

Natalie Mena  
Dr. med. dent.

## **Regulation der circadianen Uhr durch die zelluläre Signaltransduktion**

Geboren am 29.11.1981 in Pforzheim  
Staatsexamen am 27.11.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Biochemie  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. Michael Brunner

Die circadiane Uhr reguliert ein weites Spektrum physiologischer Aktivitäten, wie beispielsweise den Schlaf-Wachrhythmus, Herzfrequenz, Blutdruck, Körpertemperatur, Metabolismus, neuronale Aktivität, die Zellproliferation und viele weitere Prozesse. Der circadiane Oszillator wird mit den Licht- und Temperaturzyklen von Tag und Nacht synchronisiert, hält aber auch ohne äußere Stimuli eine autoregulatorische Oszillation aufrecht und stellt damit eine echte molekulare Uhr dar. Die circadiane Uhr wird von Transkriptionsfaktoren aufgebaut, die nicht nur ihre eigene Transkription oszillierend regulieren, sondern auch die genomweite Transkription vieler regulatorischer Schlüsselgene. Auf diese Weise wird eine Synchronisation vitaler physiologischer Prozesse miteinander und mit den äußeren Zyklen von Tag und Nacht erreicht. Das circadiane System setzt sich im Wesentlichen aus drei Bestandteilen zusammen: dem zentralen Oszillator, welcher den Rhythmus erzeugt, Input-Komponenten, welche äußere Stimuli (Licht und Temperatur) aufnehmen und Output-Komponenten, die circadian kontrollierte Prozesse regulieren. Der circadiane Oszillator in *Drosophila* besteht aus zwei verknüpften Feedbackschleifen: einer PER/TIM-Schleife, die das positive Element der circadian Uhr CLK/CYC durch direkte Bindung inhibiert und einer Schleife mit den Transkriptionsfaktoren VRI und PDP1, die die CLK Transkription rhythmisch kontrollieren. Innerhalb dieser Feedbackschleifen wird die Transkription von Clock-Genen durch negative Rückkopplung rhythmisch reguliert. Posttranslationale Mechanismen kontrollieren die Aktivität und die zelluläre Lokalisation der Clock-Proteine und sind für die temporale Kontrolle der circadianen Oszillation sowie für die Konstitution einer molekularen Uhr essentiell. Bisher ist die Regulation der nukleären Lokalisation sowie der Aktivität von CLK in *Drosophila* und in Säugern nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Mutationen in verschiedene funktionell entscheidende Gensequenzen des circadianen CLK-Proteins eingebaut, um NLS und NES Sequenzen, sowie funktionell relevante Phosphorylierungsstellen zu identifizieren. Nach Untersuchung dieser Mutanten unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten neue Erkenntnisse zu funktionell relevanten Signalsequenzen und zur Regulation der zellulären Lokalisation des CLK Proteins gefunden werden. Die Ergebnisse zeigen, dass CLK ein nukleo-cytoplasmatisches Shuttling durchläuft. Es konnten zwei funktionell relevante nukleäre Lokalisationssequenzen identifiziert werden, die für die nukleäre Lokalisation von CLK essentiell sind. Zudem konnte eine nukleäre Export Sequenz nachgewiesen werden. Mithilfe von Luciferaseassays wurde die Aktivität der Mutanten vermessen. Erstmals konnten funktionell relevante Phosphorylierungsstellen im CLK Protein ausfindig gemacht werden, die für die Regulation der zellulären Lokalisation und Aktivität von CLK als Transkriptionsfaktoren wichtig sind. Somit wurden essentielle Schritte im nukleo-cytoplasmatischen Shuttling des CLK-Proteins identifiziert. Es gelang der Nachweis, daß die posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung eine regulatorische Funktion für die zelluläre Lokalisation und Aktivität des CLK-Proteins besitzt.