup, 8,0 % Malzextrakt, 1,8 % Bierhefe, 1,0 % Sojamehl, 8,0 % Maismehl/-gries und 0,3 % Nipagin, gehalten. In den Zuchträumen herrscht ein künstlicher Tag/Nacht-Rhythmus von 12/12 h LD. Die Betäubung der Fliegen erfolgt entweder durch CO₂ oder Diethylether.

2.2.3 Remobilisierung des *P*-Elements von 21-32

Das *P*-Element der Linie 21-32 ist auf dem 3. Chromosom lokalisiert. Da die Fliegen dieser Linie homozygot steril sind, ist das Insertionschromosom mit *TM3* balanciert. Durch Einkreuzen der Transposase, die $\Delta 2-3$ ebenfalls 3. chromosomal lokalisiert ist, wurde das *P*-Element mobilisiert. Resultierende weißäugige Fliegen wurden anschließend mit $\frac{H}{TM3}$ balanciert. Bei der Parentalkreuzung wurden etwa 10 Weibchen (Jungfrauen) mit 10 Männchen gekreuzt (Massenkreuzung). Bei den folgenden Kreuzungen (F1-F4) wurden Einzelkreuzungen angesetzt.

Parentalkreuzung:

$$\frac{y\ w}{y\ w} ; \frac{+}{+} ; \frac{P[w^+]}{TM3} \quad \times \quad \frac{y\ w}{Y} ; \frac{+}{+} ; \frac{Ki\ \Delta 2-3}{Ki\ \Delta 2-3}$$

F1-Kreuzung:

$$\frac{y w}{y w} ; \frac{+}{+} ; \frac{H}{TM3} \quad \times \quad \frac{y w}{Y} ; \frac{+}{+} ; \frac{P[w^+]}{Ki \Delta 2-3}$$

F2-Kreuzung (das Chromosom nach der Remobilisierung des P -Elements ist durch $P([w^+])^-$, also eine weiße Augenfarbe gekennzeichnet:

$$\frac{y w}{y w} ; \frac{+}{+} ; \frac{H}{TM3} \quad \times \quad \frac{y w}{Y} ; \frac{+}{+} ; \frac{(P[w^+])^-}{TM3}$$

F3-Kreuzung:

$$\frac{y w}{y w} ; \frac{+}{+} ; \frac{(P[w^+])^-}{TM3} \quad \times \quad \frac{y w}{Y} ; \frac{+}{+} ; \frac{(P[w^+])^-}{TM3}$$

F4-Kreuzung (Test ob homozygote Fliegenlinien fertil sind):

$$\frac{y w}{y w} ; \frac{+}{+} ; \frac{(P[w^+])^-}{(P[w^+])^-} \quad \times \quad \frac{y w}{Y} ; \frac{+}{+} ; \frac{(P[w^+])^-}{(P[w^+])^-}$$

2.2.4 Herstellung Transgener Fliegen

2.2.4.1 DNA-Mikroinjektion in Fliegenembryos

Die DNA für die Injektion wurde mit Hilfe des QUIAGEN Plasmid Midi Kits aufgereinigt und in sterilem Wasser gelöst. Nach 30 min Zentrifugation bei 16000 g wurde die Midiprep-DNA mit sterilem Wasser, 10× Injektionspuffer und grüner Lebensmittelfarbe auf eine Konzentration von 300 ng/μl DNA sowie 1× Injektionspuffer (5 mM KCl, 0,1 mM NaPO₄ pH 6,8) und Lebensmittelfarbe 1:20 verdünnt.

Die für die Mikroinjektion verwendeten Embryonen hatten folgenden Genotyp: $\frac{y w}{y w \text{ oder } Y} ; ; \frac{Ki \Delta 2-3}{+}$. Zum Absammeln frisch gelegter Embryonen wurden 5 Kreuzungen von je 20 Weibchen (Genotyp: $\frac{y w}{y w}$) und 20 Männchen (Genotyp: $\frac{y w}{Y} ; ; \frac{Ki \Delta 2-3}{Ki \Delta 2-3}$) auf Eiablageplatten (1,8 % Baktoagar, 2,4 % Zucker, 0,15 % Nipagin, 25 % Fruchtsaft) gehalten. Die Embryonen wurden spätestens 30 min nach der Eiablage von den Eiablageplatten gesammelt, mit Wasser gewaschen, durch Rollen auf doppelseitigem Klebeband mechanisch dechorioniert und für die Injektion aufgereiht. Danach wurden sie für

1-3 Minuten über Silikagel getrocknet. Um eine weitere Austrocknung zu verhindern wurden die so vorbereiteten Embryonen mit Voltalev H10S Öl (Atofina) überschichtet.

Die Injektion erfolgte mit Eppendorf Femtotips II, deren Spitzen vor der Injektion vorsichtig an einem Objektträger gebrochen wurden. Injiziert wurde in Embryonen, bei denen die Zellularisierung noch nicht begonnen hatte, und zwar in den posterioren Bereich. Hier schnüren sich später die Polzellen ab, die die Keimbahn bilden. Nach der Injektion wurden die Objektträger mit den Embryonen auf befeuchteten Eiablageplatten gelagert, bis sich alle Überlebenden zu Larven entwickelt hatten. Immer 20 Larven wurden dann in ein Glas mit Fliegenbrei überführt.

2.2.4.2 Herstellung genetisch stabiler Transformanten

Um aus den Überlebenden der Injektion genetisch stabile Fliegenlinien im genetischen Hintergrund von $y\ per^{01}\ w$ zu erzeugen, wurde folgendes Kreuzungsschema verfolgt (per^X steht dabei für die verschiedenen, *in vitro* mutagenisierten *period*-Allele, die injiziert wurden):

P-Einzelkreuzungen mit Überlebenden aus der Injektion:

$$\frac{y\ w}{y\ w} ; ; \frac{Ki\ \Delta 2 - 3}{+} \quad \times \quad \frac{y\ per^{01}\ w}{Y} ; \frac{Bl}{CyO} \quad \text{oder:}$$

$$\frac{y\ per^{01}\ w}{y\ per^{01}\ w} ; \frac{Bl}{CyO} \quad \times \quad \frac{y\ w}{Y} ; ; \frac{Ki\ \Delta 2 - 3}{+}$$

F1-Einzelkreuzungen (Waren die Überlebenden der Injektion männlich, trugen sie bereits $y\ per^{01}\ w$ anstelle von $y\ w$):

$$\frac{y\ per^{01}\ w}{y\ per^{01}\ w} ; \frac{Bl}{CyO} \quad \times \quad \frac{y\ w}{Y} ; CyO, P[w^+ per^X]$$

Sind alle weiblichen Nachkommen aus der F1-Kreuzung rotäugig, so befindet sich das *P*-Element auf dem *X*-Chromosom. Das endogene *per*-Gen

ist ebenfalls auf dem X -Chromosom lokalisiert. Für spätere Untersuchungen wird jedoch ein X -Chromosom mit per^{01} benötigt. Hat die P -Insertion auf ein per^+ - X -Chromosom stattgefunden, kann das P -Element nicht in den per^{01} -Hintergrund gekreuzt werden. Fliegenlinien mit einem X -lokalisierten P -Element wurden daher verworfen.

Sind alle Nachkommen, die $\frac{Bl}{CyO}$ tragen, auch weißäugig, so befindet sich das P -Element auf dem 2. Chromosom.

F2-Einzelkreuzungen (Diese Kreuzungen wurden nur im Fall von weiblichen Überlebenden durchgeführt, im Fall von Männchen konnten direkt die „F3“ angesetzt werden):

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{Bl}{CyO} \quad \times \quad \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{CyO}$$

F3-Einzelkreuzungen:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{CyO} \quad \times \quad \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{CyO}$$

F4-Einzelkreuzungen:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{P[w^+ \text{ per}^X]} \quad \times \quad \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{P[w^+ \text{ per}^X]}$$

Sind auch $\frac{Bl}{CyO}$ -Tiere aus der F1-Kreuzung rotäugig, so befindet sich ein P -Element entweder auf dem 3. oder 4. Chromosom.

F2-Einzelkreuzungen:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; ; \frac{H}{TM6B} \quad \times \quad \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{CyO}{+} ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{+}$$

F3-Einzelkreuzungen:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{TM6B} \quad \times \quad \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{TM6B}$$

F4-Einzelkreuzungen:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{P[w^+ \text{ per}^X]} \quad \times \quad \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; ; \frac{P[w^+ \text{ per}^X]}{P[w^+ \text{ per}^X]}$$

Bei einer Linie (10-2-2) kam es zu einer Insertion des P -Elements auf Chromosom 4. Bei dieser Linie wurde nach Auskreuzen der Balancer ein homozygoter Stamm unter Verwendung der Augenfarbe hergestellt.

2.2.5 Herstellung doppelt homozygoter Transformanten der *per*-Konstrukte für die CoIP

Für die Coimmunopräzipitation wurden zwei Fliegenstämme erzeugt, die rekombinante PERIOD-Proteine mit HA-TAG und C-MYC-TAG exprimieren. Ein Fliegenstamm für wildtypisches PER und ein Stamm für mutantes PER mit dem Aminosäureaustausch M560D. Um die Proteinmenge in den Fliegen zu erhöhen wurden doppelthomozygote Fliegenstämme hergestellt. Ausgangsstämme für das wildtypische PER waren dabei die Stämme 1-5-2 mit *per-HA* auf Chromosom 2 und 2-2-2 mit *per-c-myc* auf Chromosom 3 (Siehe Tab. A.1).

Da die Injektion des Konstruktes *per-M560D-c-myc* zu keiner homozygot lebensfähigen Linie mit einer Insertion auf Chromosom 2 oder 3 führte, musste das Konstrukt der Linie 10-2-2 zuerst von Chromosom 4 auf Chromosom 2 mobilisiert werden. Ausgangsstamm für *per-M560D-HA* war die Linie 9-8

2.2.5.1 Remobilisierung von *per-M560D-c-myc*

Zur Remobilisierung des *per-M560D-c-myc*-Konstrukts wurde die Transposase $\Delta 2-3$ in Fliegen der Linie 10-2-2 eingekreuzt und die Tiere anschließend mit $y\ per^{01}\ w ; \frac{Bl}{CyO}$ balanciert. per^X bezeichnet hier *per-M560D-c-myc*. Aus Platzgründen wurde in den folgende Kreuzungsschemata der w^+ -Marker nicht angegeben.

P-Massenkreuzung:

$$\frac{y\ per^{01}\ w}{y\ per^{01}\ w} ; ; ; \frac{P[per^X]}{P[per^X]} \times \frac{y\ w}{Y} ; ; \frac{Ki\ \Delta 2 - 3}{Ki\ \Delta 2 - 3}$$

F1-Einzelkreuzungen (* bezeichnet das zu mobilisierende bzw. mobilisierte P-Element):

$$\frac{y\ per^{01}\ w}{y\ per^{01}\ w} ; \frac{Bl}{CyO} \times \frac{y\ per^{01}\ w}{Y} ; ; \frac{Ki\ \Delta 2 - 3}{+} ; \frac{P[per^X]^*}{+}$$

F2-Einzelkreuzungen:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{Bl}{CyO} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[\text{per}^X]^*}{CyO}$$

In den F3-Kreuzungen wurden nur Linien verwendet, bei denen eine Insertion auf Chromosom 2 stattfand. Bei diesen Linien sind alle $\frac{Bl}{CyO}$ -Tiere aus der F2-Kreuzung weißäugig.

F3-Einzelkreuzungen:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{P[\text{per}^X]}{CyO} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[\text{per}^X]}{CyO}$$

F4-Einzelkreuzungen:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{P[\text{per}^X]}{P[\text{per}^X]} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[\text{per}^X]}{P[\text{per}^X]}$$

2.2.5.2 Erzeugung doppelt homozygoter Linien

Zur Herstellung der doppelt homozygoten Linie ohne Basenaustausch wurden 1-5-2 und 2-2-2 verwendet, für M560D die Linie 9-8 und die zuvor durch Remobilisierung erzeugte J5. per^X und per^Y bezeichnen die zwei verschiedenen per -Konstrukte.

P-1-Kreuzung (P auf Chr. 3):

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{Bl}{CyO} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[\text{per}^X]}{P[\text{per}^X]}$$

P-2-Kreuzung (P auf Chr. 2):

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{H}{TM6B} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[\text{per}^Y]}{P[\text{per}^Y]}$$

F1-1-Kreuzung:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{CyO}{+} ; \frac{P[\text{per}^X]}{+} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{CyO}{+} ; \frac{P[\text{per}^X]}{+}$$

F1-2-Kreuzung:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{P[\text{per}^Y]}{+} ; \frac{TM6B}{+} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[\text{per}^Y]}{+} ; \frac{TM6B}{+}$$

F2-Kreuzung (In Bezug auf die *P*-Elemente doppelt homozygote Tiere wurden anhand der Augenfarbe ausgesucht):

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{P[\text{per}^Y]}{P[\text{per}^Y]} ; \frac{TM6B}{+} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{CyO}{+} ; \frac{P[\text{per}^X]}{P[\text{per}^X]}$$

F3-Kreuzung:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{P[\text{per}^Y]}{CyO} ; \frac{P[\text{per}^X]}{TM6B} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[\text{per}^Y]}{CyO} ; \frac{P[\text{per}^X]}{TM6B}$$

F4-Kreuzung:

$$\frac{y \text{ per}^{01} w}{y \text{ per}^{01} w} ; \frac{P[\text{per}^Y]}{P[\text{per}^Y]} ; \frac{P[\text{per}^X]}{P[\text{per}^X]} \times \frac{y \text{ per}^{01} w}{Y} ; \frac{P[\text{per}^Y]}{P[\text{per}^Y]} ; \frac{P[\text{per}^X]}{P[\text{per}^X]}$$

2.3 *in vivo*-Biolumineszenzmessung

Zur Messung der LUCIFERASE-Aktivität in lebenden Fliegen wurde jede zweite Vertiefung einer 96-well OptiPlate (Packard) mit 100 μ l Futterlösung (1 % Agar, 5 % Saccharose und 15 mM Luciferin) befüllt. Nach Erstarren der Agarose wurden mit Diethylether betäubte Fliegenmännchen in die Löcher gesetzt und mit kleinen durchsichtigen Hütchen aus abgeschnittenen PCR-Reaktionsgefäßen (MicroAmp, Perkin Elmer) bedeckt, um sie in ihrer Bewegung einzuschränken (Stanewsky *et al.*, 1997b).

Die Messung erfolgte in einem Topcount NXT Szintillationszähler (Packard) bei einer konstanten Temperatur von 25 °C in einem künstlich befeuchteten Raum. Gemessen wurde einen Tag wobei die Biolumineszenz jeder Fliege einmal pro Stunde für 16 Sekunden gemessen wurde.

2.4 Messung der Lokomotoraktivität

Maximal vier Tage alte Fliegen wurden in kleinen Glasröhrchen, zur Messung der Laufaktivität gehalten. Ein Ende der Röhrchen (65 mm \times 5 mm)

wurde mit einer Futtermischung aus 2 % Agar und 5 % Saccharose in H₂O und einer Versiegelung aus Parafin verschlossen, die andere Seite versperrte ein Wattestopfen. Gemessen wurden die Fliegen in den Röhren in Monitoren (Drosophila Activity Monitor, Trikinetics Inc.), wobei durch einen Infrarotstrahl die Laufaktivität der Fliegen aufgezeichnet wurde. Alle Unterbrechungen des Strahls wurden aufgezeichnet und halbstündlich zu Aktivitätsbins zusammengefasst (DAM IV System). Ein Tag entspricht also 48 Messpunkten oder Bins.

Die Messungen wurden bei 18 °C, 25 °C oder 29 °C in befeuchteten Klimainkubatoren (Precision Scientific und Percival) über einen Zeitraum von ca. zwei Wochen durchgeführt. In der ersten Woche wurde unter LD-Bedingungen (12 h Licht / 12 h Dunkelheit) getestet, wie gut die Fliegen mit dem künstlichen Tag / Nacht-Rhythmus synchronisierbar sind, in der zweiten Woche wurde in DD (Dauerdunkel) untersucht wie die innere Uhr unter konstanten Bedingungen weiter läuft (Freilauf).

Die graphische Darstellung, sowie die Auswertung der Daten erfolgte mit einer Skriptsammlung (Levine *et al.*, 2002a) für das Mathematikprogramm Matlab. Abb. 2.3 stellt die verwendeten Funktionen des Softwarepakets dar:

Aktogramm: Graphische Darstellung der Daten in Form eines Doppelblots.

Die einzelnen Tage sind untereinander dargestellt, die Aktivität des Versuchstiers wird durch einen Balken auf der Zeitachse wiedergegeben. Das Aktogramm teilt sich in zwei Teile. Jeder Tag wird zuerst auf der rechten Seite dargestellt, und dann auf der linken Seite wiederholt (Siehe Abb. 2.3 A).

Daily Average oder Histogramm: Aus den Daten des LD-Teils des Experiments wird entweder für ein (Abb. 2.3 B) oder mehrere Versuchstier(e) (Abb. 2.3 F) der Durchschnittstag dargestellt. Es wird der Mittelwert und der SEM aller Bins für jede Tageszeit ermittelt. Der Daily Ave-

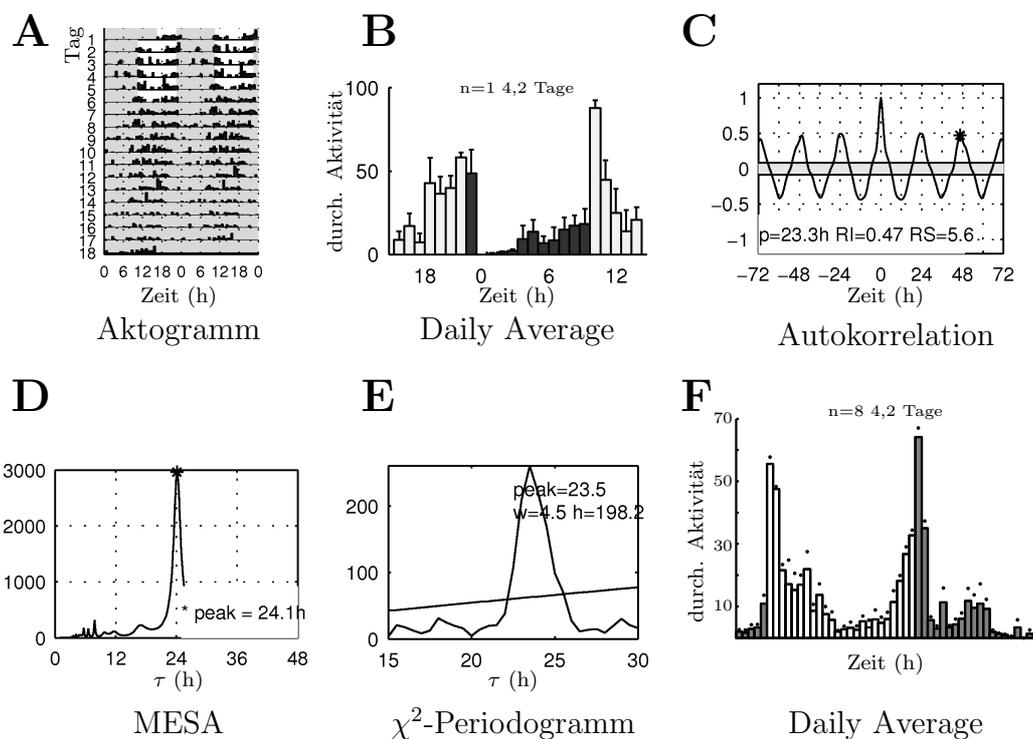


Abbildung 2.3: Auswertung der Lokomotorverhaltensdaten mit einer Skriptsammlung für das Computerprogramm Matlab (Levine *et al.*, 2002a). Dargestellt sind die graphischen Ausgaben des Computerprogramms (Genotyp: *y w*): **A**: Aktogramm einer Fliege über die Zeitdauer des gesamten Experiments. Weißer Hintergrund kennzeichnet „Licht an“, grauer Hintergrund „Licht aus“. **B**: Daily Average (durchschnittlicher Tag) einer Fliege in LD. Dargestellt ist die durchschnittliche Lokomotoraktivität über einen Zeitraum von 4 Tagen + SEM. Hellgraue Balken stehen für „Licht an“, dunkelgraue für „Licht aus“. **C**: Autokorrelationsanalyse des DD-Teils des Experiments zur Ermittlung der Periodenlänge (hier p). RI und RS kennzeichnen die Stärke der Rhythmizität. **D**: MESA-Analyse (DD) zur Bestimmung der Periodenlänge. **E**: χ^2 -Periodogramm (DD). $peak$ gibt die Periodenlänge in Stunden an. w steht für width, die Breite des Peaks und h für height, dessen Höhe. **F**: Daily Average von 8 Tieren gleichen Genotyps über 4,2 Tage.

rage hat daher nur eine Aussagekraft, wenn das oder die verwendeten Tier(e) eine Periodenlänge von ca. 24 h hat / haben, als in Entrainment Bedingungen.

Autokorrelation: Die Autokorrelation dient der Berechnung der Perioden-

länge τ und gibt außerdem an, ob ein Rhythmus statistisch signifikant ist. Ausschlag gebend dafür ist der Rhythmicity Index (RI), der die Höhe des dritten Peaks des Autokorrelogramms angibt. Aus diesem Wert wird der Rhythmicity Statistic (RS) Wert berechnet, als Verhältnis des RI zur 95 % Signifikanzlinie (in Abb. 2.3 C der Bereich zwischen den beiden horizontalen Linien). Tiere mit einem $RS \geq 1$ gelten als rhythmisch (Levine *et al.*, 2002b).

Maximum Entropy Spectral Analysis (MESA): Die MESA dient zur Bestimmung der Periodenlänge, gibt jedoch keine Auskunft darüber, wie robust der Rhythmus im analysierten Datenset ist (Abb. 2.3 D).

χ^2 -Periodogramm: Diese Analysemethode gibt, wie auch die Autokorrelation, Auskunft über die Periodenlänge und die statistische Signifikanz des berechneten Rhythmus. Die beiden relevanten Werte sind die Höhe (h oder Power) und die Breite (w) des Peaks. Ein Rhythmus mit $h > 10$ und gleichzeitig $w > 1$ gilt als signifikant.

Nicht immer kommen die Autokorrelation, das χ^2 -Periodogramm und die MESA zum gleichen Ergebnis. Die berechneten Periodenlängen und auch die Aussage über die Signifikanz des berechneten Rhythmus schwanken oft erheblich. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die Ausgaben der Autokorrelation zur Berechnung der Rhythmizitäten und Periodenlängen verwendet. Es wurde jedoch nicht blind auf deren Richtigkeit vertraut. Wicht die Autokorrelation stark von den anderen Analysen ab, so wurde das Analyseergebnis in die Auswertung aufgenommen, das sich am besten mit dem Aktogramm in Einklang bringen ließ.

2.5 Immunhistochemische Färbungen

2.5.1 Präabsorption des polyclonalen PER-Serums

Maximal 12 h alte *y per⁰¹ w* Embryonen wurden in NaHClO dechorioniert und mehrmals in PBS (10 mM PO₄, 137 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen. Nach 20 min Fixierung in paraformaldehydgesättigtem n-Heptan wurde das Fixans abgenommen und die Vitellinmembran durch Ausschütteln in -20 °C kaltem Methanol gelöst. Durch viermaliges Waschen in Methanol wurden die Membranreste entfernt.

100 µl der Embryonen wurden dann für jeweils 2 min in einer absteigenden Methanolreihe (90 %, 70 %, 50 % und 30 % Methanol in PBS) inkubiert und 3× in PBS, 0,5% Triton X 100 gewaschen. 500 µl Antikörperlösung (polyklonaler PER Antikörper 1:50, 5 % Normal Goat Serum (NGS), 0,5 % Triton, 0,02 % NH₃ in PBS) wurden mit den so vorbereiteten Embryonen über Nacht bei 4 °C präabsorbiert (Stanewsky *et al.*, 1997a).

2.5.2 Kryoschnitte von Fliegenköpfen und Antikörperfärbung

Fliegen wurden 3 Tage in einem künstlichen LD-Zyklus bei 25 °C gehalten und zu den Zeitpunkten ZT16, ZT17 und ZT18 mit CO₂ betäubt. Nach Entfernen der Probosci wurden die abgetrennten Köpfe in 4 % paraformaldehyd in PBS für 4 h bei 4 °C fixiert. Nach 4× waschen in PBS wurden die fixierten Köpfe über Nacht bei 4 °C mit 25 % Saccharose in PBS inkubiert.

Nach Einbettung in Tissue-Tek (Sakura) wurden mit einem Kryostat (LEICA CM3000) 10 µm dicke Horizontalschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden bei 40 °C ca. 5 min getrocknet und danach 3× kurz mit PBS gewaschen. Zum Auswaschen der Augenpigmente folgte ein Waschschritt in PBS bei 4 °C bis zum folgenden Nachmittag. Nach 1 h blocken in 5 % Normal Goat Serum

(NGS), 0,1 % Triton erfolgte die Färbung mit präabsorbiertem Antiserum gegen PER (Endverdünnung 1:1000, 3 % NGS, 0,03 % Triton in PBS) über Nacht bei 4 °C.

Der primäre Antikörper wurde abgenommen und die Schnitte 3× mit 0,1 % Bovine Serum Albumin (BSA), 0,03 % Triton in PBS, gewaschen. Die Färbung mit dem sekundären Antikörper (Goat Anti Rabbit gekoppelt mit Alexa Fluor 488, Invitrogen) erfolgte mit einer Verdünnung von 1:200, 0,1 % BSA, 0,03 % Triton in PBS, für 2 h bei Raumtemperatur.

Nach mehreren Waschschritten, 3× mit 0,1 % BSA, 0,03 % Triton in PBS, 2× in 0,1 % BSA in PBS und 1× nur mit BSA, wurden die Objektträger kurz getrocknet und mit Vektashield Mounting Medium (Vector Laboratories) eingedeckelt.

Bilder wurden aufgenommen mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, ZEISS) in Verbindung mit dem Softwarepaket Kamera-Control (INTAS).

2.5.3 Bestimmung der PER-Lokalisation

Pro Zeitpunkt wurden je Genotyp (*per-HA* 1-5-2 und *per-I530A-c-myc* 7-1) 5 Fliegenköpfe geschnitten und gefärbt. In einem Blindtest beurteilten dann 3 Personen unabhängig voneinander, ob eine Kernfärbung, eine Gleichverteilung zwischen Kern und Cytoplasma, oder eine cytoplasmatische Färbung vorlag. Zur Berechnung wurden den verschiedenen Angaben der Personen Werte zugewiesen: Kern 3, Kern und Cytoplasma 2 und Cytoplasma 1. Aus diesen Werten wurde dann pro Zeitpunkt und Genotyp der Durchschnitt, sowie der SEM, berechnet.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Zwei unterschiedliche Allele von *tim* exprimieren zwei TIM-Isoformen

3.1.1 Untersuchungen der Linie 21-32

3.1.1.1 Das Protein TIM zeigt auf Westernblots ein anormales Laufverhalten

Die Fliegenlinie 21-32 wurde in ein *P*-Element-Mutagenesecscreen in der vorangegangenen Diplomarbeit isoliert. Das *P*-Element(*pTrap-luc*), mit dem die Mutagenese durchgeführt wurde, trägt als Reporter das *luciferase*-Gen. Messungen der Biolumineszenz der Linie 21-32 ergaben eine rhythmische LUCIFERASE-Aktivität, die unter der Kontrolle der inneren Uhr steht. Untersuchungen des Insertionsortes zeigten, dass das *P*-Element in der Linie 21-32 66 bp vor dem Gen *CG6328* lokalisiert ist. Aufgrund der rhythmischen LUCIFERASE-Aktivität des Reporters wurde vermutet, dass es sich bei *CG6328* um ein *ccg* (*clock controlled gene*) handelt. Messungen der Lokomotoraktivität zeigten zudem eine reduzierte Rhythmik im Lokomotorverhalten der Linie 21-32. Es wurde daher vermutet, dass durch die *P*-Insertion

die Funktion von *CG6328* stark beeinträchtigt wird und das Gen vielleicht eine neue Komponente des molekularen Oszillators darstellen könnte (Landskron, 2002).

Daher sollte zunächst geklärt werden, ob die Insertion des *P*-Elements 66 bp vor dem Gen *CG6328* eine Auswirkung auf die Proteine PER und TIM hat. Dazu wurden Proteinextrakte aus Köpfen der Linie 21-32 auf Westernblots mit Extrakten der Fliegenlinien *y w* und der rotäugigen Linie *X-90* (Kap. 2.2.1) miteinander verglichen. Während bei PER kein Unterschied zwischen 21-32 und *y w* (oder *X-90*) festgestellt werden konnte, zeigte sich bei TIM ein deutlicher Unterschied. Zu den hellen Zeitpunkten ist bei beiden nur eine sehr geringe Proteinmenge nachweisbar. Bei *y w* oder *X-90* ist eine Bande sichtbar, bei der Linie 21-32 jedoch zwei. Eine sehr schwache Bande, die auf einer Höhe mit TIM aus *X-90* läuft (siehe Abb. 3.1, ZT1 und ZT9, bei ZT5 nicht sichtbar), und einer stärkeren Bande, die in der Gelelektrophorese langsamer läuft.

Da sich auch bei dem Protein PER mit zunehmender Phosphorylierung das Laufverhalten in der Gelelektrophorese stark ändert (Edery *et al.*, 1994), wurde dieser Effekt auf eine mögliche Hyperphosphorylierung von TIM zurückgeführt. Das Gen *CG6328* würde demnach die Phosphorylierung von TIM beeinflussen.

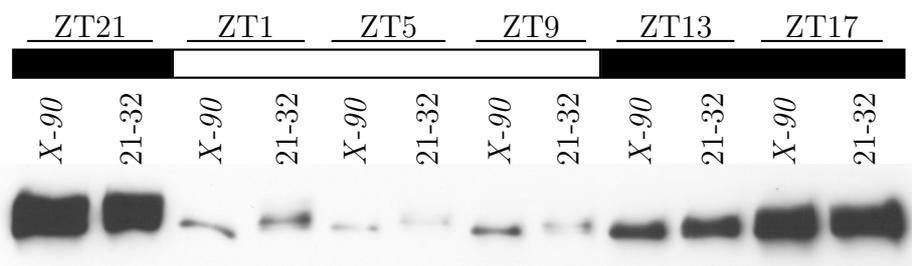


Abbildung 3.1: Anti-TIM Westernblot-Analyse der Linie 21-32 (rotäugig) im Vergleich mit der ebenfalls rotäugigen Linie *X-90*. Die Tiere der Linie 21-32 waren für die *P*-Element-Insertion $P[w^+]^{21-32}$ homozygot.

3.1.1.2 Das Gen *CG6328* beeinflusst TIM nicht

Die Defizienz von *CG6328* zeigt einen anderen Phänotyp, als die *P*-Element-Insertion: Das Gen *CG6328* ist auf dem 3. Chromosom im Bereich 93F2-93F6 lokalisiert. Dieser Abschnitt liegt vollständig im Bereich 93D1-93F8, der im defizienten 3. Chromosom *Df(3R)-4H* deletiert ist. Verursacht die *P*-Insertion vor *CG6328* tatsächlich den beobachteten TIM-Phänotyp, so sollte dieser auch bei Tieren, die diese Defizienz tragen, in ähnlicher Weise beobachtbar sein.

Eine Untersuchung durch Westernblot zeigte jedoch, dass es zwischen der Defizienz und *y w* keinen Unterschied im Laufverhalten von TIM gibt (siehe Abb. 3.2 linke Seite, Spuren eins und fünf). Tiere die das *P*-Insertionschromosom heterozygot, entweder über der Defizienz oder einem Wildtypchromosom tragen, zeigen ebenfalls den Phänotyp: Eine Bande auf der Höhe der TIM-Bande von *y w* oder der Defizienz alleine und eine zweite Bande darüber (siehe Abb. 3.2 linke Seite, Spuren drei und vier). In Kopfextrakten von Tieren, die für das Insertionschromosom homozygot waren, zeigen sich auch zwei Banden, die obere Bande ist jedoch deutlich stärker als die untere Bande (siehe Abb. 3.2 linke Seite, Spur zwei).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das mutante 3. Chromosom für den TIM-Phänotyp verantwortlich ist, da sich dieser Phänotyp auf Westernblots in Kopfextrakten aller Tiere beobachten lässt, die dieses Chromosom tragen. Dieser Effekt ist dominant und auch dosisabhängig, denn er ist bei einem homozygoten Chromosom ausgeprägter. Das Gen *CG6328* scheint jedoch nicht verantwortlich zu sein, da die Defizienz, die dieses Gen deletiert, den gleichen Phänotyp zeigt wie *y w* und *X-90*.

Revertanten der *P*-Element-Insertion zeigen den gleichen Phänotyp wie die Insertion: Um zu testen, ob die *P*-Insertion tatsächlich nicht den beobachteten Phänotyp hervorruft, wurden Revertanten erzeugt, bei de-

nen durch eine Remobilisierung das *P*-Element entfernt wurde, ohne im Insertionsbereich Mutationen zu hinterlassen. Zeigen die Revertanten auch wieder zwei TIM-Banden auf Westernblots, kann eine Beteiligung der *P*-Insertion und damit auch von *CG6328* ausgeschlossen werden.

Durch Remobilisierung des *P*-Elements von 21-32 wurden 127 weißäugige Fliegenlinien erzeugt (siehe Kap. 2.2.3). Sechs der erzeugten Linien waren homozygot letal, die restlichen Linien waren, wie die Ausgangslinie, homozygot steril. Die 121 homozygot sterilen Linien wurden trotz der Sterilität auf präzise *P*-Element-Exzision hin untersucht. In einem ersten Schritt wurden sie dazu in einem Szintillationszähler auf Biolumineszenz getestet. *P*-Elemente werden oft nur teilweise mobilisiert, wobei ein Teil dann am Ausgangsort zurück bleibt. Dieser Test sollte Linien aussortieren, bei denen ein Teil des *P*-Elements mit *luciferase* an der ursprünglichen Stelle zurück blieb. 31 Stämme zeigten noch LUCIFERASE-Aktivität. Bei den verbleibenden Linien wurde der ehemalige Insertionsort mit PCR getestet, wobei ein Primerpaar verwendet wurde, das rechts und links vom Insertionsort bindet. Bei 47 Fliegenlinien ergab sich ein PCR-Produkt, das mit dem wildtypischer Fliegen übereinstimmte. Drei dieser PCR-Produkte wurden sequenziert und bei zweien stand nach der Sequenzanalyse fest, dass es sich bei beiden Tieren um Revertanten handelte. Bei der dritten Linie war ein *P*-Element-Rest von 40 bp am Insertionsort. Für weitere Versuche wurde die Revertante Rev.14 verwendet.

Da sowohl die Revertanten, als auch die Tiere des Ausgangsstammes homozygot steril sind, kann die *P*-Element-Insertion nicht für die Sterilität verantwortlich sein. Es muss also noch eine zweite Mutation auf dem 3. Chromosom der Linie 21-32 geben. Diese Mutation ist wahrscheinlich während der *P*-Element-Mutagenese entstanden.

Ein Vergleich zwischen TIM von *y w*, heterozygoter Revertanten und heterozygoter Tiere der Linie 21-32 zeigt, dass es keinen Unterschied zwischen den

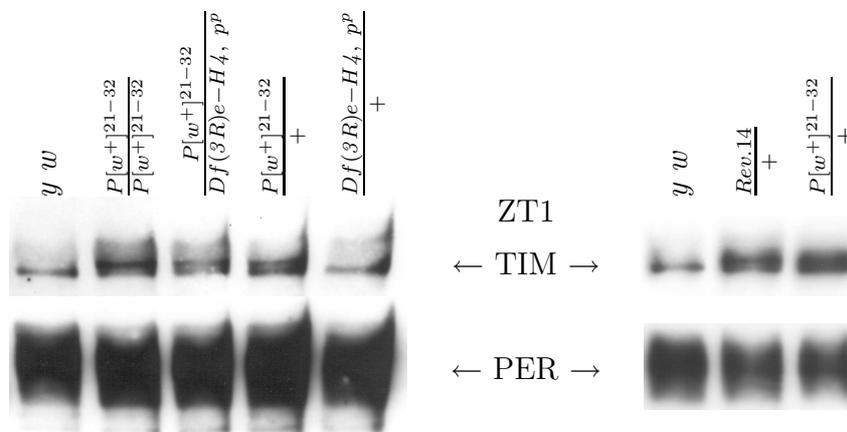


Abbildung 3.2: Westernblotanalyse der Defizienz von *CG6328 Df(3R)-4H* (linke Seite) und der Revertante Rev.14 (rechte Seite) zum Zeitpunkt ZT1. Über den Spuren ist der jeweilige Genotyp angegeben. Anti-TIM-Färbung obere Reihe, Anti-PER untere Reihe. Die Linien Rev.14 und *y w* waren weißäugig, die restlichen Linien rotäugig.

Revertanten und dem ursprünglichen *P*-Element-Stamm gibt. Beide zeigen im Unterschied zu *y w* bei ZT1 zwei TIM-Banden (siehe Abb. 3.2 rechte Seite).

Neben den Untersuchungen der Defizienz zeigen die Westernblots der Revertante deutlich, dass das Gen *CG6328* das Protein TIM nicht beeinflusst. Die Sterilität der Revertanten deutet vielmehr auf eine weitere Mutation hin, die auch diesen Phänotyp verursachen könnte.

3.1.1.3 Der Westernblot-Phänotyp korreliert mit zwei *tim*-Allelen

Eine Sequenzanalyse des *timeless*-Lokus (Chromosom 2) verschiedener Fliegenlinien ergab, dass es zwei natürliche *tim*-Allele gibt, die sich in Bezug auf den Translationsstart unterscheiden (Rosato *et al.*, 1997). *tim* verfügt über zwei potentielle Startmethionine. In einem Allel führt nur das zweite Startcodon zu einem funktionellen TIM-Protein mit 1398 Aminosäuren. Das erste Startmethionin erzeugt ein Protein, das aufgrund eines Stoppcodons vor dem zweiten Startcodon nur 19 Aminosäuren lang ist. Dieses Allel wird

daher *s-tim* genannt (siehe Abb. 3.3 oben). Das zweite Allel trägt einen Baseneinschub zwischen beiden Startcodons der das Leseraster so verschiebt, dass kein Stoppcodon entsteht, und einen C nach A Austausch. In diesem Allel führen beide Translationsstarts zu funktionellen TIM-Proteinen von 1421 Aminosäuren und 1398 Aminosäuren. Dieses Allel trägt daher den Namen *ls-tim* (siehe Abb. 3.3 oben). Es ist bisher jedoch nicht gelungen diese beiden Isoformen des Proteins TIM auf Westernblots zu unterscheiden, oder die Expression beider Formen in *ls-tim* nachzuweisen.

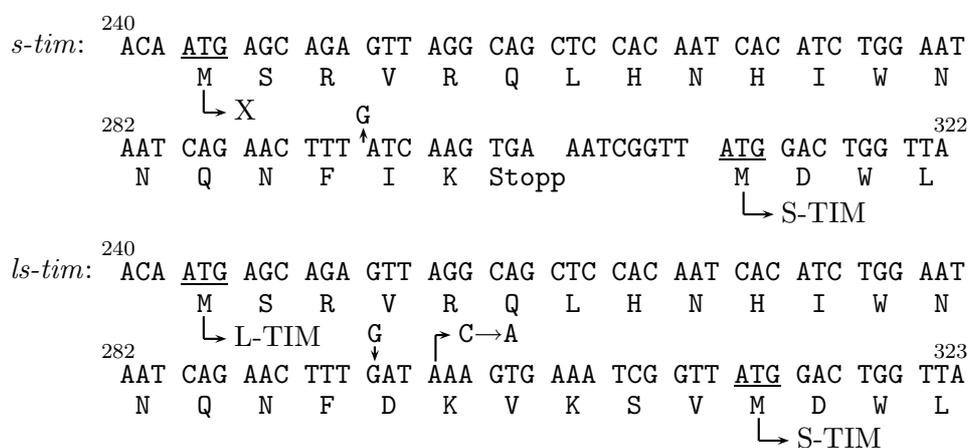


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Transkriptionsstarts in *s-tim* und *ls-tim* (nach Tauber *et al.*, 2007). Dargestellt sind die Basen 240-322 (*s-tim*) und 240-323 (*ls-tim*). Mögliche Startcodons sind unterstrichen. Bei *ls-tim* liegt an der Stelle 294 der Baseneinschub eines G vor, und drei Basen weiter ein C nach A Austausch. Dieser G-Einschub verursacht eine Leserasterverschiebung, durch die ein Stoppcodon, das in *s-tim* noch vorhanden ist, beseitigt wird. In *ls-tim* kann daher von beiden Startcodons ein funktionelles TIM translatiert werden. X: Das erste Startcodon führt bei *s-tim* zu einem Protein von nur 19 Aminosäuren.

Eine Sequenzanalyse dieses DNA-Bereichs der im Westernblot getesteten Fliegenlinien ergab, dass *y w*, *X-90* und *Df(3R)-4H* auf dem 2. Chromosom homozygot das *s-tim*-Allel tragen, während die Linie 21-32, sowie die Revertante Rev.14 homozygot für das *ls-tim*-Allel sind. Die zwei unterschiedlichen Banden auf den Westernblots sind also wahrscheinlich nicht auf die noch

zusätzlich auf dem Insertionschromosom der Linie 21-32 vorhandene Mutation zurückzuführen. Sie spiegeln vielmehr die Expression zweier natürlicher Isoformen von TIM wieder, S-TIM und L-TIM. Das Allel *ls-tim* scheint dabei hauptsächlich die lange Variante L-TIM zu exprimieren.

Die Sequenzierung weiterer Laborlinien zeigte, dass *CantonS*, *y w* ; $\frac{H}{TM3}$ und *y w* ; *Ki* $\Delta 2-3$ homozygot für das Allel *ls-tim* sind.

3.1.2 Phosphorylierung ist nicht die Ursache der zwei TIM-Banden

Falls es sich tatsächlich um die Expression der beiden natürlichen Isoformen handelt, sollte ein Westernblot mit Proteinextrakten der Wildtyp Linie *CantonS* genau wie bei 21-32 zwei Banden ergeben. Eine Dephosphorylierung der Proteinextrakte vor der SDS-Gelelektrophorese sollte darüberhinaus das Bandenmuster nicht grundlegend verändern.

Tatsächlich zeigen $\frac{ls-tim}{ls-tim}$ -Tiere (*CantonS*) den gleichen Phänotyp wie 21-32 und $\frac{s-tim}{ls-tim}$ Tiere (eine Kreuzung aus *y w* und *CantonS*) einen vergleichbaren Phänotyp wie ein heterozygotes $P[w^+]^{21-32}$ -Chromosom (siehe Abb. 3.4 Spuren 11 und 12). Die Behandlung mit λ -Protein-Phosphatase (λ -PPase) hat nur einen geringen Einfluss auf das Erscheinungsbild der TIM-Banden (vgl. 3.4 Spuren 7, 8, 9 mit 10, 11 und 12). Die λ -PPase verändert deutlich die TIM-Phosphorylierung: Bei Spur 8 und 9 ist, im Vergleich zu 11 und 12, kein Schmier sichtbar, der durch Phosphorylierung entsteht. Die Stärke der Banden 8 und 9 deutet aber darauf hin, dass es sich jeweils um zwei Banden handelt, die nicht vollständig aufgetrennt wurden. Dagegen ist der Effekt der λ -PPase auf PER bei ZT1 gravierend. Zwischen phosphoryliertem und dephosphoryliertem PER besteht ein deutlicher Unterschied in der Laufhöhe der Proteine (Edery *et al.*, 1994).

Die zwei unterschiedlichen TIM-Banden, die auf Westernblots sichtbar sind,

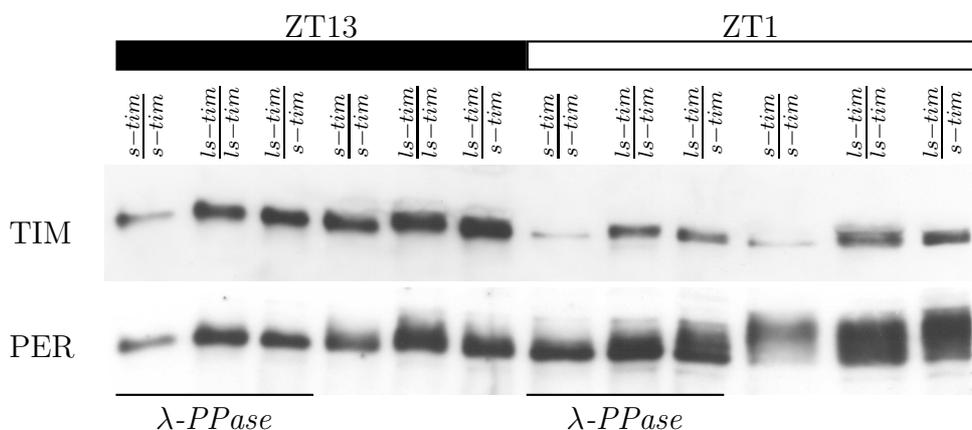


Abbildung 3.4: Vergleich der beiden TIM-Isoformen LS-TIM und S-TIM auf Westernblots vor und nach einer Phosphatasebehandlung der Proteinextrakte. $\frac{s-tim}{s-tim}$ (weißäugig): $y w$, $\frac{ls-tim}{ls-tim}$ (rotäugig): *CantonS*, $\frac{ls-tim}{s-tim}$ (rotäugig): Kreuzung aus $y w$ und *CantonS*, λ -PPase: λ -Protein-Phosphatase (NEB). Die PER-Färbung dient als Kontrolle für die Dephosphorylierung.

sind somit nicht das Produkt einer geänderten Phosphorylierung, die durch eine Mutation auf Chromosom 3 verursacht wird, sondern die zwei Isoformen S-TIM und L-TIM. Diese Formen unterscheiden sich in ihrer Länge nur um 23 Aminosäuren, was dazu führt, dass man diesen Unterschied nur zwischen ZT1 und ZT12, während der Lichtphase, sehen kann, da sonst die Proteinmenge so hoch ist, dass nur eine starke Bande sichtbar ist.

3.1.3 Untersuchung verschiedener wildtypischer und transgener Fliegenlinien in Hinblick auf die Expression der TIM-Isoformen

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kyriacou von der Universität Leicester (England), der sich mit der Evolution dieser beiden *timeless*-Allele beschäftigt, wurden verschiedene Fliegenstämme in Hinblick auf die Expression von S-TIM und L-TIM untersucht. Zunächst

wurden in einem Blindtest verschiedene Wildtypstämme (*GAB*, *ATDD*, *Nov75* und *B16*, Kap. 2.2.1) untersucht. Anhand der TIM-Färbung auf Westernblots von Kopfextrakten dieser Linien konnte der *tim*-Genotyp dieser Linien bestimmt werden (siehe Abb. 3.5 oberer Blot ZT1). Die TIM-Banden von *GAB* und *Nov75* setzen sich aus S-TIM und L-TIM zusammen, wodurch sie sich deutlich von *ATDD* und *B16* unterscheiden, die nur S-TIM exprimieren. Die Linien *GAB* und *Nov75* tragen also das *ls-tim*-Allel und die Linien *ATDD* und *B16* das Allel *s-tim*.

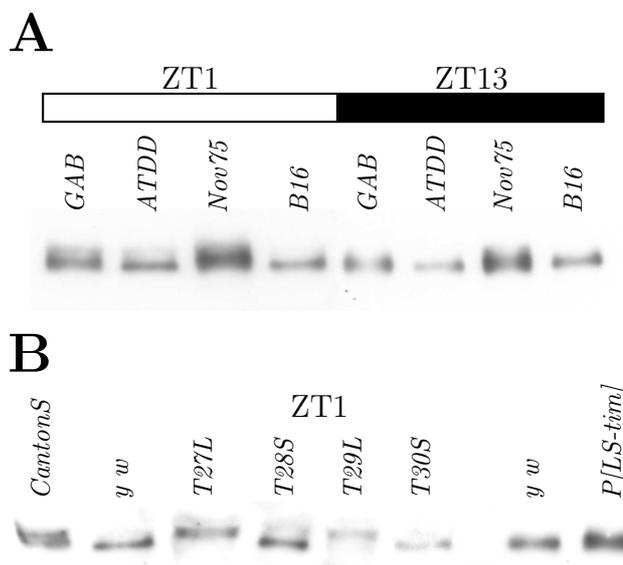


Abbildung 3.5: Anti-TIM-Western wildtypischer Stämme und *tim*-Transformanten. **A:** Kopfextrakte verschiedener wildtypischer Linien bei ZT1 (30 Köpfe) und ZT13 (15 Köpfe). **B:** Extrakte von *tim*-Transformanten im Vergleich zu *CantonS* (*ls-tim*) und *y w* (*s-tim*) bei ZT1. Alle Tiere außer *y w* waren rotäugig.

Außerdem wurden transgene Fliegenlinien untersucht, die im genetischen Hintergrund von *y w ; tim⁰¹* *P*-Elemente mit verschiedenen *tim*-Allelen tragen. *P[LS-TIM]* ist ein Fliegenstamm, der ein *P*-Element mit dem *ls-tim*-Allel trägt (Kap. 2.2.1). Dieser Stamm sollte also, wie auch wildtypische *ls-tim*-Tiere, beide Isoformen von TIM exprimieren. Die Stämme *T28S* und *T30S* tragen ein *tim*-Konstrukt, das auf *ls-tim* basiert, bei dem jedoch das erste Startcodon (siehe Abb. 3.3) durch GGG ersetzt wurde. Diese Linien können daher nur S-TIM exprimieren. Die Konstrukte, die die Linien *T27L* und *T29L* tragen, basieren ebenfalls auf *ls-tim*. In diesen Konstrukten wurde jedoch das zweite Startcodon (siehe Abb. 3.3) durch GGG (Glycin) ersetzt.

Eine Translation dieses Allels hat also im Gegensatz zu *ls-tim*, welches beide Isoformen ermöglicht, immer ein L-TIM zur Folge. Für dieses Allel gibt es keine natürliche Entsprechung (Tauber *et al.*, 2007).

Auf Westernblots zeigt sich deutlich, dass die oben beschriebenen Transfromanten die dem Genotyp entsprechenden TIM-Isoformen herstellen. Die Linie *P[LS-TIM]* exprimiert im Gegensatz zu *y w* beide TIM-Isoformen (siehe Abb. 3.5 unten rechts). Die Linien *T28S* und *T30S* exprimieren wie *y w* nur S-TIM und die Linien *T27L* und *T29L* exprimieren im Gegensatz zu *ls-tim* (*CantonS*) nur die lange Isoform L-TIM (siehe Abb. 3.5 unten links, Sandrelli *et al.*, 2007).

Wie Untersuchungen verschiedener *Drosophila*-Populationen aus Afrika und Europa ergaben, ist das Allel *ls-tim* in Europa durch Mutation aus *s-tim* entstanden. Aufgrund eines Selektionsvorteils hat sich *ls-tim* anschließend in Europa verbreitet (siehe Diskussion Kap. 4.1.4, Tauber *et al.*, 2007). Der Nachweis der beiden Isoformen mit Westernblot bildet die Grundlage der Untersuchungen zum Selektionsvorteil von *ls-tim*.

3.2 Herstellung und Untersuchung der *period*-Transformanten

3.2.1 Herstellung der transgenen Fliegenlinien

3.2.1.1 Klonierung der *per*-Konstrukte

Wie oben beschrieben (Kap. 1.6.2.2) zeigte die Aufklärung der 3D-Struktur eines N-terminalen PERIOD-Fragments (Yildiz *et al.*, 2005), dass PER wahrscheinlich als Homodimer vorliegt. Um eine Dimerisierung mit Immunoprecipitation (CoIP) nachweisen zu können, wurden, wie auch in einer früheren Studie (Zeng *et al.*, 1996), zwei Konstrukte kloniert, die rekombinante PER-Proteine exprimieren, die mit TAGs markiert sind. Dazu wurde ein *P*-Element-Transfektionsvektor, basierend auf $pP\{CaSpeR-4\}$, verwendet, die *per*-cDNA unter der Kontrolle des *-1313-34-per*-Promotors exprimiert (Hao *et al.*, 1997 und 1999). Unmittelbar vor das Stoppcodon von *per* wurden zum Einen die Sequenz für einen HA-TAG (Field *et al.*, 1988) und zum Anderen die Sequenz für einen *c-myc*-TAG (Evan *et al.*, 1985) kloniert (*per-HA* und *per-c-myc*, Abb. 3.7). Abbildung 3.6 zeigt die C-Terminale Proteinsequenz des wildtypischen PER-Proteins, sowie die der getagten Proteine.

PER: -EEDQTQHGDG

PER-HA: -EEDQTQHGDV $\frac{\text{HA}}{\text{YPYDVPDYA}}$ YV

PER-C-MYC: -EEDQTQHGDV $\frac{\text{C-MYC}}{\text{EQKLISEEDL}}$ YV

Abbildung 3.6: C-terminale Proteinsequenz des wildtypischen und der rekombinanten PERIOD-Proteine.

Die Struktur des PER-Kristalls offenbarte zu dem auch die möglichen Interaktionspunkte für die Dimerisierung und machte damit den PER:PER-Dimer für genetische Studien zugänglich. Es wurden daher die zuvor klonierten Konstrukte *per-HA* und *per-c-myc* mit Mutationen versehen, die zu Aminosäureaustauschen führen, die den PER:PER-Dimer voraussicht-

lich entweder destabilisieren, oder eine Dimerisierung gänzlich unterbinden (siehe Abb. 3.7). Das Tryptophan W482 wurde durch ein positiv geladenes Glutamat (W482E) ersetzt, um eine Wechselwirkung mit der hydrophoben Tasche zu stören (siehe Abb. 1.6). Eine Schwächung des α F-Interfaces sollte durch zwei verschiedene Austausche bewirkt werden. Einmal durch Zerstörung der Salzbrücke (Arginin 345 \leftrightarrow Glutamat 566) durch den Austausch des positiv geladenen Arginin in ein negativ geladenes Glutamat (R345E). Zum Anderen durch die Einführung einer negativen Ladung an der Position 560 durch den Austausch des neutralen Methionin in ein Aspartat (M560D, siehe Abb. 3.7). Dadurch sollte die hydrophobe Wechselwirkung von Met560 mit Val243 unterbunden werden. Es wurde bewusst nicht, wie in vorangegangenen Studien (Huang *et al.*, 1993 und 1995), das Val243 ausgetauscht. Der Austausch V243D (*per^L*) beeinträchtigt, wie oben beschrieben, auch die Interaktion mit TIM, das M560 liegt jedoch in der C-Domäne (α F-Helix), einem Bereich der außerhalb der beschriebenen TIM-Interaktionspunkte liegt. Diese Mutation bietet also die Möglichkeit, den Effekt der Homodimerisierung getrennt von der Dimerisierung mit TIM zu betrachten.

Die Interaktionsstudien (Huang *et al.*, 1993, 1995), sowie die 3D-Struktur (Yildiz *et al.*, 2005) geben jedoch nur Auskunft über das Verhalten von kleinen PER-Fragmenten. Es kann also keine Aussage darüber getroffen werden, ob zum Beispiel eine Störung der V243-Interaktion auch im vollständigen PERIOD in der Fliege die Dimerisierung verhindert, oder nur abschwächt. Ein doppelmutantes PER, bei dem sowohl die Wechselwirkung mit der hydrophoben Tasche unterbunden (W482E), als auch das α F-Interface mutiert ist (M560D), sollte eine Dimerisierung vollständig unterbinden (siehe Abb. 3.7). Zusätzlich wurde im vorhergesagten Nuclear Export Signal (NES, Vielhaber *et al.*, 2001) das Isoleucin I530 durch ein Alanin ersetzt, um zu untersuchen, ob es sich tatsächlich um ein funktionelles NES handelt.

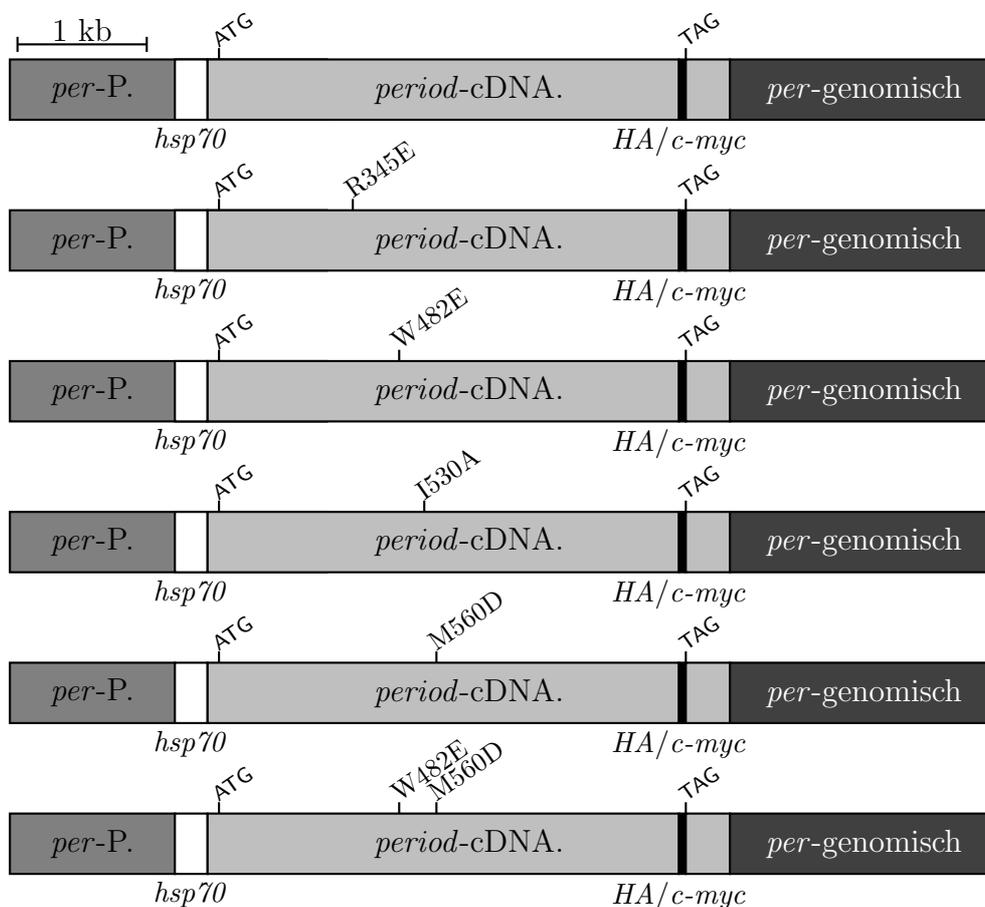


Abbildung 3.7: Struktur der klonierten *per*-Konstrukte. Insgesamt wurden zwölf Konstrukte kloniert, jedes der oben dargestellten sowohl mit einem *HA*-, als auch mit einem *c-myc*-TAG. *per*-P.: *per*-Promotor, *hsp70*: minimaler heatshock-Promotor, ATG: Translationsstart, TAG: Translationsstopp, *per*-genomisch: genomische *per*-Sequenz, die das poly-A-Signal enthält.

3.2.1.2 Erzeugung der *per*-Transformanten

Mit den 12 klonierten *PER*-Konstrukten wurden durch DNA-Mikroinjektion und Keimbahntransformation transgene Fliegenlinien hergestellt. Zur Mikroinjektion wurden *y w*-Embryonen verwendet, die auf dem 3. Chromosom eine Kopie der *P*-Element-Transposase trugen (siehe Kap. 2.2.4). Die dadurch erzeugten transgenen Tiere wurden dann, je nach Insertionsort des

P-Elements, mit *y per*⁰¹ *w*- Balancerstämmen des 2. oder 3. Chromosoms gekreuzt, um genetisch stabile Linien zu erzeugen und um die Konstrukte in den *per*⁰¹-Hintergrund zu bringen. Auf diese Weise wurden 83 transgene Fliegenlinien erzeugt (siehe Tab. 3.1 und A.1), die anstelle des endogenen PER, dessen Gen auf dem *X*-Chromosom lokalisiert ist, rekombinate Proteine exprimieren.

Nº	Genotyp	n Linien
1	<i>per-HA</i>	10
2	<i>per-c-myc</i>	8
3	<i>per-R345E-HA</i>	9
4	<i>per-R345E-c-myc</i>	5
5	<i>per-W482E-HA</i>	2
6	<i>per-W482E-c-myc</i>	6
7	<i>per-I530A-HA</i>	8
8	<i>per-I530A-c-myc</i>	7
9	<i>per-M560D-HA</i>	7
10	<i>per-M560D-c-myc</i>	3
11	<i>per-W482E-M560D-HA</i>	10
12	<i>per-W482E-M560D-c-myc</i>	8

Tabelle 3.1: Übersichtstabelle der Transformanten der *per*-Konstrukte. Eine ausführliche Tabelle befindet sich im Anhang (Tab.: A.1). Alle Konstrukte sind im genetischen Hintergrund von *y per*⁰¹ *w*.

3.2.2 Analyse der rekombinanten PER-Proteine mit Westernblot

3.2.2.1 Die Transformanten zeigen unterschiedliche Expressionslevel von PER

Der Vergleich der gebildeten PERIOD-Menge in Fliegenköpfen der Transformanten durch Westernblotanalysen ergab, dass die einzelnen Konstrukte unterschiedliche Mengen an PER exprimieren. Für jedes transfizierte Konstrukt

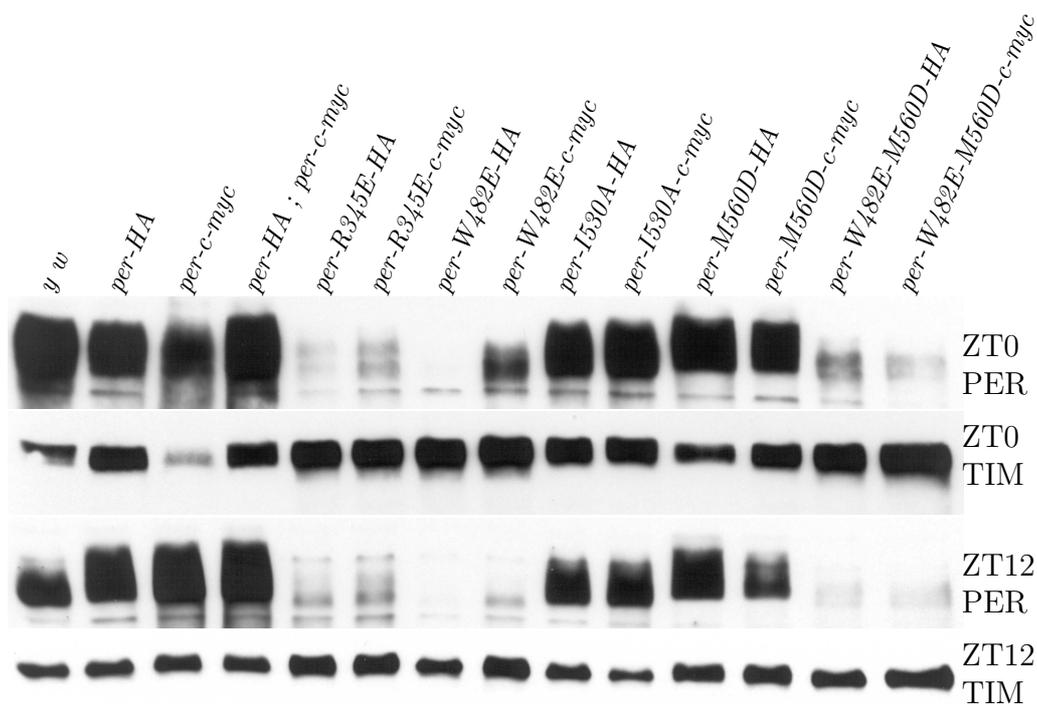


Abbildung 3.8: Westernblot der *per*-Transformanten mit Anti-PER und Anti-TIM-Färbung zu den Zeitpunkten ZT0 (oben) und ZT12 (unten). Die Proteinextrakte wurden aus 50 Fliegenköpfen hergestellt. Als *per*⁺-Kontrolle wurde *y w* verwendet. Die Beschriftung bezieht sich, mit Ausnahme von *y w*, auf den Genotyp des *per*-Konstruktes. Alle Konstrukte befinden sich im genetischen Hintergrund von *per*⁰¹. Die Spur *per-c-myc* bei ZT0 zeigt Anzeichen von Proteindegradation, welche wahrscheinlich bei der Proteinextraktion auftrat. Fliegenlinien: *per-HA* 1-5-2, *per-c-myc* 2-2-2, *per-HA ; per-c-myc* siehe Kap.: 2.2.5, *per-R345E-HA* 3-4, *per-R345E-c-myc* 4-4, *per-W482E-HA* 5-2, *per-W482E-c-myc* 6-2, *per-I530A-HA* 7-3, *per-I530A-c-myc* 8-1, *per-M560D-HA* 9-4-2, *per-M560D-c-myc* 10-2-2, *per-W482E-M560D-HA* 11-6, *per-W482E-M560D-c-myc* 12-1.

wurden Westernblots mit mehreren unabhängigen Fliegenlinien durchgeführt. Insgesamt wurden mit 43 Fliegenlinien Westernblotexperimente durchgeführt (siehe Tab. A.1). Die beobachteten PER-Mengen waren, unabhängig von *HA*- oder *c-myc*-TAG, für die jeweiligen Aminosäureaustausche in PER vergleichbar (Abb. 3.8 zeigt PER- und TIM-Färbungen von je einer Fliegenlinie pro Konstrukt). Die Stärke der PER-Expression hängt also nicht von

der jeweiligen Fliegenlinie, also dem Insertionsort des Konstruktes ab, sondern korreliert mit dem Aminosäureaustausch in PER.

Die Konstrukte für PER ohne Basenaustausch, sowie PER-I530A und PER-M560D stellen in etwa vergleichbare Mengen des PER-Proteins her wie wildtypische Fliegen (siehe Abb. 3.8). Die anderen Aminosäureaustausche haben einen drastischen Effekt auf die PER-Menge. Bei Linien mit den rekombinanten PER-Proteinen PER-R345E, PER-W482E und der Doppelmutante PER-W482E-M560D kommt es zu fast keiner Akkumulation des PER-Proteins. Den stärksten Effekt mit der geringsten PER-Menge zeigen W482E und W482E-M560D. Da der Austausch M560D allein keinen so signifikanten Einfluss auf die PER-Menge hat, und die PER-Mengen von W482E und W482E-M560D etwa gleich gering sind, ist hauptsächlich W482E für diesen Effekt verantwortlich.

Die zeitlichen Schwankungen der TIMELESS-Proteinmenge scheinen von den Mutationen in PER nicht betroffen zu sein. Dies verdeutlicht, dass TIM auch ohne PER stabil ist (Myers *et al.*, 1996). Die Menge zum Zeitpunkt ZT0 ist immer höher, als zu ZT12. Jedoch scheint die Menge von TIM mit der PER-Menge in einer Korrelation zu stehen. Bei Fliegenlinien mit schwacher PER-Expression kommt es bei beiden Zeitpunkten zu einer erhöhten TIM-Menge, wahrscheinlich aufgrund einer schwächeren transkriptionellen Repression.

3.2.2.2 Zeitliche Analyse der PER-Expression

In wildtypischen Fliegen unterliegt das PERIOD-Protein in LD einer tageszeitlichen Schwankung in der Proteinmenge und der Phosphorylierung (Edery *et al.*, 1994). Die Neubildung von PER in wildtypischen Fliegen, wie z.B. *y w*, beginnt zum Zeitpunkt ZT8 (siehe Abb. 3.9 unterer Pfeil). Zu diesem Zeitpunkt sind jedoch auch noch kleine Mengen von PER aus dem vorangegangenen Zyklus vorhanden. Dieses „alte“ PER ist durch starke Phosphorylierung für den Abbau markiert und wandert daher während

der Gelektrophorese langsamer (siehe Abb. 3.9 oberer Pfeil). Bei ZT12 ist das „alte“ PER vollständig abgebaut und es ist nur noch neugebildetes PER sichtbar. Durch eine fortlaufende Bildung akkumuliert PER und wird durch die Kinasen DBT (Kloss *et al.*, 1998) und CK2 (Lin *et al.*, 2005) phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist wichtig für die Lokalisation im Zellkern und die Repression (Bao *et al.*, 2001), der steigende Grad an Phosphorylierung markiert PER jedoch auch für den Abbau (Price *et al.*, 1998). Ab ZT0 kann auf dem Westernblot keine Neubildung mehr erkannt werden, zu diesem Zeitpunkt ist auch das Minimum der *per*-mRNA-Expression (Hardin *et al.*, 1990). Ab ZT4 erreicht die Phosphorylierung ein Maximum und eine Abnahme der Proteinmenge ist deutlich sichtbar (siehe Abb. 3.9).

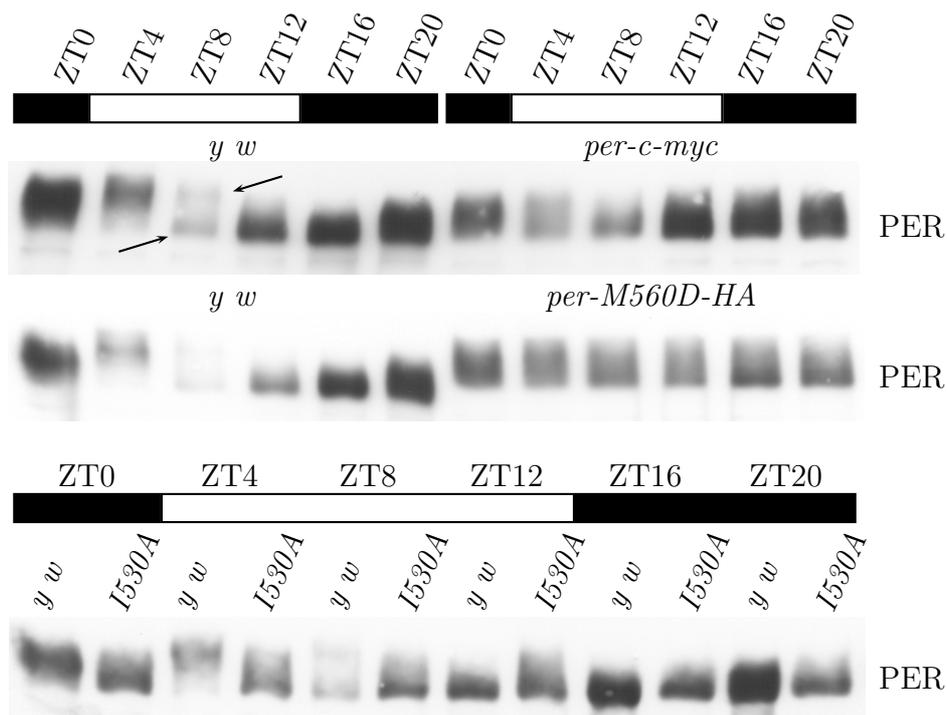


Abbildung 3.9: Zeitliche Analyse der PERIOD-Expression in den Transformanten mit *per*-Konstrukt ohne Aminosäureaustausch (*per-c-myc* 2-2-2) und mit den Austauschen M560D (*per-M560D-HA* 9-4-2) und I530A (*per-I530A-HA* 7-1) im Vergleich mit *y w*. Proteinextraktion aus je 35 Köpfen, Färbung mit Anti-PER.

Einem ähnlichen Zyklus aus Proteinneubildung, Phosphorylierung und Abbau unterliegen die PER-Proteine in den Transformanten *per-HA* und *per-c-myc*. Der Zyklus erscheint jedoch im Vergleich zu *y w* nach vorne verschoben. Die Neubildung ist bereits bei ZT4 sichtbar. Bereits bei ZT8 ist nur neugebildetes PER sichtbar. Auch Phosphorylierung und Abbau beginnen früher als im Wildtyp (siehe Abb. 3.9, obere Reihe). Diese Verschiebung der PER-Oszillation nach vorne hat jedoch keine Auswirkung auf die Periodenlänge des Lokomotorverhaltens (siehe Tab. 3.3 und Abb. 3.19). Die Periodenlänge im Freilauf liegt sowohl bei *per-c-myc*-Tieren als auch *y w* bei $\sim 23,5$ h. Ein weiterer Effekt zeigt sich in der Phosphorylierung. Diese ist nicht so stark im Vergleich zu *y w*.

Bei PER-M560D ist nur noch eine sehr schwache zeitliche Veränderung in Menge und in Phosphorylierung sichtbar (siehe Abb. 3.9, mittlere Reihe). Das Protein läuft jedoch generell deutlich langsamer im Gel im Vergleich zu *y w*. Dies kann eine Folge des TAGs sein, eher aber liegt das Protein immer in einer phosphorylierten Form vor. Die Neubildung beginnt wahrscheinlich wie beim Wildtyp bei ZT8, es findet jedoch keine so starke Akkumulation statt. Der Abbau der Proteine scheint stark verzögert, denn auch zu den Zeitpunkten ZT12 und ZT16 sind noch sichtbare Mengen an stark phosphorylierten PER vorhanden. Erst bei ZT20 ist das „alte“ PER größtenteils abgebaut.

Einen vergleichbaren Phänotyp zeigen Fliegen, deren PER den Austausch I530A trägt. Die Neubildung von PER beginnt wahrscheinlich verzögert, zwischen ZT0 und ZT4. Die Phosphorylierung ist noch schwächer als bei M560D und zu den Zeitpunkten ZT0, ZT4 und ZT8 erkennbar. Die Proteinmenge scheint über den gesamten Zyklus relativ konstant zu sein (Abb. 3.9, untere Reihe).

Diesen Phänotyp aus Hypophosphorylierung, sowie einer verringerten Amplitude der zeitlichen Schwankung der PER-Menge, zeigt auch PER- Δ C2. Die-

sem Protein fehlen die Aminosäuren 515-568, also der Bereich, in dem auch die Aminosäuren M560 und I530 lokalisiert sind (Schotland *et al.*, 2000).

3.2.3 Quantifizierung der mRNA der *per*-Konstrukte ausgewählter Transformanten

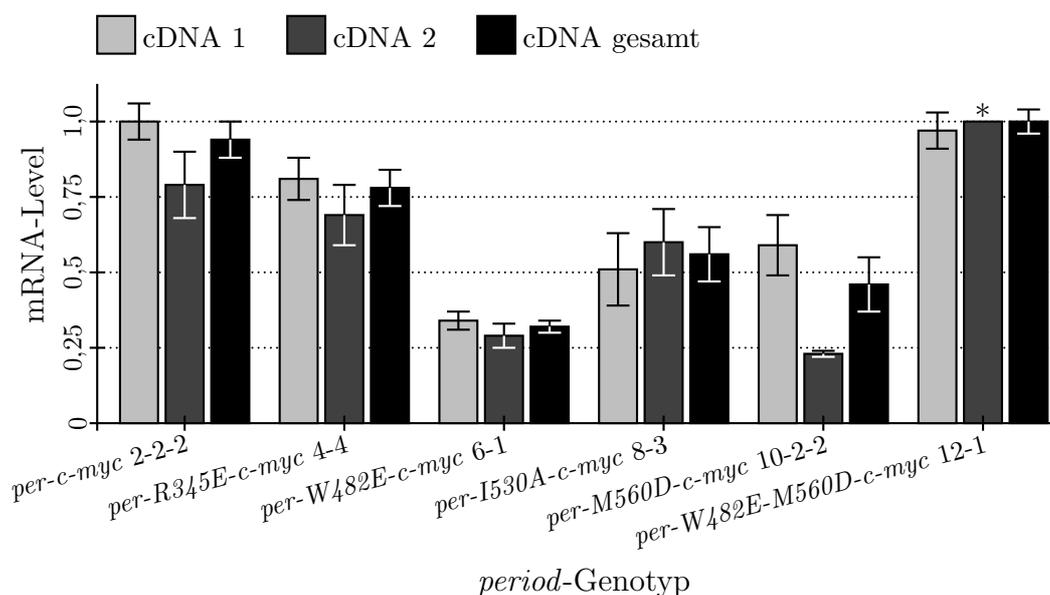


Abbildung 3.10: *per*-Expressionslevel ausgewählter *per*-Transformanten zum Zeitpunkt ZT15. Je zwei unabhängige RNA-Präparationen wurden in cDNA umgeschrieben (cDNA 1 und cDNA 2) und in je 3 LightCycler-Läufen untersucht, unter Verwendung zwei verschiedener Primer gegen das 3'-Ende der *per*-mRNA und eines Antisenseprimers gegen *c-myc*. Nachdem die Ergebnisse anhand des jeweils höchsten Wertes eines LightCycler-Laufes normalisiert wurden, wurden Durchschnitt und SEM berechnet. *: Höchster Wert in 3 LightCycler-Experimenten.

Die Westernblotanalysen der Transformanten ergaben, dass die PER-Level der Fliegenlinien stark schwanken, und dass diese Schwankungen mit den einzelnen Konstrukten, und nicht mit deren chromosomalem Insertionsort, korrelieren. Es wäre also durchaus denkbar, dass eine gestörte mRNA-Tran-

skription einiger Konstrukte für diese Variabilität verantwortlich ist. Daher wurden von sechs ausgewählten Fliegenlinien (je Konstrukt eine Linie mit *c-myc*-TAG) die *per*-mRNA zum Zeitpunkt ZT15 nach reverser Transkription mit Realtime-PCR in einem LightCycler gemessen (Kap. 2.1.6). Da das *X*-chromosomale *per*-Gen auch in *per⁰¹* transkribiert wird (aber aufgrund eines Stoppcodons kein Protein mehr bilden kann), wurde ein Primer gegen die Sequenz des *c-myc*-TAGs verwendet, die im endogenen *per*-Gen nicht vorkommt. So wurde sichergestellt, dass nur Konstrukt-cDNA in die Messung einging.

Die relativen Transkriptionslevel der unterschiedlichen Fliegenlinien schwanken erheblich, bis zu einem Faktor von ~ 4 . Diese Schwankung korreliert jedoch nicht mit den Schwankungen der Proteinmengen, die auf den Westernblots beobachtet wurden. Am deutlichsten zeigt dies ein Vergleich von *per-c-myc* und *per-W482E-M560D-c-myc*. Beide zeigen eine relative Transkriptionsrate von ~ 1 (siehe Abb. 3.10), aber während *per-c-myc* eine ungefähr wildtypische Menge an PER-Protein herstellt, ist bei *per-W482E-M560D-c-myc* das PER-Protein kaum nachweisbar (siehe Abb. 3.8). Dies trifft auch für die anderen Genotypen zu. *per-R345E-myc* hat eine relative mRNA-Menge von $\sim 0,8$ und *per-W482E-c-myc* von $\sim 0,3$, beide exprimieren jedoch nur geringe Mengen PER. Die Werte von *per-I530A-c-myc* und *per-M560D-c-myc* bewegen sich um $\sim 0,5$, aber beide Linien haben im Vergleich zu *y w* nur eine leicht verringerte Proteinmenge. Unterschiedliche mRNA-Level tragen demnach nicht erheblich zu den stark variierenden Proteinleveln bei. Letztere beruhen wahrscheinlich auf unterschiedlicher Stabilität der Proteine.

3.2.4 Untersuchung der Dimerisierung von PER – gegenseitige Beeinflussung verschiedener PER-Varianten untereinander

Die Proteinmenge der Transformanten schwankt erheblich. Wie eine Gegenüberstellung der mRNA- und der Proteinmenge ergab, ist dies auf die unterschiedlichen Aminosäureaustausche zurückzuführen, die eine unterschiedliche Destabilisierung verursachen. Da PER in der Lage ist, einen Homodimer zu bilden, wurde untersucht, ob ein PER ohne Basenaustausch in der Lage ist, ein PER mit Basenaustausch zu stabilisieren, oder ob umgekehrt ein mutantes PER destabilisierend auf ein PER ohne Austausch einwirkt. Es wurden daher verschiedene mutante *per-c-myc*-Linien mit *per-HA* ohne Austausch gekreuzt, und umgekehrt. Die Nachkommen dieser Kreuzungen wurden dann mit Westernblots in Hinblick auf Gesamt-PER-Menge und PER-HA- bzw. PER-C-MYC-Menge untersucht.

Es zeigte sich dabei, dass durch Einkreuzung einer Kopie eines *c-myc*-getagten Konstruktes, egal ob mit Basenaustausch oder ohne, die PER-HA-Menge meistens sinkt, während die Gesamtproteinmenge gleich bleibt, oder im Fall von *per-c-myc* steigt (Abb. 3.11 A und B HA-Färbung Spuren $\frac{HA}{+}$, $\frac{c-myc}{HA}$). Einzig doppelmutantes *per-W482E-M560D-c-myc* scheint keinen negativen Einfluss auf die PER-HA-Menge zu haben (Abb. 3.11 A).

Umgekehrt scheint dies nicht der Fall zu sein. Die Expression von PER-C-MYC scheint durch das Vorhandensein verschiedener PER-HA-Varianten mit und ohne Austausch nicht beeinflussbar (Abb. 3.11 B). Nur in den Spuren *c-myc* mit *per-R345E-HA* und *per-W482E-HA* scheint es zu einer leichten Erhöhung der PER-C-MYC-Menge zu kommen.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass es weder zu einer Destabilisierung durch mutantes PER, noch zu einer Stabilisierung durch PER ohne Basenaustausch kommt. Dieses Ergebnis gibt keinen Hinweis auf eine

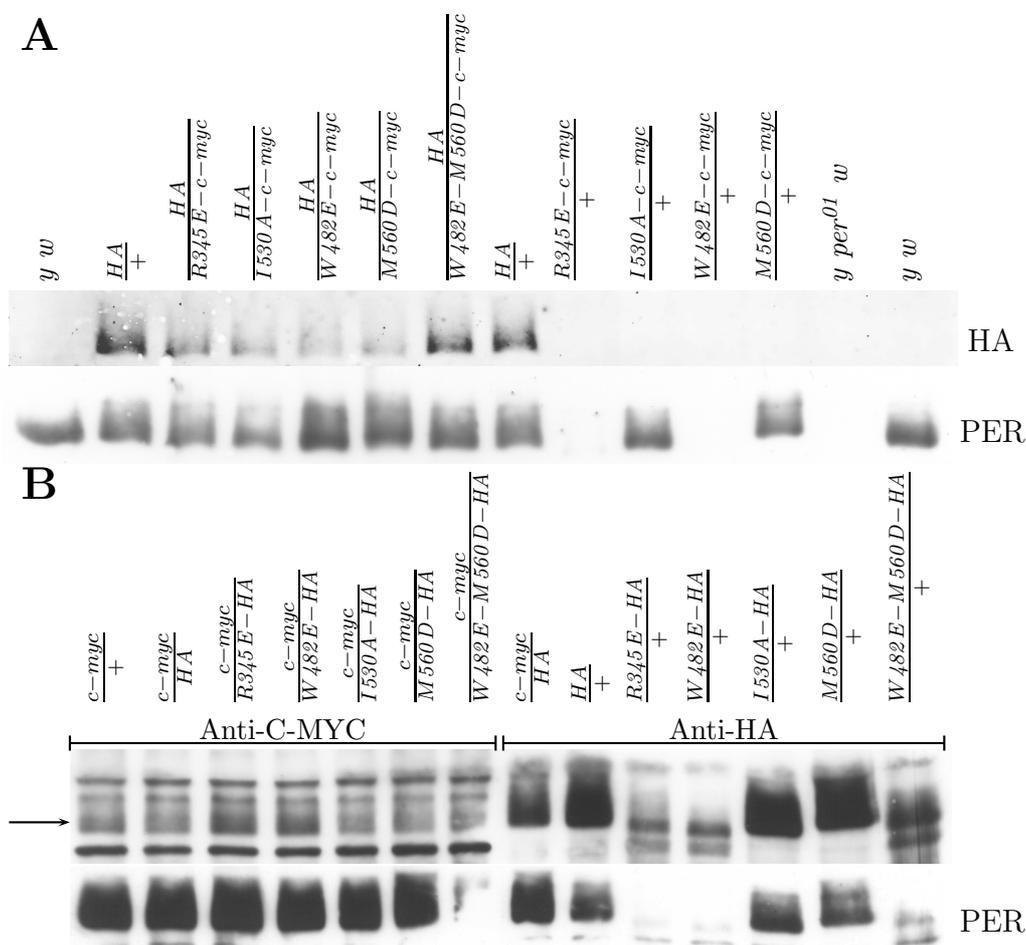


Abbildung 3.11: Westernblots zur Untersuchung einer gegenseitigen Beeinflussung von PER ohne und mit Aminosäureaustausch. Über den Spuren ist der Genotyp in Bezug auf die *per*-Konstrukte angegeben. A: Der Einfluss verschiedener PER-C-MYC auf PER-HA ohne Basenaustausch. Fliegenlinien: *per-HA* 1-11, *per-R345E-c-myc* 4-4, *per-W482E-c-myc* 6-5, *per-I530A-c-myc* 8-1, *per-M560D-c-myc* 10-2-2, *per-W482E-M560D-c-myc* 12-1. B: Der Einfluss verschiedener PER-HA auf PER-C-MYC ohne Austausch. Die Laufhöhe von PER in der C-MYC-Färbung ist durch den Pfeil markiert. Fliegenlinien: *per-HA* 1-5-2, *per-c-myc* 2-2-2, *per-R345E-HA* 3-2, *per-W482E-HA* 5-2, *per-I530A-HA* 7-3, *per-M560D-HA* 9-4-2, *per-W482E-M560D-HA* 11-4-2.

mögliche Dimerisierung zwischen mutanten PER und PER ohne Austausch. Entweder diese Dimerisierung findet nicht statt, oder sie hat keinen Einfluss auf die Stabilität. Jedoch scheint die Art des TAGs eine gewisse Rolle zu

spielen. Werden sowohl HA- als auch C-MYC-getagte PER-Proteine gleichzeitig exprimiert, kann es zu einer relativen Erhöhung der C-MYC-getagten Proteine auf Kosten der HA-getagten Proteine kommen.

3.2.5 Untersuchung der Dimerisierung von PER mit CoIP

3.2.5.1 Die Proteinmenge in Tieren mit jeweils einer Kopie der Konstrukte ist zu gering für die CoIP

Aufgrund der starken Schwankungen des PERIOD-Proteinlevels der unterschiedlichen Transformanten war eine Untersuchung der Homodimerisierung nur mit Transformanten der Konstrukte ohne Basenaustausch und mit Basenaustausch M560D möglich. Bei den Linien mit R345E, W482E und der Doppelmutante W482E-M560D ist die PER-Menge zu gering, da die Coimmunopräzipitation (CoIP) auf sehr große Mengen an Protein angewiesen ist. Zur Durchführung der CoIP werden Tiere benötigt, die sowohl ein HA- als auch C-MYC-getagtes PERIOD-Protein exprimieren. Dazu wurden zunächst die Nachkommen einer einfachen Kreuzung zwischen homozygoten *per-HA* (Linie 1-5-2) und *per-c-myc*-Tieren (Linie 2-2-2) verwendet.

Die Homodimerisierung von PER wurde zum Zeitpunkt ZT20 mit CoIP untersucht, da zu diesem Zeitpunkt die PER-Menge hoch ist, und eine Dimerisierung außerdem bereits in einer älteren Studie gezeigt wurde (Zeng *et al.*, 1996). Die CoIP wurde mit Anti-C-MYC-Beads durchgeführt, wodurch PER-C-MYC während der CoIP an die Beads gebunden wurde. Auf eine mögliche Homodimerisierung von PER wurde dann im Westernblot durch die Färbung mit einem HA-Antikörper getestet.

Die CoIP ergab jedoch keine Homodimerisierung von PER (siehe Abb. 3.12). In der Spur *HA/c-myc*-Beads der HA-Färbung ist auf dem Westernblot kein Signal, d.h. ein an PER-C-MYC gebundenes PER-HA konnte nicht nach-

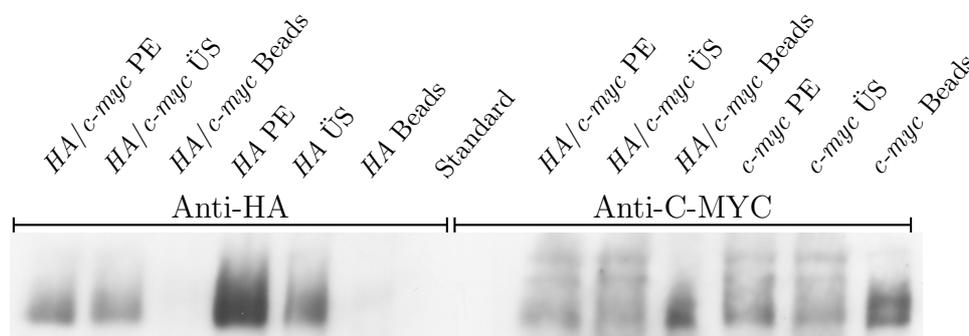


Abbildung 3.12: Westernblot eines CoIP-Experimentes mit Extrakten von Tieren, die jeweils nur eine Kopie der Konstrukte *per-HA* und *per-c-myc* trugen. Die CoIP wurde mit Anti-C-MYC-Beads durchgeführt, auf Dimerisierung wurde mit Anti-HA-Färbung getestet. Über den Spuren ist in kursiver Schrift der jeweilige Genotyp in Bezug auf den TAG angegeben. PE: Proteinextraktion, ÜS: Überstand nach der Beadinkubation, Beads: Anti-C-MYC-Beads.

gewiesen werden. Die Spuren *HA/c-myc*-Beads und *c-myc*-Beads in der C-MYC-Färbung zeigen jedoch ein deutliches Signal. Dies weist daraufhin, dass eine große Menge von PER-C-MYC an die Anti-C-MYC-Beads gebunden hat. Da eine Homodimerisierung auf eine vergleichbare Weise schon gezeigt worden ist, und da PER-C-MYC den Antikörper in der CoIP offensichtlich gut bindet, war in diesem Fall vermutlich die eingesetzte Proteinmenge für den Nachweis der Homodimerisierung zu gering.

3.2.5.2 Herstellung doppelt homozygoter Transformanten

Da die CoIP mit Tieren, die von jedem Konstrukt nur eine Kopie tragen, keine Homodimerisierung von PER zeigte, wurden zur Erhöhung der Proteinmengen doppelt homozygote Tiere hergestellt. Diese Tiere tragen beide Konstrukte, jedes davon jeweils homozygot auf einem Chromosom. Zur Untersuchung der Dimerisierung von PER ohne Basenaustausch wurde ein solcher Stamm aus den Linien 1-5-2 (*per-HA*) und 2-2-2 (*per-c-myc*) hergestellt. Bei *per-M560D-c-myc* war durch die Injektion kein homozygot lebensfähiger

Stamm, außer der Linie 10-2-2 mit einer Insertion auf Chromosom 4, entstanden. Das *P*-Element dieser Linie wurde daher auf das 2. Chromosom mobilisiert. Insgesamt wurden 11 Linien mit einer Insertion auf Chromosom 2 erzeugt (Kap. 2.2.5.1). 9 dieser Linien sind homozygot lebensfähig und fertil, 2 Linien sind homozygot letal. Zur Herstellung der doppelt homozygoten Linie für die CoIP wurden die Linie J5 (*per-M560D-c-myc*) und 9-8 (*per-M560D-HA*) verwendet.

3.2.5.3 PER interagiert mit sich und TIM

Wie schon bei den Tieren mit nur jeweils einer Kopie der Konstrukte, wurde die CoIP mit den Extrakten aus doppelt homozygoten Tieren zum Zeitpunkt ZT20 durchgeführt. Wiederum wurden Anti-C-MYC-Beads verwendet. Der Test auf mögliche Dimerisierungen fand sowohl mit einem HA-, als auch einem TIM-Antikörper statt.

Die CoIP zeigt deutlich, dass PER bei ZT20 teilweise als Homodimer vorliegt (siehe Abb. 3.13, oberste Reihe HA-Färbung, *HA/c-myc* Beads) und gleichzeitig mit dem Protein TIM dimerisiert (Abb. 3.13, zweite Reihe, *HA/c-myc* Beads und *c-myc* Beads). Sowohl die HA-, als auch die TIM-Färbung zeigt eine deutliche Bande. Bei diesen Banden handelt es sich eindeutig um copräzipitierte Proteine, da weder der HA-TAG noch TIM in der Lage sind an die Anti-C-MYC-Beads zu binden (siehe Abb. 3.13 Spur 6). Weder der HA-, noch der TIM-Antikörper erkennt nach der CoIP ein Protein auf dem Westernblot, wenn die Tiere nur PER-HA exprimierten.

Im Überstand nach der Beadinkubation (Abb. 3.13, obere Reihe HA-Färbung, *HA/c-myc* ÜS) befindet sich noch eine relativ große Menge von PER-HA und auch TIM. Zum Einen kann die CoIP nur einen Teil der Proteine binden, zum Anderen kommt es bei der Homodimerisierung von PER nicht nur zu nachweisbaren gemischten Homodimeren (PER-HA:PER-C-MYC), sondern auch zu PER-HA:PER-HA und PER-C-MYC:PER-C-MYC. PER-

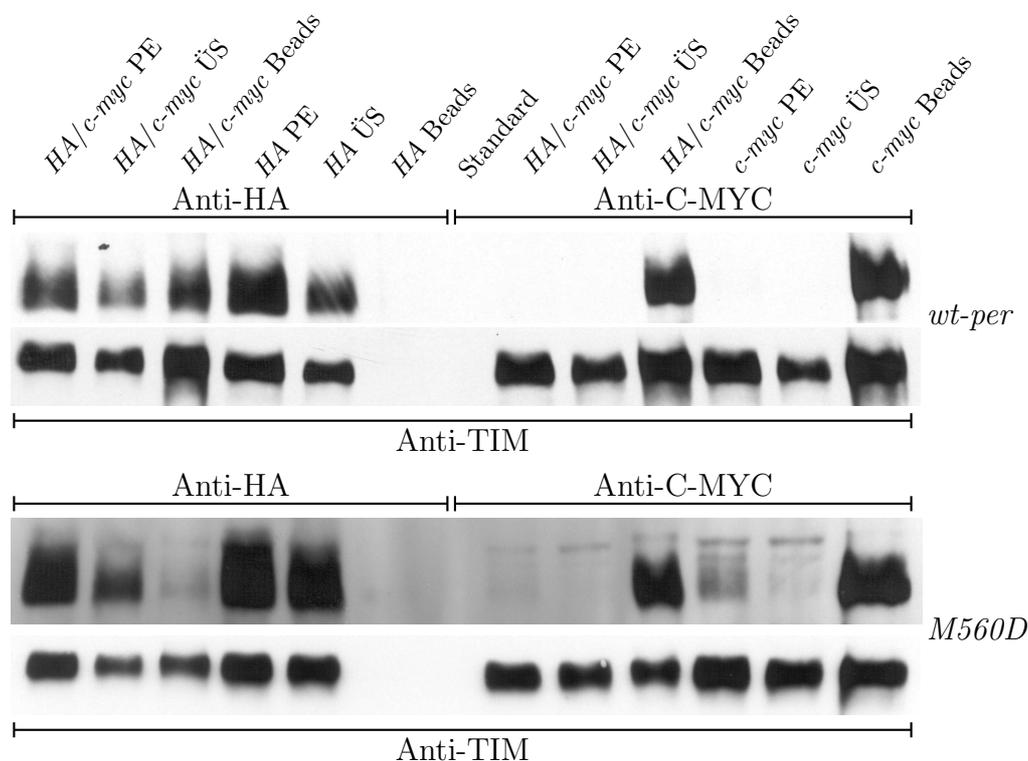


Abbildung 3.13: Westernblots der CoIP-Experimente doppelt homozygoter Tiere mit PER ohne Basenaustausch (*wt-per*) und *per-M560D* bei ZT20. Die CoIP wurde mit Anti-C-MYC-Beads durchgeführt, Dimerisierungen wurden durch Anti-HA- und Anti-TIM-Färbungen gezeigt. Über den Spuren ist in kursiver Schrift der jeweilige Genotyp in Bezug auf den TAG angegeben. PE: Proteinextraktion, ÜS: Überstand nach der Beadinkubation, Beads: Anti-C-MYC-Beads.

HA:PER-HA wird nicht präzipitiert und bleibt daher im Überstand, PER-C-MYC:PER-C-MYC präzipitiert und ist auch für die starken Signale in der C-MYC-Färbung mit verantwortlich. Es zeigt sich außerdem, dass der Anti-C-MYC zwar unter den nativen Bedingungen während der CoIP den C-MYC-TAG gut binden kann, aber auf dem Westernblot nur ein sehr schwaches Signal gibt. Auf dem Gel sind daher bei der C-MYC-Färbung (Abb. 3.13) nur die großen Mengen der Präzipitate sichtbar, jedoch nicht die vergleichsweise geringeren Mengen in der Proteinextraktion oder im Überstand nach der CoIP. Eine Quantifizierung der CoIP war daher nicht möglich.

Die Menge des Homodimers scheint jedoch im Vergleich zur eingesetzten Proteinmenge eher gering. Die Signale der präzipitierten PER-C-MYC-Proteine sind auf dem Westernblot sehr viel stärker, als die des copräzipitierten PER-HA. Der C-MYC-Antikörper gibt ein sehr viel schwächeres Signal, als der HA-Antikörper, und trotzdem ist die C-MYC-Färbung sehr viel stärker, als die HA-Färbung. Auf keinem herkömmlichen Westernblot mit Proteinextrakten aus Fliegenköpfen konnte ein derart starkes Signal mit diesem Antikörper erzeugt werden (vgl. Abb. 3.11 B: C-MYC- und HA-Färbung). Die präzipitierte PER-C-MYC-Menge beträgt daher ein Vielfaches der copräzipitierten PER-HA-Menge. Dies bestätigt auch die Beobachtungen der älteren Studie von Zeng *et al.*, (1996). Auch kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob zu diesem Zeitpunkt (ZT20) ein PER:PER:TIM-Trimer, oder PER:PER-Homodimere und PER:TIM-Heterodimere gleichzeitig vorliegen.

3.2.5.4 Der Austausch M560D schwächt die Homodimerisierung, aber nicht die Bindung mit TIM

CoIP-Experimente mit PER-M560D zeigen, dass dieser Austausch die Homodimerisierung von PER stark vermindert. Mit Anti-HA kann auf dem Westernblot nur eine sehr geringe Menge an copräzipitiertem PER-HA nachgewiesen werden (Abb. 3.13, 3. Reihe, HA-Färbung, Spur *HA/c-myc*). Die Heterodimerisierung mit TIM ist jedoch bei PER-M560D nicht betroffen. (Abb. 3.13, 4. Reihe, *HA/c-myc* Beads und *c-myc* Beads). Die TIM-Färbung zeigt deutliche Signale nach der CoIP mit PER-M560D-C-MYC. Der Austausch M560D liegt in der C-Domäne (α F-Helix) in einem Bereich, für den bisher keine Interaktion mit TIM bekannt ist. Auch zeigt das Ergebnis deutlich, dass der Homodimer keine Voraussetzung für die Heterodimerisierung mit TIM darstellt.

3.2.6 Analyse des Lokomotorverhaltens der *per*-Transformanten

3.2.6.1 Verhalten der Kontrollen *y w* und *y per⁰¹ w*

Verhalten in LD und DD bei 25 °C: Standardanalysen des Lokomotorverhaltens finden üblicherweise bei 25 °C statt und bestehen aus zwei getrennten Versuchsteilen. Der erste Versuchsteil findet unter wechselnden Licht-/ Dunkel-Verhältnissen statt (12 h Licht / 12 h Dunkelheit, LD), der zweite Teil im Dauerdunkel (DD).

Das Verhalten der Tiere in LD zeigt, wie gut die Tiere mit dem äußeren Einfluss (Zeitgeber) Licht / Dunkel synchronisierbar sind. Dazu dient vor allem die Darstellung des Verhaltens in Form eines Histogramms oder „Daily Average“ (Kap. 2.4). Bei Tieren, die eine funktionierende innere Uhr besitzen, zeigt sich, dass sie über 24 h zwei Aktivitätsmaxima haben, den Morgen- und den Abendpeak. Der Morgenpeak beginnt bevor das Licht angeht und hat sein Maximum in der Reaktion auf den Lichtwechsel (siehe Abb. 3.14 E). Nachdem das Licht angegangen ist, lässt die Aktivität sofort stark nach und den Tag über sind die Tiere dann nur wenig aktiv (Siesta).

Beim Abendpeak verhält es sich ganz ähnlich wie beim Morgenpeak. Auch dieser beginnt vor dem Lichtwechsel, in diesem Fall „Licht aus“. Die Laufaktivität der Tiere steigert sich, bis sie schließlich wieder beim Lichtwechsel das Maximum erreicht. Nach dem Lichtwechsel sinkt die Aktivität und bleibt bis zum Morgenpeak sehr gering. Der Abendpeak ist jedoch wesentlich ausgeprägter, als der Morgenpeak.

Tiere, die keine funktionierende innere Uhr mehr haben, zeigen ein ganz anderes Verhalten. Ihrem Verhalten fehlt die Antizipation des Lichtwechsels. Sie reagieren nur auf den Lichtwechsel, der für sie überraschend eintritt, mit einer sehr kurzen verstärkten Aktivität. Oft ist jedoch die Laufaktivität während der Lichtphase höher als in der Dunkelheit, was eine Bevorzugung

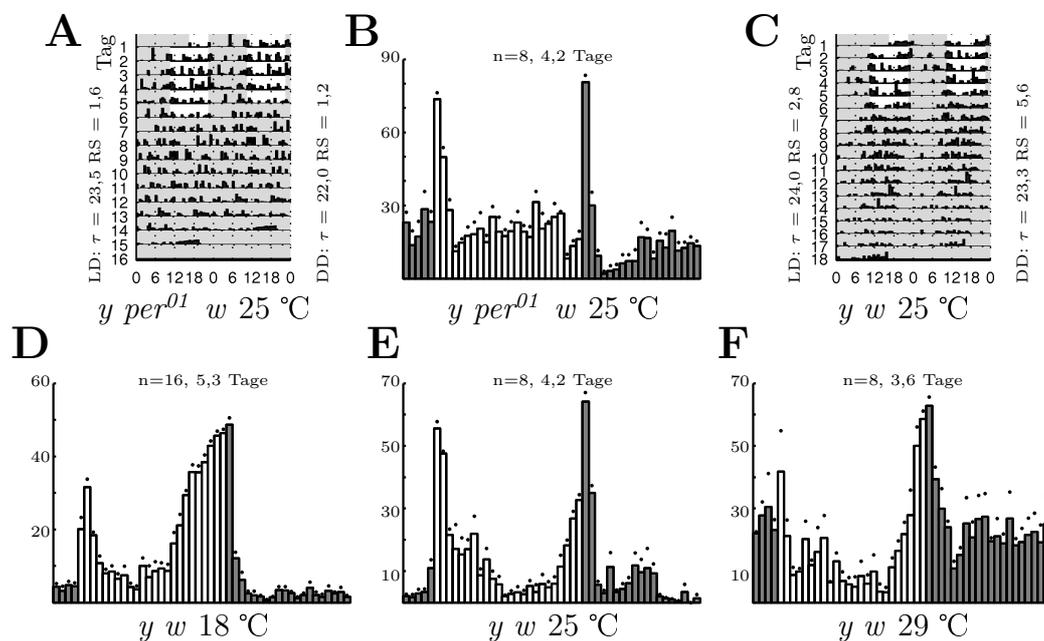


Abbildung 3.14: Lokomotorverhalten der Kontrollen $y\ per^{01}\ w$ und $y\ w$. A Aktogramm von $y\ per^{01}\ w$ bei 25 °C, B Daily Average mehrerer $y\ per^{01}\ w$ -Tiere bei 25 °C, C Aktogramm von $y\ w$ bei 25 °C, D,E und F Daily Averages mehrerer $y\ w$ -Tiere bei 18 °C, 25 °C und 29 °C. Lichtphasen sind durch weißen Hintergrund oder weiße Balken gekennzeichnet. Dunkle Zeitpunkte sind grau dargestellt.

des Tages widerspiegelt (Abb. 3.14 B).

Die Analyse des Lokomotorverhaltens in konstanter Dunkelheit (DD) zeigt, wie die innere Uhr ohne äußeren Zeitgeber weiterläuft (Freilauf). Eine Unterscheidung zwischen Morgen- und Abendpeak ist in DD oft nicht möglich, meist bleibt nur der Abendpeak dauerhaft erhalten und dient zur Berechnung von τ . Rhythmische Tiere zeigen über die Zeitdauer des subjektiven Tages eine erhöhte Laufaktivität. Die Periodenlänge τ , die sich aus der Dauer der Aktivitätsphase und der Ruhephase zusammensetzt, beträgt meist etwas weniger als 24 h (siehe Abb. 3.14 C und Tab. 3.3 $y\ w$: $\tau \sim 23,4$ h).

Tiere ohne innere Uhr zeigen in DD kein rhythmisches Verhalten mehr. Das Verhalten besteht aus kleinen aufeinander folgenden Aktivitäts- und Ruhe-

phasen, die jedoch keinem circadianem Muster unterliegen. Es handelt sich dabei um ultradiane Rhythmen, die sehr kurz, und gleichmäßig über die 24 h verteilt sind. Eine Unterscheidung in subjektiven Tag / subjektive Nacht ist bei diesen Rhythmen nicht möglich (siehe Abb. 3.14 A).

Lokomotorverhalten bei kalten und warmen Temperaturen und

Temperaturkompensation: Zusätzlich zu den Analysen bei 25 °C wurde das Lokomotorverhalten auch bei einer kalten (18 °C) und einer warmen Temperatur (29 °C) gemessen. Bei diesen Temperaturen lassen sich, besonders in LD, temperaturbedingte Anpassungen im Verhalten beobachten. Die Periodenlänge der inneren Uhr im Freilauf (DD) sollte jedoch bei einer funktionierenden Temperaturkompensation nicht gravierend von 24 h abweichen. In LD zeigen die Kontrollfliegen bei 18 °C einen ausgeprägten Abendpeak, der im Vergleich zu 25 °C viel früher beginnt und bei dem die Aktivität der Fliegen sehr viel stärker steigt. Beim Lichtwechsel fehlt der Aktivitätssprung, da die Aktivität bereits am Ende der Lichtphase sehr hoch ist. Der Morgenpeak ist nur extrem schwach ausgeprägt. Er erreicht sein Maximum erst nachdem das Licht bereits 30 min an ist (siehe Abb. 3.14 D). Die Tiere verlagern also ihre Aktivität bei kalten Temperaturen verstärkt auf den Tag.

Bei 29 °C kann man in LD den gegenteiligen Effekt beobachten. Die Tiere versuchen wahrscheinlich die in der Natur vorhandene Kühle der Nacht zu nutzen. Die Aktivität während der Dunkelphase ist generell erhöht. Der Abendpeak reicht weiter in die Nacht hinein und der Morgenpeak erreicht bereits vor Licht an ein Maximum, die Aktivität nimmt dann noch im Dunkeln wieder ab, und steigt schließlich kurz an, als Reaktion auf den Lichtwechsel (Abb. 3.14, F).

Ähnliche Anpassungen wurden auch für die Linie *CantonS* beschrieben. Bei 18 °C kam es ebenfalls zu einer Verbreiterung des Abendpeaks. Bei 29 °C verlagerte sich die Aktivität der Tiere auch verstärkt in die Dunkelphase,

allerdings zeigten die Tiere einen ausgeprägten Morgenpeak, der weit in die Hellphase hineinragt (Majercak *et al.*, 1999).

Die Rhythmizität der Tiere nimmt in LD mit steigender Temperatur ab. Während bei 18 °C und 25 °C noch weit über 90 % der Tiere rhythmisch sind, sinkt der Prozentsatz bei 29 °C auf 57 % ab (siehe Tab. 3.2, 3.3 und 3.4 und Abb. 3.18). Der Rhythm Statistic Wert (RS, Kap. 2.4), der eine Aussage über die statistische Signifikanz eines Rhythmus zulässt, verhält sich im Vergleich zur Rhythmizität versetzt. Er sinkt bereits bei einer Temperaturerhöhung von 18 °C auf 25 °C von 4,2 auf 2,3 ab und bleibt dann konstant. Bei einer Temperaturerhöhung von 18 °C auf 29 °C sinkt also zuerst der RS und dann der Prozentsatz der rhythmischen Tiere. Die Tiere haben bei der vergleichsweise hohen Temperatur von 29 °C offensichtlich ein Problem mit der Synchronisation mit dem äußeren Zeitgeber.

Erstaunlicherweise ist die Situation in DD umgekehrt. Die Rhythmizität der Tiere steigt mit steigender Temperatur. Bei 18 °C sind 83,4 % der Tiere rhythmisch, bei 25 °C steigt der Prozentsatz auf 87,0 % und bei 29 °C sind 96,6 % rhythmisch (siehe Tab. 3.2, 3.3 und 3.4 und Abb. 3.18). Auch die statistische Signifikanz des Rhythmus steigt mit der Temperatur. Während der RS bei 18 °C und 25 °C den Wert 2,9 hat, steigt der RS bei der Temperaturerhöhung auf 29 °C auf 4,4 an.

Vergleicht man die Freilaufperiodenlängen der Kontrolltiere bei den verschiedenen Temperaturen, so stellt man keinen signifikanten Unterschied fest. Sie bewegen sich zwischen 23,4 h und 23,7 h (siehe Abb. 3.19), was auf eine gut funktionierende Temperaturkompensation der inneren Uhr hinweist.

3.2.6.2 Die Konstrukte *per-HA* und *per-c-myc* retten den *per⁰¹*-Verhaltensphänotyp gut

Zur Berechnung der Werte Rhythmizität, Periodenlänge τ und Rhythmicity Statistic (RS) wurden die Linien 1-5-2 und 1-8 (*per-HA*), und 2-2-2 und 2-

6 (*per-c-myc*) verwendet. Bei 25 °C wurden zusätzlich noch weitere Linien untersucht (siehe Tab. A.2). Die Werte, die sich unter Einbeziehung aller getesteten Linien ergeben, sind in Klammern angegeben. Aktogramme ausgewählter Tiere sind in Abb. 3.21 dargestellt.

Das Lokomotorverhalten der Transformanten der Konstrukte ohne Basenaustausch, *per-HA* und *per-c-myc* zeigt deutlich, dass beide Konstrukte in der Lage sind den arhythmischen Phänotyp in *y per⁰¹ w* zu retten. Bei den drei getesteten Temperaturen zeigen diese Transformanten sowohl in LD, als auch in DD weitgehend wildtypisches Verhalten.

Bei 25 °C zeigen die Transformanten, wie auch die Kontrollen, in LD einen Morgen- und einen Abendpeak. Der Morgenpeak beginnt in der Dunkelheit und erreicht sein Maximum mit der Reaktion auf den Lichtwechsel. Auf den Morgenpeak folgt eine Siesta, bis vor dem erneuten Lichtwechsel die Aktivität wieder ansteigt. Der Abendpeak erreicht dann sein Maximum nachdem das Licht ausgegangen ist. Ein Unterschied zwischen *per-HA* und *per-c-myc*-Tieren ist dabei nicht erkennbar (siehe Abb. 3.15).

Wird die Temperatur auf 18 °C abgekühlt, kommt es wie bei *per⁺*-Tieren zu einer Verbreiterung des Abendpeaks. Im Fall der Transformanten wird jedoch das Maximum bereits vor dem Lichtwechsel erreicht, bei *per-HA* etwa 2 h, bei *per-c-myc* etwa 1 h vorher. Der Morgenpeak beginnt im Vergleich zu *y w* ebenfalls etwas früher, sowohl die *per-HA*, als auch *per-c-myc* zeigen eine Antizipation des Lichtwechsels (Abb. 3.15).

Bei einer Temperatur von 29 °C zeigen die Transformanten im Gegensatz zu den Kontrollen einen wesentlich markanteren Morgenpeak. Dieser beginnt im Vergleich zu *y w* noch früher in der Dunkelheit und erreicht sein Maximum bevor das Licht angeht. Bei *per-HA* wird das Maximum ~2 h vor dem Lichtwechsel erreicht, bei *per-c-myc* ~3 h. Zu einer Reaktion auf den Lichtwechsel kommt es nur bei *per-c-myc*. Auch der Abendpeak der Transformanten erreicht bei 29 °C sein Maximum früher, als der von *y w*-Fliegen (Abb. 3.15).

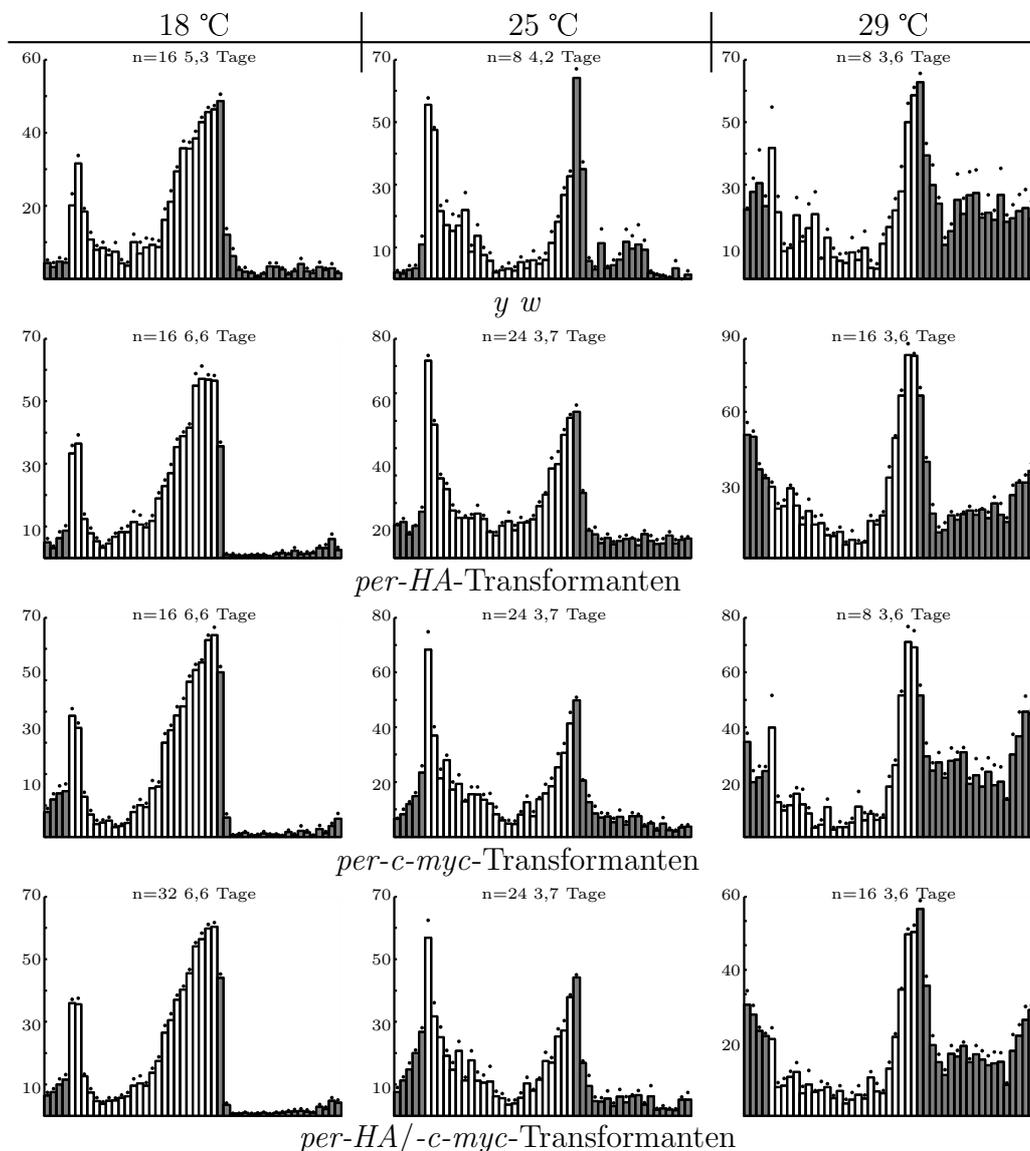


Abbildung 3.15: Daily Averages der Transformanten der *per*-Konstrukte bei den Temperaturen 18 °C, 25 °C und 29 °C. Zur Berechnung der Daily Averages wurden jeweils die Daten mehrerer Fliegenlinien vereinigt. *per-HA* 18 °C: 1-5-2, 1-8, *per-HA* 25 °C: 1-6, 1-8, 1-9, *per-HA* 29 °C: 1-5-2, 1-9; *per-c-myc* 18 °C: 2-2-2, 2-6, *per-c-myc* 25 °C: 2-2-1, 2-2-2, 2-3, *per-c-myc* 29 °C: 2-2-2 *per-HA/-c-myc* 18 °C: 1-5-2, 1-8, 2-2-2, 2-6 *per-HA/-c-myc* 25 °C: 1-11, 2-2-1, 2-2-2, *per-HA/-c-myc* 29 °C: 1-5-2, 2-2-2.

Wie auch bei den *per⁺*-Tieren nimmt bei den Transformanten die Rhythmizität in LD mit steigender Temperatur ab. Sie ist jedoch immer höher als bei den Kontrollen. Bei 18 °C liegt sie sogar bei 100 % und bei 29 °C immer noch bei 78,1 %. Das sind ~22 % mehr als bei den Kontrolltieren (Tab. 3.2, 3.3 und 3.4 und Abb. 3.18). Mit dem RS der Transformanten verhält sich ebenfalls ähnlich wie mit dem RS der Kontrollen. Bei 18 °C beträgt er 4,6 und sinkt dann bei einer Erhöhung auf 25 °C und 29 °C auf etwa 2 ab.

In DD ist die Rhythmizität im Vergleich zu *per⁺* etwas verringert. Aber auch hier steigen im Gegensatz zu LD die Rhythmizität, sowie der RS mit der Temperatur, von 74,2 % RS 2,9 bei 18 °C über 86,1 % RS 2,4 (76,7 % RS 2,9) auf 87,5 % RS 4,4 bei 29 °C an. Die Rhythmizität liegt damit bei 18 °C und 29 °C im Schnitt ca. 10 % unter der Rhythmizität der Kontrollf-liegen, bei 25°C besteht kein Unterschied.

Auch die Temperaturkompensation ist leicht beeinträchtigt. Bei 25 °C ist die Periodenlänge mit 23,5 h (23,3 h) am nächsten an 24 h. Sowohl eine Temperaturerniedrigung, als auch eine Temperaturerhöhung führt zu einer Periodenverkürzung von ~1 h. Auch die Art des TAGs scheint einen kleinen Einfluss auf die Periodenlänge zu haben. Tiere die PER-HA exprimieren zeigen eine Periodenlänge, die immer etwas kürzer ist, als solche, die PER-C-MYC tragen. Bei 18 °C beträgt dieser Unterschied sogar etwa 1 h (siehe Abb. 3.19). Wie oben beschrieben, ist dieser Unterschied bei 18 °C auch im LD-Verhalten beobachtbar. Der Abendpeak der *per-HA*-Tiere erreicht sein Maximum ca. 1 h früher, im Vergleich zu *per-c-myc*.

Die Konstrukte *per-HA* und *per-c-myc* retten den arhythmischen Phänotyp von *y per⁰¹ w* sehr gut. Die Anzahl der rhythmischen Tiere in DD ist nur unwesentlich geringer als bei den *per⁺*-Kontrolltieren und mit steigender Temperatur unterliegen sowohl die Rhythmizität, als auch die statistische Signifikanz (RS) der Rhythmen den gleichen Trends wie die Werte der *per⁺*-Kontrolltiere.

3.2.6.3 Der Basenaustausch M560D verschlechtert die Rhythmi- zität der Tiere

Zur Berechnung der Werte Rhythmicität, Periodenlänge τ und Rhythmicity Statistic (RS) wurden die Linien 9-2 und 9-4-2 (*per-M560D-HA*), und 10-2-1 und 10-2-2 (*per-M560D-c-myc*) verwendet. Bei 25 °C wurden zusätzlich noch weitere *per-M560D-HA*-Linien untersucht (siehe Tab. A.2). Die Werte, die sich unter Einbeziehung aller getesteten Linien ergeben, sind in Klammern angegeben. Aktogramme ausgewählter Tiere sind in Abb. 3.22 dargestellt. Das Verhalten der *per-M560D-HA*- und *per-M560D-c-myc*-Transformanten unterscheidet sich teilweise erheblich. In LD ist die Rhythmicität bei 18 °C sehr hoch, von den *per-M560D-HA*-Tieren sind 100 % rhythmisch, von *per-M560D-c-myc* 96,9 %. Bei Temperaturerhöhung auf 25 °C verschlechtert sich die Rhythmicität auf 87,5 % (63,6 %) (*HA*-TAG) und 75,0 % (*c-myc*-TAG). Eine weitere Temperaturerhöhung auf 29 °C hat im Fall des *HA*-TAG eine weitere Verschlechterung auf 73,3 % zur Folge. Im Fall des *c-myc*-TAG kommt es zu einer Verbesserung auf 85,7 %. Die RS-Werte dagegen sinken mit steigender Temperatur kontinuierlich, von 2,9 auf 2,5 (2,5) und 2,1 im Fall von *per-M560D-HA* und von 2,7 auf 2,4 und 2,0 im Fall von *per-M560D-c-myc* (Tab. 3.2, 3.3 und 3.4).

Besonders deutlich wird der Unterschied zwischen den *per-M560D-HA*- und *per-M560D-c-myc*-Transformanten in der Darstellung des LD-Verhaltens in Form des Daily Average. Bei allen drei getesteten Temperaturen zeigen die Tiere rhythmisches Verhalten mit einem deutlichen Morgen- und Abendpeak. Die Peaks der Tiere, die *PER-M560D-C-MYC* exprimieren, sind jedoch im Vergleich zu Tieren mit *PER-M560D-HA* signifikant nach hinten verschoben. Besonders deutlich zeigt sich dies bei den Abendpeaks bei 25 °C und 29 °C. Bei 25 °C beginnt die Antizipation des Lichtwechsels bei *per-M560D-c-myc* ca. 2,5 h später als bei *per-M560D-HA* und bei 29 °C findet der Abendpeak im Fall des *HA*-TAG im Hellen statt, während im Fall des *c-myc*-TAG

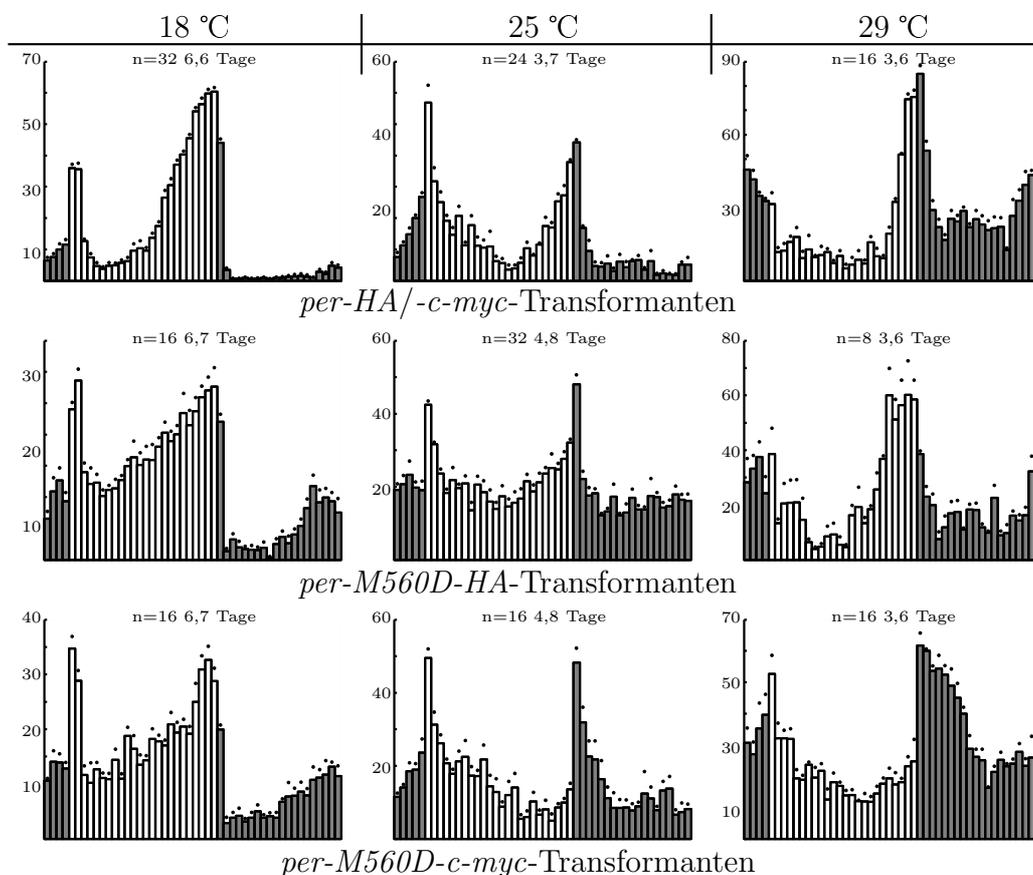


Abbildung 3.16: Daily Averages der Transformanten der *per*-Konstrukte bei den Temperaturen 18 °C, 25 °C und 29 °C. Zur Berechnung der Daily Averages wurden jeweils die Daten mehrerer Fliegenlinien vereinigt. *per-HA/-c-myc* 18 °C: 1-5-2, 1-8, 2-2-2, 2-6 *per-HA/-c-myc* 25 °C: 1-11, 2-2-1, 2-2-2, *per-HA/-c-myc* 29 °C: 1-5-2, 2-2-2, *per-M560D-HA* 18 °C: 9-2, 9-4-2, *per-M560D-HA* 25 °C: 9-4-1, 9-4-2, 9-5, 9-6, *per-M560D-HA* 29 °C: 9-4-2, *per-M560D-c-myc* 18 °C, 25 °C und 29 °C: 10-2-1, 10-2-2.

die Hauptaktivität nach dem Lichtwechsel im Dunkeln stattfindet. Ähnlich verhält es sich mit den Morgenpeaks bei 29 °C. Bei *per-M560D-c-myc* erreicht dieser sein Maximum mit dem Lichtwechsel, bei *per-M560D-HA* ist beim Lichtwechsel das Maximum bereits überschritten. Bei beiden kommt es jedoch im Vergleich zu den Transformanten mit Konstrukten ohne Ami-

nosäureaustausch zu einer Reaktion auf den Lichtwechsel durch eine kurze verstärkte Laufaktivität (siehe Abb. 3.16). Trotzdem sind die typischen Anpassungen an die Temperatur, wie eine signifikante Verbreiterung des Abendpeaks bei 18 °C, sowie eine erhöhte Laufaktivität in der Dunkelphase bei 29 °C vorhanden.

In DD ist die Zahl der rhythmischen Tiere, sowie auch die Robustheit der Rhythmen stark reduziert. Jedoch wird, wie bei den Kontrollen, jeweils der höchste Wert bei 29 °C erreicht. Bei *per-M560D-HA* steigt der Anteil der rhythmischen Tiere bei einer Temperaturerhöhung von 18 °C auf 25 °C und 29 °C von 31,3 % (18 °C) auf 37,5 % (30,0 %) (25 °C) und 51,3 % (29 °C) an. Bei *per-M560D-c-myc* steigt er ebenfalls mit steigender Temperatur kontinuierlich von 31,3 % auf 53 % und 62,5 %. Auch die RS-Werte beider steigen jeweils mit steigender Temperatur (*HA*-TAG: 1,9, 2,6 (2,3), 2,7 und *c-myc*-TAG: 1,7, 2,4, 2,6) (Tab. 3.2, 3.3 und 3.4).

Die Temperaturkompensation ist vom Basenaustausch M560D nicht betroffen. Analog der *per*-Transformanten ohne Aminosäureaustausch haben diese Tiere jeweils die längste Periode bei 25 °C (*per-M560D-HA* 23,4 h (23,5 h) und *per-M560D-c-myc* 25,0 h). Sowohl eine Abkühlung, als auch eine Erwärmung hat eine Verkürzung der Periodenlänge zur Folge. Auch scheint, wie schon bei den *per-HA*/*-c-myc*-Transformanten, der *c-myc*-TAG generell eine Periodenverlängerung gegenüber dem *HA*-TAG zu verursachen. In Verbindung mit dem Austausch M560D beträgt diese jedoch 1,5 bis 2 h (siehe Abb. 3.19). In Kombination mit M560D verursacht also der *c-myc*-TAG im Vergleich zum *HA*-TAG eine generelle Periodenverlängerung, die sich auch, wie oben beschrieben, durch eine Verschiebung der Aktivitätsmaxima im LD-Verhalten bemerkbar macht.

Die Mutation M560D scheint jedoch eine generelle, temperaturunabhängige Periodenverlängerung zu verursachen. Bei den drei getesteten Temperaturen ist die Periode der *per-M560D-HA*-Tiere im Vergleich zu *per-HA* jeweils

$\sim 0,5$ h länger, bei *per-M560D-c-myc* kommt es im Vergleich zu *per-c-myc* sogar zu einer Verlängerung von jeweils $\sim 1,5$ h (Abb. 3.19).

Die Konstrukte *per-M560D-HA* und *per-M560D-c-myc* sind also demnach eingeschränkt in der Lage arhythmisches Verhalten in einem *per⁰¹*-Hintergrund zu retten. Sowohl die Rhythmizität, als auch der RS sind zwar im Vergleich zu *per⁺*-Tieren stark reduziert, unterliegen jedoch den gleichen Trends. Auch die Temperaturkompensation ist bei den Transformanten annähernd normal. Die Periodenverlängerung, die M560D verursacht ist temperaturunabhängig.

3.2.6.4 PER mit den Austausch R345E, W482E oder W482E mit M560D führt nicht zu *per⁺*-Verhalten

Die Versuche bei 18 °C und 29 °C wurden mit den Linien 3-1 und 3-4 (*per-R345E-HA*), 4-4 und 4-9-2 (*per-R345E-c-myc*), 5-2 und 5-3 (*per-W482E-HA*), 6-1, 6-3-1 und 6-5 (*per-W482E-c-myc*), 11-6 und 11-7 (*per-W482E-M560D-HA*), und 12-1 und 12-2 (*per-W482E-M560D-c-myc*) durchgeführt. Bei 25 °C wurden zusätzlich noch weitere Linien getestet (siehe Tab. A.2). Da sich das Verhalten der Linien mit gleichen Aminosäureaustauschen in *per* kaum unterschied, wurden die Daten der jeweiligen Linien vereinigt. Akto-gramme ausgewählter Tiere sind in Abb. 3.21 und Abb. 3.22 dargestellt.

Das Verhalten der Transformanten von *per*-Konstrukten mit den Basenaustauschen R345E, W482E und W482E in Kombination mit M560D ist sehr ähnlich. In LD zeigen die Transformanten bei 18 °C neben einer schwachen Reaktion auf den Lichtwechsel allenfalls Ansätze rhythmischen Verhaltens. Bei *per-R345E*- und *per-M560D*-Tieren kommt es in der Nacht zu einem Anstieg der Rhythmizität, der einen verfrühten Morgenpeak widerspiegeln könnte. Bei *per-R345E*- und *per-W482E-M560D*-Tieren kommt es in der Mitte der Lichtphase zu einem flachen Aktivitätsmaximum. Dieses Maximum kann jedoch auch durch eine Summierung ultradianer Rhythmen ent-

standen sein. Alle drei rekombinanten *per*-Allele führen bei 18 °C deutlich zu einer Bevorzugung der Lichtphase, die auch beim den Allelen ohne Austausch beobachtet werden kann.

Bei 25 °C zeigen die Transformanten kein rhythmisches Verhalten mehr. Es findet lediglich eine ausgeprägte Reaktion auf den Lichtwechsel zu Beginn und Ende der Lichtphase statt. Bei 29 °C kommt es wiederum zu einem kleinen Aktivitätsanstieg gegen Ende der Dunkelphase. Es ist jedoch nicht erkennbar, ob es sich dabei tatsächlich um einen Effekt des circadianen Systems handelt (Abb. 3.17).

Die Rhythmizität in LD beschränkt sich daher bei den Transformanten dieser drei *per*-Allele, mit Ausnahme von R345E und W482E-M560D, die eine schwache Synchronisation zeigen, hauptsächlich auf eine Reaktion auf den Lichtwechsel, sowie die Bevorzugung der Lichtphase bei kalten Temperaturen. Diese beiden Effekte nehmen mit steigender Temperatur deutlich ab. Bei *per-R345E* sinkt die Rhythmizität von 87,3 % bei 18 °C auf 65,7 % bei 25 °C und 40,5 % bei 29 °C ab, bei *per-W482E* sinkt sie von 93,8 % über 56,9 % auf 50,0 %. Am stärksten ist die Abnahme der Rhythmizität bei der Doppelmutante *per-W482E-M560D*. Hier sinkt sie mit steigender Temperatur von 95,2 % auf 61,6 % und schließlich 21,9 % ab (siehe Abb. 3.18 oben, Tab. 3.2, 3.3 und 3.4). Wie die Rhythmizitäten, sinken auch die RS-Werte der Transformanten dieser drei Konstrukte mit steigender Temperatur drastisch. Bei R345E verringert sich der RS von 2,6 bei 18 °C, auf 1,7 und schließlich auf 1,6 bei 29 °C, bei W482E von 3,2 über 1,8 auf 1,4 und bei der Doppelmutante *per-W482E-M560D* von 2,8 auf 2,2 und 1,5.

In DD ist die Rhythmizität generell stark reduziert. Sie hat jeweils bei 18 °C ein Maximum mit 23,8 %, RS 1,8 (*per-R345E*), 18,8 %, RS 2,0 (*per-W482E*) und 25,5 %, RS 1,8 (*per-W482E-M560D*). Im Gegensatz zu den Kontrollen und den Transformanten mit *per* ohne Mutation, sinkt jedoch die Rhythmizität mit steigender Temperatur noch weiter ab. Bei *per-R345E* sinkt sie

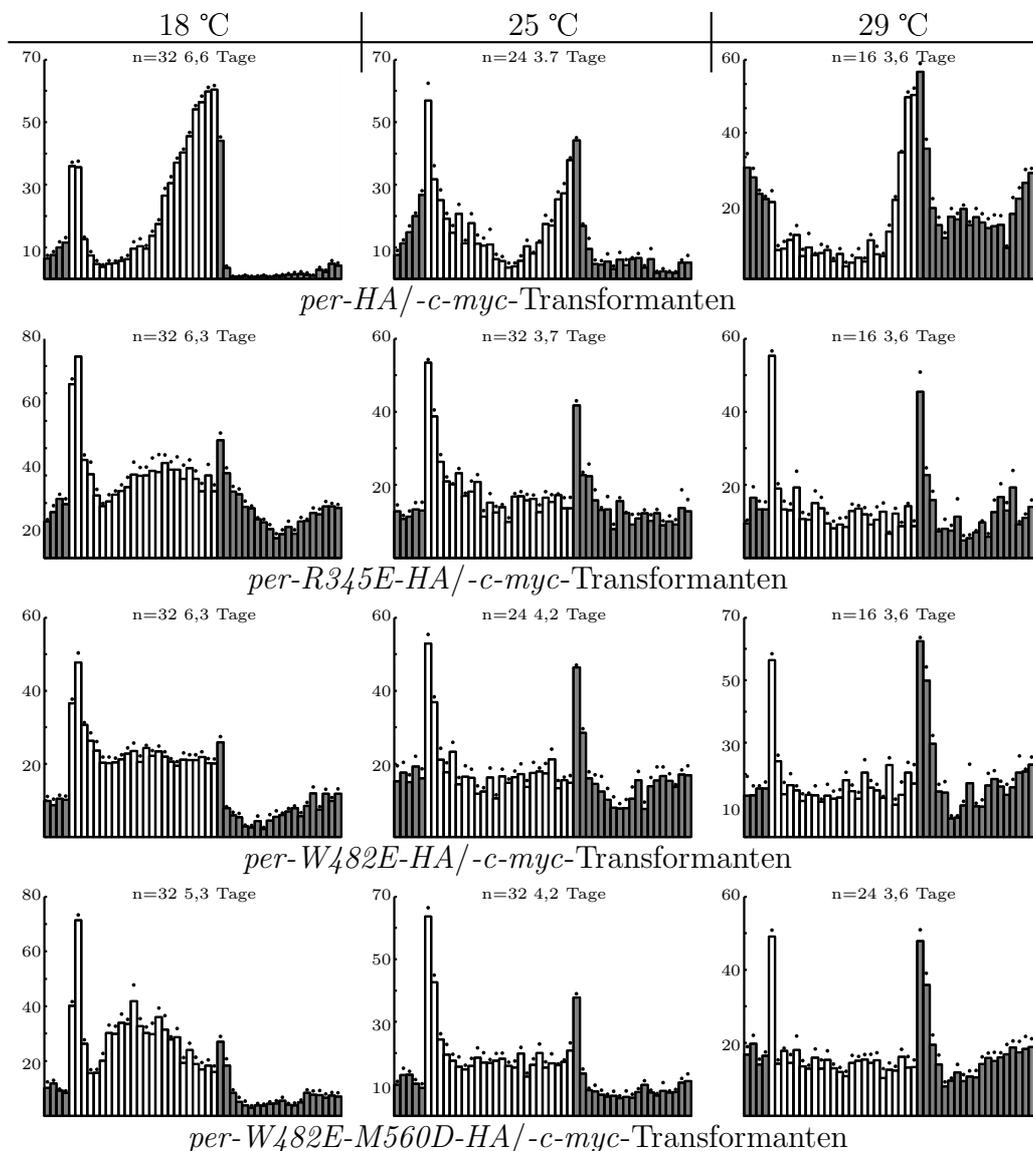


Abbildung 3.17: Daily Averages der Transformanten der *per*-Konstrukte bei den Temperaturen 18 °C, 25 °C und 29 °C. Da unter den jeweiligen Linien mit gleichem Aminosäureaustausch kein Unterschied festgestellt wurde, erfolgte keine Trennung nach TAG. *per*-HA/-c-myc 18 °C: 1-5-2, 1-8, 2-2-2, 2-6 *per*-HA/-c-myc 25 °C: 1-11, 2-2-1, 2-2-2, *per*-HA/-c-myc 29 °C: 1-5-2, 2-2-2, *per*-R345E 18 °C: 3-1, 3-4, 4-4, 4-9-2, *per*-R345E 25 °C: 3-8, 3-10, 4-4, 4-5-1, *per*-R345E 29 °C: 4-4, 4-9-2, *per*-W482E 18 °C: 5-2, 5-3, 6-1, 6-3-2, *per*-W482E 25 °C: 5-2, 5-3, 6-1, *per*-W482E 29 °C: 5-2, 5-3, *per*-W482E-M560D 18 °C: 11-6, 11-7, 12-1, 12-2, *per*-W482E-M560D 25 °C: 11-8, 11-10, 12-1, 12-2, *per*-W482E-M560D 29 °C: 11-7, 12-1, 12-2.

bei 25 °C auf 18,5 % (RS 1,8) und dann auf 1,6 % (ein Tier mit RS 2,3) bei 29 °C. Bei *per-W482E* sind bei 25 °C nur noch 5,7 % (RS 1,8) rhythmisch, bei 29 °C kein einziges Tier mehr von 61 getesteten. Auch bei *per-W482E-M560D* sinkt die Rhythmizität bei einer Temperaturerhöhung auf 25 °C stark ab (5,4 %, RS 2,2) bleibt jedoch bei einer weiteren Erhöhung auf 29 °C relativ konstant (6,7 %, RS 1,5) (siehe Abb. 3.18 unten). Erstaunlich dabei ist, dass sowohl bei 18 °C als auch bei 29 °C mehr Tiere mit *W482E-M560D*, als mit nur *W482E*, rhythmisch sind.

Die Periodenlänge unterliegt bei allen rhythmischen Tieren bei den drei verwendeten Temperaturen einer, im Vergleich zu den *per-HA*- und *per-c-myc*-Transformanten, relativ starken Variabilität. Generell ist ein Trend hin zu einer Periodenverlängerung mit steigender Temperatur beobachtbar. Bei *per-R345E-HA* hat eine Temperaturerhöhung von 18 °C auf 25 °C eine Periodenverlängerung von durchschnittlich 22,9 h (rhythmische Tiere: n = 15) auf 24,5 h (n = 20) zur Folge. Über den gleichen Temperaturbereich verlängert sich τ bei *per-W482E* sogar von durchschnittlich 24,1 h (n = 15) auf 27,2 h (n = 4). Bei *per-W482E-M560D* bleibt in diesem Temperaturbereich τ relativ konstant bei ~ 25 h (18 °C: n = 16, 25 °C: n = 6). Erst eine weitere Erhöhung auf 29 °C verlängert die Periodenlänge auf durchschnittlich 27 h (n = 4). Einzige Ausnahme bilden die Transformanten von *per-R345E-c-myc*. Hier hat eine Erhöhung von 18 °C auf 25 °C eine Verkürzung der Freilaufperiode von ~ 1 h (24,1 h auf 23,0 h) zur Folge (Abb. 3.19, Tab. 3.2, 3.3 und 3.4).

per-Konstrukte, die die Aminosäureaustausche R345E, W482E und W482E mit M560D verursachen, sind also nicht in der Lage den *per⁰¹*-Phänotyp zu retten. Die Änderungen der Freilaufperiode mit steigender Temperatur weisen darüber hinaus auf eine gestörte Temperaturkompensation der inneren Uhr in diesen Tieren hin.

Bedingungen	18 °C LD				18 °C DD					
	rhy.	Per.	RS	n	rhy.	Per.	RS	n	n (L.)	tot
Kontrollen	98,2 %	24,0 ± 0,0	4,2 ± 0,1	55	83,4 %	23,6 ± 0,1	2,9 ± 0,2	54	2	3,6 %
<i>wt-per</i>	100 %	24,0 ± 0,0	4,6 ± 0,1	63	74,2 %	22,5 ± 0,2	2,9 ± 0,5	63	4	3 %
<i>per-HA</i>	100 %	24,0 ± 0,0	4,5 ± 0,2	32	75,0 %	21,9 ± 0,3	2,6 ± 0,1	32	2	0 %
<i>per-c-myc</i>	100 %	24,0 ± 0,0	4,7 ± 0,2	31	73,3 %	23,1 ± 0,3	3,5 ± 1,0	30	2	6,3 %
<i>per-R345E</i>	87,3 %	24,1 ± 0,1	2,6 ± 0,1	63	23,8 %	23,5 ± 0,6	1,8 ± 0,2	63	4	1,6 %
<i>per-R345E-HA</i>	90,6 %	24,2 ± 0,1	2,8 ± 0,2	32	25,0 %	22,9 ± 0,9	1,6 ± 0,3	32	2	0 %
<i>per-R345E-c-myc</i>	83,9 %	24,1 ± 0,1	2,4 ± 0,2	32	22,6 %	24,1 ± 0,8	2,0 ± 0,3	31	2	3,1 %
<i>per-W482E</i>	93,8 %	24,0 ± 0,0	3,2 ± 0,1	64	18,8 %	24,1 ± 1,0	2,0 ± 0,2	64	4	0 %
<i>per-M560D</i>	98,4 %	24,1 ± 0,1	2,8 ± 0,1	64	31,3 %	23,2 ± 0,5	1,7 ± 0,2	44	4	0 %
<i>per-M560D-HA</i>	100 %	24,1 ± 0,1	2,9 ± 0,2	32	31,3 %	22,5 ± 0,7	1,9 ± 0,2	32	2	0 %
<i>per-M560D-c-myc</i>	96,9 %	24,2 ± 0,2	2,7 ± 0,2	32	31,3 %	24,4 ± 0,7	1,4 ± 0,3	32	2	0 %
<i>per-W482E-M560D</i>	95,2 %	24,0 ± 0,0	2,8 ± 0,2	63	25,5 %	25,1 ± 0,7	1,8 ± 0,2	63	4	1,6 %

Tabelle 3.2: Verhalten der *per*-Transformanten in LD und DD bei 18 °C. Verhaltensdaten von Transformanten, die im rekombinanten PER den gleichen Aminosäureaustausch tragen, wurden zusammengefasst. Ließ es die Datenmenge zu, wurden die Daten zusätzlich getrennt nach TAG dargestellt. Eine Auflistung der Verhaltensdaten, sortiert nach den einzelnen Fliegenlinien, befindet sich im Anhang (Tab.: A.2). rhy.: Anteil der rhythmischen Tiere in %, Per.: Periodenlänge in h ± SEM, RS: Rhythmicity Statistic ± SEM, n: Anzahl der Ausgewerteten Tiere, n (L.): Anzahl der getesteten Fliegenlinien.

Bedingungen	25 °C LD				25 °C DD					
	rhy.	Per.	RS	n	rhy.	Per.	RS	n	n (L.)	tot
<i>y per⁰¹ w</i>	29,2 %	24,5 ± 0,5	1,9 ± 0,2	24	0 %	-	-	24	1	0 %
<i>y w</i>	95,8 %	24,0 ± 0,1	2,3 ± 0,2	24	87,0 %	23,4 ± 0,2	2,9 ± 0,3	23	1	4,2 %
<i>wt-per</i>	88,9 %	24,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	36	86,1 %	23,5 ± 0,2	2,4 ± 0,2	36	4	0 %
<i>per-HA</i>	86,7 %	23,9 ± 0,1	2,0 ± 0,2	15	80,0 %	23,2 ± 0,4	2,4 ± 0,3	15	2	0 %
<i>per-c-myc</i>	90,5 %	24,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	21	90,5 %	23,7 ± 0,3	2,4 ± 0,2	21	2	0 %
<i>per-R345E</i>	65,7 %	24,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	108	18,5 %	24,0 ± 0,6	1,8 ± 0,1	108	14	0 %
<i>per-R345E-HA</i>	65,2 %	24,0 ± 0,2	1,6 ± 0,1	69	18,8 %	24,5 ± 0,8	1,7 ± 0,2	69	9	0 %
<i>per-R345E-c-myc</i>	66,7 %	24,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	39	17,9 %	23,0 ± 0,9	1,9 ± 0,2	39	5	0 %
<i>per-W482E</i>	56,9 %	24,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1	72	5,7 %	27,2 ± 1,0	1,8 ± 0,2	70	8	2,8 %
<i>per-M560D</i>	79,2 %	24,0 ± 0,1	2,5 ± 0,1	48	50,0 %	24,6 ± 0,3	2,6 ± 0,2	48	4	0 %
<i>per-M560D-HA</i>	87,5 %	24,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	16	37,5 %	23,4 ± 0,4	3,3 ± 0,6	16	2	0 %
<i>per-M560D-c-myc</i>	75,0 %	24,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	32	53,1 %	25,0 ± 0,4	2,4 ± 0,2	32	2	0 %
<i>per-W482E-M560D</i>	61,6 %	23,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1	112	5,4 %	24,9 ± 1,0	2,2 ± 0,2	112	14	0 %

Tabelle 3.3: Verhalten der *per*-Transformanten in LD und DD bei 25 °C. Verhaltensdaten von Transformanten, die im rekombinanten PER den gleichen Aminosäureaustausch tragen, wurden zusammengefasst. Ließ es die Datenmenge zu, wurden die Daten zusätzlich getrennt nach TAG dargestellt. Eine Auflistung der Verhaltensdaten, sortiert nach den einzelnen Fliegenlinien, befindet sich im Anhang (Tab.: A.2). rhy.: Anteil der rhythmischen Tiere in %, Per.: Periodenlänge in h ± SEM, RS: Rhythmicity Statistic ± SEM, n: Anzahl der Ausgewerteten Tiere, n (L.): Anzahl der getesteten Fliegenlinien.

Bedingungen	29 °C LD					29 °C DD						
	Genotyp	rhy.	Per.	RS	n	tot	rhy.	Per.	RS	n	tot	n (L.)
Kontrollen		57,0 %	24,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1	7	12,5 %	96,6 %	23,7 ± 0,1	4,4 ± 0,3	29	9,4 %	3
<i>wt-per</i>		78,1 %	24,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1	31	3,1 %	87,5 %	22,3 ± 0,1	3,5 ± 0,2	64	0 %	4
<i>per-HA</i>		93,3 %	24,0 ± 0,0	2,2 ± 0,2	15	6,3 %	90,6 %	22,1 ± 0,1	3,3 ± 3	32	0 %	2
<i>per-c-myc</i>		68,8 %	24,0 ± 0,1	1,9 ± 0,2	16	0 %	84,3 %	22,5 ± 0,1	3,8 ± 0,3	32	0 %	2
<i>per-R345E</i>		40,5 %	24,3 ± 0,21	1,6 ± 0,1	37	7,5 %	1,6 %	26,5	2,3	62	3,1 %	4
<i>per-W482E</i>		50,0 %	23,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1	28	12,5 %	0 %	-	-	61	4,7 %	4
<i>per-M560D</i>		79,3 %	24,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	29	9,4 %	57,8 %	23,6 ± 0,3	2,6 ± 0,2	64	0 %	4
<i>per-M560D-HA</i>		73,3 %	23,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	15	6,3 %	53,1 %	22,5 ± 0,3	2,7 ± 0,4	32	0 %	2
<i>per-M560D-c-myc</i>		85,7 %	24,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	14	12,5 %	62,5 %	24,6 ± 0,3	2,6 ± 0,3	32	0 %	2
<i>per-W482E-M560D</i>		21,9 %	24,2 ± 0,50	1,5 ± 0,2	32	0 %	6,7 %	27,1 ± 1,1	1,5 ± 0,2	60	6,3 %	4

Tabelle 3.4: Verhalten der *per*-Transformanten in LD und DD bei 29 °C. Verhaltensdaten von Transformanten, die im rekombinanten PER den gleichen Aminosäureaustausch tragen, wurden zusammengefasst. Ließ es die Datenmenge zu, wurden die Daten zusätzlich getrennt nach TAG dargestellt. Eine Auflistung der Verhaltensdaten, sortiert nach den einzelnen Fliegenlinien, befindet sich im Anhang (Tab.: A.2). rhy.: Anteil der rhythmischen Tiere in %, Per.: Periodenlänge in h ± SEM, RS: Rhythmicity Statistic ± SEM, n: Anzahl der Ausgewerteten Tiere, n (L.): Anzahl der getesteten Fliegenlinien.

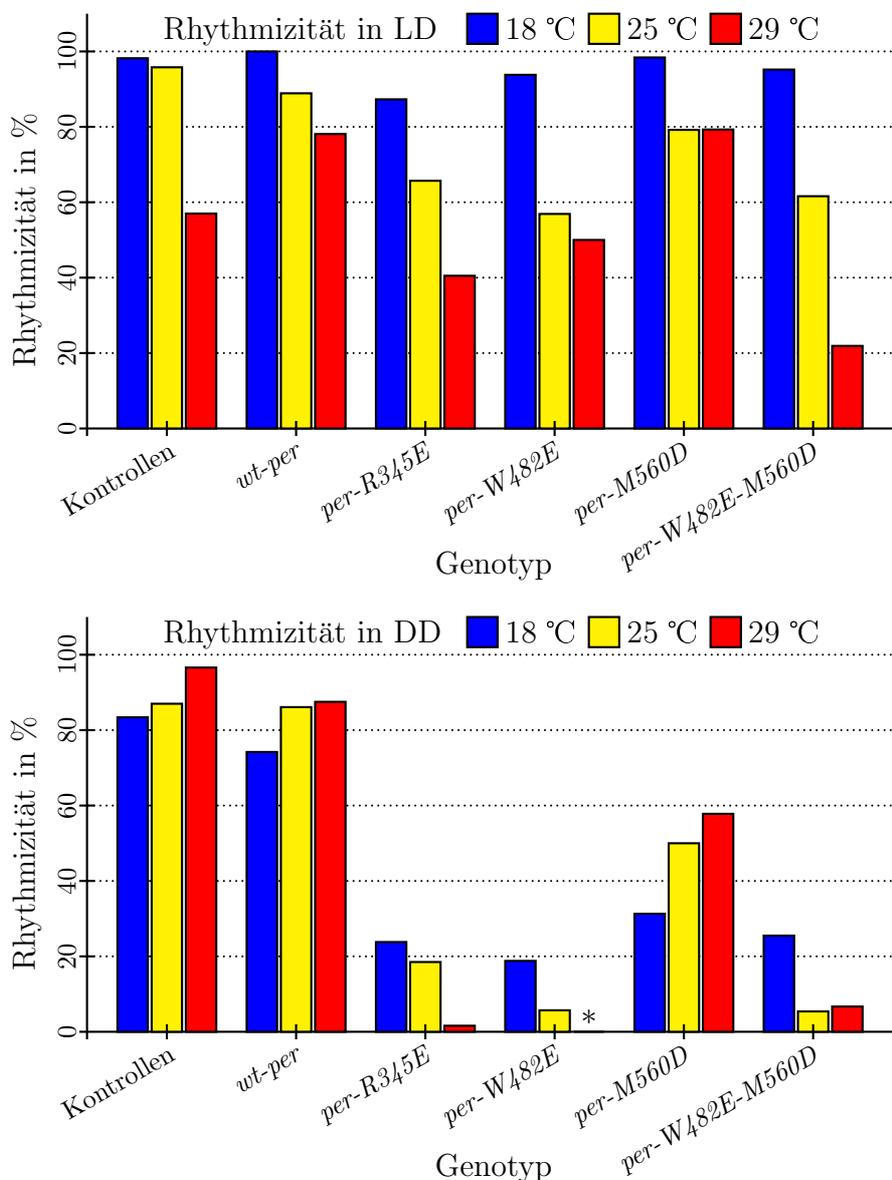


Abbildung 3.18: Rhythmizität der *per*-Transformanten *per*-HA/*c-myc*, *per*-R345E-HA/*-c-myc*, *per*-W482E-HA/*-c-myc* und *per*-W482E-M560D-HA/*-c-myc* in LD und DD in Abhängigkeit von der Temperatur. Tiere, deren Konstrukte den gleichen Aminosäureaustausch tragen, wurden zusammengefasst. Transformanten der Konstrukte *per*-I530A-HA/*-c-myc* werden in dieser Graphik nicht dargestellt, da die Rhythmizitäten der einzelnen Linien stark schwanken.

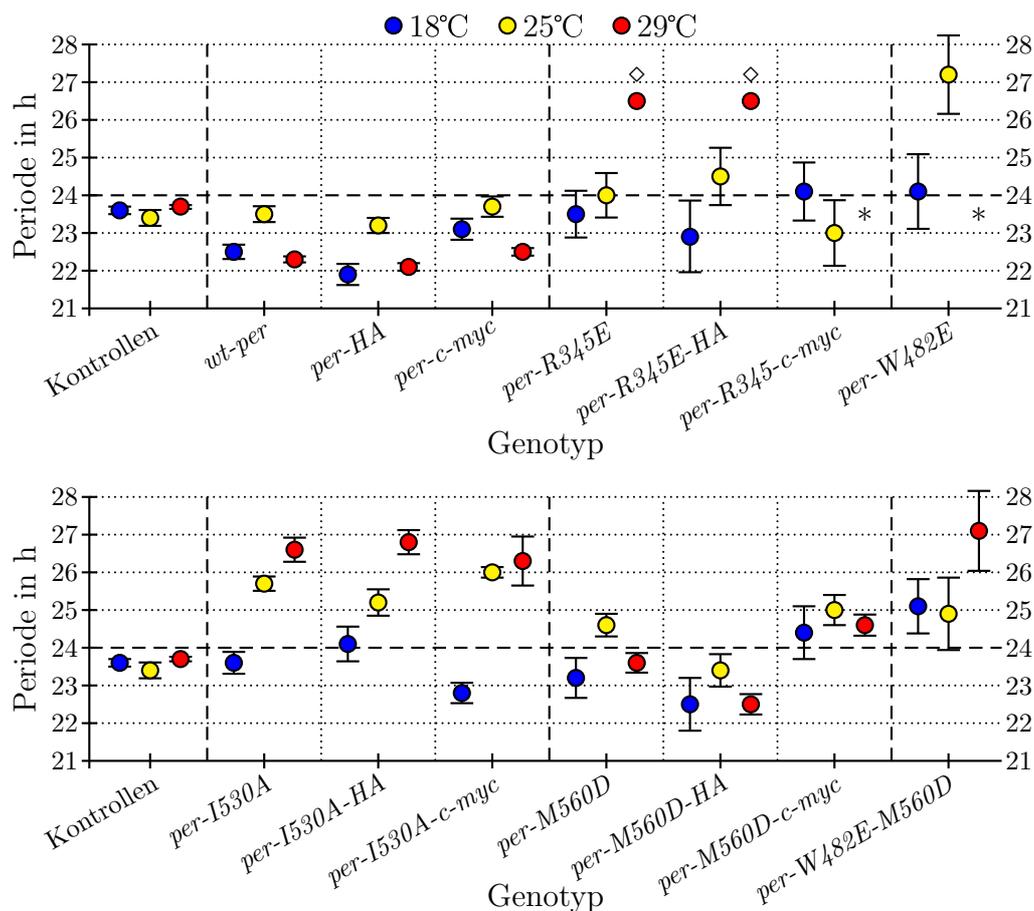


Abbildung 3.19: Periodenlänge der *per*-Transformanten in DD in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Daten von Transformanten mit gleichem Aminosäureaustausch in PER wurden zusammengefaßt. Zusätzlich erfolgte eine Darstellung getrennt nach TAG, wenn die Anzahl der rhythmischen Tiere diese Art der Auswertung zuließ.

3.2.6.5 Verhalten der Fliegenlinien mit mutiertem Nuclear Export Signal, I530A

Die Rhythmizitäten der einzelnen transgenen I530A-Fliegenlinien unterscheiden sich stark. Die Daten dieser Linien konnten daher nicht, wie bei den Linien der anderen Konstrukte, vereinigt werden. Für die Untersuchungen bei den Temperaturen 18 °C, 25 °C und 29 °C wurden die Linien 7-1 und 7-2 (*per-I530A-HA*), und 8-1 und 8-6 (*per-I530A-c-myc*) verwendet. Die Sterblichkeit der Tiere der Linie 8-6 ist jedoch bei 29 °C so hoch, dass in DD keine brauchbaren Daten gewonnen werden konnten. Bei 25 °C wurden zusätzlich zu 7-1, 7-2, 8-1 und 8-6 noch weitere Linien untersucht (siehe Tab. A.2). Aktogramme ausgewählter Tiere sind in Abb. 3.22 dargestellt.

Fliegenlinien, die im rekombinanten PER den Austausch I530A tragen, der ein, durch Sequenzanalysen vorhergesagtes Nuclear Export Signal (NES, Vielhaber *et al.*, 2001), mutiert, zeigen sowohl in LD als auch in DD ein auffälliges Verhalten. In LD zeigen die Tiere eine gute Synchronisation, die sich bei allen getesteten Temperaturen, in einem deutlichen Abendpeak der Laufaktivität widerspiegelt. Zu einem morgendlichen Laufaktivitätspeak kommt es nur bei 18 °C und 25 °C. Wie auch bei den *per-HA* / *-c-myc*-Tieren kommt es zu einer verstärkten Verlagerung der Laufaktivität in die Hellphase bei 18 °C und in die Dunkelphase bei 29 °C. Mit steigender Temperatur erfolgt jedoch eine Verschiebung, vor allem des Abendpeaks, nach hinten bis in die Dunkelphase. Bei 18 °C erreicht die abendliche Laufaktivität ihr Maximum mit dem Lichtwechsel und sinkt dann im Fall *per-I530A-HA* abrupt ab, bei *per-I530A-c-myc* nimmt die Aktivität in der Dunkelphase kontinuierlich ab. Der Morgenpeak von *per-I530A-HA* fällt mit dem Lichtwechsel zusammen, während im Vergleich dazu der Morgenpeak von *per-I530A-HA* nach vorne verschoben ist. Er hat sein Maximum bereits ~1 h vor Beginn der Lichtphase überschritten (Abb. 3.20). Bei 25 °C wird der Abendpeak im Vergleich zu den Kontrollen stärker nach hinten verlagert. Während bei *per-HA* / *c-myc*

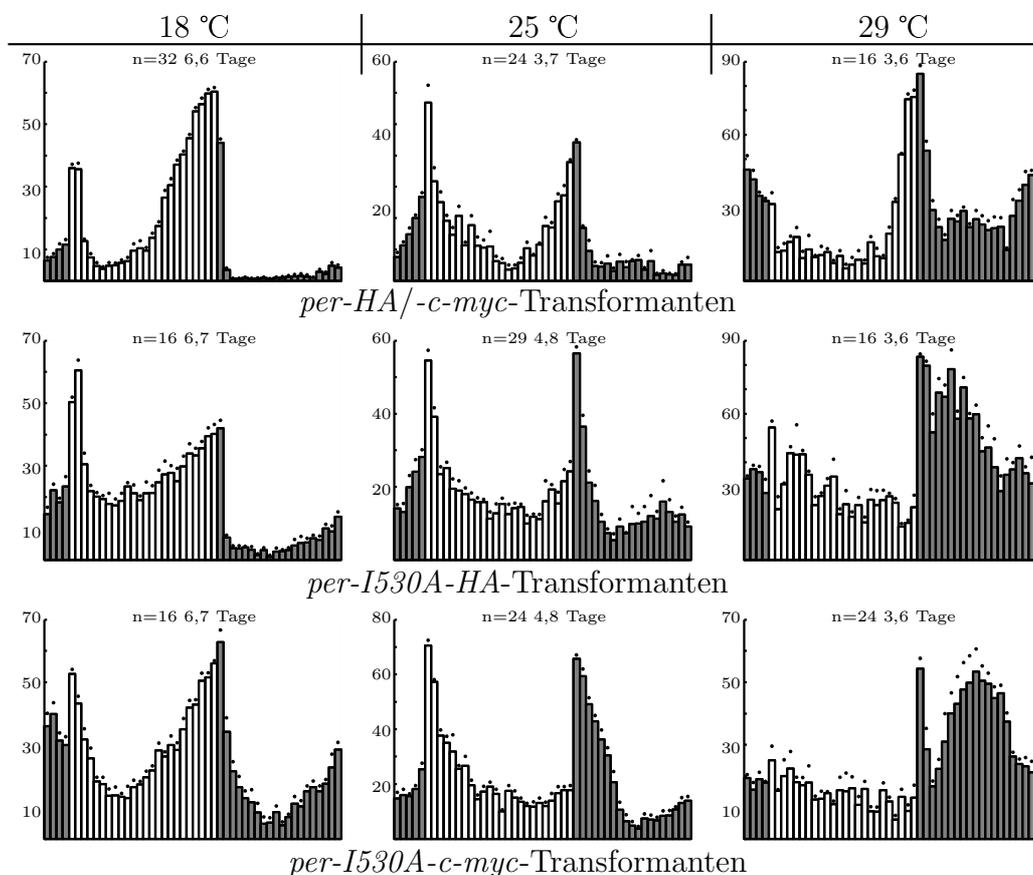


Abbildung 3.20: Daily Averages der Transformanten der *per*-Konstrukte bei den Temperaturen 18 °C, 25 °C und 29 °C. Zur Berechnung der Daily Averages wurden jeweils die Daten mehrerer Fliegenlinien vereinigt. *per-HA/-c-myc* 18 °C: 1-5-2, 1-8, 2-2-2, 2-6 *per-HA/-c-myc* 25 °C: 1-11, 2-2-1, 2-2-2, *per-HA/-c-myc* 29 °C: 1-5-2, 2-2-2, *per-I530A-HA* 18 °C und 29 °C: 7-1, 7-2, *per-I530A-HA* 25 °C: 7-4-1, 7-4-2, 7-6, 7-7, *per-I530A-c-myc* 18 °C: 8-1, 8-6, *per-I530A-c-myc* 25 °C: 8-1, 8-2, 8-3, *per-I530A-c-myc* 29 °C: 8-1, 8-3, 8-6.

die Antizipation bereits ca. 5 h vor dem Lichtwechsel einsetzt, beginnt sie bei *per-I530A-HA* ~3 h und bei *per-I530A-c-myc* ~2,5 h vorher. Bei Letzteren verschiebt sich der Abendpeak fast vollständig in die Dunkelperiode. Noch stärker ist diese Verschiebung bei 29 °C. Bei Beginn der Dunkelperiode kommt es sowohl bei *per-I530A-HA* als auch bei *per-I530A-c-myc* zu einer kurzen

Reaktion auf den Lichtwechsel durch erhöhte Laufaktivität. Diese Reaktion fällt jedoch nicht mit dem Abendpeak zusammen. Dieser erreicht sein Maximum erst 3 h (*per-I530A-HA*) und 5 h (*per-I530A-c-myc*) nach dem Lichtwechsel. Einen ähnlichen Phänotyp zeigen auch *per^L* Tiere, allerdings schon bei 25 °C (Hamblen-Coyle *et al.*, 1992). *per-I530A-c-myc*-Tiere zeigen bei dieser Temperatur keinen Morgenpeak, *per-I530A-HA*-Tiere zeigen nach dem Abendpeak noch zwei weitere kleine Aktivitätspeaks, die beide in der Dunkelphase stattfinden, und einen weiteren bereits in der Lichtphase. Es ist jedoch nicht erkennbar welcher dieser Peaks den Morgenpeak darstellt (Abb. 3.20).

Die Rhythmizität der Tiere in LD ist bei 18 °C und 25 °C relativ hoch. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 29 °C verursacht jedoch eine starke Abnahme des Anteils der rhythmischen Tiere. Besonders gravierend ist dies bei der Linie 8-6. Bei dieser Linie sinkt die Rhythmizität auf 33 % (n = 6) ab. Die RS-Werte aller vier Linien sinken mit steigender Temperatur in LD (Tab. 3.5).

In DD ist die Rhythmizität der getesteten Linien im Vergleich zu den Kontrollen reduziert (Ausnahme: 7-1, 100 % rhythmisch bei 25 °C). Besonders stark sind davon die Linien 7-2 und 8-6 betroffen. Bei 7-2 liegt der Anteil der rhythmischen Tiere bei 50 %, bei 8-6 unter 20 %. Bei allen Linien, mit Ausnahme der Linie 7-1, nimmt der Anteil der rhythmischen Tiere mit steigender Temperatur ab. Bei 7-1 steigt die Rhythmizität erst von ~ 70 % auf 100 % bei 25 °C, und sinkt dann bei 29 °C auf ~63 % (Tab. 3.5). In DD erreichen die RS-Werte bei 25 °C den jeweils höchsten Wert (Tab. 3.5).

Die Mutation des I530A hat außerdem einen starken Effekt auf die Temperaturkompensation. Während die Periodenlänge τ bei den Kontrollen über den Temperaturbereich von 18 °C bis 29 °C fast konstant bleibt, steigt τ in den Transformanten 7-1 und 8-1 mit steigender Temperatur drastisch. Es kommt zu einer Periodenverlängerung von 3,5 - 4 h (Tab. 3.5). Die tempe-

Bedingungen	LD					DD			
	Linie	rhy.	Per.	RS	n	rhy.	Per.	RS	n
18 °C	<i>per-I530A-HA</i> 7-1	100 %	23,9 ± 0,0	4,2 ± 0,2	16	68,8 %	23,2 ± 0,4	2,1 ± 0,2	16
25 °C	<i>per-I530A-HA</i> 7-1	100 %	24,1 ± 0,1	1,8 ± 0,2	8	100 %	25,5 ± 0,9	2,2 ± 0,3	8
29 °C	<i>per-I530A-HA</i> 7-1	62,5 %	24,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	8	62,5 %	27,1 ± 0,3	2,0 ± 0,2	16
18 °C	<i>per-I530A-HA</i> 7-2	93,8 %	24,2 ± 0,1	3,1 ± 0,3	16	50,0 %	25,4 ± 0,5	1,8 ± 0,1	16
25 °C	<i>per-I530A-HA</i> 7-2	87,5 %	24,2 ± 0,1	1,7 ± 0,2	8	25,0 %	27,8 ± 0,3	2,4 ± 0,9	8
29 °C	<i>per-I530A-HA</i> 7-2	71,4 %	23,0 ± 1,0	1,4 ± 0,3	7	16,7 %	25,4 ± 1,1	1,6 ± 0,0	12
18 °C	<i>per-I530A-c-myc</i> 8-1	100 %	24,0 ± 0,0	4,5 ± 0,2	15	66,7 %	22,7 ± 0,3	3,0 ± 0,3	15
25 °C	<i>per-I530A-c-myc</i> 8-1	100 %	24,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	8	62,5 %	25,4 ± 0,5	4,1 ± 0,8	8
29 °C	<i>per-I530A-c-myc</i> 8-1	75,0 %	24,4 ± 0,2	1,8 ± 0,2	8	46,1 %	26,2 ± 0,8	3,6 ± 0,6	13
18 °C	<i>per-I530A-c-myc</i> 8-6	81,3 %	24,3 ± 0,1	2,4 ± 0,3	16	18,8 %	23,3 ± 0,2	1,8 ± 0,1	16
25 °C	<i>per-I530A-c-myc</i> 8-6	75,0 %	23,9 ± 0,0	2,2 ± 0,2	8	12,5 %	25,5 *	1,6 *	8
29 °C	<i>per-I530A-c-myc</i> 8-6	33,3 %	25,2 ± 0,8	1,8 ± 0,6	6	keine Daten			

Tabelle 3.5: Verhalten der Transformanten der Konstrukte *per-I530A-HA/-c-myc*. Da sich die Rhythmizitäten der einzelnen Linien stark unterscheiden, wurden die Linien nicht zusammengefasst. Von der Linie 8-6 gibt es keine Daten von 29 °C, da alle Tiere vorzeitig verstarben.

raturabhängige Periodenverlängerung zeigt sich auch in der Darstellung des LD-Verhalten in Form des Daily Average. Mit steigender Temperatur kommt es zu einer Verschiebung des Abendpeaks in die Dunkelphase (siehe oben und Abb. 3.20). Bei den Linien 7-2 und 8-6 ist die Anzahl der rhythmischen Tiere zu gering, um eine Aussage über die Veränderung der Periodenlänge mit steigender Temperatur zu treffen.

Die Untersuchungen der Linien 7-1 und 8-1 zeigen folglich, dass die Temperaturkompensation der inneren Uhr der NES-Mutanten nicht mehr richtig funktioniert. Es handelt sich bei dem vorliegenden Effekt um eine Überkompensation, da die innere Uhr bei steigender Temperatur, nicht nur auf ~ 24 h verlangsamt wird, sondern stärker als eigentlich nötig. Dies führt zu der drastischen Periodenverlängerung, die sogar schon bei 25 °C deutlich in Erscheinung tritt (siehe Abb. 3.19).

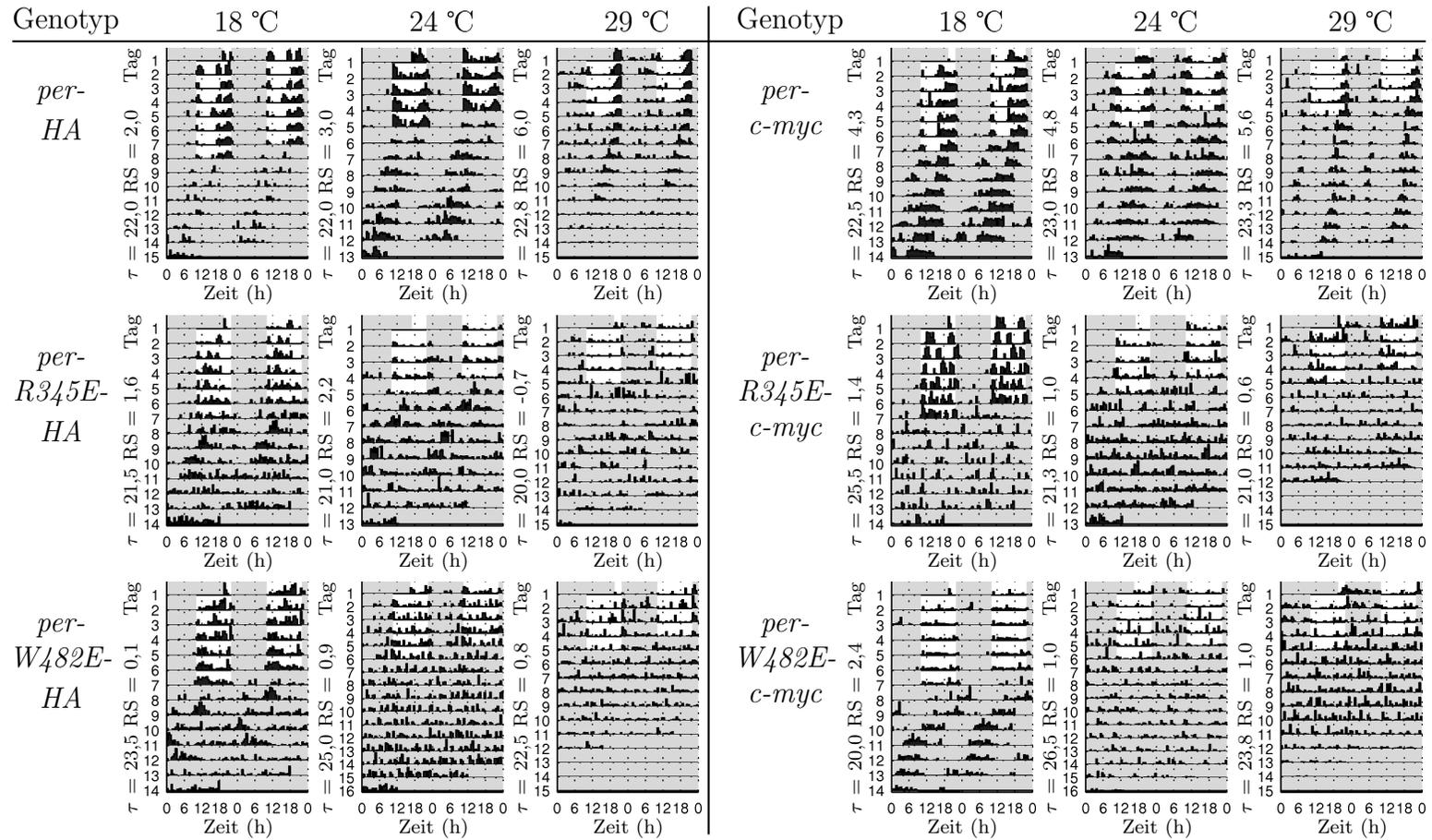


Abbildung 3.21: Aktogramme von Transformanten der Konstrukte *per-HA* (Linie 1-8), *per-c-myc* (Linie 2-6), *per-R345E-HA* (Linie 3-1), *per-R345E-c-myc* (Linie 4-4), *per-W482E-HA* (Linie 5-2) und *per-W482E-c-myc* (Linie 6-1).

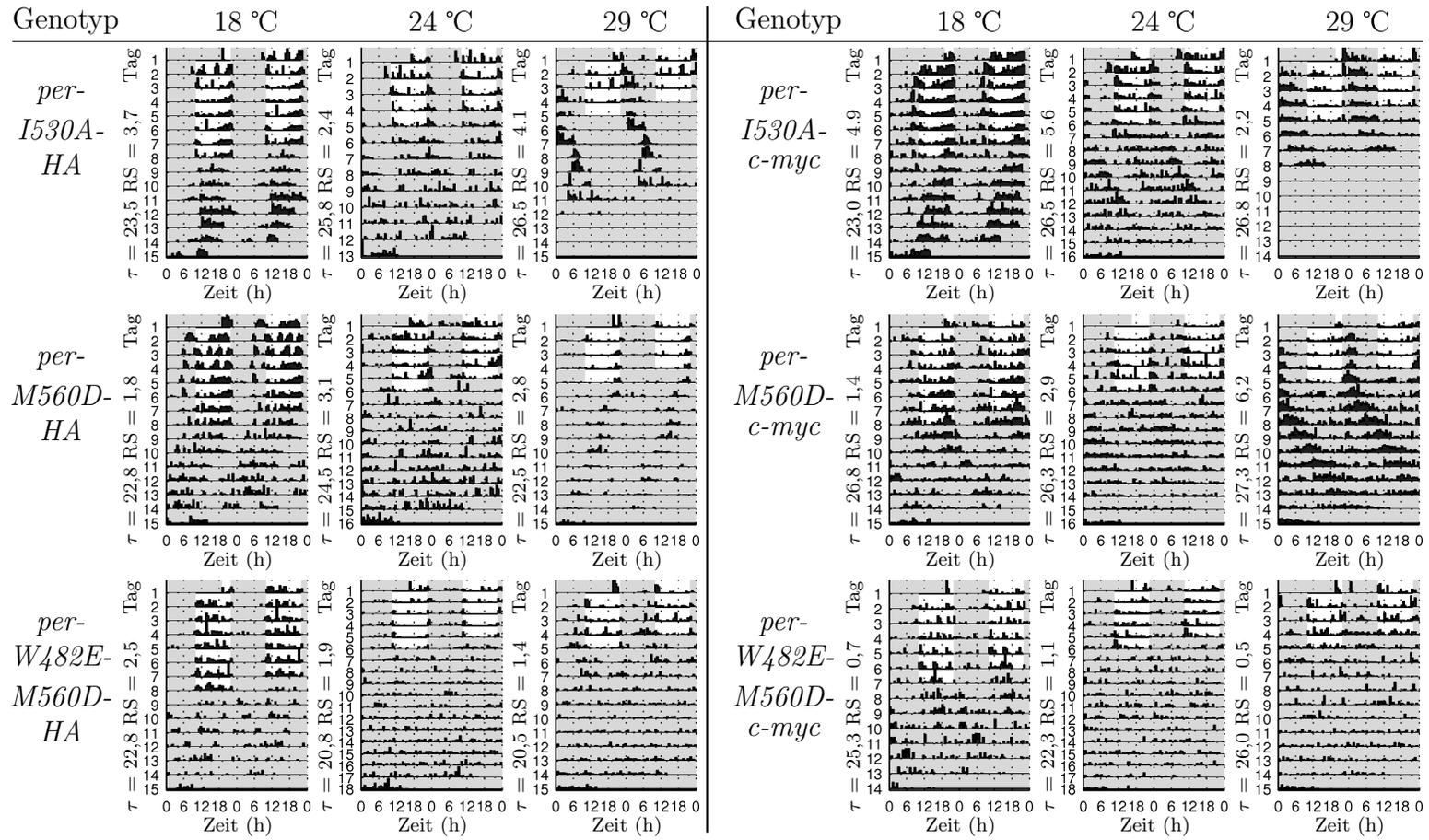


Abbildung 3.22: Aktogramme von Transformanten der Konstrukte *per-I530-HA* (Linie 7-1), *per-I530A-c-myc* (Linie 8-1), *per-M560D-HA* (Linie 9-4-2), *per-M560D-c-myc* (Linie 10-2-2), *per-W482E-M560D-HA* (Linie 11-6) und *per-W482E-M560D-c-myc* (Linie 12-1).

3.2.7 Untersuchung der zellulären PER-Lokalisation in der Nuclear Export Signal Mutante

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei dem Bereich der Aminosäuren 523-536 um ein Nuclear Export Signal (NES) handelt, wurde die zelluläre Lokalisation von PER-I530A-HA in Photorezeptorzellen der Retina bei 25 °C zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Lokalisation von PER-HA verglichen. Dazu wurden die Linien 1-5-2 (*per-HA*) und 7-1 (*per-I530A-HA*) verwendet, da beide Linien eine *P*-Insertion auf Chromosom 2 haben und außerdem das gleiche *tim*-Allel (*s-tim*) tragen. Je Linie wurden zu den Zeitpunkten ZT16, ZT17 und ZT18 5 Köpfe in einem Kryostaten horizontal geschnitten und die Schnitte mit einem präabsorbierten, polyclonalem PER-Serum gefärbt, wobei ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper verwendet wurde. In einem Blindtest bewerteten dann drei Personen unabhängig voneinander, ob in den Photorezeptorzellen der Retina das PER-Protein cytoplasmatisch, cytoplasmatisch und nuklear, oder nur nuklear lokalisiert ist.

Da die Fliegenlinien aufgrund der *P*-Element-Insertion rotäugig waren, zeigten die Schnitte eine starke Eigenfluoreszenz verursacht durch die Augenpigmente. Eine Unterscheidung zwischen cytoplasmatischer PER-Lokalisation und Hintergrund, verursacht durch diese Pigmente, war daher fast nicht möglich. Einzig eine Kernlokalisierung von PER ließ sich eindeutig bestimmen, da die Pigmente nicht im Kern lokalisiert sind und daher die Kerne nicht von der Hintergrundfärbung betroffen waren.

Es zeigte sich, dass zu den drei untersuchten Zeitpunkten das PER-Protein in der Kontrolllinie *per-HA* vorwiegend cytoplasmatisch vorliegt (Abb. 3.23 und 3.24). Eine eindeutige Kernfärbung ist bei keinem Zeitpunkt zu beobachten. Bei der NES-Mutante *per-I530A-HA* hingegen kommt es nur bei ZT17 zu einer eindeutigen Kernfärbung, die in allen 5 geschnittenen Köpfen sichtbar ist. Zum Zeitpunkt ZT16 ist noch keine Kernfärbung zu beobachten, und

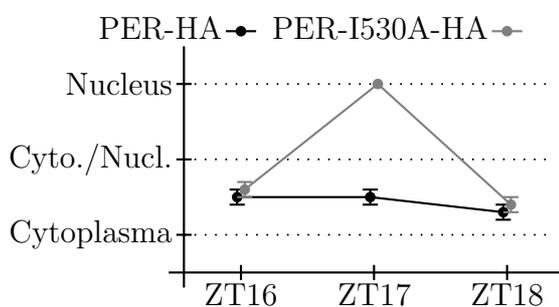


Abbildung 3.23: Graphische Darstellung der Lokalisation von PER-HA (Linie 1-5-2) und PER-I530A-HA (Linie 7-1) in Photorezeptorzellen zu den Zeitpunkten ZT16, ZT17 und ZT18. Pro Zeitpunkt wurde die Lokalisation von PER in einem Blindtest bestimmt (Kap.: 2.5.3). Cyto./Nucl.: PER-Färbung zu gleichen Teilen im Cytoplasma und Nukleus.

auch bei ZT18 sind nur noch wenige Kerne schwach gefärbt (Abb. 3.23 und 3.24).

In der Mutante I530A scheint das PER-Protein also sehr viel früher vom Cytoplasma in den Kern zu wechseln (ZT17), als bei der Kontrolle, bei der zu den untersuchten Zeitpunkten keine Kernlokalisation festgestellt wurde. Die Verweildauer von PER-I530A-HA im Kern ist jedoch nur sehr kurz, da eine Stunde später (ZT18) bereits keine Kernlokalisation mehr vorliegt. Das mutierte Exportsignal ermöglicht also eine verfrühte Kernlokalisation, die wahrscheinlich durch einen weiteren Kontrollmechanismus, beendet wird. Es kann jedoch anhand der immunhistologischen Färbungen keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Protein zwischen ZT17 und ZT18 abgebaut, oder zurück ins Cytoplasma transportiert wird.

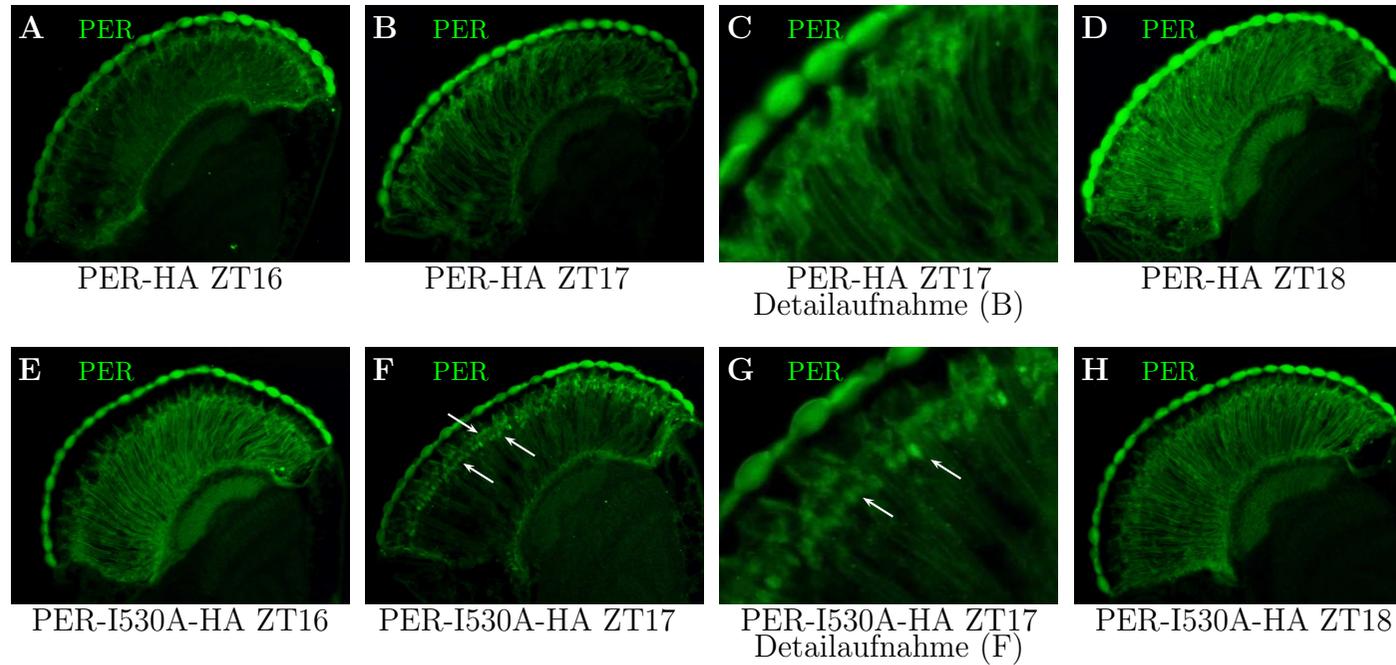


Abbildung 3.24: Immunhistologische PER-Färbungen von horizontalen Kryoschnitten der Retina zur Bestimmung der Lokalisation von PER-HA (A, B, C und D) und PER-I530A-HA (E, F, G und H) in Photorezeptorzellen zu den Zeitpunkten ZT16, ZT17 und ZT18. Die Pfeile in F markieren die zwei Reihen an gefärbten Zellkernen, die auf eine Kernlokalisierung von PER-I530A-HA zum Zeitpunkt ZT17 hinweisen. Bei PER-HA kommt zu keinem Zeitpunkt zu einer Kernlokalisierung. C und G sind vergrößerte Ausschnitte von B und F.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Untersuchung der *tim*-Allele *ls-tim* und *s-tim*

4.1.1 Zwei postulierte Isoformen von TIM werden tatsächlich exprimiert

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Landskron, 2002) wurde in einer *P*-Element-Mutagenese die Fliegenlinie 21-32 isoliert. Die Untersuchung der Expression des TIMELESS-Proteins durch Antikörperfärbungen auf Westernblots ergab ein von den Kontrollstämmen abweichendes Bandenmuster. Im Gegensatz zu den Kontrollen *y w* und *X-90* (Stempfl *et al.*, 2002) zeigte die Linie 21-32 zwei TIM-Banden. Eine schwache Bande läuft auf der Höhe der Bande der Kontrollen und eine zweite, stärkere Bande läuft etwas oberhalb (siehe Abb. 3.1). Diese zweite Bande wurde zunächst auf eine Hyperphosphorylierung des TIM-Proteins in diesen Tieren, verursacht durch eine *P*-Insertion vor dem Gen *CG6328*, zurückgeführt.

Untersuchungen der Defizienz *Df(3R)e-H4* dieses Gens legen jedoch den Verdacht nahe, dass *CG6328* nicht für diesen Phänotyp verantwortlich sein kann,

da das TIM-Bandenmuster der defizienten Tiere mit $y w$ identisch ist. Daraufhin wurde aus 21-32 ein revertanter Stamm (Rev.14) erzeugt, bei dem das $P[w^+]^{21-32}$ entfernt wurde, ohne eine Mutation am Insertionsort zurückzulassen. Auf Anti-TIM-Westernblots mit Kopfextrakten dieser Linie zeigt sich jedoch das gleiche Bandenmuster, wie beim Ausgangsstamm 21-32. Dies bestätigte das Ergebnis aus der Untersuchung der Defizienz $Df(3R)e-H4$, dass $CG6328$ nicht für den TIM-Phänotyp verantwortlich sein kann. Da das revertante 3. Chromosom homozygot ebenfalls Sterilität verursacht, besitzt dieses Chromosom offensichtlich eine weitere Mutation.

Sequenzanalysen der Kontrollen, sowie der Linie 21-32, der Defizienz und der Revertante zeigten, dass alle Linien, die zwei TIM-Banden verursachen, das Allel $ls-tim$, und alle Linien die nur eine Bande zeigen, das Allel $s-tim$ tragen. Schon vor 10 Jahren wurde aufgrund von Sequenzvergleichen des tim -Lokus unterschiedlicher Fliegenstämme vermutet, dass es zwei TIM-Isoformen gibt, die sich in ihrer Länge um 23 Aminosäuren unterscheiden (Rosato *et al.*, 1997). Das Allel $ls-tim$ ist danach in der Lage sowohl L-TIM mit 1421 Aminosäuren, als auch S-TIM mit 1398 Aminosäuren zu exprimieren, $s-tim$ Tiere dagegen exprimieren nur das Protein S-TIM. Es schien daher klar, dass es sich bei den beiden Banden um die beiden Isoformen L-TIM und S-TIM handelt.

Bestätigt wurde diese Annahme durch Westernblots der Wildtyplinie *CantonS*, der natürlichen Linien *GAB*, *ATDD*, *Nov75* und *B16* und der Transformatanten *T28S*, *T30S*, *T27L*, *T29L* und $P[LS-TIM]$, die im Rahmen einer Kooperation mit der Universität Leicester untersucht wurden (Sandrelli *et al.*, 2007). *CantonS* trägt das Allel $ls-tim$ und zeigt ebenfalls beide Banden, L-TIM und S-TIM auf Westernblots. Außerdem konnte durch eine Dephosphorylierung der Proteine das Laufverhalten der oberen Bande nicht verändert werden, was eine Hyperphosphorylierung ausschließt (siehe Abb. 3.4). Bei den Linien der Arbeitsgruppe aus Leicester war es möglich in einem Blindtest

den Genotyp anhand der Westernblotanalyse zuzuordnen (siehe Abb. 3.5). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die beiden postulierten Isoformen L-TIM und S-TIM (Rosato *et al.*, 1997) existieren und auf Westernblots unterschieden werden können (Sandrelli *et al.*, 2007).

4.1.2 Durch die Mobilisierung des *P*-Elements während der *P*-Mutagenese wurde das *ls-tim*-Allel eingekreuzt

Es stellt sich nun natürlich die Frage, wieso besitzt ausgerechnet die Linie 21-32 ($y w ; ; P[w^+]^{21-32}$) im Gegensatz zu $y w$ das Allel *ls-tim*? Die Antwort liegt in der Durchführung der Mutagenese. Mit dem Konstrukt *pTrap-luc* wurden vor meiner Diplomarbeit durch DNA-Mikroinjektion transgene Fliegenlinien erzeugt. Die Injektion fand jedoch nicht, wie in Kap. 2.2.4 beschrieben, in Embryonen des Genotyps $y w ; ; \frac{Ki \Delta 2-3}{+}$ statt, sondern in $y w$ unter Verwendung eines Transposase-Helperplasmids, das mitinjiziert wurde. Bei dieser Transformation entstand die Linie *pTrap9(x)* mit einer Insertion auf dem *X*-Chromosom. Nach der Injektion wurde mit der Balancierung dieser Linie begonnen, wobei zuerst 2. chromosomale Marker verwendet wurden. Da es sich jedoch um eine *X*-chromosomale Insertion handelte wurden die Marker unter Verwendung von $y w$ ausgekreuzt. Die Starterlinie der *P*-Element-Mutagenese *pTrap9(x)* ist daher *s-tim*, wie $y w$.

Die Linie 21-32 entstand durch eine Remobilisierung von *pTrap-luc* durch Einkreuzen der Transposase ($y w ; ; Ki \Delta 2-3$). Die erneute Insertion fand auf Chromosom 3 statt und wurde daher mit $y w ; ; \frac{H}{TM3}$ balanciert. Sowohl der Transposasestamm, als auch der 3. chromosomale Balancerstamm tragen jedoch das *ls-tim*-Allel homozygot auf Chromosom 2. Auf diese Weise wurde während der Mutagenese das Allel *ls-tim* in den Stamm 21-32 eingekreuzt.

4.1.3 Die zufällige Verteilung der Allele ermöglichte deren Entdeckung

Da die Linie 21-32 den genetischen Hintergrund von *y w* auf dem *X*-Chromosom trägt, wurden als Kontrolle für die Westernblotanalysen zwei Linien verwendet, die ebenfalls *y w* tragen, der Ausgangsstamm *y w* selbst, sowie eine andere *P*-Element-Transformante *X-90*, die aufgrund der *P*-Insertion wie 21-32 rotäugig ist. Diese Kontrolllinien tragen jedoch beide, im Gegensatz zu 21-32, das *s-tim*-Allel. Wäre von Anfang an z.B. die Linie *CantonS* (*ls-tim*) verwendet worden, so wäre kein Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante bemerkt worden.

Die erzeugte Revertante, konnte nur das *ls-tim*-Allel tragen, da alle an den Kreuzungen zur Herstellung beteiligten Linien ausschließlich dieses Allel tragen. Hätte entweder die Balancerlinie oder der Transposasestamm das *s-tim*-Allel, so hätte es sich auch in der Revertante etablieren können. Folgende Experimente hätten dann zu der Vermutung geführt, dass die *P*-Insertion tatsächlich für die zweite TIM-Bande auf Westernblots verantwortlich ist, da die Revertante dann, aufgrund des *s-tim*-Allels, ein mit den Kontrollen (*y w* und *X90*) identisches TIM-Bandenmuster gezeigt hätte. Ein glücklicher Zufall war es auch, dass die 3. chromosomale Defizienz auf dem 2. Chromosom das Allel *s-tim* trägt. Somit konnte eine Mutation des Gens *CG6328* als Ursache ausgeschlossen werden, da die Defizienz nicht den Phänotyp der vermeintlichen Mutation zur Folge hatte.

Diese Verteilung der zwei Allele *ls-tim* und *s-tim* ermöglichte damit die Entdeckung ihrer Expression durch Proteinanalysen auf Westernblots, wobei zunächst eine Mutation in einem anderen Gen (*CG6328*) als Ursache vermutet wurde. Es war jedoch wiederum die Verteilung der beiden *tim*-Allele, die *CG6328* ausschloss und den Verdacht schließlich auf die beiden postulierten Isoformen von TIM lenkte, deren Existenz dadurch in dieser Arbeit erstmalig bewiesen werden konnte (Sandrelli *et al.*, 2007).

4.1.4 *ls-tim* macht fit für den Winter

Die Verteilung der beiden Allele *s-tim* und *ls-tim* in Stämmen, die aus Fliegen generiert wurden, die an verschiedenen Orten in Europa und Afrika gefangen wurden, zeigt, dass das *ls-tim*-Allel in Europa aus *s-tim* entstanden ist. Das Allel *ls-tim* ist wahrscheinlich kurz nach der Einwanderung von *Drosophila melanogaster* aus Afrika, nach der letzten Eiszeit vor ca. 10.000 Jahren, in Südeuropa entstanden. Im Gegensatz zu *s-tim*, ermöglicht es den Weibchen bei kühleren Temperaturen, trotz einer vergleichsweise langen Tageslänge, die reproduktive Diapause zur Überwinterung zu beginnen. Dies erhöht die Überlebenschancen, der Adulten und des Nachwuchses bei den kalten Temperaturen in Herbst und Winter. Diese Anpassung, verursacht durch *ls-tim* bietet damit einen Vorteil in Europa, vor allem in Nordeuropa, gegenüber *s-tim*, der zu einer relativ schnellen Ausbreitung in Europa geführt hat. Der Prozess der Ausbreitung ist jedoch noch nicht abgeschlossen, wie die derzeitige Momentaufnahme der Verbreitung der Allele schließen lässt. Obwohl die Fitness von *ls-tim*-Fliegen mit steigender geographischer Breite auch steigt, nimmt die Verbreitung von *ls-tim* gegenüber *s-tim* mit zunehmender Breite ab (Tauber *et al.*, 2007).

Molekularbiologische Untersuchungen der beiden Isoformen zeigen, dass L-TIM im Vergleich zu S-TIM, aufgrund einer verringerten Interaktion mit dem circadianen Photorezeptor CRY, weniger lichtempfindlich ist (Sandrelli *et al.*, 2007). Dies zeigen auch die Untersuchungen des Gens *jet*, das im circadianen System an der Übertragung der Lichtinformation beteiligt ist. Nur im genetischen Hintergrund von *ls-tim* findet in der *jet^c*-Mutante keine normale Reaktion auf Licht mehr statt. Liegt die *jet^c*-Mutation in Kombination mit dem lichtsensitiverem *s-tim*-Allel vor, kann trotzdem eine Übertragung der Lichtinformation stattfinden (Peschel *et al.*, 2006).

4.2 Untersuchung der *per*-Transformanten

4.2.1 Die Funktion des PER:PER-Homodimers

4.2.1.1 Die *per*-Konstrukte ohne Basenaustausch retten den *per*⁰-Phänotyp gut

Die Untersuchung der Transformanten der *per*-Konstrukte, die PER-HA und PER-C-MYC exprimieren, zeigte, dass beide Konstrukte in der Lage sind, den *per*⁰-Phänotyp, verursacht durch den *y per*⁰¹ *w*-Hintergrund, gut zu retten. Die Menge des in Fliegenköpfen exprimierten, rekombinanten PER entspricht weitgehend der Menge, die auch in *per*⁺-Tieren festgestellt werden kann. Wie das wildtypische PER, unterliegen die rekombinanten Proteine einer circadianen Schwankung, was die Proteinmenge und die -phosphorylierung betrifft. Die Phase der Oszillationen ist jedoch im Vergleich zu *per*⁺-Tieren nach vorne verschoben. Das rekombinante PER wird außerdem nicht ganz so stark phosphoryliert, wie das Wildtypische. Die rekombinanten Proteine sind in der Lage zum Zeitpunkt ZT20 sowohl einen Homodimer, als auch einen Heterodimer mit TIMELESS zu bilden, was in den CoIP-Experimenten eindeutig gezeigt werden konnte (Abb. 3.13). Die CoIP wurde mit einem an Beads gebundenem C-MYC-Antikörper durchgeführt, der Nachweis der Homodimerisierung erfolgte mit einem HA-Antikörper. Da der C-MYC-Antikörper auf Westernblots die C-MYC-getagten Proteine nur schlecht bindet, war eine Abschätzung der Menge des Homodimers in Bezug auf die gesamte PER-Menge nur schwer möglich. Auch kann anhand der durchgeführten Experimente keine Aussage darüber getroffen werden, ob einer der möglichen „Homodimere“ bevorzugt gebildet wird. Würden sich bevorzugt PER-HA:PER-HA- und PER-C-MYC:PER-C-MYC-Dimere bilden, würde das das Ergebnis der CoIP, mit der nur PER-HA:PER-C-MYC nachweisbar sind, verfälschen. Da das Signal des präzipitierten PER-C-

MYC jedoch, auch unter Berücksichtigung der PER-C-MYC:PER-C-MYC-Homodimere, wahrscheinlich wesentlich stärker als das des copraezipitierten PER-HA ist, ist die Menge an Homodimer eher gering. Zu diesem Ergebnis kam auch eine frühere Studie (Zeng *et al.*, 1996).

Auch im Lokomotorverhalten zeigen die Transformanten der Konstrukte in LD und DD ein *per*⁺-ähnliches Verhalten. Die Konstrukte *per-HA* und *per-c-myc* retten den *per*⁰¹-Phänotyp im Lokomotorverhalten sehr gut. In DD ist die Rhythmizität der Transformanten im Vergleich zu den Kontrollen zwar leicht reduziert, aber das Verhalten in LD und DD unterliegt bei verschiedenen Temperaturen in Bezug auf Anteil der rhythmischen Tiere und Signifikanz der Rhythmen (RS) den gleichen Trends wie die Werte der Kontrollen. Lediglich die Temperaturkompensation weicht leicht von den Kontrollen ab, ist jedoch noch funktionell. Bei 25 °C liegt die Periode am nächsten bei 24 h. Sowohl eine Erhöhung, als auch eine Erniedrigung der Temperatur hat eine Verkürzung der Periode zur Folge. Die Art des TAGs beeinflusst ebenfalls die Freilaufperiode. Tiere mit *HA*-TAG zeigen allgemein eine kürzere Periode, als Tiere mit *c-myc*-TAG.

4.2.1.2 Der Aminosäureaustausch M560D schwächt die Rhythmizität des Lokomotorverhaltens und die Homodimerisierung

Der Aminosäureaustausch des Methionin an der Position 560 in ein Aspartat hat einen Phänotyp zur Folge, der stark von *per*⁺ abweicht. Die PER-Menge in Fliegenköpfen ist im Vergleich zu *per*⁺-Tieren reduziert und unterliegt keinen ausgeprägten circadianen Änderungen in Bezug auf die Proteinmenge. Lediglich der Grad der Phosphorylierung ändert sich rhythmisch. Die Schwankungen sind jedoch sehr viel schwächer, als bei der Kontrolle (*y w*) und das Protein scheint ständig phosphoryliert zu sein (Abb. 3.9). Obwohl ein Homodimer aus rekombinanten PER-Proteinen mittels CoIP kaum nachweisbar

ist, ist die Dimerisierung mit TIM von der Mutation M560D nicht betroffen. Die Homodimerisierung ist damit keine Voraussetzung für die Dimerisierung mit TIM. Die Schwächung des Homodimers bestätigt die Strukturvorhersage (Yildiz *et al.*, 2005), die dem Methionin M560 (α F-Helix) eine zentrale Bedeutung in der Homodimerisierung als Interaktionspartner von Valin V243 (PAS-A Domäne, in *per^L* zu einem Aspartat mutiert) zuspricht.

Die Mutation M560D beeinträchtigt die Rhythmik des Lokomotorverhaltens der Transformanten erheblich. Während der Anteil der rhythmischen Tiere in LD in etwa dem der Kontrollen entspricht, ist dieser in DD zwischen 40 % und 50 % reduziert. Auch die Freilaufperiodenlänge ist im Vergleich zu den Transformanten der Konstrukte *per-HA/-c-myc* um ca. 1 h verlängert, wobei die *-c-myc*-Konstrukte eine etwas längere Periode aufweisen, als die *-HA*-Konstrukte (siehe oben). Auch unterliegen die Rhythmizität, der RS und die Periodenlänge bei einer stufenweisen Temperaturerhöhung von 18 °C auf 29 °C den gleichen Trends wie bei den Transformanten der Konstrukte *per-HA/-c-myc*. Die Temperaturkompensation ist also durch die Mutation nicht beeinträchtigt. Dies steht im Widerspruch zu der Erwartung, dass die Mutation des Interaktionspartners von V243 den gleichen Phänotyp erzeugt wie die Mutation V243D (*per^L*), denn die *per-M560D*-Transformanten zeigen keinen *per^L*-Phänotyp. Eine Erhöhung der Temperatur von 25 °C auf 29 °C hat keine Periodenverlängerung wie bei *per^L*, sondern im Gegenteil, eine Periodenverkürzung zur Folge.

4.2.1.3 Die Austausch R345E, W482E und die Doppelmutante W482E-M560D verursachen einen *per⁰*-ähnlichen Phänotyp

Laut der Strukturaufklärung der PAS-Domänen von PER (Yildiz *et al.*, 2005) wird durch die Mutation des Arginin345 in ein Glutamat im Homodimer eine Salzbrücke zwischen der PAS-A (R345) des einen Moleküls und der α F-Helix

(E566) des anderen Moleküls zerstört. Die Mutation von Tryptophan482 in ein Glutamat stört die Homodimerisierung, da sich die Seitenketten der Tryptophane beider Moleküle nicht mehr in eine hydrophobe Tasche des jeweils anderen Moleküls einlagern können. In der Doppelmutante W482E-M560D sind damit sowohl die Interaktionen, die durch die beiden hydrophoben Taschen vermittelt werden, als auch eine Interaktion zwischen der PAS-A und der α F beeinträchtigt.

Bei diesen drei mutanten Konstrukten wurde zu Beginn dieser Arbeit davon ausgegangen, dass sie einen ähnlichen Phänotyp wie die Konstrukte mit der Mutation M560D verursachen würden. Der stärkste Effekt wurde dabei bei der Doppelmutante erwartet. Der Phänotyp, den diese Mutanten verursachen, ist jedoch wesentlich gravierender als der Phänotyp der *per-M560D*-Transformanten.

In Kopfextrakten dieser Transformanten lassen sich nur noch geringe Mengen des PER-Proteins durch Westernblotanalysen nachweisen. Die geringste Menge zeigen im Schnitt Transformanten der Doppelmutante. Eine daraufhin durchgeführte Untersuchung der mRNA-Menge in ausgesuchten Fliegenlinien ergab, dass die Transkription der Konstrukte dafür nicht verantwortlich sein kann. Die Konstrukt-mRNA-Menge bei ZT15 in Fliegenköpfen der Linie 12-1 (*per-W482E-M560D-c-myc*) ist sogar etwas höher als in der Linie 2-2-2 (*per-c-myc*), bei der eine wildtypische PER-Menge auf Westernblots nachgewiesen werden kann. Die stark verringerte Proteinmenge wird also eindeutig durch die Aminosäureaustausche in den rekombinanten PER-Proteinen verursacht. Mögliche Dimerisierungen der PER-Proteine konnten aufgrund dieser geringen PER-Mengen mittels CoIP nicht untersucht werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die PER-Proteine mit R345E, W482E und W482E-M560D weder durch PER ohne Mutation stabilisiert werden können, noch selbst „wildtypisches“ PER destabilisieren. Dies kann darauf hinweisen, dass diese Mutationen eine Dimerisierung verhindern oder

stark abschwächen.

Das Lokomotorverhalten der transgenen Tiere bestätigt die Ergebnisse der molekularen Untersuchungen. Die Tiere zeigen sowohl in LD, als auch in DD weitgehend arhythmisches Verhalten. In LD beschränkt sich das rhythmische Verhalten der meisten Tiere, wie auch bei *y per⁰¹ w* auf eine Reaktion auf den Lichtwechsel. In DD ist die Rhythmizität sehr gering mit jeweils dem höchsten Wert bei 18 °C. Bei einer stufenweisen Temperaturerhöhung von 18 °C auf 29 °C unterliegen die Werte der Rhythmizität und des RS jedoch, anders als bei M560D, nicht den Trends von *per-HA/-c-myc*-Tieren. Mit steigender Temperatur sinken diese Werte noch weiter ab. Auch scheinen diese Tiere einen Defekt in der Temperaturkompensation zu haben, da, außer bei *per-R345E-c-myc*-Transformanten, mit steigender Temperatur auch die Periodenlänge steigt.

Der Phänotyp, der von den Konstrukten *per-R345E-HA/-c-myc*, *per-W482E-HA/-c-myc* und *per-W482E-M560D-HA/-c-myc* verursacht wird, ist damit sehr extrem und liegt näher bei *per⁰* als bei *per-M560D-HA/-c-myc*. Da die Phänotypen der Transformanten von *per-W482E-HA/-c-myc* und *per-W482E-M560D-HA/-c-myc* fast identisch sind, und stark vom Phänotyp der *per-M560D-HA/-c-myc*-Transformanten abweichen, ist der Phänotyp der Doppelmutante wohl hauptsächlich auf den Austausch W482E zurückzuführen.

4.2.1.4 Die PER-TIM-Interaktion kann für die unterschiedlichen Phänotypen verantwortlich sein

Was also verursacht diesen gravierenden Unterschied im Phänotyp? Zunächst wurde angenommen, dass die Homodimerisierung von PER vor allem das PER-Protein stabilisiert und damit vor dem Abbau schützt. Eine vollständige Verhinderung der Homodimerisierung hätte danach einen fast vollständigen Abbau von PER zur Folge. Es ist durch die CoIP-Experimente ja gezeigt,

dass PER-M560D doch noch dazu in der Lage ist, einen geschwächten Homodimer zu bilden, der PER vielleicht ausreichend vor dem vollständigen Abbau schützt. In den 3 anderen Mutanten, besonders in der Doppelmutante, könnte die Schwächung des Homodimers dagegen so stark sein, dass er gar nicht mehr gebildet wird, und PER deshalb so instabil ist, dass es fast vollständig abgebaut wird. Dagegen spricht jedoch die Menge des gebildeten Homodimers von PER ohne Mutation, die ja im Vergleich zur Gesamt-PER-Menge relativ gering zu sein scheint (siehe Kap. 3.2.5.3, Zeng *et al.*, 1996). Wenn der Homodimer tatsächlich für die Stabilität von PER verantwortlich ist, würde man einen höheren Anteil des PER:PER-Homodimers erwarten. Auch zeigen Experimente mit PER-Fragmenten dass der Austausch M560D den Homodimer in Gelfiltrations- und Ultrazentrifugationsanalysen, im Vergleich zu W482E stärker schwächt, während bei W482E-M560D keine Homodimerisierung nachgewiesen wurde. PER-Fragmente, sowohl mit dem Austausch W482E, als auch M560D liegen in der Gelfiltration als Homodimer vor. Die Dissoziantionskonstante, die sich aus der Ultrazentrifugation ergab, ist jedoch bei W482E mit $3,85 \mu\text{M}$ deutlich geringer als $7,14 \mu\text{M}$ bei M560D. Bei PER ohne Mutation beträgt diese $0,2 \mu\text{M}$ (Eva Wolf, unpublizierte Daten). Demnach müsste die PER-Menge in *per-M560D-HA/-c-myc*-Tieren aufgrund des schwächeren Homodimers eher geringer sein, als in den *per-W482E-HA/-c-myc*-Transformanten, was jedoch nicht der Fall ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Homodimer allein für diesen Unterschied der Phänotypen, vor allem den starken Unterschied in der PER-Menge und der Temperaturkompensation, nicht verantwortlich sein kann.

Die Aminosäuren R345 und W482 liegen beide in Regionen von PER, für die in früheren Studien gezeigt wurde, dass sie für die Interaktion mit TIM wichtig sind. R345 liegt in der PAS-A Domäne von PER, einem Bereich für den eine Interaktion mit TIM in Hefe mittels Yeast-two-Hybrid-System und *in vitro* mittels eines *Glutathion-S-transferase*-Fusionsproteins von PER

(GST-PER) gezeigt wurde (Gekakis *et al.*, 1995). Mit dem gleichen System wurde ein Jahr später die Interaktion der Cytoplasmatic Localization Domain (CLD) von PER mit TIM nachgewiesen (Saez and Young, 1996). Ungefähr in der Mitte dieser Domäne liegt W482. Es ist also gut möglich, dass die Austausch R345E und W482E nicht nur die Homodimerisierung von PER betreffen, sondern auch die Heterodimerisierung mit TIM.

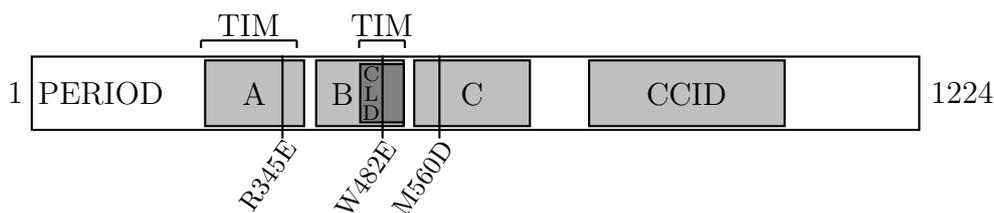


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Aminosäureaustausche R345E, W482E und M560D in PER in Bezug auf die TIM-Interaktionspunkte. Über dem Protein sind die beiden Interaktionsdomänen von PER mit TIM dargestellt. A: PAS-A, B: PAS-B, CLD: Cytoplasmatic Localization Domain, C: C-Domain, CCID: CLOCK:CYCLE Inhibition Domain.

Dies könnte auch bedeuten, dass PER vielleicht entweder einen Homodimer, oder einen Heterodimer mit TIM bildet, aber nicht einem PER:PER:TIM-Komplex. Es ist eher unwahrscheinlich, dass die beiden Tryptophane 482, die im Homodimer jeweils in die hydrophobe Tasche des anderen PER-Proteins ragen (Yildiz *et al.*, 2005) gleichzeitig auch an der Heterodimerisierung mit TIM beteiligt sind. Von den beiden Argininen 345 ist jedoch nur eines an der Homodimerisierung beteiligt, da im Homodimer nur ein α F-Interface gebildet wird (Yildiz *et al.*, 2005). Das andere Arginin wäre damit vielleicht verfügbar für andere Interaktionen. Es ist jedoch schwierig über die Interaktion mit TIM eine Aussage zu treffen, da die Struktur von TIM noch nicht aufgeklärt worden ist, und auch das kristallisierte PER-Fragment repräsentiert nur etwa ein Drittel des Gesamtproteins.

Die Aminosäure M560 hingegen befindet sich in der C-Domäne von PER (α F-Helix), für die bisher keine Interaktion mit TIM bekannt ist. Die CoIP-

Experimente haben außerdem gezeigt, dass eine Mutation dieser Aminosäure in ein Aspartat zwar den PER:PER-Homodimer schwächt, jedoch die Heterodimerisierung mit TIM nicht beeinträchtigt. Wahrscheinlich wird also der Unterschied der Phänotypen dadurch verursacht, dass es sowohl durch den Austausch R345E als auch W482E nicht nur zu einer Beeinträchtigung der Homodimerisierung, sondern auch der Heterodimerisierung mit TIM kommt. Das gestörte Dimerisierungsvermögen von PER-R345E und PER-W482E mit TIM führt dann dazu, dass TIM das PER-Protein nicht mehr stabilisieren kann, was verstärkt zum Abbau von PER führt. Die gestörte Interaktion mit TIM ist dann wahrscheinlich auch für die verschlechterte Temperaturkompensation verantwortlich.

Die *per-M560D-HA/-c-myc*-Transformanten sind somit die einzigen Fliegenlinien, an denen die physiologische Bedeutung des PER:PER-Homodimers untersucht werden kann. Die anderen Transformanten zeigen wahrscheinlich einen Summenphänotyp, der sich aus der gestörten Homodimerisierung und der gestörten Heterodimerisierung mit TIM zusammensetzt.

Denkbar wäre auch, dass die Mutationen R345E und W482E im Gegensatz zu M560D zu einer generellen Instabilität des PER-Proteins führen. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass zumindest eine Mutation der Position W482 nicht zwangsweise eine Destabilisierung verursacht. In Schneiderzellen ist vollständiges PER mit dem Austausch W482A (Tryptophan → Alanin) stabil (Yildiz *et al.*, 2005).

4.2.1.5 Die Funktion des PER:PER-Homodimers

Damit lässt sich die Funktion des Homodimers aus den phänotypischen Unterschieden der *per-HA/-c-myc*- von den *per-M560D-HA/-c-myc*-Transformanten ableiten. Der Homodimer wirkt sich zu einem gewissen Teil auf die Stabilität von PER aus, bestimmt diese jedoch nicht vollständig. Er ist außerdem für eine korrekte circadiane Phosphorylierung von PER und damit

auch die korrekte zeitliche Änderung der PER-Menge mitverantwortlich. Diese molekularen Einflüsse des Homodimers zeigen sich auch im Lokomotorverhalten der *per-M560D*-Tiere. Wird der Homodimer geschwächt, so kommt es zu einer generellen Verringerung der Rhythmizität und einer temperaturunabhängigen Periodenverlängerung in DD von ca. 1 h. Da jedoch die Temperaturkompensation sowohl in *per-HA/-c-myc*-, als auch *per-M560D-HA/-c-myc*-Fliegen normal funktioniert, kann eine Beteiligung des Homodimers am Mechanismus der Temperaturkompensation ausgeschlossen werden. Zusammen mit den Untersuchungen, die gezeigt haben, dass in *per^L* auch die Dimerisierung von PER^L und TIM temperaturabhängig gestört ist (Gekakis *et al.*, 1995), widerlegt dies klar eine ältere Studie (Huang *et al.*, 1995). In dieser Studie wird die Homodimerisierung von PER als ein möglicher Mechanismus der Temperaturkompensation diskutiert.

Untersuchungen von rekombinanten PER ohne Austausch und mit M560D in Schneiderzellen (S2) zeigen, dass PER-M560D stärker im Kern vertreten ist, als PER ohne Austausch, was darauf hinweist, dass der Homodimer eine cytoplasmatische Lokalisation begünstigen könnte, zumindest in Abwesenheit von TIM. Auch die Fähigkeit zur Repression von CLK:CYC ist bei PER-M560D in S2 stark erhöht (Yildiz *et al.*, 2005).

Dies muss jedoch nicht zwingend bedeuten, dass der Homodimer im Gegenzug die Repressionsfähigkeit von PER reduziert. Es kann auch eine Folge der Lokalisation sein, denn in einer neueren Studie (Nawathean *et al.*, 2007) wurde gezeigt, dass die verminderte Repression des mutanten rekombinanten PER Δ (siehe Abb. 1.4) unter anderem auch durch einen gestörten Kernimport verursacht wird. In Schneiderzellen ist PER Δ vorwiegend cytoplasmatisch. Durch eine Forcierung des Kernimports, die durch Anhängen eines Nuclear Localization Signals (NLS) erreicht wurde, verbesserte sich auch die Repression. Jedoch wurden auch diese S2-Versuche in Abwesenheit von TIM durchgeführt.

Diese Studie liefert auch einen weiteren Hinweis auf die Bildung und Funktion des PER-Homodimers. Die Expression von PER Δ in *per⁰*-Fliegen ist nicht in der Lage den *per⁰*-Phänotyp zu retten. Auch die gleichzeitige Expression von PER und PER Δ rettet den arhythmischen Phänotyp nicht vollständig. Vielleicht kommt es zur Bildung eines PER:PER Δ -Dimers, das es PER Δ ermöglicht in den Kern zu gelangen. Die verringerte Repressoraktivität von PER Δ verursacht dann einen höheren Prozentsatz an arhythmischen Tieren, im Vergleich zu einer reinen PER-Expression (Nawathean *et al.*, 2007). Der Homodimer ist also vielleicht auch am Kerntransport des PER-Protein beteiligt, auch wenn die Untersuchungen in S2-Zellen darauf nicht hinweisen (Yildiz *et al.*, 2005).

4.2.1.6 Ein besseres Verständnis von *per^L*

In der Mutante *per^L* ist das Valin243 zu einem Aspartat mutiert (Baylies *et al.*, 1987). Diese Mutation bewirkt bei *per^L*-Fliegen eine Periodenverlängerung, sowie einen Defekt in der Temperaturkompensation. Die Freilaufperiode dieser Mutanten beträgt bei 18 °C bereits \sim 27 h. Bei höheren Temperaturen verlängert sie sich noch weiter auf \sim 29,5 h bei 25 °C und über 31 h bei 29 °C (Huang *et al.*, 1995). In *per^L* kommt es außerdem zu einer Verzögerung der Kernlokalisierung von PER^L, die sich ebenfalls mit steigender Temperatur verstärkt (Curtin *et al.*, 1995). Außerdem sind PER-Peptide, die den Austausch V243D tragen, nicht mehr in der Lage einen Homodimer zu bilden (Huang *et al.*, 1995). Die Homodimerisierung wurde daher mit der Temperaturkompensation in Zusammenhang gebracht. Dies kann jedoch aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Die gestörte Homodimerisierung in *per^L*-Fliegen kann lediglich für die verringerte Rhythmicität, sowie eine generelle, temperaturunabhängige Periodenverlängerung verantwortlich gemacht werden.

In einer anderen Studie wiederum (Gekakis *et al.*, 1995) wurde in Hefe gezeigt, dass der Aminosäureaustausch in PER^L auch die Heterodimerisierung mit TIM temperaturabhängig schwächt, ein Effekt der ebenfalls für den per^L -Phänotyp verantwortlich gemacht wurde (siehe oben). Bestätigt wurde dies zum Einen durch die *tim*-Mutante tim^{SL} (siehe Kap. 1.7), die in der Lage ist, im per^L -Hintergrund eine normale Temperaturkompensation wieder herzustellen. In tim^{SL} ist das Threonin T494 zu einem Isoleucin mutiert (Rutila *et al.*, 1996). Obwohl dieser Austausch im TIM^{SL} -Protein nicht in der minimalen Interaktionsdomäne (Aminosäuren 505-906, Gekakis *et al.*, 1995) lokalisiert ist, führt er zu einer geänderten Interaktion zwischen TIM^{SL} und PER . TIM^{SL} ist in der Lage den Zeitpunkt der Kernlokalisierung von PER^L nach vorne zu verschieben und erzeugt im Verhalten eine Periode, die näher am Wildtyp liegt.

Zum Anderen durch die Erkenntnis, dass der circadiane Photorezeptor CRY auch an der Temperaturrezeption und -kompensation beteiligt ist. In der frühen Nacht (ZT15) kann eine Bindung von CRY an den $PER:TIM$ -Komplex nicht nur durch einen Lichtpuls, sondern auch durch einen Hitzepuls (37 °C) induziert werden. Außerdem zeigen per^L ; cry^b -Doppelmutanten eine normale Temperaturkompensation, was zeigt, dass CRY am Temperaturkompensationsdefekt von per^L beteiligt ist. Da die Bindung von CRY an den $PER:TIM$ -Dimer hauptsächlich über eine Bindung von CRY an TIM vonstatten geht (Busza *et al.*, 2004), muss die temperaturabhängig geschwächte $PER:TIM$ -Bindung in per^L maßgeblich am Phänotyp beteiligt sein (Kaushik *et al.*, 2007).

Der per^L -Phänotyp setzt sich also aus zwei Phänotypen zusammen, die getrennt voneinander betrachtet werden können. Eine gestörte Homodimerisierung verlängert wahrscheinlich generell die Freilaufperiode und verschlechtert die Rhythmizität der Tiere, die beeinträchtigte Heterodimerisierung mit TIM hat einen Verlust der Temperaturkompensation zur Folge. Dies wiederum

bestätigt die Vermutung, dass auch in den Transformanten *per-R345E-HA/-c-myc*, *per-W482E-HA/-c-myc* und *per-W482E-M560D-HA/-c-myc* die Interaktion mit TIM beeinträchtigt ist, denn der Phänotyp dieser Tiere liegt, durch den Defekt in der Temperaturkompensation, näher an *per^L*, als der von *per-M560D-HA/-c-myc*.

Ein möglicher Ansatzpunkt dies zu untersuchen, wäre ein Konstrukt, in dem der Interaktionspartner des Arginin345 mutiert ist. Dieser Interaktionspartner, das Glutamat566 liegt wie M560 in der C-Domäne (α F-Helix), für die keine TIM-Interaktion bekannt ist. Ähnlich wie M560D sollte die Mutation von E566, z.B. in ein Arginin, folglich nur die Homodimerisierung beeinträchtigen. Die Phänotypen von M560D und z.B. E566R sollten daher fast identisch sein, und sich von R345E stark unterscheiden.

4.2.2 Bestätigung eines neuen Nuclear Export Signal in PER

Aufgrund von Sequenzhomologien von PER mit mPER1, -2 und -3 wurde in PER ein Nuclear Export Signal (NES) am Anfang der C-Domäne zwischen der Cytoplasmatic Localization Domain (CLD) und der Short Mutabel Region (S/M) postuliert (Vielhaber *et al.*, 2001). Auch die Untersuchung der Lokalisation von PER und TIM in Zellen von larvalen Gehirnen deutet darauf hin, dass beide Proteine auch über Kernexport reguliert werden. Eine Behandlung der Gehirne mit Leptomycin B, einem Inhibitor des Kernexports (Nishi *et al.*, 1994), führte zu einer verstärkten Kernlokalisierung von PER und TIM, vor allem zum Zeitpunkt ZT19,5 (Ashmore *et al.*, 2003). Zur Untersuchung dieses unbestätigten NES (Aminosäure 523-536) wurden Transformanten erzeugt, die ein rekombinantes PER exprimieren, dessen NES durch den konservativen Aminosäureaustausch des Isoleucin530 in ein Alanin zerstört ist (*per-I530A-HA/-c-myc*).

Diese Mutation hat einen Phänotyp der Transformanten zur Folge, der drastisch von *per⁺*-Tieren abweicht. Die Menge des PER-Proteins in Kopfextrakten der Transformanten ist beinahe wildtypisch, unterliegt jedoch keiner sichtbaren circadianen Schwankung (Abb. 3.9). Auch der Grad der Phosphorylierung ist über einen kompletten LD-Zyklus fast konstant und sehr niedrig. Eine Untersuchung der Lokalisation in Photorezeptorzellen der PER-Proteine mit mutiertem NES im Vergleich mit PER ohne Mutation, zu den Zeitpunkten ZT16, ZT17 und ZT18, zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen diesen beiden Proteinen. Während PER-HA zu keinem der getesteten Zeitpunkte im Kern festgestellt werden kann, ist PER-I530A-HA zum Zeitpunkt ZT17 eindeutig im Zellkern lokalisiert. Jedoch bereits eine Stunde später ist die Kernlokalisierung beendet. Eine Mutation des NES hat also eine verfrühte Kernlokalisierung zur Folge, die dann jedoch, wahrscheinlich durch einen Export oder durch Abbau, beendet wird. Es ist gut möglich, dass PER zu diesem Zeitpunkt (ZT17) generell in den Kern transportiert, aus diesem jedoch, vermittelt durch das NES, sofort wieder entfernt wird, solange z.B. der Interaktionspartner TIM noch nicht im Kern ist. Durch eine Mutation im NES kommt es zu einer wesentlich stärkeren Akkumulation von PER-I530A-HA im Kern, die jedoch zu einem späteren Zeitpunkt (ZT18) nicht mehr zu beobachten ist. Dies ist vielleicht auf einen Abbau des Proteins im Kern zurückzuführen.

Ein früher, schwacher Peak der PER-Lokalisation im Kern bei ZT17 ist auch schon bei *per⁺*-Tieren für die s-LN_vs beschrieben worden (Shafer *et al.*, 2002). Der frühe Kerntransport von PER ist wahrscheinlich normal und aufgrund des ständigen Exports durch das NES nur schwer nachzuweisen. Erst die Mutation des NES führt zu einer deutlich sichtbaren verfrühten PER-Akkumulation.

Die Auswirkungen des mutierten NES auf das Lokomotorverhalten der Transformanten ist ebenfalls drastisch. Neben der starken Abnahme des Anteils

der rhythmischen Tiere in DD zwischen 40 % und 60 % ist vor allem die gestörte Temperaturkompensation interessant. Wie bei *per^L* steigt die Periodenlänge der NES-Mutanten mit steigender Temperatur ($\sim 23,5$ h bei 18 °C, $\sim 25,5$ h bei 25 °C, und $\sim 26,5$ h bei 29 °C). Ein ähnlicher Defekt in der Temperaturkompensation wurde bei Transformanten, die ein rekombinantes PER-Protein (PER- Δ C2) ohne den Bereich der Aminosäuren 515-568 (NES und Teile der α F-Helix) exprimieren, nachgewiesen. Die Periodenlänge in DD verlängert sich bei einer Temperaturerhöhung von 20 °C auf 27 °C um bis zu 5,6 h (Schotland *et al.*, 2000).

4.2.3 Neue Erkenntnisse über die Funktion von PER und Möglichkeiten zur Regulation der Temperaturkompensation

Zusammengenommen ergeben sowohl die Untersuchung der Dimerisierung von PER, als auch die Bestätigung und Mutation eines neuen Nuclear Export Signals, wichtige neue Erkenntnisse über mögliche Mechanismen der Temperaturkompensation. Durch die Schwächung des PER:PER-Homodimers konnte gezeigt werden, dass dieser nicht am Mechanismus der Temperaturkompensation beteiligt ist. Durch die Untersuchung einer Reihe anderer Mutanten, die neben der Homodimerisierung wahrscheinlich auch die Heterodimerisierung von PER mit TIM beeinträchtigen, konnte indirekt bestätigt werden, dass, wie auch schon in anderen Studien (Gekakis *et al.*, 1995, Rutila *et al.*, 1996 und Kaushik *et al.*, 2007) angenommen, diese Interaktion für die Temperaturkompensation mitverantwortlich ist. Die Einhaltung einer konstanten Periodenlänge über einen physiologisch großen Temperaturbereich scheint jedoch ein komplizierter Mechanismus zu sein, an dem noch weitere Prozesse beteiligt sein müssen. Wie die Untersuchung eines vorher unbestätigten NES zeigt, ist daran sicherlich auch die zeitliche Lokalisation von PER in der Zelle beteiligt. Auch in der Mutante *per^L* ist diese verändert

(Curtin *et al.*, 1995), möglicherweise verursacht durch eine geänderte Interaktion mit TIM (Rutila *et al.*, 1996).

Alle bio- und immunhistochemischen Analysen dieser Arbeit wurden ausschließlich bei 25 °C durchgeführt. Es ist daher nicht geklärt, ob sich die Stabilität der verschiedenen PER-Varianten und der Dimerisierungen temperaturabhängig ändern. Da sich bei I530A mit steigender Temperatur die Freilaufperiode im Lokomotorverhalten drastisch verlängert, ist ein temperaturabhängiger Effekt in der zeitlichen Kernlokalisierung wahrscheinlich. Auch ist nicht geklärt, ob der Homodimer immer, oder nur zu den Zeitpunkten ZT16, ZT20 und ZT2 (siehe Kap. 3.2.5.3, Zeng *et al.*, 1996) gebildet wird.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich folgendes neues Modell für die Funktion von PERIOD vorschlagen: PER befindet sich wahrscheinlich in einem Fließgleichgewicht zwischen Homodimer PER:PER und Heterodimer PER:TIM, wobei der Homodimer den kleineren Anteil ausmacht (siehe oben, Zeng *et al.*, 1996). Der PER-Homodimer ist vielleicht die „Transportform“ von PER und der Heterodimer dient zur Stabilisierung von PER zuerst im Cytoplasma und dann im Zellkern. Der Homodimer befindet sich aufgrund seiner Lokalisierungssignale (Nuclear Localization Signal, Nuclear Export Signal und Cytoplasmatic Localization Domain) in einem ständigen Wechsel zwischen Kern und Cytoplasma. Obwohl PER bereits vor TIM in den Kern wechselt (Shafer *et al.*, 2002), ist für eine dauerhafte Akkumulation im Kern die Anwesenheit von TIM erforderlich. Mit steigender Temperatur erhöht sich auch die Wechselgeschwindigkeit von PER:PER zwischen Cytoplasma und Kern. Es kommt jedoch zu keiner verfrühten Akkumulation und damit Periodenverkürzung (Abb. 4.2). Da PER auch in Abwesenheit von TIM in der Lage ist, die CLK:CYC aktivierte Transkription zu reprimieren (Rothenfluh *et al.*, 2000, Weber and Kay, 2003, Nawathean and Rosbash, 2004) kann die Repression sowohl von PER:TIM, als auch PER:PER ausgehen.

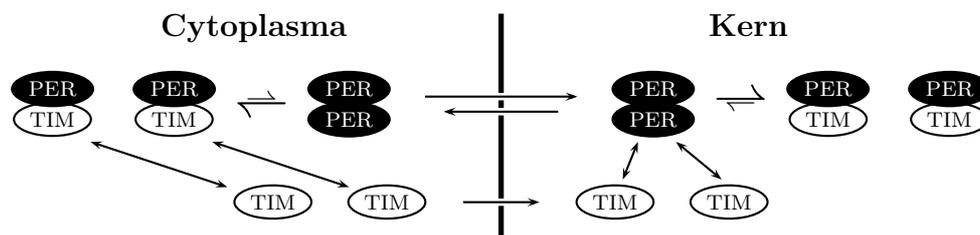


Abbildung 4.2: Ein neues Modell der PER-Funktion basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit. Das Modell basiert auf der Annahme, dass entweder ein PER-Homodimer, oder ein PER:TIM-Heterodimer gebildet wird, und dass der Homodimer die „Transportform“ von PER darstellt. Der PER:TIM-Komplex dient vor allem der Stabilisierung von PER im Cytoplasma und im Zellkern. Da PER sowohl mit, als auch ohne TIM als Repressor fungieren kann (z.B. Rothenfluh *et al.*, 2000), kommen für die Interaktion mit CLK:CYC im Kern PER:PER und PER:TIM in Frage.

Anhand dieses Modells lassen sich die Effekte erklären, die bei den Verhaltensuntersuchungen der verschiedenen *per*-Transformanten, sowie den histologischen und biochemischen Analysen gewonnen wurden.

Wird spezifisch der Kernexport gestört z.B. durch den Austausch I530A, kommt es zu einer verfrühten Akkumulation von PER im Zellkern (siehe Abb. 3.24). Diese verfrühte Anreicherung hat vielleicht einen Abbau des PER-Proteins im Kern zur Folge, wodurch die PER-Menge sinkt. Diese Reduzierung der PER-Menge hat im Verhalten der Tiere eine Periodenverlängerung zur Folge (Smith and Konopka, 1982). Bei einer Temperaturerhöhung wechselt PER-I530A schneller in den Kern, dadurch wird im Kern mehr abgebaut, wodurch sich die PER-Gesamtmenge stärker reduziert, was wiederum eine stärkere Periodenverlängerung nach sich zieht. Dies könnte der Grund dafür sein, dass sich bei *per-I530A*-Tieren mit steigender Temperatur die Periode im Verhalten verlängert.

Wird nur die Homodimerisierung geschwächt, so ist die Menge des PER-Homodimers verringert, was zu einer generellen, vor allem aber temperaturunabhängigen Verzögerung der Akkumulation im Kern führen könnte. Dies könnte bei den *per-M560D*-Transformanten die temperaturunabhängige Periodenverlängerung im Lokomotorverhalten verursachen.

In *per^L* ist nicht nur die Homodimerisierung beeinträchtigt (Huang *et al.*, 1995), sondern auch temperaturabhängig die Heterodimerisierung mit TIM (Gekakis *et al.*, 1995). Durch die beeinträchtigte Homodimerisierung würde sich, anhand des Modells, die Akkumulation von PER im Kern generell verzögern. Zu einer weiteren Verzögerung würde dann die gestörte TIM-Interaktion führen, die sich zusätzlich mit steigender Temperatur verstärkt (Curtin *et al.*, 1995).

4.2.4 Ausblick

Eine weitere Untersuchung der *per*-Transformanten wird sicherlich noch eine Vielzahl an interessanten Einblicken in die Funktionsweise der inneren Uhr gewähren. Die vollständige Aufklärung der Funktion des PER:PER-Homodimers durch die Untersuchung der Linien *per-M560D-HA/-c-myc* wird entscheidend zum Verständnis des molekularen Oszillators beitragen. Eine genaue Untersuchung des neuen Exportsignals in *per-I530A-HA/-c-myc*-Transformanten wird sowohl helfen, die zeitliche Lokalisation von PER in der Zelle, als auch den Mechanismus der Temperaturkompensation besser zu verstehen. Einen Hinweis, auf die zu erwartenden Effekte beider Austausche zeigt eine Studie, in der ein rekombinantes PER-Protein erzeugt wurde, dem der Bereich der Aminosäuren 515-568 fehlt (Schotland *et al.*, 2000). In diesem Protein fehlen sowohl die entscheidenden Teile der α F-Helix, was eine Homodimerisierung verhindert, als auch das NES. Ein Teil, der durch diese Deletion verursachten Phänotypen, kann jetzt schon entweder der Homodimerisierung oder dem NES zugeordnet werden. Die temperaturabhängige Periodenverlängerung z.B. ist identisch mit der in *per-I530A-HA/-c-myc*-Transformanten. Einen vergleichbaren Phosphorylierungsdefekt zeigen beide Austausche, I530A und M560D. Diese Studie beschreibt jedoch auch Effekte auf die negative Rückkopplungsschleife oder die Auswirkung von Licht auf die Rhythmik, die in der vorliegenden Arbeit noch nicht untersucht wurden.

Kapitel 5

Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden zwei Projekte bearbeitet, die sich mit den Faktoren *period* (*per*) und *timeless* (*tim*) des molekularen Oszillators von *Drosophila melanogaster*, beschäftigen. Beide Gene arbeiten in einer negativen Rückkopplungsschleife zusammen und fungieren als Repressoren ihrer eigenen Transkription. Beide Proteine sind jedoch auch an der Verarbeitung äußerer Einflüsse im circadianen System beteiligt.

Das Protein TIM stellt eine Schnittstelle des molekularen Oszillators mit dem Mechanismus der Lichtrezeption dar. Eine Aktivierung des Photorezeptors CHRYPTOCHROME (CRY) durch Licht führt zu einem Abbau des Proteins TIM, wodurch die Synchronisation der inneren Uhr mit dem Zeitgeber Licht bewerkstelligt wird. Bereits vor 10 Jahren wurde anhand von Sequenzvergleichen gezeigt, dass es in der Natur zwei unterschiedliche *tim*-Allele gibt (*s-tim* und *ls-tim*), die theoretisch dazu in der Lage sind, zwei unterschiedlich lange TIM-Proteine zu bilden (Rosato *et al.*, 1997). Das Allel *s-tim* ist das ursprüngliche Allel und nur in der Lage das kurze S-TIM (1398 Aminosäuren) zu bilden. *ls-tim* ist in Europa durch eine natürliche Mutation aus *s-tim* entstanden, kurz nachdem *Drosophila* aus Afrika eingewandert war. Es hat sich dann in Europa verbreitet, da es eine bessere Anpassung an die ausgeprägten Jahreszeiten, vor allem in Nordeuropa, bietet. (Tauber *et al.*, 2007).

Es wurde vermutet, dass es sowohl S-TIM, als auch das längere L-TIM (1421 Aminosäuren) exprimieren kann.

Durch Westernblotanalyse der Kopfextrakte verschiedener Fliegenlinien und Sequenzanalyse des *tim*-Lokus konnte gezeigt werden, dass zwei unterschiedliche TIM-Banden, auf die zwei *tim*-Allele zurückzuführen sind. Durch Wiederholung der Analysen mit und ohne Phosphatasebehandlung der Extrakte konnte Phosphorylierung als Ursache für das unterschiedliche Laufverhalten der Proteine ausgeschlossen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass das neue *ls-tim*-Allel tatsächlich ein längeres TIM exprimieren kann, als das ursprüngliche *s-tim* (Sandrelli *et al.*, 2007).

Das Protein PER ist, wie z.B. die Mutation *per^L* (Konopka and Benzer, 1997) oder Untersuchungen der T/G-Region in PER (Sawyer *et al.*, 1997) zeigen, unter Anderem auch maßgeblich an der Temperaturkompensation beteiligt, die dafür sorgt, dass sich die Periodenlänge der inneren Uhr nicht temperaturbedingt ändert. Ältere Studien haben gezeigt, dass PER nicht nur einen Heterodimer mit TIM, sondern auch einen PER:PER-Homodimer bilden kann (Zeng *et al.*, 1996). Da die Mutation in *per^L* eine Homodimerisierung *in vitro* verhindert, wurde gefolgert, dass der PER:PER-Homodimer an der Temperaturkompensation beteiligt sein könnte (Huang *et al.*, 1995). Die Aufklärung der 3D-Struktur eines PER-Fragments schließlich ergab ebenfalls einen Homodimer und offenbarte zudem dessen Interaktionspunkte, was eine gezielte Untersuchung des Homodimers durch rekombinante Proteine ermöglicht (Yildiz *et al.*, 2005).

Zur Untersuchung der Homodimerisierung von PER wurden daher in dieser Arbeit transgene Fliegenlinien erzeugt, die getagte PER-Proteine exprimieren. Ein Teil dieser Proteine trägt außerdem Aminosäureaustausche, die anhand der Strukturvorhersage eine Homodimerisierung verhindern. Durch Untersuchung des Lokomotorverhaltens der Transformanten, sowie der Expression und Dimerisierung der rekombinanten PER-Proteine, konnte eine

Homodimerisierung klar nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine Beteiligung am Mechanismus der Temperaturkompensation ausgeschlossen werden. Diese Untersuchungen geben zudem Grund zur Annahme, dass die Bindung von PER an TIM ein wesentlicher Baustein der Temperaturkompensation ist.

Der Vergleich der Aminosäuresequenz von PER mit PER-Proteinen der Maus zeigte, dass es auch im PER von *Drosophila* wahrscheinlich ein Nuclear Export Signal (NES) gibt (Vielhaber *et al.*, 2001). *per*-Transformanten, die in diesem Exportsignal eine Mutation tragen, zeigten einen deutlichen Effekt in Bezug auf die zeitliche Kernlokalisierung und auch die Temperaturkompensation der inneren Uhr. Dies ist ein guter Hinweis, dass es sich um ein funktionelles NES handelt und zeigt darüber hinaus, dass die zeitlich korrekte Lokalisation von PER einen weiteren wichtigen Bestandteil des Mechanismus der Temperaturkompensation darstellt.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der inneren Uhr	12
1.2	Schematische Darstellung des molekularen Oszillators	16
1.3	Lokalisation der Uhrneuronen im Fliegengehirn	20
1.4	Schematische Darstellung von PERIOD	22
1.5	3D-Struktur des PERIOD-Fragments	26
1.6	Schematische Darstellung von PERIOD und der Interaktionspunkte im Homodimer	27
2.1	Restriktionskarte von <i>-1313-34-hsp-per</i> (Paul Hardin)	35
2.2	Schematische Darstellung eines LightCycler-Experiments	44
2.3	Auswertung der Lokomotorerhaltensdaten mit Matlab	54
3.1	Anti-TIM Westernblot-Analyse der Linie 21-32	59
3.2	Westernblotanalyse der Defizienz von CG6328 und der Revertante Rev.14	62
3.3	Schematische Darstellung der Transkriptionsstarts in <i>s-tim</i> und <i>ls-tim</i>	63
3.4	Vergleich der TIM-Isoformen mit und ohne Phosphatasebehandlung auf Westernblots	65
3.5	Anti-TIM-Western wildtypischer Stämme und <i>tim</i> -Transformatanten	66

3.6	C-terminale Proteinsequenz der rekombinanten PERIOD-Proteine	68
3.7	Struktur der klonierten <i>per</i> -Konstrukte	70
3.8	Westernblot der <i>per</i> -Transformanten	72
3.9	Zeitliche Analyse der PERIOD-Expression in den Transformanten	74
3.10	<i>per</i> -Expressionslevel ausgewählter <i>per</i> -Transformanten	76
3.11	Westernblots zur Untersuchung einer gegenseitigen Beeinflussung von PER ohne und mit Aminosäureaustausch	79
3.12	Westernblot eines CoIP-Experimentes mit einfacher Kopienzahl der Konstrukte	81
3.13	Westernblots der CoIP-Experimente mit doppelt homozygoten Tieren	83
3.14	Lokomotorverhalten der Kontrollen <i>y per⁰¹ w</i> und <i>y w</i>	86
3.15	Daily Averages der Transformanten <i>per-HA/-c-myc</i>	90
3.16	Daily Averages der Transformanten <i>per-M560D-HA/-c-myc</i>	93
3.17	Daily Averages der Transformanten <i>per-R345E-HA/-c-myc</i> , <i>per-W482E-HA/-c-myc</i> und <i>per-W482E-M560D-HA/-c-myc</i>	97
3.18	Rhythmicität der <i>per</i> -Transformanten in LD und DD in Abhängigkeit von der Temperatur	102
3.19	Periodenlänge der <i>per</i> -Transformanten in DD in Abhängigkeit von der Temperatur	103
3.20	Daily Averages der Transformanten <i>per-I530A-HA/-c-myc</i>	105
3.21	Aktogramme der Transformanten <i>per-HA/-c-myc</i> , <i>per-R345E-HA/-c-myc</i> und <i>per-W482E-HA/-c-myc</i>	109
3.22	Aktogramme der Transformanten <i>per-I530-HA/-c-myc</i> , <i>per-M560D-HA/-c-myc</i> und <i>per-W482E-M560D-HA/-c-myc</i>	110
3.23	Zeitliche Lokalisation von PER-HA und PER-I530A-HA in Photorezeptorzellen	112

3.24	Immunhistologische Färbungen zur Bestimmung der Lokalisation von PER-HA und PER-I530A-HA in Photorezeptorzellen	113
4.1	Schematische Darstellung Aminosäreaustausche in PER in Bezug auf die TIM-Interaktion	125
4.2	Neues Modell der PER-Funktion	134

Tabellenverzeichnis

2.1	Reaktionszyklen der PCR und der Sequenzreaktion	32
2.2	Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung	33
2.3	Oligonukleotide zur Erzeugung der Basenaustausche und TAGs	37
2.4	Antikörper für den Proteinnachweis auf Membranen	41
2.5	Primer für Realtime-PCR	43
2.6	Realtime-PCR-Programm	44
3.1	Übersichtstabelle der Transformanten der <i>per</i> -Konstrukte . . .	71
3.2	Verhalten der <i>per</i> -Transformanten in LD und DD bei 18 °C . .	99
3.3	Verhalten der <i>per</i> -Transformanten in LD und DD bei 25 °C . .	100
3.4	Verhalten der <i>per</i> -Transformanten in LD und DD bei 29 °C . .	101
3.5	Verhalten der Transformanten von <i>per-I530A</i>	107
A.1	Ausführliche Tabelle der Transformanten der <i>per</i> -Konstrukte .	155
A.2	Verhaltensdaten der Kontrollen und Transformanten sortiert nach Fliegenlinien	159

Literaturverzeichnis

Allada R, White NE, So WV, Hall JC and M Rosbash, 1998 A Mutant *Drosophila* Homolog of Mammalian *Clock* Disrupts Circadian Rhythms and Transcription of *period* and *timeless*. *Cell* 93: 791-804.

Ashmore LJ, Sathyanarayanan S, Silvestre DW, Emerson ME, Schotland P and A Sehgal, 2003 Novel Insights into the Regulation of the Timeless Protein. *J Neurosci* 23: 7810-7819.

Bao S, Rihel J, Bjes E, Fan JY, and Price JL, 2001 The *Drosophila doubletime* mutation delays the nuclear accumulation of period protein and affects the feedback regulation of *period* mRNA. *J Neurosci* 21: 7117-7126.

Baylies MK, Bargiello, TA, Jackson FR and MW Young, 1987 Changes in abundance and structure of the *per* gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock. *Nature* 326: 390-392.

Baylies MK, Vosshall LB, Sehgal A and MW Young, 1992 New short period mutations of the *Drosophila* clock gene *per*. *Neuron* 9: 575-581.

Busza A, Emery-Le M, Rosbash M and P Emery, 2004 Roles of the Two *Drosophila* CRYPTOCHROME Structural Domains in Circadian Photoreception. *Science* 304: 1503-1506.

Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P and AA Petti, 1999 Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285: 553-556.

Chang DC and SM Reppert, 2003 A Novel C-Terminal Domain of *Drosophila* PERIOD Inhibits dCLOCK:CYCLE-Mediated Transcription. *Curr Biol* 13: 758-762.

Collins BH, Rosato E and CP Kyriacou, 2004 Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. *PNAS* 101: 1945-1950.

Crews ST and C-M Fan, 1999 Rememberance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins. *Curr Opin Genet Dev* 9: 580-587.

Curtin KD, Huang ZJ and M Rosbash, 1995 Temporally Regulated Nuclear Entry of the *Drosophila period* Protein Contributes to the Circadian Clock. *Neuron* 14: 365-372.

Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin M-C, Glossop NRJ, Hardin PE, Young MW, Storti RV and J Blau, 2003 *vriille*, *Pdp1*, and *dClock* Form a Second Feedback Loop in the *Drosophila* Circadian Clock. *Cell* 112: 329-341.

Darlington T, Wagner-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves T, Weitz C, Takahashi J and SA Kay, 1998 Closing the Circadian Loop: CLOCK-Induced Transcription of its Own Inhibitors, *per* and *tim*. *Science* 280: 1599-1603.

Dunlap JC and JJ Loros, 2006 How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. *Curr Opin Microbiol* 9: 579-587.

Edery I, Zwiebel LJ, Dembinska ME and M Rosbash, 1994 Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *PNAS* 91: 2260-2264.

Evan GI, Lewis GK, Ramsay G and M Bishop, 1985 Isolation of Monoclonal Antibodies Specific for Human *c-myc* Proto-Oncogene Product. *Mol Cell Biol* 5: 3610-3616.

Ewer J, Frisch B, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M and JC Hall, 1992 Expression of the *period* clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells influence on circadian behavioral rhythms. *J Neurosci* 12: 3321-3349.

Field J, Nikawa J, Broek D, MacDonald B, Rodgers L, Wilson IA, Lerner RA and M Wigler, 1988 Purification of a *RAS*-Responsive Adenylyl Cyclase Complex from *Saccharomyces cerevisiae* by Use of an Epitope Addition Method. *Mol Cell Biol* 8: 2159-2165.

Frisch B, Hardin PE, Hamblen-Coyle MJ, Rosbash M and JC Hall, 1994 A promoterless *period* gene mediates behavioral rhythmicity and cyclical per expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 12: 555-570.

Gardner MJ, Hubbard KE, Hotta CT, Dodd AN and AAR Webb, 2006 How plants tell the time. *Biochem J* 397: 15-24.

Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown AM, Mayers MP, Seghal A, Young MW and CJ Weitz, 1995 Isolation of *timeless* by PER Protein Interaction: Defective Interaction Between TIMELESS Protein and Long-Period Mutant PER^L. *Science* 270: 811-815.

Gibultowicz JM and DM Hege, 1997 Circadian clock in Malpighian tubules. *Nature* 368: 664.

Glaser FT and R Stanewsky, 2005 Temperature Synchronization of the *Drosophila* Circadian Clock. *Curr Biol* 15: 1352-1363.

Gloor GB, Preston CR, Johnson-Schlitz DM, Nassif NA, Phillis RW, Benz WK, Robertson HM and WR Engels, 1993 Type I repressors of *P* element mobility. *Genetics* 135(1): 81-95.

Grima B, Lamouroux A, Chelot E, Papin C, Limbourg-Bouchon B and F Rouyer, 2002 The F-box protein Slimb controls the levels of clock proteins Period and Timeless. *Nature* 420: 178-182.

Grima B, Chelot E, Xia R and F Rouyer, 2004 Morning and evening peaks of activity are controlled by different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature* 431: 869-873.

Hall TA, 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.

Hamblen-Coyle MJ, Wheeler DA, Rutila JE, Rosbash M and JC Hall, 1992 Behavior of Period-Altered Circadian Rhythm Mutants of *Drosophila* in Light:Dark Cycles. *J Insect Behav* 5: 417-446.

Hao H, Allen DL and PE Hardin, 1997 A Circadian Enhancer Mediates PER-Dependent mRNA Cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 17(7): 3687-3693.

Hao H, Glossop NR, Lyons L, Qiu J, Morrish B, Cheng Y, Helfrich-Förster C and P Hardin, 1999 The 69 bp circadian regulatory sequence (CRS) mediates *per*-like developmental, spatial, and circadian expression and behavioral rescue in *Drosophila*. *J Neurosci* 19(3): 987-994.

Hardie RC and P Raghu P, 2001 Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 412: 186-193.

Hardin PE, Hall JC and M Rosbash, 1990 Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343: 536-540.

Helfrich-Förster C, 1995 The *period* clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 92: 612-616.

Helfrich-Förster C, Winter C, Hofbauer A, Hall JC, and R Stanewsky, 2001 The circadian clock of *Drosophila* is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron* 30: 1-20.

Helfrich-Förster C, 2002 The circadian system of *Drosophila melanogaster* and its light input pathways. *Zoology* 105: 297-312.

Helfrich-Förster C, 2003 The neuroarchitecture of the circadian clock in the *Drosophila* brain. *Microsc Res Techn* 62: 94-102.

Helfrich-Förster C, Shafer OT, Wülbeck C, Grieshaber E, Rieger D and P Taghert, 2007 Development and Morphology of the Clock-Gene-Expressing Lateral Neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 500: 47-70.

- Hofbauer A and E Buchner E**, 1989 Does *Drosophila* have seven eyes? *Naturwissenschaften* 76: 335-335.
- Huang ZJ, Edery I and M Rosbash**, 1993 PAS is a dimerization domain common to *Drosophila period* and several transcription factors. *Nature* 364: 259-262.
- Huang ZJ, Curtin KD and M Rosbash**, 1995 PER protein interaction and temperature compensation of a circadian clock in *Drosophila*. *Science* 267: 1169-1172.
- Iwasaki H and T Kondo**, 2004 Circadian Timing Mechanism in the Prokaryotic Clock System of Cyanobacteria. *J Biol Rhythms* 19: 436-444.
- Kadener S, Stoleru D, McDonald M, Nawathean P and M Rosbash**, 2007 *Clockwork Orange* is a transcriptional repressor and new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev* in Press.
- Kaneko M, Helfrich-Förster C and JC Hall**, 1997 Spatial and temporal expression of the *period* and *timeless* genes in the developing nervous system of *Drosophila*: newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *J Neurosci* 17: 6745-6760.
- Kaneko M and JC Hall**, 2000 Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the *period* and *timeless* genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *J Comp Neurol* 422: 66-94.
- Kaushik R, Nawathean P, Busza A, Murad A, Emery P and M Rosbash**, 2007 PER-TIM Interactions with the Photoreceptor Cryptochrome Mediate Circadian Temperature Responses in *Drosophila*. *PLoS Biology* 5(6): 1257-1266.
- Kim EY and I Edery**, 2006 Balance between DBT CKI kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *PNAS* 103: 6178-6183.
- Klarsfeld A, Malpel S, Michard-Vanhee C, Picot M, Chelot E and F Rouyer**, 2004 Novel features of chryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *J Neurosci* 24: 1468-1477.

Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh A and MW Young, 1998 The *Drosophila* Clock Gene *double-time* Encodes a Protein Closely Related to Human Casein Kinase I α . Cell 94: 97-107.

Ko CH and JS Takahashi, 2006 Molecular components of the mammalian circadian clock. Human Molecular Genetics 15: R271-R277.

Koh K, X Zheng and A Sehgal, 2006 JETLAG Resets the *Drosophila* Circadian Clock by Promoting Light-Induced Degradation of TIMELESS. Science 312: 1809-1812.

Konopka RJ and S Benzer, 1971 Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci USA 68: 2112-2116.

Konopka RJ, Pittendrigh C, and D Orr, 1989 Reciprocal behaviour associated with altered homeostasis and photosensitivity of *Drosophila* clock mutants. J Neurogenet 6: 1-10.

Krishnan B, Dryer SE and PE Hardin, 1999 Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. Nature 400: 375-378.

Landskron, 2002 Ein genetischer Screen zur Erzeugung von Mutationen in circadian regulierten Genen aus *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.

Levine JD, Funes P, Dows HB, and JC Hall, 2002a Signal analysis of behavioral and molecular cycles. BMC Neurosci 3:1.

Levine JD, Funes P, Dowse HB and JC Hall, 2002b Advanced analysis of a *cryptochrome* mutations effects on the robustness and phase of molecular cycles in isolated peripheral tissues of *Drosophila*. BMC Neurosci 3:5.

Lim C, Chung BY, Pitman JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, Keegan KP, Choe J and R Allada, 2007 *clockwork orange* Encodes a Transcriptional Repressor Important fo Circadian-Clock Amplitude in *Drosophila*. Curr Biol 17: 1082-1089.

Lin JM, Schroeder A and R Allada, 2005 *In Vivo* Circadian Function of Casein Kinase 2 Phosphorylation Sites in *Drosophila* PERIOD. J Neurosci 25(48): 11175-11183.

Lindsley DL and GG Zimm, 1992 *The Genome of Drosophila melanogaster*. San Diego, CA, Academic Press.

de Mairan JJ, 1729 Observation botanique. Histoire de LAcademie royale des sciences, Paris 35-36.

Majercak J, Sidote D, PE Hardin and I Edery, 1999 How a Circadian Clock Adapts to Seasonal Decreases in Temperature and Day Length. *Neuron* 24: 219-230.

Majercak J, Chen WF and I Edery I, 2004 Splicing of the *period* gene 3'-terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. *Mol Cell Biol* 24: 3359-3372.

Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, and MW Young, 2001 A Role for the Segment Polarity Gene *shaggy*/GSK-3 in the *Drosophila* Circadian Clock. *Cell* 105: 769-779.

Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa TK, Dauwalder B, Itho TQ, Takahashi K, Ueda R Hardin PE Tanimura T and HR Ueda, 2007 A functional genomics strategy reveals *clockwork orange* as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev* in Press.

Meyer P and MW Young, 2006 PER-TIM Interactions in Living *Drosophila* Cells: An Interval Timer for the Circadian Clock. *Science* 311: 226-229.

Mehnert KI, Beramendi A, Elgahazali F, Negro P, CP Kyriacou and R Cantero, 2007 Circadian Changes in *Drosophila* Motor Terminals. *Develop Neurobiol* 67: 415-421.

Mohr H and P Schopfer, 1992 *Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin, p116.

Mrosovsky N, 1999 Masking: History, definitions, and measurement. *Chronobiol Int* 16: 415-429.

Myers MP, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A and MW Young, 1996 Light-induced Degradation of TIMELESS and Entrainment of the *Drosophila* Circadian Clock. *Science* 271: 1736-1740.

Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M and A Sehgal, 1999 A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. *Science* 285: 1737-1741.

Nawathean P and M Rosbash, 2004 The Doubletime and CKII Kinases Collaborate to Potentiate *Drosophila* PER Transcriptional Repressor Activity. *Mol Cell* 13: 213-223.

Nawathean P, Stoleru D and M Rosbash, 2007 A Small Conserved Domain of *Drosophila* PERIOD is Important for Circadian Phosphorylation, Nuclear Localization, and Transcriptional Repressor Activity. *Mol Cell Biology* 27(13): 5002-5013.

Nishi K, Yoshida M, Fujiwara D, Nishikawa M, Horinouchi S and T Beppu, 1994 Leptomycin B targets a regulatory cascade from crm1, a fission yeast nuclear protein involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J Biol Chem* 269: 6320-6324.

Ouyang Y, Andersson CR, Kondo T, Golden S and CH Johnson, 1998 Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *PNAS* 95: 8660- 8664.

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schulz, PG, Kay SA, Takahashi JS and JB Hogenesch, 2002 Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell* 109: 307-20.

Peschel N, Veleri S and R Stanewsky, 2006 *Veela* defines a molecular link between Cryptochrome and Timeless in the light-input pathway to *Drosophila*'s circadian clock. *PNAS* 103: 17313-17318.

Pittendrigh C, 1954 On Temperature Independence in the Clock System Controlling Emergence Time in *Drosophila*. *PNAS* 40: 1018-1029.

Pittendrigh C and M Bruce, 1957 An Oscillator Model for biological Clocks. Rhythmic and Synthetic Processes in Growth. Princeton University Press.

Plautz JD, Kaneko M, JC Hall and SA Kay, 1997 Independent Photoreceptive Circadian Clocks Throughout *Drosophila*. *Science* 278: 1632-1635.

Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Adodeely M, Kloss B, and MW Young, 1998 *double-time* is a new *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. Cell 94: 83-95.

Renn SC, Park JH, Rosbash M, Hall JC and P Taghert, 1999 A *pdf* neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. Cell 99: 791-802.

Rieger D, Shafer OT, Tomioka K and C Helfrich-Förster, 2006 Functional analysis of circadian pacemaker neurons in *Drosophila melanogaster*. J Neurosci 26: 2531-2543.

Rosato E, Codd V, Mazzotta G, Piccin A, Zordan M, Costa R and CP Kyriacou, 2001 Light-dependent interaction between *Drosophila* CRY and the clock protein PER mediated by the carboxy terminus of CRY. Curr Biol 11: 909-917.

Rosato E, Tevisan A, Sandrelli F, Zordan M, CP Kyriacou and R Costa, 1997 Conceptual translation of *timeless* reveals alternative initiating methionines in *Drosophila*. Nucleic Acids Res 25(3): 455-457.

Rothenfluh A, MW Young and L Saez, 2000 A TIMELESS-Independent Function for PERIOD Proteins in the *Drosophila* Clock. Neuron 26: 505-514.

Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M and JC Hall, 1998 CYCLE is a Second bHLH-PAS Clock Protein Essential for Circadian Rhythmicity and Transcription of *Drosophila period* and *timeless*. Cell 93: 805-814.

Rutila JE, Zeng H, Le M, Curtin KD, Hall JC and M Rosbash, 1996 The *tim^{SL}* Mutant of the *Drosophila* Rhythm Gene *timeless* Manifests Allele-Specific Interactions with *period* Gene Mutants. Neuron 17: 979-990.

Saez L and MW Young, 1996 Regulated Nuclear Localization of the *Drosophila* Clock Proteins PERIOD and TIMELESS. Neuron 17: 911-920.

Sambrook J and DW Russel, 2001 Molecular Cloning, Third Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Sandrelli F, Tauber E, Pegoraro M, Mazzotta G, Cisotto P, Landskron J, Stanewsky R, Piccin A, Rosato E, Zordan M, Costa R and CP Kyriacou, 2007 A Molecular Basis for Natural Selection at the *timeless* Locus in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 316: 1898-1900.

Sathyanarayanan S, Zheng X, Xiao R and A Sehgal, 2004 Posttranslational Regulation of *Drosophila* PERIOD Protein by Protein Phosphatase 2A. *Cell* 116: 603-615.

Sawyer LA, Hennessy JM, Peixoto AA, Rosato E, Parkinson H, Costa R and CP Kyriacou, 1997. Natural Variation in a *Drosophila* Clock Gene and Temperature Compensation. *Science* 278: 2117-2120.

Schotland P, Hunter-Ensor M, Lawrence T and A Sehgal, 2000 Altered Entrainment and Feedback Loop Funktion Effected by a Mutant Period Protein. *J Neurosci* 20: 958-968.

Sehgal A Price JL, Man B and MW Young, 1994 Loss of Circadian Behavioral Rhythms in the *Drosophila* Mutant *timeless*. *Science* 263: 1603-1606.

Shafer O, Rosbash M and JW Truman, 2002 Sequential Nuclear Accumulation of the Clock Proteins Period and Timeless in the Pacemaker Neurons of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 22: 5946-5954.

Shafer OT, Helfrich-Förster C, Renn SCP and PH Taghert, 2006 Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal pacemakers reveals new neuronal classes. *J Comp Neurol* 498: 180-193.

Smith R and R Konopka, 1982 Effects of dosage alterations at the *per* locus on the period of the circadian clock of *Drosophila*. *Mol Gen Genet* 185: 30-36.

Stanewsky R, Frisch B, Brandes C, Hamblen-Coyle, Rosbash M and JC Hall, 1997a Temporal and Spatial Expression Patterns of Transgenes Containing Increasing Amounts of the *Drosophila* Clock Gene *period* and a *lacZ* Reporter: Mapping Elements of the PER Protein Involved in Circadian Cycling. *J Neurosci* 17: 676-696.

Stanewsky R, Jamison CF, Plautz JD, Kay SA and JC Hall, 1997b Multiple Circadian-Regulated Elements Contribute to Cycling *period* Expression in *Drosophila*. EMBO J 16: 5006-5018.

Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wagner-Smith K, Kay SA, Rosbash M and JC Hall, 1998 The *cry^b* Mutation Identifies Cryptochrome as a Circadian Photoreceptor in *Drosophila*. Cell 95: 681-692.

Stempfl T, Vogel M, Szabo G, Wülbeck C, Liu J, Hall JC, and R Stanewsky, 2002 Identification of Circadian-Clock-Regulated Enhancers and Genes of *Drosophila melanogaster* by Transposon Mobilization and Luciferase Reporting of Cyclical Gene Expression. Genetics 160: 571-593.

Stephan FK, Swann JM and JL Sisk, 1979 Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. Behav Neural Biol 25: 545-554.

Stoleru D, Peng Y, Agosto J and Rosbash M, 2004 Coupled oscillators control morning and evening locomotor behavior of *Drosophila*. Nature 431: 862-868.

Tauber E, Zordan M, Sandrelli F, Pegoraro M, Osterwalder N, Breda C, Daga A, Selmin A, Monger K, Benna C, Rosato E, CP Kyriacou and R Costa, 2007 Natural Selection Favours a Newly Derived *timeless* Allele in *Drosophila melanogaster*. Science, 316: 1895-1898.

Thummel CS and V Pirotta, 1991 New pCaSpeR P-element vectors. Drosoph Inf Serv 71: 150.

Veleri S, Brandes C, Helfrich-Förster C, Hall JC and R Stanewsky, 2003 A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. Curr Biol 13: 1758-1767.

Vielhaber EL, Duricka D, Ullman KS and DM Virshup, 2001 Nuclear Export of Mammalian PERIOD Proteins. J Biol Chem 276(49): 45921-45927.

Weber F and SA Kay, 2003 A PERIOD inhibitor buffer introduces a delay mechanism for CLK/CYC-activated transcription. FEBS Letters 555: 341-345.

Wheeler DA, Hamblen-Coyle MJ, Dushay MS and JC Hall, 1993 Behavior in Light-Dark Cycles of *Drosophila* Mutants That Are Arrhythmic, Blind or Both. *J Biol Rhythms* 8: 67-94.

Yildiz Ö, Doi M, Yujnovsky I, Cardone L, Berndt A, Henning S, Schulze S, Urbanke C, Sassone-Corsi P and E Wolf, 2005 Crystal Structure and Interactions of the PAS Repeat Region of the *Drosophila* Clock Protein PERIOD. *Molecular Cell* 17: 69-82.

Yoshii T, Heshiki Y, Ibuki-Ishibashi T, Matsumoto A, Tanimura T and Tomio-ka K, 2005 Temperature cycles drive *Drosophila* circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *Eur J Neurosci* 22: 1176-1184.

Yu W, Zheng H, Houl JH, Dauwalder B, and PE Hardin, 2006 PER dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes Dev* 20: 723-733.

Zeng H, Qian Z, Myers MP and M Rosbash, 1996 A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. *Nature* 380: 129-135.

Anhang A

Zusatzinformationen

Tabelle A.1: Ausführliche Tabelle der Transformanten der *per*-Konstrukte. Chr. Insertionschromosom, Bal. Balancer, ho. homozygot. Linien, die homozygot fertil sind und die kein Balancerchromosom mehr tragen, sind mit einem + in der Spalte *ho.* gekennzeichnet, Linien bei denen Sterilität festgestellt wurde mit *steril* und Linien, die homozygot lebensfähig sind, aber noch einen Balancer tragen, mit *steril?*. Die Spalte *Tests* gibt die Experimente an, die mit dieser Linie durchgeführt wurden: *W* Westernblot, *C* CoIP, *18 °C*, *25 °C* und *29 °C* Verhaltensexperimente bei den entsprechenden Temperaturen. Mit *J* numerierte Linien wurden durch eine Remobilisierung des *P*-Elements der Linie 10-2-2 hergestellt.

Name	<i>per</i> -Genotyp	Chr.	Bal.	ho.	Tests
1-1	<i>HA</i>	3	<i>TM6B</i>	steril	W
1-3	<i>HA</i>	3	<i>TM6B</i>	letal	W, 25 °C
1-5-1	<i>HA</i>	3	-	+	W, 25 °C
1-5-2	<i>HA</i>	2	-	+	W, C, 18, 25, 29 °C
1-6	<i>HA</i>	3	<i>TM6B</i>	letal	W, 25 °C
1-7	<i>HA</i>	3	<i>CyO</i>	letal	W, 25 °C
1-8	<i>HA</i>	3	-	+	W, 18, 25, 29 °C

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle der Transformanten der *per*-Konstrukte

Name	<i>per</i> -Genotyp	Chr.	Bal.	ho.	Tests
1-9	<i>HA</i>	3	-	+	W, 25 °C
1-10	<i>HA</i>	3	<i>CyO</i>	letal	W, 25 °C
1-11	<i>HA</i>	3	-	+	W, 25 °C
2-2-1	<i>c-myc</i>	2	-	+	25 °C
2-2-2	<i>c-myc</i>	3	-	+	W, C, 18, 25, 29 °C
2-3	<i>c-myc</i>	3	-	+	W, 25 °C
2-4-1	<i>c-myc</i>	2	-	+	W, 25 °C
2-4-2	<i>c-myc</i>	2	-	+	25 °C
2-5	<i>c-myc</i>	3	-	+	W, 25 °C
2-6	<i>c-myc</i>	2	-	+	W, 18, 25 °C
2-7	<i>c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	letal	W, 25 °C
3-1	<i>R345E-HA</i>	2	-	+	W, 18, 25, 29 °C
3-2	<i>R345E-HA</i>	3	-	+	W, 25, 29 °C
3-3	<i>R345E-HA</i>	3	<i>TM6B</i>	letal	W, 25 °C
3-4	<i>R345E-HA</i>	2	-	+	W, 18, 25, 29 °C
3-5	<i>R345E-HA</i>	2	-	+	25 °C
3-6	<i>R345E-HA</i>	3	-	+	25 °C
3-7	<i>R345E-HA</i>	2	<i>CyO</i>	letal	25 °C
3-8	<i>R345E-HA</i>	3	<i>TM6B</i>	steril?	25 °C
3-10	<i>R345E-HA</i>	2	<i>CyO</i>	letal	25 °C
4-4	<i>R345E-c-myc</i>	3	-	+	W, 18, 25, 29 °C
4-5	<i>R345E-c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	steril	25 °C
4-6	<i>R345E-c-myc</i>	2	-	+	25 °C
4-9-1	<i>R345E-c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	steril	25 °C
4-9-2	<i>R345E-c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	steril	18, 25, 29 °C
5-2	<i>W482E-HA</i>	2	<i>CyO</i>	letal	W, 18, 25, 29 °C
5-3	<i>W482E-HA</i>	2	<i>CyO</i>	steril	18, 25, 29 °C
6-1	<i>W482E-c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	steril	W, 18, 25, 29 °C
6-2	<i>W482E-c-myc</i>	3	-	+	W, 25 °C
6-3-1	<i>W482E-c-myc</i>	3	<i>TM6B</i>	steril?	18, 25 °C
6-3-2	<i>W482E-c-myc</i>	3	-	+	18 °C

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle der Transformanten der *per*-Konstrukte

Name	<i>per</i> -Genotyp	Chr.	Bal.	ho.	Tests
6-5	<i>W482E-c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	letal	W, 25, 29 °C
6-6	<i>W482E-c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	steril	25 °C
7-1	<i>I530A-HA</i>	2	-	+	W, 18, 25, 29 °C
7-2	<i>I530A-HA</i>	3	-	+	18, 25, 29 °C
7-3	<i>I530A-HA</i>	3	<i>TM6B</i>	+	W, 25 °C
7-4-1	<i>I530A-HA</i>	2	-	+	25 °C
7-4-2	<i>I530A-HA</i>	2	-	+	25 °C
7-5	<i>I530A-HA</i>	2	-	+	-
7-6	<i>I530A-HA</i>	3	<i>TM6B</i>	steril	25 °C
7-7	<i>I530A-HA</i>	2	<i>CyO</i>	letal	25 °C
8-1	<i>I530A-c-myc</i>	2	-	+	W, 18, 25, 29 °C
8-2	<i>I530A-c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	letal	W, 25 °C
8-3	<i>I530A-c-myc</i>	2	-	+	W, 25, 29 °C
8-5	<i>I530A-c-myc</i>	2	-	+	-
8-6	<i>I530A-c-myc</i>	2	-	+	W, 18, 25, 29 °C
8-8	<i>I530A-c-myc</i>	3	<i>TM6B</i>	steril	-
8-9	<i>I530A-c-myc</i>	2	-	+	25 °C
9-1	<i>M560D-HA</i>	2	-	+	W, 25 °C
9-2	<i>M560D-HA</i>	2	-	+	W, 18, 25, 29 °C
9-4-1	<i>M560D-HA</i>	2	-	+	25 °C
9-4-2	<i>M560D-HA</i>	3	-	+	W, 18, 25, 29 °C
9-5	<i>M560D-HA</i>	3	<i>TM6B</i>	letal	25 °C
9-6	<i>M560D-HA</i>	2	-	+	W 25 °C
9-8	<i>M560D-HA</i>	3	-	+	W, C, 25 °C
10-1	<i>M560D-c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	letal	-
10-2-1	<i>M560D-c-myc</i>	3	<i>TM6B</i>	letal	18, 25, 29 °C
10-2-2	<i>M560D-c-myc</i>	4	-	+	W, 18, 25, 29 °C
J3	<i>M560D-c-myc</i>	2	-	+	-
J5	<i>M560D-c-myc</i>	2	-	+	C
J6	<i>M560D-c-myc</i>	2	-	+	-
J8	<i>M560D-c-myc</i>	2	-	+	-

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung Tabelle der Transformanten der *per*-Konstrukte

Name	<i>per</i> -Genotyp	Chr.	Bal.	ho.	Tests
11-1	<i>W482E-M560D-HA</i>	2	<i>CyO</i>	letal	-
11-3	<i>W482E-M560D-HA</i>	2	-	+	-
11-4-1	<i>W482E-M560D-HA</i>	2	<i>CyO</i>	letal	W, 25 °C
11-4-2	<i>W482E-M560D-HA</i>	2	-	+	W, 25 °C
11-4-3	<i>W482E-M560D-HA</i>	2	<i>CyO</i>	letal	25 °C
11-5	<i>W482E-M560D-HA</i>	2	-	+	25 °C
11-6	<i>W482E-M560D-HA</i>	3	-	+	W, 18, 25, 29 °C
11-7	<i>W482E-M560D-HA</i>	2	-	+	W, 18, 25, 29 °C
11-8	<i>W482E-M560D-HA</i>	3	-	+	25 °C
11-10	<i>W482E-M560D-HA</i>	3	-	+	25 °C
12-1	<i>W482E-M560D-c-myc</i>	3	-	+	W, 18, 25, 29 °C
12-2	<i>W482E-M560D-c-myc</i>	2	-	+	18, 25, 29 °C
12-4	<i>W482E-M560D-c-myc</i>	3	<i>TM6B</i>	steril	25 °C
12-5	<i>W482E-M560D-c-myc</i>	3	<i>TM6B</i>	steril	-
12-6	<i>W482E-M560D-c-myc</i>	3	<i>TM6B</i>	letal	25 °C
12-7	<i>W482E-M560D-c-myc</i>	2	-	+	25 °C
12-8	<i>W482E-M560D-c-myc</i>	2	<i>CyO</i>	letal	25 °C
12-10	<i>W482E-M560D-c-myc</i>	3	<i>TM6B</i>	letal	-

Ende Tabelle der Transformanten der *per*-Konstrukte

Tabelle A.2: Verhaltensdaten der Kontrollen und Transformanten sortiert nach Fliegenlinien. Rhy.: Rhythmizität, Periode.: Periodenlänge in h \pm SEM, RS: Rhythmicity Statistic \pm SEM, n: Anzahl der ausgewerteten Tiere, *: Daten stammen von nur einem rhythmischen Tier.

Temperatur: 18 °C									
Genotyp	Linie	Rhy. LD	Periode LD	RS	n	Rhy. DD	Periode DD	RS	n
wildtyp	<i>CantonS</i>	100%	24,0 \pm 0	4,6 \pm 0,2	27	96,2%	23,6 \pm 0,4	3,3 \pm 0,2	26
<i>y w</i>	–	96,4%	24,0 \pm 0,1	3,8 \pm 0,2	28	71,4%	23,7 \pm 0,2	2,5 \pm 0,3	28
<i>per-HA</i>	1-5-2	100%	24,0 \pm 0	4,7 \pm 0,2	16	68,8%	22,1 \pm 0,3	2,3 \pm 0,2	16
<i>per-HA</i>	1-8	100%	24,0 \pm 0	4,3 \pm 0,2	16	81,3%	21,7 \pm 0,4	2,2 \pm 0,1	16
<i>per-c-myc</i>	2-2-2	100%	24,0 \pm 0	4,5 \pm 0,2	16	100%	23,2 \pm 0,3	2,7 \pm 0,3	16
<i>per-c-myc</i>	2-6	100%	24,0 \pm 0	5,0 \pm 0,3	15	80,0%	23,0 \pm 0,2	2,6 \pm 0,3	15
<i>per-R345E-HA</i>	3-1	100%	24,1 \pm 0,1	3,2 \pm 0,2	16	50,0%	22,9 \pm 0,9	1,6 \pm 0,3	16
<i>per-R345E-HA</i>	3-4	81,3%	24,2 \pm 0,3	2,3 \pm 0,3	16	0%	–	–	16
<i>per-R345E-c-myc</i>	4-4	100%	24,0 \pm 0,1	2,9 \pm 0,2	15	13,3%	24,1 \pm 2,3	2,7 \pm 0,6	15
<i>per-R345E-c-myc</i>	4-9-2	68,8%	24,2 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	16	31,3%	24,2 \pm 0,9	1,7 \pm 0,2	16
<i>per-W482E-HA</i>	5-2	100%	24,1 \pm 0,1	3,2 \pm 0,3	16	18,8%	23,4 \pm 3,1	1,8 \pm 0,3	16
<i>per-W482E-HA</i>	5-3	81,3%	24,0 \pm 0	2,7 \pm 0,3	16	18,8%	26,3 \pm 0,3	1,7 \pm 0,6	16
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-1	100%	24,1 \pm 0,1	3,4 \pm 0,3	16	18,8%	22,2 \pm 1,5	2,2 \pm 0,4	16
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-3-2	100%	24,0 \pm 0,1	3,5 \pm 0,2	16	18,8%	24,4 \pm 2,2	2,2 \pm 0,4	16
<i>per-I530A-HA</i>	7-1	100%	23,9 \pm 0	4,2 \pm 0,2	16	68,8%	23,2 \pm 0,4	2,1 \pm 0,2	16
<i>per-I530A-HA</i>	7-2	93,8%	24,2 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3	16	50,0%	25,4 \pm 0,5	1,8 \pm 0,1	16
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-1	100%	24,0 \pm 0	4,5 \pm 0,2	15	66,7%	22,7 \pm 0,3	3,0 \pm 0,3	15

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung, Temperatur: 18 °C

Genotyp	Linie	Rhy. LD	Per. LD	RS	n	Ryh. DD	Per. DD	RS	n
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-6	81,3%	24,3 ± 0,1	2,4 ± 0,3	16	18,8%	23,3 ± 0,2	1,8 ± 0,1	16
<i>per-M560D-HA</i>	9-2	100%	24,0 ± 0,1	2,9 ± 0,3	16	12,5%	25,7 ± 1,4	1,9 ± 0,9	16
<i>per-M560D-HA</i>	9-4-2	100%	24,2 ± 0,1	2,9 ± 0,3	16	50,0%	21,7 ± 0,5	2,0 ± 0,1	16
<i>per-M560D-c-myc</i>	10-2-1	93,8%	24,3 ± 0,3	2,8 ± 0,3	16	25,0%	23,3 ± 1,6	1,5 ± 0,7	16
<i>per-M560D-c-myc</i>	10-2-2	100%	24,1 ± 0,1	2,7 ± 0,3	16	37,5%	25,1 ± 0,5	1,3 ± 0,3	16
<i>per-W482E-M560D-HA</i>	11-6	93,8%	24,1 ± 0,1	2,7 ± 0,3	16	12,5%	23,3 ± 0,3	2,4 ± 0,7	16
<i>per-W482E-M560D-HA</i>	11-7	86,7%	23,9 ± 0,1	3,2 ± 0,4	15	13,3%	25,4 ± 1,9	1,5 ± 0,1	16
<i>per-W482E-M560D-myc</i>	12-1	100%	24,0 ± 0,1	2,8 ± 0,3	16	37,5%	26,3 ± 0,8	1,8 ± 0,4	16
<i>per-W482E-M560D-myc</i>	12-2	100%	23,9 ± 0	2,7 ± 0,3	16	37,5%	24,5 ± 1,7	1,7 ± 0,4	16

Temperatur: 25 °C

<i>y per⁰¹ w</i>	–	29,2%	24,5 ± 0,5	1,9 ± 0,2	24	0%	–	–	24
<i>y w</i>	–	95,8%	24,0 ± 0,1	2,3 ± 0,2	24	87,0%	23,4 ± 0,2	2,9 ± 0,3	23
<i>per-HA</i>	1-3	76,9%	24,0 ± 0,1	2,7 ± 0,3	13	69,2%	23,1 ± 0,3	3,2 ± 0,5	13
<i>per-HA</i>	1-5-1	66,7%	23,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	3	66,7%	25,2 ± 1,4	2,2 ± 1,1	3
<i>per-HA</i>	1-5-2	100%	24,0 ± 0,1	2,1 ± 0,3	7	85,7%	23,8 ± 0,4	2,8 ± 0,5	7
<i>per-HA</i>	1-6	100%	24,0 ± 0,0	2,5 ± 0,2	16	87,5%	22,9 ± 0,2	3,2 ± 0,1	16
<i>per-HA</i>	1-7	100%	24,0 ± 0,1	3,0 ± 0,4	8	87,5%	22,6 ± 0,1	3,6 ± 0,6	8
<i>per-HA</i>	1-8	75,0%	23,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	8	75,0%	22,6 ± 0,5	2,0 ± 0,3	8
<i>per-HA</i>	1-9	93,3%	24,1 ± 0,0	2,7 ± 0,2	15	57,1%	22,9 ± 0,2	2,6 ± 0,3	15
<i>per-HA</i>	1-10	100%	23,9 ± 0,1	2,2 ± 0,2	8	37,5%	25,8 ± 1,0	2,0 ± 0,5	8

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung, Temperatur: 25 °C

Genotyp	Linie	Rhy. LD	Per. LD	RS	n	Ryh. DD	Per. DD	RS	n
<i>per-HA</i>	1-11	100%	23,5 ± 0,4	1,9 ± 0,2	8	50,0%	22,5 ± 0,3	2,3 ± 0,3	8
<i>per-c-myc</i>	2-2-1	100%	24,1 ± 0,2	1,4 ± 0,2	8	75,0%	23,0 ± 0,5	2,4 ± 0,2	8
<i>per-c-myc</i>	2-2-2	75,0%	24,1 ± 0,0	2,0 ± 0,2	8	75,0%	23,2 ± 0,4	1,8 ± 0,2	8
<i>per-c-myc</i>	2-3	100%	23,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	8	50,0%	24,0 ± 0,8	2,1 ± 0,3	8
<i>per-c-myc</i>	2-4-1	87,5%	24,3 ± 0,2	1,6 ± 0,3	8	50,0%	23,6 ± 1,4	2,0 ± 0,2	8
<i>per-c-myc</i>	2-4-2	60,0%	23,9 ± 0,1	2,4 ± 0,3	3	60,0%	22,6 ± 0,2	2,2 ± 0,5	5
<i>per-c-myc</i>	2-5	100%	23,9 ± 0,0	2,0 ± 0,2	6	66,7%	22,8 ± 0,1	2,2 ± 0,3	6
<i>per-c-myc</i>	2-6	100%	24,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	13	100%	24,0 ± 0,3	2,7 ± 0,3	13
<i>per-c-myc</i>	2-7	100%	24,0 ± 0,1	2,2 ± 0,2	8	62,5%	22,5 ± 0,3	2,9 ± 0,4	8
<i>per-R345E-HA</i>	3-1	75,0%	24,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	8	37,5%	24,2 ± 2,0	2,0 ± 0,1	8
<i>per-R345E-HA</i>	3-2	50,0%	25,1 ± 1,3	1,5 ± 0,2	8	12,5%	26,0 ±	0,8	8
<i>per-R345E-HA</i>	3-3	50,0%	23,8 ± 0,6	1,6 ± 0,4	8	37,5%	25,8 ± 2,2	1,3 ± 0,3	8
<i>per-R345E-HA</i>	3-4	71,4%	23,6 ± 0,4	1,6 ± 0,3	8	28,6%	23,0 ± 0	1,6 ± 0,4	8
<i>per-R345E-HA</i>	3-5	37,5%	23,3 ± 2,0	1,3 ± 0,3	8	0,0%	–	–	8
<i>per-R345E-HA</i>	3-6	75,0%	23,5 ± 0,4	1,5 ± 0,3	8	0%	–	–	8
<i>per-R345E-HA</i>	3-7	83,3%	24,6 ± 0,3	1,4 ± 0,1	6	16,7%	22,3 *	1,5 *	1
<i>per-R345E-HA</i>	3-8	75,0%	23,6 ± 0,5	1,9 ± 0,2	8	0%			8
<i>per-R345E-HA</i>	3-10	75,0%	24,3 ± 0,6	1,4 ± 0,3	8	37,5%	24,5 ± 1,7	2,2 ± 0,2	8
<i>per-R345E-c-myc</i>	4-4	75,0%	24,0 ± 0,1	1,9 ± 0,3	8	12,5%	22,5 *	2,0 *	8
<i>per-R345E-c-myc</i>	4-5	57,1%	23,7 ± 0,1	2,2 ± 0,3	7	0%	–	–	7

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung, Temperatur: 25 °C

Genotyp	Linie	Rhy. LD	Per. LD	RS	n	Ryh. DD	Per. DD	RS	n
<i>per-R345E-c-myc</i>	4-6	100%	24,0 ± 0,1	1,8 ± 0,2	8	12,5%	23,8 *	2,5 *	8
<i>per-R345E-c-myc</i>	4-9-1	87,5%	24,3 ± 0,2	1,5 ± 0,2	8	25,0%	25,3 ± 2,3	1,3 ± 0	8
<i>per-R345E-c-myc</i>	4-9-2	37,5%	24,3 ± 0,4	2,0 ± 0,1	8	37,5%	21,4 ± 0,7	2,1 ± 0,4	8
<i>per-W482E-HA</i>	5-2	100%	24,3 ± 0,2	2,0 ± 0,3	8	0%	–	–	7
<i>per-W482E-HA</i>	5-3	25,0%	23,6 ± 0,3	1,3 ± 0,8	8	12,5%	26,8 *	1,8 *	8
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-1	100%	24,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	8	25,0%	27,5 ± 0,3	1,5 ± 0,1	8
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-2	25,0%	24,3 ± 0,3	2,7 ± 0,3	8	0%	–	–	8
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-3-1	75,0%	24,4 ± 0,1	1,8 ± 0,2	4	0%	–	–	4
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-4	25,0%	25,2 ± 0,4	2,3 ± 0,7	8	0%	–	–	8
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-5	50,0%	23,9 ± 0,1	1,9 ± 0,3	16	0%	–	–	16
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-6	66,7%	24,1 ± 0,1	1,7 ± 0,3	12	9,1%	26,8 *	2,4 *	11
<i>per-I530A-HA</i>	7-1	100%	24,1 ± 0,1	1,8 ± 0,2	8	100%	25,5 ± 0,9	2,2 ± 0,3	8
<i>per-I530A-HA</i>	7-2	87,5%	24,2 ± 0,1	1,7 ± 0,2	8	25,0%	27,8 ± 0,3	2,4 ± 0,9	8
<i>per-I530A-HA</i>	7-3	100%	24,2 ± 0,1	2,1 ± 0,2	8	87,5%	26,9 ± 0,3	2,9 ± 0,4	8
<i>per-I530A-HA</i>	7-4-1	100%	24,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	8	62,5%	23,3 ± 0,3	2,1 ± 0,4	8
<i>per-I530A-HA</i>	7-4-2	75,0%	24,1 ± 0,1	2,1 ± 0,4	8	28,6%	24,7 ± 1,2	3,3 ± 1,3	7
<i>per-I530A-HA</i>	7-6	75,0%	24,0 ± 0,0	2,0 ± 0,2	8	37,5%	24,7 ± 0,3	2,5 ± 0,2	8
<i>per-I530A-HA</i>	7-7	80,0%	24,0 ± 0,1	2,6 ± 0,5	5	60,0%	24,6 ± 0,1	4,3 ± 1,0	5
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-1	100%	24,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	8	62,5%	25,4 ± 0,5	4,1 ± 0,8	8
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-2	100%	24,0 ± 0,1	2,8 ± 0,2	8	100%	26,3 ± 0,3	3,5 ± 0,5	8

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung, Temperatur: 25 °C

Genotyp	Linie	Rhy. LD	Per. LD	RS	n	Ryh. DD	Per. DD	RS	n
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-3	100%	24,1 ± 0,0	3,3 ± 0,2	8	87,5%	25,9 ± 0,2	2,8 ± 0,4	8
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-6	75,0%	23,9 ± 0	2,2 ± 0,2	8	12,5%	25,5 *	1,6 *	8
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-9	100%	24,2 ± 0,1	3,0 ± 0,2	8	87,5%	26,2 ± 0,2	2,0 ± 0,3	8
<i>per-M560D-HA</i>	9-1	37,5%	23,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1	8	12,5%	24,0 *	2,0 *	8
<i>per-M560D-HA</i>	9-2	75,0%	24,1 ± 0,1	3,1 ± 0,2	8	25,0%	22,6 ± 0,8	4,7 ± 1,3	8
<i>per-M560D-HA</i>	9-4-1	25,0%	25,3 ± 1,3	1,9 ± 0,4	8	37,5%	23,1 ± 1,8	2,0 ± 0,3	8
<i>per-M560D-HA</i>	9-4-2	100%	24,1 ± 0,2	2,5 ± 0,2	8	50,0%	23,8 ± 0,4	2,6 ± 0,3	8
<i>per-M560D-HA</i>	9-5	75,0%	24,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	8	42,9%	23,3 ± 1,0	1,3 ± 0,3	7
<i>per-M560D-HA</i>	9-6	42,9%	24,0 ± 0	2,7 ± 0,7	7	0%	–	–	6
<i>per-M560D-HA</i>	9-8	87,5%	23,9 ± 0,1	2,5 ± 0,1	8	37,5%	23,9 ± 1,6	1,7 ± 0,3	8
<i>per-M560D-c-myc</i>	10-2-1	81,3%	24,0 ± 0,1	2,4 ± 0,2	16	62,5%	25,4 ± 0,4	2,5 ± 0,3	16
<i>per-M560D-c-myc</i>	10-2-2	68,8%	24,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	16	50,0%	24,6 ± 0,7	2,4 ± 0,4	16
<i>per-W482D-M560D-HA</i>	11-3-1	28,8%	25,4 ± 1,6	2,5 ± 0,6	7	0%	–	–	7
<i>per-W482D-M560D-HA</i>	11-4-1	88,9%	23,5 ± 0,3	2,3 ± 0,1	9	22,2%	25,2 ± 1,9	1,6 ± 0,4	9
<i>per-W482D-M560D-HA</i>	11-4-3	87,5%	24,0 ± 0,1	2,4 ± 0,3	7	0%	–	–	8
<i>per-W482D-M560D-HA</i>	11-5	37,5%	24,8 ± 1,1	1,7 ± 0,5	8	0%	–	–	8
<i>per-W482D-M560D-HA</i>	11-6	75,0%	24,0 ± 0,1	2,4 ± 0,2	8	0%	–	–	8
<i>per-W482D-M560D-HA</i>	11-7	37,5%	23,4 ± 0,8	2,1 ± 0,5	8	12,5%	27,5 *	2,2 *	8
<i>per-W482D-M560D-HA</i>	11-8	62,5%	24,0 ± 0,1	2,4 ± 0,3	8	0%	–	–	8
<i>per-W482D-M560D-HA</i>	11-10	100%	23,9 ± 0	2,5 ± 0,2	8	0%	–	–	8

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung, Temperatur: 25 °C

Genotyp	Linie	Rhy. LD	Per. LD	RS	n	Ryh. DD	Per. DD	RS	n
<i>per-W482D-M560D-c-myc</i>	12-1	37,5%	24,0 ± 0,3	2,2 ± 0,2	8	12,5%	25,8 *	2,3 *	8
<i>per-W482D-M560D-c-myc</i>	12-2	75,0%	24,1 ± 0,2	2,0 ± 0,3	8	0%	–	–	8
<i>per-W482D-M560D-c-myc</i>	12-4	37,5%	23,4 ± 0,3	1,7 ± 0,4	8	0%	–	–	8
<i>per-W482D-M560D-c-myc</i>	12-6	37,5%	23,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	8	0%	–	–	8
<i>per-W482D-M560D-c-myc</i>	12-7	75,0%	24,0 ± 0,1	2,2 ± 0,3	8	0%	–	–	8
<i>per-W482D-M560D-c-myc</i>	12-8	62,5%	23,4 ± 0,7	2,1 ± 0,3	8	25,0%	22,9 ± 1,6	2,7 ± 0,3	8

Temperatur: 29 °C

wildtyp	<i>CantonS</i>	keine Daten				100%	23,6 ± 0,2	3,3 ± 0,4	6
<i>w¹¹¹⁸</i>	–	keine Daten				100%	23,6 ± 0,1	3,1 ± 0,6	7
<i>yw</i>	–	57,1%	24,1 ± 0,1	2,3 ± 0,1	7	93,6%	23,8 ± 0,1	5,5 ± 0,4	16
<i>per-HA</i>	1-5-2	85,7%	24,1 ± 0	2,1 ± 0,3	7	93,8%	22,3 ± 0,2	3,3 ± 0,3	16
<i>per-HA</i>	1-8	100%	23,9 ± 0	2,3 ± 0,2	8	87,5%	21,9 ± 0,1	3,4 ± 0,5	16
<i>per-c-myc</i>	2-2-2	62,5%	23,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	8	81,3%	22,3 ± 0,1	3,6 ± 0,4	16
<i>per-c-myc</i>	2-6	75,0%	24,0 ± 0,1	1,9 ± 0,3	8	87,5%	22,9 ± 0,2	3,9 ± 0,4	16
<i>per-R345E-HA</i>	3-1	37,5%	23,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	8	6,3%	26,5 *	2,3 *	16
<i>per-R345E-HA</i>	3-2	12,5%	26,3 *	1,4 *	8	0%	–	–	8
<i>per-R345E-HA</i>	3-4	37,5%	23,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	8	0%	–	–	8
<i>per-R345E-c-myc</i>	4-4	62,5%	24,5 ± 0,4	1,4 ± 0,2	8	0%	–	–	16
<i>per-R345E-c-myc</i>	4-9-2	60,0%	24,4 ± 0,2	1,8 ± 0,3	8	0%	–	–	16
<i>per-W482E-HA</i>	5-2	42,9%	24,0 ± 0	1,6 ± 0,2	8	0%	–	–	16

Fortsetzung nächste Seite

Fortsetzung, Temperatur: 29 °C

Genotyp	Linie	Rhy. LD	Per. LD	RS	n	Ryh. DD	Per. DD	RS	n
<i>per-W482E-HA</i>	5-3	62,5%	24,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2	8	0%	–	–	16
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-1	20,0%	23,5 *	1,6 *	5	0%	–	–	16
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-3-2	keine Daten				0%	–	–	15
<i>per-W482E-c-myc</i>	6-5	62,5%	23,9 ± 0,1	1,5 ± 0,1	8	keine Daten			
<i>per-I530A-HA</i>	7-1	62,5%	24,5 ± 0,2	1,6 ± 0,2	8	62,5%	27,1 ± 0,3	2,0 ± 0,2	16
<i>per-I530A-HA</i>	7-2	71,4%	23,0 ± 1,0	1,4 ± 0,3	7	16,7%	25,4 ± 1,1	1,6 ± 0	12
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-1	75,0%	24,4 ± 0,2	1,8 ± 0,2	8	46,1%	26,2 ± 0,8	3,6 ± 0,6	13
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-3	83,3%	24,8 ± 0,2	1,6 ± 0,1	6	keine Daten			
<i>per-I530A-c-myc</i>	8-6	33,3%	25,2 ± 0,8	1,8 ± 0,6	6	keine Daten			
<i>per-M560D-HA</i>	9-2	71,4%	23,9 ± 0	2,3 ± 0,1	8	43,8%	23,3 ± 0,5	1,9 ± 0,4	16
<i>per-M560D-HA</i>	9-4-2	75,0%	23,8 ± 0,2	2,0 ± 0,2	8	62,5%	21,9 ± 0,1	3,2 ± 0,5	16
<i>per-M560D-c-myc</i>	10-2-1	100%	24,1 ± 0,1	2,1 ± 0,2	8	68,8%	24,9 ± 0,2	3,1 ± 0,5	16
<i>per-M560D-c-myc</i>	10-2-2	66,7%	24,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	6	56,3%	24,3 ± 0,6	1,9 ± 0,2	16
<i>per-W482E-M560D-HA</i>	11-6	37,5%	23,8 ± 0,1	1,2 ± 0,4	8	0%	–	–	16
<i>per-W482E-M560D-HA</i>	11-7	0%	–	–	8	16,7%	27,5 ± 2,5	1,3 ± 0,3	12
<i>per-W482E-M560D-c-myc</i>	12-1	12,5%	27,0 *	1,5 *	8	6,3%	26,3 *	2,1 *	16
<i>per-W482E-M560D-c-myc</i>	12-2	37,5%	23,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	8	6,3%	27,0 *	1,2 *	16

Ende der Tabelle

Anhang B

Dank

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Masao Doi und Paul Hardin, die mich mit den DNA-Konstrukten versorgt haben, die das PERIOD-Projekt ermöglicht haben, bei Letzterem auch für den essentiellen Tipp die PERIOD-Dimerisierung mit CoIP zu untersuchen.

Vielen Dank auch an Eva Wolf für die Auswahl der PERIOD-Mutationen und für viele hilfreiche Diskussionen und Erklärungen zu diesem Projekt.

Ganz herzlichen Dank auch nach Leicester (UK) an „Bambos“ Kyriacou für die nette Zusammenarbeit beim TIMELESS-Projekt, die zu der super Veröffentlichung geführt hat. Nicht zu vergessen, die vielen Emails, die alle im *Kyriacou way of speaking* verfasst waren („...there are also Italians in the project ... no wonder they've lost the war ...“)

Vielen herzlichen Dank an Charlotte Förster für viel Hilfe bei Fragen zu Rhythmik und Verhalten.

Ganz herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter der AG Förster und des LS Schneuwly und natürlich alle meine Laborkollegen! Sorry, dass ich Euch nicht

alle einzeln aufzähle, Ihr seid einfach zu viele. Herzlichen Dank für eine tolle Zusammenarbeit, viel Tipps und Hilfe, und den Spaß, den wir im Labor und bei diversen Festen hatten!

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Stephan Schneuwly, an dessen Lehrstuhl ich diese Arbeit anfertigen durfte.

Und ganz herzlichen Dank natürlich an Ralf (Prof. Dr. Ralf Stanewsky) für die Betreuung dieser Arbeit!

Anhang C

Erklärung

Hiermit erkläre ich, diese Dissertation selbstständig angefertigt und dabei keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt zu haben. Alle aus der Literatur entnommenen Daten und Abbildungen sind als solche gekennzeichnet. Die hier vorliegende Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt.

Regensburg, den

Johannes Landskron