

Christoph Rademacher
Dr. med.

Kasein Kinase I kontrolliert den nuklearen Import und die Aktivität des CLOCK Proteins

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Michael Brunner

In allen Lebensformen haben sich analog aufgebaute, circadiane Uhren entwickelt, die eine Antizipation der periodischen Veränderungen der Lebensbedingungen mit den Tag/Nacht-Zyklen ermöglichen. Circadiane Uhren regulieren die Transkription und Aktivität zahlreicher Gene und kontrollieren auf diese Weise ein breites Spektrum homeostatischer Funktionen. Miteinander verzahnte negative Rückkopplungsschleifen stellen auf zellulärer Ebene das Herz der circadianen Uhr dar. Das zentrale Element dieser Rückkopplungsschleifen bildet in *Drosophila melanogaster* und in Säugern der heterodimere Komplex der Transkriptionsfaktoren CLOCK (CLK) und CYCLE (CYC). Erst in den letzten Jahren zeigte sich, dass neben der Kontrolle auf transkriptioneller Ebene auch der posttranslationalen Modifikation von Uhren-Proteinen eine entscheidende Bedeutung für die Regulation der circadianen Uhr zukommt. Während die posttranslationale Modifikation einiger Uhren-Proteine schon intensiv untersucht wurde, ist nur wenig über die Regulation des CLK Proteins bekannt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Kasein Kinase I (CKI) zur Hyperphosphorylierung des CLK Proteins beiträgt, die mit der Inaktivierung und dem Abbau des Transkriptionsfaktors korreliert.

In dieser Arbeit gelang durch Alanin Scanning die Identifizierung funktioneller Kasein Kinase I Phosphorylierungs-Sequenzen im CLK Protein. Es konnte gezeigt werden, dass die Konsensus-Phosphorylierungsstellen 400-410 und T264, S268 an der Regulation von Aktivität und Lokalisation des CLK Proteins beteiligt sind. Für die Konsensus Sequenz 500-510 ließ sich eine Kontrolle der transkriptionellen Aktivität des CLK Proteins nachweisen. Pharmakologische Inhibierung von Kasein Kinase I durch den Inhibitor IC261 führte zu einer Reduktion der transkriptionellen Aktivität und einer stärker zytoplasmatischen Lokalisation des CLK Proteins. Die Ergebnisse der Inhibitor-Untersuchungen bestätigen damit die Mutations-Studien der Konsensus-Phosphorylierungs-Sequenzen und weisen auf eine CKI vermittelte Kontrolle des nuklearen Imports und der Aktivität des CLK Proteins hin.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivität des CLK Proteins CKI vermittelt inhibiert wird. In dieser Arbeit gelang der Nachweis einer CKI vermittelten Aktivierung des CLK Proteins. Dies weist auf eine doppelte Funktion von Kasein Kinase I für die Regulation von CLK hin: zum einen aktiviert und zum anderen inhibiert CKI die CLK/CYC Aktivität.

Weiterhin konnte eine direkte Phosphorylierung von CLK durch Glycogen Synthase Kinase 3 β /Shaggy (SGG) nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass neben CKI auch GSK 3 *in vitro* zur Akkumulation hyperphosphorylierter Formen des CLK Proteins beiträgt. Zudem konnte die funktionelle GSK 3 Phosphorylierungsstelle Threonin264 im CLK Protein identifiziert werden, die an der Kontrolle von Aktivität und Lokalisation von CLK beteiligt ist. Dies deutet auf eine posttranslationale Modifikation des CLK Proteins durch die Kinase SGG hin. Untersuchungen der kombinierten GSK 3/CKI Konsensus-Phosphorylierungsstelle T264, S268 wiesen auf eine Bedeutung für die Regulation der CLK/CYC Interaktion hin.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente haben zum Verständnis der posttranslationalen Kontrolle des CLK Proteins beigetragen, welche für die exakte zeitliche Regulation der circadianen Uhr von essentieller Bedeutung ist.