

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
an der mathematisch-naturwissenschaftlichen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
Jens Keienburg
aus Oberhausen (nordrheinisch)

Tag der mündlichen Verteidigung: 08. November 2013

Biochemische und numerische Analyse der Temperaturwirkung
auf das transiente Verhalten des molekular-genetischen Uhrsystems
in *Neurospora crassa*

Gutachter: Prof. Dr. Roland Eils
Prof. Dr. Victor Sourjik

Betreuung

Prof. Dr. Roland Eils (Erstbetreuer)

1.) Abteilung für Bioinformatik und funktionelle Genomik

Institut für die quantitative Analyse von molekularen und zellulären Biosystemen (BioQuant) und

Institut für Pharmazie und molekulare Biotechnologie (IPMB)

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 267, 69120 Heidelberg

2.) Abteilung für theoretische Bioinformatik

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg

Prof. Dr. Dr. h.c. Hans Georg Bock und Akad. Dir. Dr. Johannes P. Schlöder

Forschungsgruppe Simulation und Optimierung

Interdisziplinäres Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen (IWR)

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 368, 69120 Heidelberg

Dr. Stefan Körkel

Junior Research Group Optimum Experimental Design

Heidelberg Graduate School of Mathematical and Computational Methods for the Sciences

Interdisziplinäres Zentrum für Wissenschaftliches Rechnen (IWR)

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 368, 69120 Heidelberg

Prof. Dr. Michael Brunner

Forschungsgruppe für zirkadiane Rhythmik und molekulare Uhren

Biochemiezentrum Heidelberg (BZH)

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Im Neuenheimer Feld 328, 69120 Heidelberg

Würdigung

Meine Anerkennung gilt zunächst vor allem Herrn Professor Dr. Roland Eils, der mir durch das Angebot dieses analytischen Genetik-Projekts eine nahtlose Vertiefung meiner Studienrichtung in Molekularer Biotechnologie (Systembiologie) sowohl in finanzieller, koordinativer wie auch wissenschaftskritischer Weise ermöglicht hat. Dabei möchte ich auch die Reichweite seines Engagements im Rahmen der Tätigkeiten als BioQuant-Institutsdirektor sowie als Koordinator nationaler Systembiologie-Konsortia herausheben. In besonders junger Erinnerung wird mir stets die von ihm im Jahre 2004 im prachtvollen Heidelberger Kongresshaus organisierte ICSB bleiben, bei der ich die Biologie zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Licht einer international heranwachsenden Technologiewissenschaft erlebt habe und dabei einen der unternehmerisch wohl vorbildlichsten Systembiologen, Dr. Bernhard Ø. Palsson, für mein späteres und im gleichen Sinne besonders beeindruckendes Praktikum im kalifornischen La Jolla kennengelernt habe. Von Herrn Professor Eils Mitarbeitern möchte ich speziell Herrn Professor Dr. Rainer König, Herrn Dr. Hauke Busch, Herrn Sven Mesecke, Herrn Dr. Joël Beaudouin und Frau Dr. Michaela Reichenzeller danken, die mir durch Betreuung bei Praktika und M.Sc.-Arbeit viele hochspannende Einsichten in die experimentelle und theoretische Systembiologie ermöglicht haben. Für die Zeit während meiner Doktorarbeit möchte ich mich bei allen Teilnehmern des Gruppenseminars um Herrn Dr. Beaudouin, also Herrn Dr. Beaudouin selbst, Herrn Dr. Hauke Busch, Frau Dr. Michaela Reichenzeller, Frau Dr. Hannah Schmidt-Glenewinkel, Herrn Dr. Stefan Legevie, Herrn Sven Mesecke, Herrn Dr. Leo Neumann, Herrn Stefan Kallenberger, Frau Dr. Johanna Berndt, Frau Clarissa Liesche, Frau Dr. Paula Gonzalez und Herrn Dr. Marti Bernado für den wissenschaftlichen Austausch und die hilfreiche Kritik und desweiteren bei Herrn Dr. Beaudouin, Frau Dr. Michaela Reichenzeller und Frau Sabine Aschenbrenner für die Organisation im Labor bedanken. Ebenfalls möchte ich mich allgemein bei allen wissenschaftlichen Kollegen des BioQuant-Instituts sowie der „Eils-Labs“ für die positive Atmosphäre bedanken.

Desweiteren gilt meine Anerkennung der Gruppe von Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Hans Georg Bock, bei der ich sowohl während meines Studiums wie auch während dieser Doktorarbeit einen Großteil meiner grundlegenden Mathematikkenntnisse, insbesondere der Numerik und Optimierung erworben habe. Hierbei sei auch speziell der Einsatz von Herrn Professor Dr. Moritz Diehl genannt, der mich in Vorlesung und Seminararbeit frühzeitig an die Mathematik der Optimierung herangeführt hat. Während dieser Doktorarbeit waren es insbesondere Herr (Akad. Dir.) Dr. Johannes Schlöder, der mich kritisch begleitet hat,

und Herr Dr. Stefan Körkel und Herr Christian Hoffmann, die mich in technischen Fragen bei der Anwendung von PARFIT/VPLAN unterstützt haben.

Herrn Professor Dr. Michael Brunner möchte ich für die hilfreiche Projektberatung sowie für das Angebot der Labormitbenutzung danken. Insbesondere seine Mitarbeiterin Frau Dr. Barbara Di Ventura und seine Mitarbeiter Herr Dr. Axel Diernfellner, Herr Dr. Tobias Schafmeier und Herr Dr. Erik Malzahn standen mir oftmals im Labor bei Fragen zur Seite.

Die preisgekrönte Zusammenarbeit mit Herrn Professor Eils, Herrn Professor Dr. Victor Sourjik, Frau Dr. Michaela Reichenzeller, Frau Dr. Barbara Di Ventura, Herrn Dr. Nathan Brady und Herrn Dr. Dirk Grimm einschließlich ihrer Doktoranden bei der Betreuung der drei Heidelberger iGEM-Mannschaften in synthetischer Genetik haben meine wissenschaftlichen Erfahrungen während meiner Doktorarbeit in sicherlich außergewöhnlicher Weise derartig ergänzt, dass ich über den Horizont dieser analytisch geprägten Doktorarbeit hinaus auch die sich anschließenden Perspektiven innerhalb der molekularen Biotechnologie einsehen konnte. Meine Würdigung gilt dahingehend insbesondere Herrn Professor Eils, dass durch dessen Vertrauen die Organisation der drei Mannschaften erst möglich wurde. Mein Dank sowie meine Anerkennung gilt desweiteren allen denjenigen, die in den drei iGEM-Mannschaften so sehr mit Rat und Tat mitgeefert haben und die den Besuch am Massachusetts Institute of Technology zu einem so besonderen Erlebnis gemacht haben.

Ebenfalls möchte ich meinem Studienfreund und gleichzeitig fachlichem Konkurrenten Dr. Samuel Bandara für viele wissenschaftliche Anregungen danken. Auch den Einsatz von Herrn Professor Dr. Michael Wink als Studiendekan der Molekularen Biotechnologie für einen interdisziplinären Studiengang mit Schwerpunkten in den für die Systembiologie elementaren Disziplinen des wissenschaftlichen Rechnens, der biophysikalischen Chemie und der Biochemie/Pharmakologie möchte ich an dieser Stelle noch einmal allgemein mit Anerkennung nennen.

Nicht zuletzt möchte ich von ganzem Herzen meiner gesamten Familie danken, die mich - mit Gottes Hilfe - für diese Arbeit in christlichem Glauben so entscheidend vorgeprägt hat. Bei allen wissenschaftlichen Rätseln barg diese Arbeit für mich denn auch eine religiöse Dimension: „Dem Lebendigen Geist“ lauten die Lettern, die ich nun durch das Fenster meines Laboratoriums hindurch lesen kann. Zwar ist die Frage nach dem „Geist“ des Lebendigen gerade Gegenstand der Biologie, jedoch ist die Widmung der Ruperto-Carola wohl nur religiös zu verstehen, heute lässt sie mich jedenfalls mit Ehrfurcht an meinen Wahlvers zur Konfirmation aus dem Matthäus-Evangelium (Kapitel 4, Vers 4) zurückdenken: „Der Mensch lebt nicht vom Brot allein, sondern von einem jeden Wort, das aus dem Munde Gottes kommt.“ In dieser Schuld möchte ich die Worte, die mich während dieser Arbeit geleitet haben, im Herzen forttragen.

Zusammenfassung

Der Fungus *Neurospora crassa* ist ein etablierter Modellorganismus zur Untersuchung des molekular-genetischen Netzwerks um das tagesrhythmisch schwingende Gen *frequency* (*frq*). Dieses Netzwerk besitzt als sensorisches Bindeglied zu den umgebenden Temperatur- und Lichtbedingungen eine regulierende Signalwirkung für zahlreiche tagesabhängige zell-physiologische Prozesse wie zum Beispiel die Sporenbildung. Dabei ist in den letzten Jahren der Mechanismus der Temperaturwirkung mit wachsendem Interesse untersucht worden und es konnte unter anderem gezeigt werden, dass das Splicing der *frq*-mRNA eine hohe Temperaturabhängigkeit besitzt, wodurch eine Regulierung der Periodenlänge und der Phase der Schwingung durch Änderungen in der Umgebungstemperatur und damit vermutlich auch die Temperaturkompensation, also die Eigenschaft einer konstanten Periodenlänge bei unterschiedlichen Temperaturen, ermöglicht wird. In theoretischen Studien wurde jedoch auch gezeigt, dass für die Temperaturkompensation mehr als eine biochemische Reaktion für Temperaturänderungen sensitiv sein müssen. Eine wesentliche Frage liegt demnach darin, welche biochemischen Reaktionen eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber der Temperatur besitzen.

In dieser Arbeit wird über eine biochemisch-quantitative Analyse der Verlauf der *frq*-Transkript- sowie der FRQ-Proteinmenge bei einem Temperaturanstieg von 18 auf 28°C gemessen und mit dem ebenfalls gemessenen Verlauf bei konstanter Temperatur von 25°C verglichen. Durch die Verwendung von bis zu zwölf technischen Replikaten können die Daten der *frq*-mRNA-Messung dabei in Anbetracht der *t*-Statistik mit einer um bis zu fünf Mal höheren Auflösung im Vergleich zu einer Einzelmessung ausgewertet werden und auf diese Weise bereits entsprechend kleinere Änderungen in der mRNA-Menge registriert werden. Desweiteren wird die biologisch-intrinsische Standardabweichung der *frq*-mRNA-Menge gemessen und in der Analyse mit berücksichtigt.

Die Messungen der *frq*-mRNA- und der FRQ-Proteinmengen zeigen in beiden Fällen einen unmittelbaren Anstieg nach der Temperaturerhöhung, so dass nicht unmittelbar ersichtlich ist, ob die Temperatur auf die Transkription, die Translation oder beide Prozesse wirkt. Zur numerischen Analyse wird die *frq*-Genexpression auf der Basis eines gewöhnlichen Differentialgleichungssystems zunächst als dreistufige Rückkoppelungsschleife modelliert. Dabei wird auf den Transkriptionsfaktor White-Collar-Complex (WCC) Bezug genommen, dessen aktivierende Wirkung auf die *frq*-Genexpression durch steigende Mengen phosphorylierten FRQ-Proteins gehemmt wird. Mit diesem in der Literatur bereits erprobten Goodwin-Modell ist es nach einer numerischen Parameterschätzung möglich,

die Messdaten der *frq*-mRNA- und FRQ-Proteinmengen bei konstanter Temperatur im Rahmen der Standardabweichung zu simulieren. Eine Simulation der Messdaten mit Temperaturanstieg kann mit diesem Modell jedoch selbst mit Temperatursensitivität in allen Reaktionsraten nicht erreicht werden, dies wird erst durch die Einführung einer zusätzlichen Variablen zwischen der Transkription und der Translation möglich. Mit Hilfe dieses vierstufigen Modells wird schließlich eine Sensitivitätsanalyse der einzelnen biochemischen Reaktionen hinsichtlich der Temperatur durchgeführt. Das Ergebnis bestätigt die primäre Wirkung über einen post-transkriptionalen Mechanismus und es zeigt, dass der Anstieg in der Transkriptmenge nach dem Temperaturanstieg auf die Rückkoppelungswirkung über WCC zurückzuführen ist. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass zusätzlich eine Temperatursensitivität im Transkriptionsmechanismus vorliegt.

Abstract

Biochemical and numerical analysis of the temperature influence on the transient behavior of the molecular-genetic clock system in *Neurospora crassa*

The fungus *Neurospora crassa* is an established model organism for the investigation of the molecular-genetic network around the gene *frequency* (*frq*), which oscillates with a day rhythm. This network possesses as sensoric connection to the environmental temperature and light a regulatory signalling influence on numerous cell-physiological, day-dependent processes such as sporulation. Within the last years the mechanism of the temperature influence has been investigated with growing interest, and it could already be shown that the splicing of *frq* mRNA is dependent on temperature, which allows a regulation of the phase and period length of the oscillation by changes in ambient temperature and which is thus presumably also relevant for temperature compensation, *i.e.* the capability of maintaining period length at different temperatures. However, in theoretical studies it could also be shown that several reactions need to be temperature dependent for the property of temperature compensation. A crucial question therefore is, which biochemical reactions possess a particularly high sensitivity towards temperature.

In a biochemical-quantitative analysis of this work the course of the *frq* transcript as well as the FRQ protein amount is measured at a temperature increase from 18 to 28°C and compared with the likewise measured behavior at constant temperature of 25°C. By utilizing up to twelve technical replicates the data of the *frq* mRNA measurement can - with regard to the *t* statistics - be analyzed with an increase in resolution by a factor of five in comparison to a single measurement. It is in this way possible to recognize already smaller changes in the mRNA amount. Furthermore, the biologically intrinsic standard deviation of the *frq* mRNA amount is measured and considered in the analysis.

The measurement of the *frq* mRNA and the FRQ protein amounts shows in both cases an immediate increase after the temperature rise, and it is not directly recognizable, whether the temperature influences transcription, translation, or both processes. For the numerical analysis the *frq* gene expression is modelled on the basis of ordinary differential equations as a three-level feedback loop. The model refers biochemically to the transcription factor White-Collar-Complex (WCC), whose activating influence on the *frq* gene expression is inhibited by increasing amounts of phosphorylated FRQ protein. With this in the literature already proven Goodwin model it is after a numerical parameter estimation possible to simulate the measurement data of the *frq* mRNA and the FRQ protein amounts at constant

temperature within the boundaries of the measurement standard deviation. A simulation of the measurement data with temperature rise is with this model however even with temperature sensitivity in all reaction rates not achievable, this is only possible after the introduction of an additional variable between transcription and translation. With the aid of this four-level model the sensitivities of the individual, biochemical reactions towards temperature are finally calculated. The result confirms the primary influence through a post-transcriptional mechanism and shows that the increase in the mRNA amount after the temperature rise is caused by the feedback effect via WCC. The results however also indicate that an additional temperature sensitivity exists on the transcriptional level.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung der numerischen Analyse von molekularbiologischen Systemen	1
1.2	Ziel dieser Arbeit	1
1.3	Gliederung dieser Arbeit	2
2	Das molekular-genetische Uhrsystem in Neurospora crassa	3
2.1	Die taxonomische Einordnung und der Lebenszyklus von Neurospora crassa	3
2.2	Tagesrhythmische Konidiation	4
2.3	Der Transkriptionsfaktor White-Collar-Complex	4
2.4	Die Photosensoren Vivid und WC-1	7
2.5	Struktur und Interaktionen des tagesrhythmisch schwingenden Gens frequency	7
2.6	Die Oszillation des frq-Gens durch negative Rückkoppelung	9
2.7	Temperaturempfindlichkeit und -kompensation	10
2.8	Physiologische Regulation durch das Uhrsystem	11
2.9	Konservierte Einheiten des molekular-genetischen Uhrsystems	11
3	Biophysikalische Reaktionsmodelle und numerische Methoden der Modellanalyse und Parameterschätzung	13
3.1	Physikalische Herleitung der Reaktionskinetik	13
3.2	Das Goodwin-Modell mit Temperatursensitivität	16
3.3	Numerische Integrationsverfahren	17
3.3.1	Lösbarkeit von Differentialgleichungen	17
3.3.2	Einschrittverfahren	18
3.4	Numerische Optimierung mit Newton-Verfahren	19
3.5	Verfahren der Parameterschätzung bei gewöhnlichen Differentialgleichungen	21
3.5.1	Ausgleichsproblem nach Gauß	21
3.5.2	Gauß-Newton-Verfahren	22
3.5.3	Statistisches Konfidenzkriterium	24
3.5.4	Steuerungen	26
3.5.5	Das Rechenprogramm VPLAN/PARFIT	26

4	Methoden der biochemisch-quantitativen Analyse	29
4.1	Zellkultur	29
4.1.1	Gewinnung von Makrokonidien	29
4.1.2	Gewinnung von Myzelium und grundlegende Messbedingung	29
4.2	frq-mRNA-Analyse	30
4.2.1	Quantitative RT-PCR	31
4.3	Technische Details der qRT-PCR	32
4.3.1	Varianz- und Replikarten	33
4.3.2	Datennormalisierung (Pipettierschema)	38
4.3.3	Bewertung des Unterschieds zweier Mittelwerte (Auflösung) mit t-Statistik	42
4.3.4	Biologische Varianz bei der numerischen Parameterschätzung	44
4.4	Proteinmessung	45
4.4.1	Proteinextraktion	45
4.4.2	SDS-PAGE und Western Blot	46
4.4.3	Normalisierung	46
5	Experimentelle Messungen und Varianzanalyse	47
5.1	Übersicht über experimentelle Messreihen	47
5.1.1	Grundtypisches Verhalten	47
5.1.2	Biologisch-intrinsische Varianz und Startwertermittlung	47
5.1.3	Temperaturszenarien	48
5.2	Detaillierte Ergebnisse aller Messreihen	48
5.2.1	Messreihe CDE13	48
5.2.2	Messreihe CDE05	49
5.2.3	Messreihe CDE14	50
5.2.4	Messreihe CDE15	50
5.2.5	Messreihe CDE19	52
5.2.6	Messreihe CDE18	53
5.2.7	Messreihe CDE07	54
5.2.8	Messreihe CDE08	55
6	Numerische Analyse der experimentellen Messungen	71
6.1	Modellierung und Simulation der Messreihe mit konstanter Temperatur	71
6.2	Modellierung und Simulation der Messreihe mit Temperaturanstieg	72
6.3	Analyse der Temperatursensitivität	75
7	Diskussion und Ausblick	82
7.1	Rückschlüsse auf die biochemischen Reaktionsmechanismen	82
7.2	Möglichkeit der numerischen Versuchsplanung zur Modellverfeinerung	83
	Literatur	90

8 Anhang 1	91
8.1 Analyse technischer Rauschursachen während der mRNA-Messung	91
8.1.1 DNA- und RNA-Degradation	91
8.1.2 Vergleich von DNA- und RNA-Verdünnungsreihen	91
9 Anhang 2	93
9.1 Geräte und Chemikalien	93
10 Anhang 3	97
10.1 Quantitative PCR	97
10.1.1 Sequenzen von Primern and Sonden	97
10.1.2 Genomische Alinierung von Primern und Sonden	97

Einleitung

1.1 Bedeutung der numerischen Analyse von molekularbiologischen Systemen

Das präziser und umfassender werdende Wissen um die Wechselwirkungen der molekularen Bestandteile einer biologischen Zelle hat im Verlauf der letzten zehn Jahre zunehmend rechenintensive Analysen mit in die Wissenschaft einbezogen. Eine besondere Stellung hat dabei die Modellierung auf der Basis von gewöhnlichen Differentialgleichungen eingenommen, denn diese erlaubt eine Simulation des zeitlichen Verhaltens der molekularbiologischen Systeme. Mit Hilfe eines solchen Modellierungsansatzes war es beispielsweise möglich, unterschiedliche Strukturen des Chemotaxis-Netzwerks in *Escherichia coli* hinsichtlich ihrer Robustheit gegenüber Schwankungen in den Mengen der einzelnen Netzwerkkomponenten miteinander zu vergleichen, um dann eine Hypothese über den Aufbau des tatsächlichen Systems zu formulieren [1]. In einem anderen Projekt der Krebsforschung konnte auf der Basis eines Differentialgleichungsmodells ein Entscheidungsmechanismus im CD95-Signalweg zwischen der Apoptose- und der $\text{Nf}\kappa\text{B}$ -Induktion formuliert werden [2]. Als drittes Beispiel sei eine Studie zum Mechanismus der Erythropoetin-Signaltransduktion in menschlichen, erythroiden Vorläuferzellen genannt, bei der über einen Vergleich zwischen theoretischer und experimenteller Analyse das hochdynamische Verhalten des Erythropoetin-Rezeptors hinsichtlich seiner zellulären Lokalisation nachvollzogen und damit das Verständnis des gesamten Signalmechanismus verbessert werden konnte [3]. Diese drei Projekte repräsentieren zwar nur einen Bruchteil der existierenden Literatur auf dem Gebiet zwischen angewandter Numerik und Molekularbiologie, sie verdeutlichen jedoch beispielhaft den Nutzen rechenbasierter Analysen. Einen besonderen Stellenwert besitzt die numerische Analyse desweiteren im Bereich der synthetischen Genetik, denn hier können die Eigenschaften der zu entwickelnden Systeme oft nur über einen theoretischen Ansatz vorhergesehen werden [4]. Auch in dieser Arbeit wird die numerische Analyse einen wesentlichen Anteil an den Ergebnissen beitragen.

1.2 Ziel dieser Arbeit

Die tagesrhythmische Schwingung des *frequency*-Gens (kurz *frq*) im Pilz *Neurospora crassa*, welche für die tageszeitliche Regulation zahlreicher, zellphysiologischer Prozesse verantwortlich ist, basiert primär auf einem negativen Rückkoppelungsmechanismus über den Transkriptionsfaktor White-Collar-Complex (WCC), der durch steigende Mengen von FRQ-Protein phosphoryliert und dessen Bindung an den *frq*-Promoter damit gehemmt wird [5–7]. Die Phase dieser Schwingung lässt sich durch Temperaturveränderungen von außen verändern, wodurch der Pilz in die Lage versetzt wird, anhand von

tagestypischen Temperaturveränderungen seinen inneren, zirkadianen Rhythmus anzupassen [8]. Dabei ist im Verlauf der letzten Jahre zunehmend auch der Mechanismus der Temperaturwirkung genauer untersucht worden [9–13]. Insbesondere stellt sich bis jetzt die Frage, auf welche Reaktionen beziehungsweise Reaktionseinheiten die Temperaturveränderung besonders intensiv wirkt, denn zur Fähigkeit der Temperaturkompensation sind mehrere temperatursensitive Reaktionen erforderlich [14]. Im Rahmen dieser Arbeit wird experimentell die zeitlich unmittelbare (transiente) Wirkung eines Temperaturanstiegs auf den Verlauf der *frq*-mRNA- und der FRQ-Proteinmengen untersucht. Dabei soll insbesondere quantitativ analysiert werden, ob der Temperaturanstieg bereits auf transkriptionaler Ebene wirkt. Zwar wurde eine solche biochemische Messung bereits mit einer geringeren Messauflösung durchgeführt [9], die theoretischen Modellierungen und Analysen bezogen sich jedoch immer auf das *frq*-mRNA und FRQ-Protein-Verhalten unter konstanten Temperaturbedingungen [15]. Mit Hilfe der gemessenen Daten wird in dieser Arbeit die Rückkoppelungsschleife auf der Basis eines Differentialgleichungssystems modelliert. Mit diesem Modell wird schließlich eine numerische Analyse Aufschluss über die Sensitivität jeder einzelnen Reaktion für Änderungen in der Temperatur bringen.

1.3 Gliederung dieser Arbeit

Zur Einführung in den fachlichen Hintergrund dieser Arbeit werden in Kapitel 2 zunächst die grundlegende Biologie von *Neurospora crassa* sowie der wissenschaftliche Stand des molekular-genetischen Uhrsystems wiedergegeben. In Kapitel 3 werden dann der physikalisch-chemische Hintergrund der Reaktionsmodellierung und im direkten Anschluss die Methoden der Numerik zur Simulation und Parameterschätzung erläutert. In Kapitel 4 wird dann ein Überblick über die Methodik der biochemisch-quantitativen Analytik gegeben. Ein besonderes Anliegen dieser Arbeit ist eine Verbesserung der technischen Auflösung in der mRNA-Messung. Konkret wird dazu über eine Anzahl von bis zu zwölf technischen Replikaten im Vergleich zur Einzelmessung sowohl die Standardabweichung des gemessenen Mittelwertes verringert als auch die Standardabweichung selbst mit einer höheren Zuverlässigkeit geschätzt. Wie in Kapitel 4 eingehend erläutert wird steigt durch die höhere Replikatzahl die Auflösung zwischen zwei gemessenen Mittelwerten um einen Faktor von bis zu fünf. In Kapitel 5 werden dann alle experimentellen Messungen im Detail präsentiert und mit einer ersten Auswertung abgeschlossen. Dabei steht der Vergleich zwischen den Messreihen mit Temperaturanstieg von 18 auf 28°C und der Messreihe mit konstanter Temperatur im Mittelpunkt. Zusätzlich wird in diesem Kapitel auch die Höhe der biologisch-intrinsischen Standardabweichung der *frq*-mRNA-Menge bestimmt. In Kapitel 6 erfolgt dann eine physikalisch-chemische Modellierung auf der Basis gewöhnlicher Differentialgleichungen. Das Modell wird dann mit einer numerischen Parameterschätzung an die experimentellen Messdaten angepasst und erlaubt anschließend eine Sensitivitätsanalyse für Temperaturänderungen der einzelnen Reaktionen des Uhrsystems.

Das molekular-genetische Uhrsystem in *Neurospora crassa*

2.1 Die taxonomische Einordnung und der Lebenszyklus von *Neurospora crassa*

Neurospora crassa gehört zum Reich der Fungi und stellt dort einen der bedeutendsten Modellorganismen der biologischen Wissenschaften dar [16]. Gemeinsames Merkmal aller Pilze ist vor allem die Zellwand, die aus einem Netz von Chitin, Glucanen (alpha- und beta-1,3-Glucan) und Mannanen aufgebaut ist [17, Kapitel 5]. In der nächst feineren Einteilung zählt *Neurospora crassa* zur Abteilung der Ascomyceten (Schlauchpilze), zu denen auch *Saccharomyces cerevisiae* gehört. Innerhalb der Ascomyceten entfällt *Neurospora crassa* auf die sogenannten Pyrenomycota. Diese besitzen sowohl einen vegetativen wie auch einen rekombinierenden Lebenszyklus, wobei sich im rekombinierenden Zyklus das für die Pyrenomyceten charakteristische Perithecium, der Fruchtkörper mit den sogenannten Schlauch- oder Ascosporen, bildet [18, Kapitel 16]. Das Perithecium wird im Rahmen der etwas größeren Abteilung der Ascomyceten auch als Ascocarp (lat. Schlauchkörper) bezeichnet. Während der meist vorherrschenden vegetativen Phase liegen die Ascomyceten jedoch als ein Geflecht von haploiden Hyphen vor, dieses wird als Myzelium bezeichnet.

Neurospora crassa ist ein heterothalischer Schlauchpilz, wobei die beiden verschiedenen, miteinander rekombinierbaren Paarungstypen mit mat a und mat A (engl. mating) bezeichnet werden [17, Kapitel 16]. Beide Paarungstypen sind jedoch hermaphroditisch in dem Sinne, dass sie beide zur Bildung eines Protoperitheciums, der Vorstufe zum Perithecium, befähigt sind. Eine Rekombination kann jedoch immer nur mit dem komplementären Paarungstyp stattfinden, wodurch eine Paarung mit sich selbst unterbunden wird. Das Protoperithecium umschließt die sogenannten ascogonischen Hyphen, die über die Trichogynen von einem „männlichen“ Gameten befruchtet werden können. Dabei wird das Ascogonium vom Protoperithecium mit Nährstoffen versorgt. Bei diesem Pilz existieren jedoch keine speziellen Antheridien zur Erzeugung männlicher Geschlechtszellen, stattdessen kann das Ascogonium durch Fragmente von Hyphen, Makrokonidien oder Ascosporen befruchtet werden. Nach der Befruchtung kommt es dann zu einer synchronen Mitose und Bildung einer dikaryotischen Hyphenzelle. Nach einer Karyogamie unterläuft der entstandene, diploide Kern unmittelbar die Meiose und eine zusätzliche Mitose, so dass insgesamt acht haploide Sporen entstehen. Diese Sporen (Ascosporen) werden von einem Schlauch (Ascus) umschlossen und bilden mit anderen Ascis zusammen den Ascocarp beziehungsweise das Perithecium.

Während der vegetativen Phase kommt es zur Bildung von Konidiophoren, welche die ungeschlechtlich erzeugten Makrokonidien enthalten [18, Kapitel 14]. Die Konidiation oder Konidiogenese geht

dabei mit der Bildung von carotinoiden Farbpigmenten einher, wodurch der Pilz seine typisch rötliche Farbe erhält. Die Konidiation wird vor allem durch Licht induziert [19, 20], wobei die Exponation der Hyphen an die Luft sowie der Zugang zu Sauerstoff dabei weitere wichtige Voraussetzungen sind [21–23]. Es konnte gezeigt werden, dass desweiteren insbesondere eine Erschöpfung von Stickstoff- und Kohlenstoffquellen sowie die Austrocknung (Desikkation) einen Schlüsselreiz für die Sporenbildung darstellen [24]. Aber auch bei andauernder Dunkelheit findet eine rhythmische Sporulation statt, die durch die endogene Uhr reguliert wird und welche wiederum durch Licht in ihrer Phase kalibriert wird [25]. Ebenso wie die Bildung der Konidiophoren ist auch die Bildung des Farbpigments, die Carotinogenese, durch Licht induzierbar [26].

2.2 Tagesrhythmische Konidiation

Das makroskopisch am deutlichsten erkennbare phänotypische Merkmal der molekular-genetischen Uhr von *Neurospora crassa* ist die tagesrhythmische Konidiation während der vegetativen Phase, in der *Neurospora crassa* als ein koeozytisches Myzelium wächst. Die rhythmische Sporulation lässt sich in Laufrohren beobachten und messen. Dabei wird eine etwa 60 cm lange und im Durchmesser 1 cm breite, zylindrische Glasröhre mit Agar und Medium versetzt. Auf einer Seite der Röhre werden dann die Konidien angeimpft. Das Wachstum der Hyphen ist entgegen den Nährstoffgradienten gerichtet, so dass die Hyphenbildung nur am wachsenden Rand stattfindet. Das Myzelium des Pilzes wächst so mit einer konstanten Geschwindigkeit entlang der Röhre. Nur dort findet auch die Konidiogenese statt, so dass die rhythmisch induzierte Sporulation regelmäßige, dichte Sporengewebe entlang der Röhre hinterlässt. Da sich während der Inkubationszeit CO₂ in der Röhre anreichern kann, welches die Periode der Rhythmik beeinflusst, wird in der Regel ein besonderer Stamm mit einer Mutation im sogenannten *bd*-Gen verwendet.

Zur besseren Probenaufbereitung werden für molekularbiologische Untersuchungen bevorzugt Flüssigkulturen in Erlenmeyerkolben angesetzt [27–30]. Durch Schütteln des Kolbens kann gewährleistet werden, dass der Pilz gleichmäßig im flüssigen Nährmedium wächst. Erst nachdem das Myzelium ausreichend dicht ist, stoßen vermehrt Hyphen an die Oberfläche und erreichen damit die Luft. Durch das zusätzliche Ersiegen der freien Nährstoffe kommt es dann zur Konidiogenese. Während der ungehemmten Wachstumsphase sind die Bedingungen also (zumindest extrinsisch) räumlich homogen und zeitlich konstant.

2.3 Der Transkriptionsfaktor White-Collar-Complex

Der White-Collar-Complex (WCC) ist ein Heterodimer der Proteine White-Collar-1 (WC-1) und White-Collar-2 (WC-2). WC-1 wird auf Chromosom VII kodiert und hat eine Länge von 1167 Aminosäuren. Entsprechend des Genbank-Eintrags mit der Zugriffsnummer Q01371 besitzt WC-1 drei PAS-Domänen: die PAS-A-Domäne ist eine light-oxygen-voltage-(LOV)-Domäne mit dem konservierten Aminosäuremotiv GXNCRFLQ, durch Reaktion mit einem Flavinmononukleotid entsteht am Cysteinrest ein C(4 α)-Flavincysteinyll-Addukt mit lichtabsorbierender Eigenschaft im blauen Wellenlängenbereich [31]. Die Funktion der PAS-B-Domäne konnte bisher nicht eindeutig zugeordnet

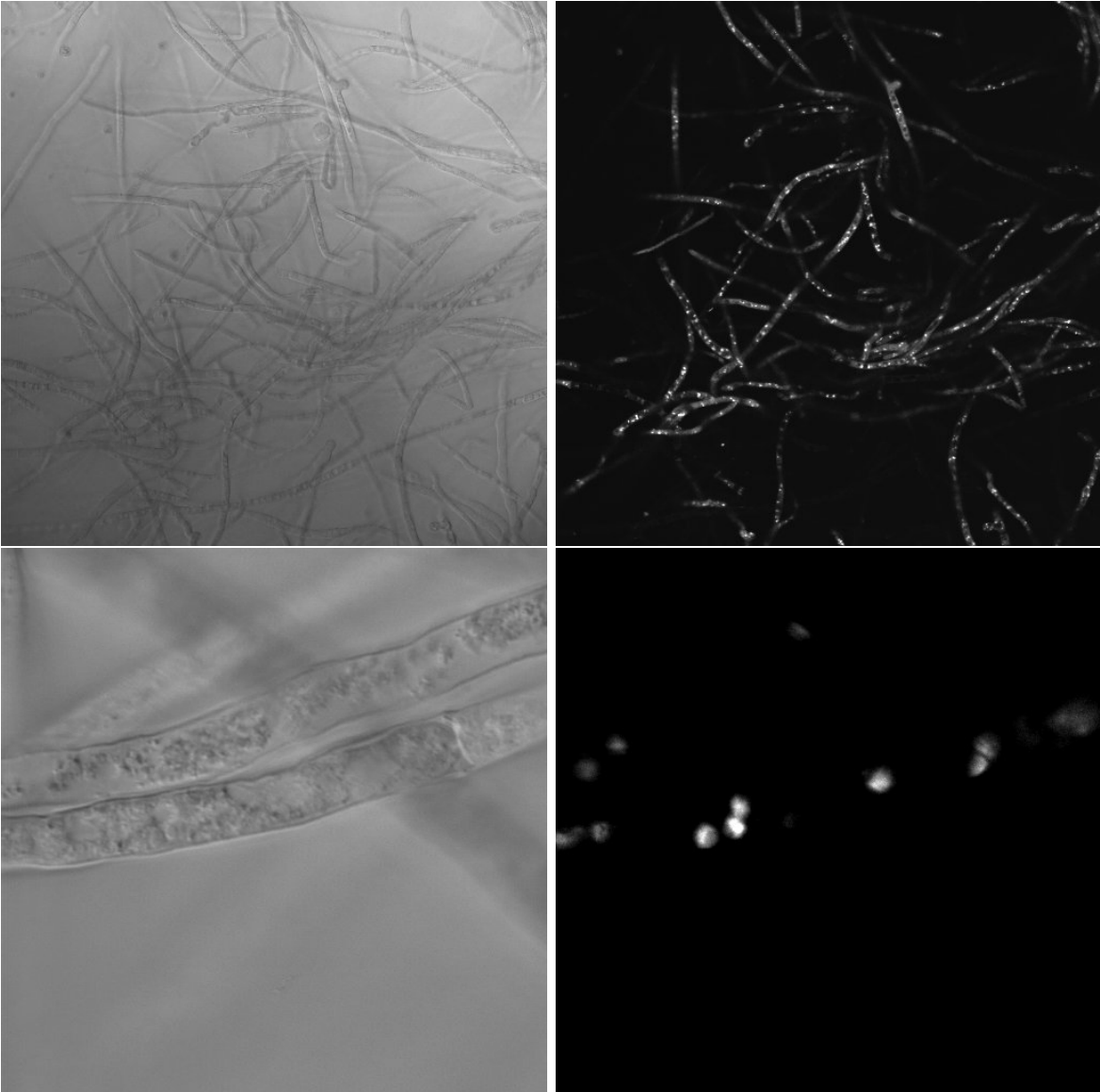


Abbildung 2.1: Linke Seite: Lichtmikroskopische Aufnahmen des koenozytischen Myzeliums. Rechte Seite: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des entsprechenden Bildausschnitts der linken Seite nach Anfärbung der DNA mit DAPI-Farbstoff.

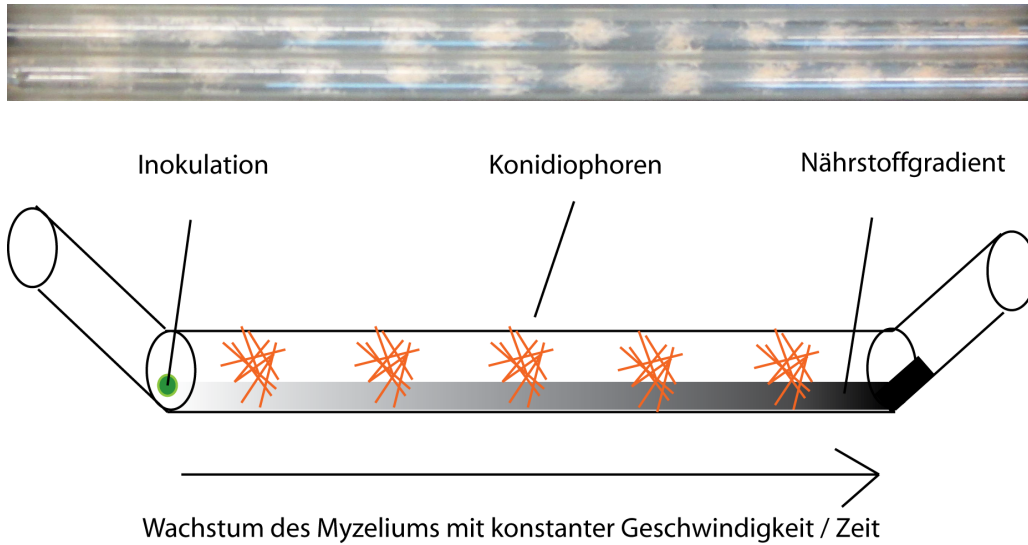


Abbildung 2.2: Oberes Bild: Aufnahme einer Laufröhre von oben mit dem Wildtyp von *Neurospora crassa*. Erkennbar sind die rhythmischen Konididationsbanden in roter Farbe. Unteres Bild: Schematische Darstellung des Prinzips der Laufröhre. Nach Animpfung von Agar-Nährmedium mit Konidien auf der linken Seite der Röhre wächst das Myzelium mit konstanter Geschwindigkeit entlang des Nährstoffgradienten zur rechten Seite. Die Konidiation erfolgt dabei aufgrund der Rhythmik der inneren Uhr in zeitlich regelmäßigen Abständen, was aufgrund der konstanten Wachstumsgeschwindigkeit zur äquidistanten Bildung der Konidiationsbanden führt. Diese Laufröhre wurde von Erik Malzahn freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

werden, und die PAS-C-Domäne, die sich in der Region der Aminosäuren 585 bis 684 befindet, ist für die Bindung des WC-2 erforderlich. Am C-terminalen Ende von WC-1 befindet sich in der Region der Aminosäuren 934 bis 982 die Zinkfinger-Domäne mit einer Bindungsspezifität für die Sequenz GATA. Etwas oberhalb der Zinkfinger-Domäne liegt vermutlich ein nukleäres Lokalisationsignal (NLS), was auf den Transport in den Zellkern hinweist [6].

WC-2 ist mit 530 Aminosäuren (Genbank P78714) wesentlich kürzer als WC-1. Zwischen den Aminosäuren 179 und 253 besitzt es eine zu PAS-C in WC-1 homologe PAS-Domäne, die die Assoziation zum Heterodimer ermöglicht. In der Region der Aminosäuren 467 bis 497 besitzt es eine dem WC-1 entsprechende Zinkfinger-Domäne, die der Erkennung und Bindung einer GATA-Promotorsequenz dient [32]. Ebenfalls oberhalb der Zinkfinger-Domäne befindet sich ein NLS. Aufgrund der gleichen Lokalisation im Zellkern sowie der sich entsprechenden PAS- und Zinkfinger-Domänen bilden WC-1 und WC-2 zusammen ein Zinkfinger-Protein, das an den GATA-Promotorbereich des DNA-Chromatin-Komplexes bindet und transkriptionsaktivierend wirkt. Die Zahl der durch WCC regulierten Gene beläuft sich auf mindestens 400, darunter insbesondere auch die Gene *frq* und *vvd* [33]. Die Dauer bis zur Expression des Zielgen-Transkripts liegt bei der Hälfte dieser Zielgene zwischen 15 und 45 Minuten [34, 35]. Im Gegensatz zum WC-2 ist das WC-1 nur in niedriger Konzentration vorhanden, weshalb es limitierend in der Regulation anderer Gene ist [36].

2.4 Die Photosensoren Vivid und WC-1

Die Phase des molekular-genetischen Uhrsystems wird durch die Belichtung zeitlich angeglichen [37]. Die wichtigsten und am besten untersuchten Photorezeptorproteine in *Neurospora crassa* sind das WC-1 und Vivid. Daneben konnten einige weitere lichtempfindliche Proteine wie Phytochrome, Chrysochromen und Rhodopsin identifiziert werden, deren physiologische Rolle ist bislang allerdings noch nicht eingehend untersucht worden [38]. Der WCC ist der primäre lichtempfindliche Rezeptor, der unter anderem die Konidiogenese und die Carotinogenese nach einem ausreichend starken Lichtimpuls auslöst. Zur Bewahrung der Empfindlichkeit für Änderungen in der Lichtstärke bei unterschiedlichen Ausgangsstärken des Lichts ist das Vivid-Protein ein wichtiger Mitspieler für den Adaptionsmechanismus an unterschiedliche Lichtstärken [39].

Vivid ist ein nur 186 Aminosäuren langes Protein mit einer zum WC-1 konservierten [32, 40] Light-Oxygen-Voltage (LOV)-Domäne, die unter Einstrahlung von blauem Licht am Cysteinrest eine Thioetherbindung mit dem C4-Atom des Kofaktors Flavinadenosindinukleotid ermöglicht [41, 42]. Dadurch wird am C-terminalen Ende eine Kinaseaktivität stabilisiert [43–45]. Die Halbwertszeit dieser kovalenten Bindung liegt im Bereich von etwa fünf Stunden, weshalb der Lichtzyklus im Gegensatz zu dem bei Phototropinen als langsam bezeichnet wird. Die Reversion der kovalenten Bindung im Dunkeln hängt dabei von der Deprotonierung des benachbarten Stickstoffatoms (N5) im Flavin ab [42]. Das *vivid*-Gen unterliegt der Regulation des Transkriptionsfaktors WCC [33]. Es konnte desweiteren über einen yeast-two-hybrid-Assay gezeigt werden, dass WC-1 über die LOV-Domäne sowohl untereinander wie auch mit der LOV-Domäne von Vivid interagiert. Durch die Lichtaktivierung der LOV-Domäne des WC-1 wird zunächst die Dimerisierung des WC-1 begünstigt, gleichzeitig induziert der aktive WCC die *wdv*-Genexpression. Sobald dieses durch Licht aktiviert wird, sequestriert es das limitierende WC-1 kompetitiv und mildert so dessen Aktivität [46]. Auf diese Weise ermöglicht die zum WC-1 zeitverzögerte Aktivität der Vivid-LOV-Domäne einen Adaptionsmechanismus, so dass WC-1 für einen neuen, intensiveren Lichtreiz wieder empfindlich wird [34, 39]. Andere Untersuchungen deuten desweiteren auf eine Homodimerisierung des Vivid hin [47]. Mithilfe der Immunopräzipitation konnte unabhängig eine Interaktion zwischen Vivid und dem Heterodimer WCC nachgewiesen werden, wobei dadurch eine Repression des WCC gemutmaßt wird [48]. Die Funktion des Vivid kann aber auch dahingehend ausgelegt werden, dass es die Robustheit der WC-1-Aktivität gegenüber störenden Lichtquellen erhöht. So konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Vivid zu einer gesteigerten Verschiebung der Konidiationsphase durch einen Lichtreiz nach der Dämmerung beziehungsweise ein Vorziehen der Konidiationsphase durch einen Lichtreiz vor der Dämmerung führen kann [38].

2.5 Struktur und Interaktionen des tagesrhythmisch schwingenden Gens *frequency*

Das *frq*-Gen besitzt zwei Promotorbereiche, die beide der gesamten kodierenden Sequenz für das FRQ-Protein vorangehen. Der stromaufwärts gelegene Promoter wird mit P_u und der stromabwärts gelegene mit P_d bezeichnet. Das Transkript enthält in beiden Fällen zwei Introns, das erste besitzt dabei zwei alternative 5'-Splice-Stellen, eine stromaufwärts von P_d und die andere unmittelbar stromabwärts

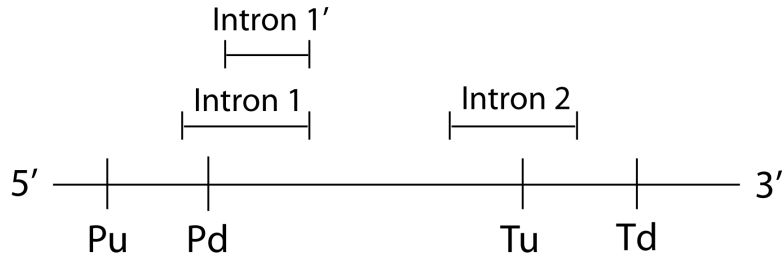


Abbildung 2.3: Relative Karte des *frq*-Gens. Das *frq*-Gen besitzt zwei Promotoren, den stromaufwärts gelegenen P_u sowie den stromabwärts gelegenen P_d . Die vom ersten Promotor aus transkribierte mRNA umfasst zwei Introns I_1 und I_2 , wobei I_1 zwei alternative 5'-Splicestellen besitzt. Die erste Alternative I_1 umfasst den Promotor P_d , die zweite Alternative I_1' liegt dagegen stromabwärts von P_d . Die beiden Translationsstartstellen T_1 und T_2 liegen beide stromabwärts des Introns I_1 , T_1 liegt jedoch innerhalb des zweiten Introns I_2 , während T_2 stromabwärts von I_2 liegt. Insgesamt gibt es somit zehn alternative *frq*-mRNA-Sequenzen sowie zwei FRQ-Proteinsequenzen.

von P_d . Die 3'-Splice-Stelle dieses oberen Introns liegt stromabwärts von P_d . Desweiteren befinden sich stromabwärts des oberen Introns zwei Translationsstartstellen, die 297 Nukleotide (entspricht 99 Aminosäuren) voneinander entfernt liegen. Die obere Translationsstelle liegt innerhalb des zweiten Introns, die untere liegt stromabwärts dieses Introns. Die nichttranslatierte 5'-Region der *frq*-mRNA umfasst 1420 Nukleotide (Genbank U17073). Insgesamt gibt es somit zehn verschiedene *frq*-mRNA-Varianten [10].

Durch die zwei verschiedenen Translationsstartstellen wird das FRQ-Protein in zwei Längen translatiert, in der längeren Form besitzt es 989 Aminosäuren [10, 11]. Die Temperatur hat dabei wesentlichen Einfluss auf den Splice-Mechanismus und damit auf die vorherrschende Variante. Dabei konnte auch ein Zusammenhang zwischen der Umgebungstemperatur und der Regulierung der Periodenlänge über das Verhältnis zwischen der kurzen und langen FRQ-Isoform nachgewiesen werden, was einen Zusammenhang mit dem Mechanismus der Temperaturkompensation nahelegt [12].

Das FRQ-Protein besitzt unabhängig von seiner Isoform vom N-terminalen Ende beginnend eine Coiled-Coil-Domäne, ein nukleäres Lokalisationsignal (NLS), eine CK1-Interaktionsdomäne (FCD), einen mit Prolin (P), Asparaginsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) angereicherten Sequenzteil (PEST-1), eine FRH-Interaktionsdomäne (FFD) sowie eine weitere PEST-Sequenz (PEST-2) [5]. FRQ dimerisiert unmittelbar nach seiner Synthese im Zytosol über die Coiled-coil-Region zu einem Homodimer, das daraufhin in den Zellkern translokiert wird [49, 50]. Darüber hinaus assoziiert FRQ mit der FRQ-interagierenden RNA-Helicase, kurz FRH, zum sogenannten FFC-Komplex, wobei FRH eine DEAD-Box enthält. Es konnte gezeigt werden, dass FRH die Interaktion von FRQ mit dem WCC vermittelt [51]. Darüber hinaus erhöht FRH die Stabilität des FFC und fördert die Phosphorylierung von FRQ [52]. Insgesamt konnten 75 Serin- und Threoninamino-säuren identifiziert werden, an denen FRQ post-translational phosphoryliert wird [53, 54]. Die Katalyse der Phosphorylierung erfolgt dabei über mehrere Kinasen, darunter die Casein Kinase Ia (CK-Ia), Casein Kinase II (CK-II) und die Protein Kinase A (PKA). Während sich die Phosphorylierungen der CK-Ia und CK-II vor allem destabilisierend hinsichtlich der FRQ-Degradation auswirken, wirkt die Phosphorylierung durch PKA

stabilisierend [55]. Die Dephosphorylierung wird durch die Phosphatasen PP1 und PP2a bewirkt, wodurch die Degradation des FRQ grundsätzlich gesenkt wird [56]. Durch die Phosphorylierung werden die elektrostatischen Wechselwirkungen des positiven N-terminalen FRQ-Bereichs (isoelektrischer Punkt bei pH 9.7) mit dem negativen C-terminalen Bereich (isoelektrischer Punkt bei 4,3-5,9) gestört, so dass es zu einer Konformationsänderung des FRQ kommt. Auf diese Weise werden Erkennungssequenzen für die Ubiquitin-Degradationsmaschinerie exponiert [57] und die sterische Interaktion mit WCC ermöglicht [57]. Die Halbwertszeit des FRQ liegt bei etwa 4,5h [58].

2.6 Die Oszillation des *frq*-Gens durch negative Rückkoppelung

Quantifiziert man die mRNA- und Protein-Menge des *frq*-Gens, so lässt sich eine Oszillation mit einer der Konidationsfrequenz in der Laufföhre entsprechenden Periode beobachten [59]. Diese Oszillation wurde auf mRNA-Ebene sowohl mit einer Northern-Analyse [59] sowie mit qRT-PCR und auf Proteinebene sowohl über eine Western-Analyse [9] sowie über einen Luziferase-Reporter [60] gemessen. Dabei wurde in allen Fällen eine Abschwächung der Amplitude beobachtet. Dieser Oszillation liegt in erster Linie eine negative Rückkoppelungsschleife zugrunde, welche aus dem *frq*-Gen und dem Transkriptionsfaktor WCC besteht [61]. Nach Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor WCC unterliegt die transkribierte *frq*-mRNA einem Splicing-Mechanismus und wird aus dem Zellkern ins Zytosol transportiert. Es wird jedoch stets nicht der gesamte *frq*-mRNA-Pool dem Splicing unterzogen, so dass es eine lange und eine kurze Form der *frq*-mRNA gibt [10, 12]. Die Höhe des dem Splicing unterzogenen mRNA-Anteils wird dabei wesentlich von der Temperatur bestimmt. Im Zytosol wird es ins Protein translatiert und dann über ein NLS zurück in den Zellkern transportiert [5]. Dort assoziiert es mit FRH und wird an bis zu 80 Threonin- und Serinresten phosphoryliert [51]. Diese Phosphogruppen können dann auf WCC übertragen werden [36], so dass WCC aus sterischen Gründen in seiner Bindungsfähigkeit blockiert wird. Sowohl *frq*-mRNA, FRQ-Protein wie auch WCC werden konstant abgebaut.

Durch diese negative Rückkoppelungsschleife kann dem *frq*-Gen zwar bereits die Oszillations-Fähigkeit unterstellt werden, es gibt jedoch noch weitere Mechanismen, die die Oszillationseigenschaft zumindest begünstigen und gegebenenfalls sogar notwendig sind. Zum einen bewirkt die Phosphorylierung von FRQ auch einen verstärkten Export aus dem Zellkern in das Zytosol, wo es die Translation des WC-1 fördert. Auf diese Weise kommt es über eine positive Rückkopplungsschleife zu einer zur WCC-Hemmung zeitverzögerten WCC-Aktivierung [61–64]. Wie eine Deletion des NLS gezeigt hat [50], ist für die Fähigkeit der tagesrhythmischen Oszillation des *frq*-Gens grundsätzlich die nukleäre Lokalisation des FRQ notwendig. Aus diesem Grund ist die negative Rückkoppelung als der primäre Oszillationsmechanismus anzusehen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sowohl der FRQ-FRH-Komplex wie auch die katalytische Einheit RRP44 des Exosoms, welches direkt über WCC reguliert wird, eine post-transkriptionelle Regulation des *frq*-Gens ausüben [52].

2.7 Temperaturempfindlichkeit und -kompensation

Neben dem Licht ist die Temperaturveränderung ein weiterer extrinsischer Reiz zur Änderung der Phase der *frq*-Schwingung [9]. Durch Trainingsexperimente mit dem *frq*-Wildtyp sowie mit *frq*-mutierten Stämmen konnte gezeigt werden, dass das *frq*-Gen essentiell für die temperatursensitive Phasenanpassung der Konidiationsperiode ist [65]. Der Einfluss der Temperatur spiegelt sich vor allem auf der post-transkriptionalen Ebene der *frq*-Genexpression ab, und es konnte desweiteren gezeigt werden, dass die prävalente FRQ-Länge durch Temperatur bestimmt wird [8, 10, 12]. Bei niedriger Temperatur (etwa 21°C) gleichen sich die Konzentrationen von sFRQ und lFRQ in etwa, bei höheren Temperaturen (28°C) dominiert dagegen das lFRQ, wobei die FRQ-Konzentration auch insgesamt höher ist. Während die FRQ-Protein-Konzentration im Zusammenhang mit höherer Umgebungstemperatur im Mittel steigt, können wesentliche Änderungen in der *frq*-mRNA-Konzentration bei unterschiedlichen und gleichbleibenden Temperaturen nicht beobachtet werden [9]. Erfolgt jedoch eine Temperaturerhöhung von mehreren Grad Celsius, dann steigt vorübergehend auch die *frq*-mRNA-Menge stark an, fällt daraufhin jedoch wieder auf das ursprüngliche Niveau ab [9]. Als temperatursensitiver Mechanismus auf der post-translationalen Ebene konnte desweiteren die Phosphorylierungsreaktion des FRQ-Proteins durch die Casein-Kinase 2 (CK-2) identifiziert werden [13].

Die Eigenschaft der Temperaturkompensation lässt sich für beliebige Reaktionssysteme mathematisch abstrahieren [14]. Ist R eine stöchiometrische Matrix der Reaktionen r_i , denen nach der Arrhenius-Kinetik die Geschwindigkeitskonstanten $k_i = a_i \cdot \exp(-\frac{E_i}{RT})$ zugeordnet werden, so gilt für die respektive Reaktionsgeschwindigkeit v_i bei Temperatur T

$$\frac{T}{v_j} \frac{\partial v_j}{\partial T} = \frac{\partial \ln(v_j)}{\partial \ln(T)} = \frac{1}{RT} \sum_{i=1}^N c_i^j \cdot E_i = 0$$

$$c_i^j = \frac{\partial \ln(v_j)}{\partial \ln(k_i)}$$

Hierbei ist c_i^j der sogenannte Steuerkoeffizient, der die Abhängigkeit einer Reaktionsgeschwindigkeit v_j von der Geschwindigkeitskonstanten k_i erfasst. Verhalten sich die Aktivierungsenergien E_i der Reaktionen r_i derartig, dass die obige Gleichung für eine Reaktion r_j erfüllt wird, dass also mindestens zwei Steuerkoeffizienten c_i^j ein entgegengesetztes Vorzeichen besitzen, dann wird eine Temperaturveränderung hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit dieser Reaktion r_j durch die anderen Reaktionen kompensiert. Eine Temperaturkompensation der Geschwindigkeit einer einzelnen Reaktion durch ihr umliegendes Reaktionssystem ist demzufolge insbesondere dann nicht möglich, wenn es keine Reaktionsverzweigungen in einem Substrat gibt. Auf diese Weise konnte argumentiert werden, dass die FRQ-Degradation für die Temperaturkompensation im molekular-genetischen Uhrsystem von *Neurospora crassa* wesentlich ist [15], und es konnte daraufhin experimentell gezeigt werden, dass die Periodenlänge der Konidiation bei Stämmen mit unterschiedlichen FRQ-Halbwertszeiten unterschiedlich sensitiv gegenüber Temperaturänderungen ist. So ist bei Stämmen mit einer niedrigeren FRQ-Degradationsgeschwindigkeit die Periodenlänge stärker gegenüber Temperaturveränderungen sensitiv.

In einer anderen Untersuchung konnte über einen Modellierungsansatz gezeigt werden, dass die Temperaturkompensation durch positive Sensitivität der mRNA-Translation und negative Sensitivität im FRQ-Import erreicht wird [66]. Auf diese Weise kann ein rapider Anstieg in der FRQ-Konzentration erreicht werden, ohne dass dieser Konzentrationsimpuls sich auf die in der negativen Rückkopplungsschleife folgenden Variablen, darunter auch die *frq*-mRNA fortpflanzt. Offen bleibt jedoch die Frage, wie das Temperatursignal nach diesem Modell eine gezielte Phasenverschiebung der *frq*-Schwingung bewirken kann.

2.8 Physiologische Regulation durch das Uhrsystem

Die Regulation anderer Gene durch das Uhrsystem, den sogenannten *clock controlled genes (ccgs)*, erfolgt insbesondere durch den Transkriptionsfaktor WCC. Ein ChIP-Seq-Experiment mit Antikörperspezifität gegen WC-2 konnte nach Belichtung 24 direkte Bindestellen zur Transkriptionsregulierung anderer Transkriptionsfaktoren identifizieren [33]. Dazu zählen insbesondere die Gene *csp-1*, *adv-1* und *wc-1*. Diese Zielgene wurden desweiteren durch ein qRT-PCR-Experiment verifiziert. Desweiteren konnten insgesamt 109 hochsignifikante Bindestellen im Promotorbereich anderer Gene mit physiologischen Funktionen vor allem im Metabolismus und in der Zellzyklusregulation identifiziert werden. Das Repressorprotein Conidial Separation 1 (CSP-1), das durch das Gen *csp-1* kodiert und durch die Regulation des WCC transkribiert wird, weist eine zur WCC-Phase leicht verzögerte, jedoch praktisch gleichphasige Konzentrationsschwingung auf. Die durch das CSP-1 reprimierten Gene werden dadurch vor allem dann transkribiert, wenn das WCC besonders niedrig konzentriert ist, die transkriptionsfördernde Wirkung des CSP-1 ist also zu der des WCC in der Phase entgegengesetzt [67]. Auf diese Weise reguliert das WCC über das Gen *csp-1* als Bindeglied auch nachtspezifische Gene. Interessanterweise ist das *csp-1*-Gen auch für die Kompensation der Glucosekonzentration essentiell, da eine Mutation im *csp-1*-Gen zu einer Änderung der Sensitivität der Periodenlänge hinsichtlich Änderungen in der Glucosekonzentration führt [60]. Das System der molekularen Uhr besitzt demzufolge auch metabolische Kompensationsmechanismen.

2.9 Konservierte Einheiten des molekular-genetischen Uhrsystems

Die Kerneinheiten des molekular-genetischen Uhrsystems sind über eine Reihe von Spezies der Pilze, Insekten und Säugetiere funktionell wie auch strukturell konserviert. So besitzen sowohl *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster* wie auch *Homo sapiens* jeweils ein positives und ein negatives Element, die zusammen eine negative Rückkopplungsschleife für die Selbstregulierung eines Gens bilden. Die orthologe Homologie zwischen den positiven Elementen ist besonders groß, wobei das Heterodimer WC-1/WC-2 in *Neurospora crassa* dem CYC/CLK in *Drosophila* und dem BMAL1/CLOCK in Säugetieren entspricht. Insbesondere die PAS-Domäne, die für die Interaktion zwischen den Heterodimeren verantwortlich ist, ist zwischen diesen Spezies hoch konserviert [62].

Es gibt jedoch auch strukturelle Homologien zwischen funktionell verschiedenen Systemen verschiedener Spezies. Das Protein Period-4 besitzt zum Beispiel eine „forkhead“-assoziierte Domäne, die eine spezifische Erkennung von phosphorylierten Threoninresten ermöglicht [68, 69]. Daran schließt sich

die Serin-/Threoninkinase-Domäne an, wobei die Aminosäuresequenz eine sehr hohe Homologie zur menschlichen Checkpoint Kinase 2 (ChK-2) aufweist. ChK-2 ist im Menschen für die Signalverarbeitung von DNA-Beschädigungen verantwortlich und stellt eine Verbindung zur Zellteilungsregulation dar. In *Neurospora crassa* konnte gezeigt werden, dass durch Methyl-methansulfonat induzierte DNA-Schäden die Kinaseaktivität des Period-4 aktiviert wird und das Signal durch Phosphorylierung des FRQ-Proteins auf den tagesrhythmischen Oszillator übertragen wird [69].

Aufgrund der strukturellen Homologie zu funktionell unterschiedlichen (paralogen) Systemen in anderen Organismen lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit gegebenenfalls übertragen und könnten sich auf diese Weise zum Beispiel auch im pharmakologischen Bereich als nützlich erweisen.

Biophysikalische Reaktionsmodelle und numerische Methoden der Modellanalyse und Parameterschätzung

3.1 Physikalische Herleitung der Reaktionskinetik

Die in dieser Arbeit bezeichneten molekularen Spezies bewegen sich in erster Näherung innerhalb des Zellkerns beziehungsweise des Zytoplasmas wie frei schwimmende Teilchen in Wasser. Diese Annahme entspricht häufig nicht der Realität, da die Moleküle zum Teil an andere Strukturen gebunden sind und damit in ihren Freiheitsgraden eingeschränkt sind. So konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die Assoziationswahrscheinlichkeit zweier bindender molekularer Spezies dadurch erhöht wird, dass sie sich entlang molekularer Strukturen bewegen und somit die Dimensionalität ihrer Bewegung reduziert wird [70]. Dennoch schränkt dies nicht die Nützlichkeit eines Modells ein, welches auf der klassischen Theorie des chemischen Massenwirkungsgesetzes basiert, solange es die experimentell erhobenen Daten quantitativ erfasst. Der theoretische Hintergrund zur Reaktionskinetik soll aus diesem Grund kurz dargelegt werden [71, 72].

Die Freie Energie E eines Systems setzt sich aus der Inneren Energie U , was auf Teilchenebene der kinetischen Energie der Moleküle entspricht, sowie dem temperaturabhängigen Grad seiner Ordnung, der Entropie S , zusammen, und es gilt: $E = U - T \cdot S$. Eine chemische Reaktion bezeichnet eine wohlgeordnete Abfolge von Umordnungen chemischer Bindungen, wodurch es zu Veränderungen in den betroffenen Bindungsenergien (potentielle Energie) bei gleichzeitiger Abgabe oder Aufnahme von kinetischer Energie der Moleküle kommt, es gilt: $dU = \frac{\partial U}{\partial n_i} \cdot dn_i$. Desweiteren ändert sich mit der Anzahl an reagierender Moleküle n_i der Spezies i auch die Entropie S des Systems und es gilt:

$$dS = \frac{\partial S}{\partial n_i} \cdot dn_i$$

Verallgemeinert lässt sich sagen, dass eine Reaktion im Mittel dann stattfindet, wenn die Änderung der freien Energie negativ ist, wenn also

$$dE = \frac{\partial E}{\partial U} \cdot \frac{\partial U}{\partial n_i} \cdot dn_i - T \cdot \frac{\partial E}{\partial S} \cdot \frac{\partial S}{\partial n_i} \cdot dn_i < 0.$$

Ein Geschwindigkeitsmodell einer Reaktion erhält man über die Stoßtheorie eines idealen Gases. Nach der Boltzmann-Statistik können sich n gleichartige Moleküle eines sich im Gleichgewicht befindlichen Systems nach $W = n! / \prod n_i!$ Möglichkeiten auf die energetischen Zustände ϵ_i verteilen, wobei

die Summe $\sum n_i$ über die Anzahl der Moleküle jedes Energieniveaus konstant gleich n und die Gesamtenergie als die Summe über die Molekülenergien $\sum n_i \cdot \epsilon_i$ konstant gleich ϵ ist. Die wahrscheinlichste Verteilung der Moleküle auf die Energieniveaus ist genau diejenige, bei der W ein Maximum bei Gültigkeit der beiden Randbedingungen hat, wenn also $\prod n_i!$ minimal wird. Durch Nullstellenberechnung der diesem beschränkten Optimierungsproblem entsprechenden Lagrange'schen Multiplikatorenleichung ergibt sich als Lösung eine Exponentialfunktion, die den Bruchteil der Moleküle zum Energieniveau ϵ_i wiedergibt:

$$n_i = n \cdot \frac{e^{-\epsilon_i/kT}}{\sum e^{-\epsilon_i/kT}}.$$

Als Spezialfall, dass die Innere Energie U eines Systems gerade der Summe der kinetischen Energien ϵ_i der Moleküle entspricht, ergibt sich die Geschwindigkeitsverteilung nach Maxwell zu

$$\frac{n(v)}{n} = \left(\frac{m}{2\pi kT}\right)^{3/2} \cdot 4\pi v^2 \cdot e^{-mv^2/2kT} \cdot dv$$

Der Anteil an Molekülen mit einer kinetischen Energie $\epsilon_i > \epsilon_{min}$ kann über den Energieverteilungssatz von Boltzmann ausgedrückt werden und es gilt:

$$n_{\epsilon_i > \epsilon_{min}} = n \cdot e^{-\epsilon_{min}/kT}$$

Dieser Satz ist für die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur wesentlich. Im Falle einer bimolekularen Reaktion hängt die Häufigkeit einzelner Reaktionen pro Zeiteinheit (ν) von der Frequenz der Zusammenstöße Z ab. Die Frequenz der Zusammenstöße zweier Moleküle a und b lässt sich anhand der Größe ihres „gemeinsamen Translationszylinders“ $t = q \cdot l$ berechnen. Dieser Zylinder besitzt die Querschnittsfläche $q = 2\pi(r_a + r_b)$ und verläuft entlang der gemeinsamen Translationsgeschwindigkeit. Die Länge dieses Zylinders ergibt sich anhand der mittleren Relativgeschwindigkeit

$$l = \bar{v}_{ab} = \sqrt{\frac{8kT}{\pi\mu}}$$

sowie der mittleren Weglänge zwischen zwei Zusammenstößen. Die mittlere Weglänge hängt nur von der Anzahl der Moleküle n_a und n_b ab und ist von der Geschwindigkeit unabhängig. Für die Stoßfrequenz gilt: $Z = t \cdot n_a \cdot n_b$. Es führt jedoch nicht jeder Zusammenstoß zu einer Reaktion, da die Moleküle mit einer kritischen Mindestgeschwindigkeit aufeinander treffen müssen um die Aktivierungsenergie der Reaktion zu überbrücken. Anhand der Boltzmann-Verteilung erhält man den Anteil der Moleküle, die diese kritische Mindestenergie besitzen. Die Reaktionsfrequenz ν ist somit

$$\nu = n_a \cdot n_b \cdot t \cdot e^{-\epsilon_{min}/kT}$$

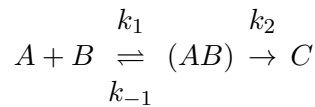
oder in molaren Konzentrationen

$$\frac{dA}{dt} = \frac{dB}{dt} = L \cdot t \cdot e^{-\epsilon_{min}/kT} \cdot A \cdot B$$

Dabei ist L die Loschmidt-Konstante. Sieht man davon ab, dass die Aktivierungsenergie E_a in der Praxis etwas größer ist als die vom Gleichgewichtszustand ausgehende, kinetische Minimalenergie nach der Boltzmann-Statistik, so entspricht dies der Arrheniusgleichung einer Reaktionskonstanten

$k(T) = A \cdot e^{-E_a/kT}$ mit der freien Aktivierungsenergie E_a .

Eine Übertragung auf Reaktionen in flüssigen Lösungen erfordert eine Aufteilung in einen Diffusionsbasierten und einen Reaktions-basierten Anteil, denn nur wenn zwei Moleküle nicht durch ein Wassermolekül (als Lösungsmittel) getrennt werden und somit nebeneinander liegen ist eine Reaktion entsprechend der beschriebenen Überlegung zum idealen Gas zutreffend. Nimmt man an, dass die Moleküle A und B mit der Diffusionsgeschwindigkeitskonstanten d_1 in eine Nachbarschaft, in der die Reaktion mit der Reaktionsgeschwindigkeit stattfindet, geraten und dass sich desweiteren benachbarte Moleküle (AB) mit der von d_1 abhängigen Diffusionskonstanten wieder trennen, so ergibt sich als Reaktionsschema:



Im Gleichgewicht von (AB) , also $dAB/dt = 0$, gilt dann $\frac{dC}{dt} = k_2 \cdot \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} \cdot A \cdot B$, so dass im Fall einer verhältnismäßig schnellen Diffusion ($k_{-1} \gg k_2$) diese Gleichung in $\frac{dC}{dt} = k_2 \cdot K \cdot A \cdot B$ mit $K = \frac{k_1}{k_{-1}}$ und im Fall einer schnellen Reaktion ($k_{-1} \ll k_2$) in $\frac{dC}{dt} = k_{-1} \cdot A \cdot B$ übergeht. In beiden Fällen liegt praktisch ein bimolekularer Reaktionsmechanismus zugrunde, was die Übertragbarkeit der theoretischen Reaktionskinetik bei einem idealen Gas auf Reaktionen in Lösung erlaubt.

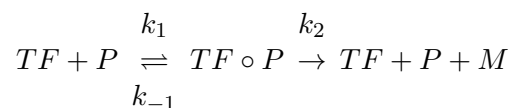
Hinsichtlich der Reaktionskinetik sind die mono- und bimolekularen, sowie die enzymkatalysierten Mechanismen von Relevanz. Bei der monomolekularen Reaktion hängt die Reaktionsgeschwindigkeit lediglich von der Konzentration des Edukts selbst ab und es gilt für die Konzentrationsänderung einer Molekülspezies A :

$$\frac{dA}{dt} = k \cdot A$$

Bei einem bimolekularen Mechanismus ist die Reaktion proportional zum Produkt der Konzentrationen beider Molekülspezies, für die im stöchiometrisch gleichem Verhältnis miteinander reagierenden Molekülspezies A und B gilt dann

$$\frac{dA}{dt} = \frac{dB}{dt} = k \cdot A \cdot B$$

Bei der Assoziation eines Transkriptionsfaktors an einen Promotor mit einer transkriptionsinitiierenden Wirkung liegt ein zur enzymatischen Katalyse analoger Mechanismus vor, wobei die Bindung des Transkriptionsfaktors (TF) an den Promotor (P) als enzymatisches Adsorbat einem der irreversiblen Transkriptioninitiation (M) vorgelagerten Gleichgewicht entspricht. Es gilt:



Unter der Annahme einer konstanten Konzentration von $TF \circ P$ ergibt sich die Geschwindigkeit der

Transkriptionsinitiation zu

$$\begin{aligned}
 v_M &= \frac{dM}{dt} = k_2 \cdot TF \circ P = k_1 \cdot TF \circ P - k_{-1} \cdot TF \circ P \\
 &= k_2 \cdot P_0 \frac{TF}{K_M + TF} \\
 K_M &= \frac{k_1}{k_{-1} + k_2}
 \end{aligned}$$

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M gibt dabei die Konzentration des Transkriptionsfaktors TF an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit $0,5 \cdot k_2 \cdot P_0 =: EC_{50}$, also der Hälfte der maximal möglichen Reaktionsgeschwindigkeit entspricht. Durch Ergänzung der Michaelis-Menten-Gleichung durch den sogenannten Hill-Koeffizienten h im Exponenten von T ergibt sich eine höhere Sensitivität der Transkription zur Konzentration des Transkriptionsfaktors TF , es gilt also $\frac{\partial}{\partial TF} v_M(h_1) > \frac{\partial}{\partial TF} v_M(h_2)$ für $h_1 > h_2$. Desweiteren entspricht bei einem Hill-Koeffizienten $h > 1$ die EC_{50} -Konzentration des Transkriptionsfaktors TF gerade $EC_{50}(h) = K_M^h$.

3.2 Das Goodwin-Modell mit Temperatursensitivität

Die Modellierung eines Genexpressionssystems mit negativer Rückkoppelung als ein Differentialgleichungssystem mit drei Variablen wurde bereits im Jahr 1965 von Goodwin vorgeschlagen [73, 74]. Die Zustandsvariablen dieses Systems sind dabei die mRNA-, die Protein-, und die Transkriptionsfaktor-Konzentrationen X , Y und Z , die entsprechend des folgenden Differentialgleichungssystems miteinander in Beziehung stehen:

$$\begin{aligned}
 v_x &= \frac{dX}{dt} = \frac{1}{1 + Z} - a \cdot X \\
 v_y &= \frac{dY}{dt} = X - b \cdot Y \\
 v_z &= \frac{dZ}{dt} = Z - c \cdot Z
 \end{aligned}$$

Im Gegensatz zur Michaelis-Menten-Kinetik beinhaltet der aktivierende Term in dX/dt nur im Nenner eine Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors, weshalb $\frac{\partial}{\partial Z} v_x < 0$ ist und sich insgesamt eine negative Rückkoppelungsschleife ergibt. Eine Erweiterung dieses Oszillators um eine Arrhenius-artige Temperaturabhängigkeit der Reaktionskonstanten verleiht dieser negativen Rückkopplungsschleife die Fähigkeit der Temperaturkompensation [75]. Dieser Modellansatz wird in dieser Arbeit zugrunde gelegt und weiterentwickelt. Da die Versuchsbedingungen in dieser Arbeit in einem im Verhältnis zur Absoluttemperatur kleinen Temperaturintervall zwischen 291 - 301 K angelegt sind, wird nach einer

Taylorentwicklung der Arrhenius-Gleichung jedoch nur der lineare Anteil verwendet:

$$\begin{aligned}
 a(T) &= k_1 \cdot e^{-k_2/T} & (3.1) \\
 \frac{\partial a}{\partial T}(T) &= k_1 \cdot e^{-k_2/T} \cdot \frac{k_2}{T^2} = a(T) \cdot \frac{k_2}{T^2} \\
 a(T) = a(T_0 + dT) &\doteq a(T_0) + \frac{\partial a}{\partial T}(T_0) \cdot dT \\
 &= a(T_0) + a(T_0) \cdot \frac{k_2}{T_0^2} \cdot dT \\
 &=: a_0 + a_1 \cdot dT = b_0 \cdot T + b_1
 \end{aligned}$$

Diese Vereinfachung erhöht die numerische Stabilität bei der Parameterschätzung ohne nennenswerten Einfluss auf die Lösungsgleichungen.

3.3 Numerische Integrationsverfahren

3.3.1 Lösbarkeit von Differentialgleichungen

Ein Anfangswertproblem sei durch die Differentialgleichung

$$\frac{dx(t)}{dt} = f(x) \tag{3.2}$$

mit $f : D \subset \mathbb{R}^n \rightarrow W \subset \mathbb{R}^n$ und den Anfangswert $x(t_0) = x_0$ zum Zeitpunkt t_0 gegeben. Zu diesem Anfangswertproblem wird eine Lösung $x : [t_0, t_e] =: I \subset \mathbb{R} \rightarrow D$ gesucht, dabei wird x auch als die Zustandsvariable des Systems mit Werten in $D \subset \mathbb{R}^n$ bezeichnet. Für die in der biochemischen Wissenschaft auftretenden Reaktionen sind die Geschwindigkeiten in der Regel von der Zeit unabhängig, weshalb die Funktion f nur von der Lösung x abhängt. Eine Lösung $x(t)$ mit $t \in I$ des Anfangswertproblems ist dagegen eine ausschließlich von der Zeit abhängige Funktion. In die rechte Seite der Differentialgleichung gehen desweiteren die reaktionsspezifischen Parameter p mit Werten in \mathbb{R}^p ein (kurz $f(x; p)$), f kann dabei sowohl linear als auch nicht-linear in x und p sein. Im Falle von Ableitungen höherer Ordnungen ist bei Verwendung der unten beschriebenen Integrationsverfahren eine Umformulierung des Anfangswertproblems erforderlich, wobei zusätzliche Zustandsvariablen zur Beschreibung jeder einzelnen Ableitung eingeführt werden [76, 77].

Die Existenz einer Lösung $x(t)$ des Anfangswertproblems 3.2 ist nach dem Existenzsatz von Peano auf dem Intervall I dann gesichert, wenn $f(x)$ auf dem Gebiet D bezüglich x stetig ist [76, 78]. Im Rahmen des Beweises dieses Satzes wird auf direktem Weg über das weiter unten beschriebene Euler'sche Einschrittverfahren eine zunächst lokale Lösung konstruiert, die dann bis an den Rand von D fortgesetzt wird. Ist die Funktion $f(x)$ darüber hinaus auf D Lipschitz-stetig, gilt also für alle $x, y \in D$, einer Lipschitz-Konstanten $L \in \mathbb{R}$ und der euklidischen Norm $\| \cdot \|$ [79]:

$$\| f(x) - f(y) \| \leq L \| x - y \|, \tag{3.3}$$

dann ist diese Lösung auch eindeutig bestimmt. Es sei angemerkt, dass im Fall der stetigen Differenzierbarkeit der Funktion $f(x)$ auf D die Lipschitz-Stetigkeit automatisch folgt. Nach dem Existenzsatz von

Picard-Lindelöf wird im Gegensatz zum Satz von Peano unter Voraussetzung der Lipschitz-Stetigkeit von $f(x)$ auf D bezüglich x die Existenz einer Lösung mithilfe des Banach'schen Fixpunktsatzes bewiesen, diese Lösung ist gleichzeitig eindeutig [76, 77, 80, 81]. Im Fall der Stetigkeit von $f(x, p)$ auf D bezüglich x ist eine Lösung $x(t)$ des Anfangswertproblems 3.2 für $t \in I$ auch durch die implizite Integraldarstellung

$$x(t) = x_0 + \int_{t_0}^t f(s, p) ds \quad (3.4)$$

gegeben. Ist $f(x, p)$ in D darüber hinaus Lipschitz-stetig, dann ist diese Lösung auch eindeutig.

Ein Gleichungssystem $M(x) \frac{dx}{dt} = f(x)$ mit einer Funktionsmatrix M lässt sich wie ein gewöhnliches Anfangswertproblem mit den im Folgenden beschriebenen Integrationsverfahren gewöhnlicher Differentialgleichungssysteme lösen, sofern die Matrix M regulär ist und sich das Gleichungssystem folglich in die Form $\frac{dx}{dt} = M(x)^{-1} f(x)$ überführen lässt. Ist $M(x)$ dagegen singulär, dann sind spezielle Integrationsverfahren zur Lösung von differential-algebraischen Gleichungssystemen erforderlich. Die in dieser Arbeit auftretenden Differentialgleichungssysteme umfassen jedoch ausschließlich den regulären Fall.

3.3.2 Einschrittverfahren

Bei den Einschrittverfahren wird über eine Folge von Taylorreihenauswertungen um den Anfangswert x_0 beziehungsweise den zuletzt berechneten Lösungspunkt x_k eine Trajektorie in Annäherung an die Lösung x des in 3.2 bezeichneten Anfangswertproblems berechnet [80–82]. Im Fall des expliziten Euler-Verfahrens wird die Taylorreihe $T_k(h) := x_k + h \cdot f(x_k) + O(h^2)$ (für $k = 0, 1, \dots$) um den zuletzt berechneten Lösungspunkt x_k linear entwickelt und an der Stelle h ausgewertet. Dabei ist $h \in \mathbb{R}$ die Schrittweite des Verfahrens. Das explizite Euler-Verfahren lautet vollständig:

$$\begin{aligned} x_{k+1} &= x_k + h \cdot f(x_k) & (k = 1, 2, \dots) \\ x(t_0) &= x_0 \end{aligned}$$

Beim impliziten Einschrittverfahren von Euler wird anstatt des nicht-linearen Funktionswertes $f(x_k)$ der Wert an der Stelle x_{k+1} verwendet, dies erfordert jedoch die Lösung des impliziten Gleichungssystems $x_{k+1} = x_k + h \cdot f(x_{k+1})$.

Ein wesentliches Maß für die Genauigkeit eines Einschrittverfahrens ist dessen Konsistenzordnung, die sich anhand eines Vergleichs mit der Taylorreihenentwicklung ermitteln lässt [80–82]. Hält es mindestens die Genauigkeit der Taylorreihenentwicklung mit dem Restglied der Ordnung $O(h^{m+1})$ ein, so ist das Verfahren von der Konsistenzordnung m . Entsprechend besitzt das Eulerverfahren die Konsistenzordnung $m = 1$. Bei den Verfahren höherer Konsistenzordnungen sind vor allem die Runge-Kutta-Verfahren zu nennen, bei denen die höheren Ableitungen der Funktion $f(x)$ im Rahmen der Taylorreihenentwicklung durch mehrfache Funktionsauswertungen von $f(x)$ ersetzt werden. Die Auswertungen von $f(x)$ müssen dazu an bestimmten Stellen zwischen x_k und x_{k+1} vorgenommen

werden, damit die Genauigkeit des Verfahrens einem möglichst hohen Grad der Taylorreihenentwicklung genügt. Als Beispiel sei das klassische, vierstufige Runge-Kutta-Verfahren der Konsistenzordnung $m = 4$ angeführt, dieses lautet ausgeschrieben:

$$\begin{aligned} x_{k+1} &= x_k + h \cdot \left(\frac{1}{6}k_1 + \frac{1}{3}k_2 + \frac{1}{3}k_3 + \frac{1}{6}k_4 \right) \\ k_1 &= f(x_k) \\ k_2 &= f\left(x_k + \frac{1}{2} \cdot h \cdot k_1\right) \\ k_3 &= f\left(x_k + \frac{1}{2} \cdot h \cdot k_2\right) \\ k_4 &= f(x_k + h \cdot k_3) \end{aligned}$$

Neben der Konsistenzordnung, die das lokale Verhalten eines Einschrittverfahrens beschreibt, ist auch das Konvergenzverhalten des globalen Fehlers ϵ_{max} in Abhängigkeit von der Schrittweite h ein wichtiges Kriterium zur Bewertung eines Verfahrens. Es lässt sich zeigen, dass unter der Voraussetzung einer hinreichend hohen Differenzierbarkeit von $f(x)$ auf D bezüglich x der globale Fehler ϵ_{max} mit

$$\begin{aligned} \epsilon_{max} &:= \max_{t_k} \| \epsilon(h, t_k, x_k, f) \| \\ \epsilon(h, t_k, x_k, f) &:= x_{k+1} - x(t_{k+1}) \end{aligned}$$

bei allen Runge-Kutta-Verfahren mit einer Konsistenzordnung $m \geq 1$ für $h \rightarrow 0$ gegen null konvergiert und die Konvergenzordnung dabei der Konsistenzordnung entspricht [80–82]. Die in dieser Arbeit betrachteten Anfangswertprobleme erfüllen die Lipschitz-Bedingung und können somit mit dem klassischen Runge-Kutta-Verfahren gelöst werden.

Neben den Einschrittverfahren gibt es als weitere wichtige Klasse von Integrationsverfahren unter anderen die linearen Mehrschrittverfahren, bei denen die letzten s (mit $s = 1, 2, 3, \dots$) Trajektorienpunkte $x_k, x_{k-1}, \dots, x_{k-s+1}$ verwendet werden um den nächsten Trajektorienpunkt η_{k+1} zu berechnen. Um auch sogenannte „steife“ Anfangswertprobleme besser handzuhaben ist aus Gründen der numerischen Stabilität in dem in dieser Arbeit verwendeten Rechenprogramm PARFIT/VPLAN als Integrationsmethode ein zu dieser Klasse gehörendes BDF-Verfahren implementiert [80, 81, 83].

3.4 Numerische Optimierung mit Newton-Verfahren

Sei eine Funktion $g : D \subset \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}$ gegeben und auf D zweimal differenzierbar. Besitzt g im Punkt x^* ein lokales Minimum, ist also in einer Umgebung \mathcal{U}_1 von x^* die Funktion $g(x^*) \leq g(x)$ für alle $x \in \mathcal{U}_1(x^*)$, dann besitzt die Ableitung von g , also $\nabla g =: f : D \subset \mathbb{R}^n \rightarrow W \subset \mathbb{R}^n$ notwendig eine Nullstelle im Punkt x^* , es gilt also $f(x^*) = 0$ (notwendige Bedingung erster Ordnung). Der Ableitungsoperator ∇ sei dabei als der Vektor partieller Ableitungen $(\frac{\partial}{\partial x_1}, \frac{\partial}{\partial x_2}, \dots, \frac{\partial}{\partial x_n})$ nach dem Argumentvektor x mit Elementen x_i definiert:

$$\nabla g = \left(\frac{\partial g}{\partial x_1}, \frac{\partial g}{\partial x_2}, \dots, \frac{\partial g}{\partial x_n} \right) =: (f_1, f_2, \dots, f_n).$$

Desweiteren ist bei einer Minimalstelle im Punkt x^* die Ableitung von f an der Stelle x^* in einer hinreichend kleinen Umgebung $\mathcal{U}_2(x^*)$ positiv semidefinit, es gilt also $x^T \cdot \nabla f(x) \cdot x \geq 0$ für alle

$x \in \mathfrak{U}_2(x^*)$, insbesondere gilt dabei $x^{*T} \cdot \nabla f(x^*) \cdot x^* \geq 0$ (notwendige Bedingung zweiter Ordnung). $\nabla f(x) = \nabla^2 g$ bezeichnet dabei die Hesse-Matrix der Funktion $g(x)$ mit den Elementen

$$\nabla f = \nabla^2 g = \begin{pmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \cdots & \frac{\partial f_n}{\partial x_1} \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_2} & \ddots & \cdots & \frac{\partial f_1}{\partial x_2} \\ \vdots & & & \vdots \\ \frac{\partial f_1}{\partial x_n} & \frac{\partial f_1}{\partial x_n} & \cdots & \frac{\partial f_n}{\partial x_n} \end{pmatrix}$$

Bei einer strikten Minimalstelle, also $g(x^*) < g(x)$ für alle $x \in \mathfrak{U}_2(x^*)$ mit $x \neq x^*$, ist $\nabla f(x^*)$ sogar positiv definit, es gilt dann also $x^T \cdot \nabla f(x) \cdot x > 0$ für alle $x \in \mathfrak{U}_2(x^*)$ mit $x \neq x^*$. Die Eigenschaft der positiven Definitheit von $\nabla f(x)$ geht dabei äquivalent mit der Konvexität der Funktion $g(x)$ einher. Lässt sich sowohl die Nullstelle von f in x^* als auch die positive Definitheit von ∇f in x^* nachweisen, dann kann umgekehrt auf das Vorliegen einer strikten Minimalstelle im Punkt x^* geschlossen werden. Die Ermittlung eines Minimums entspricht also im Ansatz derjenigen einer Nullstelle [82, 84].

Das Newton-Verfahren ist ein Abstiegsverfahren, oder bei Betrachtung der ersten Ableitung ein Verfahren zur Nullstellenbestimmung, mit der folgenden iterativen Prozedur. Seien g und f wie oben gegeben und sei desweiteren ∇f in einer hinreichend kleinen Umgebung \mathfrak{U} von x^* positiv definit. Sei desweiteren f in dieser Umgebung Lipschitz-stetig und $\nabla f(x)$ für $x \in \mathfrak{U}(x^*)$ regulär. Liegt ein Startwert $x_0 \in \mathfrak{U}$ hinreichend nahe an der Minimalstelle x^* , dann konvergiert das folgende Iterationsverfahren mit mindestens quadratischer Ordnung gegen die Minimalstelle x^* der Funktion g beziehungsweise die Nullstelle x^* der Funktion f :

$$x_{k+1} = x_k - \nabla f(x_k)^{-1} \cdot f(x_k) \tag{3.5}$$

Der Beweis zu diesem Sachverhalt findet sich in der Literatur [82, 84]. Im Gegensatz zu anderen wichtigen Abstiegsverfahren, wie zum Beispiel dem sogenannten „Steilsten Abstieg“ in Verbindung mit einer Liniensuche, bringt das Newtonverfahren den Vorteil einer lokal quadratischen Konvergenzordnung mit sich.

Das Newton-Verfahren ist grundsätzlich auch bei beschränkten Optimierungsaufgaben anwendbar, wobei im Falle von Ungleichungsbeschränkungen eine sogenannte Active-Set-Strategie verwendet wird [84]. Diese Verfahren werden als SQP-Verfahren bezeichnet. Sei $g(x)$ die Zielfunktion und $b^g(x) = 0$ mit $b^g : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^{m_g}$ ein Vektor von m_g Gleichungsbeschränkungen und $b^u(x) \geq 0$ mit $b^u : \mathbb{R}^n \rightarrow \mathbb{R}^{m_u}$ ein Vektor von m_u Ungleichungsbeschränkungen, dann ist die Lösung x^* des Optimierungsproblems durch die sogenannten Karush-Kuhn-Tucker-Bedingungen (notwendige Bedingungen erster Ordnung)

charakterisiert:

$$\begin{aligned}
\nabla_x \mathfrak{L}(x^*) &= 0 \\
b^{gl}(x^*) &= 0 \\
b^{ug}(x^*) &\geq 0 \\
\lambda_i^{u*} &\geq 0 \\
\lambda_i^{g*} \cdot b_i^g(x^*) &= 0, i = 1, \dots, m_g \\
\lambda_i^{u*} \cdot b_i^u(x^*) &= 0, i = 1, \dots, m_u
\end{aligned} \tag{3.6}$$

Dabei ist $\nabla_x \mathfrak{L}(x^*)$ der Gradient der Lagrangefunktion

$$\mathfrak{L}(x, \lambda) = g(x) - \sum_{i=1}^{m_g} \lambda_i^g b_i^g - \sum_{i=1}^{m_u} \lambda_i^u b_i^u.$$

Für die notwendige Bedingung zweiter Ordnung sei im Fall des beschränkten Optimierungsproblems auf die Literatur verwiesen [84]. Grundsätzlich gilt auch hier, dass die sogenannte reduzierte Hesse-Matrix von \mathfrak{L} in einer hinreichend kleinen Umgebung positiv definit ist. Umgekehrt kann aufgrund der hinreichenden Bedingungen erster und zweiter Ordnung auf das Vorliegen einer Minimalstelle geschlossen werden.

3.5 Verfahren der Parameterschätzung bei gewöhnlichen Differentialgleichungen

3.5.1 Ausgleichsproblem nach Gauß

Das Ziel der numerischen Schätzung von Parametern eines Differentialgleichungssystems ist eine nach objektiven Maßstäben optimale Anpassung der Lösungstrajektorien an das reale Systemverhalten, das sich durch gezielte Messungen η_{ij} zu Messzeitpunkten t_j beobachten lässt. Der Messwert η_{ij} beruht dabei auf einer in der Regel einfachen Messfunktion $m_i(x(t_j, x_0, p^*)) + \epsilon_{ij}$ des realen Zustands $x(t_j, x_0, p^*)$, die mit dem Messfehler $\epsilon_{ij} := \epsilon_i(t_j)$ verrauscht ist. Der Wert η_{ij} kann dabei auch ein Mittelwert von statistisch unabhängigen Messreplikaten sein. Wie anhand der Ergebnisse dieser Arbeit deutlich wird, ist zwischen dem Modell- und dem realen Systemverhalten grundsätzlich zwar zu unterscheiden. Zur Einführung der numerischen Mathematik wird jedoch angenommen, dass es einen derartigen Parametersatz p^* gibt, so dass die Abweichung zwischen der optimierten Modellantwort und dem durch Messungen beobachteten Systemverhalten im Verhältnis zum Messfehler vernachlässigbar ist. In diesem Sinne soll der reale Systemzustand hier mit $x(t_j, x_0, p^*)$ bezeichnet werden. Desweiteren wird in diesem Kapitel angenommen, dass das reale System keinen Fluktuationen unterliegt, sondern sich deterministisch verhält. Wie im folgenden Kapitel gezeigt und erläutert wird, spielen biologische Fluktuationen bei der mRNA-Messung jedoch eine Rolle, ihre statistische Varianz kann jedoch auf einfache Weise mit der Varianz des Messfehlers verrechnet und die etablierten, numerischen Parameterschätzmethoden somit sachgerecht angewendet werden. Die Messfehler ϵ_{ij} der Messwerte η_{ij} zum Zeitpunkt t_j sind in aller Regel statistisch unabhängig und normalverteilt, so dass eine „gewichtige“ Abweichung

der Modellantwort $m_i(x(t_j, x_0, p))$ von einem Messpunkt η_{ij} im Rahmen der Minimierungsaufgabe zu einer im Sinne der Gauß-Verteilung entsprechend gewichtigen Erhöhung der Zielfunktion führen sollte. Die Gewichtung der Abweichung ist dabei anhand des Messfehlers, also der Standardabweichung σ_{ij} eines Messwertes η_{ij} , in der Zielfunktion zu bewerten. Entsprechend richtet sich die Zielfunktion bei der Parameterschätzung eines Anfangswertproblems nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate nach Gauß, das auch Ausgleichsproblem genannt wird. Das Residuum der Zielfunktion wird daher wie folgt definiert:

$$\| r(x_0, p) \|_2^2 := \sum_i r_i(x_0, p)^2 := \sum_i \sum_j \frac{(\eta_{ij} - m_i(x(t_j, x_0, p)))^2}{\sigma_{ij}^2} \quad (3.7)$$

Damit das Differentialgleichungsmodell ein im Sinne des Ausgleichsproblems optimales Verhalten annimmt, ist es erforderlich, dass das Residuum $r(x_0, p)$ minimal wird, das (nicht-lineare) Ausgleichsproblem lautet somit:

$$\min_{x_0, p} \| r(x_0, p) \|_2^2 \quad (3.8)$$

Dabei können gegebenenfalls Gleichungs- und Ungleichungsbeschränkungen vorliegen, diese haben die Form

$$r^g(x_0, p) = 0 \quad (3.9)$$

$$r^u(x_0, p) \geq 0 \quad (3.10)$$

Die Gleichungen 3.8 bis 3.10 bilden zusammen ein beschränktes, nicht-lineares Ausgleichsproblem [83, 85–87].

3.5.2 Gauß-Newton-Verfahren

Sei im Folgenden $\pi := (x_0, p)$ mit $\pi \in D \times \mathbb{R}^p \subset \mathbb{R}^n \times \mathbb{R}^p$ der aus Anfangswerten und Modellparametern zusammengesetzte Parametersatz und $g : D \times \mathbb{R}^p \rightarrow \mathbb{R}$ mit $g(\pi) := \frac{1}{2} \| r(\pi) \|_2^2$. Die Minimierung von $g(\pi)$ bezüglich π entspricht somit dem nicht-linearen Ausgleichsproblem 3.8. Bei dem Gauß-Newton-Verfahren wird $g(\pi)$ durch eine iterative Folge $\pi_{k+1} = \pi_k + \Delta\pi_k$ minimiert, wobei die Berechnung von $\Delta\pi_k := \Delta\pi_k^{GN}$ nach der Gleichung

$$J_k^T \cdot J_k \cdot \Delta\pi_k^{GN} = -J_k^T \cdot r(\pi_k) \quad (3.11)$$

erfolgt [84–86]. Dabei seien der Ableitungsoperator ∇ und desweiteren die Jacobi-Matrix J_k des k -ten Iterationsschrittes wie folgt definiert:

$$\begin{aligned} \nabla : &= \frac{\partial}{\partial \pi} \\ J_k : &= \frac{\partial r}{\partial \pi}(\pi_k) = \nabla r(\pi_k) \end{aligned}$$

Das Gauß-Newton-Verfahren ist somit eine Abwandlung des Newton-Verfahrens (Newton-Typ-Verfahren), bei dem $\Delta\pi_k$ nach der Gleichung

$$\nabla^2 f(\pi_k) \cdot \Delta\pi_k^N = -\nabla f(\pi_k) \quad (3.12)$$

berechnet wird. Der Zusammenhang zwischen den beiden Verfahren wird durch Betrachtung der Ableitungen von $g(\pi)$ deutlich:

$$\begin{aligned}
\nabla g(\pi_k) &= \nabla\left(\frac{1}{2} \|r(\pi_k)\|_2^2\right) \\
&= \frac{1}{2} \sum_i \nabla r_i(\pi_k)^2 \\
&= \sum_i r_i(\pi_k) \cdot \nabla r_i(\pi_k) \\
&= J_k \cdot r(\pi_k) \\
\nabla^2 g(\pi_k) &= J_k^T \cdot \nabla r(\pi_k) + \nabla J_k \cdot r(\pi_k) \\
&= J_k^T \cdot J_k + r(\pi_k) \cdot \nabla^2 r(\pi_k)
\end{aligned}$$

Im Gegensatz zum Newton-Verfahren wird im Gauß-Newton-Verfahren somit der Term $r(\pi_k) \cdot \nabla^2 r(\pi_k)$, der von den zufälligen Messfehlern abhängt, in der Hessematrix von $g(\pi_k)$ vernachlässigt [88].

Zur Umformung des in Gleichung 3.8 definierten nicht-linearen Ausgleichsproblems in ein lineares Ausgleichsproblem wird die Residuumsfunktion $r(\pi_{k+1})$ in einer Taylorreihe linear um den letzten Iterationspunkt π_k entwickelt [84]:

$$\begin{aligned}
g(\pi_{k+1}) &= g(\pi_k + \Delta\pi_k) \\
&= \frac{1}{2} \|r(\pi_k + \Delta\pi_k)\|_2^2 \\
&= \frac{1}{2} \sum_i r_i(\pi_k + \Delta\pi_k)^2 \\
&\approx \frac{1}{2} \sum_i (r_i(\pi_k) + \nabla r_i(\pi_k) \cdot \Delta\pi_k)^2 \\
&= \frac{1}{2} \|r(\pi_k) + J_k \cdot \Delta\pi_k\|_2^2 \\
&=: g^{lin}(\pi_k, \Delta\pi_k)
\end{aligned}$$

Das zu Gleichung 3.8 gehörige lineare Ausgleichsproblem lautet damit [85, 86]:

$$\min_{\Delta\pi_k} \|r(\pi_k) + J_k \cdot \Delta\pi_k\|_2^2 \tag{3.13}$$

Die Ableitungen von g^{lin} lauten dabei [84]:

$$\begin{aligned}
\nabla g^{lin}(\pi_k, \Delta\pi_k) &= (r(\pi_k) + J_k \cdot \Delta\pi_k)^T \cdot J_k \\
\nabla^2 g^{lin}(\pi_k, \Delta\pi_k) &= J_k^T \cdot J_k
\end{aligned} \tag{3.14}$$

Durch Gleichsetzen von Gleichung 3.14 mit null, was der notwendigen Bedingung erster Ordnung einer Minimalstelle von $g^{lin}(\pi_k, \Delta\pi_k)$ in $\Delta\pi_k^*$ entspräche, erhält man zur Berechnung von $\Delta\pi_k^*$ die sogenannte Normalengleichung [84]:

$$J_k^T \cdot J_k \cdot \Delta\pi_k^* = -J_k^T \cdot r(\pi_k) \tag{3.15}$$

Für das linearisierte Ausgleichsproblem 3.13 entspricht die nach Gleichung 3.15 entsprechend dem Gauß-Newton-Verfahren berechnete Lösung $\Delta\pi_k^*$ somit der exakten Lösung $\Delta\pi_k^N$ des standardmäßigen Newton-Verfahrens entsprechend Gleichung 3.12. Die explizite Berechnung von $\Delta\pi_k^*$ erfolgt nach Umformung von Gleichung 3.15 in die Form

$$\begin{aligned}\Delta\pi_k^* &= -(J_k^T \cdot J_k)^{-1} \cdot J_k^T \cdot r(\pi_k) \\ &= -J^+ \cdot r(\pi_k)\end{aligned}\tag{3.16}$$

Dabei wird $J^+ := (J_k^T \cdot J_k)^{-1} \cdot J_k^T$ als die verallgemeinerte Inverse bezeichnet.

Die Linearisierung kann im Falle eines gleichungs- und ungleichungsbeschränkten, nichtlinearen Ausgleichsproblem wie in den Gleichungen 3.8 bis 3.10 ebenfalls durchgeführt werden. Die Taylorentwicklung erfolgt dabei analog für die Gleichungs- beziehungsweise Ungleichbeschränkungen r_g und r_u und es ergibt sich das lineare, beschränkte Ausgleichsproblem [85, 86]:

$$\min_{\Delta\pi_k} \| r(\pi_k) + J_k \cdot \Delta\pi_k \|_2^2\tag{3.17}$$

mit Nebenbedingungen

$$\begin{aligned}r^g(\pi_k) + J_k^g \cdot \Delta\pi_k &= 0 \\ r^u(\pi_k) + J_k^u \cdot \Delta\pi_k &\geq 0\end{aligned}$$

Dabei bezeichnen J^g und J^u die beiden Jacobi-Matrizen von r^g beziehungsweise r^u :

$$\begin{aligned}J_k^g &:= J^g(\pi_k) := \frac{\partial r^g}{\partial \pi}(\pi_k) \\ J_k^u &:= J^u(\pi_k) := \frac{\partial r^u}{\partial \pi}(\pi_k)\end{aligned}$$

Dieses linearisierte, beschränkte Ausgleichsproblem kann unter Verwendung der oben beschriebenen Lagrangegleichung mit den Karush-Kuhn-Tucker-Bedingungen (notwendige Bedingung erster Ordnung) grundsätzlich gelöst werden.

Die Berechnung der Jacobi-Matrix $J = \frac{\partial r}{\partial \pi}$ erfolgt nach dem Verfahren der Internen Numerischen Differentiation, mit dem sich besonders hohe Genauigkeiten erzielen lassen [85]. Grundsätzlich wird J dabei mit einer speziellen Schrittweitenstrategie durch numerische Integration zweier im Parameter π_i (i bezeichne hier das i -te Element von π) leicht verschiedener Anfangswertprobleme mit anschließender Berechnung der Residuendifferenz $\delta r(\pi)$ berechnet. Die Berechnung dieser Jacobi-Matrix ist in jedem Gauß-Newton-Schritt erforderlich.

3.5.3 Statistisches Konfidenzkriterium

Zur statistischen Bewertung der Güte einer Parameterschätzung ist eine Betrachtung der Fortpflanzung des Messfehlers erforderlich, denn aufgrund der statistischen Natur der Messwerte ist auch die

Parameterschätzung ein Zufallsergebnis. Die Berechnung der mit der Standardabweichung gewichteten Änderung von $\delta\pi$ in Abhängigkeit von $\delta\eta$ lässt sich nach Gleichung 3.15 mit der Hilfe von J^+ unmittelbar berechnen [83, 85, 86] :

$$\delta\pi = -J^+ \cdot \delta\eta \quad (3.18)$$

Die Kovarianzmatrix C der Abweichungen in den geschätzten Parametern π lässt sich damit folgendermaßen berechnen:

$$\begin{aligned} C &= \text{cov}(\delta\pi \cdot \delta\pi^T) \\ &= E(\delta\pi \cdot \delta\pi^T) - E(\delta\pi) \cdot E(\delta\pi)^T \\ &= E(\delta\pi \cdot \delta\pi^T) - 0 \end{aligned}$$

$E(\delta\pi)$ bezeichnet dabei den Erwartungswert der Zufallsvariable $\delta\pi$. Nach Gleichung 3.18 lässt sich $\delta\pi$ als Funktion von r und J^+ ausdrücken und es ergibt sich desweiteren:

$$\begin{aligned} C &= E((-J^+ \cdot r)(-J^+ \cdot r)^T) \\ &= J^+ \cdot E(r \cdot r^T) \cdot (J^+)^T \\ &= J^+ \cdot I \cdot (J^+)^T \end{aligned}$$

Um die Gleichung $E(r \cdot r^T) = I$ zu erhalten wird davon ausgegangen, dass die Modellfunktion $x(t, \pi)$ den Messungen des realen Systems bei einer optimalen Schätzung der Parameterwerte im Mittel entspricht, so dass sich die Messungen mit den Standardabweichungen σ um die Trajektorien $x(t, \pi)$ verteilen. Andernfalls muss in der Kovarianzmatrix noch ein gemeinsamer Faktor β^2 hinzumultipliziert werden, dieser kann gegebenenfalls anhand der euklidischen Norm der Residuumsfunktion r geschätzt werden [85]. Die Standardabweichungen der Parameter ergeben sich so anhand der Diagonalelemente der Kovarianzmatrix C , es gilt:

$$\sigma(\pi_i)^2 = C_{ii}$$

Dieser Sachverhalt gilt grundsätzlich auch unter Berücksichtigung von Nebenbedingungen und einer Auswertung der Karush-Kuhn-Tucker-Bedingungen der entsprechenden Lagrangefunktion, denn die Nebenbedingungen enthalten selbst keine Zufallsgrößen. Bei Vorgabe eines bestimmten Konfidenzniveaus γ kann durch die Ermittlung des entsprechenden Quantils q_i einer mutmaßlichen Wahrscheinlichkeitsverteilung Φ , wie zum Beispiel der Normal- oder der χ^2 -Verteilung, mit den Standardabweichungen von π ein Konfidenzgebiet K zum entsprechenden Niveau angegeben werden. Das zugehörige Konfidenzquader lautet dabei:

$$\begin{aligned} K &= \prod_i [\pi_i^* - \theta_i, \pi_i^* + \theta_i] \\ \theta_i &= q_i(\Phi, \gamma) \cdot \sqrt{C_{ii}} \end{aligned}$$

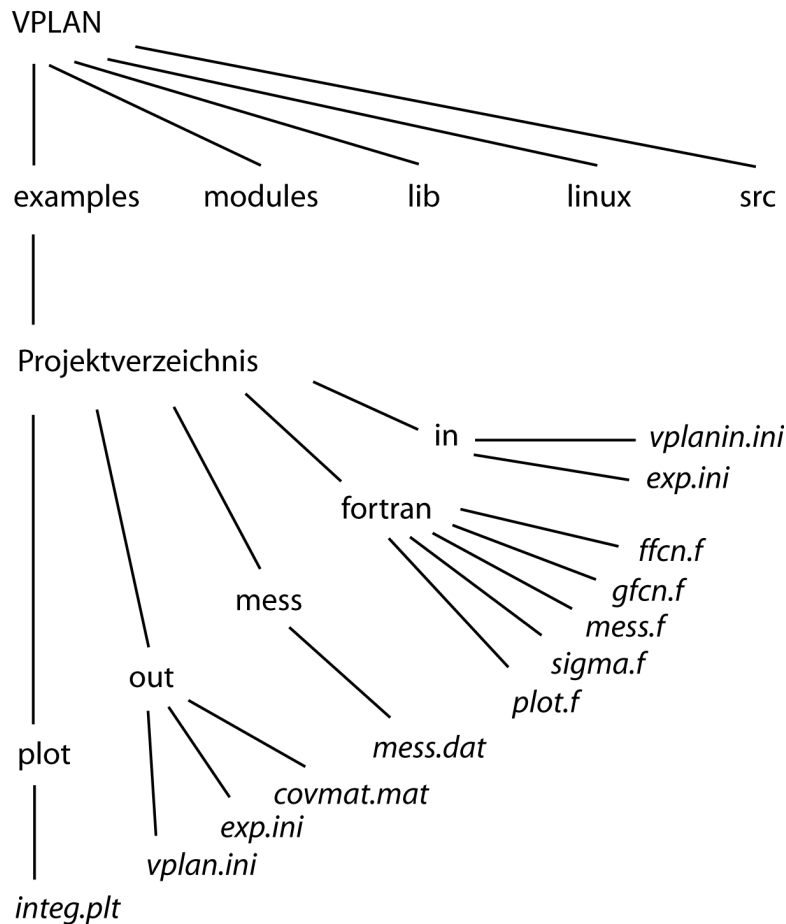


Abbildung 3.1: Verzeichnis- und Dateistruktur des Rechenprogramms VPLAN/PARFIT.

3.5.4 Steuerungen

Die rechten Seiten der Differentialgleichungen des in Gleichung 3.2 formulierten Anfangswertproblems können über die Parameter p hinaus auch von sogenannten Steuergrößen abhängen. Diese können sowohl Parameter (q) als auch Funktionen (u) sein, die von extern einstellbar sind, und gehen als separate Größen in die Lösung der Differentialgleichung $x(t, x_0, p, u, q)$ ein. In dieser Arbeit ist als Steuerfunktion die Temperatur $T(t)$ relevant, welche von der Zeit abhängig ist und sich an bestimmten Schaltpunkten \hat{t} unstetig ändert. Durch die explizite Berücksichtigung solcher Schaltstellen \hat{t} wird eine stückweise Glattheit von f erreicht und somit die Lösbarkeit durch das Integrationsverfahren gesichert [83, 85].

3.5.5 Das Rechenprogramm VPLAN/PARFIT

In dieser Arbeit wird zur Integration und Parameterschätzung des Differentialgleichungsmodells das Rechenprogramm VPLAN [83] im Sinne eines virtuellen Laboratoriums verwendet. VPLAN ist ein Akronym für Versuchsplanung und beinhaltet das Programmpaket PARFIT (Parameter Fitting). Die Verzeichnisstruktur von VPLAN ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Nachfolgend sind die Dateien und die einzelnen Programmdateien aus der Nutzerperspektive beschrieben. Im Stammverzeichnis VPLAN sind die folgenden Unterverzeichnisse enthalten: *src* beinhaltet die Quelldateien des Programmpakets, *linux* beinhaltet das kompilierte Programm und Skripten, *lib* beinhaltet numerische Bibliotheken, *modules* beinhaltet die kompilierte Modellfunktion, und *examples* beinhaltet die individuellen Projektverzeichnisse. In den Projektverzeichnissen formuliert der Wissenschaftler die Anfangswertaufgabe beziehungsweise das Parameterschätzproblem. Dieses beinhaltet die folgenden Unterverzeichnisse und Dateien

1. **in:** In der Datei *vplanin.ini* wird zunächst die Rechenaufgabe (Simulation, Parameterschätzung oder Versuchsplanung) und dann die Verzeichnisstruktur innerhalb des Projekts spezifiziert. Desweiteren werden die Parameter der Differentialgleichungen mit Startwerten, die Experiment- und zugehörigen Messdateien sowie die Ausgabedateien wie Plot- und Residuendateien angegeben. Außerdem können eine Reihe numerischer Optionen eingestellt werden. Im gleichen Verzeichnis befindet sich auch die Datei *exp#.ini*, von dieser Datei können der Experimentanzahl entsprechend viele Dateien erstellt werden. Jede Datei beschreibt dabei die wesentlichen Eigenschaften eines Experiments, also den Messungen unter denselben Versuchsbedingungen. Dabei werden zunächst Start- (t_0) und Endzeitpunkt (t_{end}) spezifiziert und desweiteren die Namen der Modellfunktionen, die sich als gleichnamige Dateien im Verzeichnis *fortran* befinden (hier *ffcn*, *gfcn*), angegeben, außerdem werden die zu simulierenden Zustandsvariablen y mit Anfangswerten angegeben, wobei die Definition der Zustandsvariablen dabei in aufsteigender Reihenfolge y_1 , y_2 , ... erfolgt. Die Bezeichnungen der Zustandsvariablen werden in den Dateien der Modellfunktionen *ffcn/gfcn* im Verzeichnis *fortran* in den globalen Adresszeiger mit der Bezeichnung x^* überführt, die in der Datei *exp#.ini* vorgenommenen Namensdefinitionen werden dabei jedoch nicht übernommen und müssen in *ffcn*, *gfcn* separat zugeteilt werden. Desweiteren wird in *exp#.ini* der Verlauf der Steuerfunktionen u angegeben. Bei der Deklaration der virtuellen Messfunktionen *mfcn* werden die Funktionen *mess#* für die Messungen aus der Modellantwort sowie die Funktionen für die Berechnung einer Standardabweichung *sigma#* zugeteilt, diese Funktionen befinden sich in deren gleichnamigen Dateien *mess#.f* und *sigma#.f* im Verzeichnis *fortran*. Die Nummern $\#$ entsprechen dabei den experimentellen Messgrößen in den Dateien *mess#.dat* im Verzeichnis *mess* und nicht den Experimentnummern. Darunter sind die genauen Zeitpunkte der Messungen angegeben, diese gelten sowohl für die virtuellen wie auch die experimentellen Messungen. Dabei wird stets die entsprechende Messfunktion zur Auslesung der Modellantwort angegeben, diese kann dann mit den Messdaten zwecks Parameterschätzung verglichen werden.
2. **fortran:** In der Datei *ffcn.f* mit der gleichnamigen Funktion *ffcn* werden die Differentialgleichungen definiert, mit denen ein Integrationsschritt durchgeführt wird. Dieser wird in die Speichervariable für den aktuellen Schritt der Lösungstrajektorie x geschrieben. In der Datei *gfcn.f* werden in der gleichnamigen Funktion *gfcn* die Nebenbedingungen definiert. Die Datei *mess#.f* enthält eine Messfunktion, die in der Datei *exp#.ini* zugeordnet ist und deren Nummer der experimentellen Messgröße in entsprechender Reihenfolge in der Datei *mess#.dat* im Verzeichnis

mess entspricht. Die Datei *plot.f* legt die Zeitpunkte und die Zustandsvariablen für den Plot fest, diese wird in eine ebenfalls hier zu spezifizierende Datei im Verzeichnis *plot* geschrieben.

3. **mess:** In diesem Verzeichnis befinden sich die einzelnen Messdateien *mess#.dat*. Sie besitzen die gleiche Nummer wie die entsprechende *exp#.ini*-Datei im *in*-Verzeichnis und enthalten entsprechend jeder Messfunktion *mfcn#/mess#.f* die experimentellen Messungen einer entsprechenden Messgröße zu je zwei Spalten mit dem Messmittelwert und dessen Standardabweichung. In der ersten Spalte ist vorweg die Zeit angegeben, die mit den angegebenen Zeiten in der *exp#.ini*-Datei übereinstimmen muss.
4. **out und plot:** In dieses Verzeichnis werden bei einer Parameterschätzung die berechnete Kovarianzmatrix in die Datei *covmat.mat* geschrieben und die neu berechneten Parameter in Form der Eingabedateien *vplan.ini* und *exp.ini* geschrieben. Das Verzeichnis *plot* enthält die Plots der Lösungstrajektorien, bei einer Parameterschätzung entspricht der Plot der Lösungstrajektorie für den optimierten Parametersatz.

Das Programm VPLAN wird von der Linux-Shell zur Kompilation der Modellfunktion und Berechnung der Ableitungen mit dem folgenden Befehl aus dem VPLAN-Verzeichnis *examples* gestartet: *doit path to vplanin.ini/vplanin.ini*. Zur Durchführung der Simulation beziehungsweise Parameterschätzung wird danach der Befehl *vplan path to vplanin.ini/vplanin.ini* eingegeben.

Methoden der biochemisch-quantitativen Analyse

4.1 Zellkultur

4.1.1 Gewinnung von Makrokonidien

Nach der Inokulation von minimalem Festmedium für *Neurospora crassa* (siehe Anhang) in einem 500 ml-Erlenmeyerkolben wird die Kultur unter Lichteinstrahlung und Raumtemperatur (23-24°C) mehrere Tage lang inkubiert bis ein dichtes Geflecht von roten Konidiophoren herangewachsen ist. Dieses wird durch Zugabe von 50 ml Sorbitollösung (1 M) bei leichtem Schütteln durchspült und die Makrokonidien daraufhin in einem Büchnertrichter über einen Vakuumfilter konzentriert. Die Konzentration der Konidien wird durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 420 nm bestimmt. Ein OD-Wert von 1 entspricht dabei etwa einer Konidienkonzentration von $3 \cdot 10^6$ Konidien / ml. Die Konidiensuspension wird bei -20°C aufbewahrt.

4.1.2 Gewinnung von Myzelium und grundlegende Messbedingung

Zur Gewinnung von Myzelium werden 700 ml Minimalmedium für *Neurospora crassa* in einem autoklavierten Erlenmeyerkolben gegeben und mit 500 µl Konidiensuspension ($OD_{420}=30$) des *Neurospora crassa*-Stammes WT74 inokuliert. Nach leichtem Schwenken des Kolbens werden jeweils 50 ml auf insgesamt 13 kleinere Erlenmeyerkolben verteilt (13 Kulturen). Die Kulturen werden bei Licht und 24°C für zunächst 72 Stunden inkubiert und danach in Dunkelheit transferiert und den Temperaturbedingungen des individuellen Versuchs ausgesetzt. In zwei Experimenten zur Untersuchung der biologisch-instrinsischen Varianz und der Stabilität unter Belichtung (siehe Kapitel 5, Messreihen CDE14 und CDE15) wurden die Kulturen jedoch auch nach den anfänglichen 72 Stunden weiter bei Licht inkubiert. Durch den Transfer in Dunkelheit wird die Oszillation des *frq*-Gens initiiert. Innerhalb dieser Dunkelphase werden alle vier Stunden Messungen durch Entnahme von Kulturen genommen, insgesamt wird der Fungus über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet. Die Temperatur kann dabei über den Inkubator manuell eingestellt werden, es dauert dann etwa eine Minute pro Grad Celsius bis der Inkubator die Temperatur auf ein Zehntel Grad genau über das Lüftungssystem reguliert hat. Zur Aufbereitung einer Kultur wird das Myzelium in einem Büchner-Trichter mit Filterpapier vom Medium getrennt und getrocknet. Da von einer Kultur stets das gesamte Myzelium als Probe entnommen wird, entsprechen sich die Begriffe „biologische Probe“ und „Kultur“ in dieser Arbeit. Das Myzelium wird daraufhin in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Arbeiten von der Entnahme der Kultur bis zum Einfrieren werden lediglich unter einer schwachen Rotlicht-Quelle durchgeführt, wodurch

eine Anregung der Photorezeptoren WCC und Vivid, die für blaues Licht sensitiv sind, vermieden wird. Das Myzelium wird dann in einem mit Stickstoff gekühltem Mörser zu einem homogenen Pulver zerrieben. Dieses Pulver kann dann zur Protein- oder RNA-Extraktion verwendet werden.



Abbildung 4.1: Illustration der Inkubationsbedingungen. Eine biologische Probe entspricht dem gesamten Myzelium-Knäuel, das in einem Erlenmeyer-Kolben heranwächst. Dieses Knäuel wird im Folgenden eine „Kultur“ genannt. Da von einer Kultur keine Teilproben entnommen werden, entspricht in dieser Arbeit eine biologische Probe stets einer Kultur. Durch das Mörsern im gefrorenen Zustand wird die Kultur homogenisiert, so dass die anschließenden Messungen dem Mittelwert der molekularen Konzentrationen in dieser Kultur entsprechen. Jede Kultur bietet dabei genügend biologisches Material für die zwölfmalige RNA-Extraktion plus einer Protein-Extraktion. Die Helligkeit lässt sich zweistufig (sehr hell oder ganz dunkel) innerhalb des Schüttelinkubators einstellen, ebenso wie die Temperatur, die mit einer Genauigkeit von einem Zehntel Grad Celsius eingestellt werden kann und dann automatisch durch das Lüftungssystem reguliert wird.

4.2 *frq*-mRNA-Analyse

Zur Analyse der *frq*-mRNA wird das eingefrorene Myzelium zunächst unter alkalischen Bedingungen lysiert und durch Verwendung einer Spritze durch Aufsaugen und Ausstoßen durch eine Injektionskanüle homogenisiert (Qiagen RNeasy plant kit). Für die Fällung und Isolierung der Gesamt-RNA wird der Qiacube-Pipettierroboter benutzt. Die Extraktion ergibt dabei Erträge von mindestens 200 ng/ μ l RNA, die genauen Mengen werden photometrisch anhand der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Nanodrop). Die Qualität der 18S-rRNA wird desweiteren mittels Gelelektrophorese (2% Agarose, 0,5x TBE Puffer) geprüft, die Gele könnten anhand der mitaufgetragenen RNA-Standardleiter später auch als zur Photometrie der Gesamt-RNA alternative Referenz in der quantitativen RT-PCR verwendet werden. In dieser Arbeit wird diese Alternative jedoch nicht verwendet. Zur Gewinnung technischer Replikate für die Berechnung eines statistisch erhobenen Messfehlers wird aus jeder Kultur/Probe insgesamt zwölf Mal separat Gesamt-RNA extrahiert, diese zwölf Extraktionen erfolgen dabei zeitlich parallel. Die extrahierten Gesamt-RNA-Lösungen werden daraufhin immer in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Dabei ist entscheidend, dass die Anzahl der Gefrier- und Auftauvorgänge bei jeder Replikatprobe zwischen der Extraktion und dem Ende

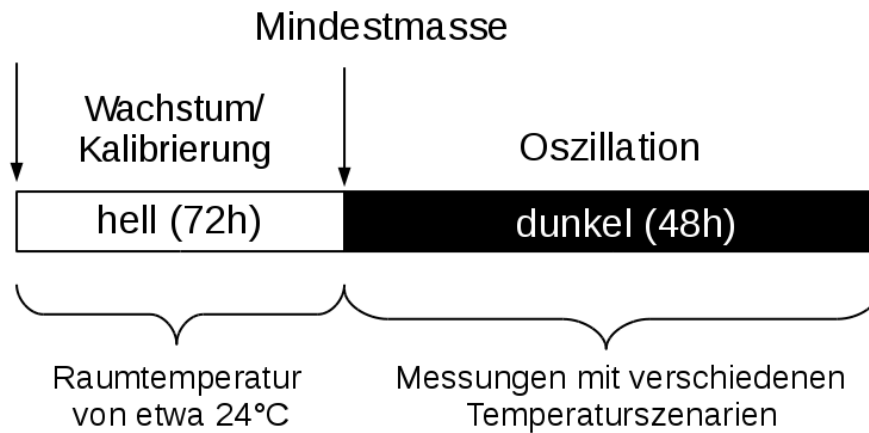


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der allgemeinen Versuchsbedingungen aller Messreihen. Für jede Messreihe werden 13 Kulturen angesetzt und genau drei Tage bei 24°C (Raumtemperatur) unter Lichteinstrahlung herangezogen. Durch das Licht wird gewährleistet, dass alle Kulturen eine hohe Aktivität von WCC besitzen und somit permanent auf den subjektiven Zeitpunkt des Tag/Nacht-Übergangs vorbereitet sind. Wie aus den Messergebnissen dieser Arbeit hervorgeht ist in dieser Phase eine Oszillation der *frq*-Aktivität mit relativ niedriger Amplitude anzunehmen, jedoch wird durch den Wegfall des Lichts ein ausreichend starker Reiz für den Anbruch der Nacht vermittelt, auf den jede Kultur dann mit einem massiven Abfall der *frq*-Aktivität reagiert. Je nach Licht- beziehungsweise Temperaturszenario wird in den darauf folgenden 48 Stunden das Licht beziehungsweise die Temperatur manuell eingestellt. In diesem Zeitraum werden dann in der Regel alle vier Stunden (Ausnahme bei Messreihe CDE14 zur Untersuchung der biologisch-intrinsischen Varianz) Messproben entnommen. Jede Messprobe entspricht dabei der Entnahme einer vollständigen Kultur mit anschließender Homogenisierung.

der mRNA-Analyse identisch ist, da bei diesem Phasenübergang ein erheblicher Anteil von mRNA degradiert (siehe Messung im Anhang 1).

4.2.1 Quantitative RT-PCR

Die Quantifizierung von *frq*-mRNA erfolgt über eine reverse Transkription (RT) der mRNA-Fractionen aus den Gesamt-RNA-Extrakten und einer anschließenden quantitativen PCR-Reaktion. Die reverse Transkription und die PCR erfolgen dabei in einem einzigen Reaktionsgefäß mit dem Quantitect Probe RT-PCR Kit von Qiagen. Die Reaktion der reversen Transkription geht dabei voran, indem das thermostabile Polymeraseenzym durch Antikörper von einer Reaktionskatalyse blockiert wird. Erst durch Erhitzen auf 90°C werden die Antikörperbindungen gelöst und die reverse Transkriptase denaturiert. Für die reverse Transkription werden stets 250 ng der Gesamt-RNA verwendet. Desweiteren werden die folgenden Reagenzmengen verwendet: 25 µl Reaktionsvolumen, 1,0 µM je Primer, 0,5 µM Sonde, 0,25 µl RT-Mix. Die Reagenzmengen, insbesondere die der Enzyme, sind dabei immer gleich um zum einen den Anteil an revers transkribierter mRNA und zum anderen die Amplifikationsrate bei der PCR identisch zu halten. Wie im Anhang anhand einer Verdünnungsreihe von Gesamt-RNA bei der qRT-PCR gezeigt wird, wirken sich Veränderungen in der eingesetzten Menge von Gesamt-RNA sowie reverser Transkriptase nicht linear sondern sigmoidal auf die gemessene relati-

ve mRNA-Menge aus, weshalb qRT-PCR-Messungen insbesondere im Fall unterschiedlich eingesetzter Mengen von Gesamt-RNA oder reverser Transkriptase nicht miteinander verglichen werden können. Die Sonden sind mit dem Farbstoff 5'-FAM-TAMRA-3' markiert (sogenannte Taqman-Sonden). Die Sequenzen der Primer und der Sonden sind im Anhang spezifiziert. Das qRT-PCR-Programm verläuft stets folgendermaßen: 30 Min. 45°C, 1 Min. 90°C, 40x(1 Min. 60°C, 15 Sek. 90°C). Für die Bestimmung der Zykluszahl wird der C_T -Schwellwert, also die Lichtemissionsstärke einer Reaktionslösung, bei der die PCR-Zykluszahl festgehalten wird, auf 0,1 gesetzt. Dieser Wert entspricht dabei etwa dem zweifachen der Lichtintensität, welche das PMT-Messgerät stabil messen kann, auf der anderen Seite ist er dabei möglichst niedrig gewählt um die Zykluszahl in einem exponentiellen Amplifikationsbereich der PCR-Reaktion zu messen. Der C_T -Wert ist dabei Gerät- und Versuchs-spezifisch und wird lediglich als Vergleichsmaßstab zwischen Reaktionen auf derselben 96er-Mikrotiterplatte verwendet. Zum Vergleich von C_T -Werten zwischen 96er-Reaktionsplatten wird auf jeder Platte ein Standard von Gesamt-RNA mit gemessen (vergleichbar mit DNA-Standardleiter bei Gelelektrophorese). Dieser Gesamt-RNA-Standard wurde durch Mischung von Gesamt-RNA-Extrakten aus mehreren Kulturen (Inkubation bei Licht, Raumtemperatur, vier Tage) in ausreichender Menge selbst hergestellt. Nach der Mischung der Gesamt-RNA-Extrakte wurde die Gesamtlösung in hoher Stückzahl aliquotiert, in Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert. Jedes Aliquot wird nach dem Auftauen nur einmalig verwendet und nicht wieder eingefroren um in Anbetracht der Degradation durch den Gefrier- und Tauvorgang die Einheitlichkeit des Standards zu gewährleisten. Zusätzlich zur *frq*-mRNA werden die Haushaltsgene *β -actin*, *γ -tubulin*, *gapdh*, and *g6pd* mit gemessen. Die Primer und Sonden für die quantitative PCR befinden sich ebenfalls im Anhang. Die Haushaltsgene sollen als Vergleichsmethode mit anderen in der Literatur verfügbaren Messungen [89], die auf eines dieser Gene referenzieren, dienen, in dieser Arbeit werden sie jedoch nicht zur Quantifizierung verwendet. Stattdessen wird als Vergleichsmethode in erster Linie die Menge an Gesamt-RNA verwendet. Die Normalisierung erfolgt dann über den Gesamt-RNA-Standard, wodurch auch eine Verwendung der Messdaten durch Außenstehende ermöglicht werden soll [90, 91]. Die genaue Verwendung des Gesamt-RNA-Standards und die genaue Vorgehensweise bei der Normalisierung wird in den folgenden Abschnitten beschrieben. Die einzelnen Sequenzen für Primer und Sonden aller Zielgene sowie eine Alinierung innerhalb der genomischen Gensequenzen befinden sich im Anhang.

4.3 Technische Details der qRT-PCR

Vor der Erläuterung der Normalisierungsmethode der Messdaten soll eine kurze Analyse der Varianzen für den Verlauf der gesamten mRNA-Messprozedur dargelegt werden. Zum einen erklären die dabei ausgeführten theoretischen Überlegungen und Illustrationen den Hintergrund der Normalisierung, gleichfalls stellt die Analyse auch die Entscheidungsgrundlage für die Ausgestaltung der technischen Replikate dar, da die einzelnen Schritte bei der mRNA-Messprozedur von unterschiedlich großen Varianzen geprägt sind. Der letztere Aspekt ist daher von Wichtigkeit, weil die Bestimmung der Messvarianz aufgrund des kosten- und zeitintensiven RNA-Messverfahrens möglichst effizient durchgeführt

werden sollte. Desweiteren hilft eine Differenzierung der biologisch-intrinsischen von der technischen Varianz bei der sachgerechten numerischen Modellierung und Parameterschätzung.

4.3.1 Varianz- und Replikatarten

Die mittlere Menge einer bestimmten Ziel-mRNA (z. B. *frq*-mRNA) im Verhältnis zur Gesamt-RNA in einer einzelnen Kultur liegt stets in einem eindeutigen Verhältnis vor, diese soll im Folgenden als die relative mRNA-Menge bezeichnet werden. Diese relative mRNA-Menge gilt es durch das mRNA-Messverfahren möglichst genau zu bestimmen, bis zur Konvertierung in eine numerische Größe unterliegt sie jedoch zahlreichen Verschiebungen. Die Abbildung 4.3 (links) gibt übersichtsartig die einzelnen Schritte der mRNA-Messprozedur angefangen bei der Wahl einer Messbedingung (z.B. Messzeitpunkt bei einem bestimmten Temperaturszenario) bis hin zur eigentlichen Quantifizierung wieder. Im Einzelnen umfasst diese Abbildung die folgenden (Mess-)Schritte: Im Rahmen eines biologischen Experiments kann sich aufgrund der biosystemischen Eigenschaften die relative mRNA-Menge ändern (oberste Stufe). Jede Kultur kann trotz identischer experimenteller Bedingungen intrinsischen Fluktuationen unterliegen, weshalb die relative mRNA-Menge in unterschiedlichen Kulturen einer Varianz unterliegt (zweite Stufe von oben). Bei der RNA-Extraktion, der reversen Transkription und der quantitativen PCR werden diese eindeutigen, relativen mRNA-Mengen (scharfe Signale) jeweils aufgrund einer für den jeweiligen Schritt der Messprozedur typischen Varianz verschoben, desweiteren unterliegt die photometrische Gesamt-RNA-Quantifizierung einer Messvarianz, die in die Bestimmung der relativen mRNA-Menge im Rahmen der Normalisierung eingeht. Die Varianzen dieser Messschritte sollen folgend als Teilvarianzen bezeichnet und mit ${}^t\sigma_i^2$ abgekürzt werden, dabei bezeichnet i die Ebene der Varianz nach Abbildung 4.3 (rechts). Es stellen jedoch nur die beiden untersten Ebenen (σ_1^2 und σ_2^2) Konvertierungen in numerische Größen dar, bei allen anderen vorangehenden Messschritten wird das scharfe Signal der relativen mRNA-Menge lediglich in chemischer Form kodiert und ist dem Auge somit nicht zugänglich. Die Teilvarianzen ${}^t\sigma_i^2$ für $i \geq 3$ können somit nicht direkt gemessen werden. Ein Anhaltspunkt zu deren Größen kann jedoch über eine Replikatstrategie gewonnen werden, welche in Abbildung 4.3 (rechts) veranschaulicht ist. Dazu wird auf jeder Ebene der Messprozedur eine Probe mehrfach aliquotiert. Die Aliquotierungen werden dann als chemisch identische Replikate ohne weitere Aliquotierungen bei nachfolgenden Messschritten gemessen. Die daraus ermittelte Varianz der bis zu dieser Ebene ablaufenden Messprozedur wird als Gesamtvarianz der Ebene i bezeichnet und mit ${}^g\sigma_i^2$ abgekürzt. Neben der Bestimmung der Messvarianzen wird darauf aufbauend auch die biologisch-intrinsische Varianz σ_5^2 nach dem gleichen Prinzip bestimmt. Im Sinne dieser Betrachtung sollen nachfolgend die Varianzen σ_1^2 bis σ_3^2 als teil-technische Varianzen und die zu deren Bestimmung erforderlichen Replikate als teil-technische Replikate, die Varianz σ_4 als vollständig-technische Varianz und die entsprechenden Replikate als vollständig-technische Replikate und die Varianz σ_5^2 als biologisch-intrinsische Varianz und die entsprechenden Replikate als biologische Replikate oder Kulturreplikate bezeichnet werden.

Zur günstigen Wahl technischer Replikate ist es entscheidend, neben den Gesamtvarianzen ${}^g\sigma_i^2$ auch die einzelnen Teilvarianzen ${}^t\sigma_i^2$ zu kennen. Es wird angenommen, dass die statistischen Verteilungen

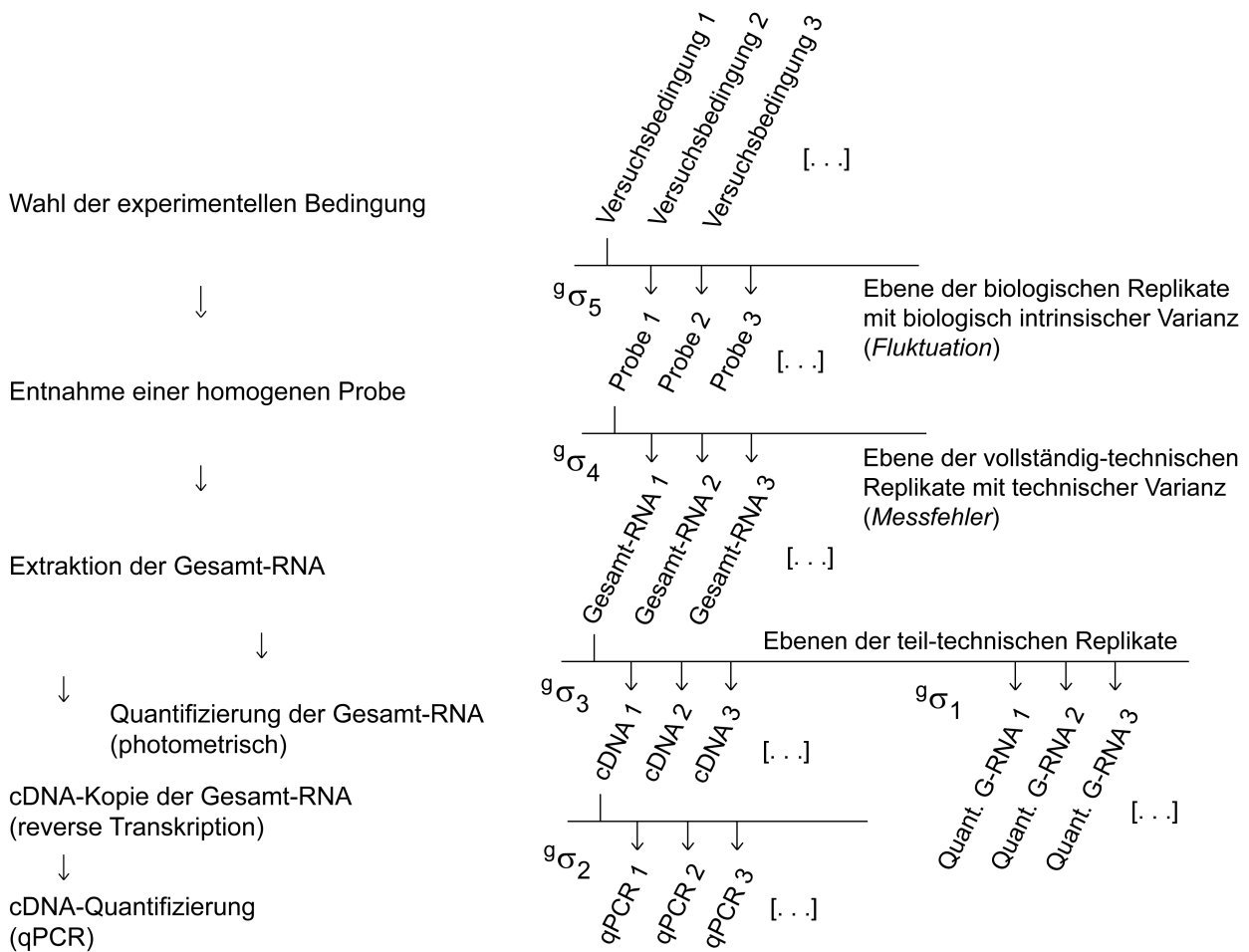


Abbildung 4.3: Übersicht zur Analyse der Varianzen der einzelnen Schritte innerhalb der mRNA-Messprozedur. Linkes Bild: Gezeigt ist der Ablauf der wesentlichen Schritte der mRNA-Messprozedur. In einer einzelnen Kultur liegt die zur Gesamt-RNA relative Menge einer bestimmten mRNA-Spezies eindeutig vor, bis zur Messung wird dieses scharfe Signal aufgrund der chemischen Transformationen durch die einzelnen Messschritte beziehungsweise durch das Auslesen einer numerischen Größe entsprechend der für diese Messschritte typischen Varianzen verschoben. Die Varianzen der Messschritte sollen als Teilvarianzen bezeichnet ($t\sigma_i^2$ für Ebene i) werden. Diese Teilvarianzen lassen sich jedoch nicht direkt messen, da nur die unteren Ebenen (qPCR) und die Photometrie Messwerte liefern, sie lassen sich jedoch indirekt berechnen. Auf jeder der in der linken Abbildung genannten Messebenen lassen sich Replikate durch Aliquotierung einer einzelnen Probe erzeugen und messen (rechte Abbildung). Die dadurch gemessenen Varianzen werden als Gesamtvarianz $g\sigma_i$ der Ebene i bezeichnet. Die Gesamtvarianz einer Ebene i beruht dabei auf der Faltung der statistischen Verteilungen der einzelnen Messschritte ab dieser Ebene bis zur numerischen Quantifizierung. Aufgrund dieser Eigenschaft kann die Teilvarianz des Messschritts zu einer betrachteten Ebene (i) durch Subtraktion der Gesamtvarianz der sich anschließenden Ebene ($i - 1$) von der Gesamtvarianz der betrachteten Ebene (i) berechnet werden, es gilt also: $t\sigma_i^2 = g\sigma_i^2 - g\sigma_{i-1}^2$. Die Varianz $g\sigma_4^2$ (beziehungsweise das Replikat) der Ebene $i = 4$ wird dabei als vollständig-technische Varianz (bzw. Replikat) bezeichnet, während die Varianzen $g\sigma_1^2$ bis $g\sigma_3^2$ als teil-technisch bezeichnet werden. Neben den technischen Varianzen bezeichnet die Varianz $g\sigma_5^2$ der Ebene $i = 5$ die biologisch-intrinsische Varianz, also der Varianz zwischen Kulturen bei identischen Versuchsbedingungen.

der durch die einzelnen Messschritte verursachten Verschiebungen normalverteilt sind. Wird ein auf der Messebene i mit der Teilvarianz ${}^t\sigma_i^2$ verrauschtes Signal durch den unmittelbar folgenden Messschritt $i-1$ zusätzlich mit der Varianz ${}^t\sigma_{i-1}^2$ verrauscht, dann entspricht dies einer Faltung der beiden, ${}^t\sigma_i^2$ und ${}^t\sigma_{i-1}^2$ entsprechenden Normalverteilungen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 4.4 (links) dargestellt. Die sich aus dieser Faltung ergebende Verteilung wird anhand des folgenden Integrals berechnet [79]. Seien die Funktionen $f(t)$ und $g(t)$ zwei Abbildungen von \mathbb{R} nach \mathbb{R} , dann sei die Faltung \oplus_2 von f und g definiert als:

$$f_i \oplus_2 f_{i-1}(x) := \int_{-\inf}^{+\inf} f_i(t) \cdot f_{i-1}(x-t) dt \quad (4.1)$$

Seien nun f_i die Normal-Verteilung zu ${}^t\sigma_i$ und f_{i-1} die Normal-Verteilung zu ${}^t\sigma_{i-1}$ mit

$$f_i(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \cdot {}^t\sigma_i^2}} \exp\left(-\frac{x^2}{2 \cdot {}^t\sigma_i^2}\right)$$

$$f_{i-1}(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi \cdot {}^t\sigma_{i-1}^2}} \exp\left(-\frac{x^2}{2 \cdot {}^t\sigma_{i-1}^2}\right)$$

dann ergibt sich nach einer Transformation in Polarkoordinaten für die Faltung von f_i und f_{i-1} :

$$f_i \oplus_2 f_{i-1}(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi({}^t\sigma_i^2 + {}^t\sigma_{i-1}^2)}} \exp\left(-\frac{x^2}{2({}^t\sigma_i^2 + {}^t\sigma_{i-1}^2)}\right)$$

Die Varianz von $f \oplus_2 g$ entspricht also gerade der Summe der Teilvarianzen ${}^t\sigma_i^2 + {}^t\sigma_{i-1}^2$. In gleicher Weise pflanzt sich bei der Division zweier Messgrößen die Varianz fort (Abbildung 4.4 rechts), dies ist bei der Normalisierung des qPCR-Ergebnisses mit der photometrisch bestimmten Gesamt-RNA-Menge wichtig. Damit ergeben sich für die einzelnen Teil- beziehungsweise Gesamtvarianzen die Beziehungen entsprechend der folgenden Gleichungen:

$$g\sigma_1^2 = {}^t\sigma_1^2$$

$$g\sigma_2^2 = {}^t\sigma_2^2$$

$$g\sigma_3^2 = g\sigma_2^2 + {}^t\sigma_3^2$$

$$g\sigma_4^2 = g\sigma_1^2 + g\sigma_3^2 + {}^t\sigma_4^2$$

$$g\sigma_5^2 = g\sigma_4^2 + {}^t\sigma_5^2$$

Entsprechend der beschriebenen Strategie wurden zur Bestimmung der Gesamtvarianzen Aliquotierungen von einzelnen Proben bei jedem Schritt der RNA-Messprozedur genommen und diese als Replikate gemessen. Desweiteren wurden mehrere Kulturen unter gleichen Versuchsbedingungen entnommen und diese Kulturen als Replikate zur Bestimmung der biologisch-intrinsischen Varianz verwendet, dabei wurden diese Kulturen parallel herangezogen, so dass in diesem Fall bei konsequenter Auslegung die Versuchsbedingung das scharfe Eingangssignal darstellen würde. Abbildung 4.5 zeigt sowohl die Gesamt- wie auch die Teilstandardabweichungen, welche sich aus den Gesamt- und Teilvarianzen ergeben, der einzelnen Ebenen. Die Nummern der Abszisse entsprechen dabei den in Abbildung

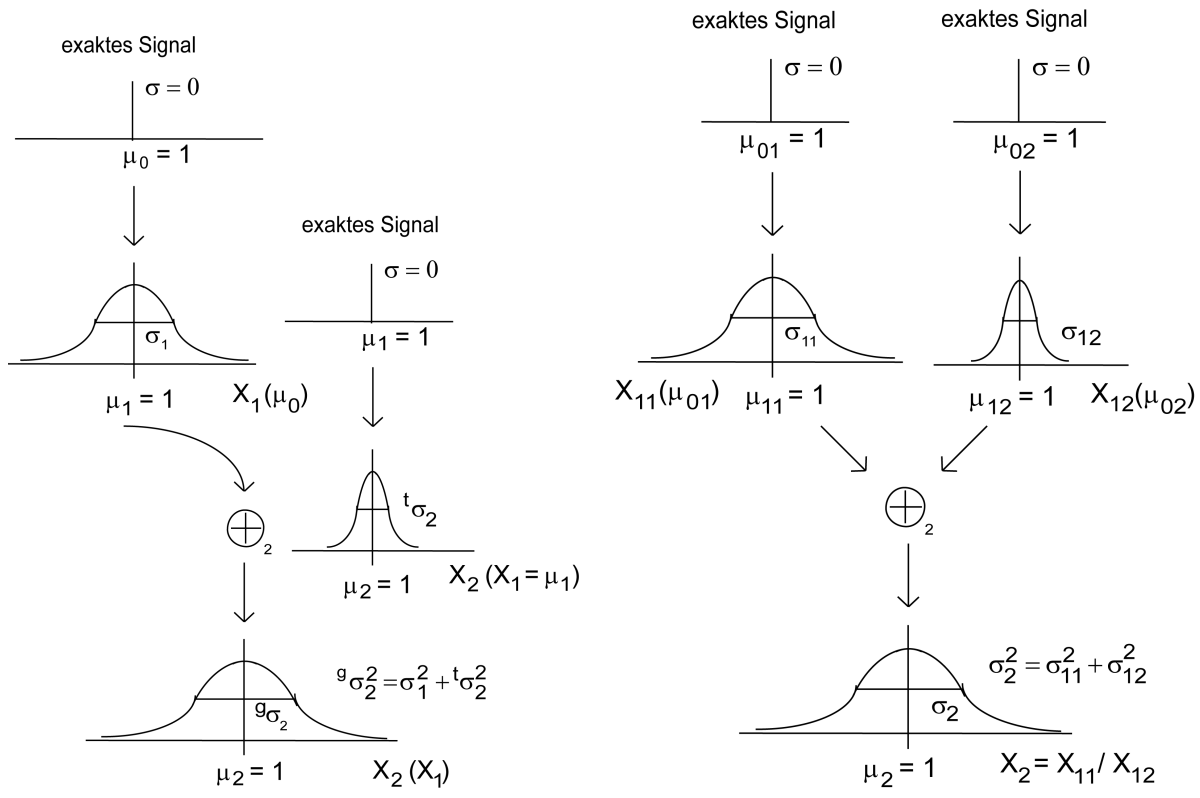


Abbildung 4.4: Überblick über die beiden Arten der bei der mRNA-Messprozedur auftretenden Varianzfortpflanzung. Die rechte Abbildung stellt die sogenannte Faltung der Varianzen zweier normalverteilter Zufallsvariablen X_1 sowie X_2 dar. Dabei verrauscht die Zufallsvariable X_1 ein scharfes Eingangssignal μ_0 mit der Standardabweichung σ_1 , und die Zufallsvariable X_2 verrauscht ihr Eingangssignal, das in diesem Fall dem Ergebnis von X_1 entspricht, mit der Standardabweichung ${}^t\sigma_2$, t kennzeichnet dabei, dass es sich lediglich um die Standardabweichung der durch die Zufallsvariable X_2 verursachten Verrauschung handelt. Mithilfe der Definition des Faltungsoperators \oplus_2 (siehe Gleichung 4.1) lässt sich die Gesamtvarianz ${}^g\sigma_2^2$ von $X_2(X_1)$ über die Summe der beiden Teilvarianzen σ_1^2 und ${}^t\sigma_2^2$ berechnen, \oplus_2 ist dabei kommutativ, es spielt also abstrakt gesehen keine Rolle, welche Zufallsvariable das Eingangssignal zuerst verrauscht. Die linke Abbildung stellt die Varianzfortpflanzung bei der Division zweier Zufallsvariablen X_{11} und X_{12} dar. Auch in diesem Fall lässt sich die Varianz von $X_2 := X_{11}/X_{12}$ durch Faltung der Wahrscheinlichkeitsverteilungen von X_{11} und X_{12} berechnen und die Varianz von X_2 entspricht der Summe der Varianzen von X_{11} und X_{12} .

4.3 (rechts) definierten Ebenen. Dargestellt ist die relative Standardabweichung zum Mittelwert. Wie man erkennen kann ist die Teilstandardabweichung durch die RNA-Extraktion viermal so groß wie die Gesamtstandardabweichung der qRT-PCR-Messung. Entsprechend lässt sich ableiten, dass die Wahl von ausschließlich vollständig-technischen Replikaten zur Bestimmung des technischen Messfehlers bei der Messung der relativen mRNA-Menge zwar am zeitintensivsten ist, diese Replikatzahl jedoch auch die meisten Informationen abdeckt. Replikate auf den unteren Ebenen können dagegen vernachlässigt beziehungsweise im Falle der photometrischen Gesamt-RNA-Messung auf eine niedrige Stückzahl beschränkt werden.

Durch die Verwendung von Replikaten wird nicht nur eine Bestimmung des Messfehlers durch Schätzung der Standardabweichung ${}_1\hat{\sigma}$ ermöglicht, sie reduziert auch den Messfehler des Mittelwertes $\hat{\mu}$, der aus den gleichen Replikaten geschätzt wird. Die Standardabweichung ${}_n\hat{\sigma}$ des aus n gemessenen Replikaten (m_r mit $r = 1, 2, \dots, n$) geschätzten Mittelwertes $\hat{\mu}_r(m_r)$ sinkt dabei proportional zum Kehrwert von \sqrt{n} , es gilt also [92]:

$$\hat{\mu}_r(m) = \frac{1}{n} \sum_{r=1}^n m_r \quad (4.2)$$

$${}_1\hat{\sigma}_r(m) = \frac{1}{\sqrt{n-1}} \sqrt{\sum_{r=1}^n (m_r - \hat{\mu})^2} \quad (4.3)$$

$${}_n\hat{\sigma}_r(m) = \frac{{}_1\hat{\sigma}_r(m)}{\sqrt{n}} \quad (4.4)$$

Nach dieser Gleichung wird in Abbildung 4.5 neben den vollständig-technischen Standardabweichungen des einzelnen Replikats (${}^g_1\sigma_4$ und ${}^t_1\sigma_4$) auch die Standardabweichung des Mittelwertes aus zwölf Replikaten (${}^g_{12}\sigma_4$ und ${}^t_{12}\sigma_4$) geschätzt. Diese Standardabweichung (${}_{12}\sigma_4$) ist die Messgrundlage für die Berechnung der biologisch-intrinsischen Standardabweichung σ_5 von *frq*- und *g6pd*-mRNA, für deren Messungen zwölf Kulturen zu jeweils zwölf vollständig-technischen Replikaten gemessen wurden. Diese Messung entspricht dem Experiment CDE14, das in Kapitel 5 im Detail beschrieben ist. Die Berechnung von ${}^t\sigma_5$ (um Verwechslungen zu vermeiden genau genommen ${}^t_1\sigma_5$) erfolgt dabei unter Verwendung der Standardabweichung des Mittelwertes aus zwölf vollständig-technischen Replikaten, also ${}^g_{12}\sigma_4$. Sowohl die Standardabweichung der *frq*- als auch die der *g6pd*-mRNA sind wesentlich größer als der Messfehler ${}^g_{12}\sigma_4$, der aus zwölf vollständig-technischen Replikaten bestimmt wurde. Ein Vergleich mit der Standardabweichung des einzelnen, vollständig-technischen Replikats (${}^g_1\sigma_4$) verdeutlicht, dass eine Messung der biologisch-intrinsischen Standardabweichung ${}^g\sigma_5(\textit{frq})$ der relativen *frq*-mRNA-Menge mit einer geringeren Replikatzahl diese nicht hätte auflösen können. Interessanterweise ist die Standardabweichung von *frq*-mRNA geringer als die von *gtub*-mRNA, obwohl entsprechend des eigentlichen Zwecks des Haushaltsgens dieses eine geringere Standardabweichung hätte erwarten lassen. Vermutlich bewirkt der intensive Lichtreiz eine genaue Regulation des *frq*-Gens, welches durch Änderungen in seiner relativen Menge weitreichende, zellphysiologische Wirkungen ausüben kann, während

die Bedeutung der relativen Menge an *gtub*-mRNA für eine Signalwirkung wenig bedeutsam ist. Aufgrund der hohen Varianz der Haushaltsgene wird in dieser Arbeit auf sie als relative Bezugsgröße verzichtet und stattdessen die Gesamt-RNA-Menge verwendet, welche unter anderem alle Haushaltsgene umfasst und damit erwartungsgemäß die Varianzen verschiedener RNA-Spezies nivellieren sollte. Die Varianzen der anderen Haushaltsgene können im Einzelnen in Kapitel 5 eingesehen werden.

4.3.2 Datennormalisierung (Pipettierschema)

In dieser Arbeit wird die *frq*-mRNA jeder Kultur stets zu zwölf vollständig-technischen Replikaten gemessen. Dies bedeutet, dass die Gesamt-mRNA einer Kultur zwölfmalig separat extrahiert wird, dann aber keine weiteren Replikate mehr bei den folgenden Schritten der Messprozedur genommen werden und stattdessen jedes Gesamt-RNA-Extrakt genau einmal gemessen wird. Jedes vollständig-technische Replikat wird dabei parallel für alle fünf genannten mRNA-Ziele (*frq* und Haushaltsgene) mit Hilfe der qRT-PCR gemessen. Da die Primer und Sonden zur Messung eines mRNA-Ziels bei diesen zwölf Replikaten immer identisch sind, lässt sich für jede Ziel-mRNA eine einzelne Enzymlösung (mit Primern/Sonde) ansetzen. Die Verwendung einer solchen Enzymlösung verringert dabei nicht nur den Pipettieraufwand, sie vermindert auch Fluktuationen in bestimmten Pipettiermengen, insbesondere die Pipettierung von reverser Transkriptase in Glycerol im Mengenbereich unter 1 μl wäre sonst sehr kritisch. Im Anhang wird über eine Verdünnungsreihe der reversen Transkriptase verdeutlicht, dass das qRT-PCR-Messergebnis gerade für Unterschiede in der Menge dieses Enzyms besonders sensitiv ist. Abbildung 4.6 veranschaulicht das Pipettierschema bei der Vermischung der Gesamt-RNA-Extrakte einer Kultur mit den für die fünf mRNA-Zielsequenzen spezifischen Enzymlösungen als ein Vektorprodukt. Dabei ergeben sich bei zwölf Gesamt-RNA-Proben und fünf mRNA-Zielsequenzen 60 qRT-PCR-Reaktionen, die auf einer 96er-Reaktionsplatte gemessen werden. Die zwölf Gesamt-RNA-Proben decken jedoch nicht die Messvarianz ab, die durch die unterschiedlichen Messbedingungen verschiedener Platten entsteht. Aus diesem Grund wird auf jeder Reaktionsplatte sechs Mal der Gesamt-RNA-Standard mit aufgetragen und parallel zu den Gesamt-RNA-Proben mit gemessen. Aufgrund der chemischen Gleichheit jedes Aliquots des Gesamt-RNA-Standards ist gewiss, dass den qRT-PCR-Messungen immer der gleiche Mittelwert unterliegt. Die Abweichungen zwischen Messungen auf verschiedenen Platten, die über die Platten-intrinsische Standardabweichung hinausgehen, sind dann auf die Unterschiede in den Messbedingungen zweier 96er-Reaktionsplatten zurückzuführen. Eine statistische Analyse in Kapitel 5 zeigt, dass diese Abweichungen erheblich genug sind, um die Verwendung des Gesamt-RNA-Standards zu rechtfertigen.

Die Formel zur Normalisierung der Messdaten aus der qRT-PCR lautet damit:

$$\mu_{frq,m}^{norm}(t = t_j) := \frac{\hat{\mu}_r({}^p frq_m^r(t_j)/{}^p GRNA_m^r(t_j))}{\hat{\mu}_r({}^s frq_m^r(t_j)/{}^s GRNA)} \quad (4.5)$$

$\mu_{frq,m}^{norm}(t = t_j)$ bezeichnet den mit dem Gesamt-RNA-Standard normalisierten Messmittelwert der relativen *frq*-mRNA-Menge der Messreihe m zum Zeitpunkt t_j . Der Anschaulichkeit halber wird hier jeder Messreihe ein separater Index m gegeben, diese Information könnte wie in der Residuumsfunktion 3.7 aus Kapitel 3 jedoch auch im Index j kodiert werden. Desweiteren entspricht der Index

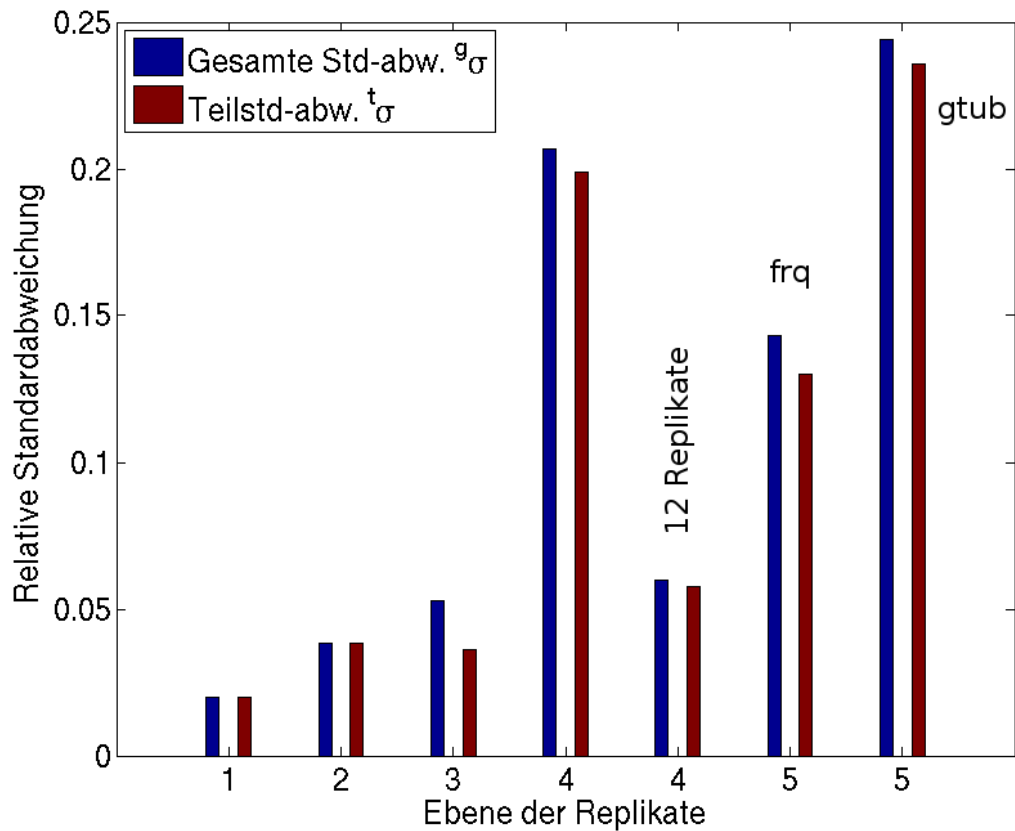


Abbildung 4.5: Analyse der relativen Standardabweichungen der einzelnen Messschritte in der mRNA-Messprozedur sowie der biologisch-intrinsischen Standardabweichung. Die Nummern auf der Abszisse kennzeichnen entsprechend Abbildung 4.3 (rechts) die Ebenen, auf die sich die aufgetragenen, zu ihren Mittelwerten relativierten Standardabweichungen beziehen. In blau ist dabei die gesamte relative Standardabweichung aufgetragen, die sich durch Messung von identischen Replikaten auf dieser Ebene ergeben. In rot ist die unter Verwendung der Faltungstheorie berechnete Teilstandardabweichung dieser Ebene aufgetragen. Wesentlich für die Ausgestaltung der technischen Replikate ist das Ergebnis, dass die Teilstandardabweichung der Ebene 4, also die Verrauschung durch die Gesamt-RNA-Extraktion viermal so groß ist wie der Messvorgang der qRT-PCR insgesamt. Zur Erlangung aussagekräftiger Replikate ist es deshalb sinnvoll, die technischen Replikate „vollständig“ zu wählen. Neben der vollständig-technischen Standardabweichung der einzelnen Messung (Ebene 4) ist auch die Standardabweichung des aus zwölf Replikaten berechneten Mittelwerts gezeigt, diese lässt sich durch Division der Einzelstandardabweichung mit $\sqrt{12}$ schätzen. Mit dieser Messgenauigkeit (${}_{12}^g\sigma_4$) wurde anhand von ebenfalls zwölf Kulturreplikaten unter identischen Messbedingungen sowohl die biologisch-intrinsische Standardabweichung der relativen *frq*- als auch die der *gtub*-mRNA-Menge bestimmt. In beiden Fällen liegen die Teilstandardabweichungen ${}^t\sigma_5$ deutlich über der vollständig-technischen Standardabweichung mit zwölf Replikaten (${}_{12}^g\sigma_4$). Ein Vergleich mit der Standardabweichung des einzelnen, vollständig-technischen Replikats (${}^g\sigma_4$) zeigt, dass eine niedrigere Replikatzahl die Auflösung der biologisch-intrinsischen Standardabweichung ${}^g\sigma_5$ der relativen *frq*-Menge nicht möglich gemacht hätte. Interessanterweise ist die biologisch-intrinsische Standardabweichung ${}^g\sigma_5$ des Haushaltsgens *gtub* größer als die von *frq*, was sich aufgrund einer höheren Signalwirksamkeit des *frq*-Gens erklären ließe.

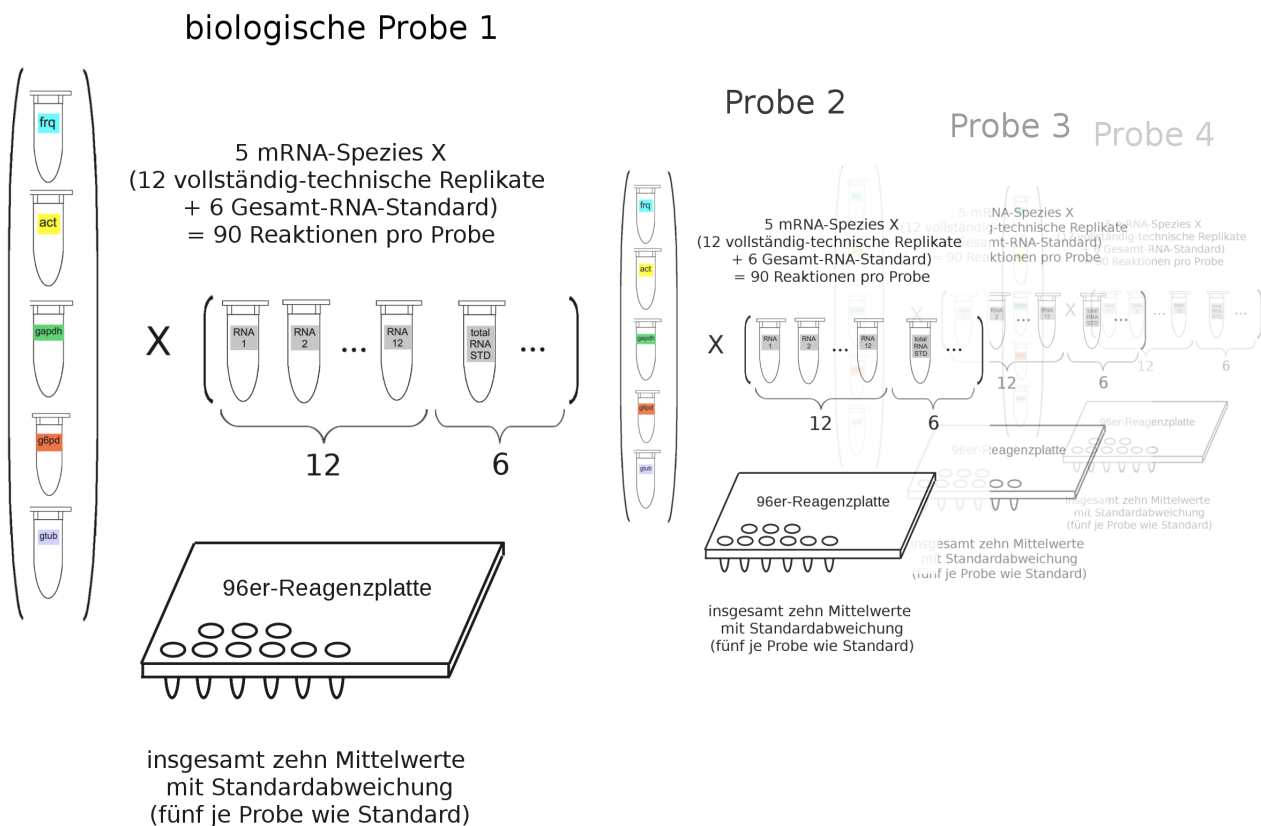


Abbildung 4.6: Übersicht über das Pipettierschema der 96er-Reaktionsplatten für die quantitative RT-PCR. Die Datennormalisierung hängt wesentlich mit der technischen Anordnung der Messproben zusammen, weshalb diese Übersicht über den praktischen Pipettierprozess hinaus das Verständnis der Datenanalyse erleichtert. Auf jeder 96er-Reaktionsplatte werden alle qRT-PCR-Daten zu einer Kultur (biologische Probe) erhoben. Dabei werden alle zwölf Replikate der Gesamt-RNA-Extraktion aus dieser Kultur parallel sowohl in Bezug auf die *frq*-mRNA wie auch auf die vier übrigen Haushaltsgene *β -actin*, *γ -tubulin*, *gapdh*, und *g6pd* gemessen. Desweiteren wird zum Vergleich zwischen verschiedenen biologischen Proben neben den zwölf Gesamt-RNA-Replikaten der biologischen Proben sechs Mal ein identischer Gesamt-RNA-Standard (Aliquotierung) auf jeder Platte aufgetragen. Insgesamt werden also 18 Gesamt-RNA-Lösungen auf fünf mRNA-Ziele hin gemessen, weshalb in der obigen Darstellung die Vermischung der fünf mRNA-spezifischen (durch Primer/Sonde) Enzymlösungen mit den 18 Gesamt-RNA-Lösungen als ein Matrixprodukt dargestellt wird. Messungen anderer Kulturen werden dann auf separaten 96er-Reaktionsplatten mit separat angesetzten Enzymlösungen durchgeführt. Die Replikatmessungen des Gesamt-RNA-Standards umfassen lediglich die Platten-intrinsische Varianz ${}^g\sigma_3^2$ auf der Ebene der qRT-PCR (siehe Abbildung 4.3). Die Messung des Gesamt-RNA-Standards kann somit verwendet werden, um die Messung einer biologischen Probe hinsichtlich der Unterschiede in den technischen Messbedingungen verschiedener Platten zu normalisieren, denn auch die zwölf Messreplikate einer biologischen Probe bilden nur die Platten-intrinsische Varianz ab.

$_{frq}$ dem Index i der Messfunktion m_i , die im Rahmen der Residuumsfunktion 3.7 in Kapitel 3 eingeführt wurde. $\hat{\mu}_r({}^p frq_{m_j}^r / {}^p GRNA_{m_j}^r)$ bezeichnet die Schätzung des Mittelwertes (nach Gleichung 4.2 arithmetisches Mittel) der mit der qRT-PCR gemessenen Probenreplikate, wobei der Index p auf die Messung der Probe hinweist und der Index r , der sich an dem Index p orientiert, die Laufzahl der Probenreplikate $r = 1, 2, \dots, r_p$ ist. Dabei wird jeder Replikatmesswert ${}^p frq_{m_j}^r$ bezüglich seiner individuellen Gesamt-RNA-Menge ${}^p GRNA_{m_j}$ relativiert. Analog bezeichnet $\hat{\mu}_r({}^s frq_{m_j}^r / {}^s GRNA)$ den geschätzten Mittelwert aus den Messreplikaten des Gesamt-RNA-Standards (Index s mit $r = 1, 2, \dots, r_s$), hierbei ist die Gesamt-RNA-Menge ${}^s GRNA$ durch die Aliquotierung in jeder Messreihe m und zu jedem Messzeitpunkt t_j identisch. Aufgrund des bei jeder biologischen Probe verwendeten Gesamt-RNA-Standards stehen die normalisierten Messwerte $\mu_{frq,m}^{norm}(t = t_j)$ sowohl für verschiedene Messzeitpunkte t_j wie auch für verschiedene Messreihen m innerhalb der Messfehlertoleranz automatisch im richtigen Verhältnis zueinander. Würde man den Gesamt-RNA-Standard wie eine gewöhnliche Probe messen und normalisieren, dann wäre der normalisierte Messwert erwartungsgemäß gleich eins. Durch die Normalisierung erfolgt also auch automatisch eine Skalierung.

Der Gesamt-RNA-Standard entspricht grundsätzlich einer Mischung von Gesamt-RNA-Extrakten aus mehreren Kulturen, die unter den Versuchsbedingungen zur Startzeit $t = 0$ entnommen wurden (etwa viertägige Inkubation unter Belichtung bei $24 \pm 1^\circ\text{C}$). Eine Messung unter diesen Bedingungen wurde jedoch in einer eigenen Messreihe mit insgesamt zwölf Kulturreplikaten durchgeführt (Genau: 72+18h Inkubation unter Belichtung, $24 \pm 1^\circ\text{C}$). Diese Messreihe wird im nachfolgenden Kapitel 5 unter der Bezeichnung CDE14 im Detail beschrieben. Die Berechnung des Mittelwertes aus den normalisierten Messwerten $\mu_{frq,CDE14}^{norm}(j)$ jedes Kulturreplikats j dieser Messreihe ergibt jedoch einen relativen Wert von 0,79. Diese Abweichung von 1 ist auf eine ebenfalls im folgenden Kapitel näher analysierte, biologisch-intrinsische Varianz zurückzuführen. Aufgrund der höheren Replikatzahl gemessener Kulturen sollen sich alle Messwerte jedoch an diesem Mittelwert und nicht am Gesamt-RNA-Standard orientieren. Zur Skalierung aller normalisierten Messdaten $\mu_{frq,m}^{norm}(t = t_j)$ werden diese deshalb durch den nachfolgend mit ${}_{12b12}\eta_{frq,0}$ bezeichneten Mittelwert der zwölf gemessenen Kulturreplikate aus CDE14 dividiert. Der Index ${}_{12b12}$ weist der Übersicht halber dabei darauf hin, dass es sich um einen Messwert aus zwölf biologischen (b) Replikaten handelt, welche jeweils zu zwölf technischen Replikaten gemessen wurden. Auf diese Weise ist der Mittelwert der normalisierten Messwerte von CDE14 nach dieser Skalierung genau 1. Aufgrund der biologischen Varianz beginnen die anderen Messreihen m jedoch nie genau bei 1, sondern bei einem entsprechend der biologisch-intrinsischen sowie der vollständig-technischen Varianz gestreuten Startwert. Die Formel zur Berechnung der endgültigen Messwerte, die entsprechend der Bezeichnung in Kapitel 3 mit $\eta_{frq,mj}$ bezeichnet werden sollen, lautet somit:

$$\begin{aligned}
\eta_{frq,mj} &: = \frac{\mu_{frq,m}^{norm}(t = t_j)}{12b12\eta_{frq,0}} \\
12b12\eta_{frq,0} &: = \frac{1}{12} \sum_{j=1}^{12} \mu_{frq,CDE14}^{norm}(j) \\
&= \frac{1}{12} \sum_{j=1}^{12} \frac{\hat{\mu}_r({}^p frq_{CDE14}^r(j)/{}^p GRNA_{CDE14}^r(j))}{\hat{\mu}_r({}^s frq_{CDE14}^r(j)/{}^s GRNA)}
\end{aligned}$$

Da mit den Replikaten ${}^p frq_{mj}^r/{}^p GRNA_{mj}^r$ ($r = 1, 2 \dots r_p$) und ${}^s frq_{mj}^r/{}^s GRNA$ ($r = 1, 2 \dots r_s$) bereits die Messfehler der Gesamt-RNA-Mengen ${}^p GRNA_{mj}^r$ beziehungsweise ${}^s GRNA$ abgedeckt sind, werden für die Schätzung der Standardabweichung von $\mu_{frq,mj}^{norm}$ die Standardabweichungen von ${}^p frq_{mj}^r/{}^p GRNA_{mj}^r$ und ${}^s frq_{mj}^r/{}^s GRNA$ miteinander verrechnet. Dabei werden die anhand der Probenreplikate $r = 1, 2, \dots r_p$ beziehungsweise Gesamt-RNA-Standardreplikate $r = 1, 2, \dots r_s$ nach Gleichung 4.3 geschätzten Standardabweichungen ${}_1\hat{\sigma}_r$ der Einzelmesswerte durch $\sqrt{r_p}$ (Proben) beziehungsweise $\sqrt{r_s}$ (Gesamt-RNA-Standard) entsprechend Gleichung 4.4 dividiert, um die Standardabweichung der aus den Replikaten geschätzten Mittelwerte zu erhalten. Der Messfehler, der aufgrund der Skalierung mit dem Anfangswert $12b12\eta_{0,frq}$ zustande kommt, wird vernachlässigt.

$$\sigma(\mu_{frq,mj}^{norm}) = \left[\frac{\hat{\sigma}_r({}^p frq_{mj}^r/{}^p GRNA_{mj}^r)^2}{\sqrt{r_p} \cdot \hat{\mu}_r({}^p frq_{mj}^r/{}^p GRNA_{mj}^r)^2} + \frac{\hat{\sigma}_r({}^s frq_{mj}^r/{}^s GRNA)^2}{\sqrt{r_s} \cdot \hat{\mu}_r({}^s frq_{mj}^r/{}^s GRNA)^2} \right]^{0,5} \cdot \hat{\mu}_{frq,mj}^{norm} \quad (4.6)$$

Die Standardabweichung des endgültigen Messwertes η (nach Skalierung) ist damit:

$$\sigma(\eta_{frq,mj}) = \sigma(\mu_{frq,mj}^{norm}) \cdot \frac{\eta_{frq,mj}}{\mu_{frq,mj}^{norm}} = \frac{\sigma(\mu_{frq,mj}^{norm})}{12b12\eta_{frq,0}} \quad (4.7)$$

4.3.3 Bewertung des Unterschieds zweier Mittelwerte (Auflösung) mit t-Statistik

Wie bereits in den vorigen Abschnitten erläutert wurde, erlaubt die Messung von Replikaten nicht nur eine Schätzung der Standardabweichung, eine steigende Replikatzahl führt auch gleichzeitig zu einer genaueren Schätzung des Mittelwertes der zu messenden Größe, da die Standardabweichung des Mittelwertes mit der Wurzel der verwendeten Replikatzahl sinkt. Bereits durch diesen Effekt wird die Auflösung der mRNA-Messung um einen Faktor von mehr als drei erhöht, dabei sei die Auflösung einer Messung als die Differenz zwischen den Mengen eines Stoffes zweier verschiedener Proben definiert, welche durch die Messung nach statistischen Kriterien als verschieden registriert werden kann. Dabei wird angenommen, dass die Messung einem normal-verteilten Zufallsereignis entspricht und die zugrunde liegende Standardabweichung dabei stets gleich ist.

Die Berechnung der Auflösung beruht demnach auf einem statistischen Test der Verschiedenheit der Messungen zweier Proben, wobei eine „Messung“ dem arithmetischen Mittel aus mehreren Messreplikaten entsprechen soll. Um die Verschiedenheit zu bewerten wird zunächst angenommen, dass die beiden Proben die gleiche Stoffmenge enthalten und die Grenzmittelwerte der beiden normalverteilten

Messungen für gegen Unendlich strebende Replikanzahlen somit identisch wären. Als Bewertungsmaßstab wird dann die Höhe der Differenz der beiden Messungen betrachtet. Da diese von der Varianz des Messverfahrens abhängt, wird sie zur Normierung durch ihre eigene Standardabweichung dividiert. Die Standardabweichung der Differenz ist jedoch nicht bekannt und muss aufgrund einer Schätzung der Standardabweichung der beiden Messungen berechnet werden. Die Schätzung der Standardabweichung ist dabei selbst eine Zufallsgröße, die bei n Replikaten einer χ_{n-1}^2 -Verteilung mit $n-1$ Freiheitsgraden unterliegt. Die Differenz $\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2$ zwischen den geschätzten Mittelwerten $\hat{\mu}_1$ und $\hat{\mu}_2$ zweier Proben mit mutmaßlich gleichem Grenzmittelwert μ^* , die mit der geschätzten Standardabweichung $\hat{\sigma}$ der Differenz $\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2$ normiert wird [93], entspricht also bei n_1 beziehungsweise n_2 Replikaten der Zufallsvariablen

$$T(\hat{\mu}_1, \hat{\mu}_2) := \frac{(\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2)}{\sqrt{\hat{\sigma}^2(1/n_1 + 1/n_2)}} \quad (4.8)$$

Die Standardabweichung der Differenz von $\hat{\mu}_1$ und $\hat{\mu}_2$ berechnet sich dabei nach

$$\hat{\sigma} = \frac{1}{m+n-2}((m-1) \cdot \hat{\sigma}_1^2 + (n-1) \cdot \hat{\sigma}_2^2)$$

Da $\hat{\mu}_1$ und $\hat{\mu}_2$ Schätzwerte für den gleichen Mittelwert μ^* sind, gilt $\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2 = (\hat{\mu}_1 - \mu^*) - (\hat{\mu}_2 - \mu^*)$ und der Erwartungswert dieser Differenz ist gleich null. Erweitert man 4.8 mit der wahren Standardabweichung von $\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2$, dann erhält man

$$T(\hat{\mu}_1, \hat{\mu}_2) = \frac{(\hat{\mu}_1 - \hat{\mu}_2)/\sigma}{\sqrt{\frac{\hat{\sigma}^2}{\sigma^2} \cdot (1/n_1 + 1/n_2)}}$$

Damit steht im Zähler eine $N(0, 1)$ -verteilte Zufallsgröße und im Nenner eine $\chi_{n_1+n_2-2}^2$ -verteilte Zufallsgröße mit $n_1 + n_2 - 2$ Freiheitsgraden. Die Zufallsvariable $T(\hat{\mu}_1, \hat{\mu}_2)$ ist somit $t_{n_1+n_2-2}$ -verteilt. Für die explizite Dichtefunktion der t -Verteilung sei auf die Literatur verwiesen [93]. Anhand der t -Verteilung lässt sich nun ein Konfidenzintervall zum Konfidenzniveau α bestimmen, innerhalb dessen die normierte Differenz (T) der Messungen zweier Proben mit gleichem Grenzmittelwert mit einer Wahrscheinlichkeit von $1 - \alpha$ liegt. Die Größe dieses Konfidenzintervalls entspricht dabei der Auflösung des Messverfahrens, da für gemessene, normierte Differenzen, die außerhalb dieses Intervalls liegen, die Gleichheit zum Konfidenzniveau α abgelehnt und somit die Verschiedenheit erkannt werden kann.

Wichtig im Rahmen dieser Arbeit ist, dass die Varianz der t -Verteilung mit höherem Freiheitsgrad, also höherer Replikanzahl, abnimmt, und dass diese Abnahme insbesondere bei niedrigen Freiheitsgraden/Replikanzahlen vorliegt (siehe Abbildung 4.7). Durch die Erhöhung der Replikanzahl steigt die Auflösung also zwar primär aufgrund der sinkenden Standardabweichung der geschätzten Mittelwerte, zusätzlich aber auch aufgrund der besseren Schätzung der Standardabweichung selbst. Aus diesem Grund steigt die Auflösung durch die Messung von zwölf Kulturreplikaten im Vergleich zu einer Einzelmessung sogar um mehr als um einen Faktor von $\sqrt{12} \approx 3,5$. Die genaue Erhöhung der Auflösung durch diesen zweiten Effekt kann im Rahmen dieser Arbeit nicht exakt berechnet werden, eine Abschätzung anhand des Abfalls der Standardabweichung in Abbildung 4.7 (rechts) legt jedoch einen zusätzlichen Faktor von etwa zwei nahe. Dieser Vorteil wird jedoch zum Teil dadurch nivelliert, dass zu jeder Standardabweichung der Messung einer Kultur aufgrund der Normalisierung die

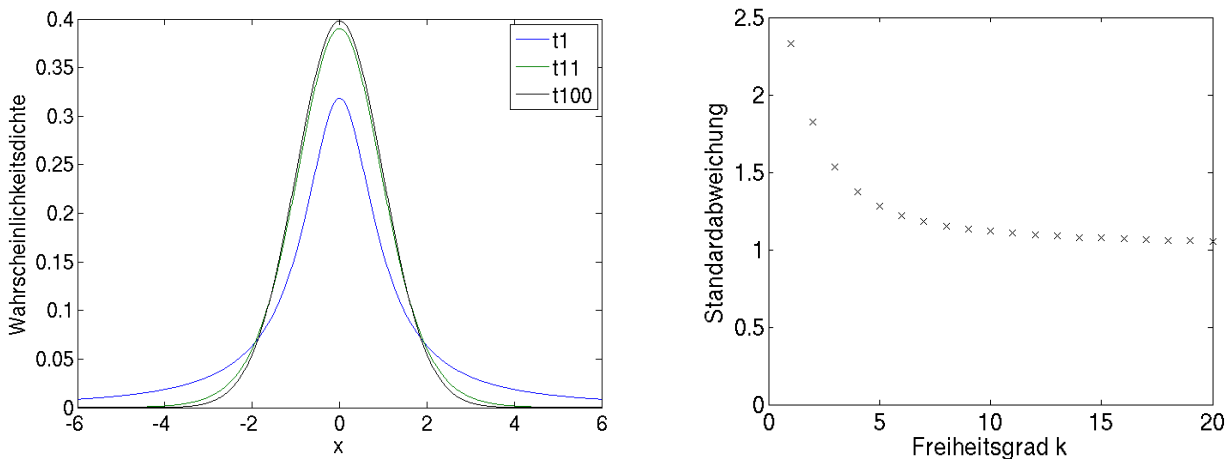


Abbildung 4.7: Links: Die t_k -Verteilung beschreibt die statistische Verteilung der durch die eigene Standardabweichung normierten Differenz zweier geschätzter Mittelwerte mit mutmaßlich identischer Normalverteilung. Sie hängt dabei vom Freiheitsgrad und damit der Anzahl an gemessenen Replikaten ab. Dargestellt sind die Wahrscheinlichkeitsdichten der drei t_k -Verteilungen mit Freiheitsgraden 1, 11 (entspricht zwölf Replikaten) und 100. Rechts: Die t_k -Verteilung wird mit steigendem Freiheitsgrad k steiler, was mit einem Abfall der Standardabweichung einhergeht. Die Standardabweichung der t_k -Verteilung ist für die ersten 20 Freiheitsgrade gezeigt, in diesem Bereich sinkt die Standardabweichung am schnellsten.

Standardabweichung der Messung des Gesamt-RNA-Standards hinzukommt. Insgesamt dürfte die in dieser Arbeit erreichte Auflösung in der mRNA-Messung im Vergleich zur Einzelmessung um einen Faktor von etwa fünf höher liegen. Durch einen Wegfall der Messungen der Haushaltsgene würde die Messkapazität für *frq*-mRNA verfünffacht und damit auch die Standardabweichung des Gesamt-RNA-Standards noch einmal um einen Faktor von $\sqrt{5}$ verringert werden, so dass in einem optimierten Messverfahren nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Replikatprinzip eine Erhöhung der Auflösung um einen Faktor von insgesamt sieben möglich wäre.

Im folgenden Kapitel 5 werden die gemessenen mRNA-Mittelwerte sowohl des Gesamt-RNA-Standards als auch der Kulturproben hinsichtlich ihrer Verschiedenheit mit Hilfe des t -Tests untersucht. Auf diese Weise ergibt sich ein Maß um die statistische Signifikanz der gemessenen, paarweisen Unterschiede zu bewerten. Der t -Test beruht auf der oben beschriebenen t -Statistik. Zur Durchführung des t -Tests wird die Matlab-Funktion `ttest2` (Mathworks) verwendet.

4.3.4 Biologische Varianz bei der numerischen Parameterschätzung

Die Beobachtung einer signifikant über der technischen Varianz liegenden biologisch-intrinsischen Varianz widerstrebt dem Ansatz eines deterministischen Modells auf der Basis von Differentialgleichungen. Obgleich nicht mit Gewissheit die Ursache für diese biologisch-intrinsische Varianz bezeichnet werden kann, lässt sich mutmaßen, dass sie wegen der niedrigen Teilchenzahl entweder auf stochastische Reaktionsgeschwindigkeiten [94] oder aufgrund nicht berücksichtigter extrinsische Rauschursachen (insbesondere auch system-extrinsische, intrazelluläre Ursachen) zurückzuführen ist. In beiden Fällen lässt sich

die Wahrscheinlichkeitsverteilung, die diesem biologischen Rauschen zugrunde liegt, mit einer Normalverteilung beschreiben. Aus technischen Gründen ist es jedoch nicht möglich zu jedem Messzeitpunkt neben vollständig-technischen Replikaten auch Kulturreplikate zu nehmen. Die biologisch-intrinsische Standardabweichung muss daher aus diesem einzelnen Experiment (CDE14) geschätzt werden und pauschal auf die experimentell bestimmten Messfehler jeder Messung im Sinne der Faltungstheorie aufgeschlagen werden. Diese aus vollständig-technischer Gesamtvarianz und biologisch-intrinsischer Teilvarianz ermittelte Gesamtvarianz spiegelt dann das Rauschverhalten um das biosystemische Mittel wider. Ein Blick auf die Residuumsfunktion der numerischen Parameterschätzung bekräftigt dabei die sachliche Legitimität von der numerischen Seite. In dieser Funktion geht üblicherweise die technische Varianz im Nenner der Zielfunktion ein. Durch Addition einer der biologisch-intrinsischen Teilvarianz entsprechenden Konstante σ_{bio}^2 wird die Varianz in der Zielfunktion derart angepasst, als wenn die Messwerte um die deterministische Modellantwort streuen würden.

$$\| r(x_0, p) \|_2^2 := \sum_i r_i(x_0, p)^2 := \sum_i \sum_j \frac{(\eta_{ij} - m_i(x(t_j, x_0, p)))^2}{\sigma_{ij}^2 + \sigma_{bio}^2} \quad (4.9)$$

4.4 Proteinmessung

Die Gesamt-Proteine jeder Kultur werden, anders als bei der mRNA-Messung, lediglich einmal extrahiert und dann auch nur einmalig auf *FRQ*-Protein hin gemessen. Damit erfolgt keine direkte Messung der technischen Standardabweichung.

4.4.1 Proteinextraktion

Etwa 500 μg des bei -80°C gefrorenen Myzelium-Puders wird auf Eis gelegt und dann unmittelbar noch im gefrorenen Zustand mit 500 μl des auf Eis vorgekühltem Protein-Extraktionspuffers (siehe Anhang) vermischt. Der Puffer enthält die drei Protease-Inhibitoren PMSF, Leupeptin und Pepstatin A um eine Degradation der Proteine durch die bei der Lyse der Lyzomen freiwerdenden Proteasen zu unterbinden, die niedrige Temperatur unterbindet dabei desweiteren die Protease-Aktivität. Das Lysat wird in regelmäßigen Abständen mit einem Vibrator (Vortex) durchmischt bis es nach etwa einer halben Stunde vollständig auf Eis aufgetaut ist. Im Anschluss wird die Probe für 30 Minuten bei 1000 U/min in einem auf 4°C gekühltem Rotor zentrifugiert und 300 μl aus der Mitte des Überstandes abpipettiert und weiter verwendet. 10 μl einer 1:10 Verdünnung werden dann mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und die relative optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm (OD_{595}) im Verhältnis zu Wasser (Referenz) bestimmt. Durch Multiplikation des gemessenen OD-Wertes mit dem Faktor 42 erhält man dann die Proteinkonzentration mit der Einheit $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Das Protein wird bis zur weiteren Verarbeitung für die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) standardmäßig bei -20°C eingefroren und gelagert.

4.4.2 SDS-PAGE und Western Blot

Zur Vorbereitung der SDS-PAGE werden die Proteinextraktionsproben zunächst auf eine Konzentration von $100 \mu\text{g} / 24 \mu\text{l}$ verdünnt und dann mit $6 \mu\text{l}$ 5x Laemmli-Puffer gemischt. Diese $30 \mu\text{l}$ werden dann vollständig neben $5 \mu\text{g}$ der Proteinstandardleiter in die Kammern eines vorgegossenen SDS-Polyacrylamidgels (7%, NuPAGE Tris-Acetat-Gel) und in einer SDS-PAGE-Kammer mit Tris-Acetat-Puffer unter der Spannung eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Der anschließende Western Blot wurde unter Verwendung des iblot-Systems von Invitrogen durchgeführt. Dabei wurde eine Nitrozellulosemembran verwendet. Der erfolgreiche Transfer der Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wird zunächst durch eine Färbung mit Poisson-Lösung überprüft. Die Membran wird dabei etwa eine Minute in der Farbstofflösung unter leichtem Schwenken inkubiert. Der Farbstoff wird danach wieder mit TBS-Puffer ausgewaschen und die Membran anschließend in Blockpuffer zur Inaktivierung der reaktiven Nitrozellulose inkubiert. Danach wird die Membran mit dem primären Antikörper gegen FRQ, hergestellt im Labor Brunner (BZH, FRQ3911-1B10-E2(Y?)), der in Blockpuffer gelöst ist, für zwei Stunden unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Form von zehn-minütigem Schwenken in TBS-Puffer wird die Membran dann mit dem Sekundärantikörper Mouse-anti-Goat versetzt, der mit einem Chemilumineszenzenzym (Wellenlänge 680 nm) konjugiert ist. Die Inkubation erfolgt dabei wieder in Blockpuffer für zwei Stunden unter leichtem Schwenken mit anschließendem, drei-maligem Waschen für zehn Minuten mit TBS-Puffer. Auf die Membran wird dann das Chemilumineszenz-Substrat gegeben, so dass die gebundene FRQ-Proteinmenge unter einer Chemilumineszenz-Kamera gemessen werden kann.

4.4.3 Normalisierung

In Anlehnung an die Ergebnisse zur mRNA-Messung wird auf die parallele Protein-Messung eines Haushaltsgens verzichtet. Stattdessen wird die gemessene FRQ-Menge dadurch ins Verhältnis zur Gesamt-Proteinmenge gesetzt, dass auf jedes Gel die gleiche Gesamt-Proteinmenge aufgetragen wurde. Die relativen Proteinmengen einer Messreihe über 48 Stunden, die stets auf einer einzelnen Membran aufgetragen sind, werden zur Normalisierung auf den Messwert bei $t = 0$ h bezogen, so dass jede Messreihe bei 1 beginnt. Als Messfehler wird ein relativer Wert von 0,1 verwendet.

Experimentelle Messungen und Varianzanalyse

In diesem Kapitel sollen alle experimentellen Messreihen im Detail dargestellt und einer ersten Analyse unterzogen werden. Dazu wird einleitend im Rahmen einer Übersicht die Motivation jeder durchgeführten Messreihe erläutert. Danach erfolgt neben der Darstellung und ersten Analyse der Messergebnisse insbesondere auch eine statistische Analyse sowohl des Verhaltens des Gesamt-RNA-Standards wie auch der biologischen Varianz. Die quantitative Modellierung der Messergebnisse als molekular-genetisches Uhrsystem wird im anschließenden Kapitel durchgeführt.

5.1 Übersicht über experimentelle Messreihen

Die Messreihen gliedern sich in die folgenden drei Einheiten:

- 1) Oszillation bei konstanter Temperatur: *frq*-mRNA (CDE13), FRQ-Protein (CDE05)
- 2) Biologisch-intrinsische Varianz (CDE14) und Stabilität (CDE15) der *frq*-mRNA unter Wachstumsbedingungen; Bestimmung des Anfangswertes
- 3) Transientes Verhalten von *frq*-mRNA (CDE18, CDE19) und FRQ-Protein (CDE07, CDE08) bei zwei verschiedenen Temperaturszenarien

Jede Messreihe wird dabei mit dem Kürzel CDE (für **C**ircadianes **E**xperiment) und einer Nummer gekennzeichnet. Diese Benennung entspricht der der originalen Messdaten und würde somit auch einem außenstehenden Analytisten/Modellierer das schnelle Auffinden der zugehörigen Originaldaten ermöglichen.

5.1.1 Grundtypisches Verhalten

In den ersten beiden Messreihen wird zunächst das Verhalten der *frq*-mRNA und des FRQ-Proteins nach dem Wechsel von Belichtung (l) zu Dunkelheit (d) bei konstanter und relativ hoher Temperatur von 25°C gemessen (*frq*-mRNA: CDE13 in Abbildung 5.1 und FRQ-Protein: CDE05 in 5.2). Damit kann später eine erste, quantitative Modellierung des typischen Uhrverhaltens ohne den Einfluß durch Temperaturänderungen erfolgen.

5.1.2 Biologisch-intrinsische Varianz und Startwertermittlung

Im Anschluss soll durch zwei Messreihen die biologisch-intrinsische Varianz der *frq*-mRNA unter den für die Wachstumsphase typischen Bedingung (Belichtung, Temperatur von 24°C) untersucht werden. Dazu werden im ersten Experiment (CDE14, Abbildung 5.3) zwölf *Neurospora crassa*-Kulturen für

drei Tagen und 18 Stunden unter Belichtung und einer Temperatur von 24°C inkubiert und zeitgleich geerntet. In allen zwölf Kulturen wird daraufhin mit jeweils zwölf vollständig-technischen Replikaten die relative *frq*-mRNA-Menge gemessen. Diese Messreihe gibt somit Aufschluss über die biologisch-intrinsische Varianz der relativen *frq*-mRNA-Menge, da alle Kulturen unter denselben Bedingungen inkubiert werden. Die daraus berechnete Varianz kann in der anschließenden quantitativen Modellierung zur Abschätzung einer pauschalen biologischen Standardabweichung verwendet werden, denn es ist davon auszugehen, dass sich diese Varianz in Dunkelheit über die Messreihe hinweg fortzieht. Desweiteren ermöglicht der Mittelwert dieser Proben- oder Kulturreplikate eine Kalibrierung aller mRNA-Messreihen auf den Startwert ($t = 0$ h), die Versuchsbedingung in dieser Messreihe entspricht ziemlich genau derjenigen zum Zeitpunkt des Wechsels von Belichtung zu Dunkelheit in den Messreihen unter Dunkelheit, der einzige Unterschied ist die etwas verlängerte Inkubationszeit zur Erhöhung des Probenmaterials. Ergänzend zu dieser Messung von Kulturreplikaten werden ebenfalls unter Belichtung und konstanter Temperatur von 24°C zwölf Kulturen nach einer dreitägigen Wachstumsphase über 48 Stunden hinweg alle vier Stunden geerntet und als Proben verwendet (CDE15, Abbildung 5.4). Analog zur vorigen Messreihe wird auch hier die biologisch-intrinsische Varianz bestimmt, desweiteren wird untersucht, ob die *frq*-mRNA bereits unter Belichtung eine Oszillation aufweist.

5.1.3 Temperaturszenarien

Zur Erweiterung des quantitativen Modells um den Einfluss der Temperatur, insbesondere von Temperaturänderungen, auf das Verhalten von *frq*-mRNA und FRQ-Protein werden beide molekularen Spezies bei zwei verschiedenen Temperaturszenarien gemessen. Im ersten Szenario wird die Temperatur nach der Wachstumsphase bei 24°C unmittelbar auf 18°C abgesenkt und dann bei $t = 12$ h auf 28°C erhöht (*frq*-mRNA: CDE19, Abbildung 5.6, FRQ-Protein: CDE07, Abbildung 5.9). Die Änderung der Temperatur erfolgt dabei mit einer Geschwindigkeit von etwa 1°C pro Minute, sie kann also in der Modellierung als unstetig angenommen werden. Die Messungen erfolgen über 48 Stunden hinweg regelmäßig alle vier Stunden. Im zweiten Temperaturszenario wird die Temperatur nach einer Absenkung auf 18°C erst bei $t = 24$ h auf 28°C erhöht. Die Messproben werden ebenfalls regelmäßig alle vier Stunden genommen.

5.2 Detaillierte Ergebnisse aller Messreihen

Die Messreihen sind in der Tabelle 5.1 aufgelistet und werden in der gleichen Reihenfolge in ihren auffälligen Punkten erläutert.

5.2.1 Messreihe CDE13

Die Messreihe CDE13 in Abbildung 5.1 zeigt das grundtypische Verhalten der relativen *frq*-mRNA-Menge bei konstanter Temperatur von 25°C nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit. Die Messproben (Kulturen) wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden hinweg in regelmäßigen Abständen

Abk.	Zielspezies	T ₀	Temperatur	Messung	Fig.
CDE13	<i>frq</i> -mRNA	24°C	konst. 25°C	alle 4h über 48h nach l/d-Transfer	5.1
CDE05	FRQ-Protein	24°C	konst. 25°C	alle 4h über 48h nach l/d-Transfer	5.2
CDE14	<i>frq</i> -mRNA	24°C	konst. 24°C	alle nach vier Tagen bei Licht	5.3
CDE15	<i>frq</i> -mRNA	24°C	konst. 24°C	alle 4h über 48h bei Licht	5.4
CDE18	<i>frq</i> -mRNA	24°C	18-28°C bei 24h	alle 4h über 48h nach l/d-Transfer	5.7
CDE19	<i>frq</i> -mRNA	24°C	18-28°C bei 12h	alle 4h über 48h nach l/d-Transfer	5.6
CDE07	FRQ-Protein	24°C	18-28°C bei 12h	alle 4h über 48h nach l/d-Transfer	5.9
CDE08	FRQ-Protein	24°C	18-28°C bei 24h	alle 4h über 48h nach l/d-Transfer	5.10

Tabelle 5.1: Auflistung der detaillierten Ergebnisse aller Messreihen. T₀ bezeichnet die Temperatur während der anfänglichen 72 Stunden unter Belichtung (Wachstumsphase), während unter „Temperatur“ die Temperatur nach dieser Phase zusammengefasst wird. Die Abkürzung CDE („CircaDianes Experiment“) mit einer Nummer bezeichnet jeweils eine Messreihe, der Name entspricht dem Verzeichnis der Rohdaten. „l/d“ kennzeichnet desweiteren den Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit. Anhand der Bildnummer lässt sich das Ergebnis der entsprechenden Messreihe finden.

von vier Stunden genommen. Jede Probe wurde dabei mit bis zu zwölf vollständig-technischen Replikaten gemessen. In Anbetracht der so ermittelten Standardabweichung kann das Verhalten der relativen *frq*-mRNA-Menge mit hoher Gewissheit charakterisiert werden. Diese Messreihe wurde jedoch noch nicht mit dem Gesamt-RNA-Standard gemessen, so dass die Messwerte auf den Wert bei $t = 0$ h normalisiert werden. Die Standardabweichung der Messwerte enthält somit auch nicht den Anteil der Standardabweichung der sonst anhand des Gesamt-RNA-Standards bestimmt wird. Auch die biologisch-intrinsche Standardabweichung ist in der aufgetragenen Standardabweichung, wie bei allen anderen Messreihen auch, nicht mit aufgetragen. Diese Standardabweichung wird erst im folgenden Kapitel im Rahmen der quantitativen Modellierung verwendet. In dieser Messreihe wurde desweiteren nur das Haushaltsgen *act* mitgemessen.

Durch den Wegfall der Belichtung zu Versuchsbeginn wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors so gemindert, dass die relative *frq*-mRNA-Menge zunächst rapide abfällt und dann in der Art einer Sinuskurve mit einer Periode zwischen 20 und 24 Stunden weiterschwingt. In der zweiten Periode nach etwa 22 Stunden ist die Amplitude deutlich niedriger und die Messwerte schwingen um einen Wert von etwa 0,6 (bezogen auf den Startwert). Die Messung der relativen mRNA-Menge des Haushaltsgens *act* zeigt eine relative Varianz von bis zu 0,3 zwischen den Probenmittelwerten, was aufgrund der hier ebenfalls mitgemessenen, vollständig-technischen Standardabweichungen ein hohes statistisches Gewicht besitzt.

5.2.2 Messreihe CDE05

Die Messreihe CDE05 in Abbildung 5.2 zeigt das entsprechende Verhalten der relativen FRQ-Proteinmenge bei konstanter Temperatur von 25°C nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit. Trotz des Mangels an einer gemessenen Standardabweichung kann aufgrund des Zusammenhangs der Messpunkte davon ausgegangen werden, dass der Messfehler wesentlich niedriger als die Änderung der Messwerte ist. Bei einem Vergleich mit der entsprechenden relativen mRNA-Menge ist ein um etwa vier Stunden verzögertes Abklingen der relativen FRQ-Proteinmenge erkennbar. Dabei entspricht das Verhalten des FRQ-Proteins unter diesen Bedingungen ansonsten dem seiner mRNA und schwingt in der Art einer gedämpften Sinusfunktion.

5.2.3 Messreihe CDE14

Die Messreihe CDE14 in Abbildung 5.3 zeigt zwölf zeitgleiche Messungen von Kulturreplikaten nach Inkubation über drei Tage und 18 Stunden unter Belichtung und bei konstanter Temperatur von 24°C (Raumtemperatur). Jede Kultur wurde dabei mit zwölf vollständig-technischen Replikaten gemessen. Der Gesamt-RNA-Standard wurde je Probe und Ziel-mRNA zu je drei Replikaten gemessen (in den folgenden Messreihen sechs Replikate). In der linken Spalte sind die Messungen der biologischen Proben sowie des Gesamt-RNA-Standards zunächst getrennt dargestellt. Der RNA-Standard zeigt bei allen mRNA-Zielen eine gewisse, jedoch geringe Varianz in den Mittelwerten. Eine statistische Analyse der Signifikanz paarweiser Unterschiede mittels t -Test ist in Abbildung 5.12 (links) dargestellt. Die Analyse zeigt für diese Messreihe einen entsprechend des Konfidenzwertes von 0,05 geringen Anteil von paarweise verschiedenen Messwerten des Gesamt-RNA-Standards, dabei ist zu berücksichtigen, dass der durch Replikate auf der qRT-PCR-Ebene ermittelte Messfehler $\frac{9}{3}\sigma_3$ des Gesamt-RNA-Standards nach Abbildung 4.5 nur etwa 0,06 beträgt und die Abweichungen zwischen verschiedenen Messungen im Gegensatz zu den Kulturproben mit einem Messfehler $\frac{9}{12}\sigma_4$ somit niedriger sein können um ein statistisch positives Testergebnis auszulösen. Vor diesem Hintergrund ist die ausnahmslose Ablehnung der statistischen Verschiedenheit der paarweisen Vergleiche der Messwerte des Gesamt-RNA-Standards bei der *frq*-mRNA als ungewöhnlich anzusehen, dies insbesondere in Anbetracht der relativ hohen Pipettiergenauigkeit der reversen Transkriptase (5 μ l Glycerol) zur Herstellung der enzymatischen Reagenzlösung. Auf der rechten Seite ist der mit dem Gesamt-RNA-Standard normalisierte Probenmittelwert dargestellt. Desweiteren wurden die normalisierten Probenwerte durch ihren Mittelwert s_0 geteilt, denn der Mittelwert der Proben dieses Experiments wird als systemischer Anfangswert für alle weiteren Messreihen definiert. Im Vergleich zur Messreihe CDE13 in Abbildung 5.1 sind die normalisierten Probenmesswerte zwar sehr konstant, die Analyse der statistischen Signifikanz paarweiser Unterschiede mittels t -Test in Abbildung 5.12 (rechts) zeigt jedoch, dass im Rahmen der gemessenen, vollständig-technischen Messfehler die *frq*-Messwerte in Anbetracht eines p -Wertes von 0,05 zu einem großen Anteil (26 von 66 Paaren) verschieden sind, so dass anhand dieser Messreihe auf das Vorliegen einer biologisch-intrinsischen Varianz im Startwert, also zum Zeitpunkt des Wechsels von Belichtung zu Dunkelheit nach der Wachstumsphase, geschlossen werden kann. Wie im vorigen Kapitel in Abbildung 4.5 dargestellt wurde, beträgt diese relative, biologisch-intrinsische Standardabweichung $\sigma_{bio} := {}^t\sigma_5(frq)$ etwa 0,13. Sowohl eine Betrachtung der biologisch-intrinsischen Standardabweichungen ${}^g\sigma_5$, die in Tabelle 5.2 zusammengestellt sind, wie auch die statistische Signifikanzanalyse in Abbildung 5.12 zeigen, dass die biologisch-intrinsische Standardabweichung der relativen *frq*-mRNA-Menge wesentlich kleiner ist als die der Haushaltsgene. Die einzige Ausnahme ist die Standardabweichung der *g6pd*-mRNA, die nur unwesentlich größer ist als die der *frq*-mRNA. Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass die Regulation des *frq*-Gens aufgrund der zellphysiologischen Signalwirkung genauer ist als die der Haushaltsgene.

5.2.4 Messreihe CDE15

Die Messreihe CDE15 in Abbildung 5.4 zeigt zwölf, in regelmäßigen zeitlichen Abständen von vier Stunden gemessene Kulturen, die unter Belichtung und bei einer konstanten Temperatur von 24°C

	<i>frq</i>	<i>act</i>	<i>g3pdh</i>	<i>g6pd</i>	<i>gtub</i>
CDE14	0,143	0,242	0,242	0,201	0,244
CDE15	0,178	0,538	0,322	0,164	0,420

Tabelle 5.2: Relative Standardabweichung (entspricht nach Abbildung 4.3 ${}^g\sigma_5$) der Probenmittelwerte zu jedem gemessenen mRNA-Ziel. Die Standardabweichung entspricht dem biologisch-intrinsischen Rauschen. In beiden Messreihen ist die biologisch-intrinsische Standardabweichung ${}^g\sigma_5$ der *frq*-mRNA deutlich niedriger als bei den Haushaltsgenen mit Ausnahme von *g6pd*, das eine nur unwesentlich größere Standardabweichung aufweist. Die Standardabweichung der biologischen Replikate ist jedoch geringer als die Standardabweichung der vollständig-technischen Replikate (${}^g_1\sigma_4$), erst die Messung des Mittelwertes aus zwölf vollständig-technischen Replikaten mit einer niedrigeren technischen Standardabweichung (${}^g_{12}\sigma_4$) erlaubt die Auflösung der biologisch-intrinsischen Standardabweichung ${}^g\sigma_5$ der *frq*-mRNA.

(Raumtemperatur) inkubiert wurden. Die erste Kultur wurde nach der minimalen Wachstumsphase von 72 Stunden entnommen, die darauf folgenden Kulturentnahmen erfolgten dann über einen Zeitraum von insgesamt 48 Stunden, wobei die Messung bei $t = 18$ h aufgrund eines technischen Mangels entfernt wurde. Wie in CDE14 sind in der linken Spalte von Abbildung 5.4 der unnormalisierte Messwert der biologischen Probe sowie der des Gesamt-RNA-Standards separat aufgetragen. Eine statistische Analyse mittels paarweisem t -Test in Abbildung 5.13 zeigt bei der *frq*-mRNA-Messung des Gesamt-RNA-Standards einen im Vergleich zu CDE14 höheren Anteil paarweise unterschiedlicher Messwerte, wogegen die Anteile paarweiser Unterschiede bei den Haushaltsgenen *g6pd* und *gtub* sehr gering ausfallen. Die normalisierten Messwerte der Kulturen auf der rechten Seite von Abbildung 5.4 deuten insbesondere während der ersten 24 Stunden eine Sinusschwingung an, eine solche Schwingung wäre jedoch nur dann plausibel, wenn die Konidien suspension, mit der die Stammlösung der Kulturen inokuliert wurde, bereits eine Synchronisation aufweisen würde, denn während der Wachstumsphase wurden phasenregulierende Reize wie eine Änderung der Temperatur oder des Lichts vermieden. Die relative Standardabweichung ${}^g\sigma_5$ der gemessenen, normalisierten *frq*-mRNA-Menge (siehe Tabelle 5.2) ist in dieser Messreihe nur geringfügig höher (0,18) wie bei einer zeitgleichen Messung verschiedener Kulturen (0,14 bei CDE14). Im Gegensatz zur *frq*-mRNA steigt die relative Standardabweichung durch die zeitlich getrennte Kulturentnahme bei den Haushaltsgenen *act* (0,54) und *gtub* (0,41) um in etwa das Doppelte wie bei einer zeitgleichen Kulturentnahme (beide 0,24). Dies verdeutlicht die verhältnismäßig hohe Stabilität der relativen mRNA-Menge von *frq* unter Belichtung. Eine statistische Analyse der Signifikanz paarweiser Unterschiede der normalisierten Messwerte mittels t -Test ist in Abbildung 5.13 gezeigt und bestätigt die beiden letzten Ergebnisse, da der Anteil signifikanter, paarweiser Unterschiede bei *frq* mit 32 von 66 Paaren zum einen im Vergleich zu CDE14 (26 von 66) etwas höher ist, zum anderen im Vergleich innerhalb der Messreihe zu den Haushaltsgenen *act*, *g3pdh* und *gtub* deutlich niedriger ist. Zur Ermittlung der biologisch-intrinsischen Standardabweichung des systemischen Startwertes sowie des Mittelwertes des Startwertes selbst werden nur die Werte aus CDE14 verwendet, da die durch die zeitlich getrennte Kulturentnahme verursachte Teilstandardabweichung ${}^t\sigma_5 := \sqrt{{}^g\sigma_5^2 - {}^g\sigma_4^2} = 0,106$ im Vergleich zu der nach CDE14 bestimmten biologisch-intrinsischen Standardabweichung (0,143) vernachlässigt werden kann. Ohnehin findet der Wechsel von Belichtung

zu Dunkelheit immer nach gleich langen Wachstumsphasen (72 Stunden) statt, so dass eine etwaige Vorschwingung den systemischen *frq*-Anfangswert nicht beeinflussen würde.

5.2.5 Messreihe CDE19

Die Messreihe CDE19 in Abbildung 5.6 zeigt die *frq*-mRNA-Messungen von elf Kulturen mit einem Temperaturwechsel von 24°C auf 18°C bei $t = 0$ h und von 18°C auf 28°C bei $t = 12$ h. Die Kulturen wurden in regelmäßigen zeitlichen Abständen von vier Stunden nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit über einen Zeitraum von insgesamt 48 Stunden entnommen. Die Kulturentnahmen bei 40 und 48 Stunden wurden aufgrund eines technischen Mangels im Messprozess nicht berücksichtigt. Alle Kulturen wurden dabei vor dem Wechsel zu Dunkelheit bei einer Raumtemperatur von etwa 24°C inkubiert. Nach dem Wechsel zu Dunkelheit wurde die Temperatur auf 18° gesenkt, wobei die Anpassung der Temperatur in etwa zehn Minuten gedauert hat. Der Temperaturabfall steht dabei in seiner Signalwirkung auf die Phase der *frq*-Schwingung mit dem Wechsel zu Dunkelheit in Einklang, da beide Signale für den Tag-/Nachtübergang stehen. Die erste Kultur zum Zeitpunkt $t = 0$ h wurde dabei direkt entnommen und nicht der niedrigeren Inkubationstemperatur exponiert. Nach zwölf Stunden wurde die Temperatur dann auf 28°C erhöht, was wiederum etwa zehn Minuten gedauert hat. Dieser Zeitpunkt entspricht hinsichtlich des Wegfalls des Lichts sowie der Temperatursenkung bei $t = 0$ h einem Nacht-/Tagübergang. Die durch den Temperaturanstieg vermittelte Signalwirkung entspricht somit der Phase der *frq*-Schwingung in den Kulturen.

In der linken Spalte von Abbildung 5.6 sind die nicht-normalisierten Proben sowie der Gesamt-RNA-Standard für jedes mRNA-Ziel separat abgebildet. Der t -Test zur Analyse der statistischen Signifikanz paarweiser Unterschiede der Messungen des Gesamt-RNA-Standards ist in Abbildung 5.14 (links) abgebildet. In dieser Messreihe weist der Gesamt-RNA-Standard einen unverhältnismäßig hohen Anteil paarweiser unterschiedlicher Messungen auf. Durch Normalisierung der Probenmesswerte mit den entsprechenden Messwerten des Gesamt-RNA-Standards lassen sich die Abweichungen zwischen den Messungen der verschiedenen Kulturen/Proben jedoch normalisieren. Die hohen Abweichungen im Gesamt-RNA-Standard in dieser Messreihe verdeutlichen wie wichtig und nützlich der Standard sowohl für die Normalisierung als auch zur Bewertung von Datenunsicherheiten ist.

Die rechte Spalte von Abbildung 5.6 zeigt die normalisierten Messwerte aller mRNA-Ziele. Interessant ist in dieser Messreihe das Verhalten der *frq*-mRNA, dieses ist in Abbildung 5.8 zusammen mit der Messreihe bei konstanter Temperatur (CDE13, Abbildung 5.1) sowie der nachfolgend beschriebenen Messreihe (CDE18, Abbildung 5.7) vergrößert dargestellt. Auffällig ist zunächst der sehr niedrige Anfangswert von etwa 0,5, der unter den gleichen Licht- und Temperaturbedingungen wie sowohl die Kulturenreplikate von CDE14 in Abbildung 5.3 als auch die Anfangswerte aller anderen Zeitserien (CDE13, CDE18, CDE19, Abbildung 5.8) gemessen wurde. Auch in Anbetracht der biologisch-intrinsischen Fluktuation ist dieser niedrige Wert, obgleich möglich, eher unwahrscheinlich, ein t -Test würde einen p -Wert von weniger als 0,05 ergeben. Eine mögliche Erklärung könnte in der technischen Durchführung liegen, da der Gesamt-RNA-Standard ebenfalls eine unerwartet hohe Schwankung aufweist. In Abbildung 5.8 ist im Vergleich zur Messreihe mit konstanter Temperatur von 25°C (CDE13) erkennbar, dass die relative *frq*-mRNA-Menge bereits zu Beginn den gleichen Minimalwert annimmt, der in CDE13

erst bei $t = 8$ h erreicht wird. Bei $t = 12$ h, also unmittelbar vor dem Temperaturanstieg kommt es dann wie bei CDE13 zu einem Anstieg in der relativen mRNA-Menge. Unmittelbar nach dem Temperaturanstieg ($t = 16$ h) fällt die relative mRNA-Menge in CDE19 dann allerdings im Unterschied zu CDE13 ab, was sich aufgrund der kurzfristig angestiegenen FRQ-Protein-Menge, die eine WCC-Hemmung bewirkt, erklären ließe. Wie in einer nachfolgenden Messreihe (CDE07, Abbildung 5.9) gezeigt wird, fällt der FRQ-Protein-Anstieg nach 12 Stunden bei einer dieser Messreihe entsprechenden Temperaturerhöhung im Verhältnis zur Messreihe CDE05 mit konstanter Temperatur sehr hoch aus (siehe Abbildung 5.11). Dies erklärt den weiteren Abfall und die Stagnation ($t = 20 \rightarrow 32$ h) der relativen *frq*-mRNA-Menge in dieser Messreihe (CDE19). Erst nachdem die relative FRQ-Proteinmenge (Messreihe CDE07) ihren zwischenzeitlich niedrigsten Wert bei $t = 32$ h erreicht, steigt die relative *frq*-mRNA-Menge wieder an.

Der Verlauf der *frq*-mRNA-Menge entspricht nach der Temperatursenkung im Wesentlichen dem Ergebnis von Liu *et al.* [9], nach der Temperaturerhöhung ergibt sich jedoch ein Unterschied, da Liu *et al.* eine Steigerung der mRNA-Menge messen konnten. In Anbetracht des unsicher gemessenen Gesamt-RNA-Standards sollte das Ergebnis dieser Messreihe vorsichtig betrachtet werden, auch wenn mit dem Gesamt-RNA-Standard die Unterschiede durch die unterschiedlichen Messbedingungen normalisiert werden können.

5.2.6 Messreihe CDE18

Die Messreihe CDE18 in Abbildung 5.7 zeigt die *frq*-mRNA-Messungen von elf Kulturen mit einem Temperaturwechsel bei $t = 0$ h von 24°C auf 18°C bei $t = 0$ h und von 18°C auf 28°C bei $t = 24$ h. Die Kulturen wurden in regelmäßigen zeitlichen Abständen von vier Stunden nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit über einen Zeitraum von insgesamt 48 Stunden entnommen. Die Kulturentnahmen bei 24 und 36 Stunden wurden aufgrund eines technischen Mangels im Messprozess nicht berücksichtigt. Alle Kulturen wurden dabei wie in CDE19 (Abbildung 5.6) vor dem Wechsel zu Dunkelheit bei einer Raumtemperatur von etwa 24°C inkubiert. Nach dem Wechsel zu Dunkelheit wurde die Temperatur auf 18°C gesenkt, wobei dieser Temperaturabfall in seiner Signalwirkung dem Wechsel zu Dunkelheit entspricht (Tag-/Nachtübergang). Die erste Kultur zum Zeitpunkt $t = 0$ h wurde dabei direkt entnommen und nicht der niedrigeren Inkubationstemperatur ausgesetzt. Im Gegensatz zu CDE19 wurde die Temperatur in dieser Messreihe erst nach 24 Stunden auf 28°C erhöht. Dieser Zeitpunkt entspricht aufgrund des Wegfalls des Lichts sowie der Temperatursenkung bei $t = 0$ h nach Maßgabe der *frq*-Schwingung in den Kulturen einem Tag-/Nachtübergang. Der Temperaturanstieg vermittelt in diesem Fall jedoch das Signal eines Nacht-/Tagübergangs und steht der Phase der *frq*-Schwingung in den Kulturen somit entgegen.

In der linken Spalte von Abbildung 5.7 sind die nicht-normalisierten Proben sowie der Gesamt-RNA-Standard für jedes mRNA-Ziel abgebildet. Der statistische *t*-Test zur Analyse der Signifikanz paarweiser Unterschiede der Messungen des RNA-Standards ist in Abbildung 5.15 (links) abgebildet und zeigt hinsichtlich des *p*-Wertes von 0,05 einen etwas hohen, jedoch statistisch nachvollziehbaren Anteil signifikant verschiedener Messwerte (29 von 55) im Fall von *frq*. Obwohl der Anteil paarweise

verschiedener Messwerte bei *act* (46 von 55) ungewöhnlich hoch ist, weisen die restlichen drei Haushaltsgene einen eher niedrigen Anteil paarweise verschiedener Messwerte auf (höchster Anteil bei *gtub* mit 23 von 55 Paaren).

Die rechte Spalte von Abbildung 5.7 zeigt die normalisierten Messwerte aller mRNA-Ziele. Die normalisierten Messdaten von *frq* sind vergrößert und im Vergleich zu CDE13 und CDE19 in Abbildung 5.8 dargestellt. Die Abweichung des Startwerts ($t = 0$ h) der relativen *frq*-mRNA-Menge von CDE18 liegt fast innerhalb des Messfehlerintervalls und lässt sich durch die biologisch-intrinsische Standardabweichung erklären. Im Vergleich zur Messreihe mit konstanter Temperatur (CDE13, Abbildung 5.1) fällt die relative mRNA-Menge bereits bei $t = 4$ h auf den Wert, der in der Messreihe CDE13 erst bei $t = 8$ h erreicht wird. Danach ist parallel zu CDE13 ein Anstieg in der relativen mRNA-Menge mit einem Spitzenwert bei $t = 16$ h zu erkennen, dieser fällt jedoch bedeutend geringer aus. Bei $t = 20$ h, dem letzten Zeitpunkt vor der Temperaturerhöhung, fällt die Menge dann ebenfalls parallel zu CDE13 wieder ab. Diese Tendenz würde bei $t = 24$ h vermutlich fortgesetzt werden, dieser Messwert liegt für CDE18 jedoch aus technischen Gründen nicht vor. Durch den Temperaturanstieg ab $t = 24$ h kommt es in der Messreihe CDE18 dann zu einem starken Anstieg in der relativen *frq*-mRNA-Menge, was dem *frq*-mRNA-Verhalten in CDE13 entgegenschlägt, denn dort fällt die *frq*-mRNA-Menge bis $t = 28$ h weiter ab und steigt dann erst wieder an. Unmittelbar nach diesem starken Anstieg fällt die relative *frq*-mRNA-Menge dann jedoch wieder ab und verläuft dabei in etwa parallel zum vorigen Abfall der relativen *frq*-mRNA-Menge nach $t = 16$ h in der CDE13-Messreihe. Die Phasenverschiebung zwischen diesen beiden abfallenden Messabschnitten beträgt dabei etwa zehn bis zwölf Stunden. Die Signalwirkung des relativ starken Temperaturanstiegs für einen Nacht-/Tagübergang ist offenbar ausreichend, um die nötige Phasenverschiebung in der *frq*-Schwingung zur Anpassung an den neuen Tag-/Nachtrhythmus zu vermitteln.

Der Verlauf der *frq*-mRNA entspricht dem Ergebnis von Liu *et al.* [9], die nach einer Temperatursenkung ebenfalls ein Abfallen und nach der Temperaturerhöhung einen Anstieg in der relativen *frq*-mRNA-Menge messen konnten. Anhand der Messdaten lässt sich jedoch nicht erkennen, ob der Anstieg in der *frq*-mRNA-Menge durch eine beschleunigende Wirkung der Temperatur auf die Transkription oder über einen Rückkoppelungseffekt durch den Anstieg der FRQ-Proteinmenge verursacht wird. Um diese Frage zu klären wird im folgenden Kapitel das Rückkoppelungssystem auf der Basis von Differentialgleichungen modelliert und für eine Sensitivitätsanalyse hinsichtlich der Temperatur verwendet.

5.2.7 Messreihe CDE07

Die Messreihe CDE07 in Abbildung 5.9 zeigt die FRQ-Proteinmessungen von 13 Kulturen mit einem Temperaturwechsel von 24°C auf 18°C bei $t = 0$ h und von 18°C auf 28°C bei $t = 12$ h. Der Versuchs-, insbesondere der Temperaturverlauf entspricht dem der Messreihe CDE19 (Abbildung 5.6). Die Kulturen wurden in regelmäßigen zeitlichen Abständen von vier Stunden nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit über einen Zeitraum von insgesamt 48 Stunden entnommen.

Die Abbildung 5.11 zeigt die Messreihe CDE07 zusammen mit der Messreihe bei einer konstanten Temperatur von 25°C (CDE05). Durch die anfängliche Erniedrigung der Temperatur sinkt die relative

Proteinmenge bei CDE07 zunächst bis sie bei $t = 12$ h den Wert erreicht, den auch die Messreihe CDE05 bei $t = 12$ h aufweist. Dieser Abfall erfolgt im Gegensatz zu CDE05 jedoch zu Beginn, also zwischen $t = 0$ und $t = 4$ h am schnellsten und wird dann zwischen $t = 4$ und $t = 8$ h sowie zwischen $t = 8$ und $t = 12$ h langsamer (positive zweite Ableitung). Dieses Verhalten lässt sich aufgrund der zu Beginn bereits sehr niedrigen relativen *frq*-mRNA-Menge erklären (siehe Abbildung 5.8). Nach dem Temperaturanstieg bei $t = 12$ h steigt die relative mRNA-Menge dann stark an und erreicht als Maximalwert bei $t = 24$ h im Vergleich zur Messreihe mit konstanter Temperatur von 25°C (CDE05) eine mehr als doppelt so große Menge. Der weitere Verlauf der Messwerte ist dann parallel, jedoch um einen Faktor von etwa 2,5 gespreizt zur Messreihe CDE05.

Die Signalwirkung durch den Temperaturanstieg für einen Nacht-/Tagübergang bewirkt aufgrund der Phasengleichheit also eine Verstärkung der Schwingungsamplitude, die dem sonst dämpfenden Verlauf entgegen wirkt. Der gemessene Abfall der relativen FRQ-Proteinmenge nach einer Temperatursenkung sowie der Anstieg nach einer Temperaturerhöhung entspricht dem Ergebnis von Liu *et al.* [9].

5.2.8 Messreihe CDE08

Die Messreihe CDE07 in Abbildung 5.9 zeigt die FRQ-Proteinmessungen von 13 Kulturen mit einem Temperaturwechsel von 24°C auf 18°C bei $t = 0$ h und von 18°C auf 28°C bei $t = 24$ h. Der Versuchs-, insbesondere der Temperaturverlauf entspricht dem der Messreihe CDE18 (Abbildung 5.7). Die Kulturen wurden in regelmäßigen zeitlichen Abständen von vier Stunden nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit über einen Zeitraum von insgesamt 48 Stunden entnommen. Aus technischen wurde der Messpunkt bei $t = 8$ h entfernt.

Die Abbildung 5.11 zeigt diese Messreihe zusammen mit der vorherig beschriebenen Messreihe CDE07 sowie der Messreihe mit einer konstanten Temperatur von 25°C (CDE05). Der Abfall der relativen FRQ-Proteinmenge ist im Vergleich zu CDE05 zu Beginn schneller, im Vergleich zur Messreihe CDE07, die in ihrem Temperaturverlauf innerhalb der ersten zwölf Stunden noch identisch mit dieser Messreihe (CDE08) ist, jedoch ähnlich, wenn auch etwas niedriger. Die relative Proteinmenge verharrt dann bis $t = 24$ h bei einem Minimalwert, der nach dem anfänglichen Abfall bei etwa $t = 12$ h erreicht wird. Anders als in der Messreihe mit konstanter Temperatur von 25°C (CDE05) steigt die relative FRQ-Proteinmenge also zwischen zwölf und 24 Stunden nicht wieder an, dies geschieht erst wieder nach dem Temperaturanstieg von 18°C auf 28°C bei $t = 24$ h. Der Anstieg ist dabei jedoch deutlich geringer als in der Messreihe CDE07. Der Verlauf der Messwerte nach 24 Stunden, insbesondere das Erreichen eines zwischenzeitlichen Maximalwertes bei $t = 36$ h, entspricht in etwa dem um zwölf Stunden phasenverschobenen Verlauf der Messreihe CDE05 ab $t = 12$ h, die Maximalwerte haben dabei eine vergleichbare Größe.

Die Signalwirkung des Temperaturanstiegs für einen Nacht-/Tagübergang bewirkt also auch auf der FRQ-Proteinebene eine Phasenverschiebung, die die FRQ-Schwingung an die zuletzt wahrgenommene Bedingung anpasst. Der gemessene Abfall der relativen FRQ-Proteinmenge nach einer Temperatursenkung sowie der Anstieg nach einer Temperaturerhöhung entspricht dem Ergebnis von Liu *et al.* [9].

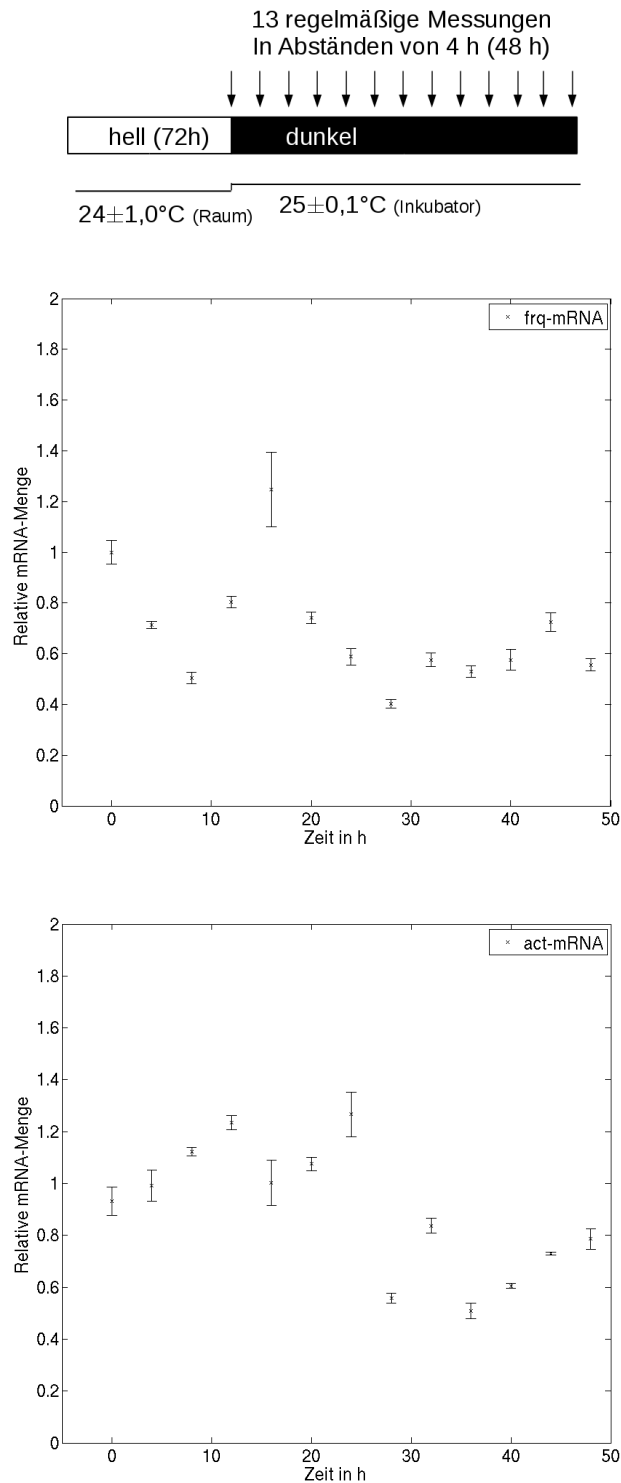


Abbildung 5.1: CDE13, Messungen der *frq*-mRNA alle vier Stunden über 48 Stunden hinweg nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit. Die Inkubationstemperatur während der Wachstumsphase in Licht vor der Messung betrug etwa 1°C weniger als während der Inkubation in Dunkelheit (Messphase). Dieser Messdatensatz wurde noch nicht in dem standardisierten Format gemessen, also ohne Gesamt-RNA-Standard und nur mit *act* als Haushaltsgen. Aus diesem Grund sind die Daten mit dem Messwert der relativen *frq*-mRNA-Menge zum Zeitpunkt $t = 0$ h normalisiert, die Standardabweichung gibt hier den technischen Messfehler an und enthält somit weder die biologisch-intrinsische Varianz noch den Messfehleranteil, der sonst anhand des Gesamt-RNA-Standards bestimmt wird.

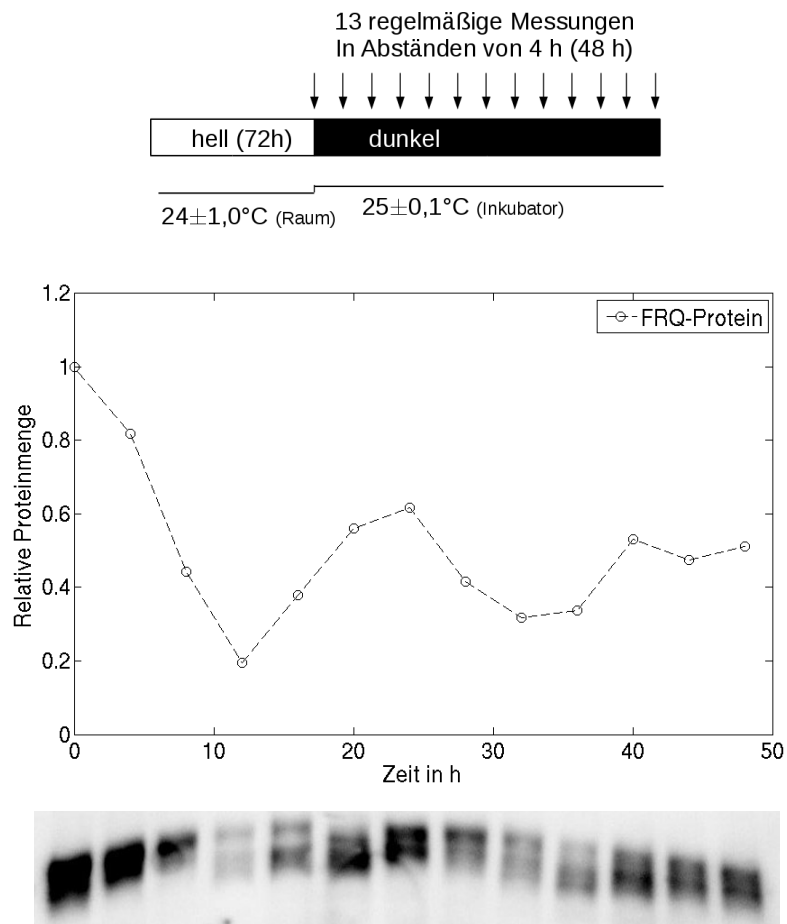


Abbildung 5.2: CDE05, Messung der zur Gesamt-Proteinmenge relativen FRQ-Proteinmenge mit Western Blot. Gemessen wurde alle vier Stunden über 48 Stunden hinweg nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit. Die Inkubationstemperatur während der Wachstumsphase unter Belichtung betrug etwa 1°C weniger als während der Inkubation in Dunkelheit (Messphase). Der entsprechende, mit Antikörper gegen FRQ-Protein markierte Blot ist darunter abgebildet.

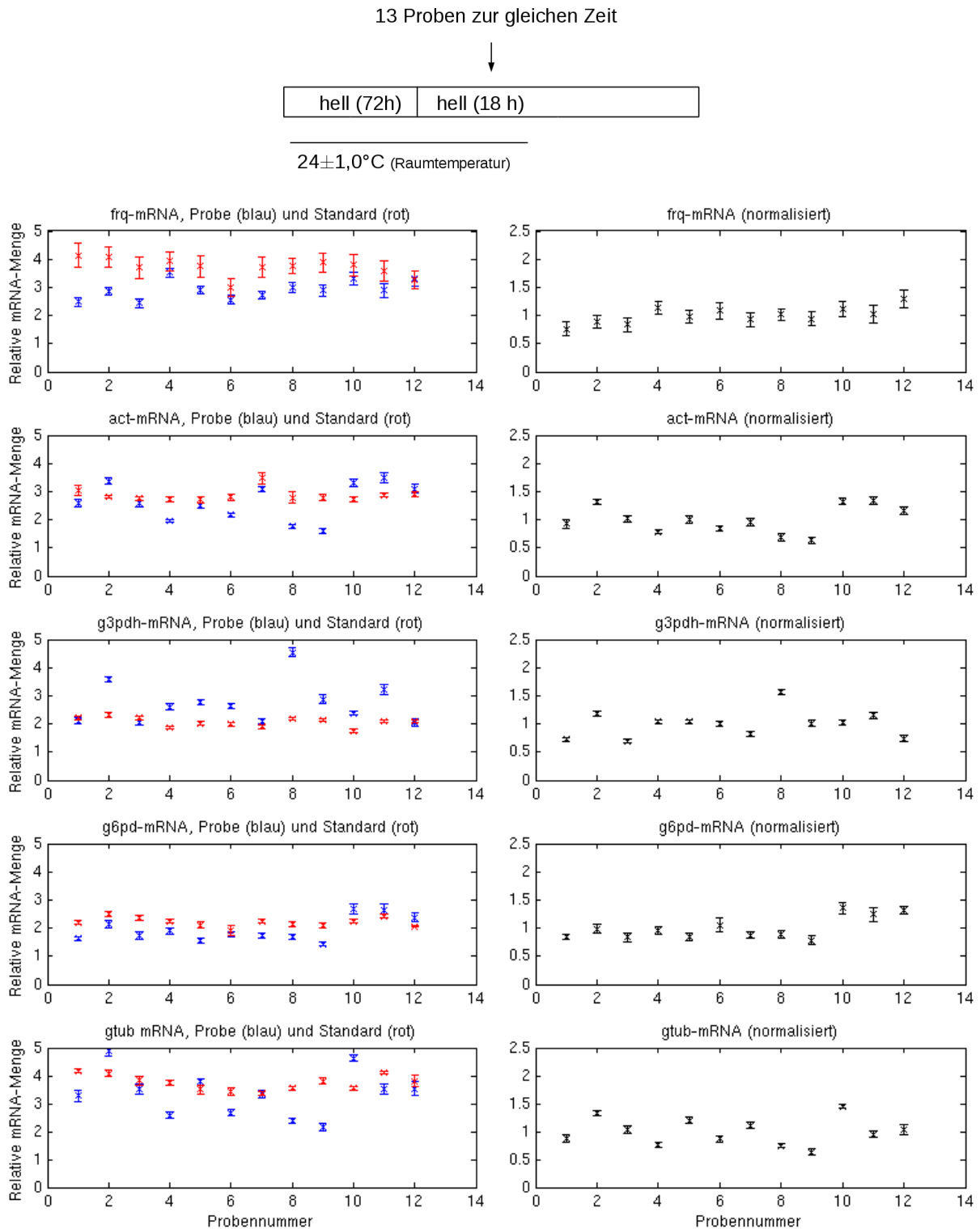


Abbildung 5.3: CDE14, relative mRNA-Messung von zwölf unabhängigen Kulturen unter identischen Inkubationsbedingungen. Die Kulturen wurden alle für drei Tage und 18 Stunden bei Licht und 24°C inkubiert und zeitgleich geerntet. Alle Kulturen wurden mit zwölf vollständig-technischen Replikaten gemessen. Durch diese Messung wird die biologisch-intrinsische Varianz zwischen verschiedenen Kulturen unter identischen Versuchsbedingungen analysiert (Stochastizität). Die linke Seite zeigt die nicht-normalisierte Messung der Proben (blau) sowie des Gesamt-RNA-Standards (rot) für *frq* sowie die vier Haushaltsgene. Die rechte Spalte zeigt die mit dem Gesamt-RNA-Standard normalisierten Messwerte der Proben.

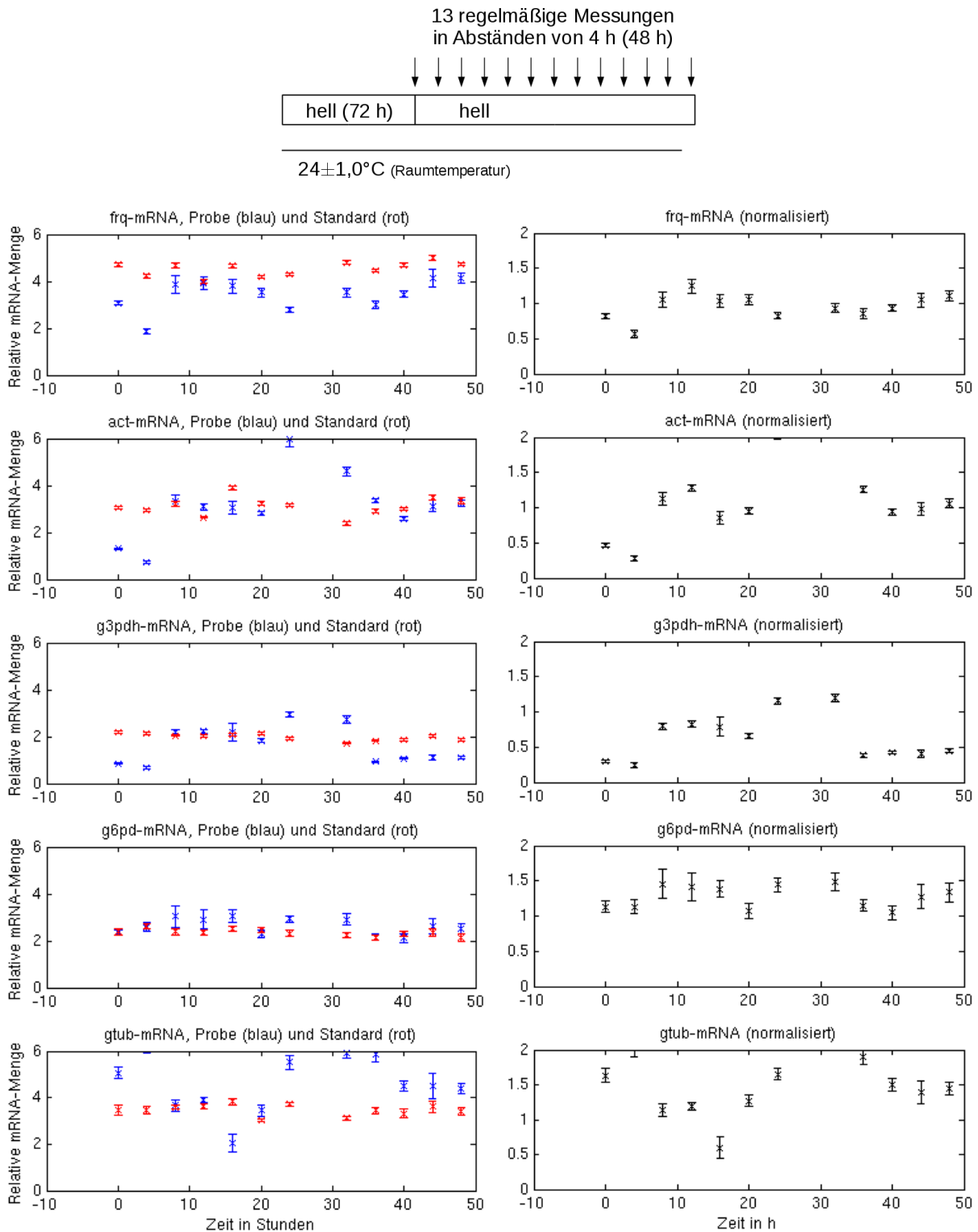


Abbildung 5.4: CDE15, relative mRNA-Messung von zwölf Kulturen nach dreitägiger Wachstumsphase unter Belichtung. Gemessen wurde alle vier Stunden über einen Zeitraum von 48 Stunden. Durch diese Messung wird die Stabilität der Kulturen unter Belichtung analysiert. Die linke Seite zeigt die nicht-normalisierte Messung der Proben (blau) sowie des Gesamt-RNA-Standards (rot) für *frq* sowie die vier Haushaltsgene. Die rechte Spalte zeigt die mit dem Gesamt-RNA-Standard normalisierten Messwerte der Proben.

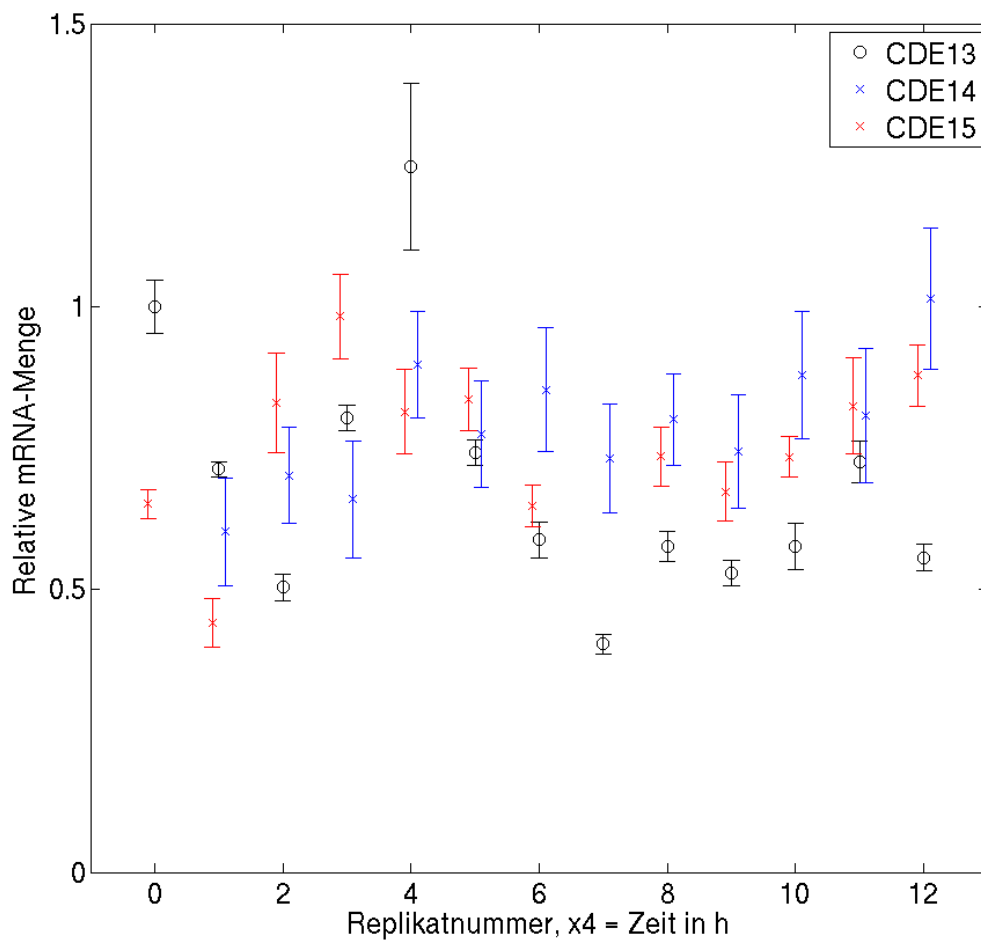
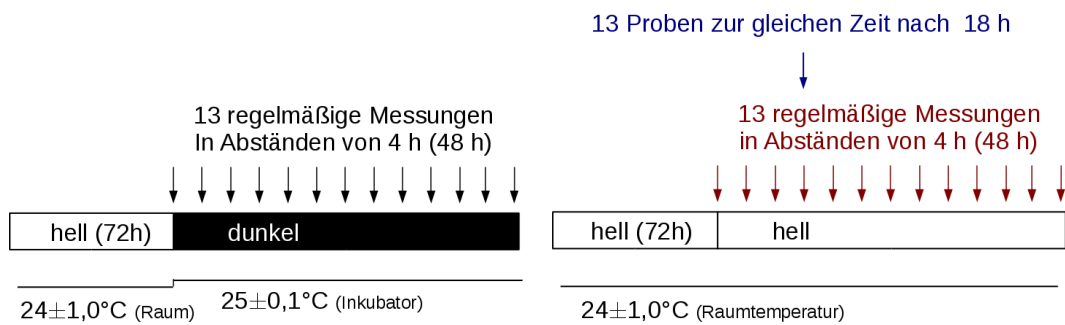


Abbildung 5.5: CDE 13, 14 und 15 im Vergleich. Die normalisierten, relativen mRNA-Mengen von *frq* aus CDE 14 und 15 (Abbildungen 5.3 und 5.4 rechts oben) zusammen mit der *frq*-Messung unter konstanter Temperatur aus CDE13 (Abbildung 5.1 oben) vergleichend gegenübergestellt.

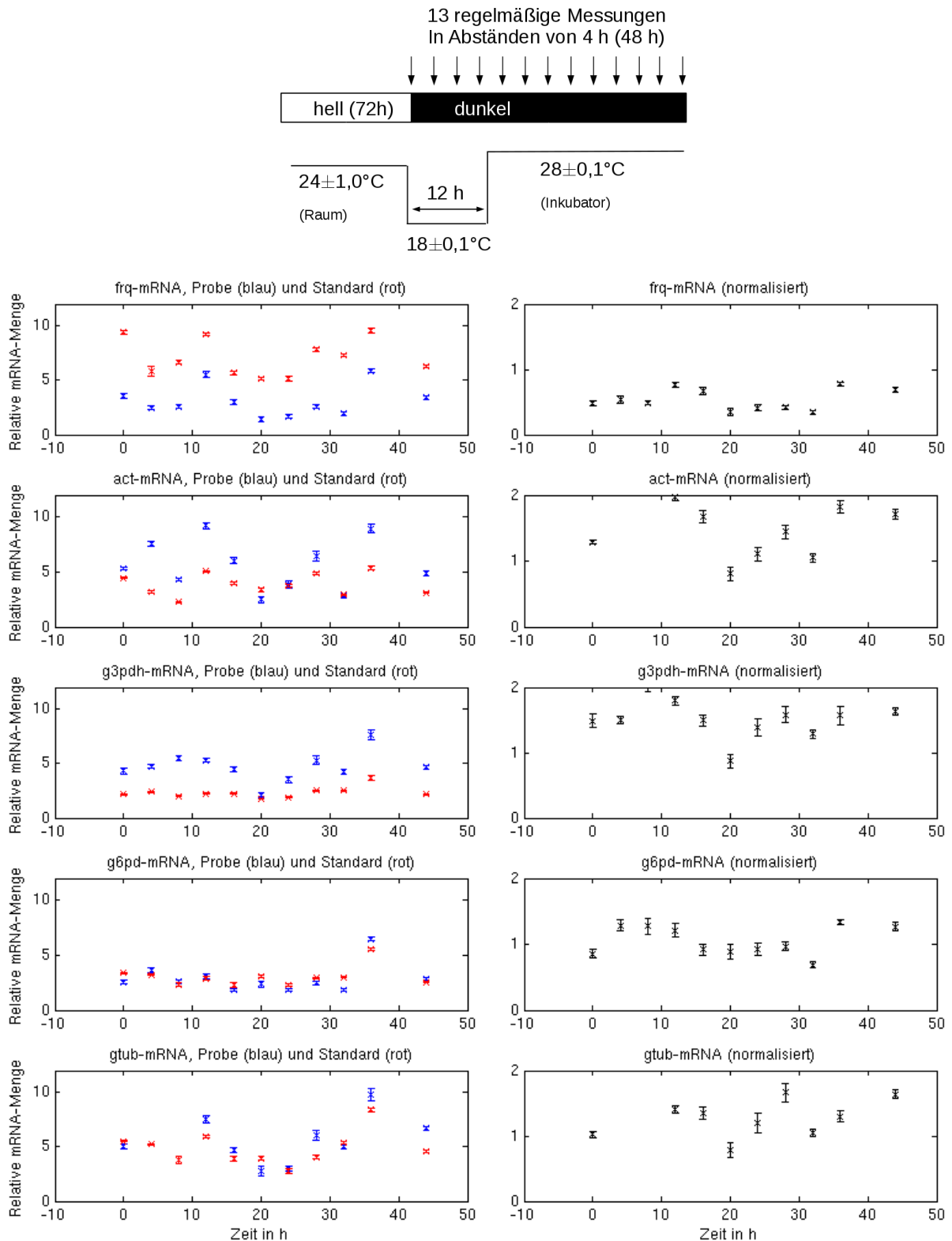


Abbildung 5.6: CDE19, Messung der relativen mRNA-Menge mit einer Temperaturänderung von 18 auf 28°C bei $t = 12$ h nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit. Gemessen wurde alle vier Stunden über einen Zeitraum von 48 Stunden nach dem Wechsel zu Dunkelheit. Die Temperatur betrug während der Wachstumsphase 24°C. Die linke Seite zeigt die nicht-normalisierte Messung der Proben (blau) sowie des Gesamt-RNA-Standards (rot) für *frq* sowie die vier Haushaltsgene. Die rechte Spalte zeigt die mit dem Gesamt-RNA-Standard normalisierten Messwerte der Proben.

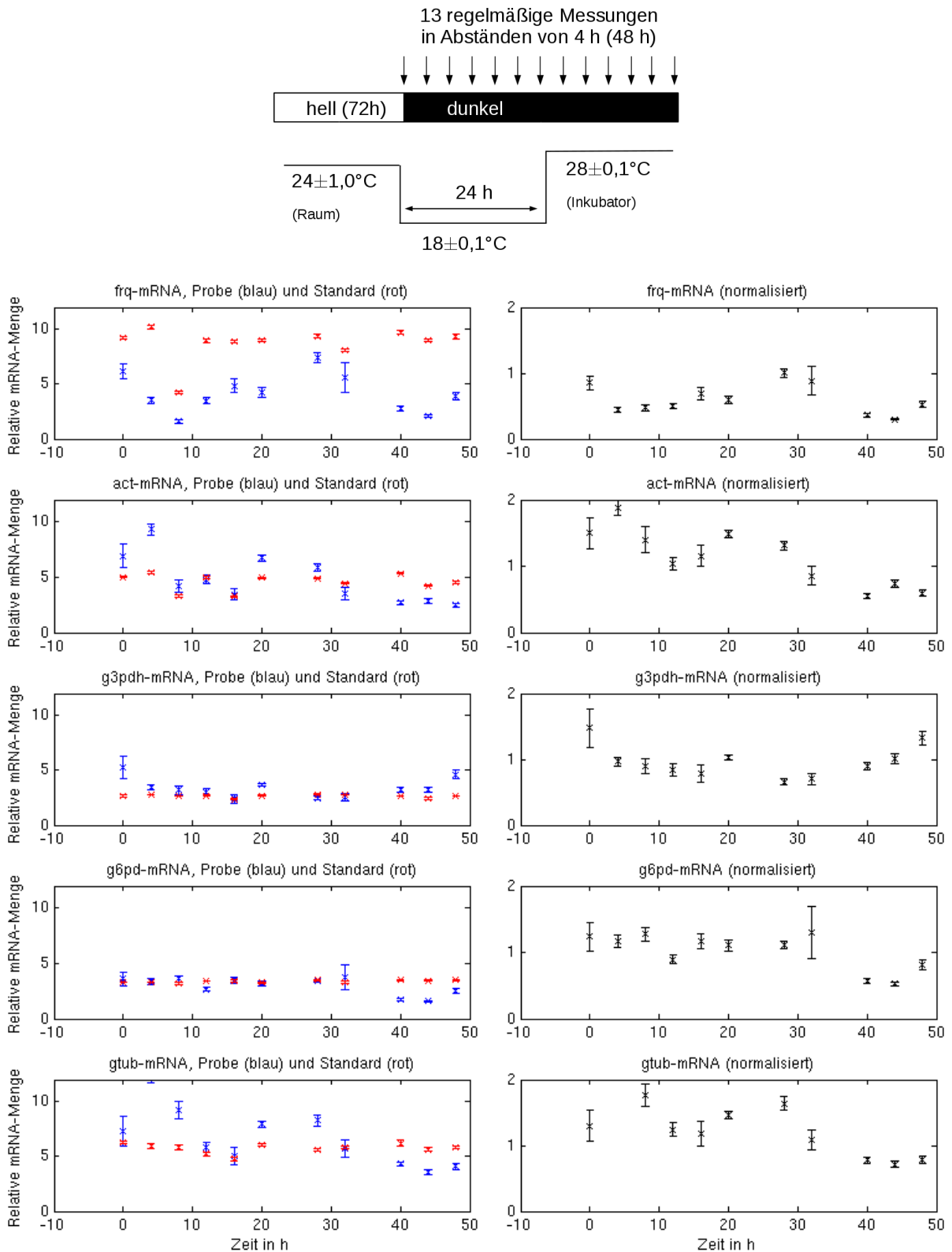


Abbildung 5.7: CDE18, Messung der relativen mRNA-Menge mit einer Temperaturänderung von 18 auf 28°C bei $t = 24$ h nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit. Gemessen wurde alle vier Stunden über einen Zeitraum von 48 h nach dem Wechsel zu Dunkelheit. Die Temperatur betrug während der Wachstumsphase 24°C. Die linke Seite zeigt die nicht-normalisierte Messung der Proben (blau) sowie des Gesamt-RNA-Standards (rot) für *frq* sowie die vier Haushaltsgene. Die rechte Spalte zeigt die mit dem Gesamt-RNA-Standard normalisierten Messwerte der Proben.

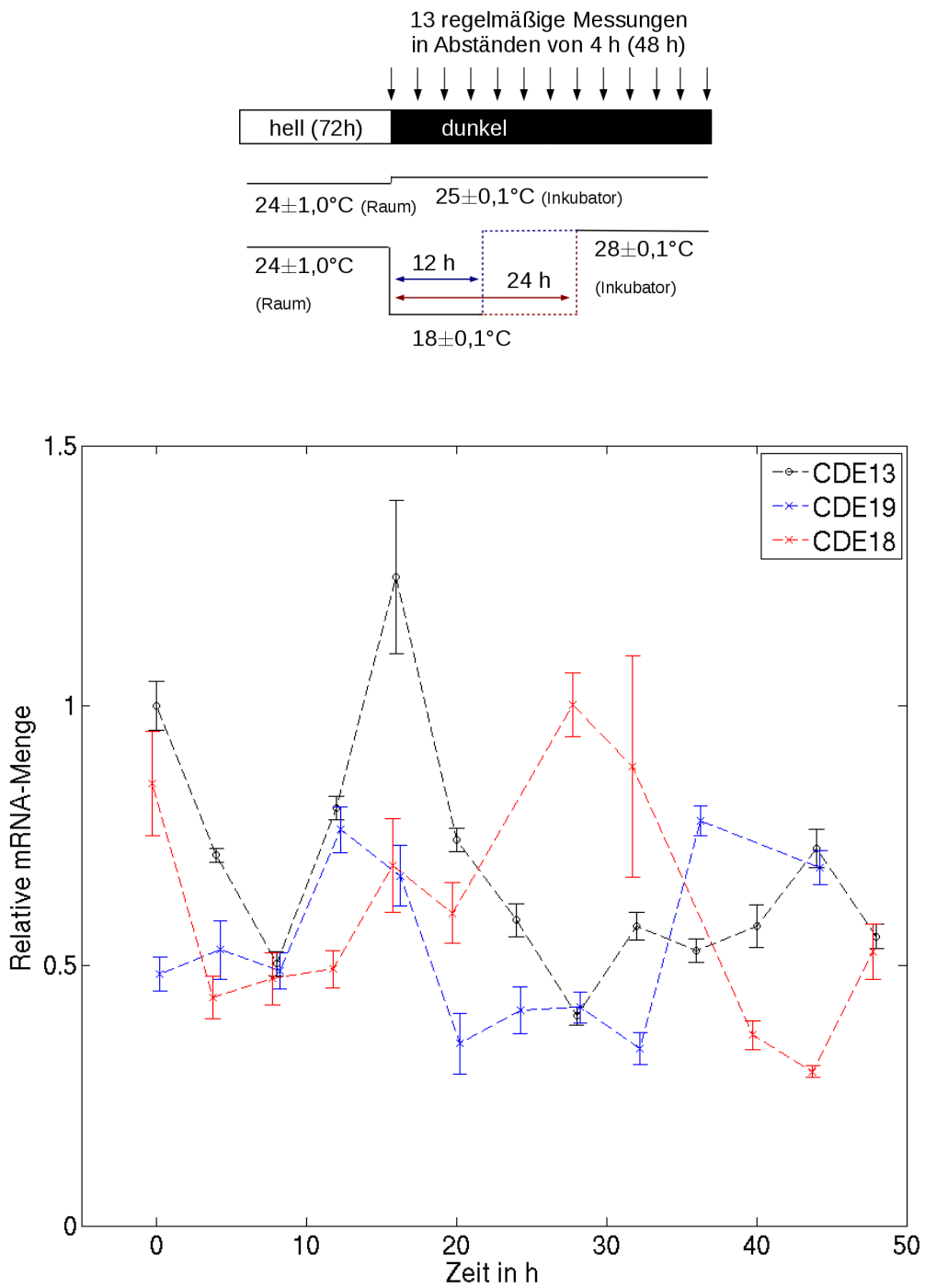


Abbildung 5.8: CDE 13, 18 und 19 im Vergleich.

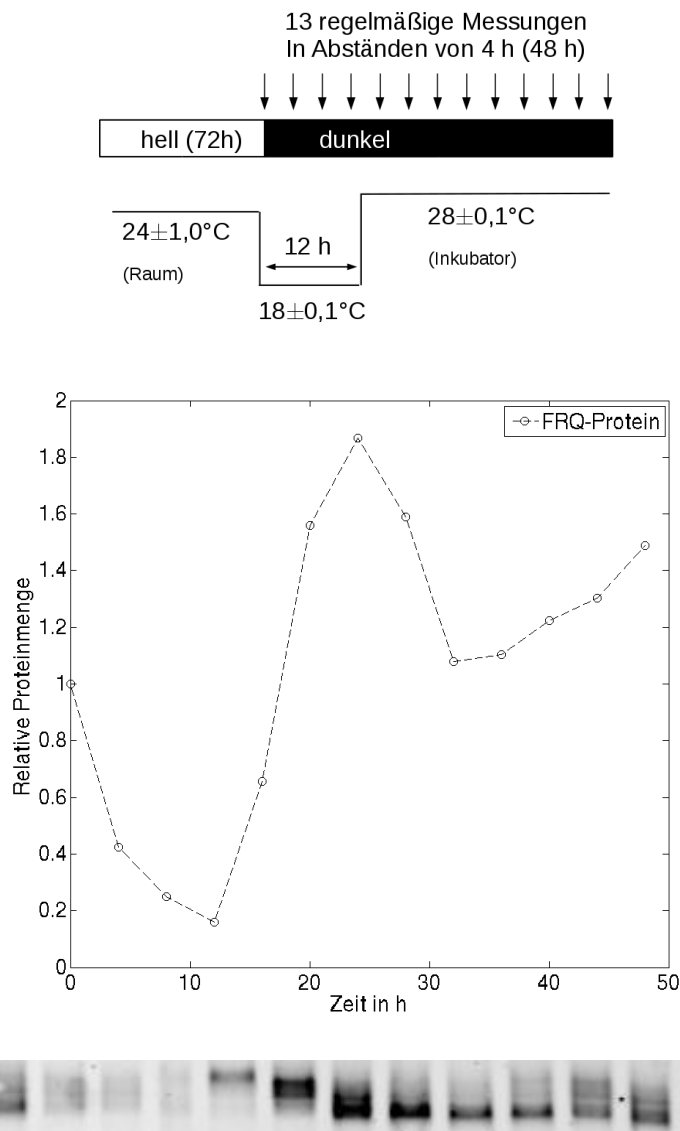


Abbildung 5.9: CDE07, Messung der relativen FRQ-Protein-Menge mit einer Temperaturänderung von 18 auf 28°C bei $t = 12$ h nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit. Gemessen wurde alle vier Stunden über einen Zeitraum von 48 Stunden nach dem Wechsel zu Dunkelheit. Die Temperatur betrug während der Wachstumsphase 24°C . Darunter ist der entsprechende Immunoblot für FRQ-Protein dargestellt.

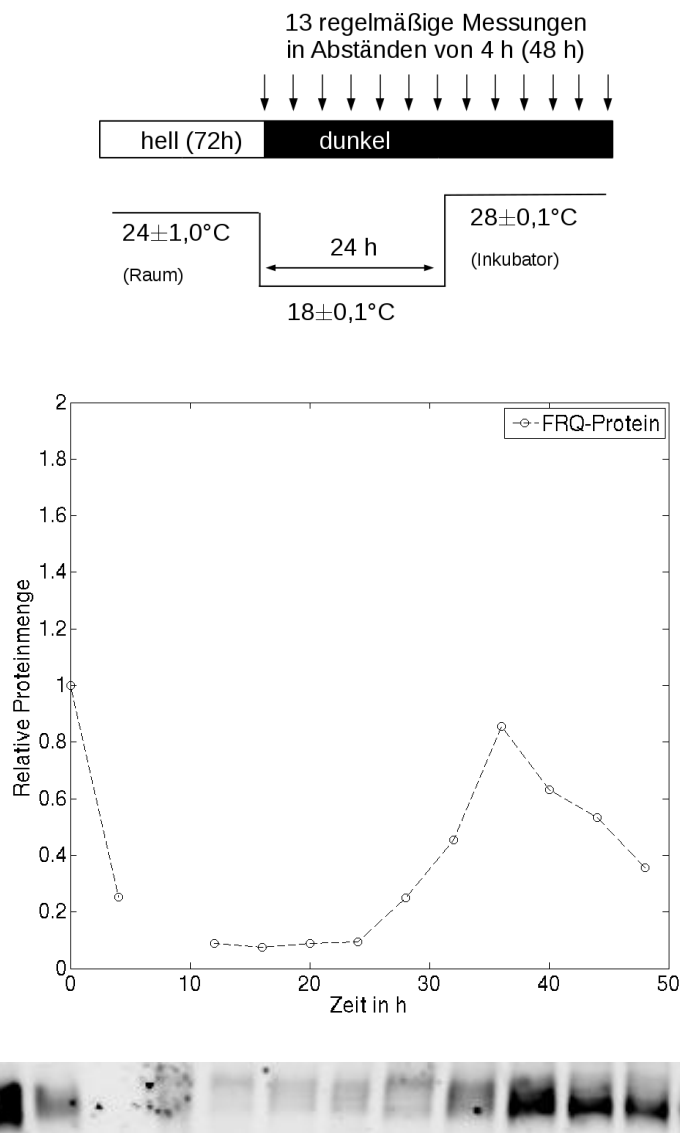


Abbildung 5.10: CDE08, Messung der relativen FRQ-Protein-Menge mit einer Temperaturänderung von 18 auf 28°C bei $t = 24$ h nach dem Wechsel von Belichtung zu Dunkelheit. Gemessen wurde alle vier Stunden über einen Zeitraum von 48 Stunden nach dem Wechsel zu Dunkelheit. Die Temperatur betrug während der Wachstumsphase 24°C. Darunter ist der entsprechende Immunoblot für FRQ-Protein dargestellt.

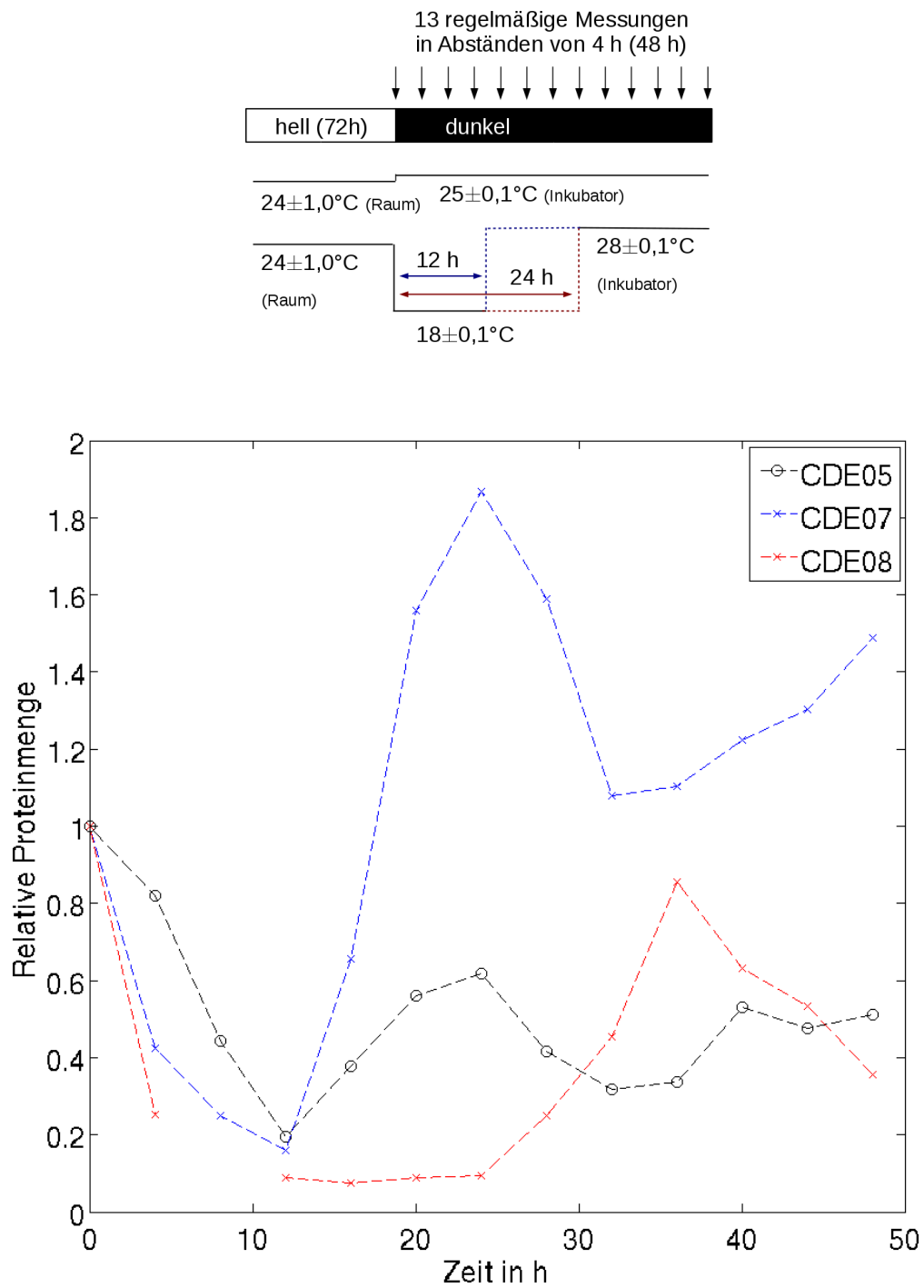


Abbildung 5.11: CDE05, CDE07 und CDE08 im Vergleich.

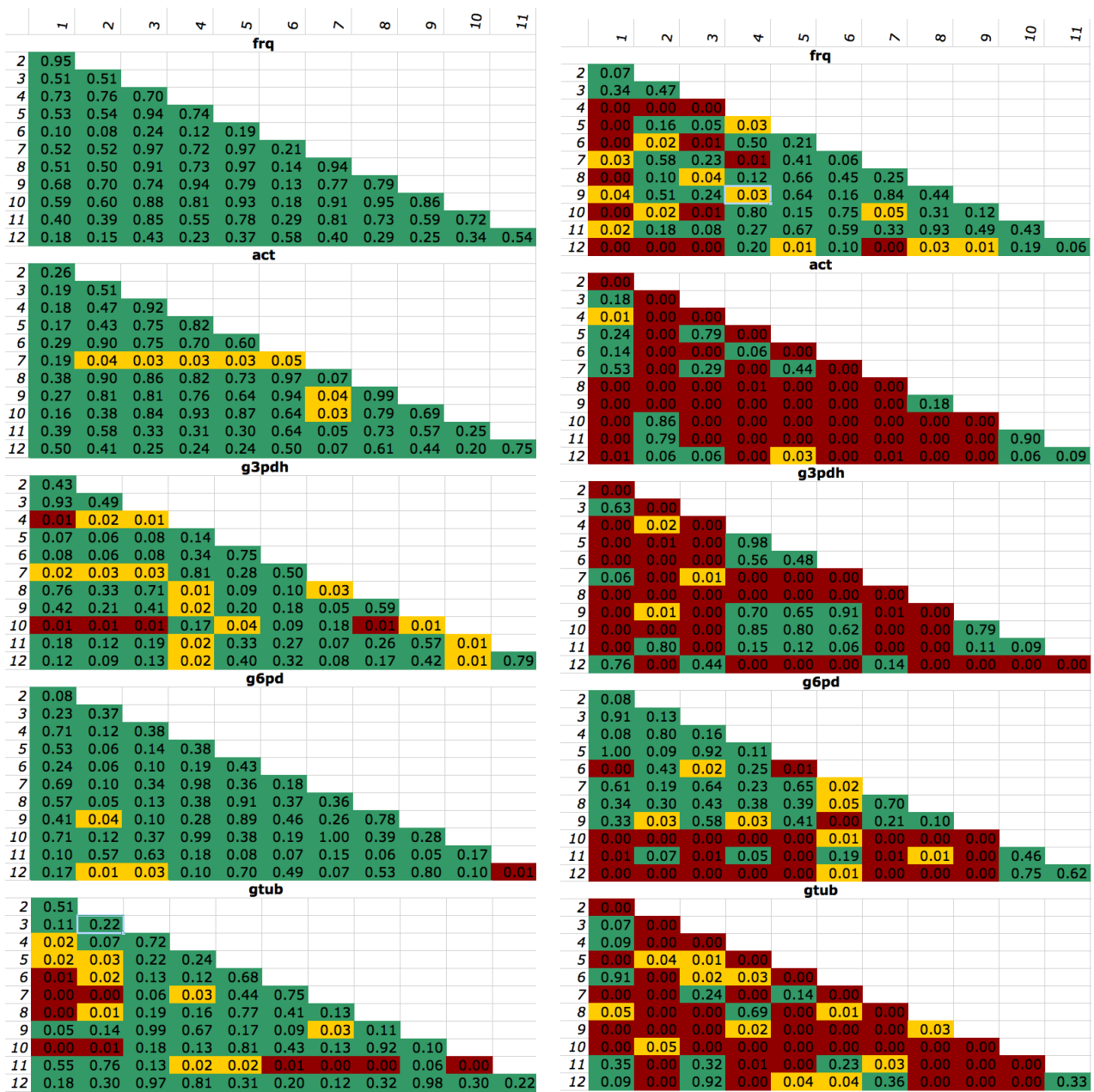


Abbildung 5.12: CDE14, paarweiser t -Test des Standards (links) und der normalisierten Proben (rechts) der Messreihe zur Analyse der biologischen Replikate. Rot kennzeichnet einen p -Wert von weniger als 0,01, diese beiden Messwerte sind also hoch signifikant verschieden. Gelb kennzeichnet p -Werte zwischen 0,01 und 0,05 und grün p -Werte größer als 0,05, letztere Messwerte sind also nicht signifikant verschieden und unterliegen aus statistischer Sicht einem sehr ähnlichen, eventuell sogar gleichem Systemwert, was für den Standard der Fall ist. Der ausschließlich grüne Bereich für den *frq*-Standard spricht für eine technisch sehr gelungene Messung, in Anbetracht des geringen Messfehlers bei der qRT-PCR und der relativ hohen Pipettiergenauigkeit der reversen Transkriptase (Glycerol, 6 μ l) ist dieses Ergebnis aus statistischer Sicht streng genommen ungewöhnlich jedoch möglich. Bei der normalisierten *frq*-mRNA-Messung der biologischen Replikate (rechts) sind 26 von 66 Paaren mit einem p -Wert von mindestens 0,05 signifikant verschieden, interessanterweise ist die *frq*-mRNA damit stabiler als alle anderen Haushaltsgene, der signifikant höhere Anteil unterschiedlicher Messwerte (bei diesem p -Wert wären vier zu erwarten) verdeutlicht das Vorliegen biologischer Fluktuationen.

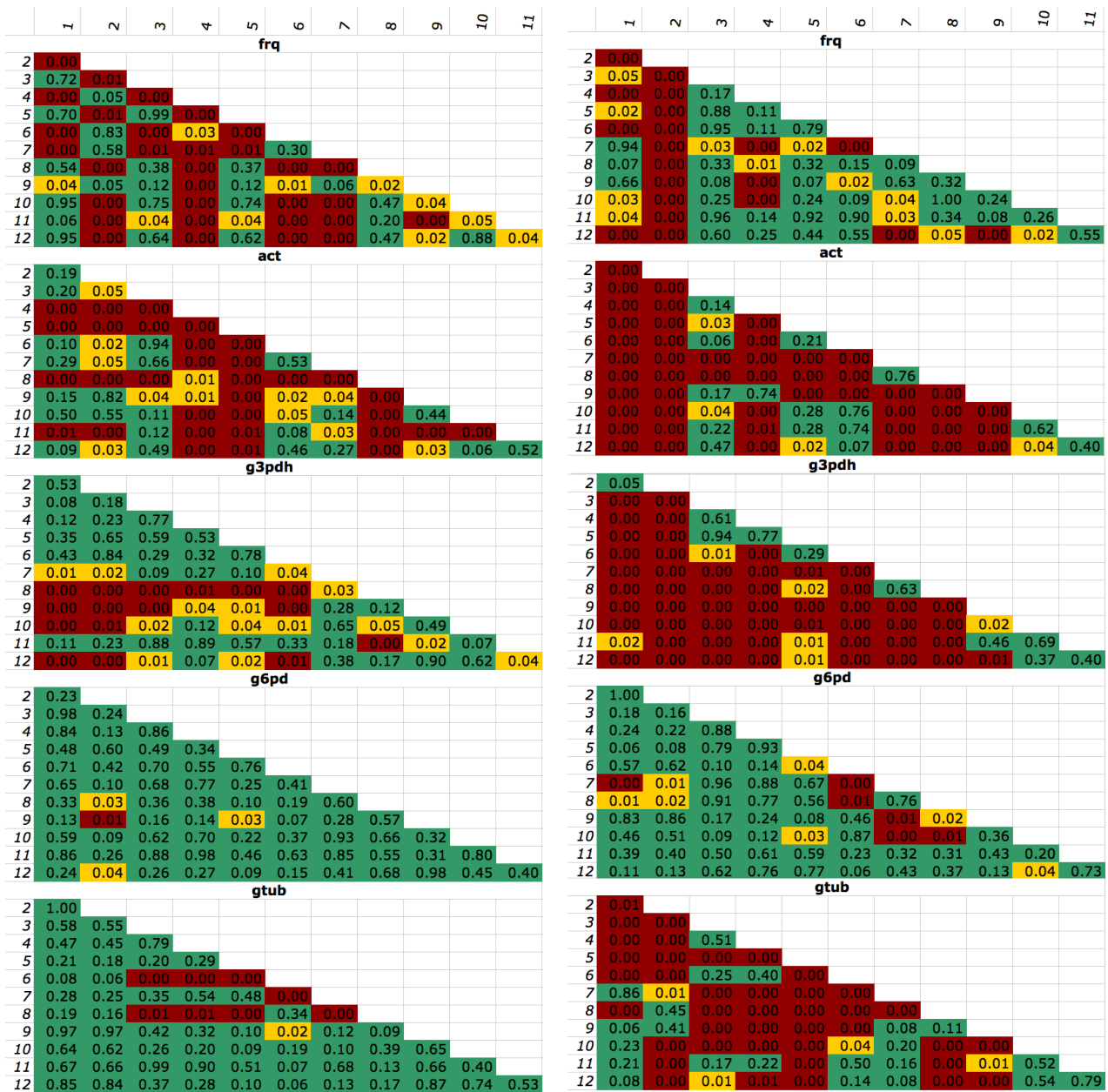


Abbildung 5.13: CDE15, paarweiser t -Test des Gesamt-RNA-Standards (links) und der normalisierten Proben (rechts) der Messreihe zur Analyse der biologischen Stabilität. Rot kennzeichnet einen p -Wert von weniger als 0,01, gelb zwischen 0,01 und 0,05 und grün größer als 0,05. Im Gegensatz zu CDE14 (Abbildung 5.12) weist der Gesamt-RNA-Standard bei *frq* (links oben) einen statistisch unverhältnismäßig hohen Anteil von signifikant verschiedenen Messwerten auf. Der primäre Grund wird in der Pipettiergenauigkeit in der Menge reverser Transkriptase (Glycerol, 6 μ l) liegen, die bei dem Gesamt-RNA-Standard umso höher wiegt, da die Messfehler der Replikate des Gesamt-RNA-Standards im Gegensatz zu den vollständig-technischen RNA-Replikaten der Proben (zusätzliche RNA-Extraktion) sehr gering sind. Unter den normalisierten *frq*-mRNA-Messwerten der Proben sind 32 von 66 der Probenpaare zum Konfidenzwert 0,05 verschieden, dies steht in Einklang mit dem Signifikanztest zu CDE14, dem Experiment der zeitgleichen Kulturreplikate. Auffällig ist bei den normalisierten Probenmessungen desweiteren die hohe Stabilität der *g6pd*-mRNA.

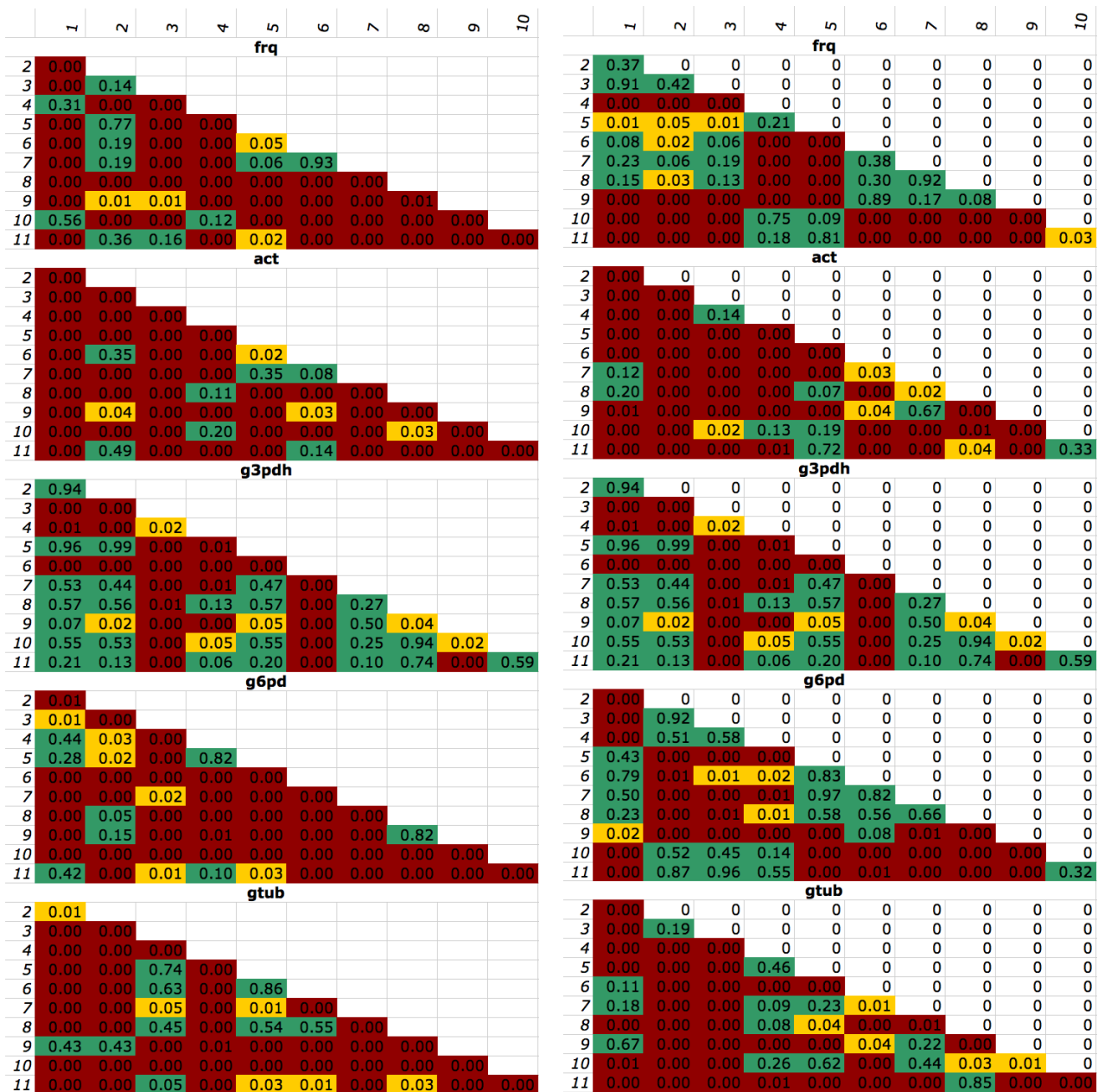


Abbildung 5.14: CDE19, paarweiser t -Test des Gesamt-RNA-Standards (links) und der normalisierten Proben (rechts) der Messreihe mit Temperaturänderung von 18°C nach 28°C bei $t = 12$ h nach dem 1/d-Transfer. Rot kennzeichnet einen p -Wert von weniger als 0,01, gelb zwischen 0,01 und 0,05 und grün größer als 0,05. Der Gesamt-RNA-Standard zeigt trotz der chemischen Identität in Anbetracht des Konfidenzniveaus von 0,05 einen sehr hohen Anteil signifikant verschiedener Paare von Messungen. Der maßgebliche Grund hierfür wird mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Pipettiergenauigkeiten in der Menge an reverser Transkriptase liegen. Durch Normalisierung mit dem Gesamt-RNA-Standard können die Proben mit Vorsicht für eine weitere Analyse verwertet werden, da die Unterschiede in den Mittelwerten der gemessenen Gesamt-RNA-Standards die gesamte Standardabweichung abbilden, die nicht durch die vollständig-technischen Replikate der Proben abgedeckt wird.

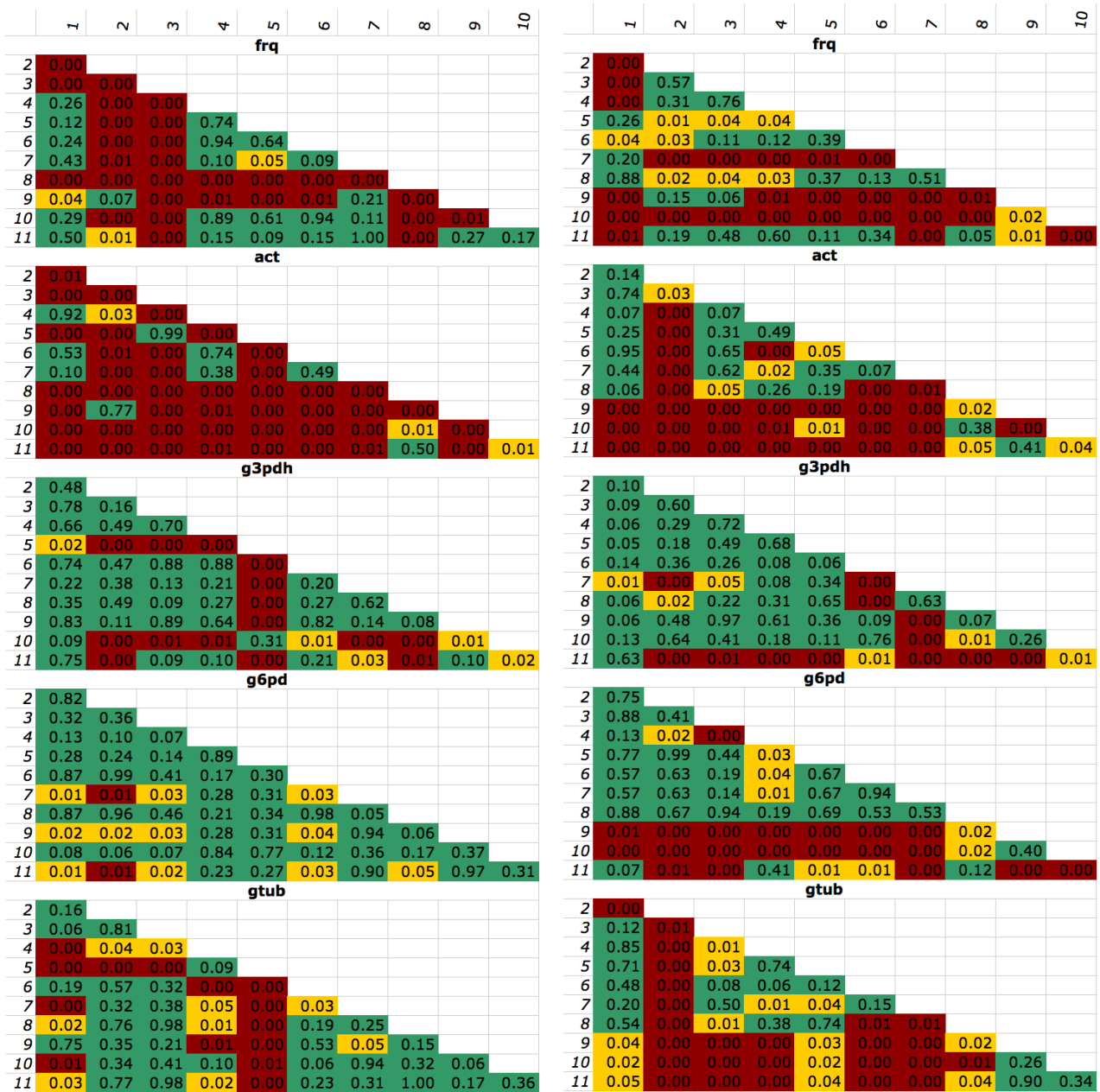


Abbildung 5.15: CDE18, paarweiser t -Test des Gesamt-RNA-Standards (links) und der normalisierten Proben (rechts) der Messreihe mit Temperaturänderung von 18°C nach 28°C bei $t = 24$ h nach dem 1/d-Transfer. Rot kennzeichnet einen p -Wert von weniger als 0,01, gelb zwischen 0,01 und 0,05 und grün größer als 0,05. Der Gesamt-RNA-Standard zeigt für die *frq*-mRNA trotz der chemischen Identität in Anbetracht des Konfidenzniveaus von 0,05 einen leicht hohen Anteil signifikant verschiedener Paare von Messungen. Dieser Anteil ist kann jedoch statistisch nachvollzogen werden. Durch Normalisierung mit dem Gesamt-RNA-Standard können die Proben für eine weitere Analyse und numerische Modellierung verwertet werden, da die Unterschiede in den Mittelwerten der gemessenen Gesamt-RNA-Standards die gesamte Varianz abbilden, die nicht durch die vollständig-technischen Replikate der Proben abgedeckt wird.

Numerische Analyse der experimentellen Messungen

In diesem Kapitel soll ein gewöhnliches Differentialgleichungsmodell erstellt werden, um das in Kapitel 5 gemessene Szenario mit einem Temperaturanstieg von 18°C auf 28°C nach 24 Stunden numerisch zu simulieren. Die Messreihen zu diesem Szenario hatten gezeigt, dass die relativen Mengen sowohl der *frq*-mRNA wie auch des FRQ-Proteins nach dem Temperaturanstieg ansteigen (siehe Abbildungen 5.5 und 5.11). Die bisherige biochemische Literatur legt jedoch einen post-transkriptionalen Wirkungsmechanismus der Temperatur nahe [8–10, 12]. Das hier entwickelte Modell ermöglicht eine numerische Analyse der Wirkung des Temperaturanstiegs auf das Verhalten des Uhrsystems. Insbesondere soll durch eine Sensitivitätsanalyse hinsichtlich der Temperatur die Frage geklärt werden, welche biochemische Einheit durch den Temperaturanstieg unmittelbar beeinflusst wird.

Bevor jedoch ein temperaturempfindliches Modell aufgestellt werden kann, werden zunächst auf der Grundlage des Goodwin-Modells (siehe Kapitel 3) die Messreihen mit konstanter Temperatur sowohl in Bezug auf die *frq*-mRNA- wie auch die FRQ-Proteinmenge (CDE05 und CDE13) simuliert. Für diesen Modellierungsteil ist es entsprechend nicht erforderlich, die Wirkung der Temperatur zu berücksichtigen. Auf diesem initialen Modell aufbauend wird dann ein vierstufiges Modell mit Temperatursensitivitäten in allen Produktions- und Degradationstermen entwickelt. Dieses Modell ermöglicht dann eine Sensitivitätsanalyse hinsichtlich der Temperatur.

6.1 Modellierung und Simulation der Messreihe mit konstanter Temperatur

Zur Modellierung der Messreihen mit konstanter Temperatur (CDE13 für *frq*-mRNA sowie CDE05 für FRQ-Protein) wird ein Derivat des Goodwinmodells, das in Kapitel 3 eingeführt wurde, verwendet. Dieses Modell besteht aus drei Zustandsvariablen: der relativen *frq*-mRNA-Menge (*frq*), der relativen FRQ-Proteinmenge (*frqp*) sowie der relativen Menge des Transkriptionsfaktors WCC (*wcc*). Die Produktionsrate $p1$ von *frq* hängt aufgrund des Hill-Koeffizienten dabei von einem ultra-sensitiven Aktivierungsmechanismus auf der Basis einer Michaelis-Menten-Kinetik von der *wcc*-Menge ab. Die Produktionsrate $p2$ von *frqp* basiert aufgrund der angenommenen konstanten Translations-Maschinerie quasi auf einem mono-molekularen Aktivierungsmechanismus, der von der *frq*-Menge abhängt. Die Produktionsrate $p3$ von *wcc* hängt dagegen lediglich von der Menge an phosphoryliertem WCC ab, welche indirekt durch die *wcc*-Menge sowie der konstanten WCC-Gesamtmenge gegeben ist. Die Degradationsraten $d1$ und $d2$ von *frq* und *frqp* sind aufgrund der konstanten Konzentrationen der Degradationsmaschinerien ebenfalls quasi-monomolekular. Dagegen basiert der Degradationsterm $d3$

von *wcc* in Anbetracht einer Übertragung eines Phosphoryl-Restes von FRQ-Protein auf WCC-Protein auf einem von diesen beiden Spezies abhängigen bimolekularen Mechanismus.

Erste Parameter wurden anhand der Messdaten manuell geschätzt, sie wurden dann im Rahmen einer numerischen Parameterschätzung mit dem Rechenprogramm PARFIT/VPLAN optimiert. Da die Messdaten zum Zeitpunkt $t = 0$ stets auf 1,0 normalisiert wurden, in den Messreihen CDE05 und CDE13 sogar exakt bei 1,0 liegen, werden die Startwerte des Anfangswertproblems auf 1,0 gesetzt. Dies schließt auch die Menge des Transkriptionsfaktors WCC mit ein. Eine Schätzung dieses Anfangswertes ist nicht nötig, da dieser Wert im Rahmen der Reaktionsparameter eingeht. Zur numerischen Parameterschätzung und zum Vergleich der numerischen Lösungstrajektorien mit den Messdaten werden die Standardabweichungen der Messdaten angepasst. Zum einen wird für die relative Proteinmenge des *FRQ* (Messreihe CDE05) als Standardabweichung eine Kombination aus einem absoluten und einem relativen Anteil nach folgender Gleichung berechnet: $\sigma(i) = \mu(i) \cdot 0.1 + 0.05$. Zur vollständigen Standardabweichung der *frq*-mRNA-Messung der Messreihe CDE13 wird aufgrund der biologisch-intrinsischen Standardabweichung ein zusätzlicher Wert von absolut 0,15 addiert.

$$\sigma_5(i) = \sqrt{12\sigma_4^2(i) + 0,15^2} \quad (6.1)$$

Das Differentialgleichungsmodell nach Parameterschätzung lautet insgesamt:

$$\begin{aligned} f_1 = \frac{dfrq}{dt} &= p1 - d1 = k1 \cdot \frac{wcc^{k14}}{k7 + wcc^{k14}} - k4 \cdot frq \\ f_2 = \frac{dfrqp}{dt} &= p2 - d2 = k2 \cdot frq - k5 \cdot frqp \\ f_3 = \frac{dwcc}{dt} &= p3 - d3 = k3 \cdot (k13 - wcc) - k6 \cdot frqp \cdot wcc \end{aligned}$$

k01 = +1.69697e+01	k04 = +1.38731e-01	k07 = +1.99182e+02
k02 = +1.67100e-01	k05 = +2.54930e-01	k13 = +1.90731e+01
k03 = +2.25356e-02	k06 = +8.86760e-01	k14 = +5.85864e+00
frq(0) = 1.0	frqp(0) = 1.0	wcc(0) = 1.0

Die Simulation anhand dieses Modells ist im Vergleich zu den Messdaten in Abbildung 6.1 dargestellt. Das Modell erfasst dabei sowohl die Periodenlängen von *frq* und *frqp* mit einem Wert von etwa 22 Stunden als auch die Phasenverschiebung zwischen *frq* und *frqp* in Höhe von etwa sechs Stunden. Darüber hinaus zeigt es das für diesen Versuchsablauf charakteristische Dämpfungsverhalten der Schwingung.

6.2 Modellierung und Simulation der Messreihe mit Temperaturanstieg

Aufbauend auf dem Modell im vorigen Abschnitt zur quantitativen Beschreibung des Schwingungsverhaltens bei konstanter Temperatur soll nun ein Modell beschrieben werden, dass die Wirkung

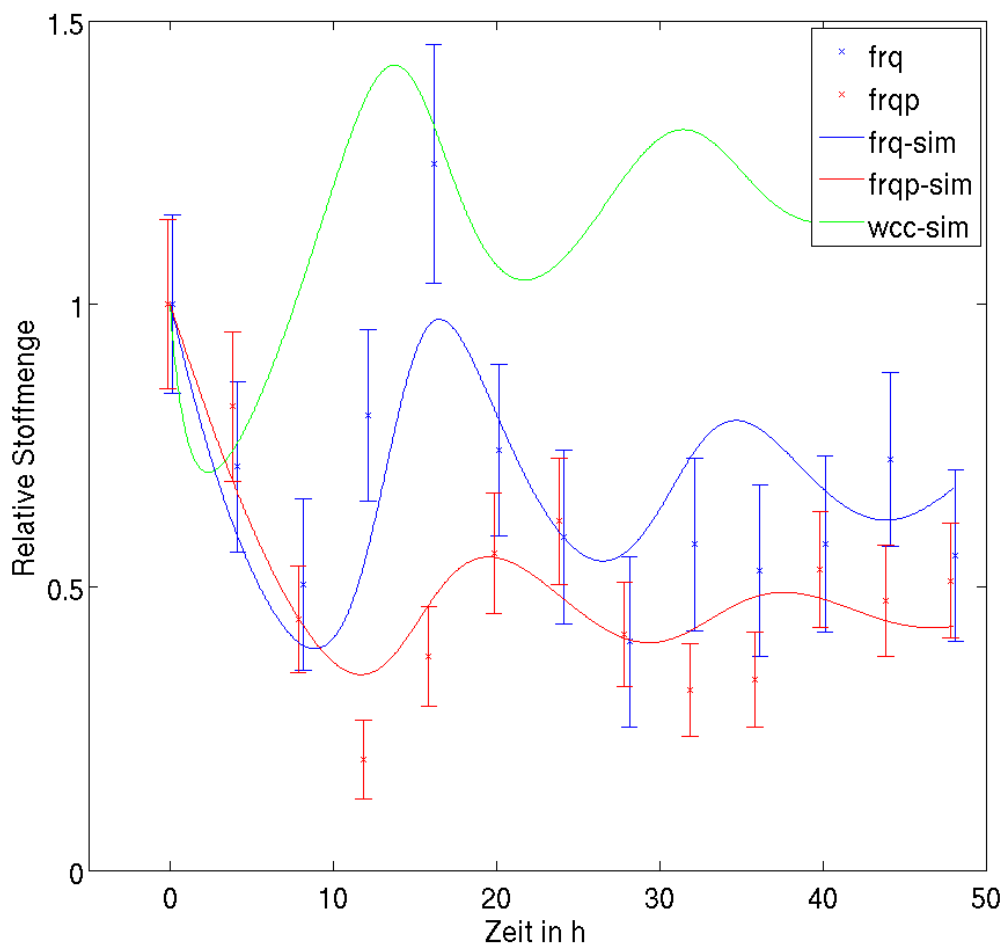
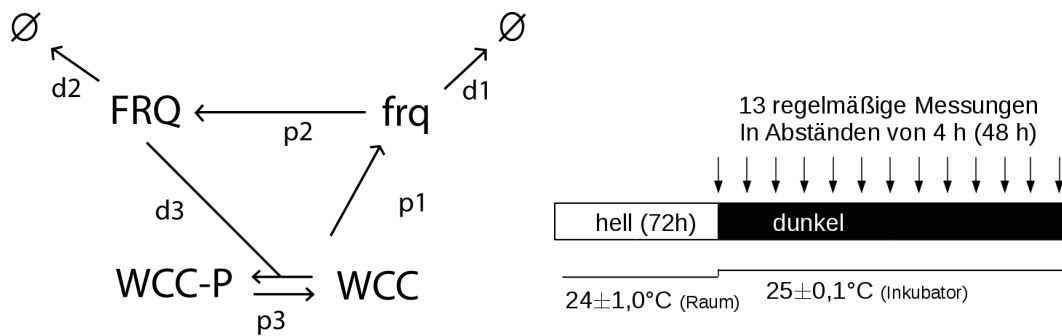


Abbildung 6.1: Vergleich der Simulation mit den Daten der Messreihen CDE13 und CDE05. Die Lösungstrajektorien zeigen, dass das Modell die wesentlichen Eigenschaften der tagesrhythmischen Schwingung hinsichtlich Periode und Phase erfasst. Desweiteren zeigt es das für diesen Versuchsaufbau typische Dämpfungsverhalten.

eines Temperaturanstiegs auf das transiente, also zeitlich unmittelbare Verhalten des Systems erfasst. Konkret soll dieses Modell die Messreihen mit einem Temperaturanstieg von 18°C auf 28°C nach 24 Stunden beschreiben. Hinsichtlich der *frq*-mRNA ist dies die Messreihe CDE18 sowie hinsichtlich des FRQ-Proteins die Messreihe CDE08. Dabei soll jedoch gleichzeitig die Fähigkeit des Modells zur Beschreibung des Systemverhaltens unter konstanter Temperatur erhalten bleiben. Zur Parameterschätzung werden daher zusätzlich die Messreihen CDE05 und CDE13 wie im vorherigen Modellierungsabschnitt mitverwendet.

Nach Testen verschiedener Gleichungsstrukturen konnte ein Differentialgleichungsmodell identifiziert werden, das nach Parameterschätzung die Daten der Messreihen bei konstanter Temperatur zwar nicht mehr so gut wie im vorigen Ausgangsmodell widerspiegelt, dafür jedoch die Daten der Messreihen mit Temperaturanstieg bei $t = 24$ h sehr gut approximiert. In diesem Modell ist zwischen die Zustandsvariablen *frq* und *frqp* eine Zwischenvariable *med* eingefügt. Ihre Produktionsrate $p2$ hängt dabei monomolekular von der *frq*-Menge ab, diese Rate wird gleichzeitig zur Degradationsrate $d1$ des *frq* hinzuaddiert, so dass es sich chemisch gesehen um eine monomolekulare Umwandlung handelt. Die Produktionsrate von *frqp* hängt nun jedoch nicht mehr von *frq* sondern von *med* ab. Die Degradationsrate des *med* selbst ist analog zu *frq* eine quasi-monomolekulare Zerfallsreaktion. Grundsätzlich lässt sich diese Zwischenvariable also als ein Zwischenprodukt interpretieren. Diese Zustandsvariable wird bei dem Vergleich mit den Messdaten in der Parameterschätzung jedoch nicht berücksichtigt, stattdessen werden nur die *frq*-Mengen mit den *frq*-mRNA-Messdaten und die *frqp*-Mengen mit den FRQ-Protein-Messdaten verglichen. Da in den Messdaten alle *frq*-mRNA- und FRQ-Protein-Varianten erfasst werden, lässt sich dieser Variablen so gesehen keine klare chemische Identität zuordnen, sie hat folglich nur eine mathematische Funktion der Verzögerung.

Um der Temperatursensitivität des Modells Rechnung zu tragen, wird jeder Produktions- und Degradationsterm als eine lineare Funktion der Temperatur modelliert. Wie in Kapitel 2 erläutert wurde müssen für die Eigenschaft der Temperaturkompensation mehrere Reaktionen temperaturabhängig sein. Die initialen Parameter wurden zunächst manuell geschätzt und dann mit einer numerischen Parameterschätzung optimiert. Alle Anfangswerte wurden zur Simulation auf 1,0 gesetzt.

Zur numerischen Parameterschätzung und zum Vergleich der numerischen Lösungstrajektorien mit den Messdaten werden die Standardabweichungen der Messdaten wie in der vorigen Modellierung angepasst. Die Standardabweichung der relativen Proteinmenge des *FRQ* wird wieder entsprechend der folgenden Gleichung angenommen: $\sigma(i) = \mu(i) \cdot 0.1 + 0.05$. Zur vollständig-technischen Standardabweichung der *frq*-mRNA-Messung wird eine biologisch-intrinsische Standardabweichung mit einem absoluten Wert von 0,15 addiert.

$$\sigma_5(i) = \sqrt{12\sigma_4^2(i) + 0,15^2} \quad (6.2)$$

Das Differentialgleichungsmodell lautet insgesamt:

$$\begin{aligned}
f_1 = \frac{dfrq}{dt} &= p_1 - d_1 = k_1 \cdot \frac{wcc^{k_{12}}}{k_{10} + wcc^{k_{12}}} - (k_5 \cdot frq + k_2 \cdot frq) \\
f_2 = \frac{dmed}{dt} &= p_2 - d_2 = k_2 \cdot frq - k_6 \cdot med \\
f_3 = \frac{dfrqp}{dt} &= p_3 - d_3 = k_3 \cdot med - k_7 \cdot frqp \\
f_4 = \frac{dwcc}{dt} &= p_4 - d_4 = k_4 \cdot (k_{11} - wcc) - k_8 \cdot frqp \cdot wcc
\end{aligned}$$

$k_1 = k_{13} \cdot (T + k_{14})$	$k_3 = k_{17} \cdot (T + k_{18})$	$k_5 = k_{21} \cdot (T + k_{22})$	$k_7 = k_{25} \cdot (T + k_{26})$
$k_2 = k_{15} \cdot (T + k_{16})$	$k_4 = k_{19} \cdot (T + k_{20})$	$k_6 = k_{23} \cdot (T + k_{24})$	$k_8 = k_{27} \cdot (T + k_{28})$
$k_{10} = +1.98594e+02$	$k_{15} = +3.81347e-01$	$k_{20} = -2.90088e+02$	$k_{25} = +5.87535e-03$
$k_{11} = +1.94087e+01$	$k_{16} = -2.851495e+02$	$k_{21} = +1.60674e-01$	$k_{26} = -2.48023e+02$
$k_{12} = +2.131606e+01$	$k_{17} = +9.28008e-04$	$k_{22} = -2.78248e+02$	$k_{27} = +2.49967e-03$
$k_{13} = +3.67061e+01$	$k_{18} = -2.89608+02$	$k_{23} = +5.03352e-03$	$k_{28} = -2.85252e+02$
$k_{14} = -2.64632e+02$	$k_{19} = +9.59137e-05$	$k_{24} = -2.63205e+02$	
$frq(0) = 1.0$	$med(0) = 1.0$	$frqp(0) = 1.0$	$wcc(0) = 1.0$

Die Abbildungen 6.2 bis 6.5 zeigen die Lösungstrajektorien im Vergleich mit den Messdaten sowohl für das Szenario mit konstanter Temperatur als auch mit Temperaturanstieg. Durch die zusätzliche Messreihe mit Temperaturanstieg können die Messdaten unter konstanter Temperatur nicht mehr so gut wie mit dem vorherigen Modell wiedergegeben werden (siehe Abbildungen 6.2 und 6.3). Insbesondere hat sich die Periodenlänge des *frqp* von 22 auf etwa 32 Stunden erhöht. Abbildung 6.4 zeigt die Lösungstrajektorien sowie die Messdaten für den Versuchsverlauf mit einem Temperaturanstieg von 18°C auf 28°C nach 24 Stunden. Die Übereinstimmung zwischen den simulierten Lösungstrajektorien mit den Messdaten ist dabei sehr hoch. Auffällig ist der Haken im *frq*-Verlauf unmittelbar nach der Temperaturerhöhung nach 24 Stunden. Der zunächst steile Abfall in der *frq*-Menge deutet in Verbindung mit dem Anstieg in der *med*-Menge zur gleichen Zeit (Abbildung 6.5) darauf hin, dass die Temperaturerhöhung insbesondere die Umwandlung der *frq*-mRNA in die Zwischenvariable *med* beschleunigt. Dieses Ergebnis soll im folgenden Abschnitt im Rahmen einer Sensitivitätsanalyse der Produktions- und Degradationsraten hinsichtlich Veränderungen in der Temperatur näher untersucht werden. Erst durch den Anstieg des *frqp* und damit einhergehend dem des *wcc* kommt es über die Rückkoppelung zu einer Umkehrung des *frq*-Abfalls in eine starke *frq*-Zunahme. Der Anstieg des *frq* wird entsprechend dieser Simulation also nicht durch die Temperatur direkt ausgelöst, sondern erst durch den Rückkoppelungsmechanismus über *frqp* und *wcc*.

6.3 Analyse der Temperatursensitivität

Nach der Modellierung der Messdaten auf der Basis eines gewöhnlichen Differentialgleichungsmodells können die Eigenschaften der biochemischen Reaktionen des Uhrsystems nun hinsichtlich der quantitativen Beziehungen zwischen ihnen selbst sowie zur Temperatur analysiert werden. Der Fokus liegt

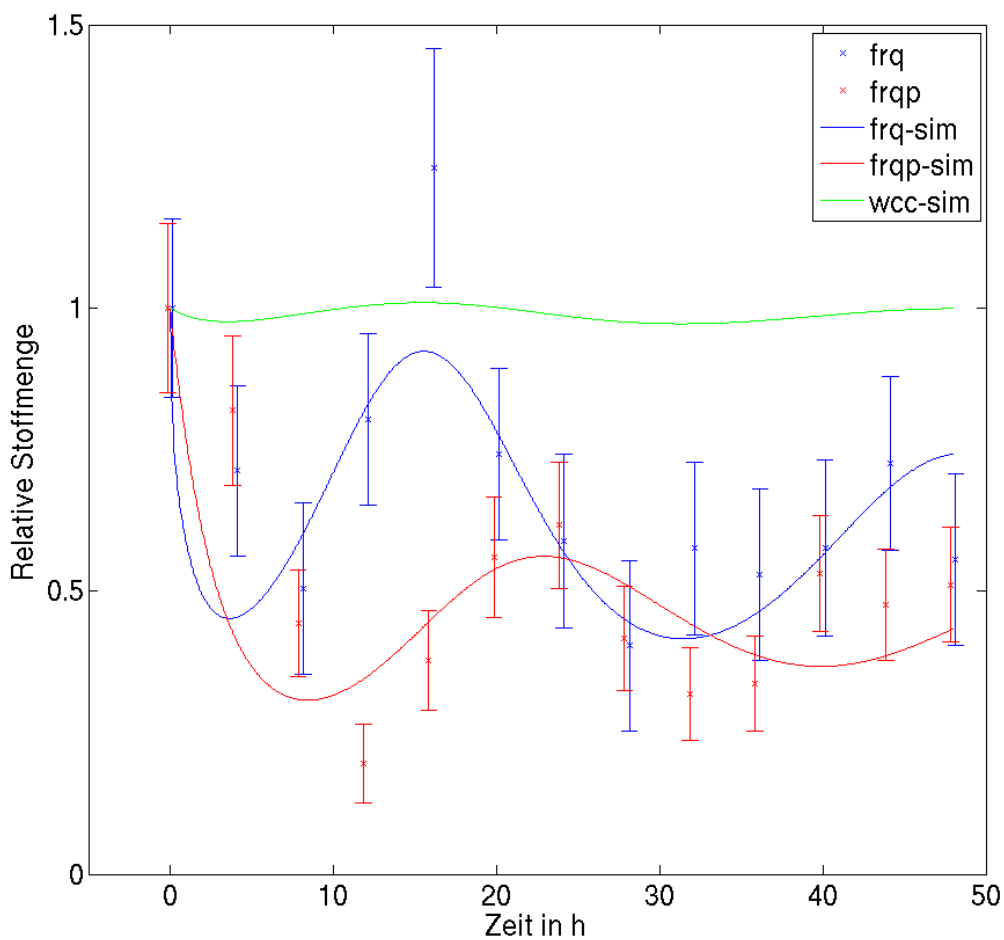
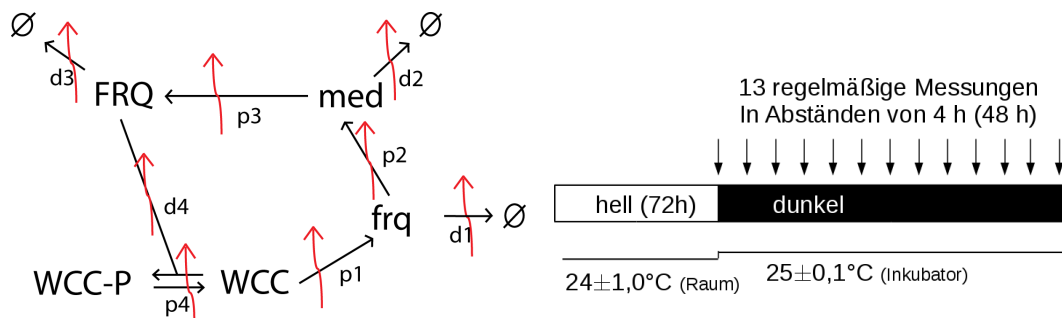


Abbildung 6.2: Simulationen mit dem vierstufigen und temperatursensitiven Modell des Versuchsablaufs mit konstanter Temperatur im Vergleich zu den Messreihen CDE13 (mRNA) und CDE05 (Protein). Aufgrund der zusätzlichen Berücksichtigung der Messreihe mit Temperaturanstieg bei 24 Stunden in der Parameterschätzung (Abbildung 6.4) beschreibt dieses Modell die Messdaten nicht so gut wie das dreistufige Modell, insbesondere hat sich die Periodenlänge des *frqp* von 22 auf 32 Stunden erhöht.

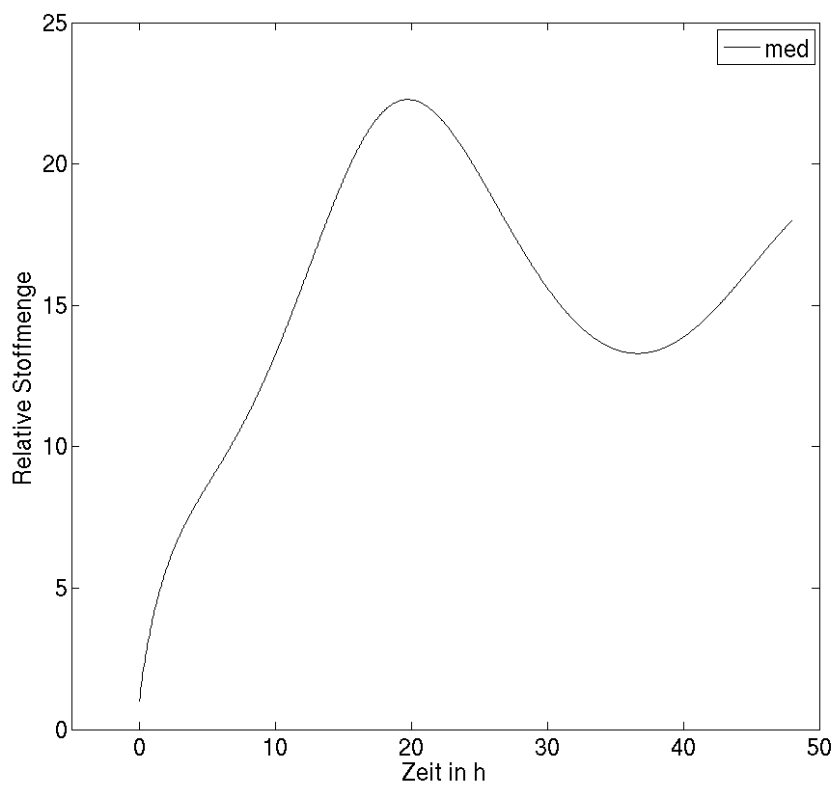


Abbildung 6.3: Ergänzender Graph zu Abbildung 6.2. Aufgrund der unterschiedlichen Skala ist die Lösungstrajektorie des *med* separat dargestellt.

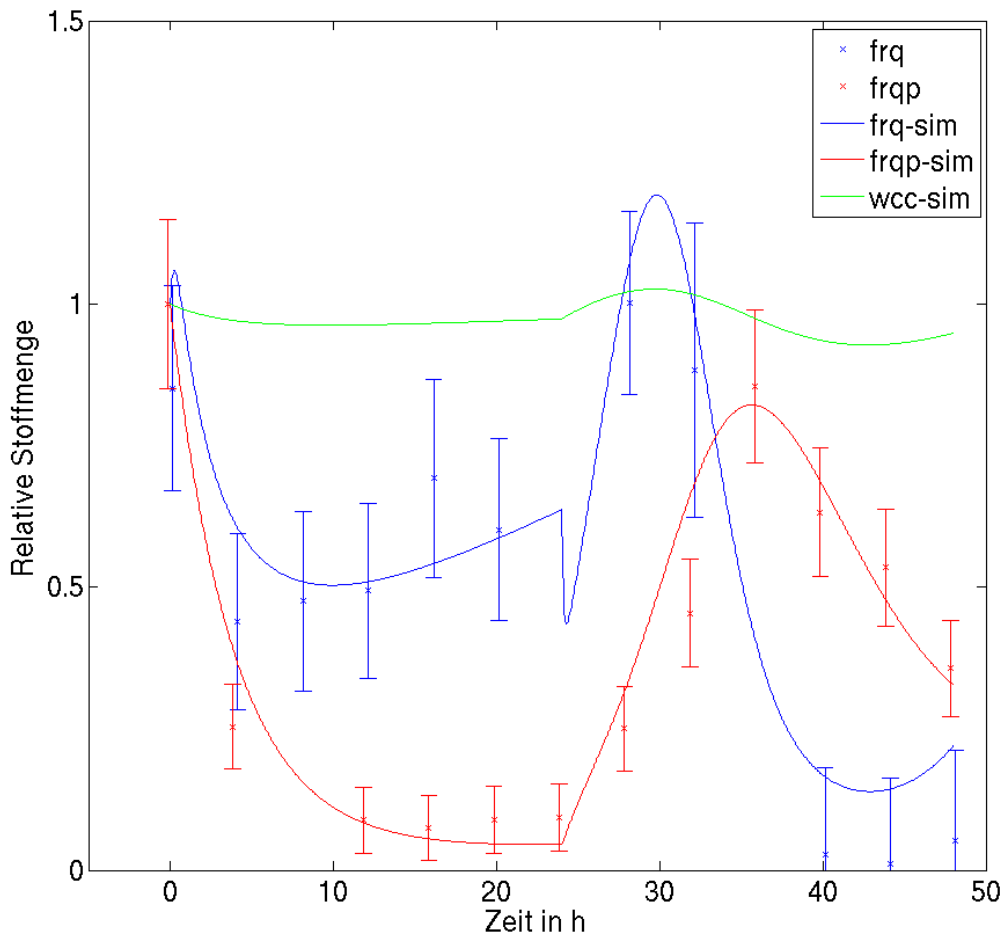
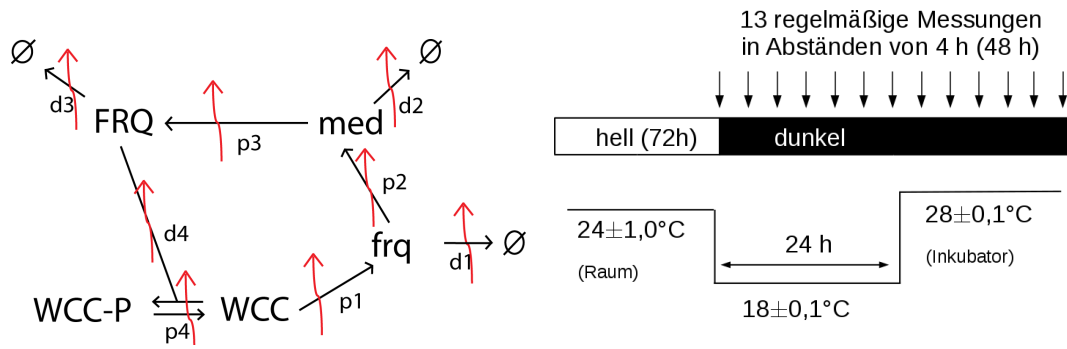


Abbildung 6.4: Simulationen mit dem vierstufigen und temperatursensitiven Modell zum Versuchsablauf mit konstanter Temperatur im Vergleich mit den Messreihen CDE18 (mRNA) und CDE08 (Protein). Die Lösungstrajektorien geben die Messreihen zutreffend wieder. Auffällig ist der über etwa eine Stunde verlaufende Haken in der *frq*-Menge unmittelbar nach dem Temperaturanstieg bei 24 Stunden. Der zunächst starke Abfall deutet auf eine hohe Temperatursensitivität der Degradationsrate d_1 hin. Eine Betrachtung des Verlauf von *med* in Abbildung 6.5 zeigt einen zeitgleichen Anstieg. Dies deutet darauf hin, dass der Temperaturanstieg auf die Umwandlungsrate von *frq* in *med* wirkt. Bereits nach etwa einer halben Stunde kehrt sich jedoch die Änderung der *frq*-Menge in eine starke Zunahme um, welche dann für einige Stunden anhält. Diese Umkehrung wird offenbar durch den zwischenzeitlichen Anstieg in den *frqp*- und *wcc*-Mengen ausgelöst, der Anstieg in der *frq*-Menge ist folglich ein Rückkoppelungseffekt.

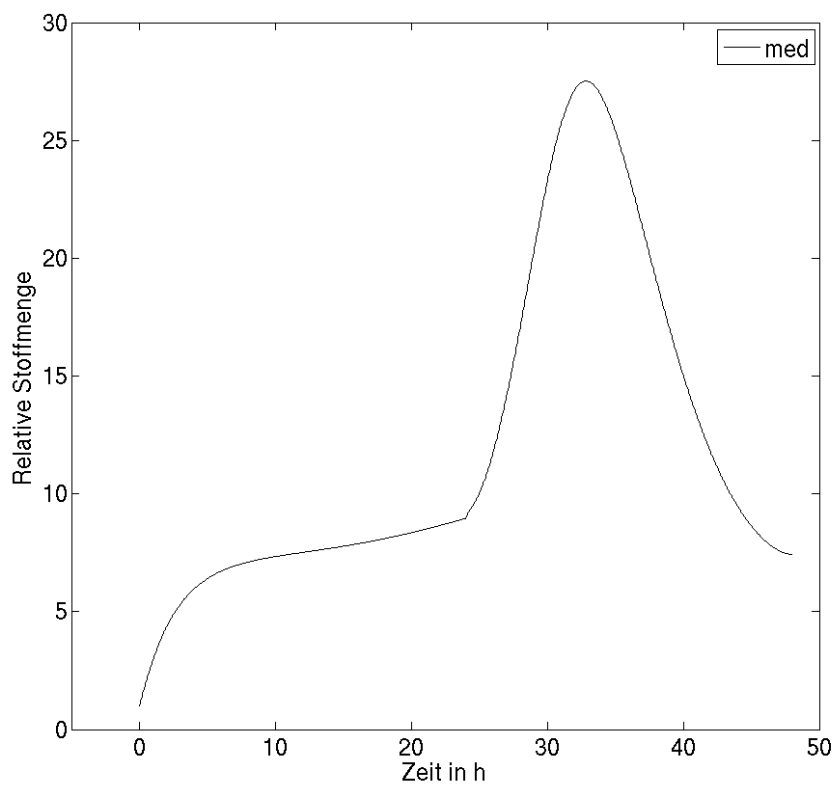


Abbildung 6.5: Ergänzender Graph zu Abbildung 6.4. Aufgrund der unterschiedlichen Skala ist die Lösungstrajektorie des *med* separat dargestellt.

hier auf der Frage, ob die Temperatur transkriptional oder post-transkriptional auf das Uhrsystem einwirkt. Zur Berechnung der Temperatursensitivitäten werden für alle Produktions- und Degradationsraten p_i und d_i die partiellen Ableitungen nach der Temperatur zum Zeitpunkt $t = 24$ h berechnet. Die partiellen Ableitungen der Änderungsraten f_i ergeben sich dann anhand der Differenz $p_i - d_i$.

$$\begin{aligned}
\frac{\partial p1(t = 24)}{\partial T} &= k13 \cdot \frac{wcc^{k12}(t = 24)}{k10 + wcc^{k12}(t = 24)} \\
\frac{\partial p2(t = 24)}{\partial T} &= k15 \cdot frq(t = 24) \\
\frac{\partial p3(t = 24)}{\partial T} &= k17 \cdot med(t = 24) \\
\frac{\partial p4(t = 24)}{\partial T} &= k19 \cdot (k11 - wcc(t = 24)) \\
\frac{\partial d1(t = 24)}{\partial T} &= k21 \cdot frq(t = 24) + k15 \cdot frq(t = 24) \\
\frac{\partial d2(t = 24)}{\partial T} &= k23 \cdot med(t = 24) \\
\frac{\partial d3(t = 24)}{\partial T} &= k25 \cdot frqp(t = 24) \\
\frac{\partial d4(t = 24)}{\partial T} &= k27 \cdot frqp(t = 24) \cdot wcc(t = 24)
\end{aligned}$$

Abbildung 6.6 zeigt die Sensitivität der Änderungsraten insgesamt sowie der Produktions- und Degradationsraten separat nach der Temperatur. Auffällig ist dabei, dass insbesondere die Degradationsrate $d1$ des frq sowie die Produktionsrate $p2$ des med eine besonders hohe Temperatursensitivität besitzen. Dadurch ergeben sich für die Änderungsraten insgesamt im Fall von frq eine starke, negative Sensitivität und im Fall von med eine starke positive Sensitivität. Festzuhalten ist desweiteren, dass auch die Produktionsrate $p1$ von frq im Vergleich zu den Produktions- und Degradationsraten von $frqp$ und wcc sehr hoch ist. Die Produktionsrate $p2$ von med ist einem post-transkriptionalen Mechanismus zuzuordnen, da im Rahmen der Parameterschätzung die Messdaten der frq -mRNA lediglich mit der Zustandsvariablen frq und nicht mit med verglichen wurden. Die zweckmäßige Interpretation des med ist dabei wohl eher in einer Eigenschaft des frq als in einer chemischen Identität zu finden. So könnte der Zustand med einen Konformationszustand darstellen, der im Sinne einer potentiellen Energie die Information über den Temperaturanstieg speichert und darüber dann langsam eine Steigerung der $frqp$ -Produktion bewirkt. Die Temperatursensitivität der Produktionsrate $p1$ von frq hat dabei eine wesentliche Funktion zur Temperaturkompensation, denn ohne eine gleichzeitige Steigerung der Produktionsrate würde die unmittelbare Abnahme der frq -Menge über den Rückkoppelungsmechanismus nicht in einen Anstieg umgekehrt werden können. Die Ergebnisse dieser Temperaturanalyse unterstützen also den in der Literatur angenommenen post-transkriptionalen Mechanismus der Temperaturwirkung, sie deuten jedoch gleichzeitig auch auf eine transkriptionelle Schnittstelle zur Temperaturkompensation hin.

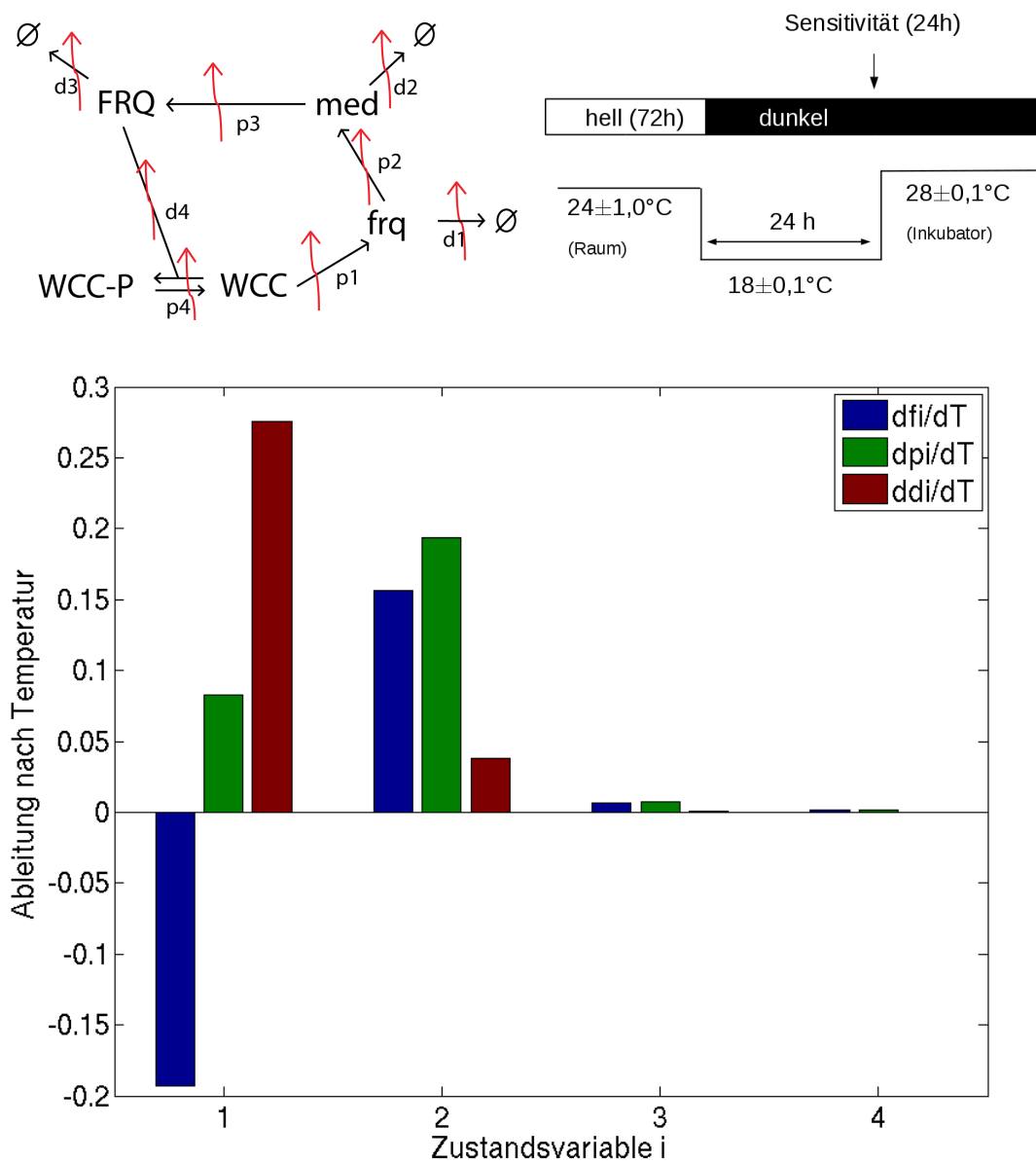


Abbildung 6.6: Sensitivitätsanalyse der Änderungsraten nach der Temperatur. Die Temperatursensitivität berechnet sich anhand der partiellen Ableitungen der Produktions- und Degradationsraten nach der Temperatur: $\partial p_i/\partial T$ und $\partial d_i/\partial T$. Die Temperatursensitivität $\partial f_i/\partial T$ der gesamten Änderungsrate f_i berechnet sich dann anhand der Differenz $p_i - d_i$. Das Diagramm zeigt die hohen Temperatursensitivitäten sowohl in der Degradationsrate d_1 von frq wie in der Produktionsrate p_2 von med . Dies legt einen post-transkriptionalen Wirkungsmechanismus der Temperatur auf das Verhalten des Uhrsystems nahe. Etwas niedriger, aber dennoch auffallend groß, ist die Produktionsrate p_1 von frq . Die Temperatursensitivität in dieser Reaktion dürfte für den Mechanismus der Temperaturkompensation entscheidend sein.

Diskussion und Ausblick

7.1 Rückschlüsse auf die biochemischen Reaktionsmechanismen

Der Schwerpunkt in dieser Arbeit liegt auf der Analyse des transienten Verhaltens der *frq*-mRNA- sowie der FRQ-Proteinmenge nach einem Temperaturanstieg. Zwar wurden bereits biochemische Untersuchungen zum Verhalten des Uhrsystems, insbesondere auch dessen Fähigkeit zur Temperaturkompensation, sowohl bei gleichbleibend unterschiedlichen Temperaturen wie auch unmittelbar nach einer Temperaturänderung mit geringerer Messauflösung durchgeführt [9–13], die numerischen Analysen bezogen sich bisher jedoch immer nur auf das Verhalten unter konstanten Temperaturbedingungen. So konnte zwar gezeigt werden, dass das Goodwin-Modell durch die Zuordnung von Arrhenius-typischen Temperaturabhängigkeiten in allen einzelnen Reaktionskonstanten zum einen die Fähigkeit zur Temperaturkompensation besitzt und zum anderen das anhand von Messungen untersuchte Verhalten unter gleichbleibend unterschiedlichen Temperaturbedingungen grundlegend wiedergibt [14, 15, 75], ein Vergleich mit Messungen des transienten Verhaltens direkt nach einer Temperaturveränderung wurde jedoch noch nicht durchgeführt. Die hier dargestellte numerische Simulation des Verhaltens der gemessenen *frq*-mRNA- und der FRQ-Proteinmengen bei einem Temperaturanstieg von 18 auf 28°C haben gezeigt, dass das Goodwinmodell auch mit temperatursensitiven Reaktionskonstanten nicht zur Beschreibung unter diesem Versuchsverlauf ausreicht. Die Einführung einer Variablen zwischen der Transkription und der Translation konnte dem Differentialgleichungsmodell jedoch die Fähigkeit verleihen, die Messdaten im Rahmen der geschätzten Messfehler adäquat zu simulieren. Diese Zwischenvariable hat dabei insbesondere eine zeitlich verzögernde Funktion.

Unter diesem Gesichtspunkt eröffnet das in dieser Arbeit eingeführte Modell einen neuen Betrachtungswinkel, um die Temperatursensitivität der einzelnen Reaktionen innerhalb der negativen Rückkoppelungsschleife zu bemessen. Durch die Sensitivitätsanalyse konnte bestätigt werden, dass die Erhöhung der Temperatur primär auf der post-transkriptionalen Ebene wirkt und von dort innerhalb von weniger als einer Stunde indirekt über die negative Rückkoppelungsschleife einen Anstieg in der *frq*-mRNA-Menge verursacht. Aufgrund des Rückkoppelungseffektes postuliert dieses Modell jedoch auch eine Temperatursensitivität im Transkriptionsprozess. Diese Eigenschaft würde mit den Simulationen auf der Basis des temperaturabhängigen Goodwin-Modells zur Modellierung der Temperaturkompensation in Einklang stehen [14], denn auch dort wurde eine Vielzahl von temperatursensitiven Reaktionen gefordert. Eine Temperatursensitivität in der FRQ-Protein-Degradationsgeschwindigkeit konnte dagegen nicht gefunden werden [15].

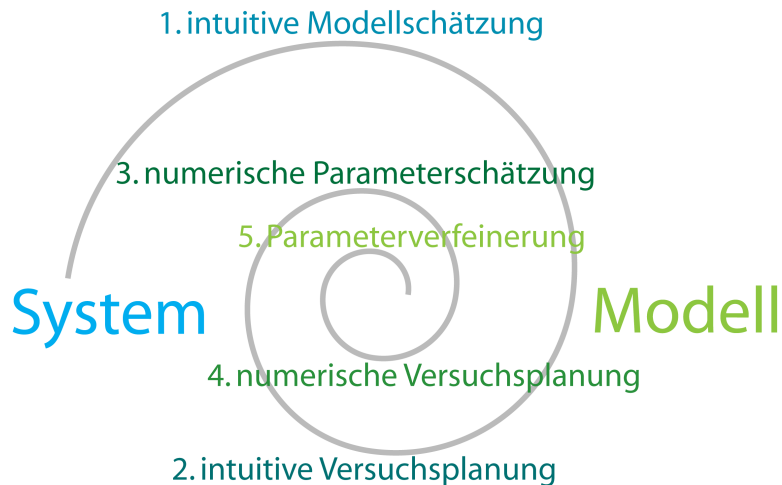


Abbildung 7.1: Abstrakte Illustration der zwischen experimenteller und theoretischer Analyse wechselseitigen Modellentwicklung und der potentiellen Rolle der optimalen Versuchsplanung. Zu Beginn dieser Arbeit wurde aufgrund erster Erfahrungen ein initiales Modell erstellt, welches im nächsten Schritt zur intuitiven Planung eines Experiments half. Anhand der daraus gewonnenen Daten (Schritt 3) konnte dann zur Verbesserung des Modells eine Numerik-basierte Parameterschätzung durchgeführt werden. Die optimale Versuchsplanung kann diese Spirale nun dadurch verlängern, indem sie bei der Auswahl optimaler Experimente für die nachfolgende Parameterschätzung hilft (Schritte 4 und 5). In diesem Sinn stellt die Numerik-basierte Versuchsplanung das Bindeglied zwischen Modellierung und Messung in der zur numerischen Parameterschätzung entgegengesetzten Richtung dar.

7.2 Möglichkeit der numerischen Versuchsplanung zur Modellverfeinerung

Die Ergebnisse der Modell-basierten Sensitivitätsanalyse hinsichtlich der Temperatur hängen in dieser Arbeit von der Zuverlässigkeit des Modells und dabei insbesondere der Konfidenz der geschätzten Parameter ab. Die Qualität des Modells hängt wiederum wesentlich von den zur Verfügung stehenden Messdaten ab. Es liegt nahe zu fragen, ob eine Messreihe unter einem anderen Temperaturverlauf zur Schätzung der für die Sensitivitätsanalyse wichtigen Parameter günstiger wäre. Mit der sogenannten Optimierungs-basierten oder kurz Optimalen Versuchsplanung können anhand eines vorläufigen Differentialgleichungsmodells ein Temperaturszenario sowie geeignete Messzeitpunkte derartig berechnet werden, dass eine anschließende Parameterschätzung zu einer möglichst hohen Konfidenz der Parameter führt [83,95]. In diesem Sinne wäre es interessant, die Schätzung der Temperatursensitivitäten der Translation und Transkription zu verfeinern. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben jedoch gezeigt, dass eine neue Messreihe unter andersartigen Versuchsbedingungen eine Differenzierung der Modellstruktur insgesamt erfordern kann. Es bleibt dann offen, ob die anhand des vorläufigen Modells berechneten Messbedingungen auch für das neue Modell günstig beziehungsweise optimal sind. Sollte sich die Modellstruktur in diesem Sinne jedoch nur unerheblich ändern, dann wäre die optimale Versuchsplanung als Gegenrichtung zur Parameterschätzung eine bedeutende Hilfe bei der Modellverbesserung (siehe Abbildung 7.1).

Literaturverzeichnis

- [1] M. Kollmann, L. Lovdok, K. Bartholome, J. Timmer, and V. Sourjik. Design principles of a bacterial signalling network. *Nature*, 438(7067):504–7, 2005. [1](#)
- [2] L. Neumann, C. Pforr, J. Beaudouin, A. Pappa, N. Fricker, P. H. Krammer, I. N. Lavrik, and R. Eils. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Mol. Sys. Biol.*, 6(352), 2010. [1](#)
- [3] V. Becker, M. Schilling, J. Bachmann, U. Baumann, A. Raue, T. Maiwald, J. Timmer, and U. Klingmüller. Covering a broad dynamic range: information processing at the erythropoietin receptor. *Science*, 328(5984):1404–8, 2010. [1](#)
- [4] N. Nandagopal and M. B. Elowitz. Synthetic biology: integrated gene circuits. *Science*, 333(6047):1244–8, 2011. [1](#)
- [5] C. L. Baker, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. The circadian clock of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Review*, 36(1):95–110, 2012. [1](#), [8](#), [9](#)
- [6] M. Brunner and K. Kaldi. Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, 68(2):255–62, 2008. [1](#), [6](#)
- [7] J. B. Hogenesch and H. R. Ueda. Understanding systems-level properties: timely stories from the study of clocks. *Nature Review Genetics*, 12(6):407–16, 2011. [1](#)
- [8] Y. Liu, N. Y. Garceau, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. Thermally regulated translational control of FRQ mediates aspects of temperature responses in the *Neurospora* circadian clock. *Cell*, 89(3):477–86, 1997. [2](#), [10](#), [71](#)
- [9] Y. Liu, M. Meroow, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science*, 281(5378):825–9, 1998. [2](#), [9](#), [10](#), [53](#), [54](#), [55](#), [71](#), [82](#)
- [10] H. V. Colot, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. Temperature-modulated alternative splicing and promoter use in the circadian clock gene frequency. *Mol. Biol. Cell*, 16(12):5563–71, 2005. [2](#), [8](#), [9](#), [10](#), [71](#), [82](#)
- [11] A. C. R. Diernfellner, T. Schafmeier, M. W. Meroow, and M. Brunner. Molecular mechanism of temperature sensing by the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Genes Dev.*, 19:1968–1973, 2005. [2](#), [8](#), [82](#)

- [12] A. Diernfellner, H. V. Colot, O. Dintsis, J. J. Loros, J. C. Dunlap, and M. Brunner. Long and short isoforms of *Neurospora* clock protein FRQ support temperature-compensated circadian rhythms. *FEBS Lett.*, 581:5759–5764, 2007. [2](#), [8](#), [9](#), [10](#), [71](#), [82](#)
- [13] A. Mehra, M. Shi, C. L. Baker, H. V. Colot, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. A role for casein kinase 2 in the mechanism underlying circadian temperature compensation. *Cell*, 137(4):749–60, 2009. [2](#), [10](#), [82](#)
- [14] P. Ruoff, M. Zakhartsev, and H. V. Westerhoff. Temperature compensation through systems biology. *FEBS J.*, 274(4):940–50, 2007. [2](#), [10](#), [82](#)
- [15] P. Ruoff, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. The relationship between FRQ-protein stability and temperature compensation in the *Neurospora* circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(49):17681–6, 2005. [2](#), [10](#), [82](#)
- [16] D. D. Perkins. *Neurospora*: The organism behind the molecular revolution. *Genetics*, 130:687–701, 1992. [3](#)
- [17] K. Esser, J. P. Latgé, R. Calderone, R. Fischer, U. Kües, S. Pöggeler, M. Nowrousian, and U. Kück. *The Mycota, Vol. I: Growth, Differentiation, and Sexuality (Kapitel 5, 14, 16)*. Springer, 2nd edition, 2006. [3](#)
- [18] K. Esser, Gary J. Samuels, and M. Blackwell. *The Mycota, Vol. VII: Systematics and Evolution (Kapitel 11)*. Springer, 2nd edition, 2006. [3](#)
- [19] F.-R. Lauter. Molecular genetics of fungal photo biology. *J. Genet.*, 75:375–386, 1996. [4](#)
- [20] E. Klemm and H. Ninnemann. Correlation between absorbance changes and a physiological response induced by blue light in *Neurospora crassa*. *Photochem. Photobiol.*, 28:227–230, 1978. [4](#)
- [21] R. W. Siegel, S. S. Matsuyama, and J. C. Urey. Induced macroconidia formation in *Neurospora crassa*. *Experientia*, 24:1179–1181, 1968. [4](#)
- [22] M. L. Springer and C. Yanofsky. A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.*, 3:559–571, 1989. [4](#)
- [23] R. Maheschwari. Microconidia of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetic Biol.*, 26:1–18, 1999. [4](#)
- [24] R. Guignard, F. Grange, and G. Turian. Microcycle conidiation induced by partial nitrogen deprivation in *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.*, 30:1210–1215, 1984. [4](#)
- [25] M. R. Sargent and W. R. Briggs. The effect of light on a circadian rhythm of conidiation in *Neurospora crassa*. *Plant Phys.*, 42:1504–1510, 1967. [4](#)
- [26] R. W. Harding and W. J. Shropshire. Photocontrol of carotenoid biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Phys.*, 31:217–238, 1980. [4](#)

- [27] H. Nakashima. A liquid culture system for the biochemical analysis of the circadian clock of *Neurospora*. *Plant Cell Physiol.*, 22:231–8, 1981. [4](#)
- [28] J. Perlman, H. Nakashima, and J. Feldman. Assay and characteristics of circadian rhythmicity in liquid cultures of *Neurospora crassa*. *Plant Phys.*, 68(2):255–62, 1981. [4](#)
- [29] J. J. Loros, S. A. Denome, and J. C. Dunlap. Molecular cloning of genes under the control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science*, 243:385–8, 1989. [4](#)
- [30] Y. Liu, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. Alternative initiation of translation and time specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein frequency. *Cell*, 89:469–476, 1997. [4](#)
- [31] W. R. Briggs. The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors. *J. Biomed. Sci.*, 14(4):499–504, 2007. [6](#)
- [32] P. Cheng, Q. He, Y. Yang, L. Wang, and Y. Liu. Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 100(10):5938–43, 2003. [6](#), [7](#)
- [33] K. M. Smith, G. Sancar, R. Dekhang, C. M. Sullivan, S. Li, A. G. Tag, C. Sancar, E. L. Bredeweg, H. D. Priest, R. F. McCormick, T. L. Thomas, J. C. Carrington, J. R. Stajich, D. Bell-Pedersen, M. Brunner, and M. Freitag. Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for *Neurospora* white collar complex. *Eukaryot. Cell*, 9(10):1549–56, 2010. [6](#), [7](#), [11](#)
- [34] Q. He and Y. Liu. Molecular mechanism of light responses in *Neurospora*: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev.*, 19(23):2888–99, 2005. [6](#), [7](#)
- [35] C. H. Chen, C. S. Ringelberg, R. H. Gross, J. C. Dunlap, and J. J. Loros. Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J.*, 28(8):1029–42, 2009. [6](#)
- [36] T. Schafmeier, A. Haase, K. Kaldi, J. Scholz, M. Fuchs, and M. Brunner. Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell*, 122(2):235–46, 2005. [6](#), [9](#)
- [37] S. K. Crosthwaite, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. *Cell*, 81(7):1003–12, 1995. [7](#)
- [38] T. Schafmeier and A. C. Diernfellner. Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS Lett.*, 585(10):1467–73, 2011. [7](#)
- [39] E. Gin, A. C. Diernfellner, M. Brunner, and T. Höfer. The *Neurospora* photoreceptor VIVID exerts negative and positive control on light sensing to achieve adaptation. *Mol. Sys. Biol.*, 9(667), 2013. [7](#)

- [40] B. D. Zoltowski, C. Schwerdtfeger, J. Widom, J. J. Loros, A. M. Bilwes, J. C. Dunlap, and B. R. Crane. Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science*, 316(5827):1054–7, 2007. [7](#)
- [41] J. T. Kennis, I. H. van Stokkum, S. Crosson, M. Gauden, K. Moffat, and R. van Grondelle. The LOV2 domain of phototropin: a reversible photochromic switch. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(14):4512–3, 2004. [7](#)
- [42] B. D. Zoltowski, B. Vaccaro, and B. R. Crane. Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor. *Nat. Chem. Biol.*, 5(11):827–34, 2009. [7](#)
- [43] J. T. Kennis, S. Crosson, M. Gauden, I. H. van Stokkum, K. Moffat K, and R. van Grondelle. Primary reactions of the LOV2 domain of phototropin, a plant blue-light photoreceptor. *Biochemistry*, 42(12):3385–92, 2003. [7](#)
- [44] S. Crosson, S. Rajagopal, and K. Moffat. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*, 42(1):2–10, 2003. [7](#)
- [45] M. Gauden, S. Yeremenko, W. Laan, I. H. van Stokkum, J. A. Ihalainen, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf, and J. T. Kennis. Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry*, 44(10):3653–62, 2005. [7](#)
- [46] E. Malzahn, S. Ciprianidis, K. Kaldi, T. Schafmeier, and M. Brunner. Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell*, 142(5):762–72, 2010. [7](#)
- [47] B. D. Zoltowski and B. R. Crane. Light activation of the LOV protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry*, 47(27):7012–9, 2008. [7](#)
- [48] C. H. Chen, B. S. DeMay, A. S. Gladfelter, J. C. Dunlap, and J. J. Loros. Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(38):16715–20, 2010. [7](#)
- [49] P. Cheng, Y. Yang, C. Heintzen, and Y. Liu. Coiled-coil domain-mediated FRQ-FRQ interaction is essential for its circadian clock function in *Neurospora*. *EMBO J.*, 20(1-2):101–8, 2001. [8](#)
- [50] C. Luo, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *EMBO J.*, 17(5):1228–35, 1998. [8](#), [9](#)
- [51] P. Cheng, Q. He, Q. He, L. Wang, and Y. Liu. Regulation of the *Neurospora* circadian clock by an RNA helicase. *Genes Dev.*, 19(2):234–41, 2005. [8](#), [9](#)
- [52] J. Guo, P. Cheng, and Y. Liu. Functional significance of FRH in regulating the phosphorylation and stability of *Neurospora* circadian clock protein frq. *J. Biol. Chem.*, 285(15):11508–15, 2010. [8](#), [9](#)

- [53] C. L. Baker A. N. Kettenbach J. J. Loros S. A. Gerber J. C. Dunlap. Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the *Neurospora* circadian clock. *Mol. Cell*, 34(3):354–63, 2009. [8](#)
- [54] C. L. Baker J. C. Dunlap. Circadian rhythms: phosphorylating the clock. *Cell Cycle*, 9(2):231–2, 2010. [8](#)
- [55] G. Huang, S. Chen, S. Li, J. Cha, C. Long, L. Li, Q. He, and Y. Liu. Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop. *Genes Dev.*, 21(24):3283–95, 2007. [9](#)
- [56] Y. Yang, Q. He, P. Cheng, P. Wrage, O. Yarden, and Y. Liu. Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev.*, 18(3):255–60, 2004. [9](#)
- [57] C. Querfurth, A. C. Diernfellner, E. Gin, E. Malzahn, T. Höfer, and M. Brunner. Circadian conformational change of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY triggered by clustered hyperphosphorylation of a basic domain. *Mol. Cell*, 43(5):713–22, 2011. [9](#)
- [58] A. C. Diernfellner and T. Schafmeier. Phosphorylations: Making the *Neurospora crassa* circadian clock tick. *FEBS Lett.*, 585(10):1461–6, 2011. [9](#)
- [59] B. D. Aronson, K. A. Johnson, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science*, 263(5153):1578–84, 1994. [9](#)
- [60] G. Sancar, C. Sancar, and M. Brunner. Metabolic compensation of the *Neurospora* clock by a glucose-dependent feedback of the circadian repressor CSP1 on the core oscillator. *Genes Dev.*, 26(21):2435–42, 2012. [9](#), [11](#)
- [61] P. Cheng, Y. Yang, and Y. Liu. Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(13):7408–13, 2001. [9](#)
- [62] K. Lee, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science*, 289(5476):107–10, 2000. [9](#), [11](#)
- [63] T. Schafmeier, K. Kaldi, A. Diernfellner, C. Mohr, and M. Brunner. Phosphorylation-dependent maturation of *neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes Dev.*, 20(3):297–306, 2006. [9](#)
- [64] T. Schafmeier, A. Diernfellner, A. Schäfer, O. Dintsis, A. Neiss, and M. Brunner. Circadian activity and abundance rhythms of the *Neurospora* clock transcription factor WCC associated with rapid nucleo-cytoplasmic shuttling. *Genes Dev.*, 22(24):3397–402, 2008. [9](#)
- [65] A. M. Pogue, N. Price-Lloyd, D. Bell-Pedersen, C. Heintzen, J. J. Loros, and J. C. Dunlap. Assignment of an essential role for the *Neurospora* frequency gene in circadian entrainment to temperature cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(6):2210–5, 2005. [10](#)

- [66] Y. Y. Tseng, S. M. Hunt, C. Heintzen, S. K. Crosthwaite, and J. M. Schwartz. Comprehensive modelling of the *Neurospora* circadian clock and its temperature compensation. *PLoS Comput. Biol.*, 8(3:e1002437), 2012. [11](#)
- [67] G. Sancar, C. Sancar, B. Brügger, N. Ha, T. Sachsenheimer, E. Gin, S. Wdowik, I. Lohmann, F. Wieland, T. Höfer, A. Diernfellner, and M. Brunner. A global circadian repressor controls antiphase expression of metabolic genes in *Neurospora*. *Mol. Cell*, 44(5):687–97, 2011. [11](#)
- [68] A. Mahajan, C. Yuan, H. Lee, E. S. Chen, P. Y. Wu, and M. D. Tsai. Structure and function of the phosphothreonine-specific FHA domain. *Science Signaling*, 1(51:re12), 2008. [11](#)
- [69] A. M. Pogueiro, Q. Liu, C. L. Baker, J. C. Dunlap, and J. J. Loros. The *Neurospora* checkpoint kinase 2: a regulatory link between the circadian and cell cycles. *Science*, 313(5787):644–9, 2006. [11](#), [12](#)
- [70] A. Tafvizi, L. A. Mirny, and A. M. van Oijen. Dancing on DNA: kinetic aspects of search processes on DNA. *Chem. Phys. Chem.*, 12(8):1481–9, 2011. [13](#)
- [71] P. W. Atkins and J. De Paula. *Physical Chemistry*. Oxford University Press, 9th edition, 2010. [13](#)
- [72] G. Wedler und H.-J. Freund. *Lehrbuch der physikalische Chemie*. Wiley-VCH, 6. Auflage, 2012. [13](#)
- [73] B. C. Goodwin. Oscillatory behavior in enzymatic control processes. *Advances in Enzyme Regulation (Pergamon Press)*, 3:425–438, 1965. [16](#)
- [74] J. S. Griffith. Mathematics of cellular control processes: negative feedback to one gene. *J. Theor. Biol.*, 20:202–208, 1968. [16](#)
- [75] P. Ruoff and L. Rensing. The temperature-compensated goodwin oscillator simulates many circadian clock properties. *J. Theor. Biol.*, 179:275–285, 1996. [16](#), [82](#)
- [76] W. Walter. *Gewöhnliche Differentialgleichungen*. Springer-Verlag, 7. Auflage, 2000. [17](#), [18](#)
- [77] O. Forster. *Analysis 2 - Gewöhnliche Differentialgleichungen*. Vieweg-Verlag, 5. Auflage, 1993. [17](#), [18](#)
- [78] H. Amann. *Gewöhnliche Differentialgleichungen*. de Gruyter-Verlag, Berlin, 2. Auflage, 1995. [17](#)
- [79] H. Amann und J. Escher. *Analysis III*. Birkhäuser-Verlag Basel, 2. Auflage, 2008. [17](#), [35](#)
- [80] R. Rannacher. *Numerische Mathematik 1*. Universität Heidelberg, Vorlesungsskript, 2012. [18](#), [19](#)
- [81] H. G. Bock. *Numerische Mathematik 1*. Universität Heidelberg, Vorlesungsmitschrift, 2004. [18](#), [19](#)

- [82] R. W. Freund und R. H. Hoppe. *Numerische Mathematik 1*. Springer-Verlag Berlin/Heidelberg, 2007 (10. Auflage). [18](#), [19](#), [20](#)
- [83] S. Körkel. *Numerische Methoden für optimale Versuchsplanungsprobleme bei nicht-linearen DAE-Modellen*. Universität Heidelberg, Dissertation, 2002. [19](#), [22](#), [25](#), [26](#), [83](#)
- [84] J. Nocedal and S. J. Wright. *Numerical Optimization*. Springer-Verlag New York, 1st edition, 1999. [20](#), [21](#), [22](#), [23](#)
- [85] H. G. Bock. Randwertproblemmethoden zur Parameteridentifizierung in Systemen nicht-linearer Differentialgleichungen. *Bonner Mathem. Schriften (Dissertation)*, 183, 1987. [22](#), [23](#), [24](#), [25](#), [26](#)
- [86] J. P. Schlöder. Numerische Methoden zur Behandlung hochdimensionaler Aufgaben der Parameteridentifizierung. *Bonner Mathem. Schriften (Dissertation)*, 187, 1988. [22](#), [23](#), [24](#), [25](#)
- [87] I. Bauer. *Numerische Verfahren zur Lösung von Anfangswertaufgaben und zur Generierung von ersten und zweiten Ableitungen mit Anwendungen bei Optimierungsaufgaben in Chemie und Verfahrenstechnik*. Universität Heidelberg, Dissertation, 2001. [22](#)
- [88] H. G. Bock, S. Körkel, and J. P. Schlöder. *Parameter Estimation and Optimum Experimental Design for Nonlinear Differential Equation Models*, volume 4 (Model Based Parameter Estimation) of *Contributions in Mathematical and Computational Sciences*. Springer-Verlag, 2013. [23](#)
- [89] J. Huggett, K. Dheda, S. Bustin, and A. Zumla. Real-time RT PCR normalisation: strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6:279–284, 2005. [32](#)
- [90] M. Schilling, A. C. Pfeifer, S. Bohl, and U. Klingmüller. Standardizing experimental protocols. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19(4):354–9, 2008. [32](#)
- [91] M. Schilling, T. Maiwald, S. Bohl, M. Kollmann, C. Kreutz, J. Timmer, and U. Klingmüller. Computational processing and error reduction strategies for standardized quantitative data in biological networks. *FEBS Journal*, 272(24):6400–11, 2005. [32](#)
- [92] N. M. Downi and R. W. Heath. *Basic Statistical Methods*. Harper and Row Ltd., 2nd edition, 1965. [37](#)
- [93] U. Krengel. *Einführung in die Wahrscheinlichkeitstheorie und Statistik*. Vieweg-Verlag, 8. Auflage, 2005. [43](#)
- [94] D. T. Gillespie. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 81(25):2340–2361, 1977. [44](#)
- [95] S. Bandara, J. P. Schlöder, R. Eils, H. G. Bock, and T. Meyer. Optimal experimental design for parameter estimation of a cell signaling model. *PLoS Comput. Biol.*, 5(11), 2009. [83](#)

Anhang 1

8.1 Analyse technischer Rauschursachen während der mRNA-Messung

8.1.1 DNA- und RNA-Degradation

Das Einfrieren und das Auftauen von in Wasser gelöster DNA bewirkt eine teilweise Degradation der DNA. Diese Tatsache verdeutlicht eine quantitative PCR-Messreihe von DNA, die in ansteigender Anzahl eingefroren und wieder aufgetaut wurde. Als PCR-Substrat wird dabei DNA verwendet, die zuvor in einer identischen PCR-Reaktion hergestellt, aufgereinigt und verdünnt wurde. Die PCR-Bedingungen entsprechen dabei denen des in Kapitel 4 beschriebenen Protokolls. Abbildung 8.1 zeigt die Abnahme der in der PCR-Reaktion amplifizierten DNA-Menge mit steigender Anzahl von Gefrier/Auftau-Zyklen. Es kann angenommen werden, dass die Degradation auch im Fall von RNA stattfindet. Bei der quantitativen mRNA-Messung ist es daher entscheidend, dass die zu messenden RNA-Proben möglichst selten und in jedem Fall immer gleich oft eingefroren werden.

8.1.2 Vergleich von DNA- und RNA-Verdünnungsreihen

Eine Verdünnungsreihe von DNA und Gesamt-RNA wird für das cDNA-/mRNA-Ziel *frq* mit quantitativer PCR beziehungsweise RT-PCR gemessen. Die cDNA wurde dabei aus einer vorigen PCR Reaktion mit identischen Primern gewonnen, aufgereinigt und verdünnt. Jede Verdünnung wurde dabei mit 24 (qPCR) beziehungsweise zwölf (qRT-PCR) technischen Replikaten gemessen. In Abbildung 8.2 sind auf der linken Seite die Verdünnungen auf einer logarithmischen Skala (Verdünnungsfaktor) gegen die PCR-Zykluszahl, die bis zum Erreichen des kritischen Schwellwertes von 0,1 erforderlich ist, aufgetragen. Auf der rechten Seite sind die Mittelwerte der Replikate jeweils einer Verdünnung aufgetragen. Wie man erkennen kann steigt im Fall der DNA die erforderliche Zykluszahl bis zum Erreichen des Schwellwertes linear mit dem Verdünnungsfaktor an, so dass sich durch exponentielle Transformation der PCR-Zykluszahl auf die relative DNA-Ausgangsmenge geschlossen werden kann. Dieses Verhalten liegt im Fall der Gesamt-RNA-Verdünnung nicht vor, da offenbar durch eine steigende Ausgangsmenge an Gesamt-RNA die Sättigung der reversen Transkriptase verstärkt wird. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass umgekehrt durch Veränderung der Menge reverser Transkriptase die reverse Transkriptionsgeschwindigkeit verändert wird und somit das Messergebnis der qRT-PCR von der eingesetzten Menge reverser Transkriptase abhängt. Da dieses Enzym in der qRT-PCR-Reaktion in einer Menge von etwa 5 μ l pipettiert wird, sind Abweichungen im Messergebnis aufgrund von Pipettierfehlern dieses Enzyms besonders kritisch. Der Gesamt-RNA-Standard hat unter anderem die Funktion diese Pipettierfehler zu normalisieren.

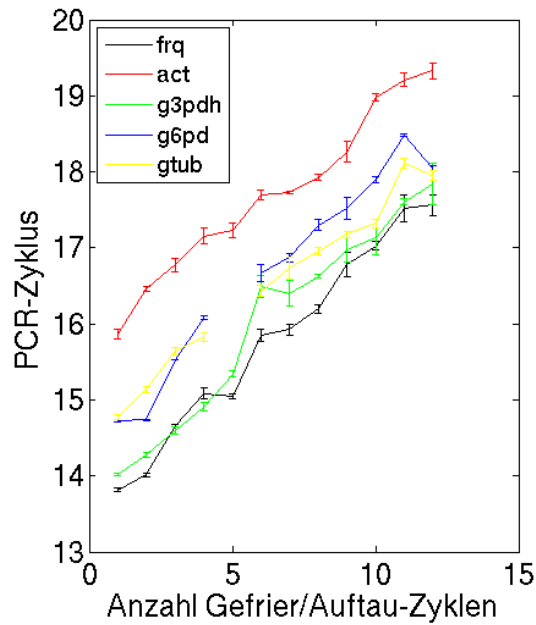


Abbildung 8.1: Degradation von DNA in Abhängigkeit von der Anzahl an Gefrier- und Auftauvorgängen. Das linke Bild zeigt den Anstieg der kritischen PCR-Zykluszahl bei steigenden Gefrier-/Auftauvorgängen. Das rechte Bild zeigt nach einer exponentiellen Transformation die relative DNA-Menge für *frq*.

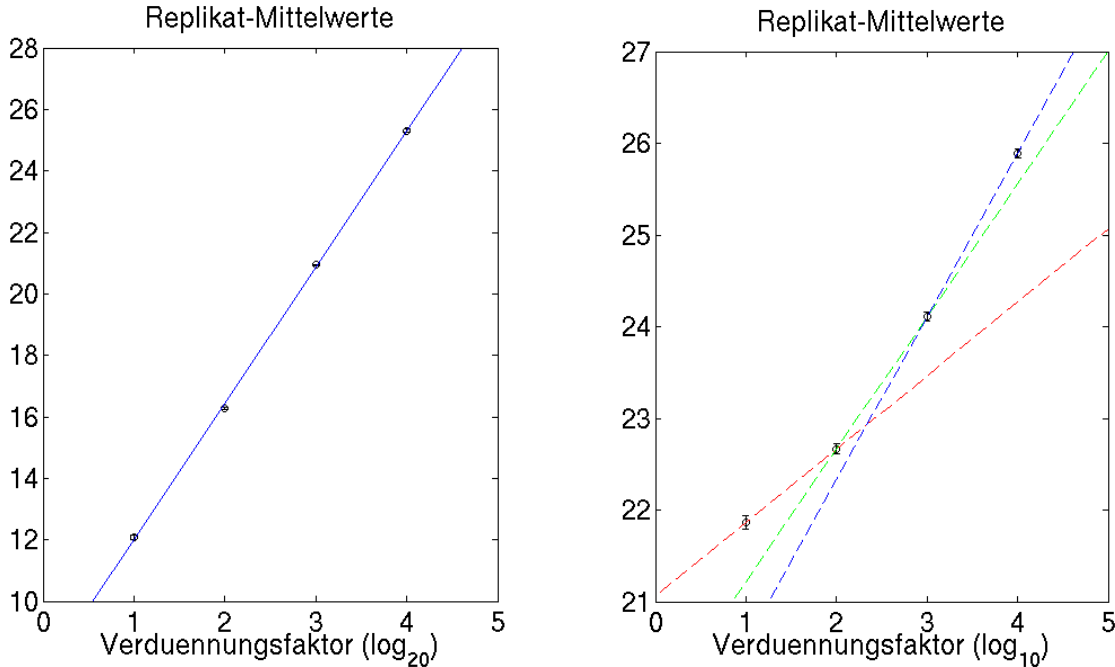


Abbildung 8.2: Verdünnungsreihe von cDNA und Gesamt-RNA. Linke Spalte: Darstellung der kritischen PCR-Zykluszahl der Einzelrepliate in Abhängigkeit vom Verdünnungsfaktor. Rechte Spalte: Darstellung der Replikatmittelwerte mit schrittweiser Interpolation. Die Änderungsrate der kritischen PCR-Zykluszahl nimmt mit steigender Verdünnung ab, was auf die Sättigung der reversen Transkriptionsreaktion bei niedriger Verdünnung schließen lässt.

Anhang 2

9.1 Geräte und Chemikalien

Geräte (1)		
Geräteart	Modell	Hersteller
Allgemein		
Licht- und konfokales Mikroskop	TCS SP5	Leica
Photospektrometer	Nanodrop 1000	peqlab
Schüttelinkubator	Multitron	Infors AG
Pipetten (0,1-1000 μ l)	Standard	Eppendorf
Handschuhe	aus Nitril	Freeform SE Emergo
UV-Dunkelkammer		Vilber Lourmat
Polypropylen-Gefäße	1,5-2,0 ml, RNase-frei	eppendorf
Tischzentrifuge (bis 2,0 ml)	Biofuge pico	Heraeus
Mikrofiltriertes Wasser		TKA-Genpure
Polypropylen-Gefäße	15-50 ml Falcon Tubes	BD Biosciences
Rotlichtlampe		Kaiser
Tischschüttelinkubator bis 2 ml	Thermomixer compact	eppendorf
Laborwaage	EW 600-2M	Kern
Magnetrührer	MR3001	Heidolph Instruments
Pipettierpumpe (bis 1 - 50 ml)	Pipetboy	Integra
Polypropylenpipetten (1 - 50 ml)		BD Biosciences
Filterpapier	rund	Sartorius
Erlenmeyerkolben	aus Borosilikat	VWR
Vakuumpumpe	Savant Speed Vac SC110	GMI
pH-Meter	766 calimatic	Knick
pH-Elektrode	SE 100	Knick

Geräte (2)

Geräteart	Modell	Hersteller
RNA-Analytik		
Pipetierroboter	Qiacube (Bj. 2008)	Qiagen
real-time PCR	step-one-plus	Applied Biosystems
Gelelektrophoresekammer	Mupid One	Advance
UV-Geldokumentation	Infinity	Vilber Lourmat
96er-PCR-Mikrotiterplatte	MicroAmp	Applied Biosystems
Deckfolien	optical adhesive covers (PCR)	Applied Biosystems
Zentrifuge (>2 ml)	Allegra 25R	Beckman Coulter
Zentrifugenrotor 96er-PCR-Platten		
Spritzennadel		Terumo
Mehrschrittpipette (bis 50 ml)	Multistream	Eppendorf
Mehrschrittpipettenspitzen	Combitips plus	Eppendorf
Filterspitzen	Tip One	Starlab
Protein-Analytik		
Chemilumineszenz-Kammer		Intas
dryblot-System	iblot	Invitrogen
SDS-PAGE-Kammer	Novex Mini Cell	Invitrogen
Stromtransformator	Power Pac HC	BIORAD

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ethanol (analytisch, HPLC rein)	Carl Roth GmbH
Isopropanol (analytisch, HPLC rein)	Carl Roth GmbH
Agarose	Biozym
Ethidiumbromid (1%)	Applichem
CaCl ₂	J. T. Baker
MgSO ₄	J. T. Baker
NH ₄ NO ₃	J. T. Baker
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich/Applichem
Na ₃ NH ₄	Carl Roth/Applichem
Arginin	Sigma-Aldrich/Applichem
ZnSO ₄	Applichem
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	Applichem
CuSO ₄	Applichem
MnSO ₄	Carl Roth GmbH
NaCl	J. T. Baker
Na ₂ EDTA	Carl Roth GmbH
Glycerin	Applichem
Hepes-KOH	Carl Roth GmbH
Sorbitol	Carl Roth GmbH
H ₃ BO ₃	Sigma-Aldrich
Na ₂ MoO ₄	Carl Roth GmbH
Tris	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure	J. T. Baker
Poinçeau S (0,1% in 5% Essigsäure)	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid	
Leupeptin	
Pepstatin	
Methanol	Merck
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Biochemische Reagenzien

Methode	Artikel	Hersteller
RNA-Analytik		
RNA Extraktion	RNeasy Plant Mini und shredder	Qiagen
qRT-PCR	QuantiTect Probe RT-PCR	Qiagen
RNase freies Wasser		MP Biomedicals LLC
RNA-Fragmentstandard	RiboRuler HighRange RNA Ladder	Fermentas
RNA Ladepuffer	2x RNA Loading Dye	Fermentas
Primer		Operon
Taqman-Sonden		Operon
Protein-Analytik		
SDS-PAGE-Fertiggele	NuPAGE Tris-Acetate Gel	Invitrogen
SDS-PAGE-Puffer	Novex Tris-Acetate SDS Running Buffer	Invitrogen
Nitrozellulosemembran	iBlot transfer stack, nitrocellulose	Invitrogen
Protein-Fragmentstandard	Novex sharp prestained protein standard	Invitrogen
Protein-Ladepuffer	5x Laemmli/NuPAGE LDS Sample Buffer	Invitrogen
frq-Primärantikörper	3G11	AG Brunner/BZH
Sekundärantikörper	goat-anti-mouse dylight 680 conjugated	Thermo Scientific
PBS-Puffer	10x Dubbecco's Pulver	Applichem
Block-Puffer	für Western Blot	Rockland
Chemilumineszenz Substrat	Super Signal West Pico	Thermo Scientific

Medien/Lösungen

Menge	Lösung/Chemikalie
Neurospora Minimalmedium	
1x	Vogels Medium N
2% (w/v)	Glucose
0,6% (w/v)	Arginin (HCl)
2% (/v)	Agar für Festmedium
50x Vogels (Vogel, 1964)	
123,5 g	Trinatriumcitrat
250 g	KH ₂ PO ₄
100 g	NH ₄ NO ₃
10 g	MgSO ₄
5 g	CaCl ₂
5 ml	Spurenelementelösung
2,5 ml	Biotin-Lösung
ad 1 l	H ₂ O
Biotin-Lösung	
0,1 mg/ml	Biotin
50 ml	Ethanol
ad 1l	H ₂ O

Lösungen/Puffer (1)

Menge	Lösung/Chemikalie
Spurenelemente	
5 g	Citrat
5 g	ZnSO ₄
1 g	(NH ₃) ₂ Fe(SO ₄) ₂
0,25 g	CuSO ₄
50 mg	MnSO ₄
50 mg	H ₃ BO ₃
50 mg	Na ₂ MoO ₄
ad 100 ml	H ₂ O
Proteinextraktionspuffer	
50 mM	HEPES-KOH (pH 7,4, NaOH)
140 mM	NaCl
5 mM	Na ₂ EDTA
10% (v/v)	Glycerin
1 mM	PMSF in 2-Propanol*
1 µg/ml	Leupeptin in H ₂ O*
1 µg/ml	Pepstatin in Formaldehyd*

*Zugabe unmittelbar vor Gebrauch

Lösungen/Puffer (2)

Menge	Lösung/Chemikalie
TAE-Puffer (50x)	
Tris	2,0 M
EDTA-Na ₂	50 mM
Essigsäure	1,0 mM
pH 8,5	
PBS-Puffer (10x)	
KH ₂ PO ₄	18 mM
Na ₂ HPO ₄	101 mM
NaCl	1,369 mM
KCl	27 mM
pH 7,4	
Laemmli-Puffer (10x)	
Tris	250 mM
Glycine	1,920 M
SDS	1%

Rechenprogramme

Programm	Entwickler
DAESOL/PARFIT/VPLAN	IWR, Ruprecht-Karls-Universität
Matlab	Mathworks
Illustrator	Adobe
Photoshop	Adobe
The Gimp	GNU
LaTeX	The LPPL

Anhang 3

10.1 Quantitative PCR

10.1.1 Sequenzen von Primern and Sonden

Name	Sequence
frq_fw	TTGTAATGAAGGTGTCCGAAGGT
frq_rv	CGTTTTCCGCTTCTTCCTCC
frq_pr	(6)FAM-ACCTCCCAATCTCCGAACCTCGCCTG-TAMRA
act(II)_fw	GATGACACAGATCGTTTTTCGAGACT
act(II)_rv	TCCTTTCTCTCTACGCCTCCG
act(II)_pr	(6)FAM-CCGCCTTCTACGTCTCCATCCA-TAMRA
g3pdh_fw	CATTGAGCCCAAGTACGCTGCTTAC
g3pdh_rv	CCTTCTTGCCGTTGACGACGAG
g3pdh_pr	(6)FAM-CCACGGCAACTTCAAGGGCACCAT-TAMRA
g6pd_fw	ACTCCTTCCTTGGCGCTACCTGG
g6pd_rv	CATCACATCGCGGATGATGCCG
g6pd_pr	(6)FAM-CAAGGAACCCTTCGGCACCGAGG-TAMRA
gtub_fw	CCAGTGCGGCAACAGCATCGGA
gtub_rv	AGACATCTTTACGGTCGCCGCC
gtub_pr	(6)FAM-CTTTGTCTGGAGCATGGCATCAGCC-TAMRA

10.1.2 Genomische Alinierung von Primern und Sonden

frq

```
DNA      AGCCCTATGACCGAAGATACCGAGGATGGCTCGGATAAGAATGGTTCGGAGGAAGAAGCGG
mRNA     AGCCCTATGACCGAAGATACCGAGGATGGCTCGGATAAGAATGGTTCGGAGGAAGAAGCGG
pri_fw   -----
pri_rv   -----GGAGGAAGAAGCGG
probe    -----
```

```
DNA      AAAACGCAGCAGGCGAGTTCGGAGATTGGGAGGTTTCGGTCCCTCAAGGTCACCTTCGGAC
mRNA     AAAACGCAGCAGGCGAGTTCGGAGATTGGGAGGTTTCGGTCCCTCAAGGTCACCTTCGGAC
pri_fw   -----ACCTTCGGAC
pri_rv   AAAACG-----
probe    -----CAGGCGAGTTCGGAGATTGGGAGGT-----
```

```
DNA      ACCTTTCATTACAAACCGATGTTTGTACACCGTAATTCATCCTCAATCGAGACCTCTTTG
mRNA     ACCTTTCATTACAAACCGATGTTTGTACACCGTAATTCATCCTCAATCGAGACCTCTTTG
pri_fw   ACCT-TCATTACAA-----
pri_rv   -----
probe    -----
```

act

DNA TGAGAAGATGACACAGATCGTTTTTCGAGACTTTCAACGCCCCCGCCTTCTACGTCTCCAT
mRNA TGAGAAGATGACACAGATCGTTTTTCGAGACTTTCAACGCCCCCGCCTTCTACGTCTCCAT
pri_fw -----GATGACACAGATCGTTTTTCGAGACT-----
pri_rv -----
probe -----CCGCCTTCTACGTCTCCAT

DNA CCAGGCCGTCCTTTCTCTCTACGCCTCCGGTCTGTACCACCGGTATCGTCCTCGACTCCGG
mRNA CCAGGCCGTCCTTTCTCTCTACGCCTCCGGTCTGTACCACCGGTATCGTCCTCGACTCCGG
pri_fw -----
pri_rv -----TCCTTTCTCTCTACGCCTCCG-----
probe CCA-----

g3pdh

dna GAGCACGATGACATCCACATCGTCGCTGTCAACGACCCCTTCATTGAGCCCAAGTACGCT
rna GAGCACGATGACATCCACATCGTCGCTGTCAACGACCCCTTCATTGAGCCCAAGTACGCT
intron -----
prim_fw -----CATTGAGCCCAAGTACGCT
prim_rv -----
probe -----

dna GTAAGTTGGCCTCGCTCACATAGATCCCTTGTCTCATATGACAACTCAGACTCTGACCAT
rna -----
intron GTAAGTTGGCCTCGCTCACATAGATCCCTTGTCTCATATGACAACTCAGACTCTGACCAT
prim_fw GCTTAC-----
prim_rv -----
probe -----

dna CATCCCTCTTACAGGCTTACATGCTCCGCTACGACACCACCCACGGCAACTTCAAGGGCA
rna -----GCTTACATGCTCCGCTACGACACCACCCACGGCAACTTCAAGGGCA
intron CATCCCTCTTACAG-----
prim_fw -----
prim_rv -----
probe -----CCACGGCAACTTCAAGGGCA

dna CCATCGAGGTTGACGGTGCTGACCTCGTCAACGGCAAGAAGGTCAAGTTCTACTCTG
rna CCATCGAGGTTGACGGTGCTGACCTCGTCAACGGCAAGAAGGTCAAGTTCTACTCTG
intron -----
prim_fw -----
prim_rv -----CTCGTCAACGGCAAGAAG-----
probe CCAT-----

g6pd

mRNA GCGCTACCTGGAACAGGCATCACATCGACAACGTCCAAATTACATTCAAGGAACCCTTC
pri_fw GCGCTACCTGG-----
pri_rv -----
probe -----AGGAACCCTTC

mRNA GGCACCGAGGGCCGTGGTGGCTACTTCGACGAGTTCGGCATCATCCGCGATGTGATGCAG

pri_fw -----
pri_rv -----CGGCATCATCCGCGATGTGATG---
probe GGCACCGAG-----

gtub

DNA AGAAATAATAACCATCCAGGCCGGCCAGTGCGGCAACAGCAGTGAGTGCCCAATTCAACC
mRNA AGAAATAATAACCATCCAGGCCGGCCAGTGCGGCAACAGCA-----
pri_fw -----CCAGTGCGGCAACAGCATCGGA-----
pri_rv -----
probe -----

DNA CGACGAGGAGGCAGTCGACCTTCACCCAGTCTTGCGCCTCGACATCCGGCAGCTGGACGC
mRNA -----
pri_fw -----
pri_rv -----
probe -----

DNA GCAGTTTCTGCTAACATTCTCAAGTCGGAAGCCAGTTCTGGCAGCAGCTTTGTCTGGAGC
mRNA -----TCGGAAGCCAGTTCTGGCAGCAGCTTTGTCTGGAGC
pri_fw -----
pri_rv -----
probe -----CTTGTCTGGAGC

DNA ATGGCATCAGCCAGGACGGAACCATCGAGGACTTTGCGACCGAAGGCGGCGACCGTAAAG
mRNA ATGGCATCAGCCAGGACGGAACCATCGAGGACTTTGCGACCGAAGGCGGCGACCGTAAAG
pri_fw -----
pri_rv -----GGCGGCGACCGTAAAG
probe ATGGCATCAGC-----

DNA ATGTCTTCTTTTACCAGAGCGACGATACGCGATACATTCCCCGGTCCATCCTGATCGATC
mRNA ATGTCTTCTTTTACCAGAGCGACGATACGCGATACATTCCCCGGTCCATCCTGATCGATC
pri_fw -----
pri_rv ATGTCT-----
probe -----