

Charakterisierung der transkriptionellen
Regulation des humanen Period 1-Gens
(*hPER1*) *in vitro*

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biologe Dirk Motzkus
geboren am 19.07.1972 in Siegen

2001

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Korreferent: Prof. Dr. U. Albrecht
Tag der Promotion: 19.01.2001

Meinen Eltern, meiner Oma und meinen Freunden

Zusammenfassung: Inhalt der Arbeit ist die Charakterisierung der Promotor-Region des humanen Gens für period 1 (hPER1). Dazu wurden sowohl Aktivatoren („first messengers“) als auch intrazelluläre Signal-Transduktoren („second messengers“) in verschiedenen Zelllinien untersucht. Der Promotor von hPER1 konnte mit Hilfe von Southern Blot-Analysen auf einem humanen Cosmid lokalisiert, kloniert und vollständig sequenziert werden. Zur Identifikation putativer Promotor-Elemente wurde eine *in silico*-Analyse durchgeführt. Anschließend wurde ein Promotor-Luciferase-Reporterplasmid konstruiert und in verschiedene Zelllinien transfiziert. Mit Hilfe von Reporter-gen-Experimenten konnte in humanen Hepatoma-Zellen (HuH-7) eine synergistische Induktion des hPER1-luc-Konstruktes durch PKA- und PKC-aktivierende Agentien festgestellt werden. Die endogene Responsivität von hPER1 wurde mit Hilfe quantitativer RT-PCR (TaqMan-Analyse) validiert. Durch Interleukin-6 (IL-6) konnte hPER1-luc in HuH-7, nicht aber in der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y aktiviert werden. In Choriocarcinoma-Zellen (JEG-3) führten die bisher nur als Modulatoren des zentralen Oszillators bekannten Peptide VIP und PACAP zu einer fünf-fachen Induktion des Reporters. Mögliche Rezeptoren für die Signalwirkung und die Zusammenhänge zum efferenten System des zirkadianen Rhythmus sind diskutiert.

Schlagworte: zirkadiane Rhythmen, Period 1, Signaltransduktion

Abstract: The subject of this work was the characterization of the promoter of the human gene encoding period 1 (hPER1). Components of intracellular signal transduction („second messenger“) and primary activators („first messengers“) were characterized in different cell lines. In brief, these studies included the localization of the promoter region of hPER1 on a human genomic cosmid by Southern Blot analysis, its cloning, complete sequencing and *in silico* analysis. A sequence-derived promoter-luciferase construct was made and different cell lines were transfected. Using reporter-gene assays a synergistic induction of the hPER1-luc reporter gene by PKA- and PKC-activating agents was found in human hepatoma cells (HuH-7). The endogenous responsiveness of the hPER1 gene was validated using quantitative RT-PCR (TaqMan) analysis. Interleukin-6 (IL-6) also induced hPER1-luc activity in HUH-7 cells, but not in the neuroblastoma cell line SH-SY5Y. Additionally, in the choriocarcinoma cell line JEG-3, the peptides VIP and PACAP, as yet only known as modulators of the central oscillator, the SCN, led to a fivefold induction of the reporter. Possible receptors for these responses and connections to the efferent circadian system are discussed.

Keywords: circadian rhythms, period 1, signal-transduction

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µM	Mikromolar
β-ME	β-Mercapto-Ethanol
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure/n
ATCC	„American Type Culture Collection“
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CLDB	„Cell Line Data Base“
cDNA	komplementäre DNA, die bei der reversen Transkription von RNA entsteht
Da	Dalton
ddH ₂ O	Aqua bidestillata
d.i.	das ist
EtBr	Ethidiumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
FLIPR™	„Fluometric Imaging Plate Reader System“
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	96%iges Ethanol
et al.	et altera
FCS	Fetales Kälberserum
x g	Erdbeschleunigung
h	Stunde/n
HCl	Salzsäure
HRP	„Horse-Radish-Peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase
IP ₃	Inositol (1,4,5)-Triphosphat
IL-6	Interleukin-6
IUPAC	„International Union of Pure and Applied Chemistry“
J	Joule
kb	Kilobase/n
kDa	Kilodalton (siehe auch Da)
l	Liter
min	Minute/n
M	Molar
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nt	Nukleotide
nM	Nanomolar
OD	Optische Dichte
PACAP	„Pituitary adenylat cyclase-activating polypeptide“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBGD	Porphobilinogen Desaminase
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ (Polymerasekettenreaktion)

Abkürzungsverzeichnis

pH	potentium hydrogenii
PKA	Protein Kinase A; „cAMP-dependent protein kinase“
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
RNA	„Ribonucleic acid“ (Ribonukleinsäure)
<i>Rp</i> -8-CPT-cAMPS	<i>Rp</i> -8-(4-Chlorophenylthio)-Adenosin-3',5'-cyclic Monophosphorothionat, <i>Rp</i> -Isomer
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
<i>Sp</i> -5,6-DCI-cBiMPS	5,6-Dichlorbenzimidazol-1- β -D-Ribofuranosyl-3',5'-Mono-Phosphorthionat; <i>Sp</i> -Isomer
SSC	„Standard Saline Citrate“
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TSR	„template suppression reagent“
ün	über Nacht
VIP	„Vasoactive intestinal peptide“
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	1
1.1 Zirkadiane Rhythmen	1
1.2 Molekulare Mechanismen der zirkadianen Uhr	2
1.3 Afferente Mechanismen der Synchronisation des SCN	6
1.3.1 Extrazelluläre Signalmoleküle	6
1.3.2 Intrazelluläre Signalverarbeitung	8
1.4 Efferente Mechanismen zur Synchronisation peripherer Organe	13
1.5 Störungen zirkadianer Rhythmen	14
1.6 Ziel der Arbeit	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Materialien, Organismen und Kulturbedingungen	16
2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen	16
2.1.2 Computer, Programme und Statistik	16
2.1.3 Geräte und Apparaturen	17
2.1.4 Kits und Enzyme	17
2.1.5 Verwendete Oligonukleotide	18
2.1.6 Verwendete Organismen und Plasmide	19
2.2 Klonierung von DNA-Fragmenten	20
2.2.1 Isolation von DNA	20
2.2.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin Plus-Kit (Macherey-Nagel)	20
2.2.1.2 Präparation von Endotoxin-freier Plasmid-DNA (Qiagen)	21
2.2.1.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen	21
2.2.2 DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen	22
2.2.3 Ligation	22

2.2.4	Herstellung von Transformations-kompetenten Zellen (DAGERT und EHRlich, 1979)	22
2.2.5	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E.coli</i> -Zellen	23
2.2.6	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	24
2.2.7	Photometrische Konzentrationsbestimmung	24
2.2.8	Southern Blot Analyse	25
2.2.9	Sequenzierung von DNA	26
2.2.10	Aufreinigung der Sequenzierproben durch DNA-Präzipitation	27
2.2.11	PCR: Polymerasekettenreaktion	27
2.3	Arbeiten mit RNA und Transkriptanalyse	28
2.3.1	Isolation von RNA aus Zellen	28
2.3.2	Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)	29
2.3.3	Relative Quantifizierung von Transkripten mit <i>TaqMan</i> [™] -PCR	30
2.4	Kultivierung eukaryotischer Zellen	33
2.4.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	33
2.4.2	Transfektion von Zellen	35
2.4.2.4	Transiente Transfektion von Zellen	35
2.4.2.5	Stabile Transfektion von Zellen	36
2.4.3	Stimulation von Zellen	37
2.4.4	Verwendete pharmakologische Substanzen	38
2.4.5	Luciferase-Reportergen-Assay	38
2.5	Proteinbiochemische Methoden	39
2.5.1	Probenvorbereitung	39
2.5.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.5.3	Immuno-Blot Analyse	40
2.6	Ca²⁺-Messungen mit FLIPR[™]	43
2.7	Herstellung einer Peptidbank	44
3.	ERGEBNISSE	46
3.1	Herstellung eines Promotor-Luciferase-Konstruktes des humanen <i>hPER1</i>-Gens	46
3.1.1	Southern Blot Analyse zur Isolation eines Promotor-Fragments von <i>hPER1</i>	46
3.1.2	<i>In silico</i> Promotor-Analyse	49

3.2	Optimierung der Transfektionseffizienzen	51
3.3	Aktivierung von <i>hPER1</i>-luc	53
3.3.1	Bestimmung der PKA-abhängigen Promotor-Aktivität	53
3.3.2	Synergismus der PKA und PKC induzierten Promotor-Aktivität	54
3.4	Aktivierung von <i>hPER1</i>-luc durch pCREB	57
3.5	cAMP-responsive Elemente in <i>hPER1</i>-luc	58
3.6	Aktivierung von <i>hPER1</i> durch „second messengers“	59
3.7	Relative Quantifizierung der <i>hPER1</i>-Aktivierung mit dem TaqMan™	61
3.7.1	Stimulation und Kontrollen	61
3.7.2	Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Bestimmung des Stimulationsfaktors	62
3.8	Aktivierung von <i>hPER1</i> durch „first messengers“	65
3.8.1	Etablierung stabiler Zelllinien	65
3.8.2	„Screening“ einer bovinen Augen-Peptidbank	66
3.8.3	Synergistische Aktivierung von <i>hPER1</i> durch Interleukin-6 (IL-6) in HUH-7 Zellen	68
3.8.4	Aktivierung von <i>hPER1</i> durch VIP und PACAP in JEG-3 Zellen	69
3.9	Ca²⁺-Messungen mit dem FLIPR™	70
4.	DISKUSSION	73
4.1	Induktion von <i>hPER1</i> durch PKA und PKC	73
4.2	Induktion von <i>hPER1</i> durch IL-6 in HUH-7 Zellen	76
4.3	Induktion von <i>hPER1</i> durch VIP und PACAP	78
5.	ZUSAMMENFASSUNG	80
6.	LITERATURVERZEICHNIS	81
7.	ANHANG	93

1. Einleitung

1.1 Zirkadiane Rhythmen

Die Anpassung an externe, sich periodisch wiederholende Zyklen, wie z. B. dem Wechsel von Tag und Nacht, ist für alle Organismen von fundamentaler Bedeutung (ASCHOFF, 1981). Das Vorhandensein biologischer Uhren ermöglicht es, unabhängig von Sonnenauf- oder -untergang, die Tageszeit abzuschätzen (vgl. DUNLAP, 1999). Die Periodenlänge, d.h. das Wiedererreichen des gleichen Zustandes nach einer konstanten Zeit, beträgt bei fast allen bisher untersuchten Organismen ungefähr 24 Stunden und wird daher als zirkadian (zirka: ungefähr; dian: 1 Tag) bezeichnet. Während in Archaeobakterien und den meisten Eubakterien keine Rhythmizität nachgewiesen werden konnte, ist das Prinzip der zirkadianen Anpassung bei den meisten höheren Lebewesen konserviert. Die Anpassung an den Zyklus der Sonne scheint somit für das Leben aller höheren Taxa einen wesentlichen Faktor darzustellen.

Ein zirkadianes System läßt sich in drei wesentliche Komponenten aufteilen, die für das Funktionieren des oszillatorischen Netzwerkes notwendig sind. Erstens müssen Mechanismen vorhanden sein, die für die Generierung und Aufrechterhaltung der Oszillation verantwortlich sind. Die hierin involvierten Gene sind von elementarer Bedeutung für den Oszillator und stellen den sog. „Schrittmacher“ des Systems dar. Zweitens ist eine Anpassung („entrainment“) der Rhythmizität an externe Stimuli notwendig. Dabei führen Veränderungen der Umwelt zu einer Phasenverschiebung innerhalb des Oszillators. Drittens muß die Zeitinformation des Oszillators an die Peripherie weitergegeben werden. Letztendlich führt die Synchronisation des Organismus an die Phase des internen Schrittmachers zur Anpassung physiologischer Abläufe bis hin zur Veränderung komplexer Verhaltensweisen. Weiterhin ist eine Rückkopplung des zirkadianen Systems notwendig, die dem Oszillator den Status der peripheren Organe anzeigt. Die genannten Kriterien ermöglichen eine Zuordnung Uhr-regulierter Gene („clock-controlled-genes“) zu den afferenten, zentralen oder efferenten Bestandteilen des oszillatorischen Systems. Führt beispielsweise die Deletion eines Gens zu Arrhythmizität, so kann postuliert werden, daß es sich dabei um eine zentrale Komponente des Oszillators handelt. Ist dies nicht der Fall, ist anzunehmen, daß es sich um ein afferentes oder efferentes Effektormolekül handelt.

In Vertebraten ist das zentrale Element des zirkadianen Systems im *Nucleus Suprachiasmaticus* (SCN) lokalisiert. Dieser zentrale Oszillator liegt in einem paarigen Kern nahe des dritten Ventrikels ventral des Hypothalamus superior des optischen Chiasmus. Der SCN stellt eine autonome Einheit dar, die unabhängig aller externen *Zeitgeber* die eigene Rhythmizität aufrechterhalten kann. Diese Eigenschaft konnte sowohl *in vitro* (GREEN und GILLETTE, 1982; GROOS und HENDRIKS, 1982; SHIBATA *et al.*, 1982) als auch *in vivo* (SCHWARTZ und GAINER, 1977; INOUE und KAWAMURA, 1979) belegt werden. Die afferente Zuleitung von Informationen erfolgt im wesentlichen über die Rezeptoren der Retina entlang des retinohypothalamischen Traktes (RHT) zum SCN. Nach der Verarbeitung der Signale, die zur Veränderung der Phase im SCN führen können, werden die Informationen durch neuronale und endokrine Mechanismen an andere Gewebe weitergeleitet. In den nachfolgenden Kapiteln soll der afferente Weg der Signalaufnahme, der autonome aber anpassungsfähige Schrittmacher und der efferente Weg der Signalweitergabe durch die Darstellung der bekannten Mechanismen und Schlüsselmoleküle beschrieben werden.

1.2 Molekulare Mechanismen der zirkadianen Uhr

Für die Generierung und Aufrechterhaltung eines Rhythmus muß ein System phasenweise aus einem Zustand gebracht werden, um nach einer bestimmten Periode wieder in diesen Zustand zurückzukehren. Für einen solchen Mechanismus sind Regulatoren notwendig, die eine negative Rückkopplung zum Effektor haben. Modellorganismen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen reichen vom Cyanobakterium (*Synechococcus*) über *Neurospora* bis zu *Drosophila*. Bei den genannten Organismen ist trotz der Divergenz der involvierten Gene das Prinzip der Rhythmizität gleich: Die Wirkung eines Effektors wird durch die Aktivierung einer negativen Rückkopplung zum Effektor phasenweise inhibiert. Die Wirkung von positiven Elementen (*kaiA* in *Synechococcus*, *WHITE COLLAR (WC)-1* und *WC-2* in *Neurospora* und *Clock* und *Cycle* in *Drosophila*) wird durch negative Elemente (*kaiC* in *Synechococcus*, *frequency* bei *Neurospora* und *period* und *timeless* in *Drosophila*) inhibiert (vgl. DUNLAP, 1999).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die zentralen Proteine und Mechanismen bei Vertebraten näher beschrieben. Die negativen Elemente des zirkadianen Systems scheinen hier die Gene für *Period (Per)* und *Cryptochrom (Cry)* zu sein. Die *Per*-Gene werden im SCN und verschiedenen Geweben sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene diurnal exprimiert (ALBRECHT *et al.*, 1997; FIELD *et al.*, 2000; SHEARMAN *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 1997; TAKUMI *et al.*, 1998; TEI *et al.*, 1997; ZYLKA *et*

al., 1998; ZHENG *et al.* 1999). *mPer1* und *mPer2* sind im SCN im Dauerdunkel (DD) phasenverschoben exprimiert, wobei die mRNA von *mPer2* ca. 4 Stunden nach der von *mPer1* gebildet wird. Abbildung 1 zeigt ein zeitliches Schema der wichtigsten Elemente im SCN.

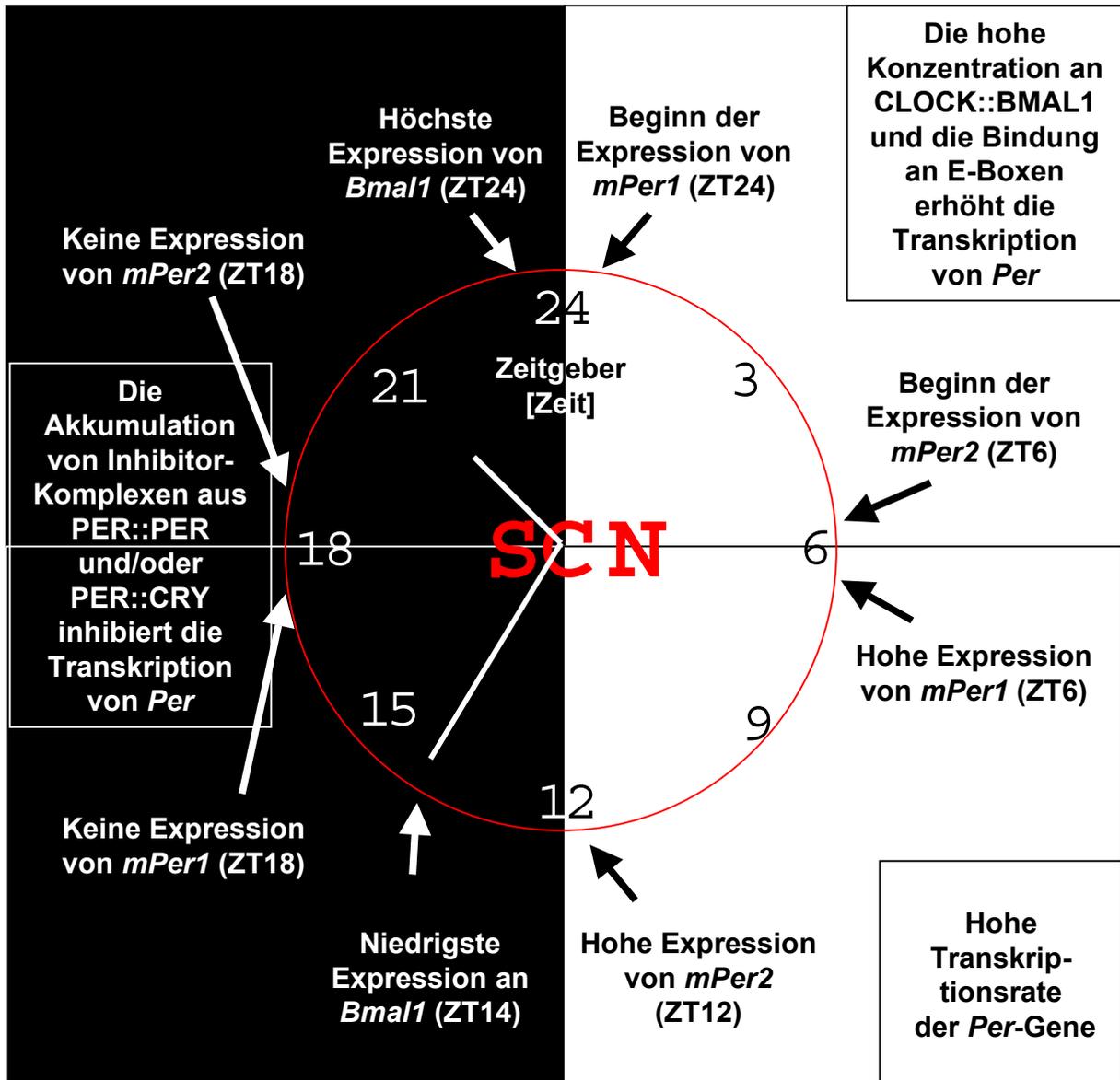


Abbildung 1: Modell der zirkadianen Uhr im SCN der Maus. Die Expression von Mediatoren (*Per*) und Aktivatoren (*Bmal1*) zu verschiedenen zirkadianen Zeiten (ZT) sind wesentliche Komponenten der inneren Uhr. Angaben von *mPer1*, *mPer2* und *Bmal1* nach ALBRECHT *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 1997 und OISHI *et al.*, 1998a.

Die CRY-Proteine scheinen im Laufe der Evolution aus Licht-Rezeptoren der Pflanzen (Cryptochromen) hervorgegangen zu sein. Die Säuger-Homologe zeigen keine Photoreaktivierung, behielten jedoch ihren Namen bei. Deletionen der Gene für *mCry1* und *mCry2* führen zu einer signifikanten Verkürzung (*mCry1*) bzw. Verlängerung (*mCry2*) der Periode im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (VAN DER HORST *et al.*, 1999). Im DD sind *mCry1/mCry2* defiziente Mäuse arhythmisch. Die

Aktivierung der Transkription von *Per* und *Cry* erfolgt nach einem Modell von SHEARMAN *et al.* (2000) durch die Bildung von Heterodimeren der Proteine CLOCK (CLK) und BMAL1, die die positiven Elemente des Systems darstellen. Ebenso wie PER zeigen CLK und BMAL1 innerhalb einer Domäne hohe Sequenzähnlichkeit mit dem humanen „Aryl-hydrocarbon nuclear translocator“ (ARNT) und „single minded“ (SIM) aus *Drosophila*. Dieser homologe Bereich aus PER, ARNT und SIM wird als die sog. PAS-Domäne bezeichnet und scheint für die Heterodimerisierung der Proteine verantwortlich zu sein. Die Bindung von BMAL1/CLK-Heterodimeren an zirkadiane „Enhancer“-Elemente der Promotoren von *Per* und *Cry* führt zur Aktivierung der Transkription (GEKAKIS *et al.*, 1998, OISHI *et al.*, 1998a). Nach der Bildung eines transkriptionsaktiven Komplexes kann durch die Interaktion der bHLH- („basic helix-loop-helix“) und anderer Domänen mit der DNA die transkriptionelle Aktivität von *mCry* und *mPer* initiiert werden. Einige *in vitro* Experimente zeigten, daß die spezifische Aktivierung der Gene durch die palindrome E-Box-Sequenz (CACGTG) mediiert wird. Die Bedeutung des putativen Elementes konnte bisher nur in Reporter-gen-Studien bei *mPer1* belegt werden (HIDA *et al.*, 2000). Inwieweit das Sequenzmotiv bei anderen Uhr-regulierten Genen funktionelle Eigenschaften aufweist, ist nicht bekannt. In *Drosophila* wurde gezeigt, daß die E-Box zwar für die Initiation der Transkription, nicht aber für die zirkadiane Expression des *Drosophila*-Homologen Gens *dPer* verantwortlich ist (HAO *et al.*, 1997).

In Vertebraten wird die Inhibition der Transkription von *Per* und *Cry* wahrscheinlich durch die entstehenden Proteine selbst reguliert. CRY und PER bilden Homo- oder Heterodimere, die für die Translokation der Proteine in den Kern verantwortlich sind (KUME *et al.*, 1999). Die Heterodimerisierung von PER und CRY wird, ebenso wie bei CLK/BMAL1, wahrscheinlich durch die PAS-Domäne vermittelt. Der genaue Mechanismus, mit dem die Protein-Komplexe auf die Expression von *Per* und *Cry* wirken, konnte noch nicht aufgeklärt werden. Im Gegensatz zu diesem Modell könnte *mPER2* auch als positiver Regulator des zirkadianen Systems fungieren (ZHENG *et al.*, 1999). Eine Mutation in *mPer2* inhibiert die rhythmische Expression von *mPER1*. Dieser Befund läßt vermuten, daß *mPer1* direkt oder indirekt durch *mPer2* aktiviert wird. Somit könnte PER2 zumindest bei der Maus ein positives Regulator-Element darstellen.

Ein Modell für die Generierung des Rhythmus im SCN ist in Abbildung 2 dargestellt.

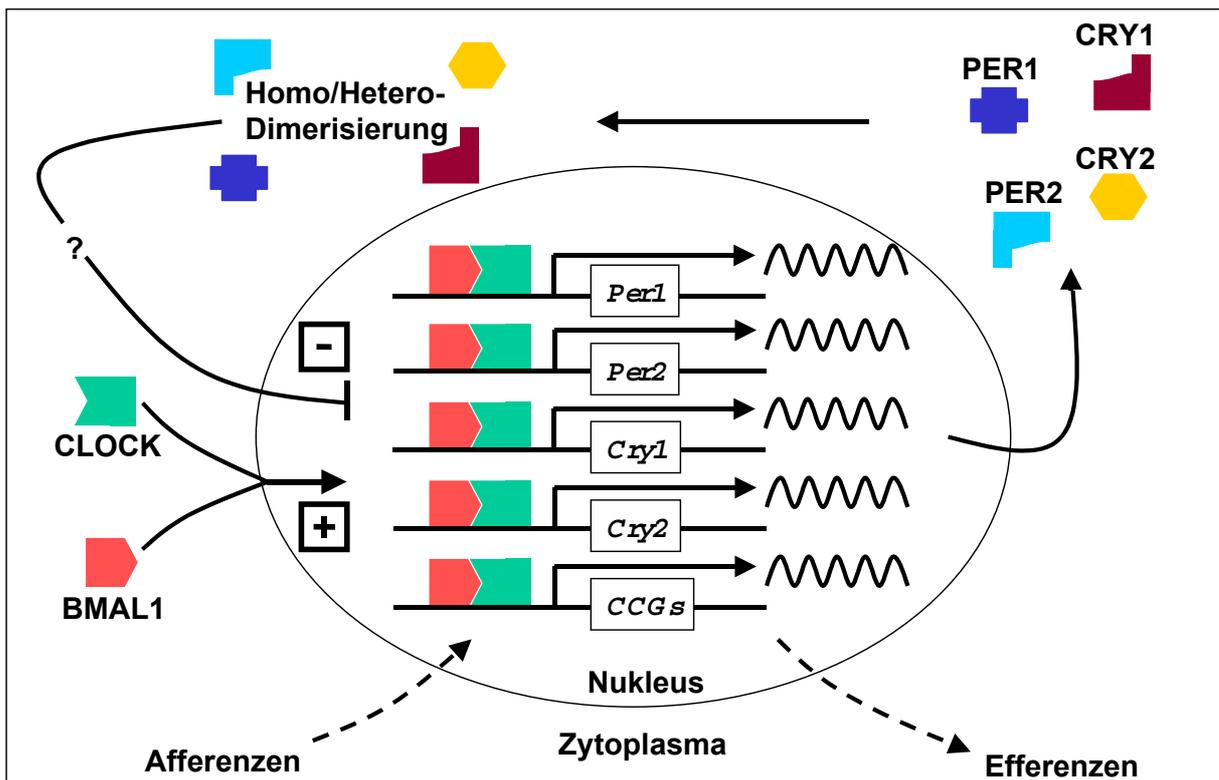


Abbildung 2: Modell des oszillatorischen Systems im SCN. Heterodimere von CLOCK und BMAL1 aktivieren die Transkription von *Cry*, *Per* und „clock controlled genes“ (CCG). Die Bildung der Proteine CRY und PER führt zur Inhibition der Transkription, wahrscheinlich durch Bildung von Homo- oder Heterodimeren. Afferente und efferente Signale können die Phase des SCN verschieben.

Die zentralen Elemente des Oszillators können durch afferente Induktionen in ihrer Phase verändert werden (vgl. Abbildung 2). Durch die Initiation eines Lichtpulses innerhalb der Dunkelperiode kann die sofortige Expression von *mPer1* im SCN induziert werden (ALBRECHT *et al.*, 1997) und die Phase des Systems nach vorn verschoben werden („phase advance“). Für diese Veränderung der Phase („resetting“) sind eine Vielzahl von Transduktoren gefunden worden, die für die Anpassung des zentralen Schrittmachers verantwortlich sein könnten. Die Wirkung dieser Substanzen auf die Neuronen des SCN wird durch die spezifische Bindung an Rezeptoren hervorgerufen. Intrazelluläre Signaltransduktions-Mechanismen führen über die Aktivierung von „second messengers“ und schließlich von Transkriptionsfaktoren zu einer Veränderung der Genexpression. Die bisher bekannten Schlüssel-Mediatoren und einige Wege der möglichen Signaltransduktion sind nachfolgend beschrieben.

1.3 Afferente Mechanismen der Synchronisation des SCN

1.3.1 Extrazelluläre Signalmoleküle

Eine wesentliche Eigenschaft des Oszillators ist die Möglichkeit der Anpassung („entrainment“) an externe Veränderungen des Tag/Nacht-Rhythmus (vgl. TAKAHASHI, 1995). Dabei wirkt bei allen untersuchten diurnalen Organismen Licht als externer Zeitgeber auf die Retina. Nach der Aktivierung spezifischer Photorezeptoren wird die Licht-Information meist über afferente Neuronen des RHT zum SCN geleitet (vgl. VAN ESSEVELDT *et al.*, 2000). Eine Reihe verschiedener neuromodulatorischer Peptide sind bekannt. So kann Licht zur Freisetzung von Glutamat (Gln) aus terminalen RHT-Neuronen führen (CAHILL und MENAKER, 1989). Experimentell führt die Applikation von Gln, ebenso wie die Aktivierung spezifischer Rezeptoren durch Licht, zum Zurücksetzen der Phase im SCN (TAMARU *et al.*, 2000). Möglicherweise ist für die Umsetzung des Glutamat-Signals ein nachgeschalteter Mechanismus zuständig, der Gln in den Neurotransmitter γ -Amino-Buttersäure (GABA) umwandelt. Ebenso wie GABA selbst ist die Aktivität des für diese Reaktion verantwortlichen Enzyms Glutamat-Decarboxylase zirkadian reguliert (AGUILAR-ROBLERO *et al.*, 1993). GABAerge Neuronen scheinen aber auch für die afferente Weitergabe von Signalen an den *Nucleus Paraventricularis* (PVN) verantwortlich zu sein. Serotonin (5-Hydroxytryptamin (5-HT)) scheint sowohl in die afferente als auch in die efferente Signalübermittlung des SCN involviert zu sein. In der Retina liegende serotonerge Neuronen projizieren dabei nicht über den RHT, sondern über die *Raphe Nuclei* zum SCN. Die Bildung von 5-HT erfolgt auch im Dauer-Dunkel diurnal, wobei das Maximum der Synthese in der Nacht liegt (CT16) (CAGAMPANG und INOUE, 1994). Ein weiteres neuromodulatorisches Peptid ist Vasopressin (AVP). Im Dauer-Dunkel sind sowohl die mRNA (UHL und REPERT, 1986) als auch das Peptid (TOMINAGA *et al.*, 1992) zirkadian reguliert. Bei der Deletion des Gens zeigen Ratten nur Veränderungen in der Periodenlänge, nicht aber in der Rhythmicität selbst (GROBLEWSKI *et al.*, 1981). Daher wird angenommen, daß AVP nur eine modulatorische Funktion innerhalb des zirkadianen Systems einnimmt. Ebenso wie AVP zeigt auch Somatostatin (SOM) im DD eine zirkadiane Verteilung im SCN (FUKUHARA *et al.*, 1994).

Ein weiterer neuromodulatorischer Faktor ist das „vasointestinal polypeptide“ (VIP). Neben verschiedenen Organen und der freien Zirkulation im Blut wurde VIP auch im zentralen und peripheren Nervengewebe (FAHRENKRUG, 1979) und schließlich auch in Neuronen des SCN gefunden (CARD *et al.*, 1981). Diurnale Schwankungen des Peptids konnten jedoch nur bei Licht-Dunkel-Rhythmen (LD) festgestellt werden, während bei DD die Menge von VIP im SCN konstant bleibt (MORIN *et al.*, 1991). VIP

wird aus einem Vorläufer-Protein generiert (Prä-Pro-VIP), welches im Golgi-Apparat von Nervenzellen gebildet und in Vesikeln freigesetzt wird. In diesem Zusammenhang steht auch ein weiterer Neuromodulator, das Peptid-Hormon „gastrin releasing peptide“ (GRP). Das Peptid zeigt unter Licht-Dunkel-Bedingungen eine rhythmische Verteilung im SCN, die in Antiphase mit VIP liegt (OKAMURA und IBATA, 1994). Darüber hinaus projizieren VIP und GRP-Neuronen aus dem SCN, so daß für die beiden Transmitter auch eine efferente Wirkung postuliert wurde (OKAMURA und IBATA, 1994).

Ein weiterer neuromodulatorischer Transmitter, „pituitary adenylat cyclase-activating polypeptide“ (PACAP) zeigt ähnliche Eigenschaften wie VIP. Ebenso wie Dopamin und Somatostatin wird PACAP vom Hypothalamus sezerniert und löst im anterioren Teil des Hypophysen-Vorderlappens spezifische Effekte aus. Das Peptid konnte in zwei alternativen Formen, PACAP 1-38 (MIYATA *et al.*, 1989) und PACAP 1-27 (MIYATA *et al.*, 1990), isoliert werden. Die beiden Formen werden aus einer gemeinsamen cDNA gebildet, die für ein Vorläufer-Polypeptid (Prä-Pro-PACAP) kodiert, aus dem posttranslational die maturen Formen gebildet werden. Die hohe Sequenzidentität zwischen den klonierten Sequenzen aus Schaf, Ratte, Maus und Mensch suggeriert eine wichtige physiologische Rolle der Peptide. Die funktionelle Ähnlichkeit von VIP und PACAP spiegelt sich in der hohen Sequenzübereinstimmung der beiden Peptide wieder. Die Abbildung 3 zeigt einen Vergleich der humanen Sequenzen.

	1	10	20	30																																					
PACAP 1-38	h	s	d	g	i	f	t	s	y	s	r	y	r	k	q	m	a	v	k	k	y	l	a	a	v	l	g	k	r	y	k	r	v	k	n	k					
PACAP 1-27	h	s	d	g	i	f	t	s	y	s	r	y	r	k	q	m	a	v	k	k	y	l	a	a	v	l															
				+				+																															+	+	
VIP	h	s	d	a	v	f	t	d	n	y	t	r	l	r	k	q	m	a	v	k	k	y	l	n	s	i	l	n													

Abbildung 3: Sequenzvergleich von PACAP und VIP. Die humanen Sequenzen von PACAP 1-38, PACAP 1-27 und VIP sind gezeigt, die Positionen sind oben angegeben; (|): identische Aminosäure, (+): Aminosäure mit ähnlichen Eigenschaften.

Neben den Funktionen im Hypothalamus gibt es auch Hinweise, daß PACAP für die afferente Informationsweitergabe vom optischen System zum SCN verantwortlich ist (HANNIBAL *et al.* 1997). Ebenso wie Glutamin ist PACAP in den terminalen Neuronen des RHT (HANNIBAL *et al.* 2000) lokalisiert und scheint einer der zentralen Übermittler für Licht-Information an den SCN zu sein (SHIGEYOSHI *et al.*, 1997). PACAP zeigt *in vivo* das gleiche Verhalten wie Licht bezüglich der Verschiebung der zirkadianen Zeit im SCN (HARRINGTON *et al.*, 1999).

Für die Vermittlung der genannten Transmittermoleküle sind spezifische Rezeptoren verantwortlich, von denen manche, ebenso wie ihre Liganden, diurnal exprimiert werden. Innerhalb des SCN sind dabei nicht alle Neuronen mit dem gleichen Rezeptorsatz ausgestattet. Immunhistologisch sind Subpopulationen von Neuronen mit unterschiedlichen Rezeptoren und Neurotransmittern nachweisbar, die innerhalb des SCN eine hohe Komplexität an Informationsverarbeitung vermuten lassen (vgl. VAN ESSEVELDT *et al.*, 2000).

1.3.2 Intrazelluläre Signalverarbeitung

Die Responsivität von Zellen auf extrazelluläre Signale erfolgt in einem ersten Schritt durch die Bindung des Liganden an spezifische Rezeptoren. Für die Weitergabe der Informationen ist ein komplexes Netzwerk an „second messengers“ notwendig (vgl. HUNTER, 2000). Im Vergleich zur „langsamen“ *de novo* Transkription und Translation erfolgt die Signal-Weitergabe meist durch schnelle und reversible Phosphorylierung intrazellulärer Proteine. Durch die Existenz vieler Signalwege und ihrer Konvergenz kann die gleiche Information durch zytoplasmatische Regulatoren unterschiedlich interpretiert werden. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kann schließlich zu differentieller Genregulation führen. Nachfolgend sind die wichtigsten Elemente der Protein Kinase A- (PKA) und Protein Kinase C- (PKC) vermittelten Signaltransduktion beschrieben. Die Bildung eines aktiven Homodimers des Transkriptionsfaktors „cAMP responsive element binding protein“ (CREB) kann durch die Aktivierung der PKA (MONTMINY *et al.* 1990, vgl. KARIN und HUNTER, 1995) induziert werden. Die Abbildung 4 zeigt ein vereinfachtes Schema der Induktion. Durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und Bindung an die PKA transloziert die regulatorische Untereinheit in den Kern und phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB (GONZALEZ und MONTMINY, 1989). Die Phosphorylierung von CREB ist ein wesentliches Element zur Transduktion eines externen Stimulus zu langandauernden intrazellulären Signalen (SHENG und GREENBERG, 1990). Dimere pCREB kann durch die Bindung an responsive Elemente auf der DNA differentielle Genaktivität induzieren (SHENG *et al.*, 1990). Die Phosphorylierung von CREB kann auch durch Ca/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase (CaMK, SHENG *et al.*, 1991), mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase (MEK, SATO *et al.*, 1997) oder PKC (XIE und ROTHSTEIN, 1995) vermittelt werden. Es ist bekannt, daß cAMP-vermittelte Mechanismen von großer Bedeutung für das Zurücksetzen der Phase im Oszillator sind (DING *et al.*, 1997; HASEGAWA und CAHILL, 1998; PROSSER und GILLETTE, 1989). Dabei kann mit dem Adenylat-Zyklase aktivierenden Agenz Forskolin in dem Mollusken *Aplysia* (ESKIN und TAKAHASHI, 1983) und in ovinen *pars tuberalis* Zellen (MORGAN *et al.*, 1998) der interne Zeitgeber beeinflusst werden.

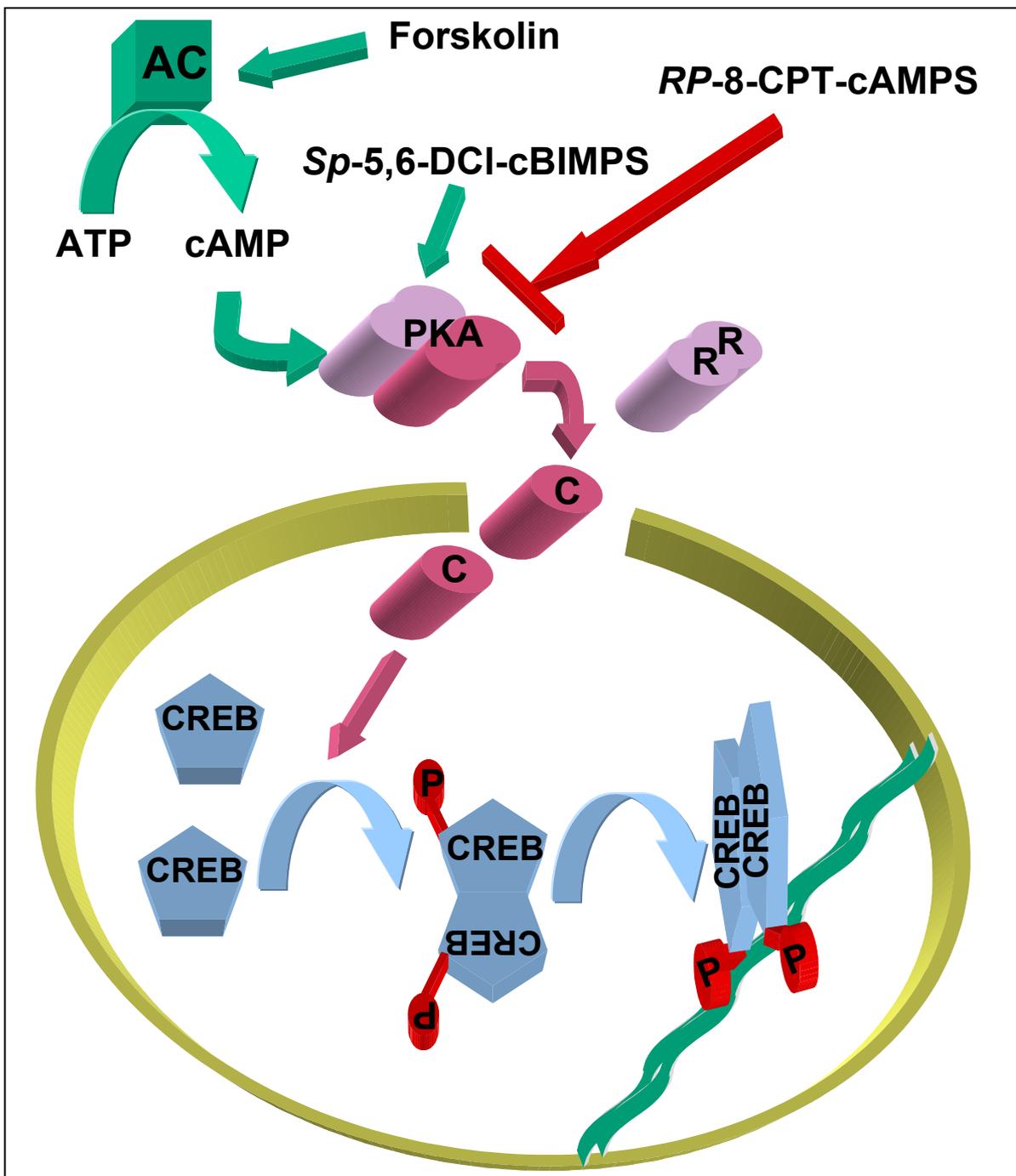


Abbildung 4: Vereinfachtes Schema des PKA-Signaltransduktionsweges. Durch die Aktivierung der Adenylat-Zyklase mit z.B. Forskolin wird ATP zu cAMP umgesetzt. Nach Aktivierung der PKA durch cAMP oder dem Analogen *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* werden die nun monomeren katalytischen Untereinheiten (C) von den regulatorischen Untereinheiten der PKA (R) getrennt. Die regulatorischen Untereinheiten diffundieren in den Kern und führen dort zur Dimerisierung und Phosphorylierung von CREB. Dimeres pCREB bindet an CRE-Elemente (grün) auf der DNA und führt zur Veränderung der Genaktivität. Durch das cAMP-Analogue *RP-8-CPT-cAMPS* kann die Aktivierung der PKA inhibiert werden.

Ein weiteres ebenfalls sehr intensiv erforschtes Gebiet ist die signalvermittelte Induktion der PKC (Abbildung 5).

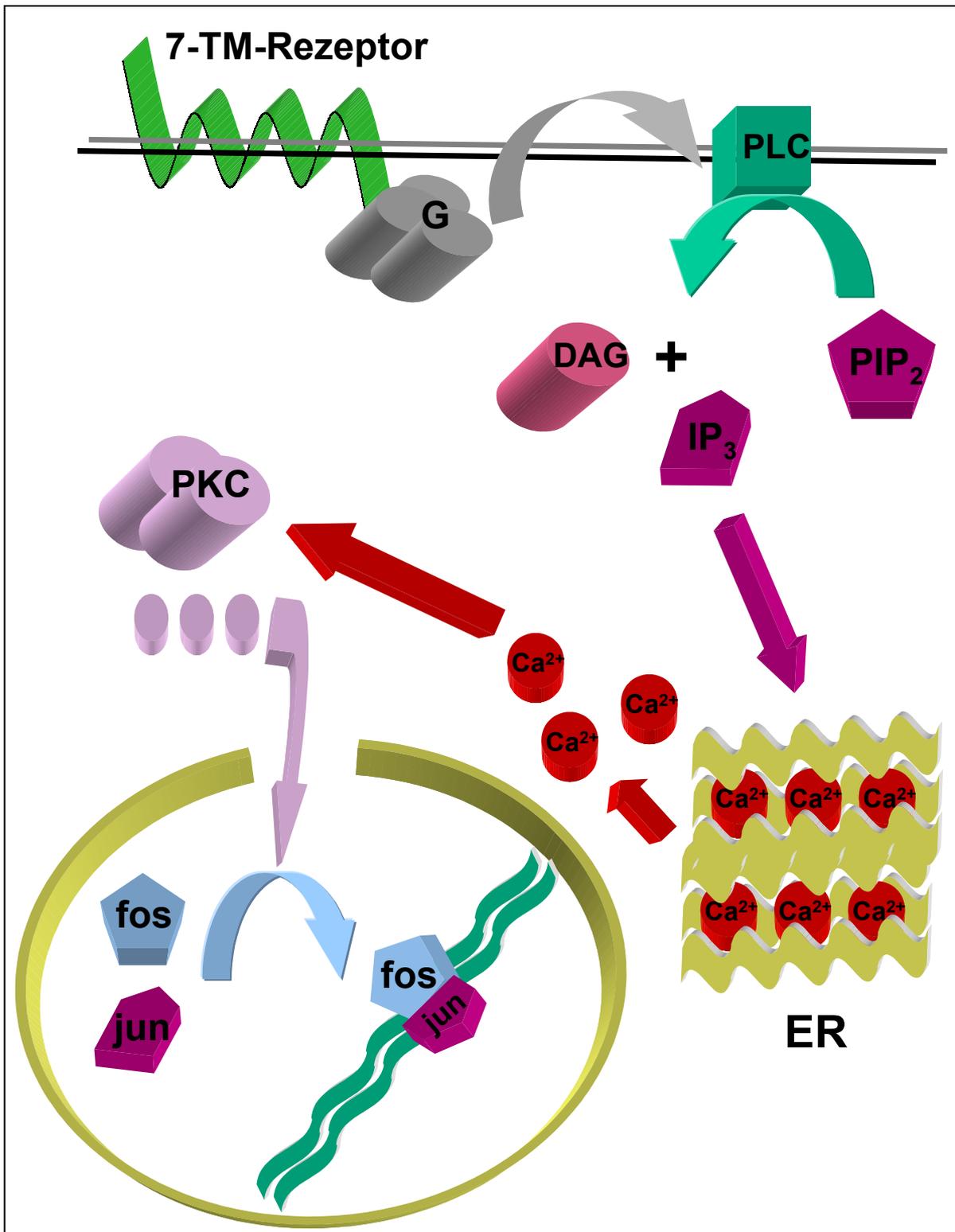


Abbildung 5: Schematische Darstellung des PKC-Signaltransduktionsweges eines 7-transmembran-Domänen-Rezeptors (7-TM-Rezeptor). Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins, welches wiederum Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die katalytische Umsetzung von PIP₂ führt zur Bildung von IP₃ und DAG. Durch die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Retikulum durch IP₃ wird die PKC aktiviert. Diese kann über verschiedene Signalwege zur Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren c-fos und jun-B führen, die an responsive DNA-Elemente binden und differentielle Genaktivität auslösen.

Die Aktivierung eines 7-transmembran-Domänen Rezeptors führt zur Konformationsänderung innerhalb der Domänen und zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins. Dieses wiederum kann zum Umsatz von Phosphatidylinosit 4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inosit-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) führen, das durch die katalytische Aktivität der Phospholipase C vermittelt wird. Der „second messenger“ IP₃ setzt aus dem endoplasmatischen Retikulum Ca²⁺ frei, welches wiederum die Aktivierung der PKC zur Folge hat. Die PKC kann nun eine Vielzahl weiterer „third messengers“ phosphorylieren (vgl. GARRINGTON und JOHNSON, 1999) und letztlich auch zur Aktivierung der mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) p42/44 führen. Eine mögliche Folge ist die Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren c-fos und jun-B, die an responsive Elemente verschiedener Gene binden und dort differentielle Transkription hervorrufen können. Im SCN kann die Transkription von c-fos durch Licht induziert werden. Die Expression von c-fos ist unter Licht-Dunkel-Bedingungen, nicht aber im Dauerdunkel diurnal (EARNEST *et al.*, 1990), so daß dem Transkriptionsfaktor wahrscheinlich eine regulatorische Rolle im zirkadianen System zukommt. Die Aktivität des Heterodimers aus c-fos und jun-B (AP1) ist ebenfalls durch Licht induzierbar (KORNHAUSER *et al.* 1992).

Voraussetzung für die Aktivierung eines Signaltransduktions-Weges ist die spezifische Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor. Dabei können teilweise verschiedene Liganden den gleichen Rezeptor binden und abhängig vom zellulären Kontext unterschiedliche Signalwege aktivieren. Am Beispiel der bekannten Rezeptoren für VIP und PACAP soll dies verdeutlicht werden.

VIP und PACAP wirken mit unterschiedlicher Spezifität auf die gleichen Rezeptoren, die in fast allen bisher beschriebenen Arbeiten zur Aktivierung der Adenylat-Zyklase-Aktivität und damit zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führen. Diese Rezeptoren gehören der Familie der G-Protein gekoppelten 7-Transmembran-Domänen-Rezeptoren an. Für VIP und PACAP können aufgrund unterschiedlicher Affinitäten und Signaltransduktionswege drei Rezeptor-Subtypen unterschieden werden. Nachfolgend ist die Nomenklatur entsprechend der Benennung der NC-IUPHAR (The International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification) gewählt worden.

In Tabelle 1 sind die bisher gefundenen Rezeptoren mit ihren Varianten und Eigenschaften aufgelistet.

Tabelle 1: PACAP und VIP-Rezeptoren. P38: PACAP 1-38; P27: PACAP 1-27; (↑↑↑): hohe Responsivität; (↑↑): intermediate Responsivität; (↑): zehnfach niedrigere Responsivität; (*) Mobilisierung von Ca²⁺ in manchen Zellen (SREEDHARAN *et al.*, 1994).

Rezeptor-Typ	Spleiß-Variante	Bindung	PACAP/VIP – Effekte auf:	
			Adenylat-Zyklase	PKC (IP ₃ -Umsatz)
PAC ₁	PAC ₁ s PAC ₁ hop1 PAC ₁ hop2 PAC ₁ hiphop1 PAC ₁ hiphop2 PAC ₁ hip	P38 ≈ P27 >> VIP	cAMP P38 ≈ P27 >> VIP cAMP (↑↑↑) cAMP (↑↑↑) cAMP (↑↑) cAMP (↑↑) cAMP (↑)	P38 > P27 >> VIP P38 ≈ P27 >> VIP kein Umsatz
VPAC ₁	keine Varianten	P38 ≈ P27 ≈ VIP	cAMP P38 ≈ P27 ≈ VIP	Umsatz = ?(*)
VPAC ₂		P38 ≈ P27 ≈ VIP	cAMP P38 ≈ P27 ≈ VIP	kein Umsatz

Die Rezeptoren VPAC₁ und VPAC₂ zeigen bei Stimulation mit PACAP 1-38, PACAP 1-27 und VIP eine Aktivierung der Adenylat-Zyklase und eine Erhöhung des cAMP-Spiegels, wobei die Rezeptoren von PACAP und VIP mit der gleichen Affinität und Effektivität gebunden und aktiviert werden. Im Gegensatz dazu zeigt der Rezeptor PAC₁ eine um den Faktor 100-1000 höhere Responsivität zu PACAP als zu VIP. In der Ratte konnte PAC₁ zusätzlich in sechs verschiedenen Spleiß-Varianten nachgewiesen werden (SPENGLER *et al.*, 1993), die sich wahrscheinlich nicht in ihrer Affinität zu PACAP und VIP, aber in bezug auf die Transduktion des Signals unterscheiden. Die Varianten PAC₁hop1 und PAC₁hop2 binden PACAP mit gleicher Effizienz und aktivieren sowohl die Adenylat-Zyklase als auch die PKC. Im Gegensatz dazu zeigt die Variante PAC₁hip1 eine zehnfach geringere Aktivierung der Adenylat-Zyklase und keine Aktivierung der PKC.

Die Induktion von Phasen-Verschiebungen im SCN durch die beschriebenen Mechanismen wirft die Frage auf, über welche Wege die Signale an periphere Organe weitergeleitet werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang nicht bekannt, jedoch existieren einige Hinweise.

1.4 Efferente Mechanismen zur Synchronisation peripherer Organe

Für die Weitergabe der verarbeiteten Informationen im SCN scheinen sowohl neuronale als auch humorale Faktoren verantwortlich zu sein. Vom SCN ausgehend wird über einen multisynaptischen Weg vom *Nucleus paraventricularis* (NPV) und die *Columna intermedio-lateralis* zum *Ganglion cervicale superior* (SCG) das Pinealorgan innerviert. Die Synthese und Ausschüttung von Melatonin wirkt als Rückkopplungsmechanismus für den SCN. Während der Melatoninbiosynthese wird durch N-Acetylierung das Vorläufermolekül Serotonin (5-Hydroxytryptamin (5-HT)) zu N-Acetyl-Serotonin umgesetzt. Das hierfür verantwortliche Enzym Arylalkylamin-N-Acetyltransferase (AA-NAT) wird nachts im Nager-Pinealorgan 150fach aktiver (ROSEBOOM *et al.*, 1996). Durch Norepinephrin (NE)-Ausschüttung in der Nacht werden β -adrenerge Rezeptoren aktiviert. Die anschließende Rekrutierung des GTP-bindenden Proteins $G_{s\alpha}$ führt zur Aktivierung der Adenylat-Zyklase und zur Bildung von cAMP. Diese Aktivierung ist für die transkriptionelle und translationale Induktion und Aufrechterhaltung der AA-NAT-Aktivität verantwortlich (MARONDE *et al.*, 1999a). Die neuroendokrine Rückkopplung des Pinealorgans über Melatonin an den SCN stellt einen wichtigen Mechanismus innerhalb des zirkadianen Systems dar.

Neben Veränderungen in der Melatonin- und Cortison-Konzentration im Plasma wurden auch weitere zirkulierende Substanzen entdeckt, die im Zusammenhang mit der endogenen Synchronisation stehen könnten. Zytokine sind eine Gruppe pleiotroper Proteine oder Peptide, die der interzellulären Kommunikation dienen. Sie werden von Zellen sezerniert, um sowohl autokrine als auch parakrine Effekte zu vermitteln. Innerhalb des Immunsystems nehmen die Zytokine eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Entzündungs-Reaktionen ein. Die Bindung verschiedener Zytokine an ihre spezifischen Rezeptoren kann zur Aktivierung der PKA oder PKC, aber auch anderer Wege wie z.B. „signal transducer and activator of transcription“ (STAT) und Janus-Kinasen (JAK) führen (vgl. HORN *et al.*, 2000). *In vivo* zeigen viele Zytokine redundante Eigenschaften, indem sie meist im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen Effekte vermitteln, und auch das gleiche Zytokin unterschiedliche Rezeptoren aktivieren kann. Trotz Involvierung der Zytokine in Akut-Phase Reaktionen des Organismus zirkuliert Interleukin-6 (IL-6) diurnal im Blutplasma (SOTHERN *et al.*, 1995).

Der molekulare Mechanismus dieser und anderer die Uhr beeinflussenden Effekte ist unklar. Ebenso ist über die efferenten Mechanismen, die für die Weitergabe der zentralen Zeit-Information verantwortlich sind, wenig bekannt. Neben einer direkten neuronalen Verbindung zu Organen (WARREN *et al.*, 1994, vgl. BUIJS *et al.*, 1998) wurde postuliert, daß auch humorale Faktoren für die Synchronisation von Organen

verantwortlich sind (OISHI *et al.* 1998b, SILVER *et al.* 1996). Ein wesentlicher Hinweis für die Existenz der Weitergabe von Informationen an periphere Oszillatoren ist die Induktion der zirkadianen Expression von *rPer1* und *rPer2* in rat-1 Fibroblasten in Zellkultur (BALSALOBRE *et al.* 1998). Ebenso wie durch die Induktion von *mPer1* durch Licht im SCN zeigen auch Organe rhythmische Expression zirkadianer Gene, die unabhängig vom SCN oszillieren (YAMAZAKI *et al.*, 2000). Die Synchronisation des Rhythmus externer Organe ist bis auf diese Hinweise wenig verstanden. Eine Störung der Regulation kann jedoch schwerwiegende Folgen haben.

1.5 Störungen zirkadianer Rhythmen

Die wohl bekannteste Störung des zirkadianen Systems ist der sogenannte „jet-lag“, bei dem durch das Überspringen von Zeit-Zonen Symptome wie Tag-Müdigkeit und Nacht-Schlaflosigkeit beobachtet werden. In neuerer Zeit konnten auch andere Krankheitsbilder mit Rhythmizitäts-Störungen innerhalb des Organismus in Verbindung gebracht werden. Eine der häufigsten physiologischen Veränderungen ist die Winter-Depression („saisonal abhängige Depression“, SAD) (vgl. BUNNEY und BUNNEY, 2000), deren Auftreten mit der verlängerten Dunkelphase der Winterzeit korreliert. Typische Symptome der SAD sind Traurigkeit, Reizbarkeit, Energielosigkeit, vermehrtes Schlafbedürfnis sowie der Heißhunger auf Kohlenhydrate. Das Auftreten von SAD in der Bevölkerung ist abhängig vom Breitengrad. Dabei erhöht sich die Inzidenz für SAD mit der Entfernung zum Äquator und somit zur zeitlichen Verkürzung der Tag-Phasen. Ein ähnliches Krankheitsbild zeigen Nachtschichtarbeiter, die sogar in der Sommerperiode unter SAD-Symptomen leiden. Einige Mutationen Uhr-regulierter Gene der Maus verursachen Verhaltensstörungen, die dem „advanced sleep phase syndrome“ beim Menschen (WAGER-SMITH und KAY, 2000) sehr ähnlich sind. Ein wichtiges Indiz, daß pathologische Veränderungen in direktem Zusammenhang mit den Regulatoren des zirkadianen Systems stehen, ist die Therapie betroffener Patienten durch Licht. Dabei wird durch die morgendliche Exposition mit starken Lichtquellen eine Sommer-Tagesperiode simuliert. In vielen Fällen konnte hiermit die zugrundeliegende Phasenverschiebung der zirkadianen Uhr der Patienten revidiert werden. Da Licht im SCN die spontane Expression von *mPER1* induziert, ist es wahrscheinlich, daß *hPER1* eine entscheidende Rolle beim Zurücksetzen der Phase beim Menschen einnimmt. Die Mechanismen und nicht zuletzt die Faktoren, die die Expression von *hPER1* in peripheren Organen steuern, könnten eine wichtige Grundlage für pharmakologische Ansätze bei der Heilung zirkadian-assoziiierter Krankheiten darstellen.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung regulatorischer Substanzen, die ausgehend vom SCN die zirkadiane Expression des humanen Period1-Gens (*hPER1*) beeinflussen (vgl. OISHI *et al.*, 1998b). Dazu sollte der Promotor von *hPER1* innerhalb eines zur Verfügung gestellten humanen genomischen Cosmids identifiziert und kloniert werden. Anschließend sollte der Promotor-Bereich in ein Reporter-System eingebracht und in verschiedene Zelllinien des peripheren Gewebes transfiziert werden. Biochemische Untersuchungen mit pharmakologischen Substanzen sollten zeigen, welche bekannten oder unbekanntem Signaltransduktionswege zu einer Stimulation oder Inhibition des Promotor-Konstruktes führen. Dazu sollten sowohl Reporter-Experimente als auch biochemische Analysen Aufschluß darüber geben, welche „second messengers“ an der Regulation von *hPER1* beteiligt sind. Die Identifizierung von regulatorischen Substanzen sollte mit Hilfe von verschiedenen Peptidbanken durchgeführt werden. Dabei mußte die endogene Expression von Rezeptoren und Signaltransduktoren zur Beeinflussung des Promotor-Reporter-Konstruktes führen und so eine Identifikation ermöglichen. Die biologische Funktion solcher Peptide sollte charakterisiert und die zugrundeliegenden Signaltransduktionswege analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien, Organismen und Kulturbedingungen

2.1.1 Herstellung und Sterilisation von Lösungen

Die Sterilisation von thermostabilen Lösungen und Gebrauchswaren erfolgte für 20 min bei 120°C und 2 bar in einem Dampfdruckautoklaven (Bioclav 3021001, Schütt Labortechnik, Göttingen).

Lösungen, die nicht durch feuchte Hitze sterilisiert werden konnten, wurden sterilfiltriert (Filtropur, Sarstedt, Ø :0,22 oder 0,45 µm). Alle Lösungen, Puffer, Nährmedien und Nähragar wurden mit deionisiertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Milli-QUFplus, Millipore) angesetzt. Glas-, Keramik- und Metallwaren wurden für 4 h bei 180°C trockener Hitze entkeimt.

Alle Chemikalien und Materialien wurden in Analysenqualität verwendet und stammen, soweit nicht anders angegeben, ausschließlich von den Firmen BioWhittaker, Life Technologies™, Costar/Corning, Falcon, Greiner, Roth und SIGMA.

2.1.2 Computer, Programme und Statistik

Zum Durchsuchen von öffentlichen Datenbanken wurde der NCBI-Server und der BLAST-Algorithmus (Basic Local Alignment Search Tool; ALTSCHUL *et al.*, 1997) verwendet. Für die Promotor-Analyse kam das Programm MatInspector V2.2 basierend auf TRANSFAC 4.0 (QUANDT *et al.*, 1995) zum Einsatz. Daten von mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit 3-6 Replika wurden statistisch mit Microsoft®-Excel 97 SR-1 oder dem Programm GraphPad Prism (Version 3.0 for Windows; GraphPad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA) ausgewertet. Statistische Signifikanzen wurden durch ANOVA mit nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche erhoben. Als Kriterium für Signifikanz wurde $p < 0.05$ gesetzt. Als Standardabweichung (SD) wurde angegeben:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - Y_{\text{Mittelwert}})^2}{n-1}}$$

mit y_i = Einzel-Meßwerte; $y_{\text{Mittelwert}}$ = Summe der Einzel-Meßwerte, n = Anzahl der Replika.

Zur Erstellung der Arbeit diente Microsoft® Word.

2.1.3 Geräte und Apparaturen

Wenn nicht explizit erwähnt, kamen für alle Arbeiten Einwegplastikmaterialien (z.B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) und Glasmaterialien (z.B. Meßzylinder, Duran-Flaschen) zum Einsatz. Zusätzlich zu den laborüblichen Standardgeräten wie Pipetten, Magnetrührer, Thermomixer etc. wurden folgende Geräte verwendet:

Bildbearbeitung:	- 'Gel Doc 2000' - System und QuantityOne [®] 4.0.1 Software der Firma BioRad
DNA-Sequenzierer:	- Kapillarelektrophorese-Sequenzier 'PRISM™ 310 Genetic Analyzer' von ABI
Inkubationsschrank:	- 'B 6120' der Firma Heraeus, Hanau
Zellkulturschrank:	- IG150 CO ₂ -Inkubator der Firma Jouan, Virginia, USA
Sterilbank:	- Sterilbank 8511 der Firma Köttermann, Ütze/Hennigsen
Kulturschüttler:	- 'Innova TM 4340' der Firma New Brunswick, C.A., USA
pH-Meter:	- 'CG 804' der Firma Schott
Proteingelelektrophorese:	- 'Mini-Protean II Elektrophoresezellen' der Firma Bio-Rad
Sterilisation:	- 'Bioclav 3.021001' der Firma Schütt Labortechnik, Göttingen
Spektralphotometer:	- 'DU [®] 640' der Firma Beckman inklusive:
Thermocycler:	- 'GeneAmp PCR System 2400' der Firma Perkin Elmer
Ultraschallgerät:	- 'Vibra cell' der Firma SONIC & MATERIALS
Waagen:	- Laborwaage 'LC 2200 S' der Firma Sartorius, Göttingen - Analytikwaage 'AC 120 S' der Firma Sartorius, Göttingen - Feinwaage 'supermicro' der Firma Sartorius, Göttingen
Zentrifugen:	- Kühlzentrifuge 'Mikro Rapid/K' der Firma Hettich, Henningen - Kühlzentrifuge 'Biofuge 28 RS' der Firma Heraeus, Hanau - Kühlzentrifuge 'Rotixa/RP' der Firma Hettich, Henningen - Vakuum-Zentrifuge 'Univapo 150H' der UniEquip

2.1.4 Kits und Enzyme

Wenn nicht explizit erwähnt, kamen für die entsprechenden Anwendungen die in Tabelle 2 angegebenen Kits zum Einsatz.

Tabelle 2: Verwendete kommerziell erhältliche Kits

RNA-Isolierung	RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen
Plasmid-Isolierung	NucleoSpin Plus der Firma Macherey-Nagel
DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen NucleoSpin Extract der Firma Macherey-Nagel
Reinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin Extract der Firma Macherey-Nagel
DNA-Sequenzierung	ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Perkin Elmer
Isolierung genomischer DNA	Micro Kit III Spin DNA der Firma InViSorb
TaqMan™-Experimente	TaqMan [®] Universal PCR MasterMix der Firma Perkin Elmer

2.1.5 Verwendete Oligonukleotide

Alle für PCR-Reaktionen (2.2.11) und DNA-Sequenzierung (2.2.9) verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Perkin-Elmer oder MWG-Biotech bezogen und sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht der eingesetzten Oligonukleotide

Bezeichnung/ Richtung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Bemerkungen
M13/pUC forward sequencing primer (-20)	GTAAAACGACGGCAGT	Sequenzier-Oligo für <i>HindIII-hPER1</i>
M13/pUC reverse sequencing primer (-26)	CAGGAAACAGCTATGA	Sequenzier-Oligo für <i>HindIII-hPER1</i>
Per1-seq1s sense	CTCTGTAGTCCTGGCTTCCTGGC	Sequenzier-Oligo für <i>hPER1</i> -Luc (Pos. 511-533)
Per1-seq2s sense	GTAGACAAGTCTTGAGCACCTAC	Sequenzier-Oligo für <i>hPER1</i> -Luc (Pos. 1008-1029)
Per1-seq3s sense	GCCCCAAGGACCGAAGTCCTCTCG	Sequenzier-Oligo für <i>hPER1</i> -Luc (Pos. 1540-1563)
Per1-seq4as antisense	CTAGGGGGCCACTCATGTCTGGGC	Sequenzier-Oligo für <i>hPER1</i> -Luc (Pos. 3024-3047)
Per1-seq5as antisense	GGTGTCCACTCTGCCTGGGCCTCC	Sequenzier-Oligo für <i>hPER1</i> -Luc (Pos. 2570-2593)
Per1-seq6as antisense	CAACCTGACTCTCGCCTGGATCC	Sequenzier-Oligo für <i>hPER1</i> -Luc (Pos. 2125-2147)
PBGD 1S Primer	CAACATTGAAAGCCTCGTACCC	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für „Housekeeping-Gen“ in M95623: 4726-4747
PBGD 2AS Primer	AGTGCAGTATCAAGAATCTTGTC	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für „Housekeeping-Gen“ in M95623: 5160-5184
PBGD probe	FAM- CCTGCAGTTTGAATCGTTGCTATGTCCAC- XTC ¹⁾	<i>TaqMan</i> -Sonde für „Housekeeping-Gen“ (FAM- markiert, Perkin-Elmer) in M95623: 4751-4766, 5141-5154
PER1-forward	CTCTTGATGTGATGGCCTGTGT	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für <i>hPER1</i> in gi7416847: 15387-15400, 15863-15870
PER1-reverse	AGTCCATCCAGCTCTGAGAAGAGT	<i>TaqMan</i> -Oligonukleotid für <i>hPER1</i> in gi7416847: 15916-15939
PER1 probe	VIC- CACCCAAGATCCTGGTCACCCTGATGA-XTC ¹⁾	<i>TaqMan</i> -Sonde für <i>hPER1</i> (VIC- markiert, Perkin-Elmer) in gi7416847: 15886-15912

¹⁾ VIC und FAM (6-Carboxy-Fluoreszein) bezeichnen den jeweiligen Reporter-Farbstoff; XTC den „Quencher“ TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin)

2.1.6 Verwendete Organismen und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die molekular- und zellbiologischen Experimente die in Tabelle 4 aufgeführten Bakterienstämme und Ausgangs-Plasmide verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstamm	Genotyp / relevante Eigenschaften	Anbieter / Referenz
Escherichia coli XL2Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> [F', <i>proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r</i>]	Stratagene®
Epicurian Coli® XL10-Gold® Ultracompetent Cells	<i>recA1, relA1, gyrA96, thi-1, Tet^r Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mr^r)173, endA1, supE44, lac, Hte, [F', proAB, lacI^q, lacZΔM15, Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r</i>]	Stratagene®
Plasmide	relevante Eigenschaften	Anbieter/Referenz
pGL2-basic-Vektor	Luciferase-Reportergen-Vektor, kein Promotor oder Enhancer	Promega®
pGL2-control-Vektor	Luciferase-Reportergen-Vektor, SV-40-Promotor	Promega®
K-CREB	Dominanter Repressor von CREB; Bildner von CREB:K-CREB Heterodimeren	WALTON <i>et al.</i> , 1992
A-CREB	Dominant negativer Inhibitor der Phospho-CREB-Dimerisierung	AHN <i>et al.</i> , 1998
SuperCos I	Cosmid-Vektor zur Klonierung von großen (> 10kb) DNA-Fragmenten	Stratagene®
pEGFP-N1-Vektor	Reportergen-Vektor mit Sequenz für das Grün-Fluoreszenz-Protein („green fluoreszenz-protein“) und Kanamycin-Resistenz	Clontech®
pcDNA3.1(-) Neo	Klonierungs-Vektor mit Neomycin-Gen (Geneticin (G418)-Resistenz) zur Selektion stabil transfizierter Zelllinien	Invitrogen®
pSPORT2	Phagemid-Vektor zur Klonierung	Life Technologies™
pBluescript II SK(+)	Phagemid-Vektor zur Klonierung	Stratagene®

2.2 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.1 Isolation von DNA

2.2.1.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin Plus-Kit (Macherey-Nagel)

Für die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien-Zellen wurde die Methode der alkalischen Lyse nach BIRNBOIM und DOLY (1979) verwendet.

Zur Generierung einer ausreichenden Menge Bakterien wurden von den entsprechenden Klonen 5 ml üN-Kulturen in LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika angesetzt. Nach ca. 16 h wurden 1,5 ml der Kulturen 5 min bei 12000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet in 250 µl Puffer A1 (incl. RNase A) resuspendiert. Hierauf erfolgte die Zerstörung der Zellwand der Bakterien durch Zugabe von 250 µl Puffer A2 für 5 min bei RT. Anschließend erfolgte die Fällung der chromosomalen Bakterien-DNA und bakterieller Proteine durch Zugabe von 300 µl Puffer A3 und 5-minütiger Inkubation auf Eis. Nach einer Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min und 4°C wurde der Überstand auf eine NucleoSpin-Säule überführt und erneut für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule zweimal mit 700 µl Puffer A4 gewaschen (vgl. VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). Danach wurde noch verbliebener Puffer durch nochmaliges Zentrifugieren beseitigt und die Säule 5-10 min bei RT getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit 30-50 µl auf 75°C erwärmten TE-Puffer.

Luria-Bertani (LB)-Medium: (auf 1 l H₂O)

10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl

TE-Puffer:

10 mM TRIS
1 mM EDTA
pH 8,5

Zur phänotypischen Selektion rekombinanter Klone (Blau/Weiss-Selektion) wurden vor der Ausplattierung der Zellen jeweils 20 µl IPTG- und 20 µl X-Gal-Lösung mit 160 µl H₂O versetzt, auf der Selektions-Agar-Platte verteilt und getrocknet.

IPTG-Lösung (steril filtriert):

100 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktosid in ddH₂O

X-Gal-Lösung (steril filtriert):

2% (w/v) 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid in Dimethylformamid

2.2.1.2 Präparation von Endotoxin-freier Plasmid-DNA (Qiagen)

Zur Isolierung großer Mengen Endotoxin-freier DNA zur Transfektion von eukaryotischen Zellen aus *Escherichia coli* wurde der „Endofree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) eingesetzt. Diese Methode erlaubt die Isolierung von bis zu 500 μ g Plasmid-DNA aus 100 ml Bakterienkultur. Nach dem Abzentrifugieren der bakteriellen \bar{u} N-Kultur bei 12000 x g für 10 min bei 4°C und Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterien-Pellet in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 10 ml P2-Puffer und einer Inkubation für 5 min bei RT. Die anschließende Fällung der chromosomalen Bakterien-DNA und bakterieller Proteine erfolgte durch die Zugabe von 10 ml P3-Puffer in Filter-Spritzen („Filter-Cartridge“, Qiagen) für 10 min bei RT. Nach der Filtration wurden 2,5 ml Puffer ER (Qiagen) zugegeben und alle in der Suspension vorhandenen Endotoxine bei 4°C für 30 min zersetzt. Anschließend wurde das Lysat auf eine Tip500-Säule (Qiagen) gegeben, die zuvor mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert worden war. Die Säule wurde anschließend zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen und die gebundene Plasmid-DNA mit 15 ml QN-Puffer eluiert. Es erfolgte eine Fällung durch die Zugabe von 0,7 Vol.(v/v) Isopropanol, wonach die DNA 10 min bei 13000 g abzentrifugiert, zweimal mit 70% EtOH gewaschen, vollständig getrocknet und in 500 μ l TE (10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) resuspendiert wurde.

2.2.1.3 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation von DNA aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin Extrakt Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurden die entsprechend elektrophoretisch aufgetrennten Banden (siehe 2.2.6) mit einem sterilen Skalpell aus den Agarosegelen ausgeschnitten und eingewogen. Pro 100 mg Agarosegel wurden 300 μ l Puffer NT1 zugegeben und die DNA bei 50°C für 10 min durch viermaliges Vortexen herausgelöst. Anschließend wurde die Suspension auf die NucleoSpin-Säule gegeben und für 1 min bei ca. 6000 g abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer NT3 wurde die Säule durch 3-minütige Zentrifugation vollständig getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 μ l ddH₂O.

2.2.2 DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen

Für gentechnische Arbeiten wurden die unten aufgeführten Enzyme und die entsprechenden Puffer von den angegebenen Firmen bezogen. Die spezifische Spaltung von DNA erfolgte mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen der Firmen Life Technologies™ und New England Biolabs GmbH.

Reverse Transkriptase:	<i>SuperScript™</i> II RT von Life Technologies™
DNA-Polymerasen:	Taq-DNA Polymerase von Qiagen AmpliTaq-Gold von Perkin Elmer
DNA-Nuklease:	DNase I von Macherey&Nagel
Phosphatase:	Alkalische Phosphatase von Boehringer Mannheim GmbH
Klenow-Fragment:	DNA-Polymerase II Fragment (Klenow) von Pharmacia
DNA-Ligase:	T4 DNA Ligase von Promega

Die Modifikation der DNA (Spaltung, Dephosphorylierung, Ligation) erfolgte dabei stets nach den Instruktionen des Herstellers. Die enzymatische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen wurde in den entsprechenden Puffern bei 37°C in einem Volumen von mindestens 30 µl durchgeführt, um Nebeneffekte durch hohe Konzentration an Glycerin, in dem die Enzyme gelagert werden, zu vermeiden.

2.2.3 Ligation

Für die Ligation wurde ein 3 bis 10-facher molarer Überschuss des DNA-Fragments im Verhältnis zum Vektor mit Ligationspuffer und T4 DNA-Ligase (Promega) im 10 µl Ansatz gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 1 h bei RT. Für Ligationen mit „blunt“-Enden wurde die Ligation für 12-16 h bei 12-14°C durchgeführt. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde zur Transformation entsprechender *E. coli*-Stämme verwendet.

2.2.4 Herstellung von Transformations-kompetenten Zellen (DAGERT und EHRlich, 1979)

Zur Herstellung kompetenter Zellen aus *E. coli*-Stämmen XL2Blue (2.1.2) wurden 50 ml LB-Medium mit $\frac{1}{10}$ Vol. einer Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,3$ herangezogen. Die Zellen wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 2000 x g und 4°C sedimentiert und nach Entfernen des Überstandes in 5 ml eiskalter und sterilfiltrierter 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung

resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert und der Überstand quantitativ entfernt. Anschließend wurde das noch feuchte Sediment in 2 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung gelöst und 45 min bei 4°C inkubiert. Die nun kompetenten Zellen wurden mit $\frac{1}{5}$ Vol. (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E.coli*-Zellen

Zur Transformation wurden 100 µl des kompetenten Zellstammes auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA vermischt. Bei Verwendung des XL10 Gold-Stammes wurden die Zellen vor der Zugabe der DNA vorsichtig mit 1,7 µl 1,22 M β-ME vermischt und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem vorsichtigen Mischen von Plasmid und Zellen erfolgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 4°C. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden wurden die Zellen kurz auf Eis abgekühlt, mit 250 µl vorgewärmten SOC-Medium versetzt und für mindestens 30 min bei 37°C und 220 U/min inkubiert. 150 µl des Transformationsansatzes wurden anschließend auf geeigneten Selektions-Agar-Platten ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium:

2%	Caseinhydrolysat
1%	Hefeextrakt
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
10 mM	NaCl
20 mM	Glucose

Das Medium wurde vor der Zugabe der Glukose autoklaviert.

Selektions-Agar-Platten:

10 g	Trypton
5 g	Hefe-Extrakt
10 g	NaCl
15 g	Agar
Für Ampicillin-resistente Bakterien	Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin
Für Kanamycin-resistente Bakterien	Zugabe von 30 µg/ml Kanamycin

2.2.6 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die analytische oder präparative Trennung von DNA erfolgte nach dem jeweiligen Trennungsziel in 0,8-1,5%igen (w/v) Agarose/1 xTAE Gelen durch horizontale Gelelektrophorese. Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde dem Gel vor der Gelatinierung Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) zugegeben. Die Auftrennung erfolgte in 1 x TAE Puffer bei 10 V/cm. Zur Visualisierung der Lauffront und zur Sedimentation der Proben in den Taschen wurden die DNA-Proben vor der Applikation auf das Gel 1:5 mit 5 x Blaumarker versetzt. Die Größe der isolierten DNA-Fragmente wurde anhand eines im Gel aufgetrennten DNA-Größenstandards bestimmt (1 kbp-Leiter (0,5 µg/Spur) bzw. 100 bp-Leiter (3 µg/Spur), Life Technologies™). Mit Hilfe der 1636 bp Bande der 1 kbp Leiter (≅ 50 ng) konnten isolierte Fragmente relativ quantifiziert werden.

Ethidiumbromid-Stammlösung:

1 mg/ml Ethidiumbromid in ddH₂O

50 x TAE-Puffer:

2 M Tris
100 mM EDTA
1 M Essigsäure

5 x DNA-Blaumarker:

70% Glycerin
10 mM Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA
0,05% (w/v) Bromphenolblau

2.2.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen in Lösung wurde die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Dazu wurden die Proben in ddH₂O verdünnt und in eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke überführt. Die Messung erfolgte in einem Spektralphotometer. Die Berechnung der Konzentrationen erfolgte über die Gleichung:

$$c[\text{ng}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times \varepsilon \times V$$

mit

c = Konzentration

OD₂₆₀ optische Dichte bei 260 nm

ε = Extinktionskoeffizient

V = Verdünnungs-Faktor

ε für ssRNA = 0,04

ε für dsDNA = 0,05

Zur Ermittlung der Reinheit der jeweiligen DNA oder RNA wurde zusätzlich der Quotient von OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Bei einem Wert $> 1,6$ wurde mit der Aufarbeitung fortgefahren (Der Idealwert für wässrige Nukleinsäurelösungen liegt bei ca. 1,8-2,0).

2.2.8 Southern Blot Analyse

Zur spezifischen Detektion von immobilisierten Nukleinsäuren wurde die zu detektierende DNA elektrophoretisch getrennt und das Bandenmuster mit einem Lineal dokumentiert. Zur Fixierung der DNA-Fragmente wurde das Gel anschließend zweimal für 15 min in Denaturierungslösung geschwenkt, mit H_2O gespült und anschließend zweimal 15 min in Neutralisationspuffer gewaschen. Nach kurzem Spülen in H_2O wurde das Gel für 5 min in 20x SSC äquilibriert und $\bar{u}N$ durch Kapillartransfer auf eine Nylon-Membran (Pall, Biodyne B, $0,45 \mu m$) „geblottet“. Nach dem Transfer wurde die DNA durch beidseitiges „crosslinking“ mit UV-Licht von 1200 J (Stratalinker, Stratagene) auf der Membran fixiert.

Denaturierungslösung:

0,5 M HCl

Neutralisationspuffer:

1,5 M NaCl
0,5 M Tris-HCl, pH 7.0

20x SSC:

3 M NaCl
0,3 M Trinatriumcitrat, pH 7.0

Nach dem Trocknen der Membran erfolgte die Vorhybridisierung in 10 ml QuickHyb-Lösung (Stratagene) in einem Rotationsofen bei $68^\circ C$.

Zur radioaktiven Markierung der Sonde wurden 50 ng DNA lyophilisiert und in $34 \mu l$ dd H_2O rekonstituiert. Nach der Denaturierung durch 3-minütiges Aufkochen und schnelles Abkühlen auf Eis wurden $10 \mu l$ „reagent mix“ (Pharmacia), $5 \mu l$ αP^{32} -dCTP (1500 Ci/mol) und $1 \mu l$ Klenow-Enzym (Pharmacia) hinzugefügt und für die Endmarkierung für 1 h bei $37^\circ C$ inkubiert. Zur Aufreinigung des markierten Fragments wurde der Reaktionsansatz auf eine Probe Quant G-50-Säule (Amersham/Pharmacia Biotech) gegeben, deren Porenflüssigkeit vorher für 2 min bei 3000 U/min abzentrifugiert worden war. Nach Elution der Sonde wurden $10 \mu l$ in einem Szintillationsmeßgerät gemessen.

Waschpuffer A:

2x SSC
0,1% SDS

Waschpuffer B:

0,1x SSC
0,1% SDS

1.2 Mio. counts der markierten Sonde wurden in 100 µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) gelöst und direkt zu der Vorhybridisierungslösung gegeben. Nach einstündiger Hybridisierung bei 68°C wurde die Membran bei 60°C zweimal 15 min in Waschpuffer A und anschließend zweimal in Waschpuffer B stringent gewaschen, in Zellophan verpackt und 18h bei -80°C auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham) exponiert.

2.2.9 Sequenzierung von DNA

Zur Bestimmung der Nukleotidsequenz von DNA wurde eine modifizierte Form des enzymatischen Kettenabbruchverfahrens nach SANGER *et al.*, (1977) verwendet. Dabei wird mit Hilfe eines komplementären Oligonukleotids in einer PCR-Reaktion die zu sequenzierende DNA-Sequenz linear amplifiziert („Cycle-Sequencing“). Analog zur PCR (siehe 2.2.11) wird der Ablauf der Reaktion bei verschiedenen Temperaturen (Denaturierung, Anlagerung des Oligonukleotids und Extension) durchgeführt. Zusätzlich zu den für die Neusynthese verwendeten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) werden dem Reaktionsansatz in einem bestimmten Verhältnis Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt. Werden diese ddNTPs während der Extension in einen neu entstehenden Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Kettenreaktion. Im Verlaufe der Wiederholungen werden spezifische Abbruchprodukte im Reaktionsansatz akkumuliert. Im Gegensatz zu anderen enzymatischen Sequenzier-Reaktionen sind bei dieser Methode geringere Mengen Matrizen-DNA notwendig. Zur Markierung der Abbruchprodukte sind die vier ddNTPs mit Farbstoffen verschiedener Fluoreszenzspektren markiert, so daß die parallele automatisierte Detektion der spezifischen Produkte in der Kapillarelektrophorese während der Elektrophorese möglich ist.

Für die Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten ddNTPs wurden die Reagentien der Firma Perkin Elmer verwendet (ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit). Die Sequenzier-Reaktionen fanden unter Einhaltung des Herstellerprotokolls statt. Gereinigte DNA-Proben wurden nach dem angegebenen Schema sequenziert.

Pro Reaktionsansatz wurden verwendet (20 µl Endvolumen):

8 µl	Dye Terminator Ready Reaction Mix (Perkin-Elmer)
1 µl	Oligonukleotid (10 pmol/µl)
x µl	Matrizen-DNA (DNA in ng = Basenpaaranzahl/7,5)

Zur Analyse wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

1. Denaturierung	96°C	10 sec	
2. Oligonukleotidanlagerung	45-60°C	5 sec	
3. Elongation (Verlängerung)	60°C	4 min	25 Zyklen
4. Kühlen	4°C		

2.2.10 Aufreinigung der Sequenzierproben durch DNA-Präzipitation

Im Anschluß an die Sequenzierungsreaktion wurden die Ansätze jeweils in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt und durch Zugabe von je 10 µl 3 M Natriumacetatlösung pH 4.6 und 250 µl 96%igem Ethanol bei RT gefällt. Anschließend erfolgte die Sedimentation durch 30-minütige Zentrifugation bei 15000 rpm. Die gefällte DNA wurde einmal mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation 15 - 30 min bei 15000 rpm) und für 3 min im Vakuum getrocknet. Für die Sequenzierung auf einem Kapillarelektrophorese-Sequencer (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer) wurde das Präzipitat in 25 µl TSR („template suppression reagent“, ABI) gelöst. Das gelöste Probenmaterial wurde bei 95°C für 2 min denaturiert und anschließend kurz in der Labortischzentrifuge abzentrifugiert. Die Injektionszeit für die Analyse betrug 30 sec, die Spannung 15 kV, die Temperatur 50°C und die Laufzeit 36 min.

2.2.11 PCR: Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion („Polymerase chain reaction“ (PCR); SAIKI *et al.*, 1985) wird zur selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen genutzt. Für die Reaktionen wurden verschiedene DNA-Matrizen und Oligonukleotide (siehe 2.1.2) verwendet. Wenn nicht anders erwähnt, wurden die PCR-Reaktionen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Pro PCR-Reaktionsansatz wurden verwendet (25 µl Endvolumen):

1x	PCR-Reaktionspuffer
200 nM	dNTP-Mix (200 nM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
200 nM	Oligonukleotid (200 nM je Oligo)
	DNA-Matrize (Template) (ca. 1-100 ng der entsprechenden DNA)
1,5 mM	MgCl ₂
1 U	DNA-Polymerase

Zur Analyse wurden folgende Temperaturprogramme verwendet:

1.	Erst-Denaturierung	98°C	3 min	1 Zyklus
2.	Denaturierung	98°C	5 sec	
3.	Oligonukleotidanlagerung	52-64°C	30 sec	
4.	Elongation (Verlängerung)	72°C	30 sec - 2 min	35 Zyklen
5.	End-Elongation	72°C	7 min	1 Zyklus
6.	Kühlen	4°C		

Die PCR wurde im 'GeneAmp PCR System 2400' der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Die Temperatur zur Oligonukleotidanlagerung wurde zur Stringenz-Optimierung der Reaktion geändert. Die Länge der Extensionsphase bei 72°C richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments (ca. 1000 bp/min).

2.3 Arbeiten mit RNA und Transkriptanalyse

Alle Arbeiten mit RNA wurden unter besonderen Schutzmaßnahmen (Verwendung von gestopften Pipettenspitzen, Tragen von Handschuhen, Verwendung von RNase-freien Lösungen) durchgeführt, um die RNA vor der Hydrolyse von allgegenwärtigen RNasen zu schützen. Isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung in ddH₂O gelöst und bei -80°C gelagert.

2.3.1 Isolation von RNA aus Zellen

Zur Isolierung von RNA wurde der RNA Isolierungs Kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) verwendet. Am Tag vor der Isolation der RNA wurden 5×10^5 Zellen in 6-Well Kulturschalen in 3 ml Kulturmedium ausplattiert und üN inkubiert. Nach der Stimulation der Zellen (siehe 2.4.3) wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 400 µl Lysis-Puffer (RA1, Macherey-Nagel) inklusive 4 µl β-ME resuspendiert. Anschließend wurden die Wells mit je 300 µl EtOH

gewaschen und dieses mit den entsprechenden Lysaten durch heftiges Vortexen gemischt. Alle anschließenden Arbeiten wurden unter dem Abzug durchgeführt und die Abfälle in einem separaten Abfallgefäß entsorgt. Das Zellysate wurde nun auf RNA-bindende Säulen (Macherey-Nagel) gegeben und 30 sec in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Hydrolyse genomischer DNA durch Zugabe von 95 µl DNase I in DNase Reaktionspuffer und 15-minütige Inkubation bei RT direkt auf der Säule. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde die Säule einmal mit 500 µl Puffer RA2 und zweimal mit jeweils 600 µl bzw. 250 µl Puffer RA3 gewaschen. Die Zentrifugation wurde 2 min durchgeführt und die Säulen anschließend 10 min bei RT inkubiert, um das im Puffer RA3 enthaltene Ethanol vollständig zu verdampfen. Die Elution der RNA erfolgte durch die Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation für 3 min bei 4°C. Zur Bestimmung der Konzentration und Qualität der isolierten RNA wurde anschließend eine photometrische Analyse durchgeführt (siehe 2.2.7)

2.3.2 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Zum spezifischen Nachweis geringer RNA-Mengen wurde mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase komplementäre DNA (cDNA) generiert.

Für die Reaktion wurden je 2 µg lyophilisierte RNA eingesetzt, die in ddH₂O und 250 ng „random“ Primer (Life Technologies™) gelöst wurde. Nach 10-minütiger Denaturierung bei 72°C und schnellem Abkühlen auf Eis fand die Anlagerung der Oligonukleotide an die RNA statt. Nach kurzer Zentrifugation wurde dem Ansatz jeweils 4 µl Erststrang-Puffer (Life Technologies™), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTPs (je 10 mM) (Life Technologies™) und 0,5 µl RNAsin (Promega) zugesetzt. Für die vergleichende Analyse wurden diese Komponenten in einem gemeinsamen Ansatz gemischt, um auftretende Pipettierfehler zu minimieren. Nach dem Mischen erfolgte eine Äquilibration des Reaktionsansatzes für 2 min bei 42°C und die Zugabe von je 1 µl SUPERSCRIPT™ II RNase H⁻ (Life Technologies™). Die reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte bei 42°C für 50 min und wurde durch anschließende Inkubation bei 70°C für 10 min durch Inaktivierung des Enzyms abgebrochen. Die so erhaltene cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert. Als Maßeinheit für die vergleichende Quantifizierung im TaqMan™ (siehe 2.3.3) wurde die zugrundeliegende RNA-Äquivalentmenge benutzt.

2.3.3 Relative Quantifizierung von Transkripten mit *TaqMan*[™]-PCR

Die endogene Expression von *hPER1* wurde mit Hilfe des *TaqMan*[™] (7700 Sequence Detector, ABI Prism) ermittelt. Das Prinzip der Analyse ist in Abbildung 6 dargestellt.

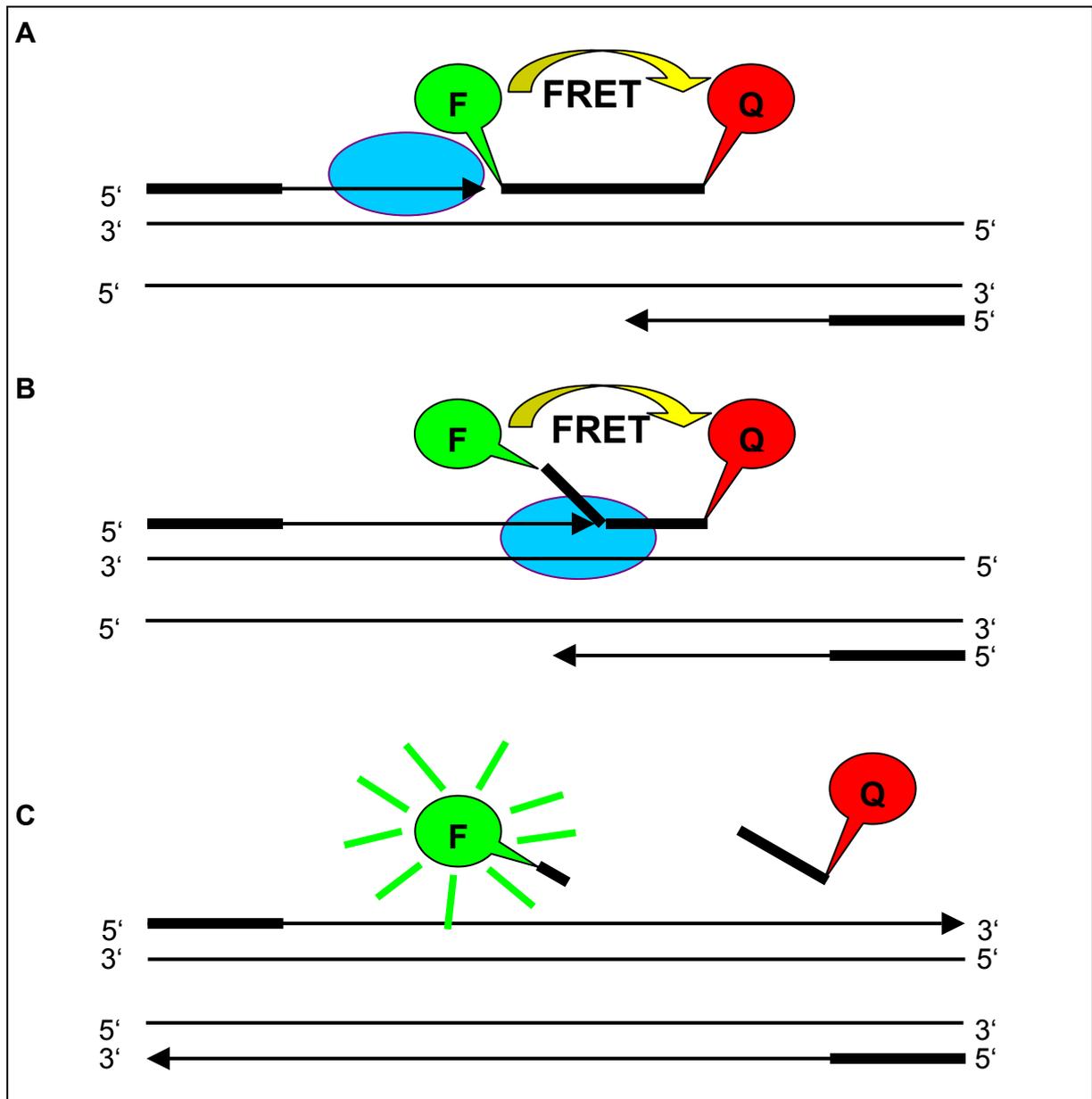


Abbildung 6: Prinzip der *TaqMan*-PCR. A: Zu Beginn der Elongation ist die intakte Sonde mit der cDNA hybridisiert, und es findet Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer statt. B: Während der Verdrängungsreaktion wird die Sonde hydrolysiert. C: Nach Beendigung der Elongation und Hydrolyse der Sonde wird das Signal des Fluoreszenz-Reporters frei (es findet kein FRET statt). F: Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff, Q: Quencher-Rhodamin-Derivat, FRET: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer. fettgedruckte Balken symbolisieren die verwendeten Oligonukleotide; Pfeile zeigen die Syntheserichtung an; das blaue Oval symbolisiert die Taq-Polymerase, die Orientierung der DNA ist angegeben.

Durch eine modifizierte PCR-Technik können sensitive und hochspezifische Quantifizierungen von Transkripten durchgeführt werden. Die Methode eignet sich besonders für sehr geringe RNA-Mengen, so daß die Analyse auch in sehr kleinen Maßstäben (5×10^5 Zellen pro Well) durchgeführt werden kann. Die sogenannte *TaqMan*[™] PCR basiert auf dem 5'-Nuklease-Assay von HOLLAND *et al.*, (1991) und macht sich die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase zunutze. Zusätzlich zu dem spezifischen Oligonukleotidpaar einer Standard-PCR (siehe 2.2.11) wird eine fluoreszente Sonde verwendet, welche spezifisch mit der DNA-Zielsequenz hybridisiert. Die Sonde besteht aus einem modifizierten Oligonukleotid, das am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszeinderivat) und am 3'-Ende mit einen „Quencher“-Farbstoff (Rhodaminderivat) markiert ist. Ist die Sonde intakt (nicht hydrolysiert), findet zwischen Fluoreszenzfarbstoff und Quencher ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt. Wird die Sonde bei der spezifischen Wellenlänge ($\lambda = 488$ nm) angeregt, wird die Fluoreszenz-Energie der Reporter-Markierung durch die räumliche Nähe zu einem großen Teil auf den Quencher übertragen. Durch diesen Vorgang wird die Energie des emittierten Lichtes abgeschwächt, und das detektierte Signal ist sehr klein. Während des Hybridisierungsschritts der PCR lagern sich sowohl die Primer, als auch die Sonde an die Matrizen-DNA an (Abbildung 6 A). Dabei sind durch die Länge und Basenzusammensetzung die Schmelztemperaturen so gewählt, daß die unmarkierten Oligonukleotide bei der gewählten Hybridisierungstemperatur ideal binden (d.h. die verwendete Hybridisierungstemperatur entspricht exakt der Schmelztemperatur der Primer). Die Sonde weist eine um mindestens 10°C höhere Schmelztemperatur auf. Das führt dazu, daß die Sonde während der Neusynthese in der Elongationsphase (Extension) durch die *Taq* DNA-Polymerase verdrängt wird. Als Zwischenprodukt entsteht eine „Y“-förmige Sekundärstruktur, bei der die Sonde am 5'-Ende durch die Polymerase verdrängt wird, während das 3'-Ende noch mit der Matrize hybridisiert bleibt (siehe Abbildung 6 B). Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase wird die Sonde zwischen Fluoreszenz-Reporter und Quencher hydrolysiert. Da das 5'-Fluoreszenz-Derivat nun nicht mehr räumlich eng mit dem Quencher verbunden ist, wird die räumliche Nähe und auch der FRET aufgehoben (Abbildung 6 C). Während der exponentiellen PCR-Reaktion werden pro Zyklus doppelt so viel ungequenchte Reporter-Fluorochrom-Derivate freigesetzt, die entsprechend ihren Eigenschaften bei verschiedenen Wellenlängen nachgewiesen werden können. Mit dem *TaqMan* kann also über den spezifischen Nachweis der Akkumulation von PCR-Produkten die genaue Quantität der Matrize im Reaktionsansatz bestimmt werden. Dabei ist der Nachweis hochspezifisch entsprechend der verwendeten Primer und der Reporter-Sonde. Der Nachweis über die Veränderung der Fluoreszenzen wurde mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence

Detectors (Perkin-Elmer) detektiert. Für die Anregung benutzt das Gerät einen Argon-Laser (488 nm). Die Emissionsdaten von 500-660 nm werden von einer CCD-Kamera gesammelt, wobei jede Probe alle 7 sec gemessen wird.

Primer- und Sondensequenzen wurden mit dem Programm Primer Express™ (Perkin Elmer) erstellt und von der Firma Perkin Elmer bezogen (siehe 2.1.2). Als endogener Standard wurden Oligonukleotide und Sonde für ein "Housekeeping Gen" (PBDG; Porphobilinogen -Desaminase (CASSINAT *et al.*, 2000)) verwendet.

Als Reporter-Farbstoff für die PBGD-Sonde diente 6-Carboxy-Fluorescein (FAM), für die *hPER1*-Sonde VIC.

Pro PCR-Reaktionsansatz wurden verwendet (25 µl Endvolumen):

12,5 µl	2 x TaqMan® Universal PCR MasterMix (ABI).
200 nM	Oligonukleotid (200 nM je Oligo)
200 nM	Sonde (5'- und 3'-markiertes Oligonukleotid)
1,0 µl	DNA-Matrize (Template)

Zur Analyse wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

1.	N-Glucosylase-Reaktion	50°C	2 min	1 Zyklus
2.	Erst-Denaturierung	95°C	10 min	1 Zyklus
3.	Denaturierung	95°C	15 sec	
	Oligonukleotidanlagerung und			
	Elongation (Verlängerung)	59°C	45 sec	45 Zyklen
4.	Reaktionsende	25°C	∞ min	1 Zyklus

Die Aufnahme der Absorptionsspektren wurde während Schritt 3 durchgeführt, wobei jede einzelne Reaktion entsprechend der Emission des eingesetzten Reporter-Farbstoffes analysiert wurde. Zur relativen Quantifizierung wurde die Vergleichende C_T-Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode) verwendet (vgl. 3.7.2).

2.4 Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.4.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Für die Zellkulturarbeiten wurden die Empfehlungen für den Umgang mit eukaryotischen Zellen befolgt (LINDL, 2000).

Die verwendeten Zelllinien (Tabelle 5) wurden ausschließlich mit den in Tabelle 6 ausgeführten Zellkultur-Flaschen und Medien kultiviert.

Zellen aus flüssigem Stickstoff (-196°C) wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in eine 75 cm² Zellkultur-Flasche mit 20 ml des entsprechenden Zellkulturmediums überführt.

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

Zellstamm / Identifikation	Gewebe / Morphologie/ relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
HUH-7 CRB No.:JCRB0403	humane hepatoma-Karzinom-Zelllinie Adhärenzte Zellen, die als einschichtiger Zellrasen („monolayer“) wachsen	Etabliert aus der Resektion der Leber eines 57 Jahre alten Patienten NAKABAYSHI <i>et al.</i> , 1982
SNB-19 DSMZ-Nr: ACC 325	humane Glioblastom-Zelllinie Adhärenzte fibroblastische Zellen, die als einschichtiger Zellrasen („monolayer“) mit Kontaktinhibition wachsen	Etabliert aus der Resektion eines parieto-occipital Glioblastoms eines 47 Jahre alten Patienten 1980; die Zellen sekretieren Plasminogen-Aktivator. GROSS <i>et al.</i> , 1988
SH-SY5Y ATCC-Nr.: CRL-2266	humane Neuroblastom-Zelllinie Epitheliale Zelllinie, die als „Cluster“ neuroblastischer Zellen wachsen, die multiple Fortsätze ausbilden (Neuriten)	Subklon der Neuroblastoma-Zelllinie SK-N-SH (ATCC-Nr.: HTB-11), die 1970 aus einem metastatischen Knochenmarks-Tumor einer 4 Jahre alten Patientin resektomiert wurde. ROSS <i>et al.</i> , 1983
JEG-3 ATCC-Nr. HTB-36	humane Choriocarcinoma-Zelllinie Adhärenzte epitheliale Zellen, die als einschichtiger Zellrasen („monolayer“) mit Kontaktinhibition wachsen	Eine von sechs klonalen Zelllinien aus einem Erwin-Turner Tumor KOHLENER und BRIDSON, 1971

Tabelle 6: Verwendete Agentien zur Kultivierung von Zellen

Medien, sonst. Zellkulturmaterial	Anbieter, Katalog. Nr.
Dulbecco's Modified Eagle Medium	(Life Technologies™, Kat. Nr. 41966-029)
Dulbecco's MEM / Nut Mix F-12 (1:1)	(Life Technologies™, Kat. Nr. 21331-020)
Dulbecco's Modified Eagle Medium, 25 mM HEPES	(Life Technologies™, Kat. Nr. 22320-022)
Minimum Essential Medium Alpha Medium	(Life Technologies™, Kat. Nr. 41061-029)
Minimum Essential Medium Eagle	(Sigma, Kat. Nr. M-2414)
Fetales Kälber Serum	(BioWhittaker, Kat. Nr. 14-701F, Lot. Nr. 7SB0001)
PBS Dulbecco's	(Life Technologies™, Kat. Nr. 144190-094)
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	(Life Technologies™, Kat. Nr. 35400-027)
10000 µg/ml Penicillin/Streptomycin (100x)	(Life Technologies™, Kat. Nr. 15140-114)
200 mM (100x) L-Glutamin	(Life Technologies™, Kat. Nr. 25030-024)
500 mg/ml Geneticin (G418)	(Life Technologies™, Kat. Nr. 10131-027)
Zellkultur-Flaschen:	Anbieter, Katalog. Nr.
75 cm ² Zellkultur-Flaschen, Filterdeckel	Sarstedt, Kat. Nr.83.1813.002
175 cm ² Zellkultur-Flaschen, Filterdeckel	Sarstedt, Kat. Nr.83.1812.002
100x20 mm Zellkultur-Schalen	Falcon/Becton-Dickensen, Kat. Nr. 3003

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die adhärent wachsenden Zellen in den entsprechenden Zellkultur-Medien (siehe Tabelle 7) unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach Erreichen von 70-90% Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 1x Trypsin/EDTA bei 37°C vom Kulturflaschen-Boden gelöst. Nach Abstoppen der Trypsin-Reaktion mit 4 Vol Medium incl. FCS wurden die Zellen für 7 min bei 120 g (700 U/min) abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und je nach Zelltyp und Dichte 1:3 bis 1:9 in neue Kulturflaschen überführt („passagiert“). Experimentelle Daten mit Hilfe von Transfektions- oder Stimulationsexperimenten wurden erst nach mindestens drei Passagen und/oder einer Woche in Kultur erhoben.

Zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden Zellen mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und bei einer Dichte von 1,5 x 10⁶ Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert.

Einfriermedium:

Medium	entsprechend der Zelllinie
FCS	20%
L-Glutamin	2 mM
Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml
DMSO	10%

Tabelle 7: Verwendete Kulturbedingungen

Zellstamm	Kultur-Medium
JEG-3 (wt)	MEME, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS (v/v)
SNB-19 (wt)	DMEM, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS (v/v)
HUH-7 (wt)	DMEM, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS (v/v)
HUH-7 <i>hPER1-luc</i> (,Susi'; ,Stolch')	DMEM, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS (v/v), 500 µg/ml Geneticin
SH-SY5Y (wt)	Dulbecco's MEM / Nut Mix F-12 (1:1) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 15% FCS (v/v)
SH-SY5Y <i>hPER1-luc</i> ,Harry'; ,Sally' (Selektion)	Dulbecco's MEM / Nut Mix F-12 (1:1) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 15% FCS (v/v), 500 µg/ml Geneticin
SH-SY5Y <i>hPER1-luc</i> ,Harry' (,Screening')	DMEM-HEPES, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 5% FCS (v/v), 500 µg/ml Geneticin
JEG-3 <i>hPER1-luc</i>	MEME, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS (v/v), 500 µg/ml Geneticin

Nach dem Aliquotieren in Einfriergefäße (Cryovial[®], Roth) wurden die Zellen durch Isopropanol bei 1°C/min langsam bis auf -80°C abgekühlt (Cryo-Einfriergerät, Nalgene) und innerhalb von einer Woche in flüssigen Stickstoff überführt.

2.4.2 Transfektion von Zellen

2.4.2.4 Transiente Transfektion von Zellen

Zur Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde das Effectene-Transfektions-Reagent[®] der Firma Qiagen verwendet. Dabei wird die zu transfizierende Plasmid-DNA mit einem kondensierenden Agenz („Enhancer“, Qiagen) in einem dafür geeignetem Puffersystem („Buffer EC“, Qiagen) in eine kompakte Form überführt. Zur Bildung des DNA-Transfektions-Komplexes werden Lipide („Effectene“, Qiagen) zugegeben, die den DNA-Enhancer-Komplex in Micellen verpacken. Die eigentliche Transfektion findet durch Fusion der Lipide mit der Membran der Zellen statt, wodurch die zu transfizierende DNA ins Innere der Zellen „geschleust“ werden kann.

Für die Durchführung der Reporter-Experimente mit transient transfizierten Zellen wurde für jede Zelllinie eine Optimierung der Transfektionsparameter durchgeführt. Die nach der Optimierung gefundenen idealen Parameter für jede Zelllinie sind in Tabelle 8 dargestellt. Zur Bestimmung der Effizienz der Transfektionen unter verschiedenen Bedingungen wurde das Reporter-Plasmid pGL2-control (Tabelle 4)

verwendet. Durch die hohe und permanente Expression des Reportergens Luciferase ist die Transfektionseffizienz direkt proportional zur Licht-Ausbeute.

Tabelle 8: Verwendete Transfektions-Protokolle

	HUH-7	SNB-19	SH-SY5Y	JEG-3 (*)
Ausplattieren der Zellen in den entsprechenden Zellkulturmedien 16-24 h vor der Transfektion in 15 ml Medium in 100x20 mm Kultur-Schalen				
Absolute Zellzahl/Kultur-Schale	2,5 x 10 ⁶ Zellen	3,75 x 10 ⁶	4 x 10 ⁶	5 x 10 ⁵ (*)
Ansetzen des Transfektionsansatzens (Angaben pro Kulturschale):				
Plasmid-DNA [µg]	12	76,8	76,8	1,4 (*)
„Enhancer“ [µl]	48	307,2	307,2	8,4 (*)
Puffer EC [µl]	300	1800	1800	100 (*)
Vortexen, Inkubation für 2 min bei RT, anschließend Zugabe von				
Effectene [µl]	60	192	192	3 (*)
Vortexen, Inkubation für 10 min bei RT, anschließend Zugabe von 5 ml Kultur-Medium				

(*) JEG-3 Zellen wurden wegen der geringen Transfektions-Effizienz in 24-Well-Format transfiziert. Dabei wurden die Zellen gewaschen, 500 µl Medium vorgelegt und der Transfektionsansatz in 400 µl Medium zu den Zellen gegeben.

Die für die Transfektion vorbereiteten Zellen wurden vor Beginn der Transfektion einmal mit Zellkultur-Medium gewaschen und 5 ml in die Zellkulturschalen vorgelegt. Der komplette Transfektionsansatz wurde anschließend auf die Zellen gegeben und 24 h bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Für Kotransfektionen wurden beide Vektoren in gleichen Verhältnissen transfiziert; damit verbundene Kontrollen wurden mit Nicht-Reporter-Vektoren vergleichbarer Größe durchgeführt (z.B. pGL2-basic).

2.4.2.5 Stabile Transfektion von Zellen

Zur Etablierung stabil transfizierter Zellen wurden die in Tabelle 8 beschriebenen Protokolle für die jeweiligen Zelllinien verwendet. Zur Einbringung eines Selektionsmarkers wurde zusätzlich zum Promotor-Luciferase-Konstrukt der Vektor pcDNA 3.1 (-) Neo transfiziert. Dieses Plasmid kodiert für das Resistenzgen

Neomycin, welches durch Zugabe von Geneticin (G418) zur Selektion von pcDNA 3.1 positiven Zellen führt. Dabei wurde für die Transfektion von Promotor-Konstrukt und Selektions-Vektor ein Verhältnis von 10:1 gewählt, um falsch positive Klone (die nur Resistenz aufgrund des Neomycin-Vektors enthalten, aber kein Luciferase-Konstrukt integriert haben) möglichst gering zu halten. Als Kontrolle wurde für jede Zelllinie eine Transfektion durchgeführt, bei der zwar das Promotor-Konstrukt, nicht aber der Selektionsmarker transfiziert wurde.

48 h nach Transfektion der Zelllinien entsprechend dem o.g. Protokoll (siehe 2.4.2.4) erfolgte die Zugabe von Selektionsmedium (Medium incl. 500 µg/ml Geneticin). Zur Entfernung absterbender Zellen wurde dieses für ca. 1 Woche täglich gewechselt. Bei weniger als 10.000 Zellen in sowohl Transfektions- als auch Kontrollschale wurden die Kulturschalen komplett trypsiniert und in neue Kulturschalen gesetzt, so daß nur noch ca. 200-300 Zellen in die neue Schale überführt wurden. Mit der Selektion der Klone wurde nur begonnen, wenn auf den entsprechenden Kontrollplatten alle Zellen abgestorben waren (nach ca. 2 Wochen). Wachsende Einzelklone wurden nach 2-3 Wochen bei einer Zellzahl von ca. 500-5000 Zellen mit einer sterilen Pipettenspitze in 96-Well-Kulturschalen überführt, und dort mit Selektionsmedium weiter inkubiert. Je nach Dichte der einzelnen Klone wurden diese sukzessiv in 24-Well-Schalen und schliesslich in 6-Well Schalen überführt, um mit einer ausreichenden Zahl an Zellen Stimulationsexperimente ausführen zu können.

2.4.3 Stimulation von Zellen

Für die Reporter-gen-Experimente wurden stabil oder transient transfizierte Zellen mindestens 14 h vor Beginn der Stimulation in 96-Well-Schalen mit durchsichtigem Boden und weissen Seitenwänden überführt (Costar, Kat. Nr. 3610). Die verwendeten Stimulantien wurden in einer Verdünnung von mindestens 1:100 der Stammlösung, für in DMSO gelöste Substanzen mindestens 1:1000, in auf RT äquilibriertes MEMalpha Medium verdünnt. Das Kulturmedium in den einzelnen Wells wurde abgenommen und mit jeweils 25 µl der entsprechend gelösten Stimulanz versetzt. Bei gleichzeitiger Stimulation mit mehreren Substanzen wurden diese in den entsprechenden Konzentrationen im MEMalpha Medium gelöst und auf die Zellen gegeben. Für Inhibitionsexperimente wurden die Inhibitoren in einem Volumen von 25 µl auf die Zellen gegeben und für mindestens 20 min bei 37°C/5% CO₂ vorinkubiert. Der anschließende Stimulus erfolgte durch die Zugabe von 5 µl Medium, in dem die Substanz in 6facher Konzentration vorlag.

2.4.4 Verwendete pharmakologische Substanzen

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle verwendeten Stimulanzien von den Firmen Sigma-Aldrich, TEBU und Biolog LifeScience Inst. verwendet. Alle Substanzen wurden in Wasser (Sigma) oder DMSO (Sigma) gelöst und aliquotiert bei -20°C gelagert. Da die Substanzen in verschiedenen Reinheitsgraden und Aktivitätseinheiten angeboten werden, sind zur eindeutigen Identifikation auch die entsprechenden Katalog-Nummern angegeben. Die verwendeten Stammlösungen sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Verwendete Substanzen

Substanz	Anbieter	Konzentration der Stammlösung/ Lösungsmittel	Kat. Nr.
Interleukin-6	TEBU	100 ng/ μl / H_2O	016200-06
Forskolin	RBI	10 mM / DMSO	F-105
<i>Sp</i> -5,6-DCI-cBiMPS	Biolog	100 μM / H_2O	D 014
PMA	Sigma	1 mM in / DMSO	P 8139
<i>Rp</i> -8-CPT-cAMPS	Biolog	100 mM / H_2O	C 011-25
Chelerythrine	BIOMOL	1 mM / DMSO	EI-225

2.4.5 Luciferase-Reportergen-Assay

Zur Bestimmung der Reportergen-Aktivität wurde stabilisierte Luciferase-Lösung verwendet (SteadyGlo[®]). Hierbei findet die Umsetzung des Substrates Luciferin nicht in einer schnellen Reaktion mit geringer Halbwertszeit statt („Flash Reaktion“, $t_{1/2}$ ca. 10 min) sondern wird unter den besonderen Pufferbedingungen verlangsamt, so daß die Halbwertszeit der Reaktion bei RT bei ca. 2 h liegt. Gleichzeitig mit der Zugabe des Substrats (Luciferin) werden die Zellen durch Agentien lysiert, so daß die gebildete Luciferase freigesetzt wird.

Nach der Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Stimuli wurden pro Well 25 μl auf RT äquilibrierte SteadyGlo[®]-Lösung zugegeben und die gesamte Platte für 15-20 min bei 250 U/min bei RT geschüttelt. Die Messung des emittierten Lichts erfolgte in einem automatischen 96-Well-Lumineszenzmeßgerät (LumiStar[®], BMG), wobei jedes Well 10 s gemessen wurde. Die Auswertung der Platten erfolgte mit Hilfe einer LumiStar-Excel-Maske (BMG) und anschließender statistischer Auswertung (siehe 2.1.2).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Probenvorbereitung

Zur Detektion von intrazellulären Proteinen wie Transkriptionsfaktoren (z.B. pCREB) wurden Zellen in 24-Well Platten ausgesät und für das jeweilige Experiment entsprechend stimuliert. Nach der Behandlung wurde das Medium abgenommen und 100 µl 2x Probenpuffer zu den Zellen pipettiert.

2x Probenpuffer:

1 ml	0.5 M Tris/HCl, pH 6.8
1 ml	0.5 M Imidazol, pH 6.8
4 ml	10% SDS
1 ml	Glycerin
0,2 ml	β-ME
0,8 ml	0,1% Bromphenolblau

Die durch den hohen Gehalt an DNA zähe Zell-Lysis-Flüssigkeit wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und drei mal je 2 sec bei maximaler Kraft mit einem Vibra-Cell-Sonifizierer (Sonics & Materials, Danbury, Connecticut, USA) bei 4000 J/W x sec homogenisiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis gestellt und in einer Tischzentrifuge 30 sec bei ca. 12.000 g abzentrifugiert. Die Proben wurden bis zum Auftrag auf das Gel bei –20°C gelagert.

2.5.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen im Bereich von 1-100 kDa kamen denaturierende SDS-Polyacrylamidgele (RITTENHOUSE und MARCUS 1984) zum Einsatz. Als Gelapparatur diente die Mini-Protean II-Kammer (BIO-RAD).

10% Polyacrylamid-Trenngel:

12 ml	H ₂ O
7,5 ml	0.5 M Tris/HCl, pH 8.9
10 ml	30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), Sigma
0,3 ml	10% SDS-Lösung

Zugabe von Polymerisations-Startern:

50 µl	10% APS (Aliquots bei –20°C)
10 µl	TEMED

Die verwendeten Glasplatten wurden vor Beginn mit H₂O und anschließend mit 70% Ethanol gründlich gereinigt. Nach dem Zusammenbau des Gelgießstandes wurde das Trenngel in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert. Anschließend

wurde das noch flüssige Gemisch in den Plattenzwischenraum gefüllt, so daß noch ca. 1 cm für das Sammelgel freibleib. Das Gel wurde vorsichtig mit Isopropanol überschichtet und zur Polymerisation 45 min - 60 min bei Raumtemperatur erschütterungsfrei belassen.

Danach wurde das Isobutanol verworfen, sorgfältig mit ddH₂O gespült und die Geloberfläche vorsichtig mit Filterpapier getrocknet. Im Anschluss wurde das Sammelgel präpariert, auf das Trenngel gegossen und der entsprechende Probenkamm gesteckt.

4% Polyacrylamid-Sammelgel:

2,9 ml H₂O
0,875 ml 0,5 M Imidazol/HCl, pH 6.8
0,875 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6.8
0,75 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1); Sigma
0,05 ml 10% SDS-Lösung

Zugabe von Polymerisations-Startern:

50 µl 10% APS (Aliquots bei -20°C)
10 µl TEMED

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Protean-II-Kammer (BIO-RAD) eingebaut, und beide Pufferkammern mit Laufpuffer gefüllt. Nach dem Entfernen des Probenkammes wurden zur Entfernung unpolymersierten Polyacrylamids die Taschen mit Laufpuffer gespült. Luftblasen, die in den Probenaschen oder an der Gelober- oder Unterseite hafteten, wurden vorsichtig weggespült.

Laufpuffer:

6 g Tris-Base
28,8 g Glycin
10 ml 10% SDS
Auffüllen mit ddH₂O auf 1000 ml

Nach dem Auftragen der Proben in die Taschen wurden die Proteine für 20 min bei 80 V und anschließend für ca. 40 min bei 160 V elektrophoretisch getrennt. Als Größenmarker diente („Prestained Protein Marker“, NEB). Nach Beendigung des Laufes wurden die Glasplatten voneinander getrennt, das Sammelgel abgeschnitten und das Gel in Roti[®]-Blot K (s.u.) äquilibriert.

2.5.3 Immuno-Blot Analyse

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden die Proben durch ein Spannungsfeld auf eine Membran transferiert („semi-dry“ Blot, vgl. MARONDE *et al.*,

1999b). Zum Transfer der elektrophoretisch getrennten Proteine wurde eine PVDF-Membran (0.2 μm ; NEN und Filterpapier (Whatman 3MM)) in der Größe des Gels zugeschnitten.

Vor Beginn des Transfers wurden die Graphit-Elektrodenplatten mit ddH₂O gesäubert. Anschließend wurde die Transfereinheit nach folgendem Schema zusammengesetzt (von unten nach oben):

- Anoden-Platte (+)
- Anodenpuffer (1x Roti[®]-Blot A) getränktes Whatman Filterpapier 3MM
- Methanol und Roti[®]-Blot-A äquilibrierte PVDF-Membran
- Kathodenpuffer (1x Roti[®]-Blot K) äquilibriertes Gel
- Kathodenpuffer (1x Roti[®]-Blot K) getränktes Whatman Filterpapier 3MM
- Kathode (-)
- ca. 1 kg Gewicht

Anoden-Puffer (1x Roti[®]-Blot A):

100 ml 10x Roti[®]-Blot A (Roth)
200 ml Methanol
700 ml H₂O

Kathoden-Puffer (1x Roti[®]-Blot K):

100 ml 10x Roti[®]-Blot K (Roth)
200 ml Methanol
700 ml H₂O

Der Transfer wurde bei 1-1,5 mA/cm² für 45 – 90 min bei RT durchgeführt.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran zur Entfernung des Methanols zweimal mit TBS-Tween gewaschen.

10x TBS (Tris gepufferte Saline):

24,2 g Tris
80,0 g NaCl
pH-Wert auf HCl auf 7.6 einstellen
Auffüllen auf 1 l mit ddH₂O

1x TBS-Tween:

100 ml 10x TBS
1 ml Tween20
900 ml ddH₂O

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde der der Blot danach für 1 h in 1x Roti®-Block-Lösung (Roth) inkubiert und anschließend die entsprechenden primären Antikörper in 1x Roti®-Block zugegeben. Die Bindung der primären Antikörper fand üN bei 4°C und 20-50 U/min statt.

1x Roti®-Block-Lösung:

2 ml 10x Roti®-Block
18 ml ddH₂O

Zum spezifischen Nachweis der Proteine wurden die in Tabelle 10 angegeben primären und sekundären Antikörper verwendet:

Tabelle 10: Verwendete Antikörper

primäre Antikörper		
pCREB	1:2000	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
CREB	1:2000	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
pMAPK 42/44	1:2500	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
MAPK 42/44	1:2500	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
sekundäre Antikörper		
Ziege, Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	1:100.000	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Streptavidin-AK, HRP-gekoppelt	1:30.000	Sigma

Zur Chemilumineszenz-Detektion des primären Antikörpers wurde die Membran 1x kurz und anschließend dreimal je 5 min mit TBS-Tween gewaschen und mit den sekundären Antikörpern (gegen den primären Antikörper bzw. gegen den biotinylierten Marker) in 1x Roti®-Block-Lösung für 1 h inkubiert. Nach nochmals 6-maligem Waschen für je 5 min mit TBS-Tween wurde die Membran gut abgetropft und West-Dura-Detektionsreagenz (Pierce®) auf den Blot gegeben. Nach einminütiger Inkubation wurde die Membran in Zellofanfolie luftblasenfrei verschlossen und je nach Intensität des Signals 30 sec bis 12 h exponiert (CL-X Posure, Pierce®).

West Dura-Detektionsreagenz (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce®):

750 µl Super Signal West Dura Stable Peroxidase
buffer
750 µl Super Signal West Dura Luminol/Enhancer
Solution
Äquilibrieren auf RT

Film-Entwickler (1:25):

100 ml Rodinal (Agfa)
2400 ml H₂O

Film-Fixierer (1:7):

250 ml Tetenal Superfix 1 (Agfa)
1500 ml H₂O

Zur Überprüfung ob in den entsprechenden Spuren die gleichen Mengen Protein vorhanden waren, wurden die Membranen mit ddH₂O gespült und in India Ink-Lösung (Pelikan) 2 h bei RT geschüttelt. Nach dem Spülen mit ddH₂O konnten die Quantitäten der entsprechenden Banden dokumentiert werden.

India-Ink-Lösung:

50 ml TBST
0,15 ml Fount India Ink (Pelikan)

2.6 Ca²⁺-Messungen mit FLIPR™

Für die Messung von intrazellulärer Ca²⁺-Änderung wurde der FLIPR™ (Fluorometric Imaging Plate Reader) verwendet. Das System basiert auf der Beladung von Zellen mit einem fluoreszenten Acetoxy-Methyl-Ester (Fluo-4, AM, Molecular Probes®). Nach der Diffusion des Farbstoffes in die Zellen wird der Ester intrazellulär gespalten, so daß sich Fluo-4 in der Zelle anreichert. Das Derivat erhöht seine Fluoreszenz-Intensität um ca. einen Faktor 100 nach der Bindung von freiem, intrazellulärem Ca²⁺.

Für die Experimente wurden JEG-3 Zellen in schwarzen 96 Well Platten (Costar, Kat. Nr. 3603) mit je 80.000 Zellen pro Well in Komplett-Medium ausplattiert und 16 h üN bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Für die Beladung wurden die Zellen einmal mit 1x HBSS (Life Technologies™) incl. 20 mM HEPES (Life Technologies™) gewaschen und mit dem gleichen Puffer incl. 1 µM Fluo-4® (gelöst in je 22 µl DMSO und 22 µl Pluronic F-127; Molecular Probes) für 40 min bei 37°C / 5% CO₂ beladen. Die Wells wurden anschließend je 3x mit 1x HBSS/HEPES gewaschen und in einem Volumen von 100 µl 1x HBSS/HEPES kurz bei 37°C inkubiert. Die Zugabe der in 1x HBSS/HEPES gelösten Testsubstanzen erfolgte während der Messung in einem

Volumen von je 50 µl als 3fach konzentrierte Lösungen. Die Anregung der Zellen erfolgte mit einem Argon-Laser bei 488 nm, die Emission wurde zwischen 510 und 520 nm gemessen. Die relative Fluoreszenz-Änderung wurde 30 sec im Vorlauf (vor Applikation des Stimulus) und 130 sec nach der Zugabe der Substanzen gemessen. Alle weiteren Details der Messung wurden nach den Anweisungen des User Manuals Version 3.4, Molecular Devices durchgeführt.

2.7 Herstellung einer Peptidbank

Zur Aufreinigung bioaktiver Peptide aus Gewebe wurden 1,73 kg (60 Stück) Rinderaugen (Schlachthof Gleidingen, Hannover) mechanisch zerkleinert und die löslichen Stoffe mit Citratpuffer extrahiert. Dabei wurden pro kg Gewebe 4 kg Extraktionspuffer und 4 kg Eis aus VE-Wasser verwendet. Nach der Homogenisation wurde der Extrakt bei 9500 rpm für 30 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde über 1574 Filter (Schleicher & Schüll) weiter von Schwebeteilchen befreit. Eine anschließende Ultrafiltration wurde mit dem Sartocoon Mini Crossflow System SM 17521 (Sartorius) durchgeführt. Dabei wurden 4 übereinanderliegende Ultrasart-Module (SM 303146500E-SG, Sartorius) mit 50 kDa Ausschlussgröße verwendet. Nach der Konzentrierung des Filtrats auf 1 l erfolgte eine Diafiltration des Retentats mit 8,5 l Diafiltrationspuffer.

Citrat-Puffer:

1 M Citronensäure
20 mM Ascorbinsäure
1 mM EDTA
mit HCl auf pH 2.5 einstellen

Diafiltrations-Puffer:

0.1 M Citronensäure
10 mM Ascorbinsäure
0.5 mM EDTA

Das Gesamtpermeat (24 l) wurde auf einer C18-Kartusche (15-30 µm, 300 Å, Vydac, Hesperia, USA) mit einer BioCad 60 (PerSeptive Biosystems, Freiburg) bei 40 ml/min und 40 bar chromatographiert:

Puffer und Gradienten:

Puffer A: 10 mM HCl

Puffer B: 10 mM HCl/ 80% Acetonitril

Gradient:

0 %B	100 ml
0 -60 %B	1900 ml
60-100 %B	150 ml
100-0 %B	100 ml
0 %B	350 ml

Es wurden insgesamt 42 Fraktionen zu je 50 ml Volumen gesammelt. Je 500 µl pro Fraktion wurde in 96-Well Schalen überführt und lyophilisiert. Zur Verwendung der Aliquots im Luciferase-Reportergen-Assay wurden diese Fraktionen in MEMalpha resuspendiert und anschließend getestet (2.4.3).

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung eines Promotor-Luciferase-Konstruktes des humanen *hPER1*-Gens

Zur Charakterisierung des Promotors von *hPER1* wurde ein Luciferase-Reporter-Konstrukt hergestellt. Die gewählte Strategie sollte ohne PCR-Reaktionen durchgeführt werden, um Punktmutationen während der Klonierung auszuschließen. Die gesamte Klonierungsstrategie ist in Abbildung 7 zusammengefaßt.

3.1.1 Southern Blot Analyse zur Isolation eines Promotor-Fragments von *hPER1*

Für die Identifizierung des Promotors des humanen Gens für Period1 (*hPER1*) wurde ein ca. 30 kb umfassendes Plasmid (39C2, SUN *et al.*, 1997; zur Verfügung gestellt von Cheng Chi Lee, Dept. of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA) verwendet, welches nachfolgend als *hPER1*-SuperCos I bezeichnet wird. Zur Isolierung von DNA wurde das Plasmid in ultrakompetente XL10-Gold Zellen (Stratagene) transformiert (2.2.5). Von acht der erhaltenen Kolonien wurde Plasmid-DNA (2.2.1.1) hergestellt. Je 1/5 der Proben wurde anschließend auf einem 0,8%igem Agarosegel (2.2.6) auf den Gehalt des *hPER1*-SuperCos I überprüft. Zusätzlich wurde die Konzentration der jeweiligen Plasmid-Präparationen durch photometrische Messung bestimmt (2.2.7). Da alle acht Klone das *hPER1*-SuperCos I Plasmid enthielten, wurden die Proben zusammengegeben und je 2,2 µg mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen 3 h bei 37°C enzymatisch gespalten (siehe 2.2.2). Die Ansätze wurden anschließend komplett auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (2.2.6). Als Marker wurde die 1 kb-Ladder und λ -*HindIII* (Life Technologies™) verwendet (Abbildung 8A).

Zur nachträglichen Identifikation hybridisierender Fragmente wurde das Gel mit einem Lineal fotografiert und anschließend auf eine Nylon-Membran überführt (2.2.8; SOUTHERN, 1975).

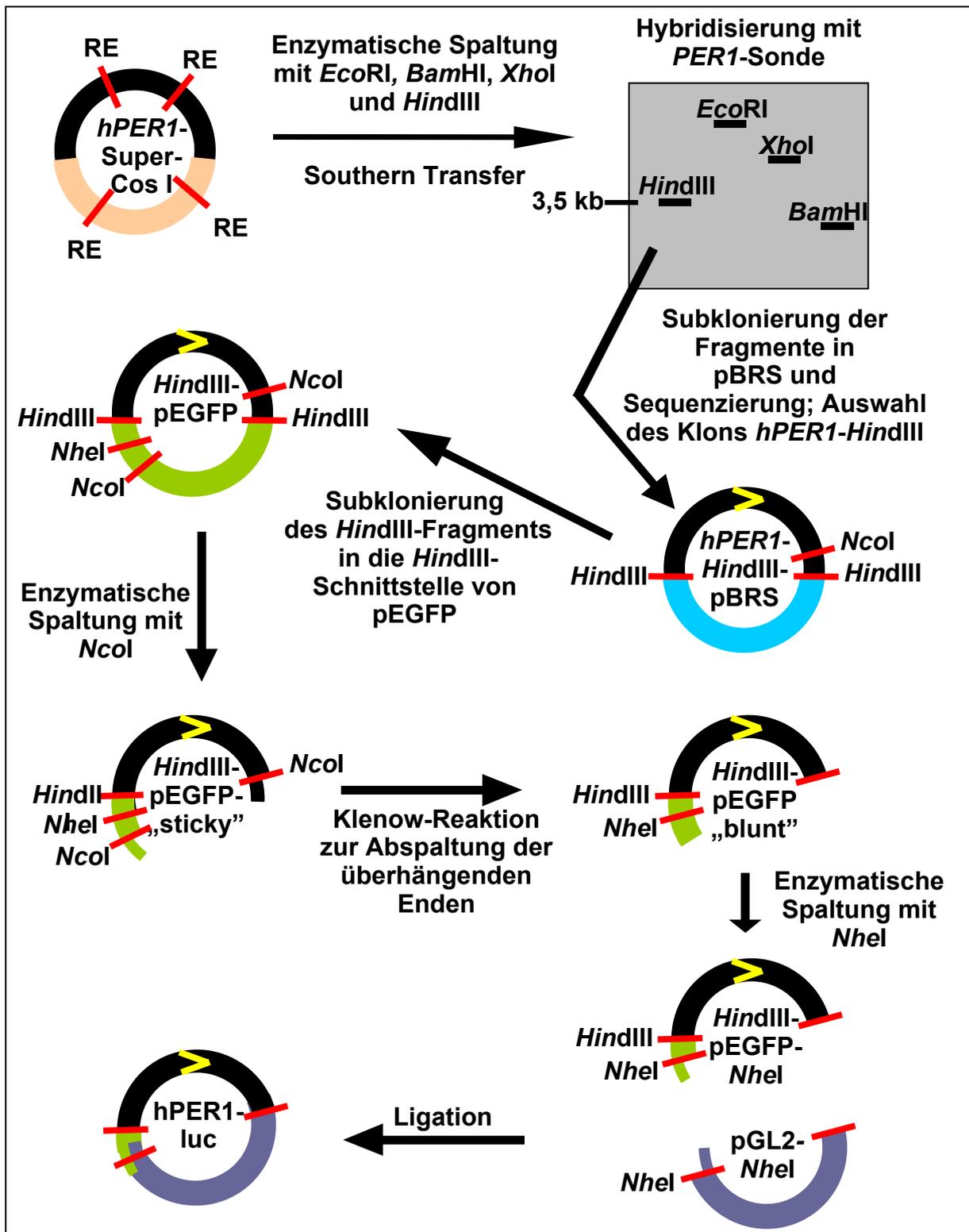


Abbildung 7: Klonierung von *hPER1-luc* aus dem Plasmid *hPER1-SuperCos I* (39C2, SUN *et al.*, 1997). Das Cosmid wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen (RE) enzymatisch gespalten und die resultierenden Banden mit einer *PER1*-Sonde hybridisiert. Das positive *hPER1-HindIII*-Fragment wurde in *pBluescript* (*pBRS*) kloniert. Anschließend erfolgte eine Subklonierung in *pEGFP-N1* (*pEGFP*), aus dessen Vektor-Sequenz die *NheI*-Schnittstelle genutzt wurde. Dieser Vektor, ebenso wie der promotorlose *pGL2-basic* Vektor, wurden so modifiziert, daß ein Ende des Fragments eine freie *NheI*-Schnittstelle aufwies („sticky“) und die andere Seite keine überhängenden Enden zeigte („blunt“). Die Ligation der so präparierten DNA-Sequenzen führten zum Reporter-Plasmid *hPER1-luc*. Die gelben Pfeile zeigen die Orientierung von *hPER1*.

Zur Hybridisierung wurde ein *XhoI/EcoRI*-Fragment des murinen Period-Homologen verwendet („RIGUI“, Acc. Nr.: AF02292), welches die Exons 1 und 2 umfaßt. Dazu wurde ein entsprechendes Plasmid (RIGUI-pSport2; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. U. Albrecht, MPI für experimentelle Endokrinologie, Hannover) in kompetente XL2Blue Zellen transformiert (2.2.4). Nach der Präparation von Plasmid-DNA (2.2.1.1) wurden 3 µg mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* gespalten und ein 650 bp großes Fragment generiert. Nach der elektrophoretischen Trennung wurde dieses aus einem Agarosegel isoliert und aufgereinigt (2.2.1.3). 50 ng des Fragments wurden durch die Reaktion mit dem Klenow-Enzym mit P³²-dCTP markiert und für die Southern Hybridisierung eingesetzt (2.2.8).

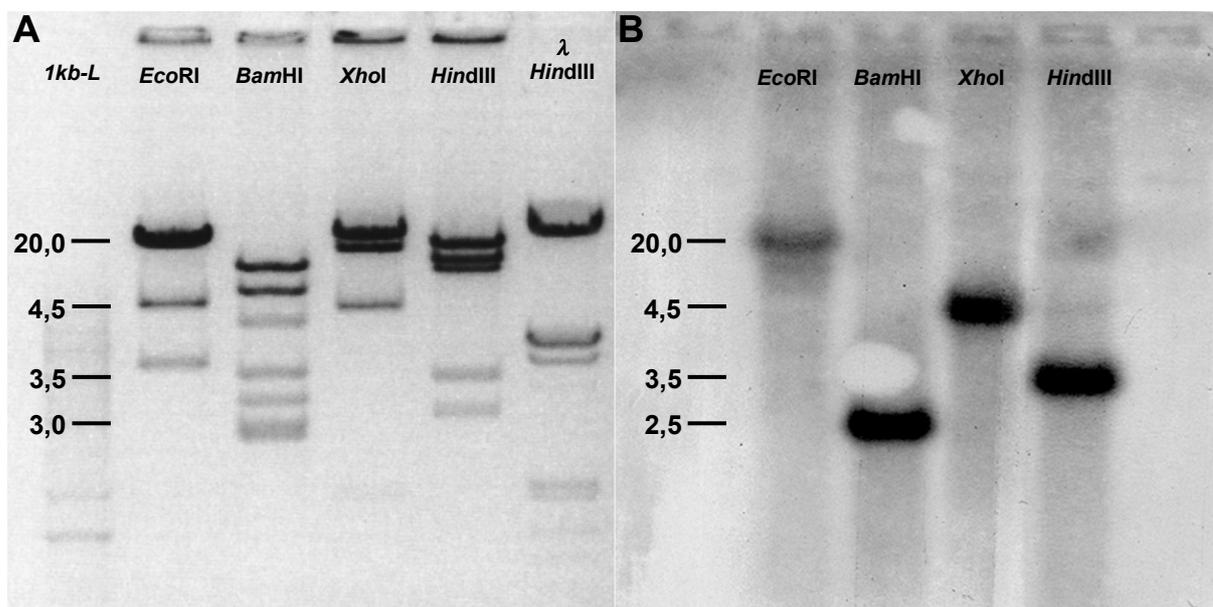


Abbildung 8: Southern Hybridisierung. Das Plasmid 39C2 wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen gespalten und elektrophoretisch getrennt. Abbildung 8A zeigt das resultierende Bandenmuster, Abbildung 8B das Radiogramm nach Hybridisierung des Blots mit der generierten Sonde. Die Größen der positiven Fragmente sind von den beiden Molekulargewichtsmarkern 1 kb-Leiter (links) und λ -*HindIII* (rechts) abgeleitet. Die verwendeten Enzyme sind über den jeweiligen Spuren angegeben.

Für die weiteren Arbeiten wurden 12 µg des Plasmids 39C2 mit *HindIII* enzymatisch gespalten und elektrophoretisch getrennt. Die in Abbildung 8A, Spur *HindIII*, positiv hybridisierte Bande wurde anschließend aus dem Gel eluiert. Für die Klonierung wurden 3 µg pBluescript Vektor mit *HindIII* gespalten und das linearisierte Plasmid mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Für die Ligation wurden 100 ng des dephosphorylierten Vektors und 500 ng *hPER1-HindIII*-Fragment verwendet. Nach der Ligation wurde der Ansatz komplett in XL2Blue-Zellen transformiert und auf Blau/Weiss-Selektionsmedium ausplattiert. Positive Klone wurden nach Anfertigung von Mini-Präparationen auf die Insertion mit Spaltung durch *hPER1-HindIII* überprüft. Ein positiver Klon wurde ausgewählt, eine Maxi-Präparation durchgeführt und vollständig sequenziert (siehe 2.2.9). Im Detail wurde das *hPER1-HindIII*-Fragment

aus dem Vektor pBluescript geschnitten, isoliert und in einen ebenfalls geschnittenen und dephosphorylierten Transfer-Vektor (pEGFP-N1, Tabelle 4) ligiert. Diese Strategie wurde gewählt, da für die nachfolgende Klonierung in den Luciferase-Vektor (pGL2-basic, siehe Tabelle 4) Restriktionserkennungssequenzen Verwendung fanden, die nicht im pBluescript vorhanden waren. Die Selektion putativ positiver pEGFP-N1-*hPER1-HindIII*-Klone erfolgte mit Kanamycin. Der Wechsel des Selektions-Antibiotikums von Ampicilin (pBluescript) zu Kanamycin (pEGFP-N1) wurde dabei als Hilfsmittel verwendet, um „revertierte“ Formen des ursprünglichen Klons *HindIII*-pBluescript auszuschließen. Nach erfolgter Restriktionsanalyse und Auswahl positiver Klone wurde pEGFP-N1-*hPER1-HindIII* mit *NcoI* gespalten, die überhängenden Enden des Fragments mit Klenow-Fragment abgespalten (siehe 2.2.2) und wiederum mit dem Enzym *NheI* gespalten. Das auf diese Weise generierte Fragment besitzt auf der 5'-Seite einen freien *NheI*-Restriktionsüberhang und endet am 3'-Ende an Position +1317 relativ zum putativen Transkriptionsstartpunkt (vgl. TARUSCIO *et al.*, 2000) innerhalb des Introns 1 (vgl. auch Abbildung 9). Die Klonierung erfolgte über die *NheI*-Schnittstelle im pGL2-basic Vektor, so daß der klonierte Promotor-Bereich von *hPER1* direkt vor die als Reporter gen fungierende Luciferase gesetzt wurde. Das so erhaltene Plasmid wird nachfolgend als *hPER1-luc* benannt.

3.1.2 *In silico* Promotor-Analyse

Nach der vollständigen Sequenzierung des *hPER1-HindIII*-Klons wurden die erhaltenen Daten mit Hilfe von BLAST-Suchen (ALTSCHUL *et al.*, 1997) mit eingetragenen Sequenzen verglichen, die Exon/Intron-Übergänge zugeordnet und die Promotor-Region lokalisiert (Abb. 3). Die erhaltene Sequenz umfaßt sowohl Promotor-Sequenzen (blau) als auch 3' liegende Bereiche, die bis in das Exon 4 reichen. Kurze Zeit nach der Sequenzierung (NCBI-Nr. AF284444) wurde auch von anderen Arbeitsgruppen der Promotor für *hPER1* sequenziert und in der NCBI-Datenbank abgelegt. Der Sequenzvergleich mit den NCBI-Einträgen AF102137 (TARUSCIO *et al.*, 2000) und AB030817 (HIDA *et al.*, 2000) zeigte eine fast vollständige Identität.

Zur Charakterisierung des klonierten Promotor-Bereichs wurde die Sequenz mit dem Programm MatInspector V.2.2 basierend auf TRANSFAC 4.0 (QUANDT *et al.*, 1995) auf putativ responsive Promotor-Elemente hin analysiert (Abbildung 10).

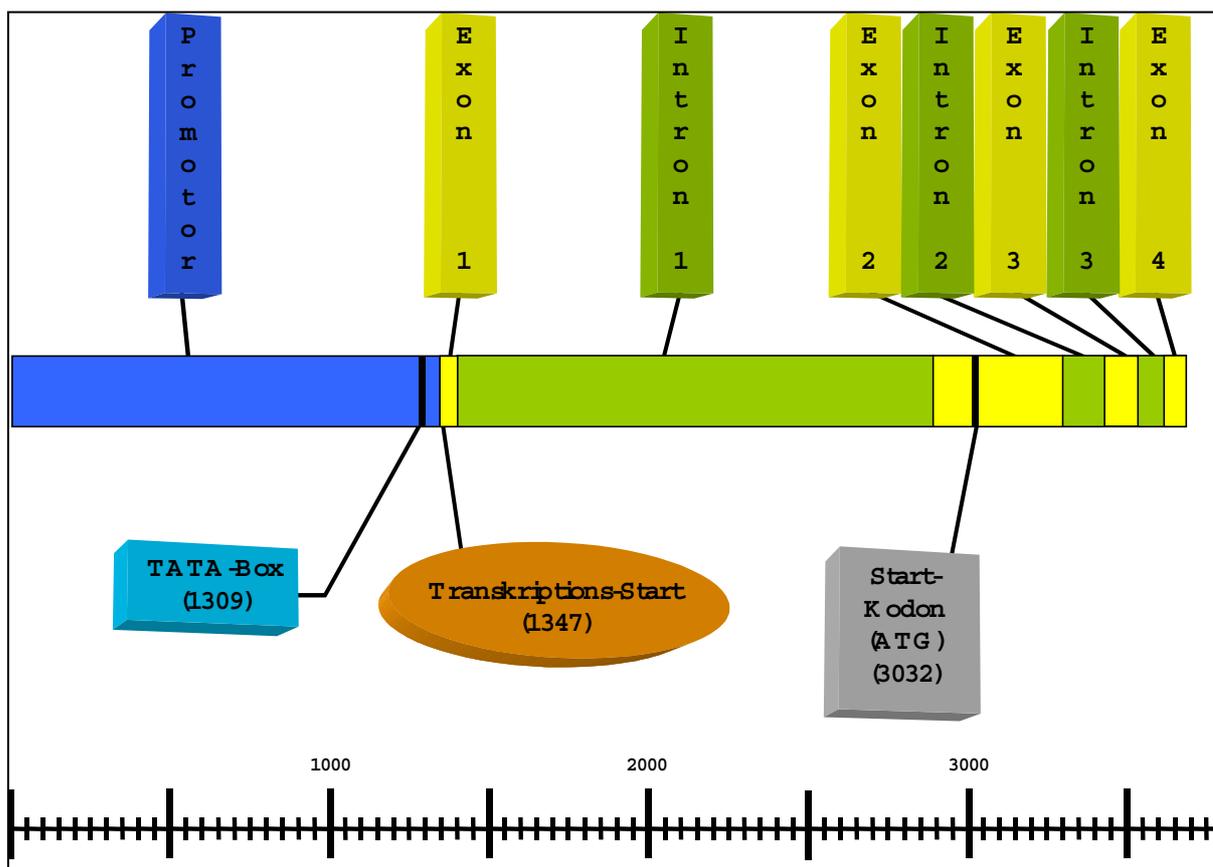


Abbildung 9: Exon/Intron-Struktur des *hPER1*-HindIII-Fragments. Die Sequenz umfasst den Promotor von *hPER1* und reicht bis in Exon 4 des Gens. Die TATA-Box und der Transkriptionsstartpunkt entsprechen den Angaben von TARUSCIO *et al.*, 2000. Das Start-Kodon ist angegeben. Die exakten Bereiche für Exons und Introns sind im Anhang gezeigt.

Der klonierte Promotor-Bereich umfasst drei E-Box-Elemente (SWANSON *et al.*, 1995), die in großen Abständen (mehr als 500 bp) auf dem Promotor verteilt sind. Weiterhin ermittelte das Programm Barbiturat-responsive Elemente (LIANG *et al.*, 1995), die ebenfalls relativ weit voneinander entfernt sind. Im Gegensatz dazu liegen drei putative C/EBP-beta-responsive Elemente (AKIRA *et al.*, 1990) sehr eng beieinander (innerhalb von 120 bp), ca. 400 Basen 5' des Transkriptionsstartpunktes. Ein einzelnes AP1-Element zur putativen Bindung von fos/jun-Heterodimeren wurde ebenfalls gefunden. Insgesamt ermittelte das Programm über 450 putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Dabei wurden für manche Elemente nur vier oder fünf Basen als Kriterium für eine Übereinstimmung verwendet. Das TATA-Box-Element konnte vom Programm TRANSFAC 4.0 nicht identifiziert werden. Eine ausreichende Übereinstimmung mit bekannten TATA-Box Motiven konnte nur mit dem Programm TSSG („Recognition of human PolII promoter region and start of transcription“, SOLOVYEV *et al.*, 1995) festgestellt werden (vgl. auch TARUSCIO *et al.*, 2000). Nahe 5' der so gefundenen Sequenz konnten mit beiden Programmen putative CAAT-Box Motive identifiziert werden, die für die basale Transkriptions-Maschinerie verantwortlich sind.

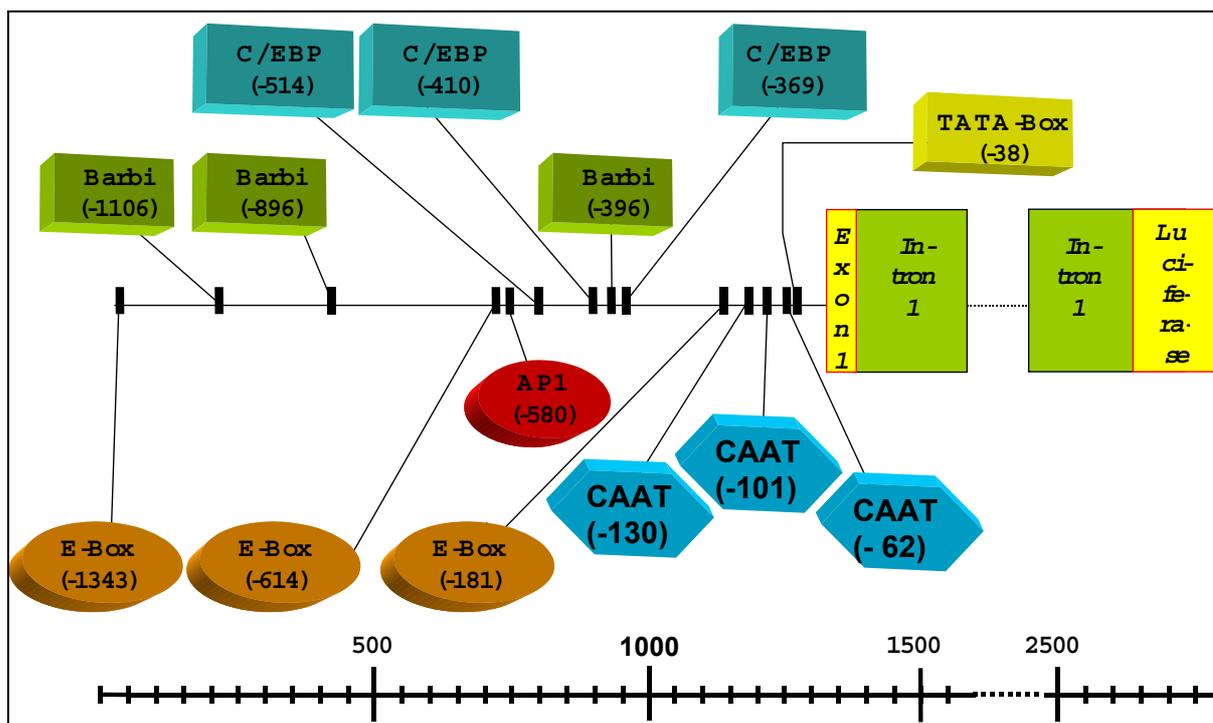


Abbildung 10: Putativ responsive Elemente des Promotors von *hPER1*. Die Skalierung bezieht sich auf die Position der ersten Base des putativen Elements in *hPER1-HindIII* (NCBI-Nr. AF284444); die angegebenen Positionen in Klammern auf den putativen Transkriptionsstartpunkt (TARUSCIO *et al.*, 2000). C/EBP: C/EBP-beta („CCAAT/Enhancer binding protein beta“), CAAT: CAAT-Box Element für RNA-Polymerase II, AP1: Aktivator-Protein 1, Barbi: Barbi-Box-Element. Die Konsensus-Sequenzen für die gezeigten Elemente sind im Anhang gezeigt.

Bei der Auswertung der TRANSFAC-Daten wurden neben den in Abbildung 10 angegebenen Elementen auch putativ cAMP-responsive Elemente gefunden (BENBROOK und JONES, 1994). Von den insgesamt 23 gefundenen Sequenzen war keine mit der palindromen Konsensus-Sequenz 5'-TGACGTCA-3' identisch.

3.2 Optimierung der Transfektionseffizienzen

Für die Transfektion von *hPER1-luc* in eukaryotische Zellen wurden zunächst Transfektionen im 24-Well Format durchgeführt. Zur Optimierung der Effizienz der verschiedenen humanen Zelllinien (HUH-7, SNB-19, SH-SY5Y) wurden verschiedene DNA- und Transfektionsagentien-Mengen getestet.

In Abbildung 11 ist beispielhaft der erste Optimierungsschritt gezeigt. Dazu wurden die jeweiligen Zellen ausplattiert und 24 h später nach verschiedenen Protokollen transfiziert (siehe „Qiagen Transfection Resource Book“).

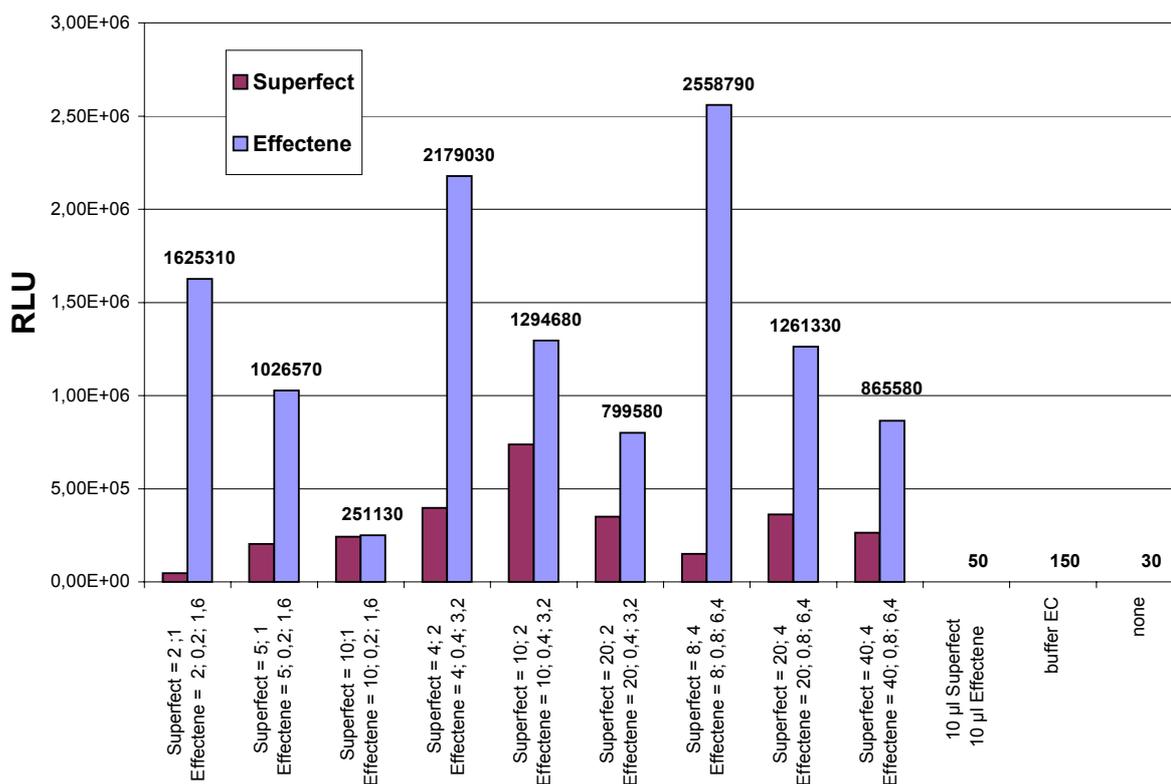


Abbildung 11: Optimierung der Transfektionseffizienz. HUH-7 Zellen wurden mit variierenden pGL2-control Vektor und verschiedenen Mengen Transfektions-Agentien (Effectene, Superfect; Qiagen) transfiziert und nach 16h die Luciferase-Aktivität gemessen. Die relativen Mengen DNA und Superfect bzw. DNA, Effectene und Enhancer sind als Verhältnisse angegeben. Kontrollen sind ohne DNA, Transfektionsagens oder beidem durchgeführt worden.

Für Optimierungsexperimente wurde der pGL2-control Vektor verwendet (2.1.2). Dabei ist die kodierende Sequenz der Luciferase 3' an den Promotor des Cytomegalievirus (CMV) gekoppelt, um maximale Transkription des Luciferase-Gens zu gewährleisten. Abbildung 11 zeigt, daß mit Effectene (blau) in den Verhältnissen 8 : 0,8 : 6,4 (DNA [µg] : Effectene [µl] : Enhancer [µl]) die höchste Transfektionseffizienz erreicht werden konnte, während Transfektionen mit Superfect (rot) mindestens zweifach niedrigere Reporteragen-Aktivität zeigten. Nach der Bestimmung der optimalen Transfektionsbedingungen im 24-Well-Format wurden die Zellen in entsprechenden Agenz-Verhältnissen in 6-Well Schalen transfiziert. In einem anschließenden Schritt wurden 10x22 mm Schalen verwendet und die Aktivität der Luciferase bei verschiedenen Bedingungen getestet. Die so erhaltenen Protokolle (2.4.2.4) erlaubten die gleichzeitige Transfektion von ca. 4-8 Millionen Zellen, die anschließend in 96-Well Schalen ausplattiert wurden. So konnte gewährleistet werden, daß die Transfektionseffizienz bei allen Zellen eines Experimentes vergleichbar war und so für die Stimulations-Experimente kein interner Standard verwendet werden mußte. Alle weiteren Experimente sind, wenn nicht abweichend angegeben, mit nach den jeweiligen Protokollen transient transfizierten Zellen durchgeführt worden.

3.3 Aktivierung von *hPER1*-luc

Für die Charakterisierung aktivierender Signaltransduktionswege von *hPER1* wurde das in Abbildung 7 beschriebene *hPER1*-luc Konstrukt in verschiedene humane Zelllinien transfiziert und in 96-Well-Format ausplattiert. Die Stimulation der Zellen mit verschiedenen Agentien erfolgte, wenn nicht anders angegeben, für 4 h (2.4.3). Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt (2.4.3). Alle nachfolgenden Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig in Replika wiederholt und statistisch ausgewertet (2.1.2).

3.3.1 Bestimmung der PKA-abhängigen Promotor-Aktivität

Der Adenylat-Zyklase Aktivator Forskolin, ein bekannter Agonist der zirkadianen Expression von *Per1* in rat-1 Fibroblasten (YAGITA und OKAMURA, 2000), zeigt eine konzentrationsabhängige Aktivierung von *hPER1*-luc (Abbildung 12A) in HUH-7 Zellen.

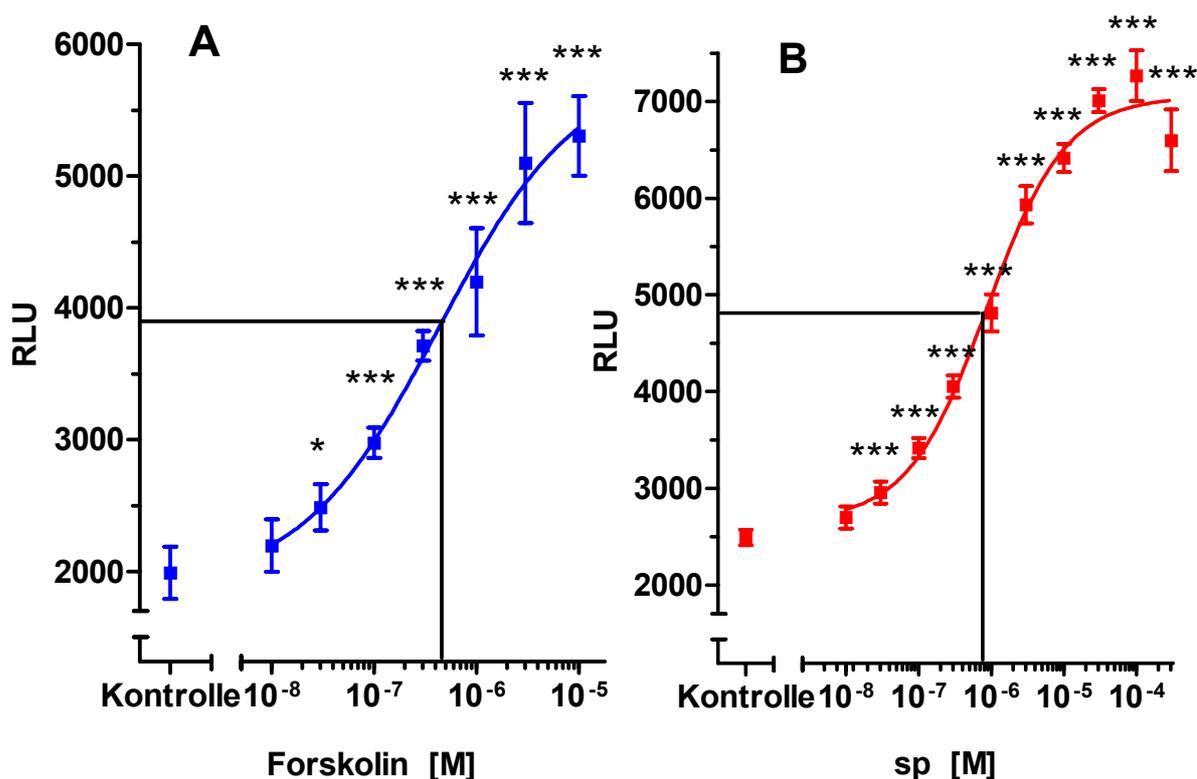


Abbildung 12: Aktivierung von *hPER1* über PKA-Aktivatoren. A: Stimulation von ‚Susi‘ (HUH-7-*hPER1*-luc) mit Forskolin, B: Stimulation mit Sp-5,6-DCl-cBiMPS. Gezeigt sind die Mittelwerte von n=10 (für Forskolin) und n=8 (für Sp-5,6-DCl-cBiMPS) Experimenten +/- SD. Kontrolle entspricht der Basalaktivität des Reporter-Konstruktes. Die EC₅₀-Werte sind graphisch angezeigt. Die Signifikanzen bezogen auf die Kontrolle sind mit (*) p < 0.01 und (***) p < 0.001 angegeben.

Die Stimulation mit dem PKA-spezifischen und zellpermeablen cAMP-Analogen *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS (SANDBERG *et al.*, 1991) zeigt eine vergleichbare Aktivierung (Abbildung 12B). Der ermittelte EC_{50} -Wert liegt bei Forskolin bei $4,3 \times 10^{-7}$ M und bei *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS bei $8,6 \times 10^{-7}$ M. Für diese Stimulationen wurden stabil transfizierte Zellen verwendet („Susi“, siehe 2.4.2.5). In transfizierten SH-SY5Y und SNB-19 Zellen konnte ebenfalls eine Aktivierung von *hPER1*-luc detektiert werden (nicht gezeigt).

3.3.2 Synergismus der PKA und PKC induzierten Promotor-Aktivität

Das PKC stimulierende Agens Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) induzierte *hPER1*-Promotor-Aktivität in HUH-7 Zellen bei einer Konzentration von 100 nM (Abbildung 13, blaue Kurve). Bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit konstanter Menge PMA und steigenden Konzentrationen des cAMP-Analogs zeigte sich eine Potenzierung der Aktivierung.

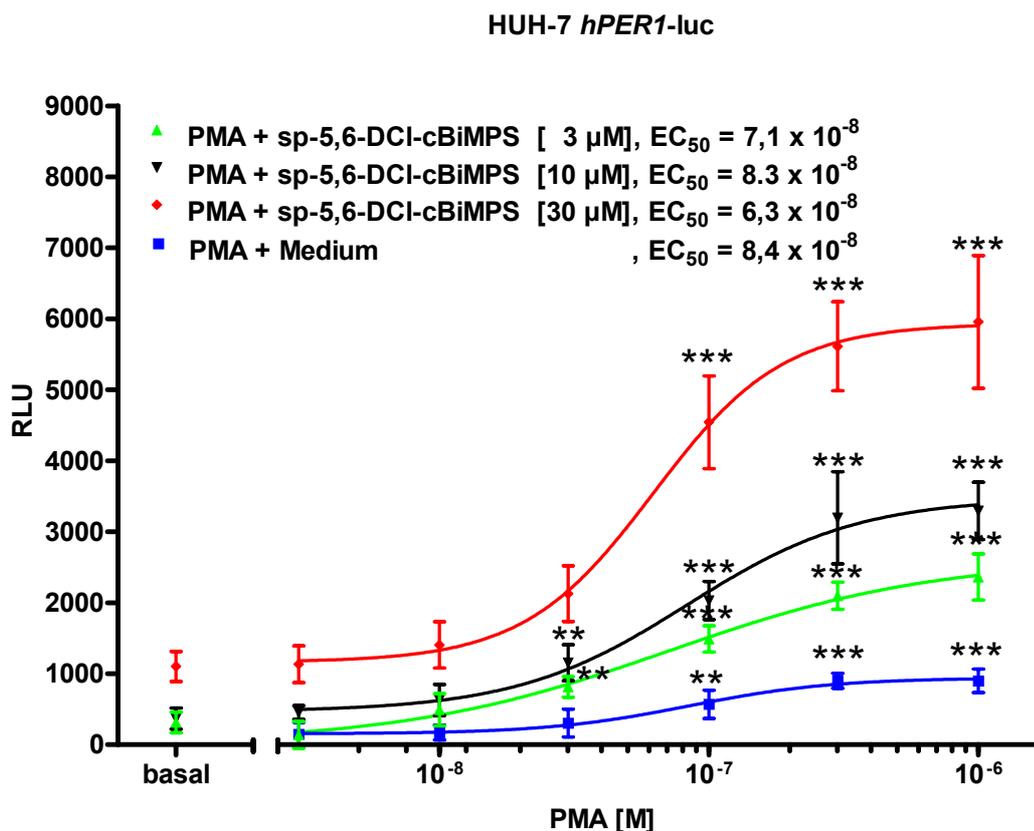


Abbildung 13: Synergistische Aktivierung von *hPER1*-luc durch PKA und PKC aktivierende Agentien in HUH-7 Zellen. Kostimulation von PMA [100 nM] und steigenden Konzentrationen von *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS in transient *hPER1*-luc transfizierten Zellen. Die Stimulation mit *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS alleine ist als „basal“ angegeben, die blaue Kurve zeigt die Stimulation mit PMA allein. Die korrespondierenden EC_{50} -Werte sind angegeben. Die Signifikanzen, bezogen auf die basale Aktivierung, sind mit (**) $p < 0.01$ und (***) $p < 0.001$ angegeben.

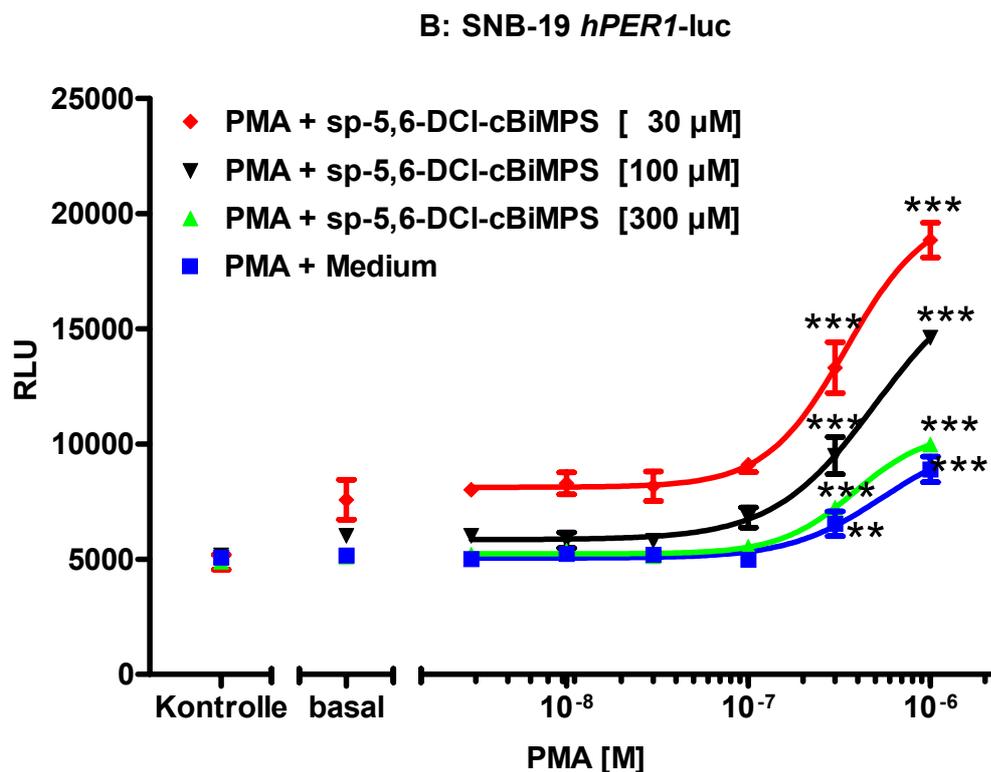
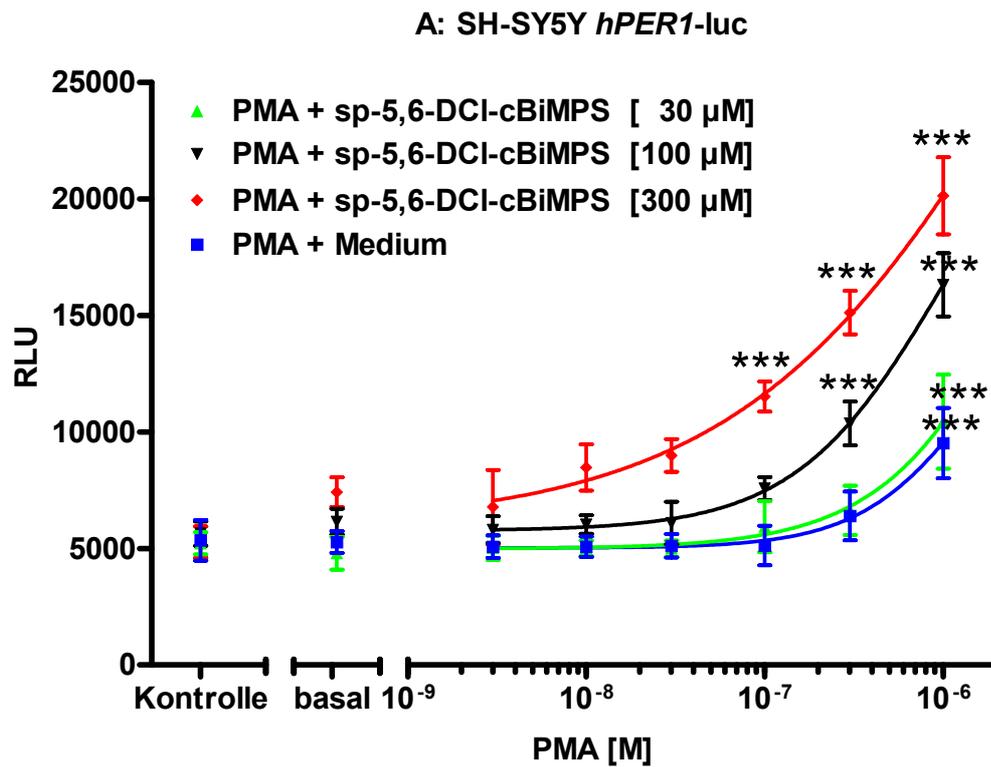


Abbildung 14A/B: Synergistische Aktivierung von *hPER1*-luc auf PKA und PKC aktivierende Agentien in A: SH-SY5Y Zellen und B: SNB-19 Zellen. Kostimulation von PMA [100 nM] und steigenden Konzentrationen von Sp-5,6-DCI-cBiMPS in transient *hPER1*-luc transfizierten Zellen. Die Stimulation mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS alleine ist als angegeben (basal), die blaue Kurve zeigt die Stimulation mit PMA allein. Die Signifikanzen, bezogen auf die basale Aktivierung, sind mit (**) $p < 0.01$ und (***) $p < 0.001$ angegeben.

Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl in HUH-7 Hepatoma-Zellen (Abbildung 13) als auch in neuronalen SH-SY5Y (Abbildung 14A) und Glioblastom-Zelllinien (Abbildung 14B). Dies läßt vermuten, daß es sich bei der gemessenen Genexpression um zwei verschiedene transkriptionelle Mechanismen handelt, die synergistisch zusammenwirken. Als Kontrollen für die Spezifität der gewonnenen Daten wurde der promotorlose pGL2-basic Vektor in HUH-7 Zellen verwendet. Die so transfizierten Zellen zeigten keine Aktivierbarkeit mit den o.g. Agentien (nicht gezeigt).

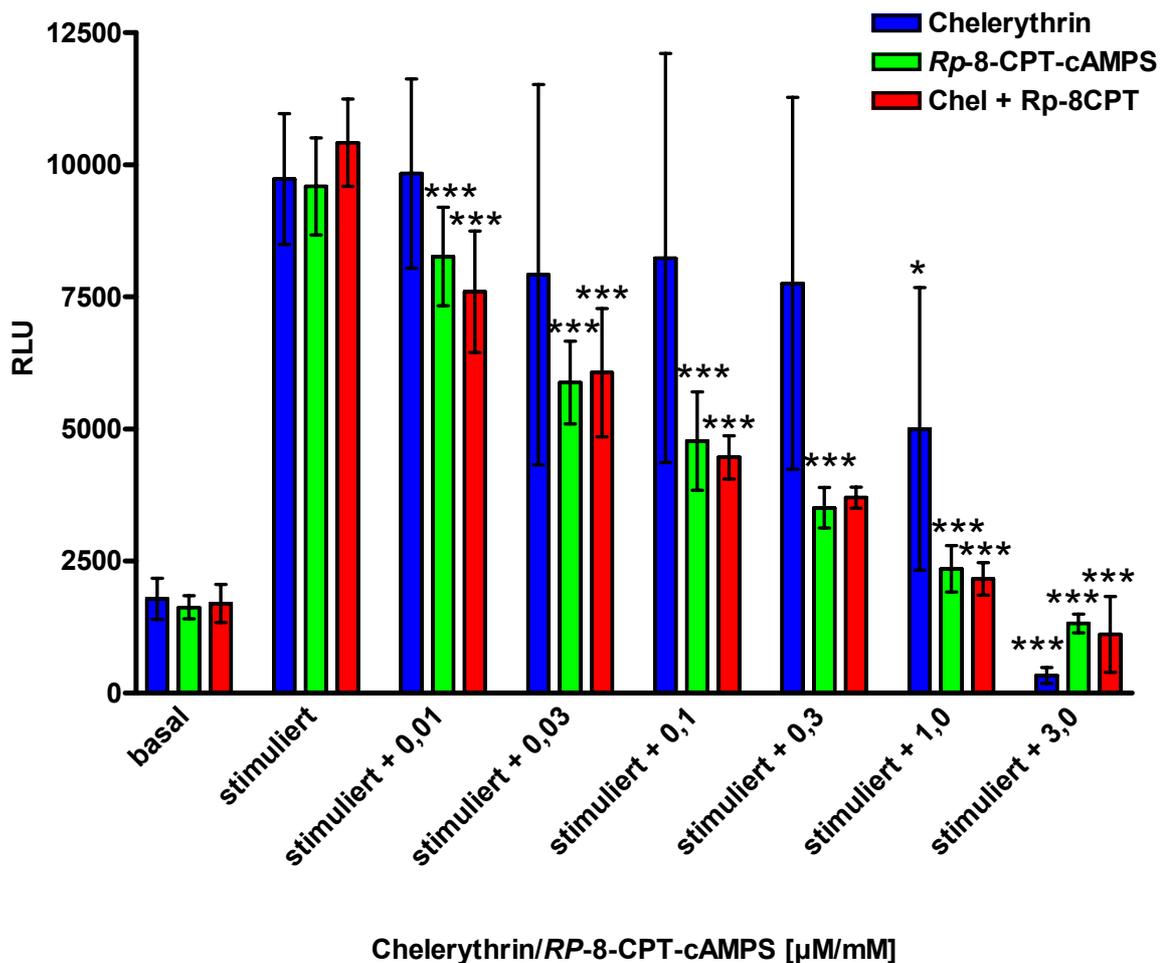


Abbildung 15: Inhibition der PKA- und PKC-vermittelten Stimulation von *hPER1-luc*. HUH-7 Zellen wurden mit *hPER1-luc* transfiziert und in 96-Well Format ausplattiert. Die Zellen wurden mit Chelerythrin, *Rp-8-CPT-cAMPS* oder beiden Inhibitoren für 20 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* [100 μ M] / *PMA* [30 nM] (stimuliert). Die Basalaktivität des Reporters ist links dargestellt (basal). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte von zwei Experimenten (n=7) +/- SD. Die Signifikanzen, bezogen auf die stimulierten Zellen, sind mit (*) $p < 0,05$ und (***) $p < 0,001$ angegeben.

Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wurden spezifische Inhibitoren für PKC und PKA eingesetzt. Der PKA-spezifische Inhibitor *Rp-8-CPT-cAMPS* (GJERTSEN *et al.*, 1995) hemmte bei einer Konzentration von 3 mM die PKA abhängige Induktion mit *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* (Abbildung 15, grüne Balken). Der EC_{50} -Wert wurde mit 30 μ M

ermittelt. Chelerythrin (Abbildung 15, blaue Balken), ein Inhibitor für PKC, zeigte bei einer Konzentration von 1 μM eine Reduktion der PKA-vermittelten Stimulation auf ca. 40%. Bei gleichzeitiger Inhibition mit *Rp-8-CPT-cAMPS* und Chelerythrin zeigte sich keine weitere Inhibition des Signals als mit *Rp-8-CPT-cAMPS* allein (Abbildung 15, rote Balken). Ab einer Konzentration von 3 μM wirkte Chelerythrin auf HUH-7 Zellen toxisch

Die Experimente zeigen, daß die Aktivität des *hPER1*-Promotor-Luciferase-Konstruktes sowohl von PKA als auch von PKC vermittelten Signalen abhängig ist.

3.4 Aktivierung von *hPER1*-luc durch pCREB

PKA oder PKC abhängige Promotor-Aktivitäten werden in vielen Fällen durch den Transkriptionsfaktor CREB („cAMP-response-element binding protein“) transponiert. Zur näheren Analyse dieses Signalweges wurden HUH-7 Zellen mit kompetitiven Inhibitoren von pCREB kotransfiziert.

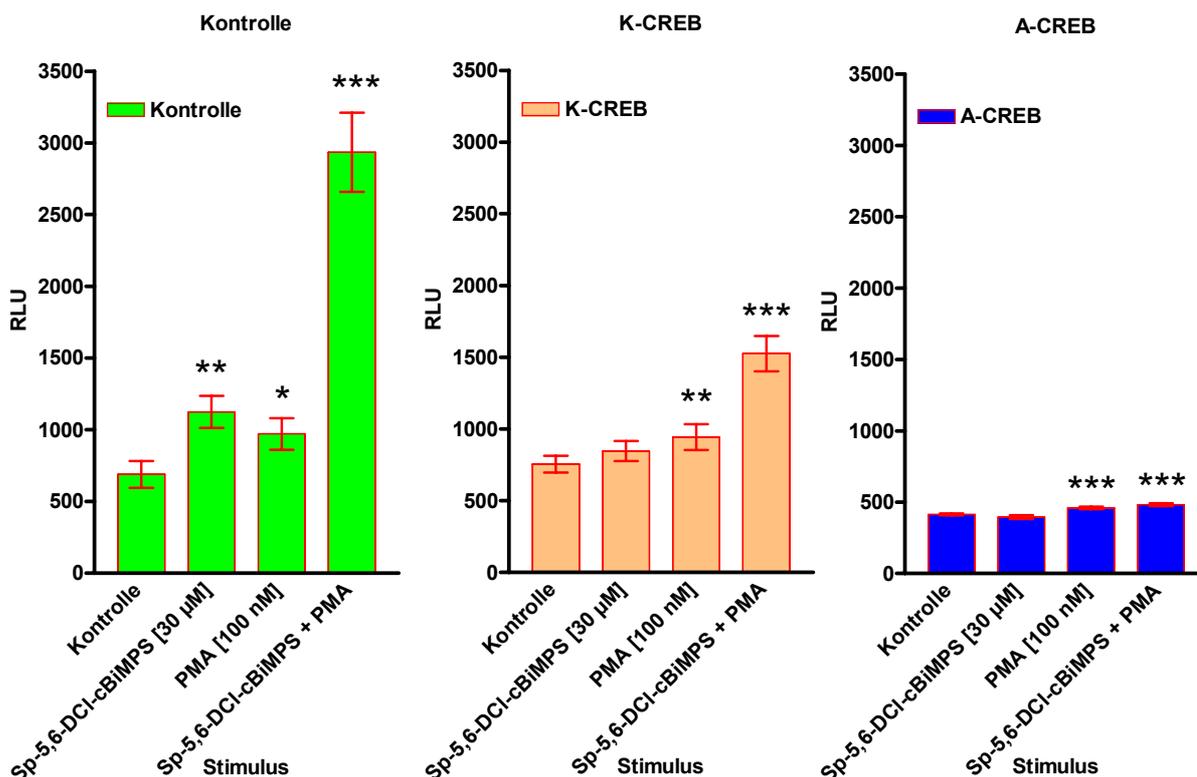


Abbildung 16: Inhibition von CREB-vermittelter Promotor-Induktion. HUH-7 Zellen wurden mit dem Reporter-Plasmid *hPER1*-luc und Plasmiden, die für K-CREB oder A-CREB kodieren, kotransfiziert. Als Kontrolle wurde mit dem Leer-Vektor pGL2-basic kotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* [30 μM], PMA [100 nM] oder beiden Substanzen stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte von n=4 Experimenten \pm SD. Die Signifikanzen, jeweils bezogen auf die Kontrolle, sind mit (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ und (***) $p < 0,001$ angegeben.

K-CREB (Killer-CREB, WALTON *et al.*, 1992) ist ein CREB-Antagonist, der die Phosphorylierung kompetitiv inhibiert. A-CREB bindet mit hoher Affinität an pCREB, verhindert die Bildung von pCREB/pCREB-Dimeren und somit die Bindung an die DNA (AHN *et al.*, 1998). A-CREB oder K-CREB wurden zusammen mit dem Reporter-Plasmid *hPER1-luc* in HUH-7 Zellen kotransfiziert. Beide Antagonisten zeigten eine Inhibition der *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* vermittelten Promotor-Aktivität (Abbildung 16). Die Aktivierung des Reporter-Konstruktes über PKA wurde dabei nicht beeinflusst (siehe PMA [100 nM]). Zusätzlich inhibierte A-CREB die basale Expression von *hPER1-luc* (vgl. Kontrollen in Abbildung 16). Die Experimente lassen darauf schließen, daß die Erhöhung der Aktivität von *hPER1-luc* durch die Aktivierung des Promotors mit pCREB vermittelt wird.

3.5 cAMP-responsive Elemente in *hPER1-luc*

Nachdem ermittelt worden war, daß die spezifische Aktivierung des Reporters *hPER1-luc* unter anderem über den Transkriptionsfaktor CREB stattfinden kann, sollten weitere Experimente zeigen, ob cAMP-responsive Sequenzen auf der Promotor-Sequenz lokalisiert werden können. Wie bereits in der *in silico* Analyse erwähnt (3.1.2), konnten innerhalb des Promotor-Bereichs von *hPER1* insgesamt 23 Elemente detektiert werden, die mindestens zu 85% mit der Konsensus-Sequenz des CRE-Elements (TGACGTCA) übereinstimmten. Zur experimentellen Überprüfung der Relevanz eines der CRE-Elemente wurde die Sequenz TGACGTCTG von Position 2409-2416 innerhalb von *hPER1-luc* mit dem Enzym *AatII* enzymatisch gespalten (2.2.2). Die überhängenden Basen wurden enzymatisch deletiert und das Konstrukt anschließend wieder religiert, so daß vier Basen aus dem zentralen Bereich des Promotor-Elements fehlten. Im Vergleich zu *hPER1-luc* (5'-TGACGTCTG-3') wurde so die putative CREB-Bindungssequenz auf 5'-TG----CG-3' verkürzt. Dieses um die CRE-Konsensus-Sequenz deletierte Reporter-Plasmid wird nachfolgend als Δ CRE-*hPER1-luc* benannt. Die Plasmid DNAs von *hPER1-luc*, Δ CRE-*hPER1-luc* und pGL2-basic wurden parallel isoliert (2.2.1.2), transient in HUH-7 Zellen transfiziert (2.4.2.4), in 96-Well-Format ausplattiert und mit *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* (100 μ M), PMA (300 nM) oder beiden Substanzen stimuliert (2.4.3) (Abbildung 17).

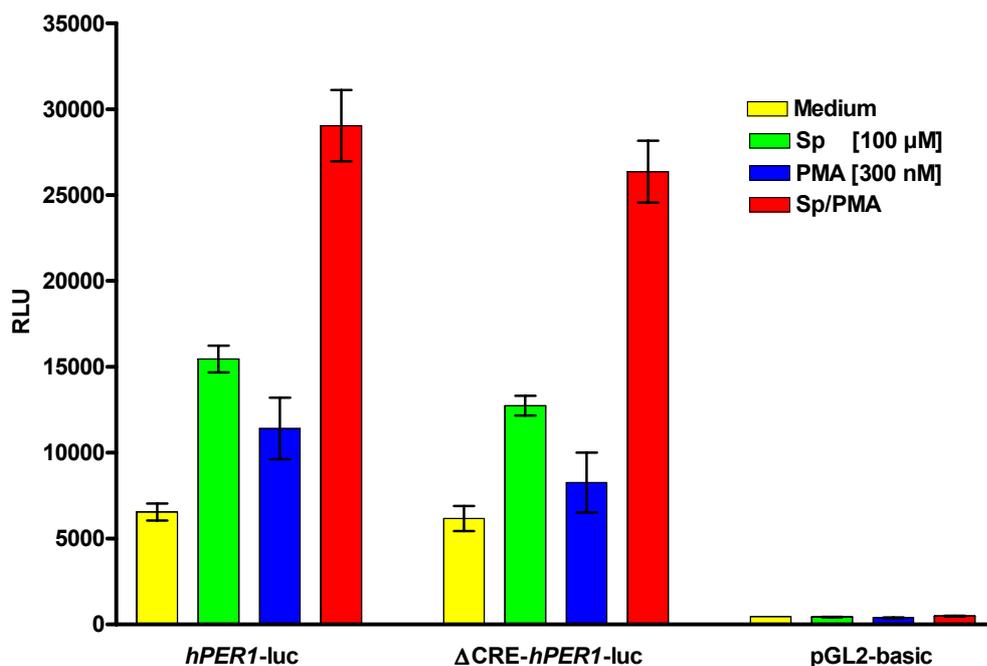


Abbildung 17: Bestimmung der Promotor-Aktivität von Δ CRE-*hPER1-luc*. HUH-7 Zellen wurden mit den unten angegebenen Plasmiden transfiziert und mit *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS (*Sp*) (100 μ M), PMA (300 nM) oder mit beiden Agentien stimuliert. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von n=6 Experimenten +/- SD.

Abbildung 17 zeigt, daß die Aktivitäten von *hPER1-luc* und Δ CRE-*hPER1-luc* nahezu identisch sind. Die leicht geringeren Werte des Deletions-Reporters können auch auf eine geringere Transfektionseffizienz zurückzuführen sein, die durch Variabilität der DNA-Konzentrationsbestimmung oder Isolationsbedingungen abweichen kann. Der direkte Vergleich von *hPER1* und Δ CRE-*hPER1-luc* zeigt, daß das putative CRE-Element mit der höchsten Homologie zur Konsensus-Sequenz nicht oder nur in sehr geringem Maße für die Aktivierung des Reporters verantwortlich ist.

3.6 Aktivierung von *hPER1* durch „second messengers“

Weitere Untersuchungen des Signaltransduktionsweges wurden mit Hilfe von Western Blots durchgeführt (siehe 2.5). Sowohl PKA als auch PKC vermittelte Signaltransduktion kann zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führen. Die drei verwendeten Zelllinien wurden für 1 h mit *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS (100 μ M), PMA (30 nM) oder beiden Stimulatoren inkubiert, in Elektrophoresepuffer lysiert (2.5.1) und auf denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt (2.5.2). Immunologisch wurden spezifisch das an Serin 133 phosphorylierte cAMP Responsiv-Element Binde-Protein (CREB) als auch die phosphorylierte Form der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase p42/44 (MAPK) nachgewiesen. Als Kontrollen für die gleichmäßige Beladung des Gels wurden

Antikörper für die nicht-phosphorylierten Formen der „second messenger“ verwendet (Abbildung 18).

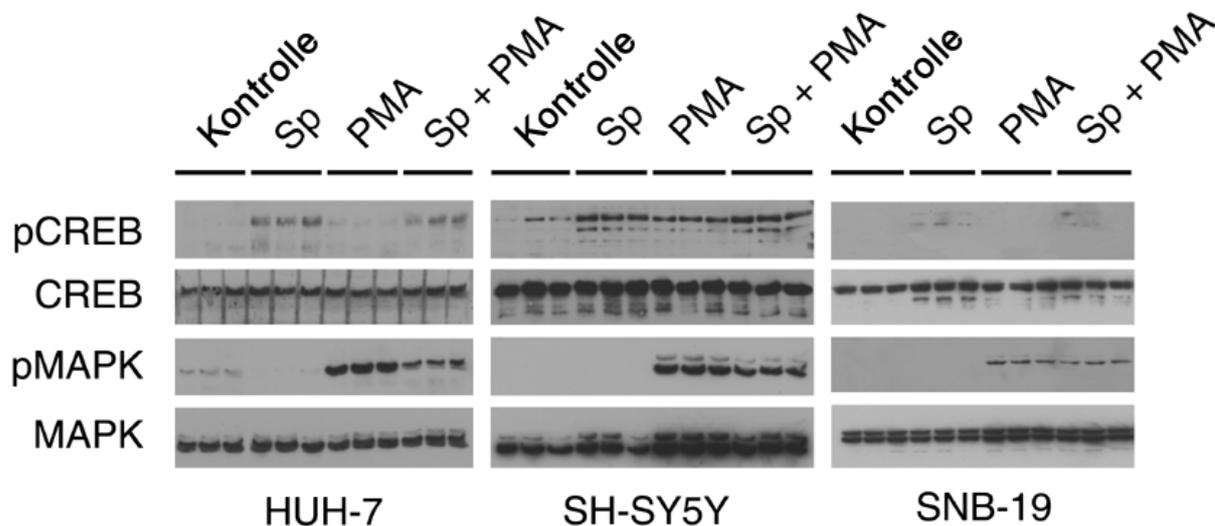


Abbildung 18: Western Blot Analyse mit phosphospezifischen Antikörpern für pCREB und pMAPK. Die jeweils unter der Abbildung angegebenen Zelllinien wurden für 1 h mit den oben gezeigten Agentien stimuliert. Die Induktion der MAPK (pMAPK) und CREB (pCREB) wurde durch phosphospezifische Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle wurden Antikörper für die nicht-phosphorylierten Formen verwendet. Wie die horizontalen Balken über der Abbildung zeigen, wurden die Experimente in Triplika durchgeführt. Sp: *Sp-5,6-DCI-cBiMPS*.

In HUH-7 Zellen induzierte eine Stimulation mit *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* die Phosphorylierung von CREB. PMA zeigte, wie erwartet, keine signifikante Erhöhung von pCREB. Bei Kostimulation mit PKA- und PKC-induzierenden Agentien konnte, im Vergleich zu *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* alleine, ein ähnliches oder sogar geringeres Maß an Phosphorylierung von CREB festgestellt werden. Wie erwartet zeigte die Stimulation von HUH-7 Zellen mit PMA eine Erhöhung der pMAPK 42/44-Konzentration. Überraschenderweise verringerte sich die Menge von pMAPK 42/44 bei Kostimulation mit *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* und PMA. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Aktivierung der PKA die Aktivierung der MAPK p42/44 durch PMA inhibiert. Im Gegensatz zur Amplifikation des Reporter-Signals (vgl. Abbildung 14) zeigt sich immunbiochemisch, daß die Aktivierung der MAPK höchstwahrscheinlich nicht für die Erhöhung der Genexpression verantwortlich ist. In SH-SY5Y Zellen zeigten die Analysen der Phosphorylierung von CREB und MAPK ähnliche Ergebnisse. Wie in HUH-7 führte die Induktion der PKA zur Bildung von pCREB und die Stimulation der PKC zur Phosphorylierung der MAPK. Zusätzlich führte PMA auch zu einer Aktivierung von CREB, die sowohl in HUH-7 als auch in SNB-19 nicht detektiert werden konnte (Abbildung 18: SH-SY5Y; PMA; pCREB). In SNB-19 und SH-SY5Y erhöhte *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* die Bildung von pCREB. Bei Kostimulation mit den PKA- und PKC-Aktivatoren verringerte sich die Menge von pMAPK

(Abbildung 18: SH-SY5Y und SNB-19; Sp + PMA pMAPK) im Vergleich zu PMA allein.

3.7 Relative Quantifizierung der *hPER1*-Aktivierung mit dem TaqMan™

3.7.1 Stimulation und Kontrollen

Für den Nachweis der endogenen Stimulation von *hPER1* durch PKA und PKC vermittelte Signale wurde eine direkte Quantifizierung der mRNA durchgeführt. Da die Protein-Biosynthese zur Generierung des Luciferase-Reportergens nach 4 h ihr Maximum erreicht, wurde angenommen, daß die vermehrte Bildung des Transkripts von *hPER1* nach ca. 2h detektiert werden konnte.

Zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge im Vergleich von unstimulierten und stimulierten Zellen wurden HUH-7 Wildtyp-Zellen wie in 2.4.3 beschrieben in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Well in einer 6-Well-Schale ausplattiert und nach 16 h mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS [100 µM] und PMA [1 µM] für 2 h stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen lysiert und Gesamt-RNA extrahiert (siehe 2.3.1). Nach der photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration (2.2.7) wurde mit Hilfe der reversen Transkription cDNA generiert (siehe 2.3.2). Für die Validierung der nachfolgenden Quantifizierungen wurden systematisch oder stichprobenartig folgende Kontrollen mitgeführt:

Experimenteller Ansatz	Kontrolle
RNA, die nicht revers transkribiert wurde:	Kontrolle für genomische Kontamination
RNA, die revers transkribiert wurde, aber nicht mit DNase verdaut worden war:	Kontrolle für RNase freie DNase
H ₂ O anstelle von cDNA:	Kontrolle für Kontamination der verwendeten Lösungen

Die relative Quantifizierung aller cDNA-Proben wurde zusätzlich parallel mit einer Sonde für die Porphobilinogen Desaminase (PBGD, vgl. CASSINAT *et al.*, 2000) durchgeführt. Das in Leberzellen exprimierte Gen diente dabei zum Abgleich der gemessenen *hPER1* Expression. Die häufig verwendete Superoxid-Dismutase (SOD) schien zur internen Standardisierung ungeeignet, da eine Stimulation mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS/PMA ebenfalls die Transkriptionsrate der SOD veränderte.

3.7.2 Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur Bestimmung des Stimulationsfaktors

Zur Berechnung des Stimulationsfaktors wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewendet (WINER *et al.*, 1999). Zur mathematischen Anwendung der Methode müssen die Effizienzen der PCR-Reaktionen der Zielsequenz- (*hPER1*) und der Referenz-Reaktion (PBGD) nahezu identisch sein. Um zu überprüfen, ob die beiden Amplikons eine vergleichbare Reaktionseffizienz besitzen, wurde ein Vergleich des ΔC_T bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Matrize durchgeführt. ΔC_T ist bei dieser Methode ein Maß dafür, daß unabhängig von der Konzentration der eingesetzten Matrize die Differenzen zwischen der Zielsequenz (*hPER1*) und dem endogenen Standard (PBGD) vergleichbar sind. Ist dies der Fall, kann der quantitative Vergleich ohne eine Standardreihe durchgeführt werden. Die nun folgenden Experimente wurden zur Validierung der Anwendbarkeit der Methode durchgeführt. Generierte cDNA (siehe 2.3.2) von HUH-7 Zellen wurde, ausgehend von 1 ng RNA-Äquivalentmenge, in 5 Verdünnungen jeweils 1:2 für die *TaqMan* Analyse eingesetzt. Anschließend wurden die Transkriptmengen aller Verdünnungen mit Oligonukleotiden und Sonden (2.1.2) für *hPER1* und PBGD durch *TaqMan* Analysen bestimmt (Abbildung 19).

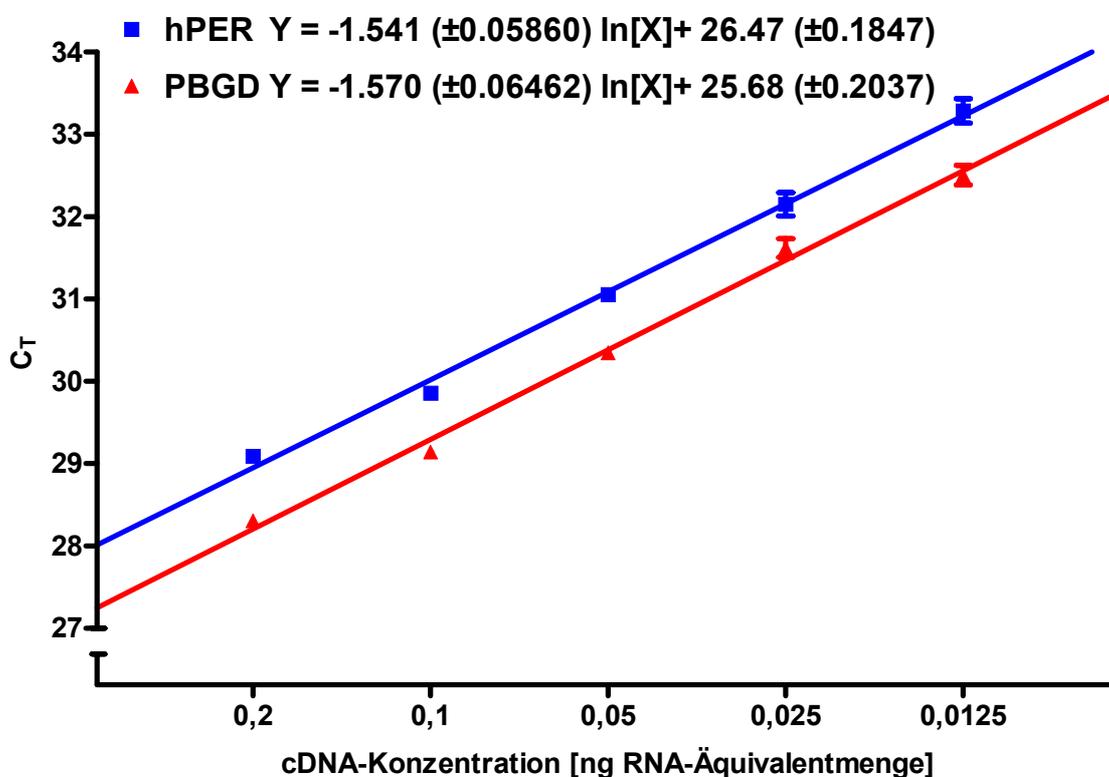


Abbildung 19: Relative Effizienz der Reaktionen von *hPER1* und PBGD. Die Grafik zeigt die Quantifizierung der Amplifikation von *hPER1* und PBGD (C_T) in logarithmischer Abhängigkeit der Konzentration der eingesetzten cDNA. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus Duplikaten. Die Steigung der Durchschnittsgeraden wurde mit Graph-Pad bestimmt.

Abbildung 19 zeigt eine repräsentative Verdünnungsreihe der cDNA aus HUH-7. Der C_T -Wert ist dabei der vergleichende Schwellenwert der Amplifikation, zu dessen Zeitpunkt der lineare Bereich der jeweiligen PCR beginnt. Die Steigung der Regressionsgeraden ist proportional der Effizienz der jeweiligen Reaktion. Die Differenz der Regressionen ist ein direktes Maß zum Vergleich der PCR-Reaktionen und sollte unterhalb von $0,1 \ln(x)$ liegen.

Zur Validierung wurden aus 3 Stimulationsexperimenten je 2 Verdünnungsreihen (10 ng – 312,5 pg) gemessen und die Steigung der ΔC_T -Geraden bestimmt. Die Standardabweichung entspricht der Standardabweichung der 6 Meßreihen.

$$\text{Steigung} = 0,085 \pm 0,0265$$

Da die Effizienzen der Reaktionen vergleichbar sind, konnte der Stimulationsfaktor mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet werden.

Zur Bestimmung der Aktivierung der Expression von endogenem *hPER1* wurden HUH-7 Zellen mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS [100 μM] / PMA [1 μM] für 2 h stimuliert, cDNA generiert und vergleichend mit dem „housekeeping“-Gen PBGD im TaqMan quantifiziert.

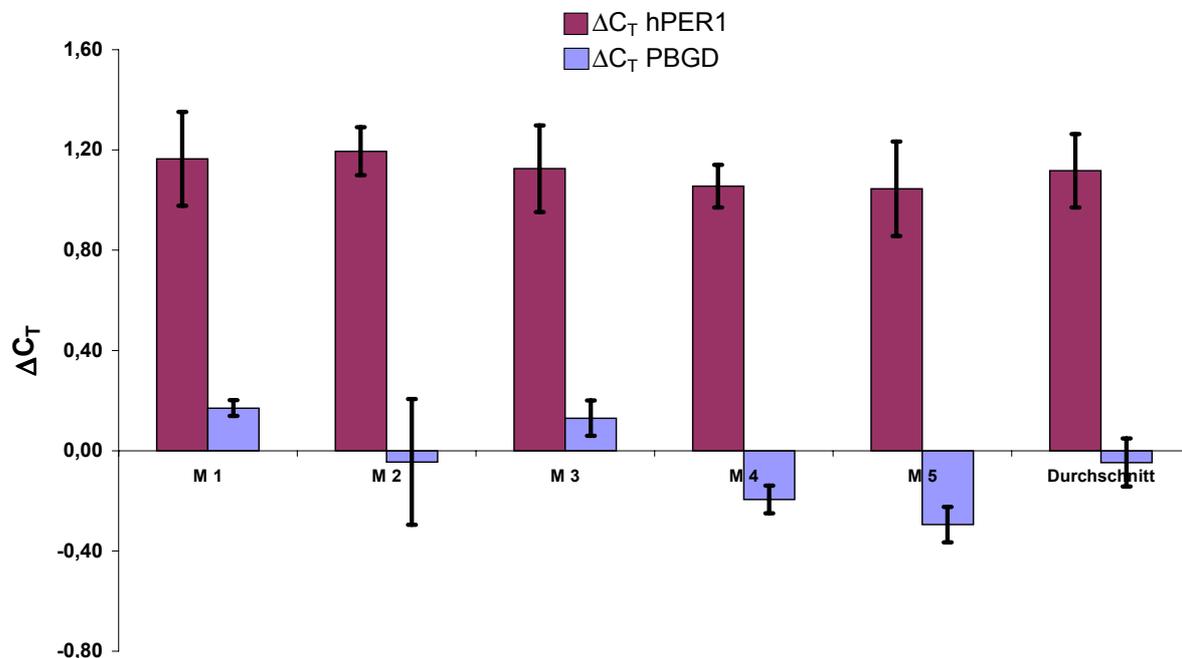


Abbildung 20: Relative Quantifizierung der endogenen *hPER1* Expression. Gezeigt ist die Fluoreszenzänderung am Schwellenwert der PCR-Reaktion (ΔC_T) von *hPER1* (rot) und PBGD (blau). M1 bis M5 sind die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten +/- SD. Der Durchschnitt der ermittelten Stimulationen ist rechts gezeigt.

Für die Bestimmung der ΔC_T -Werte wurde die Differenz aus den stimulierten und den nicht-stimulierten Zellen gebildet, d.h:

$$\Delta C_{T(hPER1)} = C_{T(hPER1 \text{ nicht stimuliert})} - C_{T(hPER1 \text{ stimuliert})} \text{ und}$$

$$\Delta C_{T(hPBGD)} = C_{T(PBGD \text{ nicht stimuliert})} - C_{T(PBGD \text{ stimuliert})}$$

Nach der beschriebenen Methode wäre ΔC_T :

$$\Delta C_{T(hPER1 \text{ stimuliert})} = C_{T(hPER1 \text{ stimuliert})} - C_{T(PBGD \text{ stimuliert})} \text{ und}$$

$$\Delta C_{T(hPER1 \text{ nicht stimuliert})} = C_{T(hPER1 \text{ nicht stimuliert})} - C_{T(PBGD \text{ nicht stimuliert})}$$

Die hier verwendete Bildung der Differenzen ist keine Normalisierung des untersuchten Gens in bezug auf ein „housekeeping“-Gen. Die resultierenden Daten (Abbildung 20) zeigen im Gegensatz zur etablierten Berechnung, inwieweit das untersuchte Gen reguliert wird (Differenz zu Null) und ob das sogenannte „housekeeping“-Gen tatsächlich die gewünschten Eigenschaften besitzt, d.h. die Expression aufgrund des Stimulus nicht zu verändern (vgl. WARRINGTON *et al.*, 2000). Wie die Abbildung 20 zeigt, erhöht sich die Expression von *hPER1* in HUH-7 Zellen nach der Stimulation mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS/PMA, während die RNA-Konzentration von PBGD konstant bleibt.

Die Bildung von $\Delta\Delta C_T$ erfolgt hier nach:

$$\Delta\Delta C_{T(hPER1)} = \Delta C_{T(hPER1 \text{ stimuliert})} - \Delta C_{T(PBGD \text{ stimuliert})}$$

und ist identisch mit dem $\Delta\Delta C_T$ nach WINER *et al.*, 1999. Da pro Zyklus der PCR-Reaktion im idealen Fall die doppelte Menge an Produkt entstehen sollte, ergibt sich der Stimulationsfaktor aus:

$$\text{Stimulationsfaktor} = 2^{\Delta\Delta C_T}$$

Abbildung 21 zeigt, daß die endogene Expression von *hPER1* nach der Gabe von Sp-5,6-DCI-cBiMPS /PMA mehr als verdoppelt wird. Dabei konnte nach Abgleich mit dem internen Standard PBGD eine Stimulation von 2,25 +/- 0,245 bestimmt werden. Das Ergebnis zeigt, daß die in 3.3.2 gezeigten Reporter-gen-Experimente wahrscheinlich die Stimulation des endogenen *hPER1*-Promotors in HUH-7 Zellen widerspiegeln.

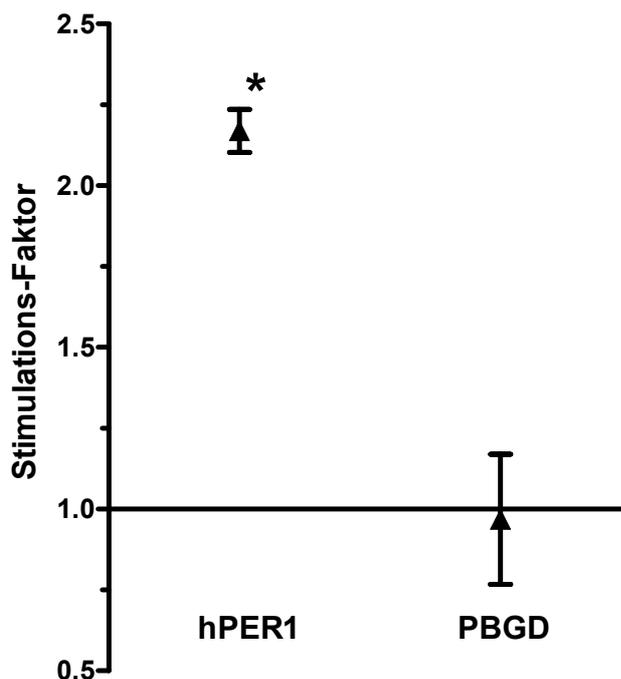


Abbildung 21: Endogene Erhöhung der Transkription von *hPER1* in HUH-7 Zellen. Die Abbildung zeigt die mit der $\Delta\Delta C_T$ Methode ermittelte Stimulation von HUH-7 Zellen nach zweistündiger Inkubation mit *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS [100 μ M] / PMA [1 μ M]. *hPER1*: mRNA des humanen PER1-Gens; PBGD: mRNA der Porphobilinogen Desaminase. Gezeigt sind die Mittelwerte aus $n=5$ unabhängigen Experimenten \pm SD. Die Signifikanz (*) wurde durch t-Test mit Welch's Korrektur bestimmt ($p < 0.001$).

3.8 Aktivierung von *hPER1* durch „first messengers“

3.8.1 Etablierung stabiler Zelllinien

Für die Detektion von Peptiden, die zur Erhöhung oder Verringerung der *hPER*-luc Aktivität führen, wurde eine bovine Peptidbank verwendet (vgl. SCHULZ-KNAPPE *et al.*, 1997, SEILER *et al.*, 1999). Für die durchzuführenden Hoch-Durchsatz Experimente, die hohe Validität und Reproduzierbarkeit voraussetzen, wurden stabile Zelllinien etabliert (2.4.2.5). Die Selektion transfizierter Zellen wurde nach verschiedenen Kriterien durchgeführt. Als wichtigstes Merkmal der Zellen wurde die stabile Integration des Reporter-Konstruktes kontrolliert. Dazu wurden, wie in 2.4.2.5. beschrieben, Einzelklone selektiert, die sowohl eine intrinsische Luciferase-Basalaktivität als auch eine Aktivierbarkeit mit *Sp*-5,6-DCI-cBiMPS/PMA zeigten. Als weiteres Kriterium wurde ermittelt, ob die konzentrationsabhängige Stimulation mit den in 3.3.2 verwendeten PKA und PKC Induktoren mit den Ergebnissen der transient transfizierten Zellen vergleichbar waren. Durch die statistische Integration des Konstruktes in das Genom der Zellen könnte der *hPER1*-Promotor durch lokale Enhancer-Elemente beeinflusst werden, so daß die Stimulation auch intrinsischen

Effekten unterliegen würde. Solche möglichen Fehlerquellen sollten durch den Vergleich mit den Ergebnissen der transienten Transfektion minimiert werden. Als letztes Kriterium wurde die Stabilität der Integration überprüft, indem gezeigt wurde, daß nach einem Einfrier/Auftau-Zyklus und weiteren drei Passagen die konzentrationsabhängige Aktivierung von *hPER1-luc* vergleichbar war. Für die Zelllinien HUH-7 und SH-SY5Y wurden jeweils zwei Klone selektioniert, die diesen Kriterien entsprachen. Für die humane Hepatoma Zelllinie HUH-7 wurden diese Klone als ‚Susi‘ und ‚Stolch‘, und für SH-SY5Y als ‚Harry‘ und ‚Sally‘ benannt. Alle Experimente, die mit den selektierten Einzelklonen durchgeführt wurden, sind mit ‚Susi‘ (HUH-7 *hPER1-luc*) und ‚Harry‘ (SH-SY5Y-*hPER1-luc*) durchgeführt worden.

3.8.2 „Screening“ einer bovinen Augen-Peptidbank

Für das primäre „Screening“ wurde eine bovine Peptidbank verwendet, die aus 1,73 kg Rinderaugen etabliert worden war (zur Verfügung gestellt von Dr. L. Ständker, präpariert von R. Kopittke und D. Zoch) (Abbildung 22).

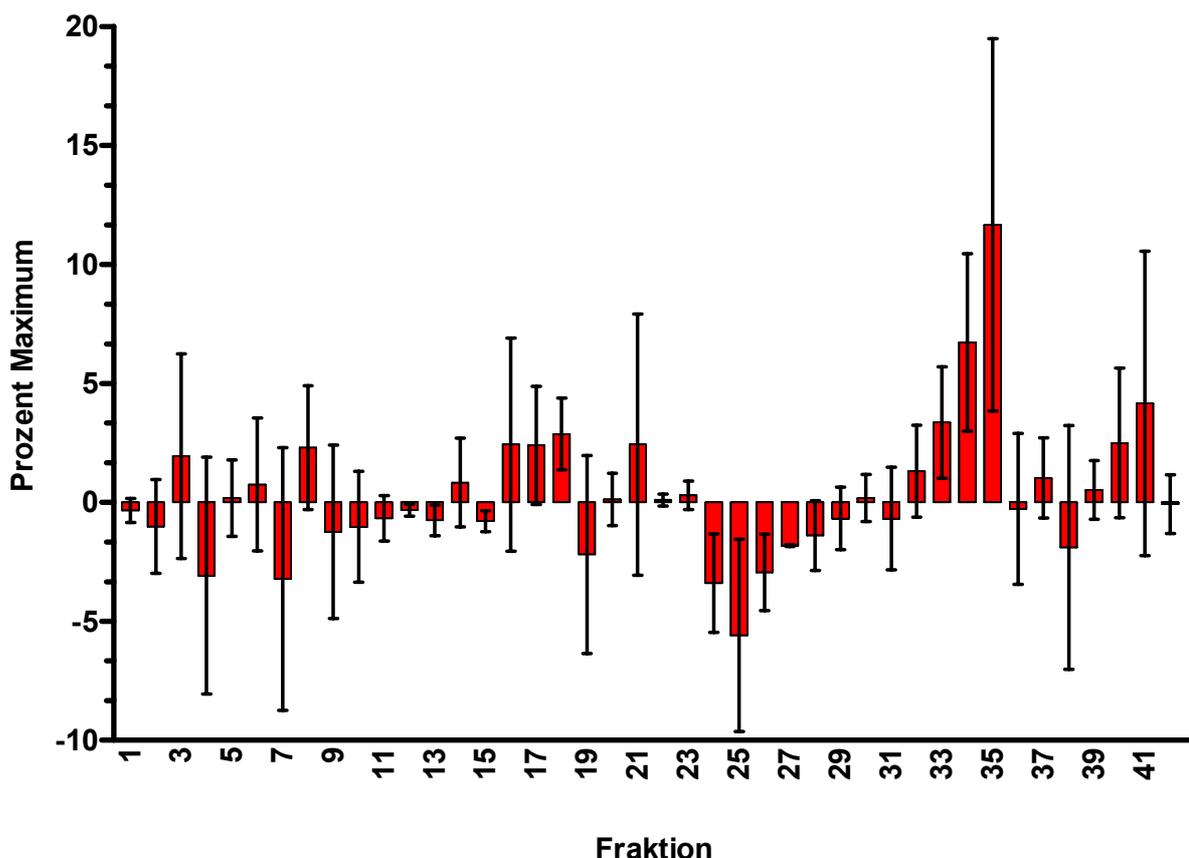


Abbildung 22: „Screening“ von ‚Susi‘ mit einer bovinen Augen-Peptidbank. Stabil transfizierte HUH-7 *hPER1-luc* Zellen (‚Susi‘) wurden in 96-Well Platten mit 500 mg Rinderaugen-Gewebe-Äquivalent für 4 h inkubiert. Die Darstellung zeigt die relative Reporter-gen-Aktivität der einzelnen Fraktionen, bezogen auf die Stimulation von *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* [100 µM]/PMA [1 µM] = 100%. Die Balken entsprechen den Mittelwerten aus n=3 unabhängigen Experimenten +/- SD.

Die gesamte Peptidbank umfaßte nach der Extraktion der Peptide und der reversen Phase-Chromatographie 42 Fraktionen. Je 500 mg Gewebe-Äquivalentmenge jeder Fraktion wurden in Kulturmedium gelöst und im Reporter-gen-Experiment auf die Regulation von *hPER1* getestet. Abbildung 22 zeigt das Reporter-gen-Profil der stabil transfizierten HUH-7 Zellen („Susi“). Die Fraktionen 33-35 zeigen eine signifikante und reproduzierbare Aktivierbarkeit des Reporters. Ein ebenfalls durchgeführtes „Screening“ mit SH-SY5Y Zellen („Harry“) zeigte in diesen Fraktionen keine erhöhte Luciferase-Aktivität. Die Daten lassen vermuten, daß eines der Peptide innerhalb der Fraktionen 33-35 spezifisch für die Induktion von *hPER1-luc* in humanen Hepatoma- nicht aber in Neuroblastoma-Zellen ist.

Parallel zu den Experimenten mit Peptidbanken wurden auch reine Peptide auf die Induktion oder Inhibition von *hPER1-luc* getestet. Dazu wurde die LOPAP Bank bioaktiver Peptide („Library of pharmacologically active peptides“, Kat. Nr. SC0411, Sigma) verwendet (Tabelle 11).

RGDS	Guanylin	Somastotatin-14
Arg ⁸ -Vasopressin	Neurokinin B	Oxytocin
Mel-Enkephalin	Urodilatin	Leptin 22-56
BNP	Neuromedin N	Neurotensin
Neuropeptid FF	beta-Amyloid Peptid	Antiflammin-1
ACTH 1-39	alpha-CGRP	Inhibin beta 67-94
Arg ⁸ -Vasotocin	CCK-8	Dynorphin A
BNP-32	Gastrin I	Neurokinin A
Endomorphin-1	Nocistatin	PTH 1-34
PHM-27	CRF	Antiflammin-2
PACAP 1-27	beta-MSH	TRH
Substance P	Bombesin	beta-Endorphin
N-Formyl-Met-Leu-Phe	Neuromedin B	VIP
Endomorphin-2	Motilin	Sauvagin
Enterostatin	Galanin	Mastoparan
NPY	MCH	Angiotensin II
Bradykinin	Calcitonin	Leu-Enkephalin
Nociceptin (Orphanin FQ)	Urocortin	Secretin
LHRH	gamma-MSH	Valosin
GRP	Kinetensin	Peptid YY

Tabelle 11: Verwendete Peptide der Lopap-Peptid-Bank. Die angegebenen Peptide wurden mit stabil transfizierten *hPER1-luc* Zellen getestet.

Die Peptide wurden in Zellkultur-Medium gelöst in einer Konzentration von 1 μM im Reporter-gen-Assay mit ‚Susi‘ und ‚Harry‘ getestet. Die getesteten Peptide sind in Tabelle 11 aufgezeigt. Die exakten Namen der Peptide sind bei Sigma-Aldrich zu erhalten.

Keines der in Tabelle 11 aufgelisteten Peptide zeigte bei Experimenten mit ‚Susi‘ und ‚Harry‘ signifikante Stimulationen oder Inhibitionen des Reporters, d.h. keine Aktivität, die größer der doppelten Standardabweichung der Basalaktivität des Reporters war. Dabei ist zu beachten, daß die verwendeten Peptide nicht alle in ihrer idealen physiologischen Konzentration getestet wurden. Weiterhin sind mit hoher Wahrscheinlichkeit viele notwendige Rezeptoren und/oder Signaltransduktionsmediatoren innerhalb der beiden verwendeten Zelllinien nicht vorhanden. Unter diesen Voraussetzungen erscheint es daher nicht zwingend, daß die verwendeten Peptide keinen Einfluß auf die Expression von *hPER1* haben.

3.8.3 Synergistische Aktivierung von *hPER1* durch Interleukin-6 (IL-6) in HUH-7 Zellen

Interleukin-6 (IL-6), ein Peptid, das in Verbindung mit Akutphase-Responsivität steht (vgl. HIRANO *et al.*, 1990), zeigte eine konzentrationsabhängige Induktion von *hPER1-luc* in HUH-7 Zellen (Abbildung 23).

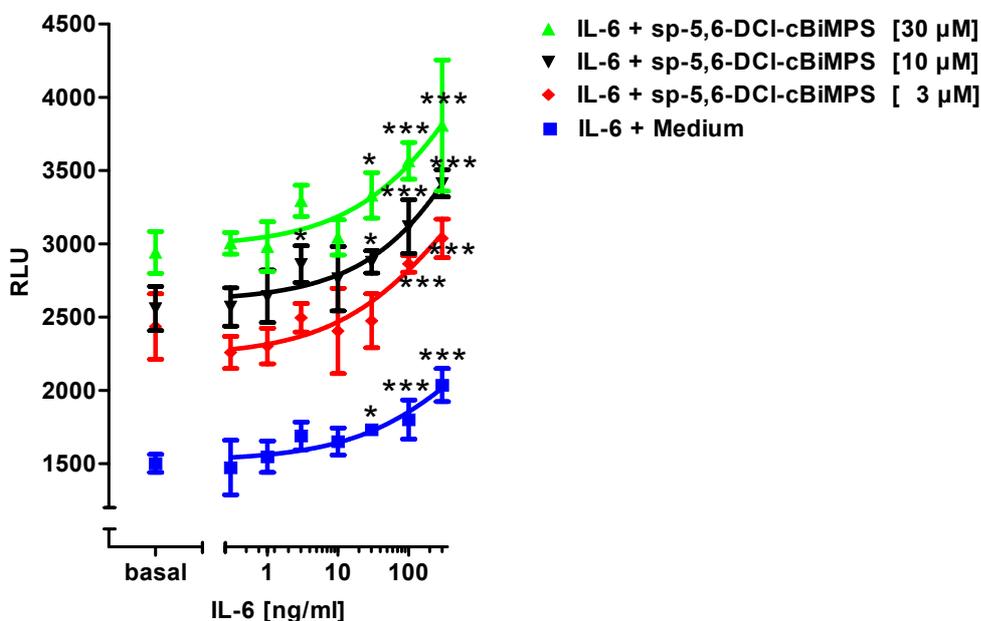


Abbildung 23: Induktion von *hPER1-luc* durch IL-6. Stabil transfizierte HUH-7 *hPER1-luc* („Susi“) wurden mit IL-6 alleine oder zusätzlich mit konstanten Mengen Sp-5,6-DCI-cBiMPS stimuliert. Die Stimulation mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS allein ist angegeben (basal). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus n=6 Experimenten. Die Signifikanzen bezogen auf die basale Aktivierung sind mit (*) $p < 0.05$ und (***) $p < 0.001$ angegeben.

Bei Kostimulation mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS in verschiedenen Konzentrationen konnte eine rein additive Erhöhung der Reporter-Responsivität festgestellt werden. Dieses zeigt sich dadurch, daß die einzelnen Kurven aufeinander abbildbar sind, wenn die Differenz der basalen Induktion mit dem PKA-Aktivator gebildet wird. Eine Sättigung des Signals konnte in physiologischen Konzentrationen nicht erreicht werden. Sowohl SNB-19 als auch SH-SY5Y und JEG-3 Zellen zeigten keine IL-6 vermittelte Aktivierung des Promotor-Konstruktes (nicht gezeigt).

3.8.4 Aktivierung von *hPER1* durch VIP und PACAP in JEG-3 Zellen

Choriocarcinoma-Zellen (JEG-3) wurden mit verschiedenen biologisch aktiven Substanzen stimuliert (Estradiol, Parathyroid Hormon, Tumor Nekrose Faktor α und Insulin). Während diese Stoffe keine stimulatorischen oder inhibitorischen Effekte aufwiesen, zeigten die Peptide „Pituitary adenylate cyclase activating peptide“ (PACAP) und „Vasoactive intestinal peptide“ (VIP) eine konzentrationsabhängige Aktivierung von *hPER1-luc* (Abbildung 24).

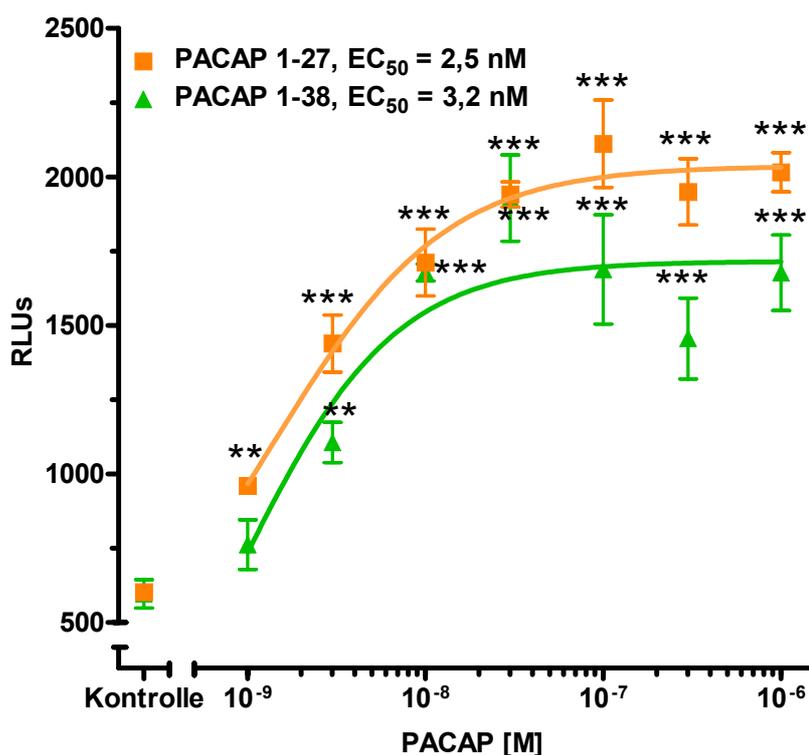


Abbildung 24: Aktivierung von *hPER1-luc* durch PACAP in JEG-3 Zellen. JEG-3 Zellen wurden im 24-Well Format mit *hPER1-luc* transient transfiziert und für 4 h mit PACAP 1-38 oder PACAP 1-27 inkubiert. Gezeigt ist die Induktion des Reportergens von n=3 Experimenten +/- SD. Die angegebenen Signalkurven und EC₅₀-Werte wurden mit Graph Pad berechnet. Die Signifikanzen sind mit (**) p < 0.01 und (***) p < 0.001 angegeben.

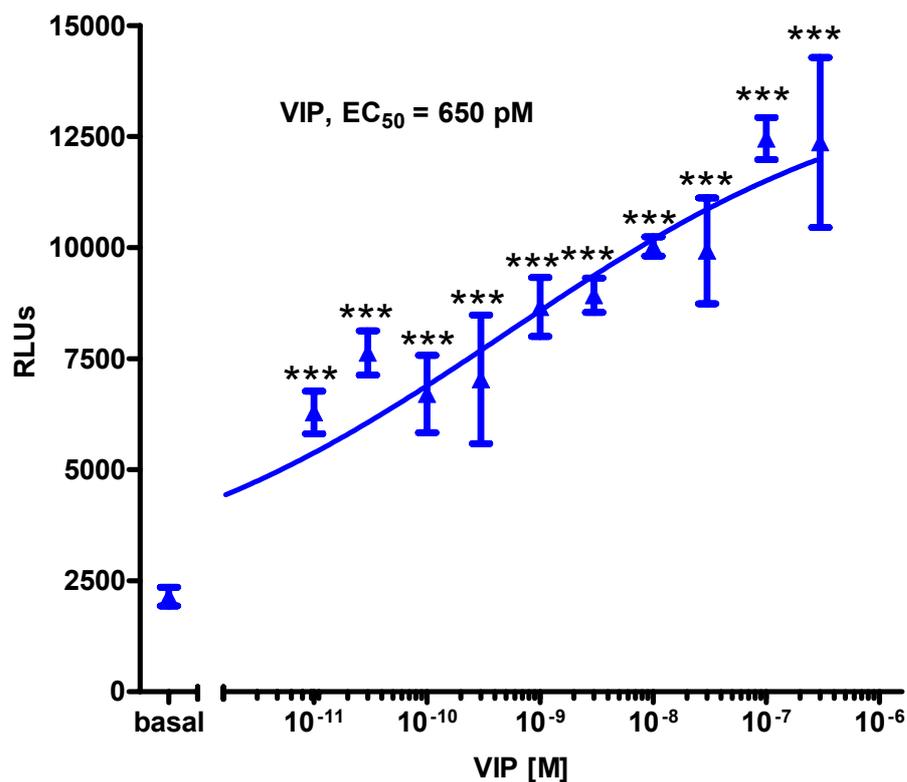


Abbildung 25: Aktivierung von *hPER1-luc* durch VIP in JEG-3 Zellen. JEG-3 Zellen wurden im 24-Well-Format mit *hPER1-luc* transient transfiziert und für 4 h mit ansteigenden Konzentrationen VIP stimuliert. Die Abbildung zeigt die bis zu fünffache Induktion des Reportergens von n=3 Experimenten +/- SD. Die angegebene Signalkurve und der EC₅₀-Wert wurden mit Graph Pad berechnet. Die Signifikanz ist mit (***) p < 0.001 angegeben.

Dabei konnte mit den beiden Isoformen von PACAP (PACAP 1-27 und PACAP 1-38) in Konzentrationen von 100 nM eine 3 bis 4-fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität erreicht werden. Mit VIP konnte eine 4 bis 5-fache Aktivierung des Reporters gemessen werden, die konzentrationsabhängig abfällt (Abbildung 25). Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt dabei einen fast linearen Verlauf im Gegensatz zu der Responsivität mit PACAP (vgl. Abbildung 24). Dieses könnte darauf hindeuten, daß noch nicht bekannte Rezeptoren oder mehrere Rezeptoren gleichzeitig das Signal von VIP an den Reporter vermitteln. Der korrespondierende EC₅₀-Wert liegt mit ca. 650 pM um einen Faktor 5 höher als der von PACAP.

3.9 Ca²⁺-Messungen mit dem FLIPR™

Für VIP und PACAP sind drei verschiedene Rezeptortypen und zusätzlich mehrere Spleiß-Varianten bekannt, die trotz teilweise gleicher Affinität an verschiedene Signaltransduktionswege koppeln (vgl. Tabelle 1). Zur Bestimmung des Signaltransduktionsweges von VIP und PACAP wurden Ca²⁺-Messungen vorgenommen. Die auf Fluoreszenzänderung basierende Meßmethode kann Änderungen der freien Ca²⁺-

Konzentration in der Zelle (ca. 100 nM) durch Freisetzung aus zellulären Speichern oder Ca^{2+} -Einstrom durch Ionenkanäle (extrazelluläres Ca^{2+} im 1x HBSS-Puffer ca. 1,4 mM) zeitaufgelöst nachweisen (Abbildung 26).

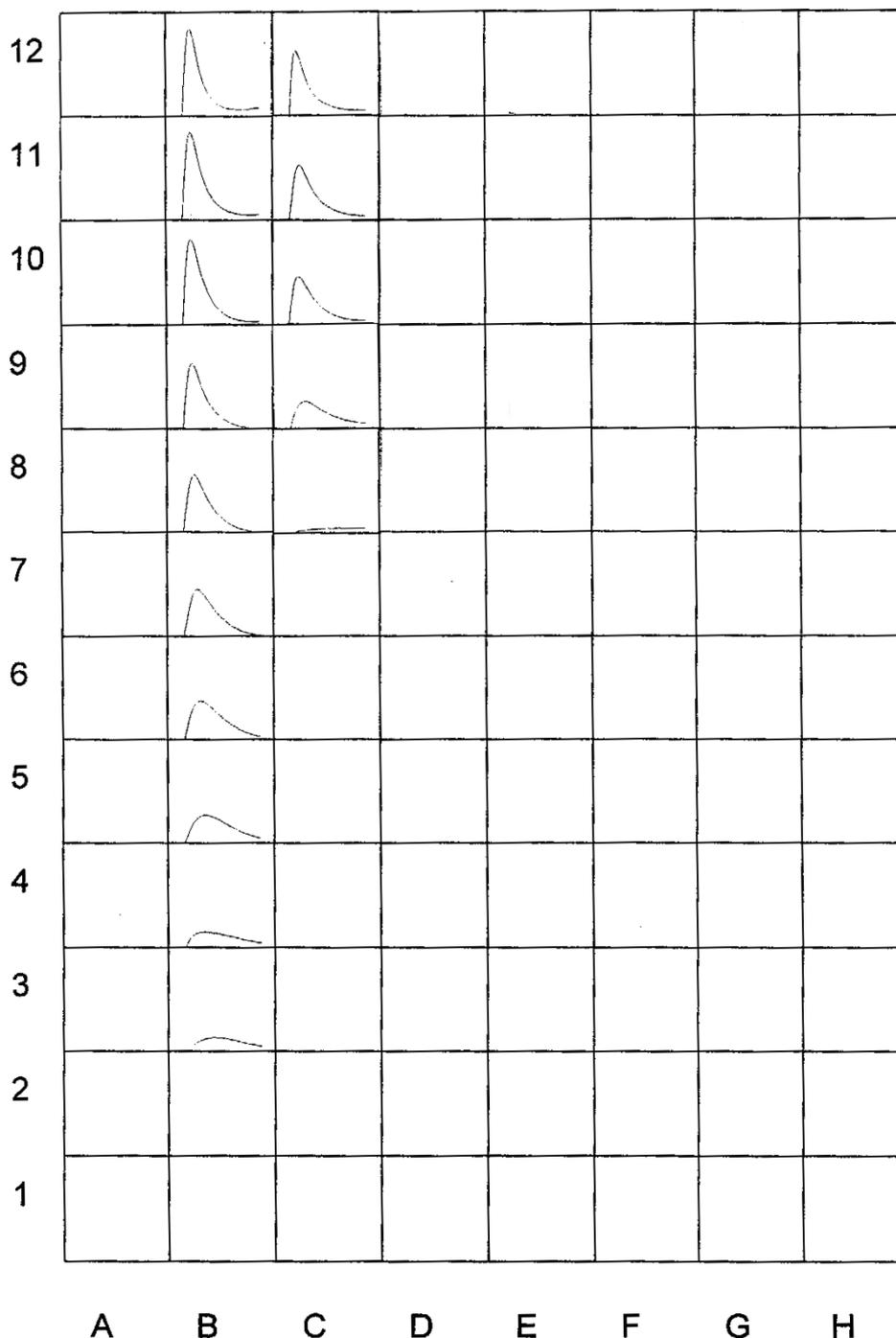


Abbildung 26: Ca^{2+} -Freisetzung in JEG-3 Zellen im FLIPR™. JEG-3 Zellen wurden in 96-Well Schalen plattiert und mit Fluo-4 beladen. Die Abbildung zeigt die zeitaufgelöste Fluoreszenz-Änderung nach der Applikation von A: HBSS-Puffer, B: Ionomycin [10 nM], C: Adenosin 5' Diphosphat [100 nM], D: VIP [100 nM], E: PACAP-27 [100 nM], F: PACAP-38 [100 nM]. Die angegebenen Konzentrationen wurden von Spalte 12 nach 1 sukzessiv halblogarithmisch, für ADP in 1:2 Schritten verdünnt. Die Abbildung zeigt die Zusammenfassung von n=2 Messungen.

Je nach Rezeptorbesatz von JEG-3 sollte nach der Gabe von VIP oder PACAP eine intrazelluläre Ca^{2+} -Änderung auftreten (vgl. VAN ESSEVELDT, 2000). Als Positivkontrolle wurden Ionomycin als unspezifischer Porenbildner und ADP, das über Purino-Rezeptoren Ca^{2+} -Freisetzung induziert, eingesetzt. Die Konzentrationsabhängigkeit der Ca^{2+} -Freisetzung von JEG-3 Zellen bei Gabe von Adenosin 5' Diphosphat (ADP) ist in Abbildung 27 vergrößert dargestellt.

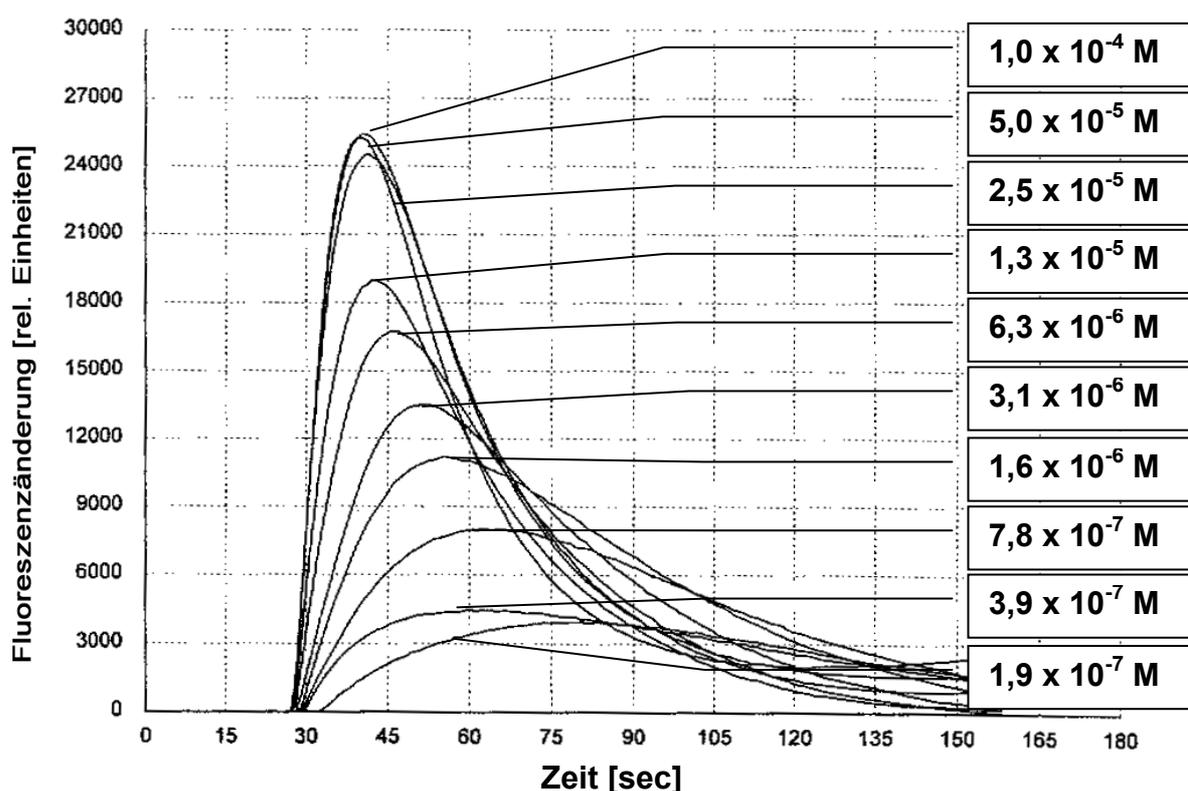


Abbildung 27: Ca^{2+} -Freisetzung in JEG-3 Zellen durch Adenosin 5' Diphosphat (ADP). Gezeigt sind die überlagerten zeitaufgelösten Fluoreszenzänderungen nach der Gabe von ADP. Die Zugabe der Substanz zu den mit Fluo-4 beladenen JEG-3 Zellen erfolgte nach $t=30 \text{ sec}$. Die korrespondierenden ADP-Konzentrationen sind rechts angegeben.

Wie die Abbildung 26 zeigt, erzeugten sowohl ADP (Abbildung 26, Spalte B, vgl. auch Abbildung 27) (10^{-4} M bis $2 \times 10^{-7} \text{ M}$) als auch Ionomycin (Abbildung 26, Spalte C) (10^{-3} M bis $1 \times 10^{-7} \text{ M}$) eine konzentrationsabhängige Ca^{2+} -Freisetzung. PACAP (1-27) (Abbildung 26, Spalte D), PACAP (1-38) (Abbildung 26, Spalte E) und VIP (Abbildung 26 Spalte F) führten dagegen zu keinerlei Veränderungen der Fluoreszenz und somit zu keiner Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration.

Die gefundenen Daten belegen, daß VIP und PACAP in JEG-3 Zellen *hPER1-luc* stimulieren können (Abbildung 24 und Abbildung 25). Die fehlende Ca^{2+} -Freisetzung zeigt, daß die Transduktion des Signals wahrscheinlich nicht durch IP_3 und PLC vermittelt wird.

4. Diskussion

4.1 Induktion von *hPER1* durch PKA und PKC

Die Beeinflussung der Phasen-Verschiebung durch cAMP-vermittelte Mechanismen im SCN wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen beschrieben (DING *et al.*, 1997; HASEGAWA und CAHILL, 1998; PROSSER und GILLETTE, 1989). In Zellkultur konnte durch Forskolin in rat-1 Fibroblasten die zirkadiane Gen-Expression von *rPer1* und *rPer2* induziert werden (YAGITA und OKAMURA, 2000). Dieser Befund wurde kurz nach den hier beschriebenen Ergebnissen publiziert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß sowohl Forskolin als auch das cAMP-Analogue *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* konzentrationsabhängig die Expression des *hPER1*-Luciferase-Konstruktes induzieren kann (Abbildung 12A/B). Sowohl cAMP als auch die regulatorische Unter-einheit der PKA sind im SCN diurnal reguliert (FERREYRA und GOLOMBEK, 2000). Ebenso kann ein kurzer Lichtpuls zu einer schnellen Induktion von pCREB im SCN führen (GINTY *et al.*, 1993). Die hier gefundenen Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Regulation des zirkadianen Rhythmus nicht nur im zentralen Schrittmacher, dem SCN, PKA-abhängigen Regulationen unterliegt. Die Aktivierung der PKA könnte auch in peripheren Organen einen wesentlichen Faktor zur Synchronisation der zirkadianen Zeit darstellen. Die Befunde in humanen HUH-7 Hepatoma-Zellen waren sehr ähnlich den Induktionen in SNB-19 Glioblastoma und SH-SY5Y Neuroblastoma Zelllinien (vgl. Abbildung 14A/B, basal). Diese Ergebnisse weisen möglicherweise darauf hin, daß viele Organe nach den gleichen Prinzipien der Signaltransduktion synchronisiert werden, nämlich über PKA. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß auch PKC-vermittelte Signalwege in die Regulation von *hPER1* involviert sind. Die Applikation des PKA-aktivierenden Agens Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) führte ebenfalls zur Induktion von *hPER1*-luc. Im SCN führt die Aktivierung der MAPK zur Mobilisierung von Ca^{2+} und zur Aktivierung von CREB (OBRIETAN *et al.*, 1999). Im Unterschied zum SCN konnte durch Ionomycin, einem Agens, das zur Porenbildung und Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels führt, keine Induktion von *hPER1*-luc erreicht werden (nicht gezeigt). Überraschenderweise hatten *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* und PMA synergistische Effekte. Dabei führte die Koapplikation der PKA- und PKC-stimulierenden Agenzien zu einer Potenzierung des Reporter-Signals (Abbildung 13). In HUH-7 Zellen wurde so eine Verachtfachung der Basalaktivität beobachtet, während die reine Addition der einzelnen Stimulantien nur eine bis zu dreifach höhere Expressionsrate erwarten ließ. Der Synergismus der beiden Stimuli läßt vermuten, daß mindestens zwei konvergente Signaltransduktionswege in die Regulation von *hPER1* involviert sind. Ebenso scheint es

wahrscheinlich, daß mehrere responsive Elemente auf die Transkription von *hPER1* wirken, wie dies auch die *in silico* Promotor-Analyse vermuten läßt (Abbildung 10).

Mit dem pharmakologischen Inhibitor *RP-8-CPT-cAMPS* (Abbildung 15) konnte die PKA-vermittelte Induktion fast vollständig inhibiert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Induktion der PKA wahrscheinlich zur Aktivierung von pCREB führt. Durch die Kotransfektion mit den pCREB-Antagonisten K-CREB und A-CREB konnte die Aktivierung des Promotors spezifisch inhibiert werden (Abbildung 16). Mit Chelerythrin, einem Inhibitor für PKC, konnte im Gegensatz dazu nur eine partielle Inhibition des synergistischen Effektes erreicht werden (Abbildung 15). In diesem Zusammenhang stehen auch die Ergebnisse der Western-Blot Analysen, nach denen sich die Aktivierung beider Signaltransduktionswege nicht synergistisch auf die Menge des gebildeten pCREB und sogar negativ auf die Menge der produzierten pMAPK auswirkt (Abbildung 18). Diese Befunde implizieren, daß Signale über PKA und pCREB wesentlich auf die Transkription von *hPER1* einwirken. Im Gegensatz dazu sind neben der PKC-induzierten Aktivierung möglicherweise noch weitere Mechanismen für die Genregulation von *hPER1* verantwortlich, die unabhängig von MAPK-vermittelten Signalwegen differentielle Promotor-Aktivität vermitteln. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse in HUH-7 Zellen ist in Abbildung 28 dargestellt. Die Voraussetzung für ein mechanistisches Prinzip der Aktivierung von *hPER1* in peripheren Geweben ist nur dann gegeben, wenn Zelltypen aus unterschiedlichen Geweben in ähnlicher Weise auf Stimulation reagieren. Glioblastom- (SNB-19) und Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) zeigten mit PKA und PKC vermittelter Induktion die gleiche synergistische Aktivierung des Reporter-Konstruktes (Abbildung 14A/B). Im Gegensatz zur Dosis-Wirkung in HUH-7 Zellen konnte jedoch innerhalb der physiologisch wirksamen Konzentrationen der Substanzen kein Plateau erreicht werden. Somit zeigen unterschiedliche Zelltypen rein qualitativ (d.h. in der Potenzierung der Stimuli) ähnliche Responsivität, während quantitativ (d.h. in der Dosis-Wirkung der Stimulatoren) markante Unterschiede festzustellen sind. Dies könnte darauf hindeuten, daß zirkulierende Faktoren zur Weitergabe der „zentralen Zeit“ im SCN die gleichen Signaltransduktionswege nutzen, diese aber unterschiedlichen Feinregulationen in Abhängigkeit vom Zelltyp unterliegen. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die „clock-controlled-genes“ im SCN im Vergleich zur Rhythmizität peripherer Organe eine identische Phasenlänge haben, jedoch phasenverschoben reguliert sein können (YAMAZAKI *et al.*, 2000).

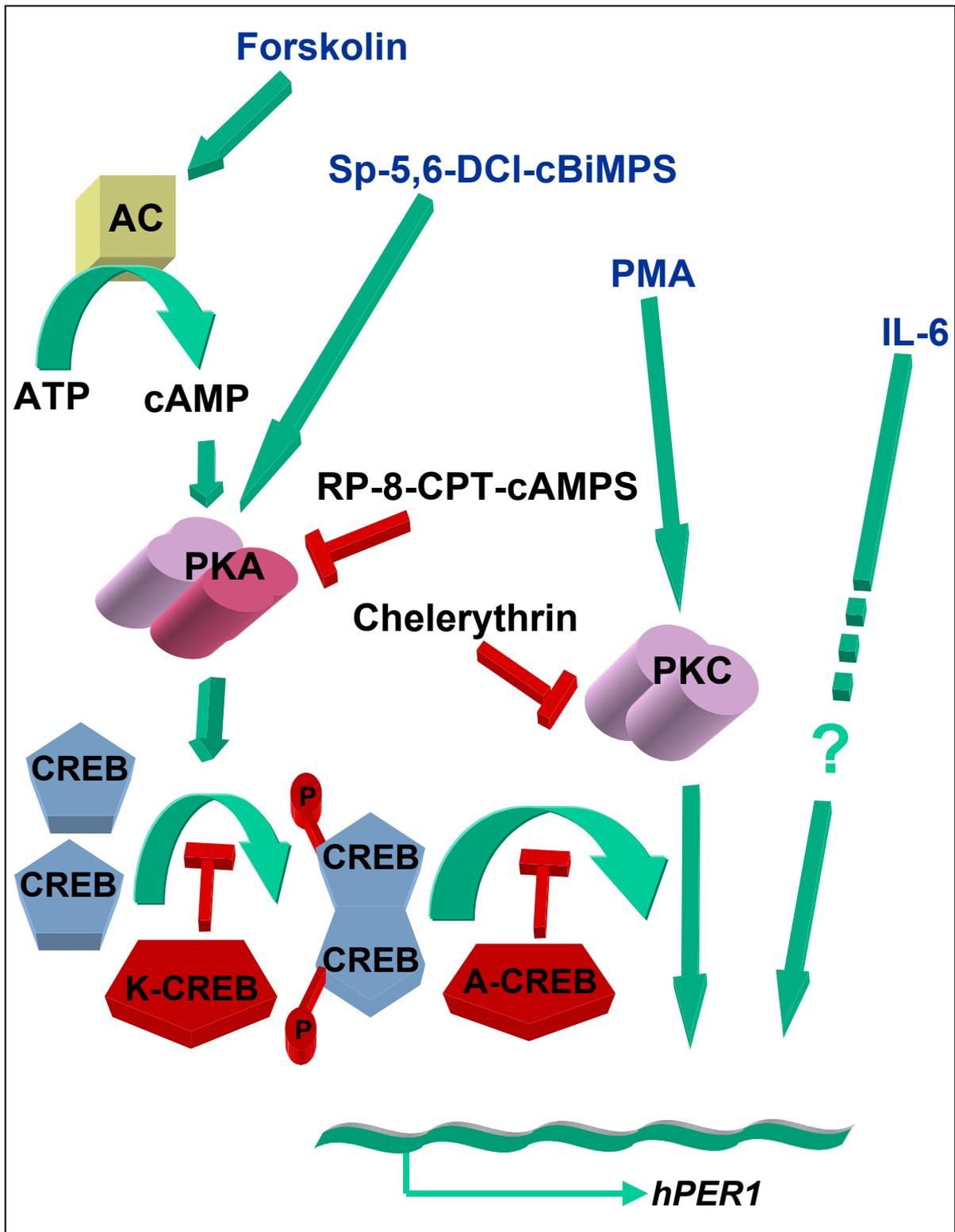


Abbildung 28: Induktion der Expression von *hPER1* in HUH-7 Zellen. Verschiedene Mediatoren (blau) induzieren die Expression von *hPER1*-luc (grüne Pfeile). Die Induktion der PKA mit Forskolin oder Sp-5,6-DCI-cBiMPS konnte mit RP-8-CPT-cAMPS gehemmt werden (rot). Die signalvermittelte Transduktion über den Transkriptionsfaktor pCREB konnte mit den Antagonisten K-CREB und A-CREB inhibiert werden (rot). Die PKC-vermittelte Induktion von *hPER1*-luc durch PMA konnte durch Chelerythrin unterbunden werden. Der „first messenger“ IL-6 induzierte eine Erhöhung des Reportergens (Signaltransduktionsweg nicht untersucht).

Für die beschriebenen Experimente wurde ein Reporter-Konstrukt verwendet, welches nicht die vollständige Promotor-Region von *hPER1* umfaßt. Durch das Vorhandensein weiterer regulatorischer Elemente, sowohl 5' als auch in 3'-intronischen Sequenzen der gewählten Sequenz, könnte sich die intrinsische Expression von *hPER1* von den Ergebnissen der Reporter-Gen-Experimente unterscheiden. Zur Validierung der endogenen Stimulation von *hPER1* wurde daher die Induktion der mRNA in HUH-7 Zellen durch quantitative RT-PCR nachgewiesen (3.7). Die gewählte Analyse-Methode ermöglicht eine sehr genaue und reproduzierbare Möglichkeit der Quantifizierung kleinster Transkriptmengen. Die 2,25-fache Expression von *hPER1* nach Stimulation mit Sp-5,6-DCI-cBiMPS/PMA zeigt, daß die Ergebnisse des Reporter-Systems die endogene Stimulation des Gens widerspiegeln (Abbildung 21).

Die Lokalisation eines cAMP-responsiven Elementes auf dem Promotor von *hPER1-luc* war nicht erfolgreich (Abbildung 17). Bei der durchgeführten Deletionsstudie eines putativen CRE-Elementes im Intron 1 konnte, im Vergleich zum Wildtyp, keine Veränderung der Promotor-Aktivierbarkeit festgestellt werden (Abbildung 17). Viele Arbeiten zeigen, daß auch Varianten der palindromen Konsensus-Sequenz für die Aktivierung der Transkription durch pCREB verantwortlich sein können (vgl. SHAYWITZ und GREENBERG, 1999). Ebenso sind Beispiele bekannt, bei denen pCREB an das gleiche DNA-Motiv bindet wie der Transkriptionsfaktor C/EBP-beta (ROESLER, 2000). Die in dieser Arbeit untersuchte CRE-Konsensus-Sequenz scheint nicht oder nur in sehr geringem Maße für die PKA-vermittelte Aktivierung des Promotors verantwortlich zu sein. Dieses Ergebnis ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß das gewählte Element im Intron des Gens liegt und somit nicht zur Regulation des Promotors beiträgt. Im Gegensatz dazu scheinen bei der Genexpression des *Drosophila*-Homologen *dPer1* auch intronische Sequenzen die Regulation des Gens zu beeinflussen (CHENG *et al.*, 1998). Weitere Deletions- und Mutationsstudien müssen zeigen, inwieweit eines oder mehrere Elemente für die Promotor-Aktivierung relevant sind. Ebenfalls könnte die additive Wirkung aller 23 (*in silico* detektierten) putativ responsiven CRE-Elemente zur Induktion des Promotors führen.

4.2 Induktion von *hPER1* durch IL-6 in HUH-7 Zellen

Die bisher diskutierten Befunde beschreiben Signaltransduktionswege, die bei der Übermittlung eines extrazellulären Signals zur Aktivierung von *hPER1* und damit möglicherweise zur Synchronisation der zirkadianen Zeit von SCN und peripheren Organen führen können. Zur Identifikation eines zirkulierenden Faktors wurde eine Peptidbank aus bovinen Augen auf die Induktion des Reporter-Konstruktes getestet

(Abbildung 22). Drei der getesteten Fraktionen zeigten in transfizierten HUH-7 Zellen, jedoch nicht in SH-SY5Y Zellen, eine reproduzierbare Erhöhung der Luciferase-Aktivität. Weitere Aufreinigungen und Charakterisierungen müssen Aufschluß darüber geben, um welches Peptid es sich handelt. In weiteren Experimenten wurde eine Vielzahl bekannter, pharmakologisch aktiver Substanzen getestet, die zur Veränderung der Genaktivität von *hPER1* führen sollten. Die meisten dieser Peptide zeigten in keiner der verwendeten Zelllinien eine signifikante Veränderung der intrinsischen Aktivität des Reporters (Abbildung 22). In HUH-7 Zellen konnte überraschenderweise ein Zytokin, Interleukin-6 (IL-6), eine signifikante Erhöhung des Reportersignals auslösen.

IL-6 (synonym: IFN-2 beta; HSF („heptacyte stimulating factor“)) ist ein wesentlicher Induktor von Akut-Phase-Reaktionen in der Leber und induziert die Expression der meisten damit verbundenen Gene (GAULDIE *et al.*, 1987; vgl. auch HIRANO *et al.*, 1990; VAN SNICK, 1990; AKIRA *et al.*, 1993). *In vivo* besitzt das 185 Aminosäuren umfassende Protein mehrere Glycosylierungs-Varianten. Stimuli, die zur Produktion von IL-6 führen, sind u.a. IFN-beta, TNF-alpha, PDGF und bakterielle Endotoxine, die in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe zur Sezernierung des Peptids führen können. Am Zielgewebe bindet IL-6 spezifisch an den IL-6-Rezeptor (IL6-R; gp80) und den Signal-Transduktions-Mediator gp130, so daß ein Multiprotein-Rezeptor-Liganden Komplex entsteht. Wie die Ergebnisse zeigen, ist *hPER1-luc* durch IL-6 in HUH-7 Zellen konzentrationsabhängig aktivierbar (Abbildung 23, blaue Kurve). Bei Koapplikation von IL-6 und *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* zeigt sich eine additive Responsivität der beiden Signale, jedoch kein Synergismus. In verschiedenen Zelllinien wurde beschrieben, daß IL-6 auch zur Aktivierung der MAPK führen kann (GERHARTZ *et al.*, 1996). Das Fehlen des synergistischen Effekts (d.i. die mehr als additive Wirkung von PKA- und PKC-Mediatoren) deutet aber darauf hin, daß in HUH-7 Zellen andere Signalwege durch das Zytokin aktiviert werden und zur Induktion des Reporters führen. Die Signalübermittlung von IL-6 wird, abhängig vom Zelltyp, meist über Proteintyrosin-Kinasen, wie z.B. Janus-Kinasen (JAKs), vermittelt, die zur Phosphorylierung von STAT-Proteinen („signal transducer and activator of transcription“) führen (vgl. HIRANO *et al.*, 1990). Darüber hinaus sind speziell in Leber-Zellen spezifische Transkriptionsfaktoren bekannt, die zur Vermittlung des Signals von IL-6 zu Akut-Phase Genen führen, d.i. IL-6DBP („IL-6-dependent DNA binding protein“; POLI *et al.*, 1990). Obwohl auch Effekte von IL-6 in SH-SY5Y Zellen beschrieben wurden (SCHUMANN *et al.*, 1999), konnte in den Reporter-Experimenten keine Aktivierung von *hPER1-luc* festgestellt werden. Möglicherweise fehlen in den Neuroblastoma-Zellen leberspezifische Mediatoren, die für die Signaltransduktion verantwortlich sind. In einigen Zelllinien wird der Transkriptionsfaktor C/EBP-beta (synonym: „Nuclear Factor IL-6“ (NF-IL-6)) aktiviert, der zur Induktion responsiver

Gene führen kann. Wie Abbildung 10 zeigt, sind in der Promotor-Sequenz von *hPER1* drei dicht benachbarte C/EBP-beta-Elemente *in silico* detektiert worden, die für die Responsivität von *hPER1* verantwortlich sein könnten. Deletions-Studien könnten Aufschluß darüber geben, inwieweit die gefundenen Sequenzmotive für die Aktivierbarkeit des Luciferase-Reporters verantwortlich sind.

Mögliche therapeutische Aspekte dieser Ergebnisse resultieren aus dem Befund, daß bei verschiedenen Lebererkrankungen häufig eine Tag-Müdigkeit und Nacht-Schlaflosigkeit auftritt (BLEI und ZEE, 1998). Weiterhin wurde beschrieben, daß IL-6 diurnalen Schwankungen unterliegt (SOTHERN *et al.*, 1995). Dabei sind die Serumkonzentrationen bei Nacht höher als am Tage, ebenso wie die beschriebenen Transkriptmengen von *hPER1*. Bei Erkrankungen kommt es bei Schlafentzug zu einer Tag-Überexpression und Nacht-Unterexpression von IL-6 (VGONTZAS *et al.*, 1999). Unter der Voraussetzung, daß IL-6 auch *in vivo* zur Erhöhung der Expression von *hPER1* in der Leber führt, könnte eine veränderte Regulation des zirkadianen Faktors wesentlich für die Schlafstörungen verantwortlich sein. Inwieweit sich diese Hypothese bestätigen läßt, müssen Experimente an Modellorganismen zeigen.

Die *in silico* Analyse zeigte auch einige weitere Elemente, die zur Regulation von *hPER1* beitragen könnten. Die gefundenen E-Box-Elemente sind möglicherweise zur Bindung und Induktion der Transkription durch die Heterodimere der Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL verantwortlich. Mutationsanalysen und Reporterexperimente mit *mPer1* suggerieren dabei eine additive Responsivität der einzelnen E-Box-Elemente (HIDA *et al.*, 2000).

4.3 Induktion von *hPER1* durch VIP und PACAP

Die Suche nach regulatorischen Peptiden führte in der humanen Choriocarcinoma-Zelllinie (JEG-3) zum Erfolg. Die als Neuromodulatoren bekannten Peptide VIP und PACAP führten zur vier- bis fünffachen Induktion des *hPER1*-Reportergens (Abbildung 24 und Abbildung 25). VIP ist auf der afferenten Seite des SCN lokalisiert (TECLEMARIAM-MESBAH *et al.*, 1997) und kann den zirkadianen Rhythmus des SCN beeinflussen (WATANABE *et al.*, 2000). Dabei ist der Neuromodulator nur unter Licht-Dunkel-Bedingungen zirkadian reguliert (MORIN *et al.*, 1991). Interessanterweise kann durch die Repression von Somatostatin (SOM) auch im Dauerdunkel eine zirkadiane Expression von VIP induziert werden (FUKUHARA *et al.*, 1994). Möglicherweise stellt SOM einen lokalen Repressor innerhalb des SCN dar, der innerhalb des zentralen „Schrittmachers“ eine Beeinflussung von VIP-vermittelten Effekten reprimiert. Die zirkadianen Plasmakonzentrationen (CUGINI *et al.*, 1991) und die Stimulation von *hPER1* in Zellen des peripheren Gewebes (Abbildung 25) weisen

jedoch darauf hin, daß VIP auch als efferenter Modulator des zirkadianen Systems fungieren könnte.

PACAP und VIP induzieren nach der Bindung aller bisher bekannten spezifischen Rezeptoren (vgl. Tabelle 1, Seite 12) die intrazelluläre Erhöhung von cAMP. In JEG-3-Zellen wurden solche Effekte sowohl durch PACAP (DESAI und BURRIN, 1994) als auch durch VIP (DEUTSCH *et al.*, 1990) nachgewiesen. In Übereinstimmung damit führte die Applikation von Sp-5,6-DCI-cBiMPS zur Induktion von *hPER1-luc* in JEG-3 Zellen (nicht gezeigt). In der Placenta sind bisher nur die humanen Rezeptor-Varianten PAC1SV1 und PACSV2 beschrieben, die die strukturellen Homologen zu den Varianten PAC₁hip und PAC₁hop der Ratte sind (SCALDAFERRI *et al.*, 2000, vgl. Tabelle 1). Es scheint jedoch unwahrscheinlich, daß die Responsivität von *hPER1-luc* in JEG-3 auf PAC₁-Varianten zurückzuführen ist. Hiernach müßte PACAP mit viel höherer Affinität zur Induktion von *hPER1-luc* führen (vgl. Tabelle 1). Die ermittelten EC₅₀-Werte zeigen jedoch, daß VIP sogar mit höherer Affinität zur Induktion des Reportergens führt. Nach den gezeigten Ergebnissen ist es daher wahrscheinlich, daß es sich bei den exprimierten Rezeptoren um VPAC₁ oder VPAC₂ handelt. Ein zusätzliches Indiz für diese Hypothese ist die Tatsache, daß weder VIP noch PACAP Ca²⁺-Änderungen in JEG-3 induzieren können (Abbildung 26). Dieses wäre in Übereinstimmung mit bisherigen Befunden, bei denen VPAC, nicht aber PAC-Rezeptor-Varianten, über IP₃-vermittelte Signalwege differentielle Transkription auslösen können (vgl. SREEDHARAN *et al.*, 1994). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche Rezeptoren tatsächlich für die Weitergabe des Signals verantwortlich sind und über welche Signaltransduktionswege die Information an den Promotor weitergeleitet wird. Neben der Aktivierung von pCREB ist auch die Induktion des Transkriptionsfaktors C/EBP-beta durch VIP und PACAP beschrieben (CARDINAUX und MAGISTRETTI, 1996). Wie auch bei IL-6 könnten die drei im Promotor lokalisierten C/EBP-responsiven Elemente (Abbildung 10) eine regulatorische Rolle bei der Induktion von *hPER1* übernehmen.

Alle bisher veröffentlichten Daten belegen einen direkten Zusammenhang der Neuroregulatoren VIP und PACAP auf den zentralen Schrittmacher, den SCN. Dies ist das erste Mal, daß ein direkter Zusammenhang zwischen diesen Peptiden und peripheren Oszillatoren gezeigt werden konnte. Neueste Erkenntnisse weisen darauf hin, daß eine Überexpression des VPAC₂-Rezeptors zu einer schnelleren Anpassung an Phasenverschiebungen führt (SHEN *et al.*, 2000). Die Induktion von *hPER1* durch VIP und PACAP in JEG-3 Zellen impliziert, daß dieser Mechanismus nicht nur auf die afferente Induktion des SCN durch die Neurotransmitter beschränkt sein muß, sondern auch in der Efferenz des zirkadianen Systems eine synchronisierende Wirkung einzelner Organe bewirken könnte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Promotor des humanen Gens für Period 1 (*hPER1*) untersucht. Dabei wurden sowohl die Komponenten der intrazellulären Signaltransduktion („second messengers“) als auch primäre Aktivatoren („first messengers“) in verschiedenen humanen Zelllinien charakterisiert. Für das Vorhaben wurde in einem humanen genomischen Cosmid durch Southern-Blot Analyse der Promotor-Bereich von *hPER1* lokalisiert, anschließend kloniert und der Bereich vollständig sequenziert. Zur Lokalisation putativ responsiver Elemente wurde eine *in silico* Promotor-Analyse durchgeführt. Abgeleitet von der Lokalisation des Promotors wurde ein Promotor-Luciferase-Konstrukt hergestellt und Reporter-gen-Assays durchgeführt. Dazu wurden Strategien und Protokolle zur optimalen Transfektion von verschiedenen Zelllinien etabliert. In humanen Hepatoma-Zellen (HUH-7) konnte eine synergistische Induktion des Reporter-gens mit PKA und PKC-stimulierenden Agenzien nachgewiesen werden. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, daß durch pharmakologische Inhibitoren beide Signaltransduktionswege mindestens partiell gehemmt werden konnten. Experimente mit A-CREB und K-CREB Antagonisten zeigten, daß die PKA- und PKC-vermittelten Signale unabhängig voneinander zur Induktion des Promotors von *hPER1* führten. Zur Evaluierung der endogenen Responsivität der *hPER1*-Aktivierung wurden quantitative RT-PCR-Experimente durchgeführt. Die Analysen ergaben, daß durch die Induktion von PKA und PKC die mRNA um den Faktor 2,25 anstieg. Dies läßt den Schluß zu, daß die Reporter-gen-experimente die endogene Induktion des Gens widerspiegeln. In HUH-7 Zellen, jedoch nicht in der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y, konnte das Zytokin IL-6 konzentrationsabhängig das Reporter-Konstrukt induzieren. Die Koapplikation des PKA-induzierenden Agenz *Sp-5,6-DCI-cBiMPS* und IL-6 zeigte eine rein additive Aktivierung des Reporters. In Choriocarcinoma-Zellen (JEG-3) konnten die bisher nur als SCN-beeinflussenden Peptide VIP und PACAP eine bis zu fünffache Induktion des Reporters auslösen. Durch Messungen am FLIPR™ konnte bestimmt werden, daß weder VIP noch PACAP zur Freisetzung von Ca^{2+} führen. Mögliche Rezeptoren und Zusammenhänge mit dem efferenten zirkadianen System sind diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

AGUILAR-ROBLERO, R., VERDUZCO-CARBAJAL, L., RODRIGUEZ, C., MENDEZ-FRANCO, J., MORAN J. und DE LA MORA, M.P. (1993). Circadian rhythmicity in the GABAergic system in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *Neurosci Lett* **157**: 199-202.

AHN, S., OLIVE, M., AGGARWAL, S., KRYLOV, D., GINTY, D.D. und VINSON, C. (1998). A dominant-negative inhibitor of CREB reveals that it is a general mediator of stimulus-dependent transcription of c-fos. *Mol Cell Biol* **18**: 967-977.

AKIRA, S., ISSHIKI, H., SUGITA, T., TANABE, O., KINOSHITA, S., NISHIO, Y., NAKAJIMA, T., HIRANO, T. und KISHIMOTO, T. (1990). A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* **9**: 1897-1906.

AKIRA, S., TAGA, T. und KISHIMOTO, T. (1993). Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* **54**: 1-78.

ALBRECHT, U., SUN, Z.S., EICHELE, G. und LEE, C.C. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell* **91**: 1055-1064.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. und LIPMAN, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.

ASCHOFF, J. (1981) A survey on biological rhythms. In: *Biological Rhythms*, Vol. 4, Handbook of Behavioral Neurobiology, Aschoff J. (ed.), Plenum Press, New York.

BALSALOBRE, A., DAMIOLA, F. und SCHIBLER, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**: 929-937.

BENBROOK, D.M. und JONES N.C. (1994). Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic Acids Res* **22**: 1463-1469.

BIRNBOIM, H. C. und DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1522.

BLEI, A.T. und ZEE, P. (1998). Abnormalities of circadian rhythmicity in liver disease. *J Hepat* **29**: 832-835.

- BUIJS, R.M., HERMES, M.H. und KALSBECK, A. (1998). The suprachiasmatic nucleus-paraventricular nucleus interactions: a bridge to the neuroendocrine and autonomic nervous system. *Prog Brain Res* **119**: 365-382.
- BUNNEY, W.E. und BUNNEY, B.G. (2000). Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities and depression. *Neuropsychopharmacology* **22**: 335-345.
- CAGAMPANG, F.R. und INOUE, S.T. (1994). Diurnal and circadian changes of serotonin in the suprachiasmatic nuclei: regulation by light and an endogenous pacemaker. *Brain Res* **639**: 175-179.
- CAHILL, G.M. und MENAKER, M. (1989). Effects of excitatory amino acid receptor antagonists and agonists on suprachiasmatic nucleus responses to retinohypothalamic tract volleys. *Brain Res* **479**: 76-82.
- CARD, J.P., BRECHA, N., KARTEN, H.J. und MOORE, R.Y. (1981). Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci* **1**: 1289-1303.
- CARDINAUX, J.R. und MAGISTRETTI, P.J. (1996). Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)-beta and C/EBP delta in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *J Neurosci* **16**: 919-929.
- CASSINAT, B., ZASSADOWSKI, F., BALITRAND, N., BARBEY, C., RAIN, J.D., FENAUX, P., DEGOS, L., VIDAUD, M. und CHOMIENNE, C. (2000): Quantitation of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia patients with t(15;17) translocation using real-time RT-PCR. *Leukemia* **14**: 324-328.
- CHENG, Y., GVAKHARIA, B. und HARDIN, P.E. (1998). Two alternatively spliced transcripts from the *Drosophila* period gene rescue rhythms having different molecular and behavioral characteristics. *Mol Cell Biol* **18**: 6505-6514.
- CUGINI, P., LUCIA, P., DI PALMA, L., RE, M., LEONE, G., BATTISTI, P., CANOVA, R., GASBARRONE, L. und CIANETTI, A. (1991). Vasoactive intestinal peptide fluctuates in human blood with a circadian rhythm. *Regul Pept* **34**: 141-148.
- DAGERT, M. und EHRLICH, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-28.

DESAI, B.J. und BURRIN, J.M. (1994). PACAP-38 positively regulates glycoprotein hormone alpha-gene expression in placental cells. *Mol Cell Endocrinol* **99**: 31-37.

DEUTSCH, P.J., SUN, Y. und KROOG, G.S. (1990). Vasoactive intestinal peptide increases intracellular cAMP and gonadotropin-alpha gene activity in JEG-3 syncytial trophoblasts. Constraints posed by desensitization. *J Biol Chem* **265**: 10274-10281.

DING, J.M., FAIMAN, L.E, HURST, W.J., KURIASHKINA, L.R. und GILLETTE, M.U. (1997). Resetting the biological clock: mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate, and nitric oxide. *J Neurosci* **17**: 667-675.

DUNLAP, J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* **96**: 271-290.

EARNEST, D.J., IADAROLA, M., YEH, H.H. und OLSCHOWKA, J.A. (1990). Photic regulation of c-fos expression in neural components governing the entrainment of circadian rhythms. *Exp Neurol* **109**: 353-361.

ESKIN, A. und TAKAHASHI, J.S. (1983). Adenylate cyclase activation shifts phase of a circadian pacemaker. *Science* **220**: 82-84.

FAHRENKRUG, J. (1979). Vasoactive intestinal polypeptide: measurement, distribution and putative neurotransmitter function. *Digestion* **19**: 149-169.

FERREYRA, G.A. und GOLOMBEK, D.A. (2000). Cyclic AMP and protein kinase A rhythmicity in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Brain Res* **858**: 33-39.

FIELD, M.D., MAYWOOD, E.S., O'BRIEN, J.A., WEAVER, D.R., REPERT, S.M. und HASTINGS, M.H. (2000). Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron* **25**: 437-447.

FUKUHARA, C., NISHIWAKI, T., CAGAMPANG, F.R. und INOUE, S.T. (1994). Emergence of VIP rhythmicity following somatostatin depletion in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* **645**: 343-346.

GARRINGTON, T.P., JOHNSON, G.L. (1999). Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 211-218.

GAULDIE, J., RICHARDS, C., HARNISH, D., LANSDORP, P. und BAUMANN, H. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7251-7255.

GEKAKIS, N., STAKNIS, D., NGUYEN, H.B., DAVIS, F.C., WILSBACHER, L.D., KING, D.P., TAKAHASHI, J.S. und WEITZ, C.J. (1998). Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* **280**: 1564-1569.

GERHARTZ, C., HEESEL, B., SASSE, J., HEMMANN, U., LANDGRAF, C., SCHNEIDER-MERGENER, J., HORN, F., HEINRICH, P.C. und GRAEVE, L. (1996). Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem* **271**: 12991-12998.

GINTY, D.D., KORNHAUSER, J.M., THOMPSON, M.A., BADING, H., MAYO, K.E., TAKAHASHI, J.S. und GREENBERG, M.E. (1993). Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* **260**: 238-241.

GJERTSEN, B.T., MELLGREN, G., OTTEN, A., MARONDE, E., GENIESER, H.-G., JASTORFF, B., VINTERMYR, O.K., MCKNIGHT, G.S. und DOESKELAND, S.O. (1995). Novel Rp-cAMPs analogs as tools for inhibition of cAMP kinase in cell culture. *J Biol Chem* **270**: 20599-20607.

GONZALEZ, G.A. und MONTMINY, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**: 675-680.

GREEN, D.J. und GILLETTE, R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* **245**: 198-200.

GROBLEWSKI, T.A., NUNEZ, A.A. und GOLD, R.M. (1981) Circadian rhythms in vasopressin deficient rats. *Brain Res Bull* **6**: 125-130.

GROOS, G. und HENDRIKS, J. (1982). Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci Lett* **34**: 283-288.

GROSS, J.L., BEHRENS, D.L., MULLINS, D.E., KORNBLITH, P.L. und DEXTER, D.L. (1988). Plasminogen activator and inhibitor activity in human glioma cells and modulation by sodium butyrate. *Cancer Res* **48**: 291-296.

HANNIBAL, J., DING, J.M., CHEN, D., FAHRENKRUG, J., LARSEN, P.J., GILLETTE, M.U. und MIKKELSEN, J.D. (1997). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* **17**: 2637-2644.

HANNIBAL, J., MOLLER, M., OTTERSEN, O.P. und FAHRENKRUG, J. (2000). PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol* **418**: 147-155.

- HAO, H., ALLEN, D.L. und HARDIN, P.E. (1997). A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* **17**: 3687-3693.
- HARRINGTON, M.E., HOQUE, S., HALL, A., GOLOMBEK, D. und BIELLO, S. (1999). Pituitary adenylate cyclase activating peptide phase shifts circadian rhythms in a manner similar to light. *J Neurosci* **19**: 6637-6642.
- HASEGAWA, M. und CAHILL, G.M. (1998). Cyclic AMP resets the circadian clock in cultured *Xenopus* retinal photoreceptor layers. *J Neurochem* **70**: 1523-1531.
- HIDA, A., KOIKE, N., HIROSE, M., HATTORI, M., SAKAKI, Y. und TEI, H. (2000). The human and mouse *Period1* genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of *mPer1* transcription. *Genomics* **65**: 224-233.
- HIRANO, T., AKIRA, S., TAGA, T. und KISHIMOTO, T. (1990). Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* **11**: 443-449.
- HOLLAND, P.M., ABRAMSON, R.D., WATSON, R. und GELFAND, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7276-7280.
- HORN, F., HENZE, C. und HEIDRICH, K. (2000). Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function. *Immunobiology* **202**: 151-167.
- HUNTER, T. (2000). Signaling - 2000 and beyond. *Cell* **100**: 113-127.
- INOUE, S.T. und KAWAMURA, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 5962-5966.
- KARIN, M. und HUNTER, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* **5**: 747-757.
- KOHLER, P.O. und BRIDSON, W.E. (1971). Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **32**: 683-687.
- KORNHAUSER, J.M., NELSON, D.E., MAYO, K.E. und TAKAHASHI, J.S. (1992). Regulation of *jun-B* messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. *Science* **255**: 1581-1584.

KUME, K., ZYLKA, M.J., SRIRAM, S., SHEARMAN, L.P., WEAVER, D.R., JIN, X., MAYWOOD, E.S., HASTINGS, M.H. und REPERT, S.M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**: 193-205.

LIANG, Q., HE, J.S. und FULCO, A.J. (1995). The role of Barbie box sequences as cis-acting elements involved in the barbiturate-mediated induction of cytochromes P450BM-1 and P450BM-3 in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* **270**: 4438-4450.

LINDL, T. (2000): Zell und Gewebekultur. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.

MARONDE, E., PFEFFER, M., OLCESE, J., MOLINA, C.A., SCHLOTTER, F., DEGHANI, F., KORF, H.W. und STEHLE, J.H. (1999a). Transcription factors in neuroendocrine regulation: rhythmic changes in pCREB and ICER levels frame melatonin synthesis. *J Neurosci* **19**: 3326-3336.

MARONDE, E., WICHT, H., TASKEN, K., GENIESER, H.G., DEGHANI, F., OLCESE, J. und KORF, H.W. (1999b). CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal gland: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase type II. *J Pineal Res* **27**: 170-182.

MIYATA, A., ARIMURA, A., DAHL, R.R., MINAMINO, N., UEHARA, A., JIANG, L., CULLER, M.D. und COY, D.H. (1989). Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **164**: 567-574.

MIYATA, A., JIANG, L., DAHL, R.D., KITADA, C., KUBO, K., FUJINO, M., MINAMINO, N. und ARIMURA, A. (1990). Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 643-648.

MONTMINY, M.R., GONZALEZ, G.A. und YAMAMOTO, K.K. (1990). Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* **13**: 184-188.

MORGAN, P.J., ROSS, A.W., GRAHAM, E.S., ADAM, C., MESSENGER, S. und BARRETT, P. (1998). oPer1 is an early response gene under photoperiodic regulation in the ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* **10**: 319-323.

MORIN, A., DENOROY, L. und JOUVET, M. (1991). Daily variations in concentration of vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivity in discrete brain areas of the rat. *Brain Res* **538**: 136-140.

- NAKABAYASHI, H., TAKETA, K., MIYANO, K., YAMANE, T. und SATO, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**: 3858-3863.
- OBRIETAN, K., IMPEY, S., SMITH, D., ATHOS, J. und STORM, D.R. (1999). Circadian regulation of cAMP response element-mediated gene expression in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Chem* **274**: 17748-17756.
- OISHI, K., SAKAMOTO, K., OKADA, T., NAGASE, T. und ISHIDA, N. (1998a). Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun* **253**: 199-203.
- OISHI, K., SAKAMOTO, K., OKADA, T., NAGASE, T. und ISHIDA, N. (1998b). Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (rPer2) mRNA in peripheral tissues. *Neurosci Lett* **256**: 117-119.
- OKAMURA, H. und IBATA, Y. (1994). GRP immunoreactivity shows a day-night difference in the suprachiasmatic nuclear soma and efferent fibers: comparison to VIP immunoreactivity. *Neurosci Lett* **181**: 165-168.
- POLI, V., MANCINI, F.P. und CORTESE, R. (1990). IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell* **63**: 643-653.
- PROSSER, R.A. und GILLETTE, M.U. (1989). The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP. *J Neurosci* **9**: 1073-1081.
- QUANDT, K., FRECH, K., KARAS, H., WINGENDER, E. und WERNER, T. (1995). MatInd and MatInspector - New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* **23**: 4878-4884.
- RITTENHOUSE, J. und MARCUS, F. (1984). Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. *Anal Biochem* **138**: 442-448.
- ROESLER, W.J. (2000). What is a cAMP response unit ?. *Mol Cell Endocrinol* **162**: 1-7.
- ROSEBOOM, P.H., COON, S.L., BALER, R., MCCUNE, S.K., WELLER, J.L. und KLEIN, D.C. (1996). Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. *Endocrinology* **137**: 3033-3045.

- ROSS, R.A., SPENGLER, B.A. und BIEDLER, J.L. (1983). Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* **71**: 741-747.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. und ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- SANDBERG, M., BUTT, E., NOLTE, C., FISCHER, L., HALBRUEGGE, M., BELTMANN, J., JAHNSEN, T., GENIESER, H.-G., JASTORFF, B. und WALTER, U. (1991). Characterization of Sp-5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole- 3',5'-monophosphorothioate (Sp-5,6-DCI-cBiMPS) as a potent and specific activator of cyclic-AMP-dependent protein kinase in cell extracts and intact cells. *Biochem J* **279**: 521-527.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- SATO, N., KAMINO, K., TATEISHI, K., SATOH, T., NISHIWAKI, Y., YOSHIIWA, A., MIKI, T. und OGIHARA, T. (1997). Elevated amyloid beta protein(1-40) level induces CREB phosphorylation at serine-133 via p44/42 MAP kinase (Erk1/2)-dependent pathway in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **232**: 637-642.
- SCALDAFERRI, M.L., MODESTI, A., PALUMBO, C., ULISSE, S., FABBRI, A., PICCIONE, E., FRAJESE, G. und MORETTI, C. (2000). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP-receptor type 1 expression in rat and human placenta. *Endocrinology* **141**: 1158-1167.
- SCHULZ-KNAPPE, P., SCHRADER, M., STANDKER, L., RICHTER, R., HESS, R., JURGENS, M. und FORSSMANN, W.G. (1997). Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J Chromatogr A* **776**: 125-132.
- SCHUMANN, G., HUELL, M., MACHEIN, U., HOCKE, G. und FIEBICH, B.L. (1999). Interleukin-6 activates signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways and induces de novo protein synthesis in human neuronal cells. *J Neurochem* **73**: 2009-2017.
- SCHWARTZ, W.J. und GAINER, H. (1977). Suprachiasmatic nucleus: use of 14C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* **197**: 1089-1091.
- SEILER, P., STANDKER, L., MARK, S., HAHN, W., FORSSMANN, W.G. und MEYER, M. (1999). Application of a peptide bank from porcine brain in isolation of regulatory peptides. *J Chromatogr A* **852**: 273-283.

SHAYWITZ, A.J. und GREENBERG, M.E. (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* **68**: 821-861.

SHEARMAN, L.P., ZYLKA, M.J., WEAVER, D.R., KOLAKOWSKI, L.F.JR. und REPERT, S.M. (1997). Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* **19**: 1261-1269.

SHEN, S., SPRATT, C., SHEWARD, W.J., KALLO, I., WEST, K., MORRISON, C.F., COEN, C.W., MARSTON, H.M. und HARMAR, A.J. (2000). Overexpression of the human VPAC2 receptor in the suprachiasmatic nucleus alters the circadian phenotype of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:11575-11580.

SHENG, M. und GREENBERG, M.E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**: 477-485.

SHENG, M., THOMPSON, M.A. und GREENBERG, M.E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**: 1427-1430.

SHENG, M., MCFADDEN, G. und GREENBERG, M.E. (1990). Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* **4**: 571-582.

SHIBATA, S., OOMURA, Y., KITA, H. und HATTORI, K. (1982). Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res* **247**: 154-158.

SHIGEYOSHI, Y., TAGUCHI, K., YAMAMOTO, S., TAKEKIDA, S., YAN, L., TEI, H., MORIYA, T., SHIBATA, S., LOROS, J.J., DUNLAP, J.C. und OKAMURA, H. (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell* **91**: 1043-1053.

SILVER, R., LESAUTER, J., TRESKO, P.A. und LEHMAN, M.N. (1996). A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* **382**: 810-813.

SOLOVYEV, V.V., SALAMOV, A.A. und LAWRENCE, C.B. (1995). Identification of human gene structure using linear discriminant functions and dynamic programming. *Ismb* **3**: 367-375.

SOTHERN, R.B., ROITMAN-JOHNSON, B., KANABROCKI, E.L., YAGER, J.G., ROODELL, M.M., WEATHERBEE, J.A., YOUNG, M.R., NENCHAUSKY, B.M. und SCHEVING, L.E. (1995). Circadian characteristics of circulating interleukin-6 in men. *J Allergy Clin Immunol* **5**: 1029-1035.

SOUTHERN, EM (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.

SPENGLER, D., WAEBER, C., PANTALONI, C., HOLSBOER, F., BOCKAERT, J., SEEBURG, P.H. und JOURNOT, L. (1993). Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* **365**: 170-175.

SREEDHARAN, S.P., PATEL, D.R., XIA, M., ICHIKAWA, S. und GOETZL, E.J. (1994). Human vasoactive intestinal peptide1 receptors expressed by stable transfectants couple to two distinct signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 141-148.

SUN, Z.S., ALBRECHT, U., ZHUCHENKO, O., BAILEY, J., EICHELE, G. und LEE, C.C. (1997). RIGUI, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila* period gene. *Cell* **90**: 1003-1011.

SWANSON, H.I., CHAN, W.K. und BRADFIELD, C.A. (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* **270**: 26292-26302.

TAKAHASHI, J.S. (1995). Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* **18**: 531-553.

TAKUMI, T., MATSUBARA, C., SHIGEYOSHI, Y., TAGUCHI, K., YAGITA, K., MAEBAYASHI, Y., SAKAKIDA, Y., OKUMURA, K., TAKASHIMA, N. und OKAMURA, H. (1998). A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **3**: 167-176.

TAMARU, T., ISOJIMA, Y., YAMADA, T., OKADA, M., NAGAI, K. und TAKAMATSU, K. (2000). Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J Neurosci* **20**: 7525-7530.

TARUSCIO, D., ZORAQI, G.K., FALCHI, M., IOSI, F., PARADISI, S., DI FIORE, B., LAVIA, P. und FALBO, V. (2000). The human *per1* gene: genomic organization and promoter analysis of the first human orthologue of the *Drosophila* period gene. *Gene* **253**:161-170.

- TECLEMARIAM-MESBAH, R., KALSBECK, A., PEVET, P. und BUIJS R.M. (1997). Direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection from the suprachiasmatic nucleus to spinal projecting hypothalamic paraventricular neurons. *Brain Res* **748**: 71-76.
- TEI, H., OKAMURA, H., SHIGEYOSHI, Y., FUKUHARA, C., OZAWA, R., HIROSE, M. und SAKAKI, Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. *Nature* **389**: 512-516.
- TOMINAGA, K., SHINOHARA, K., OTORI, Y., FUKUHARA, C. und INOUE S.T. (1992). Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroreport* **3**: 809-812.
- UHL, G.R. und REPPERT, S.M. (1986). Suprachiasmatic nucleus vasopressin messenger RNA: circadian variation in normal and Brattleboro rats. *Science* **232**: 390-393.
- VAN DER HORST, G.T., MUIJTJENS, M., KOBAYASHI, K., TAKANO, R., KANNO, S., TAKAO, M., DE WIT, J., VERKERK, A., EKER, A.P., VAN LEENEN, D., BUIJS, R., BOOTSMA, D., HOEIJMAKERS, J.H. und YASUI, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**: 627-630.
- VAN ESSEVELDT, K.E., LEHMAN, M.N. und BOER, G.J. (2000). The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Brain Res Rev* **33**: 34-77.
- VAN SNICK, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* **8**: 253-278.
- VGONTZAS, A.N., PAPANICOLAOU, D.A., BIXLER, E.O., LOTSIKAS, A., ZACHMAN, K., KALES, A., PROLO, P., WONG, M.L., LICINIO, J., GOLD, P.W., HERMIDA, R.C., MASTORAKOS, G. und CHROUSOS, G.P. (1999). Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 2603-2607.
- VOGELSTEIN, B. und GILLESPIE, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 615-619.
- WAGER-SMITH, K. und KAY, S.A. (2000). Circadian rhythm genetics: from flies to mice to humans. *Nat Genet* **26**: 23-27.
- WALTON, K.M., REHFUSS, R.P., CHRISTIVA, J.C., LOCHNER, J.E. und GOODMAN, R.H. (1992). A dominant repressor of cyclic 3',5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer-binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo. *Mol Endocrinol* **6**: 647-655.

WARREN, W.S, CHAMPNEY, T.H. und CASSONE V.M. (1994). The suprachiasmatic nucleus controls the circadian rhythm of heart rate via the sympathetic nervous system. *Physiol Behav* **55**: 1091-1099.

WARRINGTON, J.A., NAIR, A., MAHADEVAPPA, M. und TSYGANSKAYA, M. (2000). Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol Genomics* **2**: 143-147.

WATANABE, K., VANECEK, J. und YAMAOKA, S. (2000). In vitro entrainment of the circadian rhythm of vasopressin-releasing cells in suprachiasmatic nucleus by vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Res* **877**: 361-366.

WINER, J., JUNG, C.K., SHACKEL, I. und WILLIAMS, P.M. (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* **270**: 41-49.

XIE, H. und ROTHSTEIN, T.L. (1995). Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J Immunol* **154**: 1717-1723.

YAGITA, K. und OKAMURA, H. (2000). Forskolin induces circadian gene expression of rPer1, rPer2 and dbp in mammalian rat-1 fibroblasts. *FEBS Lett* **465**: 79-82.

YAMAZAKI, S., NUMANO, R., ABE, M., HIDA, A., TAKAHASHI, R., UEDA, M., BLOCK, G.D., SAKAKI, Y., MENAKER, M. und TEI, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**: 682-685.

ZHENG, B., LARKIN, D.W., ALBRECHT, U., SUN, Z.S., SAGE, M., EICHELE, G., LEE, C.C. und BRADLEY, A. (1999). The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. *Nature* **400**:169-173.

ZYLKA, M.J., SHEARMAN, L.P., WEAVER, D.R. und REPERT, S.M. (1998). Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* **20**: 1103-1110.

7. Anhang

DNA-Sequenz von *hPER1-HindIII*:

```

1           10           20           30           40           50           60
ggccacgtgacagtgaggggagtgcccccacaatgattatgtcagcagctgcttggaggc
  |||||
  CACGTG
  E-Box

61           70           80           90           100          110          120
ctgttcatctactaccacgtttccagggagccctgcgaggaactactcatcacggtcct

121          130          140          150          160          170          180
ggatggagggggctgtgtaactgcagctctcctgagcccagactaacatTTTattgctg

181          190          200          210          220          230          240
caaatcgtgccctgttctcttcttaggactactcatctctTTTtagagaatcagaattcc

241          250          260          270          280          290          300
cagccccctttctcctgttgacactcttttcccacctcccacacctatccttgttTaaa
|-|||||/|||/\
CCNYCNGCTTTNNAT
  BARBIE-Box

301          310          320          330          340          350          360
aaaaaaaaatcatgtttatcgatcacttgccatgtgtcaggtcctgtcctgggctctgga

361          370          380          390          400          410          420
gactacagtgaatgagacagatgacgttccgtctgggccctggagttggctttctctt

421          430          440          450          460          470          480
ttccaagcagtggaatatgaagcccttgacccccacctttctctgctagggccccagct
  \|||||/|||/|
  CCNYCNGCTTTNNAT
  BARBIE-Box

481          490          500          510          520          530          540
ggcctcttctctgggccatccccttgggtccctctgtagtcctggcttctggccccact

541          550          560          570          580          590          600
tttggggcagctttaactgtgggtggctgcgtcctctggaggaaagtactagacaccacg

601          610          620          660          640          650          660
taggctgcccggagaccttgtctctgagtggccatagaagcacctgccattgtttccctt

661          670          680          690          700          710          720
cacagccactattggctctggttgccccttccattgtccgcatccttctccaccactca

```


1321 1330 1340 1350 1360 1370 1380
cctccccgcccgccccggtggagcttc**CACTCG**GCTGCGGGCTGGAGCGGCGGGCAGG
 | | | | |
 Transtrikptionsstart (*)

1381 1390 1400 1410 1420 1430 1440
CGTGCGGAGGACTCCTGCGACCAGgtaggcatctctgcggccatcctggggccgatct

1441 1450 1460 1470 1480 1490 1500
ccgtccctgagccggaccgctgcacttccaatctgatgggctactttcggcccaggcaga

1501 1510 1520 1530 1540 1550 1560
gggcacactgtcgtccttaccgctaccaccctctccctgcccccaaggaccgaagtcctc

1561 1570 1580 1590 1600 1610 1620
tcgaaatcttgaccgggagctctgcactcctgaccactcatcttacctccagcttgtccc

1621 1630 1640 1650 1660 1670 1680
cacctccccgtcccagctttcccggccccacagccgactctcagcgggcatgccccggtc

1681 1690 1700 1710 1720 1730 1740
ttcttgctcgttactcgaggggccccagggttgccccggtagcaggaccctattaggctt

1741 1750 1760 1770 1780 1790 1800
tcagcgtccccgtgtctctgttctccagtcctggccctgcgcccgtgtgatgtcagc

1801 1810 1820 1830 1840 1850 1860
ccacttcggactagaacatcccgttcccagcgtgggtcctgctggtggccacaaccttc

1861 1870 1880 1890 1900 1910 1920
ccttttcccctggcgctcagaaaatgctcagtagtaggggtgtggttggacggggagtag

1921 1930 1940 1950 1960 1970 1980
gggaagaaagatctgttggctggtgtgtgtcttctgcccaaggcttgggggttggggggg

1981 1990 2000 2010 2020 2030 2040
ggtctggccagaaaagtaggggactgaagagagaggatcctcgggtccttgacgatggca

2041 2050 2060 2070 2080 2090 2100
ggttgccggcttcggtccttgtggtggggaagcagcgcaggggctaaagaaggaaagggtt

2101 2110 2120 2130 2140 2150 2160
gtgttgtcttgaccagaatgactgggatccaggcgagagtcaggttgaggggcttttgcg

2161 2170 2180 2190 2200 2210 2220
ccgagggcagtgccgcttgtgcttcgtcctgggaagccaggaccaacctgggatcctaa

2221 2230 2240 2250 2260 2270 2280
taggccgtcccacttcttacggccaccgagccatcctgggactggggatatgtaagggat

2281 2290 2300 2310 2320 2330 2340
gcgtgaccccccggtgcgcccaccagtgtagagtgggcogttccccacttccgccc

2341 2350 2360 2370 2380 2390 2400
ggaaatgggggaggggtcgctcctcccgcctcctgtggtccctccagcaaccgctgagc

2401 2410 2420 2430 2440 2450 2460
tcagcagctgacgtcggtttccctggcgaccgtggcggcggaagcgcgtggtggggc

|||||/|
TGACGTCA

CRE-Element

2461 2470 2480 2490 2500 2510 2520
cgcgcacgtcggcgcgcatgtgcagcgggggtggcaccgccccggataaaaattagcctg

2521 2530 2540 2550 2560 2570 2580
gaggcctaaatataggaggcgaccagctcacctcctgctccgaggccttgaggcccagg

2581 2590 2600 2610 2620 2630 2640
cagagtggacacctaattgggaacttgggaatgggaagtgtccaggtttttgtctacagcc

2641 2650 2660 2670 2680 2690 2700
gtggttctcattgactgctcaggccatgggtggcaggggatgtgaaggaaggccccggaga

|||||
CCATGG

NcoI

2701 2710 2720 2730 2740 2750 2760
accttctcccgctggcagtcctcctaaaggtacaggagacatcctgactccccattggaa

2761 2770 2780 2790 2800 2810 2820
gccccaggcctgggttccactcccatcagtcctgcaggaggccaggcagggggaaggctct

2821 2830 2840 2850 2860 2870 2880
gagtgaagccagcaggtgctctggagttaaaccagctttctgcaagccctgcttcttggt

2881 2890 2900 2910 2920 2930 2940
ctccctctccagGTACTGGCTGTGATCGAACTTCTCAACCCTCAGAGACTTAGATCTTCC

2941 2950 2960 2970 2980 2990 3000
ACCTCACTCCCTCAGCCAAGCCTCCAGGCCCCCTCGTGCATCCGTGGTGGCCTCTCTGCC

3001 3010 3020 3030 3040 3050 3060
TTCTCTGTTCTGTTCTCCCATGGCCAGACATGAGTGGCCCTTAGAAGGGGCTGATGG

|||
ATG

START-Kodon

3061 3070 3080 3090 3100 3110 3120
GGAAGGGACCCAGGCCTGGGAATCATTTTGTCTGGGGCGTCCCATCCCTTGGGCCCC

3121 3130 3140 3150 3160 3170 3180
CACAGCACCGCCTTGCCCAGGCCCCAGCCTGGCCGATGACACCGATGCCAACAGCAATG

3181 3190 3200 3210 3220 3230 3240
GTTCAAGTGGCAATGAGTCCAACGGGCATGAGTCTAGAGGCGCATCTCAGCGGAGCTCAC

3241 3250 3260 3270 3280 3290 3300
ACAGCTCCTCCTCAGGCAACGGCAAGGACTCAGCCCTGCTGGAGACCACTGAGAGCAGCA

3301 3310 3320 3333 3340 3350 3360
AGAGgtgtgtatggatgtgtatgttgggtctaggaatggtcttgtgagcaggcagagctg

```

3361      3370      3380      3390      3400      3410      3420
ggtgacaggcctcgcactgctggccctacctgtaactgggcctgttgctgtctcctagCA

3421      3430      3440      3450      3460      3470      3480
CAAACCTCTCAGAGCCCATCCCCACCCAGCAGTTCCATTGCCTACAGCCTCCTGAGTGCCA

3481      3490      3500      3510      3520      3530      3540
GCTCAGAGCAGGACAACCCGTCCACCAGTGGCTGCAGgtacgtcgggtgaggctggagga

3541      3550      3560      3570      3580      3590      3600
gaggtctggggggcccaggccacactctgggactaatgtctttatctctttcttcctctgtg

3601      3610      3620      3633      3640      3650      3660
ggccccgcagCAGTGAACAGTCAGCCCGGGCAAGGACTCAGAAGGAACTCATGACAGCAC

3661      3669
TTCGAGAGC

```

Anhang 1: DNA-Sequenz von *hPER1-HindIII*. Einige der mit dem Programm TRANSFAC 4.0 (QUANDT *et al.*, 1995) gefundenen putativen Promotor-Elemente sind gezeigt. (|) = Übereinstimmung, (|) = hohe Übereinstimmung (|) = geringe Übereinstimmung und (-) = keine Übereinstimmung mit den verwendeten Konsensus-Sequenzen des Programms. Die Basennomenklatur entspricht IUPAC (R: G/A, Y: T/C, M: A/C, K: G/T, S: G/C, W: A/T, N: A/G/C/T). *NcoI* zeigt die Schnittstelle, mit der die 5' liegende Sequenz in den pGL2-basic Vektor kloniert wurde (vgl. Abbildung 7). Exons sind in Grossbuchstaben, Introns kursiv gedruckt. Exon 1: 1362-1406; Intron 1: 1407-2892; Exon 2: 2893-3306; Intron 2: 3307/3418; Exon 3: 3419-3517; Intron 3: 3518-3610; Exon 4: 3611-(Klon endet innerhalb). Die Nummerierung entspricht der publizierten Sequenz AF284444. (ˆ): Transkriptionsstartpunkt und TATA-Box Motiv entsprechend dem Programm TSSG („Recognition of human PolII promoter region and start of transcription“, SOLOVYEV *et al.*, 1995)

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolf-Georg Forssmann für die Möglichkeit, diese Arbeit in den IPF-Forschungslaboren in Hannover anfertigen zu können.

Für die kompetente Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit möchte ich vor allem Dr. Erik Maronde danken, der mir für alle Probleme stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Markus Meyer danke ich für die Betreuung zu Beginn der Arbeit.

Für die Bereitstellung wichtiger Arbeitsvoraussetzungen und Übernahme des Korreferates möchte ich Prof. Dr. Urs Albrecht danken.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Müller vom Zentrum Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover für die Übernahme des Referates danken.

Bei Annette Busmann möchte ich mich für die Unterstützung der Arbeiten am FLIPR bedanken.

Für computergestützte Arbeiten, Sequenzierungen und Protein-analytische Arbeiten bedanke ich mich bei Wolfgang Posselt, Uwe Grunenberg, Rolf Kopittke, Daniela Zoch, Ilka Uhrlandt und für die Bereitstellung der Peptid-Bank bei Dr. Ludger Ständker.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie, besonders Melanie Klingenberg, Alexander Krause, Peter Kreuzmann, Sandra Schulz und Rainer Schreeb und in besonderem Maße dem Abteilungsleiter, PD Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Mägert.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Abteilung 5, besonders Antonietta Gasperina, Sabine Loumi, Edith Rambow und Maike Sniehotta.

Nicht zuletzt möchte ich mich für die sehr kreativen Raucher-Pausen bedanken, bei denen die Gespräche mit Susann Arndt, Michael Walden und „Dr. Conny“ häufig entscheidende Wendungen in der Interpretation einzelner Experimente erbrachten.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meiner Oma, meinem Bruder und seiner Verlobten und bei meiner Freundin, die mir in allen Situationen jederzeit zur Seite standen.

Publikationsliste

Publizierte Originalarbeiten

MOTZKUS, D., SINGH, P.B. und HOYER-FENDER, S. (1999). M31, a murine homolog of Drosophila HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet* **86**:83-88.

HOYER-FENDER, S., SINGH, P.B. und **MOTZKUS, D.** (2000) The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp Cell Res* **254**:72-79.

MOTZKUS, D., MARONDE, E., GRUNENBERG, U., LEE, C.C., FORSSMANN, W.G. und ALBRECHT, U. (2000). The human *PER1* gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett* **486**:315-319.

Datenbankeintragung

MOTZKUS, D., MARONDE, E., GRUNENBERG, U., LEE, C.C. und ALBRECHT, U. (2000). *Homo sapiens* PER1 (*PER1*) gene, partial cds. EMBL Datenbank, Acc.-Nr.: AF284444.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt wurde. Zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen habe ich vollständig angegeben. Ich versichere ferner, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Dirk Motzkus

Hannover, den 30.01.2001