Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Thema:

Subzelluläre Verteilung des zentralen Uhrenproteins FREQUENCY in der circadianen Uhr von *Neurospora crassa*

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker Felix Heise
aus Peine

Gutachter: Prof. Dr. Michael Brunner
Prof. Dr. Felix T. Wieland

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Difficile est saturam non scribere.

(Juvenal, Saturae I, 30)

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Weiterhin erkläre ich, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

. . . . . .

Meinem Großvater

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **3**

1.1 Circadiane Rhythmen und molekulare Uhren . . . 3
1.2 *Neurospora crassa* als Modellorganismus . . . 4
1.3 Die circadiane Uhr von *N. crassa* . . . 8
1.4 Eigenschaften von FREQUENCY . . . 9
1.5 Der *White Collar*-Komplex . . . 14
1.5.1 Mechanismus der negativen Rückkopplung . . . 15
1.5.2 Positive Rückkopplung . . . 17
1.5.3 Integration der Rückkopplungswege . . . 18
1.6 Blaulichtrezeption und *Entrainment* . . . 18
1.7 Temperaturwahrnehmung . . . 21
1.8 Kerntransport von Proteinen . . . 22
1.8.1 Import . . . 23
1.8.2 Export . . . 24
1.8.3 Direktionalität des Transports durch Ran . . . 25
1.8.4 Regulation der Transportprozesse und *Shuttling* . . . 26
1.8.5 Bedeutung des Kerntransports für die circadianen Uhren in anderen Modellorganismen . . . 27
1.9 Aufgabenstellung . . . 28

2 Methoden **29**

2.1 Molekulargenetik . . . 29
2.1.1 *In vitro*-Mutagenese . . . 29
2.1.2 Topo-TA™-Klonierung . . . 30
2.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten . . . 30
2.1.4 Klonierungsstrategien . . . 31
2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion . . . 34
2.1.6 Restriktionsverdau . . . 35
2.1.7 Agarosegelelektrophorese . . . 35
2.1.8 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen . . . 35
2.1.9 Präparation kompetenter *E. coli* . . . 36
2.1.10 Transformation kompetenter *E. coli* . . . 36
2.1.11 Plasmidpräparation aus *E. coli* . . . 37
2.2 *Neurospora*-Genetik . . . 38
2.2.1 Transformation von Makrokonidien durch Elektroporation . . . 38
2.2.2 Präparation genomischer DNA . . . 38

2.3 Proteinbiochemie . . . 39
2.3.1 Analytische Gelfiltrationschromatographie . . . 39
2.3.2 Immunpräzipitation . . . 40
2.3.3 *In vitro*-Dephosphorylierung von Totalextrakten oder Kernextrakten . . . 40
2.3.4 Proteinfällung mit Trichloressigsäure . . . 40
2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung . . . 41
2.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . 41
2.3.7 Elektrotransfer und Immundetektion („*Western Blot*“) . . . 42
2.3.8 Glutathion-Affinitätschromatographie von GST-FRQ . . . 43
2.4 Zellbiologie . . . 44
2.4.1 Zellfraktionierung . . . 44
2.4.2 Kernextraktion . . . 44
2.4.3 Proteintotalextrakt . . . 45
2.5 Physiologie . . . 45
2.5.1 Gewinnung von Makrokonidien . . . 45
2.5.2 Gewinnung von Myzel . . . 45
2.5.3 Induktion mit Chinasäure . . . 46
2.5.4 *Race tube*-Analyse . . . 46

3 Ergebnisse **47**
3.1 Subzelluläre Verteilung von FRQ in Abhängigkeit von der Expressionsstärke . . . 47
3.2 Lokalisation von FRQ und FRQ^9 . . . 48
3.2.1 Analyse von FRQ/FRQ^9-Komplexen durch Gelfiltration . . . 50
3.3 Lokalisation von FRQ-Proteinen mit partiellen Deletionen . . . 52
3.3.1 C-terminal verkürzte FRQ-Formen . . . 52
3.3.2 FRQ-Varianten mit zentralen Deletionen . . . 55
3.3.3 FRQ-Assoziation mit Caseinkinase 1a . . . 57
3.3.4 Physiologische Rhythmizität der *frq*-Mutanten . . . 59
3.3.5 Limitierte Proteolyse von FRQ . . . 59
3.4 Lokalisation von FRQ im Vergleich mit FRH . . . 61
3.5 Der C-Terminus von FRQ als putative cytoplasmatische Lokalisationsdomäne (CLD) 64
3.6 Subzelluläre Lokalisation von NLS-sGFP-Konstrukten . . . 65
3.7 Nukleo-cytoplasmatisches *Shuttling* von Frequency? . . . 67
3.7.1 Verteilung von FRQ nach Induktion von heterologem Promotor . . . 67
3.7.2 FRQ-Umverteilung nach Unterbrechen der Translation? . . . 69
3.8 Affinitätsaufreinigung von Frequency . . . 75
3.8.1 Ni^{2+}-Affinitätschromatographie mit His_6-Markierung . . . 76
3.8.2 *Tandem Affinity Purification* (TAP) . . . 77
3.8.3 Strep-Tag II-Affinitätschromatographie an StrepTactin . . . 79
3.8.4 Glutathion S-Transferase-Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 81
3.9 Konstruktion von neuen Expressionsplasmiden für *N. crassa* . . . 83

4 Diskussion **88**
4.1 Subzelluläre Lokalisation von FRQ . . . 88

4.2 C-Terminus von FRQ als CLD? . . . 93
4.3 Nukleo-cytoplasmatisches *Shuttling* von FRQ? . . . 94
4.4 Affinitätsaufreinigung von FRQ . . . 96
4.5 pFH-Vektoren . . . 98

A Materialien und Geräte **101**
A.1 Stämme und Genotypen . . . 101
A.1.1 *N. crassa* . . . 101
A.1.2 *E. coli* . . . 102
A.2 Plasmide . . . 102
A.3 Oligonukleotide . . . 103
A.3.1 Polymerase-Kettenreaktion . . . 103
A.3.2 *In vitro*-Mutagenese . . . 104
A.3.3 Direkte Insertion . . . 105
A.3.4 Sequenzierung . . . 105
A.4 Medien . . . 106
A.4.1 *N. crassa* . . . 106
A.4.2 *E. coli* . . . 106
A.5 Puffer und Lösungen . . . 107
A.5.1 Proteinbiochemie . . . 107
A.5.2 Zellfraktionierung . . . 108
A.5.3 Kompetente *E. coli* . . . 108
A.5.4 DNA-Präparation . . . 109
A.5.5 Gelelektrophorese und Elektrotransfer . . . 109
A.6 Proteaseinhibitoren . . . 110
A.7 Enzyme . . . 110
A.7.1 Restriktionsendonukleasen . . . 110
A.7.2 Sonstige . . . 110
A.8 Antikörper . . . 111
A.9 Sonstige Proteine . . . 111
A.10 Affinitätsmatrizes . . . 111
A.11 Kits . . . 111
A.12 Verbrauchsmaterial . . . 111
A.13 Chemikalien . . . 112
A.14 Geräte . . . 114
A.15 Sonstiges . . . 115

B Abkürzungen **117**

Literaturverzeichnis **120**

Abstract

Eukaryotic circadian clocks are made up by networks of interconnected feedback loops. One basic principle therein is a transcriptional-translational negative feedback loop in which a protein represses with a time delay transcription of its own mRNA. Therefore, regulation of nucleo-cytoplasmic partitioning of distinct proteins plays an important role in the clocks' molecular mechanisms.

FREQUENCY (FRQ) is one of the central components of the *Neurospora crassa* circadian clock. On the one hand, it represses in the nucleus transcription of its own mRNA (negative feedback). On the other hand, it promotes in the cytosol accumulation of White Collar Complex (WCC) consisting of the transcription factors White Collar (WC) 1 and 2 (positive feedback) which in turn causes transcription of *frq* mRNA. The temporal order of both functions is exactly determined so subcellular distribution of FRQ needs to be regulated precisely. To ensure proper functioning of the clock, most of the protein localises to the cytosol and only a minor portion is in the nucleus although FRQ contains a functional nuclear localisation signal (NLS). frq^9 expresses — due to a frame shift mutation — an approx. 30 % C-terminally shortened protein (FRQ^9). FRQ^9 appears predominantly in the nucleus so the C-terminus accounts for the unexpected cytosolic localisation of FRQ.

This study examines which parts of the C-terminus determine localisation and how the subcellular distribution is achieved. FRQ distribution cannot be attributed to a closely confined region in the C-terminus (e.g. a putative nuclear export signal, NES) and presumably reflects a dynamic equilibrium of nuclear import and export. Phosphorylation in the nucleus may withdraw a part of the FRQ population from this shuttling process so it cannot enter the nucleus again (e. g. by masking of the nuclear localisation signal, NLS).

Phosphorylation is an important mechanism regulating FRQ functions and may be involved in determining subcellular localisation as well. In order to identify *in vivo* phosphorylation sites and binding partners by mass spectrometry several affinity chromatography methods were tested for their applicability with *Neurospora*. One single method has not proven to be sufficient for proper FRQ enrichment but a double strategy of His_6/Ni^{2+} and StrepTag II/StrepTactin purification seems promising since both can deplete the protein from total extracts and their buffers are compatible with each other.

Finally, a new set of expression vectors for *N. crassa* transformation is presented. Each vector complements histidine auxotrophy of the *his-3* mutant and contains a *N. crassa* promoter, polylinker and a transcriptional terminator with polyadenylation site.

Zusammenfassung

Die circadianen Uhren eukaryontischer Organismen bestehen aus einem Netzwerk miteinander verknüpfter Rückkopplungsschleifen. Ein grundlegendes Prinzip darin ist eine negative Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife, in der ein Protein die Transkription seiner eigenen mRNA zeitverzögert reprimiert. Daher spielt die Regulation der nukleocytoplasmatischen Verteilung einzelner Proteine im molekularen Mechanismus der Uhren eine wichtige Rolle.

FREQUENCY (FRQ) ist eine der zentralen Komponenten der circadianen Uhr von *Neurospora crassa*. Es hemmt zum einen im Zellkern die Transkription seiner eigenen mRNA (negative Rückkopplung), zum anderen fördert es im Cytosol die Bildung des White Collar Komplexes (WCC) bestehend aus den Transkriptionsfaktoren White Collar (WC) 1 und 2 (positive Rückkopplung), der wiederum die Transkription von *frequency*-mRNA bewirkt. Die zeitliche Abfolge beider Funktionen ist exakt festgelegt, daher muss die subzelluläre Verteilung von FRQ präzise reguliert werden. Um das korrekte Funktionieren der Uhr zu gewährleisten, ist FRQ zum größten Teil im Cytosol und nur zum kleineren Teil im Zellkern lokalisiert, obwohl es ein funktionales Kernlokalisationssignal (NLS) besitzt. frq^9 exprimiert durch Leserasterverschiebung ein um ca. 30 % C-terminal verkürztes Protein (FRQ^9), das überwiegend im Zellkern vorkommt. Der C-Terminus ist also für die unerwartete cytoplasmatische Lokalisation von FRQ verantwortlich.

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, welche Teile des C-Terminus die FRQ-Lokalisation beeinflussen und wie die subzelluläre Verteilung bewirkt wird. Die Verteilung kann nicht einer eng umgrenzten Region (z. B. einem putativen Kernexportsignal, NES) im C-Terminus zugeschrieben werden und spiegelt sehr wahrscheinlich ein dynamisches Gleichgewicht aus Kernimport und -export wider. Ein Teil der FRQ-Population könnte durch Modifikation im Zellkern diesem *shuttling*-Prozess entzogen werden, so dass er nicht wieder in den Zellkern gelangen kann (z. B. durch Maskierung eines Kernlokalisationssignals, NLS).

Phosphorylierungen sind ein wichtiger Regulationsmechanismus für FRQ-Funktionen und könnten auch an der Festlegung der subzellulären Lokalisation beteiligt sein. Um *in vivo*-Phosphorylierungsstellen und Bindungspartner von FRQ massenspektrometrisch identifizieren zu können, wurden verschiedene Affinitätschromatographiemethoden auf ihre Verwendbarkeit in *N. crassa* getestet. Eine einzelne Methode führte in keinem Fall zu ausreichender Anreicherung von FRQ, aber eine Doppelstrategie aus His_6/Ni^{2+}- und StrepTag II/StrepTactin-Aufreinigung erscheint viel versprechend, da beide das Protein aus Totalextrakten depletieren können und die Puffer miteinander kompatibel sind.

Schließlich wird ein Satz neuer Expressionsvektoren für die Transformation von *N. crassa* vorgestellt. Jeder dieser Vektoren komplementiert die Histidinauxotrophie der *his-3*-Mutante und besitzt einen *N. crassa*-Promotor, einen Polylinker sowie einen Transkriptionsterminator mit Polyadenylierungsstelle.

1 Einleitung

Viele Lebensräume der Erde sind durch den ständigen Wechsel von Tag und Nacht geprägt, deren Rhythmus durch die Erdrotation bestimmt wird. Die Lebewesen in ihnen müssen sich den dadurch entstehenden wechselnden Bedingungen anpassen bzw. können diese zu ihrem Vorteil nutzen (z. B. geringere Bedrohung durch Fressfeinde bei nacht- oder dämmerungsaktiven Tieren). Dabei ist es oftmals nützlich, den Anbruch des Tages bzw. den Einbruch der Nacht quasi vorauszuahnen, um zum tatsächlichen Zeitpunkt bereits darauf vorbereitet zu sein [1]. So haben sich im Laufe der Evolution bei vielen – insbesondere höheren – Lebewesen Mechanismen entwickelt, die es ermöglichen, die Zeitspanne eines Tages auch ohne äußere Einflüsse zu messen: die circadianen Uhren.

1.1 Circadiane Rhythmen und molekulare Uhren [2]

Circadiane Rhythmen sind Oszillationen auf biochemischer, physiologischer oder Verhaltensebene, die unter konstanten äußeren Bedingungen fortbestehen und dann eine Peridoendauer von ungefähr einem Tag* aufweisen. Sie sind temperaturkompensiert, d. h. die Periodendauer ist weitgehend temperaturunabhängig. Da sie autonom und selbsterhaltend sind, bedürfen sie keiner externen Stimuli, können aber dennoch in bestimmten Grenzen von außen beeinflusst werden (Phasenverschiebung bzw. *entrainment*), z. B. durch Licht oder schnelle Temperaturwechsel. Dies macht die Synchronisation auf die exakt 24 Stunden des astronomischen Tages möglich. Die äußeren Faktoren (*inputs*) werden – auch in der englischen Literatur – als *Zeitgeber* bezeichnet. Neben den starken universellen Zeitgebern Licht und Temperatur können beispielsweise auch Nahrungsangebot oder soziales Umfeld einen Einfluss haben. Circadiane Rhythmen sind also nicht völlig starr, sondern können auf Veränderungen der Umwelt reagieren (schon die jahreszeitlich bedingte Schwankung der Tageslänge in höheren geographischen Breiten macht eine Anpassung erforderlich).

Beim Menschen weisen viele Prozesse einen 24-stündigen Rhythmus auf: Körpertemperatur, Hormonproduktion, Blutdruck, Ausscheidungsrate der Nieren, körperliche und geistige Leistungsfähigkeit, Wachstum und Regenerationsvorgänge, Schmerzempfinden, Metabolismusrate usw. Das prominenteste und offensichtlichste Beispiel für einen circadianen Rhythmus ist aber der Schlaf-Wach-

* lat. *circa* – um ... herum, etwa, ungefähr; lat. *dies* – Tag

Rhythmus: Schichtarbeiter mit häufig wechselnden Schichten leiden darunter, dass sich die „innere Uhr“ des Menschen nicht plötzlich und beliebig verstellen lässt, und auch der sogenannten *Jetlag* nach Langstreckenflügen in Ost→West- bzw. West→Ost-Richtung macht dies deutlich.

Die erste Beschreibung eines circadianen Ryhthmus stammt aus dem Jahre 1729 [3]: de Mairan hatte beobachtet, dass *Mimosa pudica*, die nachts ihre gefiederten Blätter zusammenfaltet und nach unten hängen lässt (die gleiche Reaktion erfolgt nach Berührung oder Erschütterung), diese Blattbewegung auch in ständiger Dunkelheit mit konstanter Zeitabfolge beibehält. Später wurden circadiane Rhythmen auch bei vielen anderen Organismen entdeckt; sie kommen mit Ausnahme der *Archaea* in allen Domänen des Lebens vor und sind insbesondere bei höheren Eukaryonten weit verbreitet. Ursache dieser Rhythmen sind circadiane Uhren auf molekularer und zellulärer Ebene, die den zentralen Oszillator bilden und auf verschiedenen Wegen (*outputs*) die anfangs erwähnten Prozesse steuern.

Als Modellorganismen zur Charakterisierung der circadianen Uhren dienen heute Maus (*Mus musculus*), Taufliege (*Drosophila melanogaster*), Zebrafisch (*Danio rerio*), Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*), die einzellige Alge *Chlamydomonas reinhardtii*, das Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* und der Ascomycet (Schlauchpilz) *Neurospora crassa*. Anders als anfangs vielleicht erhofft, gibt es keinen universellen Mechanismus, der allen Spezies gemeinsam ist. Die zentralen Oszillatorkomponenten zwischen ihnen unterscheiden sich teilweise so sehr, dass anzunehmen ist, dass circadiane Uhren mehrmals während der Evolution entstanden sind [4]. Dennoch gibt es gemeinsame Prinzipen (z. B. eine verzögerte negative Rückkopplungsschleife, meist im Wechsel von Transkription und Translation, bei der das Protein die Transkription seiner eigenen mRNA reprimiert) und insbesondere unter den Proteinen, die den Kernoszillator regulieren, viele Parallelen. Erkenntnisse aus dem einem Modellorganismus führen so gelegentlich zur Charakterisierung eines ähnlichen Mechanismus in einem anderen.

1.2 *Neurospora crassa* als Modellorganismus [5, 6]

Neurospora gehört zur Abteilung der Ascomycota (Schlauchpilze) oder *fungi imperfecti*, wie auch *Saccharomyces cerevisiae* oder *Schizosaccharomyces pombe*. Sie kommt häufig als Erstbesiedlerin auf Holz nach Bränden vor*, aber auch in verwesender pflanzlicher Materie (speziesabhängig) und besitzt einen asexuellen sowie einen – recht komplexen – sexuellen Lebenszyklus (Abb. 1). Im asexuellen Zyklus, der unter normalen Wachstumsbedingungen dominiert, ist *N. crassa* haploid und wächst in Form von coenocytischen Hyphen, d. h. die Hyphen bilden ein mehrkerniges Syncytium, das durch unvollständige Septen unterteilt ist. Auf bestimmte Reize (Licht, Nährstoffmangel) bzw.

* *Neurospora* gehört zur Klasse der Sordariomycetes oder Pyrenomyctes; altgr. $\pi\upsilon\rho$ – Feuer

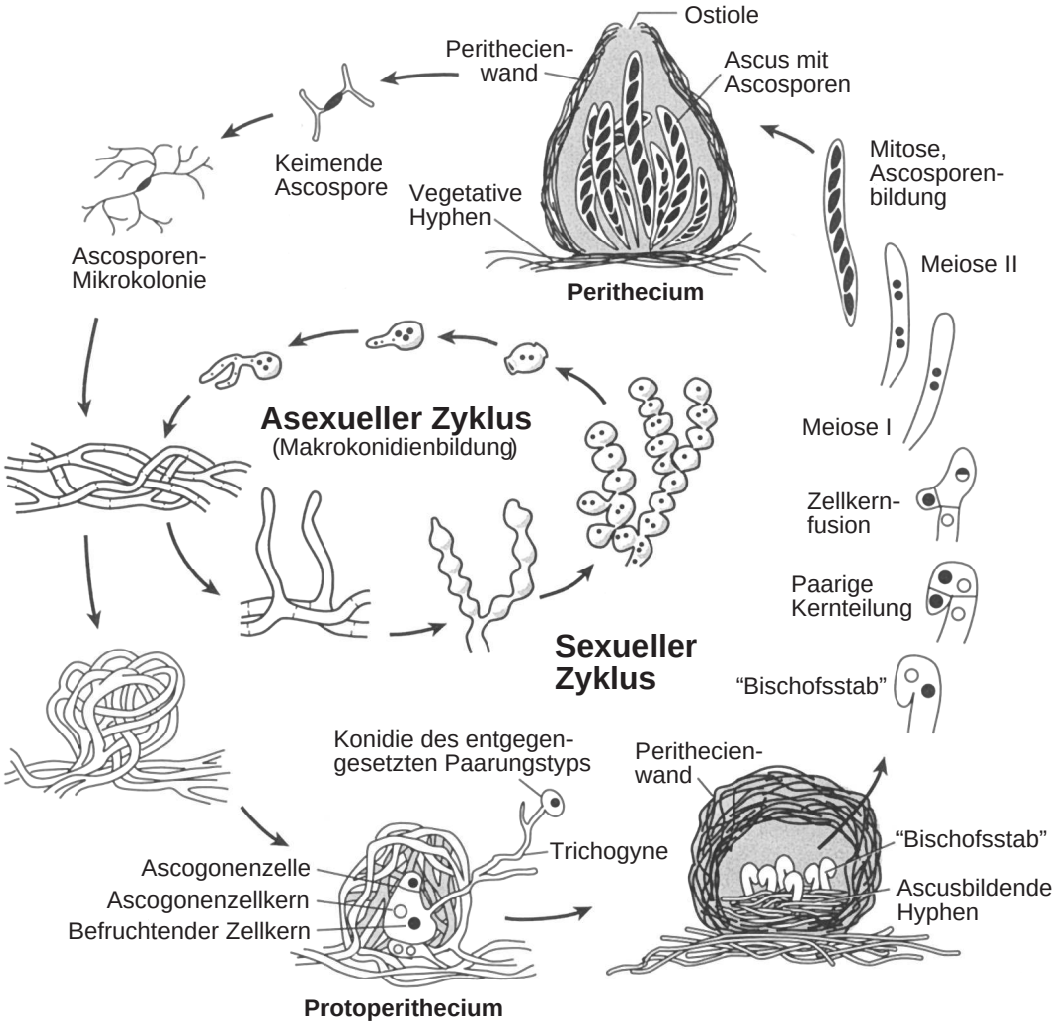

Abbildung 1: Sexueller und asexueller Lebenszyklen von *Neurospora crassa*, nach [6], S. 13 (verändert)

unter Kontrolle der circadianen Uhr werden die mehrkernigen Makrokonidien gebildet. Dabei entsteht zunächst ein sogenanntes Luftmyzel, dessen Hyphen eine hydrophobere Oberfläche besitzen. An deren Enden bilden sich mehrfache Einschnürungen, die schließlich vollständig abgeteilt werden und sich zu Makrokonidien entwickeln. Diese können abbrechen und z. B. vom Wind verteilt werden; sie dienen damit der schnellen Verbreitung (einkernige Mikrokonidien entstehen dagegen nur unter sehr speziellen Wachstumsbedingungen, zunächst als seitliche Ausstülpungen der Hyphen). Nach dem Auskeimen bilden die Konidien wieder ein vegetatives Myzel.

Bevor der circadiane Rhythmus der Makrokonidienbildung entdeckt wurde, war *Neurospora crassa* schon längere Zeit als Modellorganismus verwendet worden. Der „rote Brotschimmel“ wurde 1843 beschrieben als Kontamination französischer Bäckereien und *Oidium aurantiacum* genannt [7]; schon hier wurde die lichtabhängige Orangefärbung untersucht. 1901 wurde berichtet, wie der nun

Monilia sitophila genannte Organismus in Indonesien zur Herstellung von „ontjom“ (fermentierte Erdnusspresskuchen) verwendet wurde [8], und im gleichen Jahr wurde ein orangener Schimmelpilz erwähnt, der in Brasilien auf verbrannter Vegetation wuchs [9]. 1923 kam es nach einem Erdbeben mit folgendem Großbrand in Tokyo zu massenhaftem Auftreten von „*Monilia aurea*“ [10].

Shear und Dodge erkannten 1927, dass der *Monilia sitophila*-Komplex in Wahrheit aus drei Arten bestand, die sie anhand ihrer geschlechtlichen Fortpflanzungsformen unterschieden (*Neurospora*[*] *crassa*, *N. sitophila* und *N. tetrasperma* genannt) [11]. Sie fanden, dass *N. crassa* und *N. sitophila* jeweils in zwei Paarungstypen vorkamen, die selbststeril waren und deren Gene klassisch vererbt wurden. *Neurospora* wurde ein Modellorganismus für die Genetik, weil er klasssiche Mendelsche Vererbung sowie Rekombination durch *crossing over* zeigt und im asexuellen Lebenszyklus haploid ist, Mutationen also leicht an Hand des Phänotyps verfolgt werden können. Beadle und Tatum mutierten *Neurospora* künstlich durch Röntgenbestrahlung und untersuchten die dabei entstandenen Stoffwechseldefekte [12, 13]. Sie kamen schließlich zur berühmten „Ein-Gen-ein-Enzym“-Hypothese [14], die 1958 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.

Pittendrigh *et al.* beschrieben 1959 den circadianen Rhythmus von *N. crassa* [15], und später fanden Sargent *et al.* die Mutante *timex*, bei der die rhythmische Makrokonidienbildung in *race tubes* als deutliche Banden besser zu beobachten war [16]. Diese wurde später als Doppelmutante aus *band* (*bd*) und *inv* identifiziert, in der die Invertase-Mutation *inv* für den Phänotyp der rhythmischen Bandenbildung unerheblich ist[†] [18]. Auf der Grundlage dieses Stamms wurde eine Reihe verschiedener Mutanten erzeugt, die Veränderungen des circadianen Rhythmus aufweisen; dies betrifft meist die Periodendauer (unter anderen frq^1–frq^8, Zusammenfassung in [19]), aber auch eine Mutante, die keinen circadianen Rhythmus mehr zeigte (frq^9 [20]), trat auf. Schließlich wurde mit FREQUENCY (FRQ) das erste Uhrenprotein von *N. crassa* chrakterisiert [21, 22], was den Anfang der detaillierten molekularen Untersuchung der circadianen Uhr markierte. So viel darüber bisher in Erfahrung gebracht wurde, so wenig ist allerdings über den Mechanismus des *output* bekannt, weder was die Regulation der Konidienbildung betrifft noch die Expression der uhrenkontrollierten Gene (*clock controlled genes*, *ccg*s).

Race tube assay

Der *race tube assay* wurde bereits 1943 zur Bestimmung der linearen Wachstumsrate von *Neurospora* eingeführt [23] und später zur Analyse des circadianen Ryhthmus der Konidienbildung verwendet [16]. *Race tubes* sind 40–60 cm lange Glasröhren von ca. 14 mm Innendurchmesser, die an den En-

[*] altgr. $\nu\varepsilon\tilde{\upsilon}\rho o\nu$ – Sehne, Hinweis auf das gebänderte Aussehen der sexuellen Ascosporen

[†] *bd* verringert die Empfindlichkeit für CO_2, das die Konidienbildung insbesondere in den engen *racetubes* unterdrücken kann. Kürzlich wurde *bd* als dominante Punktmutation von *ras-1* charakterisiert [17].

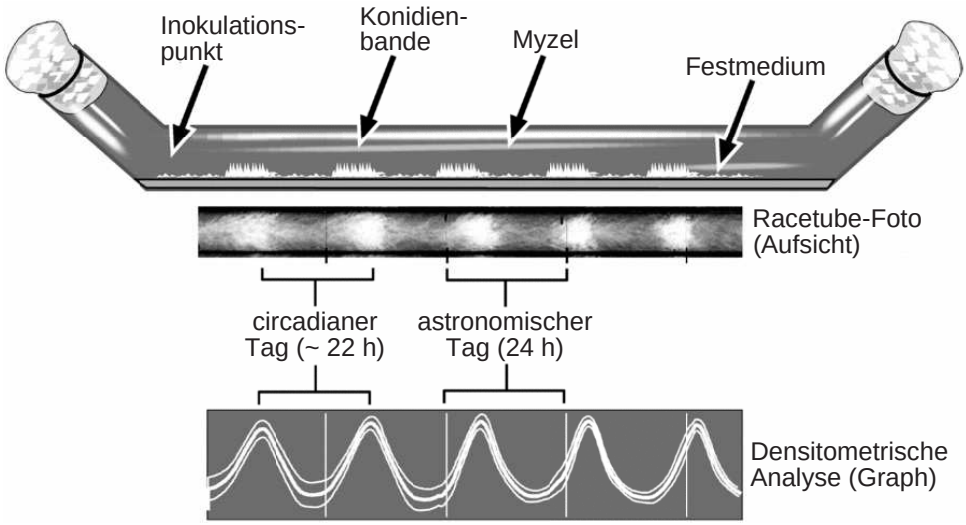

Abbildung 2: Schematischer Aufbau und Fotografie eines vollständig bewachsenen *race tube* mit densitometrischer Analyse (Quantifizierung der Signalintensität, reduziert auf eine Dimension), nach [25] (verändert)

den um 45° nach oben gebogen sind und am Boden mit einer dünnen Schicht Festmedium gefüllt sind. Sie werden an einem Ende inokuliert und bei Licht inkubiert, bis *N. crassa* sicher angewachsen ist. Dann werden sie ins Dunkle gestellt bzw. definierten Licht-Dunkel-Zyklen ausgesetzt, bis die gesamte Länge der Röhren bewachsen ist. Um Periodendauer und Phase der Zyklen bestimmen zu können, wird die Wachstumsfront täglich unter Rotlicht* markiert. Die Abstände zwischen den Maxima der Konidienbildung und die Abstände der Markierungen des Wachstumsfortschritts werden ausgemessen und gemittelt; aus dem Verhältnis beider lässt sich die Periodendauer berechnen. Durch computergestützte Analyse kann neben der Periodendauer auch die Phase des Rhythmus errechnet werden.

Um circadiane Rhythmen unterschiedlicher Periodendauer miteinander vergleichen zu können, wurde das System der circadianen Zeit (*circadian time*, CT) eingeführt: Unabhängig von der tatsächlichen Dauer wird eine Periode des circadianen Rhythmus willkürlich in 24 Stunden eingeteilt, wobei der Beginn (CT 0) auf den subjektiven Sonnenaufgang festgelegt wurde; der subjektive Sonnenuntergang liegt damit bei CT12.

* Rotlicht hat offensichtlich keinen Einfluss auf die circadiane Uhr, wenngleich *N. crassa* zwei Phytochrome exprimiert, die circadian reguliert werden. Keine der bisher bekannten Photoreaktionen wird indes durch Deletion der beiden Gene verändert [24].

1.3 Die circadiane Uhr von *N. crassa*

Drei Proteine bilden die zentralen Komponenten der circadianen Uhr von *N. crassa*: Frequency (FRQ) [21, 22] sowie die Transkriptionsfaktoren White Collar 1 (WC-1) und White Collar 2 (WC-2), alle drei werden *in vivo* vielfach phosphoryliert [26, 27, 28, 29, 30]. WC-1 und WC-2 bilden zusammen den White Collar Complex (WCC) [27], der die Transkription von *frq* (und anderer circadian kontrollierter Gene) aktiviert. FRQ, das gegenüber seiner mRNA mit einer Verzögerung von einigen Stunden akkumuliert, hemmt die Aktivität des WCC und reprimiert so die Transkription von *frq* sowie die anderer WCC-kontrollierter Gene [21]. Diese negative Rückkopplungsschleife führt dazu, dass sowohl die *frq*-mRNA- als auch die FRQ-Proteinmenge im Laufe eines circadianen Tages mit hoher Amplitude oszillieren (Abb. 3). Des Weiteren bewirkt FRQ auf posttranskriptionaler und/oder posttranslationaler Ebene, dass größere Mengen WCC gebildet werden, was als positive Rückkopplung wiederum die Transkription von *frq* fördert [31, 32]. Diese beiden scheinbar widersprüchlichen Funktionen von FRQ sind zeitlich und räumlich genau koordiniert: Kleine Mengen an nukleärem FRQ sind für die Repression ausreichend, während größere Mengen FRQ im Cytosol akkumulieren müssen, um die Bildung des WCC zu unterstützen [33].

Die *wc-1*- und *wc-2*-mRNA-Mengen sind konstant, ebenso die Menge an WC-2, das im fünffachen Überschuss zu WC-1 (und FRQ) vorliegt [35, 30]. WC-1 kann nur akkumulieren, wenn es mit WC-2 den WCC bildet [36], und seine Menge oszilliert mit nahezu entgegengesetzter Phase zu *frq*-mRNA [31] (Abb. 3). Der WCC ist im Zellkern sehr stark angereichert, während überschüssiges WC-2 sowohl dort als auch im Cytosol in großer Menge vorkommt [28]. Der WCC bindet an licht- und uhrgesteuerte Elemente im *frq*-Promotor und aktiviert die Transkription von *frq*-mRNA [37, 38]. Dabei findet im *frq*-Promotorbereich ein Umbau des Chromatins statt. Clockswitch (Csw-1), ein Homolog von ATP-abhängigen Chromatin-umbauenden Enzymen, ist für die Funktion der circadianen Uhr notwendig [39]. Die *frq*-mRNA-Konzentration beginnt von der späten subjektiven Nacht (CT 20) an zu steigen und erreicht kurz nach der Morgendämmerung (CT 0–4) ihr Maximum [40, 26, 41]. Zu diesem Zeitpunkt sind geringe Mengen hypophosphoryliertes FRQ vorhanden, die als Repressor wirken [42, 33]. FRQ akkumuliert langsam, und deshalb sinkt die mRNA-Menge, bis die Repression am späten Nachmittag ihren Höhepunkt erreicht [40, 26, 43]. Das bereits synthetisierte FRQ wird nach und nach an vielen Stellen phosphoryliert, und während der subjektiven Nacht (CT 12–20) wird das hyperphosphorylierte FRQ abgebaut, so dass die FRQ-Konzentration sinkt. Die Repression hält allerdings noch bis CT 20 an, wo nur noch geringe Mengen hyperphosphoryliertes FRQ vorhanden sind. Dieses kann die Transkription aber nicht mehr in gleichem Maße reprimieren wie hypophosphoryliertes FRQ, das am Morgen in vergleichbarer Konzentration vorliegt [41]. Ob die Fähigkeit zur Transkriptionsrepression von bestimmten Phosphorylierungen abhängt, ist nicht

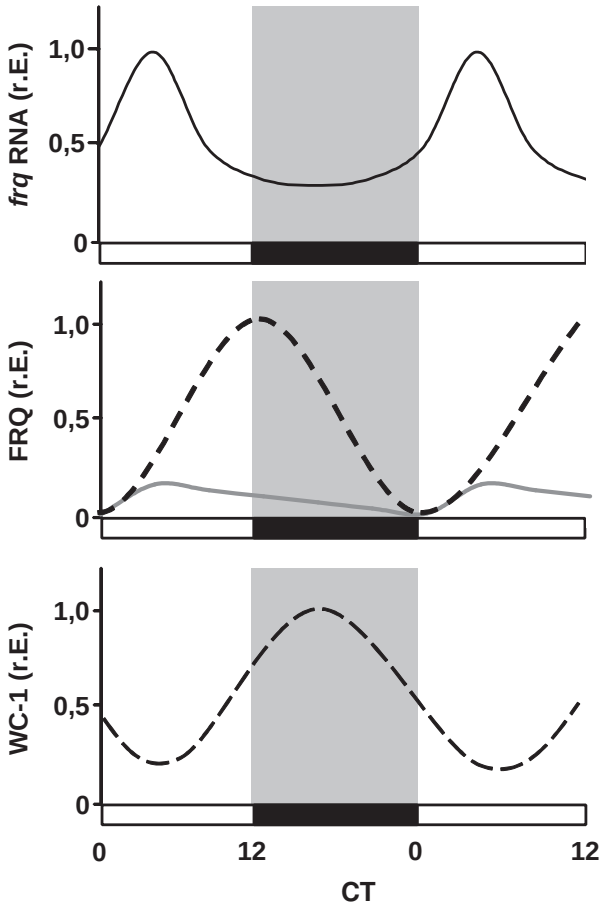

Abbildung 3: Schematisierte Oszillationen der Mengen von *frq*-mRNA, FRQ (gestrichelt: Cytosol, grau: Zellkern) und WC-1 in relativen Einheiten (r. E.) während des circadianen Tages (CT: circadiane Zeit, *circadian time*), nach [34] (verändert)

bekannt; es ist möglich, dass allein die FRQ-Konzentration im Zellkern von Bedeutung ist. Diese ist vor der Morgendämmerung wesentlich geringer als am Morgen [41, 33].

1.4 Eigenschaften von FREQUENCY

FRQ ist ein 989 Aminosäurereste (108 kDa) großes Protein [21] ohne strukturelle Verwandtschaft zu anderen Proteinen. Homologe wurden lediglich in den Ascomyceten *Sordoria fimicola*, *Leptosphaeria australiensis*, *Hypocrea spinulosa*, *Gibberella zeae*, *Magnaporthe grisea* und *Phaeosphaeria nodorum* gefunden [44]; Abb. 4 zeigt einen Sequenzvergleich der Proteine. Das einzige von den gängigen Algorithmen vorhergesagte Strukturmerkmal ist die *coiled coil*-Region im N-terminalen Bereich von FRQ, die Dimerisierung ermöglicht und für die Funktion der circadianen Uhr notwendig ist [45]. FRQ bildet höhermolekulare Komplexe sehr heterogener Größe (s. 3.2.1), in denen Caseinkinase 1a

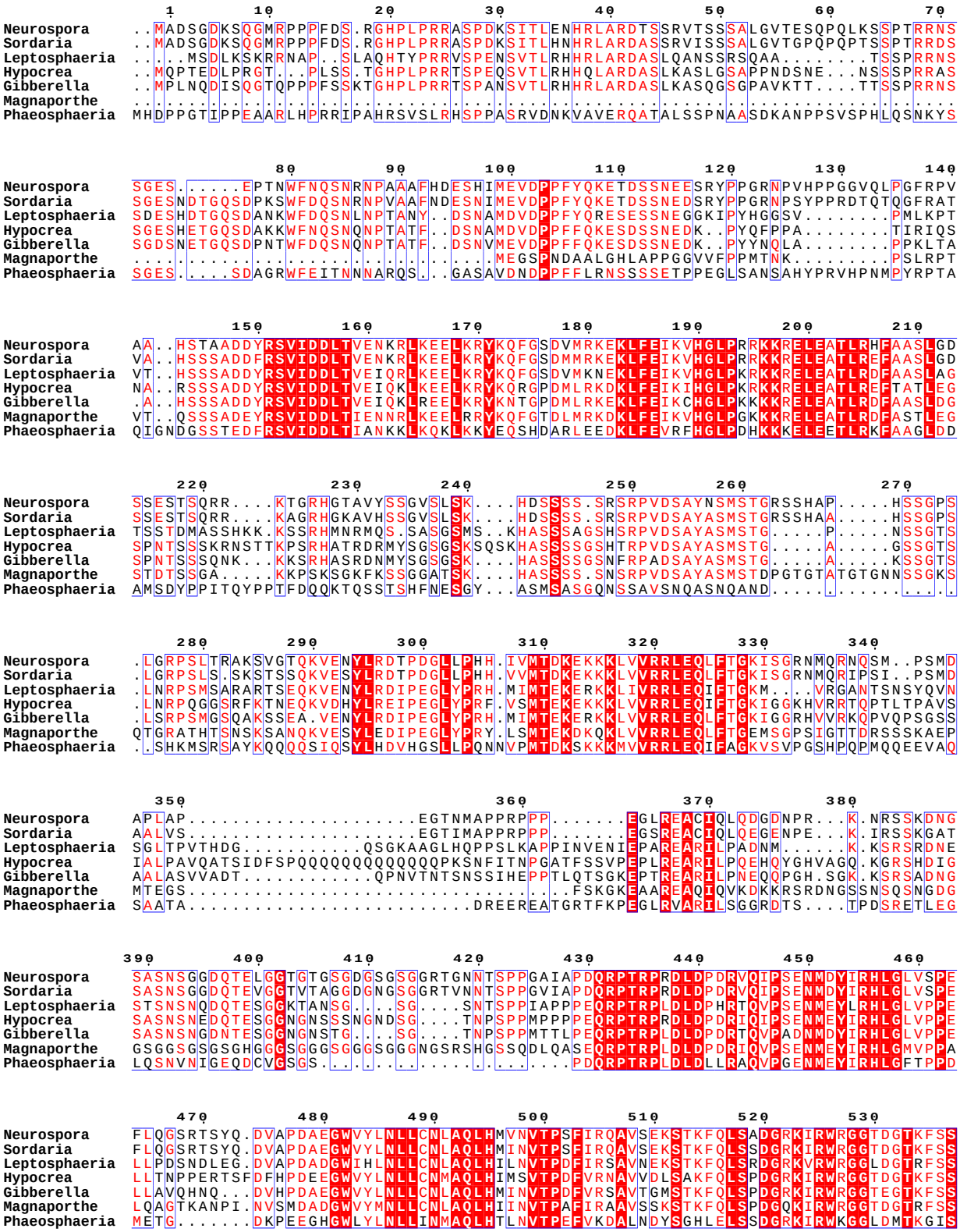

Abbildung 4: Sequenzvergleich von FRQ-Homologen aus verschiedenen Organismen

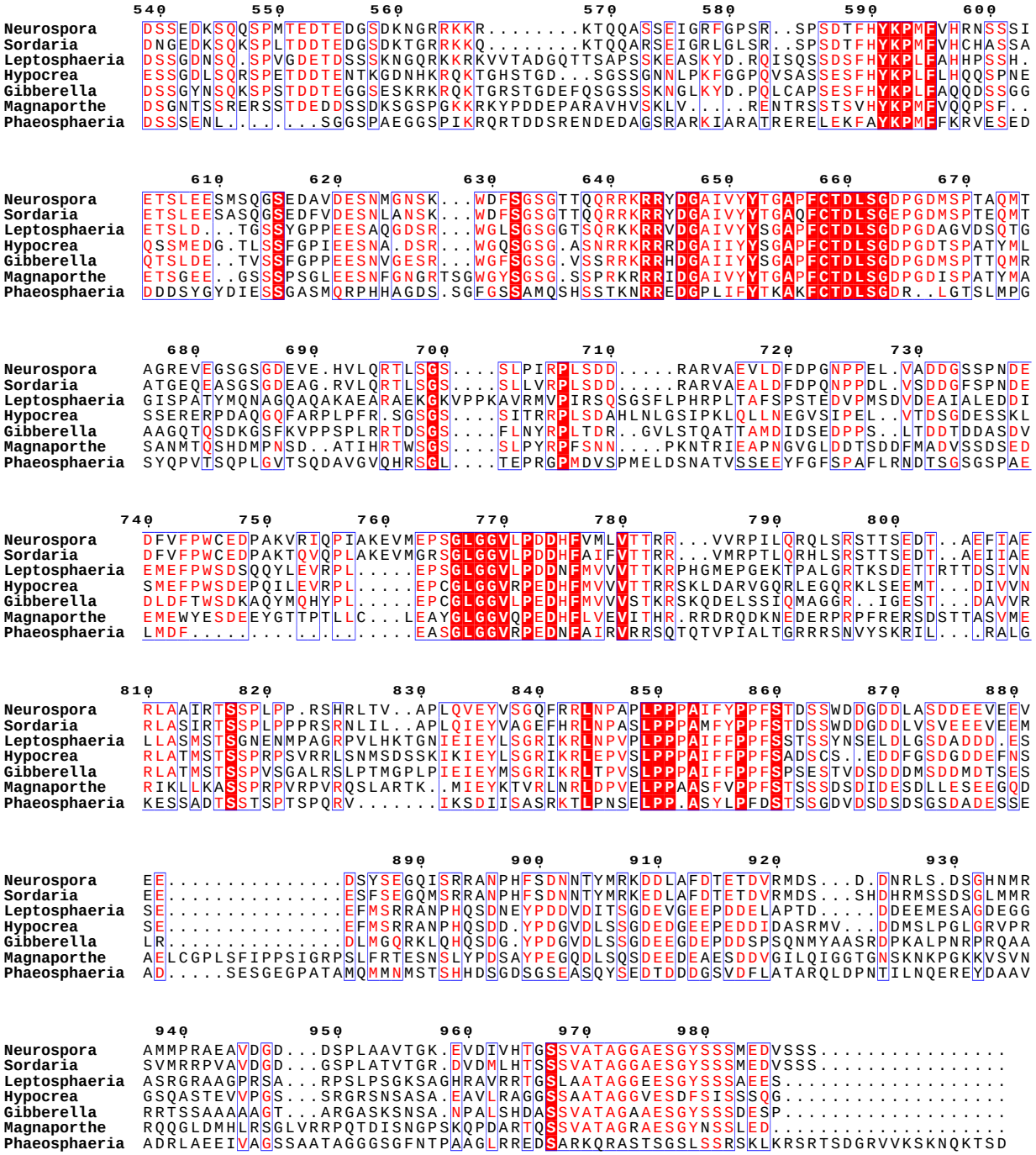

Abbildung 4: (Fortsetzung) Sequenzvergleich von FRQ-Homologen aus verschiedenen Organismen: *Neurospora crassa*, *Sordaria fimicola*, *Leptosphaeria australiensis*, *Hyprocrea spinulosa*, *Gibberella zeae* und *Phaeosphaeria nodorum*

(CK-1a, s. u.) [43] und die DEAD-box-RNA-Helikase FRH (FRQ *interacting* RNA *helicase*) enthalten sind [46]. Dob1p, das *S. cerevisiae*-Homolog von FRH, ist Bestandteil des Exosom-Komplexes, der den Metabolismus verschiedener RNA-Spezies (darunter auch mRNAs) reguliert. FRH ist für die Lebensfähigkeit von *Neurospora* essentiell (der genaue Zusammenhang ist nicht bekannt), die FRH–FRQ-Interaktion wird für die negative Rückkopplung der circadianen Uhr benötigt. Außerdem interagiert FRH FRQ-unabhängig mit WC-1 und WC-2 [46].

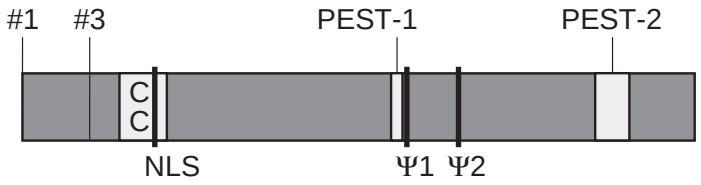

Abbildung 5: Schematische Darstellung wichtiger Bereiche von FRQ. #1, #3: alternative Startkodons (s. 1.7) für l-FRQ (#1) und s-FRQ (#3), CC: *coiled coil*, NLS: Kernlokalisationssignal, Ψ: Pseudo-NLS (inaktiv), PEST: Prolin-/Glutaminsäure-/Asparaginsäure-/Serin-/Theronin-reiche Region

Für die Repressorfunktion erforderlich ist ein Kernlokalisationssignal (*nuclear localisation signal*, NLS), das sich am Ende der *coiled coil*-Region von FRQ befindet (Abb. 5). Dennoch ist FRQ nicht im Zellkern angereichert, sondern kommt zum überwiegenden Teil im Cytosol vor; Deletion des NLS verlagert FRQ allerdings vollständig ins Cytosol, und die circadiane Uhr funktioniert nicht mehr [41]. Zu Beginn der FRQ-Synthese sind die Konzentrationen in Zellkernen und Cytosol ungefähr gleich [41, 33]. Während in den Kernen recht bald das Maximum erreicht wird (CT 4), steigen die cytosolischen Mengen weiter an, bis sich 8–12 h nach Induktionsbeginn der weitaus größte Teil im Cytosol befindet und die cytosolische Konzentration deutlich höher als die nukleäre ist [41, 46]. Die FRQ-Akkumulation geht mit zunehmender Phosphorylierung einher, aber es ist nicht bekannt, ob die subzelluläre Lokalisation dadurch reguliert wird.

Weiterhin ist unbekannt, ob nur ein Teil des gesamten FRQ überhaupt in der Lage ist, in den Kern zu gelangen bzw. der größte Teil im Cytosol zurückgehalten wird. Alternativ könnte die FRQ-Verteilung ein dynamisches Gleichgewicht aus Import und Export widerspiegeln („*shuttling*“, s. 1.8), in dem die Kinetiken der Transportprozesse circadian reguliert werden.

Das im Lauf eines circadianen Tages entstehende hyperphosphorylierte FRQ wird schließlich abgebaut [47]. FRQ interagiert mit FWD-1, einer Untereinheit einer Ubiquitin-Ligase vom SCF-Typ*, die Proteine für den proteasomalen Abbau vorbereitet [48, 49]. Da gerade hyperphosphoryliertes FRQ abgebaut wird, könnten Phosphorylierungen ein direktes Signal für die Abbaumaschinerie sein oder andere Reifungsprozesse von FRQ regulieren, die schließlich zum Abbau führen. Die Stabilität des $SCF^{FWD\text{-}1}$-Komplexes wird in *S. cerevisiae* durch das COP9-Signalosom reguliert. In einem

* Skp1, Cul1, F-Box-Protein

COP9-defizienten *Neurospora*-Stamm wird FRQ verzögert abgebaut, und der circadiane Rhythmus ist stark beeinträchtigt [50].

Mehrere Phosphorylierungsstellen wurden durch Sequenzanalyse von FRQ, *in vitro*-Phosphorylierungsversuche oder ortsgerichtete Mutagenesen *in vivo* gefunden, des Weiteren wurden einige Proteinkinasen und -phosphatasen identifiziert, die FRQ *in vitro* (de)phosphorylieren und *in vivo* seinen Phosphorylierungszustand sowie die Funktion der circadianen Uhr beeinflussen [47, 43, 51, 52, 53, 54, 33]. Beispielsweise erhöhen die Mutationen S513R bzw. S513I die Lebensdauer des Proteins und verlängern die Periodendauer auf 31 h [47]. Wird Serin 513 zu Asparaginsäure mutiert, ist das Abbauverhalten wieder normal, doch ist der Stamm nur noch auf molekularer Ebene rhythmisch. Eine Kinase, die S513 phosphoryliert, wurde bisher nicht identifiziert.

PRD-4, ein Ortholog der Checkpoint Kinase 2 (Chk2) aus Säugern, phosphoryliert FRQ *in vivo* nach DNA-Beschädigung (z. B. durch alkylierende Agenzien) und verschiebt so tageszeitabhängig die Phase der circadianen Uhr. Umgekehrt ist die Expression von PRD-4 circadian reguliert, es besteht damit eine Verbindung von Uhr und Zellzyklus [55]. Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase I (CAMK-I) und Caseinkinase II (CK-II) phosphorylieren *in vitro* einen zentralen Bereich von FRQ, Deletion von CAMK-I hat aber kaum Auswirkungen auf die circadiane Uhr, vermutlich weil seine Funktion durch die strukturell verwandte CAMK-II übernommen werden kann.

CK-II besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten (kodiert von *cka*) und zwei regulatorischen (*ckb1* und *ckb2*). Stämme mit defekter katalytischer Untereinheit (cka^{RIP}) bzw. deletierter *ckb1* sind in Wachstum und Entwicklung stark beeinträchtigt. Beide zeigen erhöhte *frq*-mRNA-Mengen, cka^{RIP} ohne erkennbare circadiane Schwankungen [52], Δ*ckb1* mit Oszillationen kleiner Amplitude und langer Periodendauer auf molekularer Ebene [53]. In cka^{RIP} ist der WCC hypophosphoryliert, CK-II ist damit an der FRQ-abhängigen Deaktivierung des WCC beteiligt (s. u.) [56]. Die Lebensdauer von FRQ ist in den beiden Stämmen erhöht, das Protein hypophosphoryliert. CK-II phosphoryliert Serin- und Threoninreste drei Aminosäurereste N-terminal von negativ geladenenen Seitenketten, Konsensussequenz (S/T)xx(D/E/^{P}S/^{P}T). Allein das Muster (S/T)xx(D/E) kommt 29-mal in FRQ vor; werden mehrere dieser Konsensussequenzen mutiert, entstehen Stämme mit schwächer phosphoryliertem FRQ und verlängerter Periodendauer [53]. Bedeutsam könnten auch Sequenzmuster wie (S/T)[xx(S/T)]$_n$ sein, denn sobald eine Kinase den C-terminalen Serin- bzw. Threoninrest phosphoryliert hat, kann CK-II sukzessiv alle anderen phosphorylieren [57].

FRQ besitzt zwei sogenannte PEST-Regionen (PEST-1: Aminosäurereste 544–560, PEST-2: Aminosäurereste 843–893) [58]; dies sind Bereiche, in denen die Aminosäuren Prolin, Glutaminsäure/Asparaginsäure, Serin und Threonin häufig vorkommen [59]. PEST-Sequenzen werden oft phosphoryliert und sind am Abbau von Proteinen beteiligt [60]. Beide PEST-Regionen von FRQ werden *in vivo* phosphoryliert [43, 33]. Die Deletion von PEST-1 stabilisiert FRQ; wird das Protein im normalen genetischen Kontext exprimiert, hat der betreffende Stamm einen Rhythmus mit lan-

ger Periode (28 h) auf *frq*-mRNA- und FRQ-Protein-Ebene, die rhythmische Konidienbildung aber unterbleibt [43]. *In vitro* wird PEST-1 durch CK-1a phosphoryliert, dem Ortholog von DOUBLE-TIME (DBT) aus *D. melanogaster* und CK-1δ/ε aus Säugern, die beide jeweils für den circadianen Rhythmus benötigt werden. PEST-2 wird *in vitro* von CK-1a und CK-1b phosphoryliert. CK-1b, das zweite CK-1-Homolog von *N. crassa*, phosphoryliert PEST-1 *in vitro* nicht [43], befindet sich nicht im Komplex mit FRQ und hat trotz großer Bedeutung für Wachstum und Entwicklung keine Funktion in der circadianen Uhr [53]. Eventuell kann aber PEST-2 *in vivo* von beiden CK-1-Homologen in redundanter Weise phosphoryliert werden.

CK-1a phosphoryliert PEST-2 an S885 und S887, was zur Akkumulation von WC-1 und damit WCC führt [33]. Deletion von PEST-2 oder Mutation der beiden Serinreste zu nicht phosphorylierbaren Asparginresten ergibt sehr geringe WC-1-Konzentrationen und Verlust der Rhythmizität, Mutation zu Asparaginsäureresten (die Phospho-Serinreste imitieren sollen) stellt die ursprünglichen WC-1-Mengen und den Rhythmus wieder her, wobei die Phase der Konidienbildung um 3 h vorgeschoben wird. PEST-2-Phosphorylierung ist also notwendig für die WC-1-Expression (positive Rückkopplung, s. 1.5.2) und den Beginn der Konidienbildung während des circadianen Tages.

Die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A dephosphorylieren FRQ *in vitro*, und beide regulieren *in vivo* FRQ sowie den circadianen Rhythmus auf bestimmte Weise [54]. Allerdings ist nicht bekannt, ob sie oder einzelne ihrer Untereinheiten rhythmisch exprimiert werden. PP1 erhöht die Stabilität von FRQ, denn ein Stamm mit einer nur teilweise funktionalen katalytischen Untereinheit von PP1 (*ppp-1*^{RIP}) weist auf molekularer wie physiologischer Ebene eine verkürzte Periodendauer auf, und die Phase der Konidienbildung ist vorgeschoben. Ein Stamm, dem RGB-1, eine regulatorische Untereinheit von PP2A, fehlt (*rgb-1*^{RIP}), ist stark im Zellwachstum behindert und bildet mit irregulärem Rhythmus Konidien bei einer gemittelten Periodendauer länger als 24 h. *frq*-mRNA- und FRQ-Gesamtmengen sind gegenüber dem Wildtyp reduziert, weil PP2A an der Aktivierung des WCC beteiligt ist, was die Transkription von *frq* auslöst [30]. Eine direkte Wirkung auf FRQ kann dennoch nicht ausgeschlossen werden.

1.5 Der *White Collar*-Komplex

Die Zinkfinger-Proteine WC-1 und WC-2 sind Transkriptionsfaktoren vom GATA-Typ und bilden zusammen den White Collar-Komplex [27]. WC-2 liegt immer im Überschuss zu WC-1 vor, und ohne WC-2 kann nur wenig WC-1 akkumulieren [35]. Der WCC ist in den Zellkernen stark angereichert, während freies WC-2 sowohl im Kern als auch im Cytosol vorhanden ist [28]. Ob Letzteres eine physiologische Funktion besitzt, ist unbekannt; der WCC reguliert die Expression von *frq* [40] und anderer uhrenkontrollierter bzw. lichtinduzierbarer Gene.

WC-1 setzt sich zusammen aus drei sogenannten PAS-Domänen*, einem basischen Abschnitt, der als NLS fungieren könnte, sowie dem bereits erwähnten Zinkfinger vom GATA-Typ [61, 62]; an N- und C-Terminus befinden sich Polyglutamin-Bereiche. PAS-A ist eine spezialisierte sogenannte LOV-Domäne†, die für Lichtreaktionen benötigt wird [62] und als prosthetische Gruppe FAD kovalent gebunden hat (vgl. 1.6) [63]. WC-2 besteht aus einer einzelnen PAS-Domäne sowie dem GATA-Typ-Zinkfinger [64], der auf beiden Seiten von basischen Abschnitten flankiert wird, die als NLS dienen könnten, ohne aber Übereinstimmungen mit kanonischen Kernlokalisationssequenzen aufzuweisen. WC-1 und WC-2 können unabhängig voneinander in den Zellkern gelangen [28, 36], aber es ist unbekannt, ob der WCC evtl. nur in einem bestimmten Zellkompartiment zusammengesetzt werden kann.

Bisher wurden lediglich vier WCC-Bindestellen im *Neurospora*-Genom identifiziert: eine im *albino-3*-Promotor, eine im *vivid*- (s. 1.6) und zwei im *frq*-Promotor [65]. Bei den letzteren beiden handelt es sich um das proximale lichtreaktive Element (*light responsive element*, LRE) sowie das distale LRE oder *clock box* des *frq*-Promotors [37, 38].

1.5.1 Mechanismus der negativen Rückkopplung

FRQ reprimiert die Transkription seiner eigenen mRNA, die zuvor durch Bindung des WCC an seinen Promotor ausgelöst wurde. Die Inhibition erfolgt aber wahrscheinlich nicht durch direkte stöchiometrische Wechselwirkung mit dem WCC: Zwar beginnt die *frq*-mRNA-Menge zu sinken, wenn das nukleäre FRQ seine höchste Konzentration erreicht [41], aber beide fallen danach nahezu parallel, trotz abnehmender Menge muss also die Repressorstärke des verbliebenen nukleären FRQ zunehmen. Des Weiteren befinden sich sowohl *frq*-mRNA als auch nukleäres FRQ nahezu in ihrem Minimum, während die WCC-Menge ihr Maximum erreicht [31, 35, 43]. Weder die absolute Konzentration von FRQ im Zellkern noch das Konzentrationsverhältnis zum WCC korrelieren demnach mit der Stärke der *frq*-Repression, zumal die FRQ-Menge im Zellkern während des gesamten circadianen Tages unter der des WCC liegt [30] und eine Assoziation zwischen beiden bis auf einen geringen Anteil nicht nachweisbar ist [35, 29].

Die Aktivität des WCC wird vielmehr durch seinen Phosphorylierungszustand bestimmt, welcher wiederum von FRQ beeinflusst wird [30]: Hyperphosphorylierter WCC bindet schwächer an die *clock box* und unterstützt weniger die *frq*-Transkription als hypophosphorylierter. Der Phosphorylierungsstatus von WC-2 (und vermutlich auch WC-1) oszilliert im Laufe des circadianen Tages und korreliert mit der *frq*-Transkriptionsrate. Die stärkste Phosphorylierung ist während der subjektiven Abenddämmerung und in der ersten Nachthälfte zu beobachten, die geringste um die Mor-

* PER, ARNT, SIM

† *light*, *oxygen*, *voltage* – Licht, Sauerstoff, (elektrische) Spannung

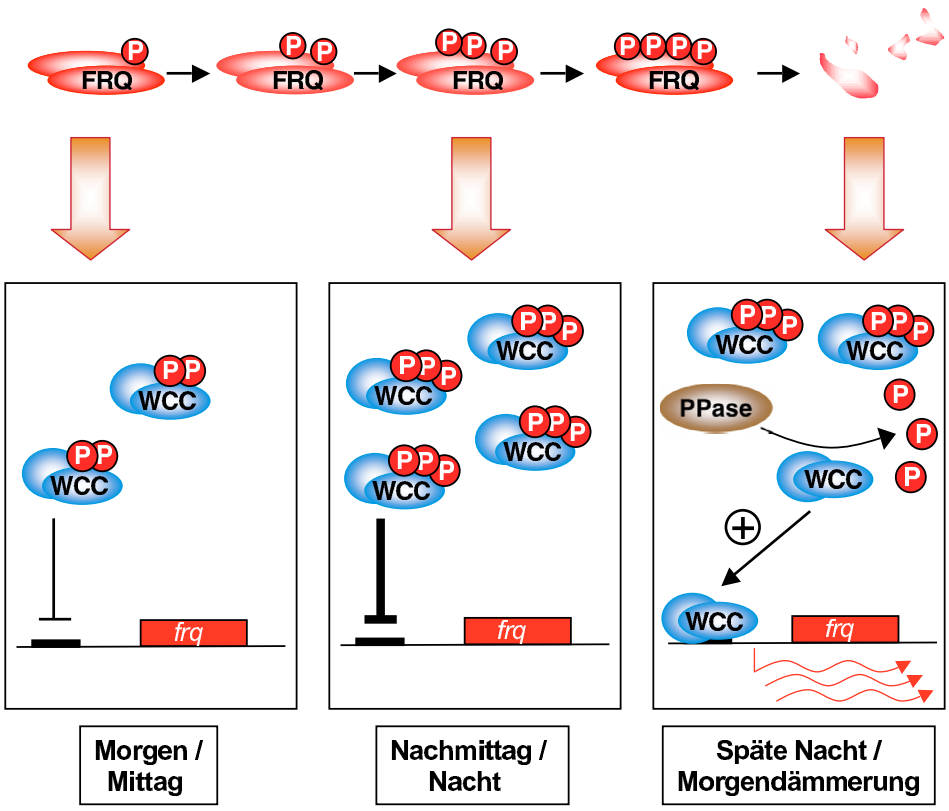

Abbildung 6: Modell der negativen Rückkopplung von FRQ auf die Expression seiner eigenen mRNA, nach [34] (verändert); PPase: Proteinphosphatase, P: Phosphat(-rest)

gendämmerung. CK-1a und CK-II phosphorylieren den WCC *in vivo* und deaktivieren ihn dadurch [56]. Die Aktivierung des WCC ist abhängig von RGB-1, der bereits zuvor erwähnten regulatorischen Untereinheit von PP2A, und geht mit der Dephosphorylierung von WC-1 und WC-2 einher [30]. FRQ moduliert dieses Gleichgewicht aus Phosphorylierung und Desphosphorylierung nach einem circadianen Muster. Zu keinem Zeitpunkt, auch nicht im Maximum der *frq*-mRNA, ist der WCC vollständig dephosphoryliert, umgekehrt ist sein Phosphorylierungsmuster auch im Minimum der Transkription noch heterogen. Es wird also niemals der gesamte WCC-Vorrat deaktiviert, eine basale Transkription findet auch zu Zeiten der geringsten *frq*-mRNA-Konzentrationen noch statt. Vollständige Aktivierung des WCC kann erreicht werden, wenn FRQ nach Expression über einen regulierbaren heterologen Promotor plötzlich stark reprimiert wird oder die Translation durch Cycloheximid abrupt beendet wird [30], wobei der WCC weitgehend dephosphoryliert wird und die *frq*-Transktiption sehr stark zunimmt.

Unter konstanten Bedingungen setzt die FRQ-abhängige Inaktivierung des WCC ein, bevor die Gesamtmenge vollständig aktiviert werden kann, und die circadiane Oszillation der *frq*-mRNA wird durch Verschiebung des Anteils von aktivem WCC in der Gesamtpopulation bedingt. FRQ modu-

liert das Kinase-/Phosphatase-Gleichgewicht nur leicht, so dass sich der Phosphorylierungsstatus des WCC nur langsam ändert und seine (De)aktivierung im Zeitrahmen eines circadianen Tages stattfindet. Die Rekrutierung von aktivem WCC aus einer größtenteils inaktiven Population könnte zur Stabilität des Rhythmus beitragen, denn (De)phosphorylierung kann viel schneller geschehen als proteolytischer Abbau und Neusynthese. Die Neusynthese von WC-1 und WC-2 füllt eher den WCC-Vorrat auf als dass sie der Erzeugung des circadianen Rhythmus dient.

1.5.2 Positive Rückkopplung

Der negativen Rückkopplung steht eine positive gegenüber, bei der FRQ die Akkumulation größerer WCC-Mengen fördert [31, 32]. Dies kommt teilweise durch Transkriptionsregulation zustande, denn während der WCC die Transkription von *wc-2* reprimiert, aktiviert FRQ diese [32, 66]. Der genaue Mechanimus ist nicht bekannt; möglicherweise bewirkt der WCC die Expression eines Repressors von *wc-2*, und da FRQ den WCC inaktiviert, würde es indirekt durch Repression des putativen Repressors die *wc-2*-Transkription fördern, ähnlich den PERIOD (PER)-Proteinen in Säugern [67, 68] und *D. melanogaster* [69, 70]. FRQ beeinflusst auch die Transkription von *wc-1*, die in begrenztem Maß vom WCC abhängig ist [64, 71]. Keines der *white collar*-Gene wird indes rhythmisch transkribiert, und die Rückkopplung von FRQ auf deren Transkription ist weder notwendig noch hinreichend für die Akkumulation des WCC [31, 32]. Insbesondere sind die WCC-Mengen auch dann von FRQ abhängig, wenn *wc-1* und *wc-2* effizient durch einen heterologen Promotor transkribiert werden [32, 33]. Heterolog induzierte Transkription von *wc-2* in Abwesenheit von FRQ führt zur Überexpression von WC-2, nicht aber zur Akkumulation des WCC; WC-2 ist also für den WCC kein limitierender Faktor. Wird *wc-1*-mRNA in einem *frq*-Deletionsstamm heterolog induziert, entsteht kaum zusätzliches WC-1, allerdings ist unklar, ob FRQ die Akkumulation des WCC hervorruft, indem es die Translation von *wc-1*-mRNA fördert oder den Zusammenbau des WCC [33]. Wie erwähnt befindet sich FRQ im Komplex mit FRH, und dieser ist zum größten Teil im Cytosol lokalisiert [46]. Eine Möglichkeit wäre daher, dass der FRQ-FRH-Komplex die Translation der *wc-1*-mRNA reguliert.

Die Akkumulation des WCC setzt voraus, dass größere Mengen von FRQ im Cytosol vorhanden sind und posttranslational modifiziert wurden. Besonders wichtig scheint die Phosphorylierung bestimmter Serinreste innerhalb der PEST-2-Region zu sein (vgl. 1.4 auf Seite 14); diese hat aber keinen Einfluss auf die Repressorkapazität von FRQ [33]. Durch welchen Mechanismus FRQ die WCC-Mengen kontrolliert ist unbekannt; vielleicht sind auch hier FRQ-abhängige Phosphorylierungen des WCC beteiligt. C-terminal des Zinkfingers von WC-1 befinden sich fünf unter konstanten Bedingungen phosphorylierte Serinreste; werden diese durch Alaninreste ersetzt, sinkt die WCC-Menge. *frq*-mRNA und FRQ-Protein bleiben hingegen fast unverändert, so dass Phosphorylierung dieser

Serinreste die WCC-Aktivität vermindert [29]. Außerdem befindet sich der WCC unter konstanten Bedingungen im Komplex mit Proteinkinase C (PKC). Die Expression von konstitutiv aktiven bzw. dominant negativen PKC-Formen führt zu verringerten bzw. erhöhten WCC-Konzentrationen, so dass PKC die WCC-Menge negativ reguliert [72]. In beiden Fällen ist noch unbekannt, ob FRQ an der Regulation beteiligt ist.

1.5.3 Integration der Rückkopplungswege

Die Funktionen von FRQ in der negativen und positiven Rückkopplung sind also unabhängig voneinander, sie finden in unterschiedlichen Kompartimenten statt und werden von verschiedenen FRQ-Populationen vermittelt, die sich im Phosphorylierungsstatus unterscheiden. Fortschreitende (Hyper-) Phosphorylierung scheint die FRQ-Reifung vom nukleären Repressor zum cytosolischen Aktivator auszulösen.

Während eines circadianen Zyklus wirkt zunächst neu synthetisiertes hypophosphoryliertes FRQ indirekt als Repressor, indem es die Phosphorylierung des WCC im Zellkern fördert. Später im Zyklus sind neben hypo- auch hyperphosphorylierte Formen in Cytosol und Zellkern vorhanden, und FRQ unterstützt zusätzlich die Bildung des WCC, wobei neu entstandener WCC im Zellkern sofort FRQ-abhängig inaktiviert wird. FRQ bewirkt also die Akkumulation großer Mengen seines inaktiven Transkriptionsfaktors, so dass die *frq*-Transkription vorerst reprimiert bleibt. Noch später im Zyklus ist FRQ zum größten Teil hyperphosphoryliert und wird nach und nach abgebaut. Die Dephosphorylierung des WCC durch PP2A überwiegt nun kinetisch gegenüber der FRQ-abhängigen Phosphorylierung, und die große Population von inaktivem WCC wird zunehmend aktiviert. Damit wird die negative Rückkopplung aufgehoben, die *frq*-Transkription steigt und der Zyklus beginnt von vorn.

1.6 Blaulichtrezeption und *Entrainment*

Alle bekannten Lichtreaktionen von *Neurospora* werden durch blaues Licht ausgelöst und benötigen WC-1 und WC-2 in Form des WCC. Dieser erzeugt Lichtreaktionen durch die Transkription lichtinduzierter Gene. Je nach Kinetik der Induktion unterscheidet man direkt aktivierte frühe (Klasse I L, Induktionsbeginn $\leq$5 min) und späte möglicherweise indirekt aktivierte Gene (Klassen II L und III L). Die *albino*-Gene (*al-1* [73], *al-2* [74], *al-3* [75]), verantwortlich für die lichtinduzierte Carotinoidsynthese, sowie *frq* sind prominente Beispiele für frühe Gene, während *ccg-1* und *ccg-2* [76] zu den späten mit Transkriptionsmaxima 1–2 h nach einem Lichtpuls gehören.

Unmittelbare (frühe) Lichtreaktionen werden durch die circadiane Uhr moduliert, so dass gleich starke Lichtsignale morgens eine stärkere Induktion auslösen als abends („*gating*“) [77, 78]. Die

circadian modulierte Lichtreaktion korreliert mit dem circadian regulierten Phosphorylierungsstatus und der circadianen Transkriptionsaktivität des WCC [30]; möglicherweise ist also auch nur ein Teil des WCC lichtaktivierbar. Dauert die Belichtung an, sinkt die induzierte RNA-Menge trotzdem wieder, um spätestens nach zwei Stunden einen relativ geringen Gleichgewichtswert anzunehmen. Diese sogenannte Lichtadaptation wird durch den Blaulichtrezeptor VIVID (VVD, s. u.) erleichtert, der auch die circadiane Modulation der Lichtreaktion bewirkt [78].

Der Mechanismus der Lichtinduktion durch den WCC ist zum Teil aufgeklärt. Licht bewirkt, dass der WCC an lichtreaktive Elemente im Promotorbereich der frühen Gene bindet, und verstärkt dessen Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung [65]. Die Bindung erfolgt schnell mit einem Maximum ca. 5 min nach Lichtexposition, während die lichtabhängige WC-1-Hyperphosphorylierung langsamer stattfindet und ihr Maximum nach 15–30 min erreicht. Zum Zeitpunkt der höchsten LRE-Affinität des WCC ist nur wenig hyperphosphoryliertes WC-1 vorhanden [65]. *In vitro* nimmt nicht nur die LRE-Affinität des WCC durch Licht zu, sondern die elektrophoretische Mobilität des an synthetische LRE-Oligonukleotide gebundenen WCC nimmt ab, was bedeuten kann, dass sich die Konformation und/oder Zusammensetzung des WCC-LRE-Komplexes verändert. Phosphorylierung ist keine Voraussetzung für die LRE-Bindung, vielmehr kann Phosphatasebehandlung die LRE-Affinität von hyperphosphoryliertem WCC erhöhen. Licht ermöglicht die Phosphorylierung des WCC durch bislang nicht identifizierte Kinasen, was durch Reduktion der LRE-Affinität zur Inaktivierung führt [65]. Weiterhin löst Lichtaktivierung von WC-1 die Actylierung von Histonen im Promotorbereich von *al-3* und *vvd* aus [79].

Wie und in welchem Ausmaß nach Lichtexposition inaktiviertes WC-1 wiederverwendet wird, ist nicht völlig klar. Das hyperphosphorylierte WC-1 verschwindet recht schnell, teils durch Abbau und teils durch Dephosphorylierung. Lichtaktiviertes WC-1 ist im Dauerlicht weniger stabil, und ein beträchtlicher Teil wird abgebaut [27]. Im Dunkeln dagegen ist WC-1 stabil [31], und durch Lichtexposition hyperphosphoryliertes WC-1 wird nach Rückkehr ins Dunkle binnen zwei Stunden dephosphoryliert [29]. Trotzdem kann dieses WC-1 mehrere Stunden lang nicht wieder durch Licht aktiviert werden, der Photozyklus scheint also im Vergleich zu den strukturell verwandten pflanzlichen Phototropinen sehr langsam zu sein. Im Dauerlicht ersetzt neu synthetisiertes WC-1 ständig das abgebaute, wird selbst schnell aktiviert und hyperphosphoryliert, so dass ein Fließgleichgewicht mit einem erhöhten Anteil aktiviertem WC-1 entsteht.

Die Lichtreaktion wird durch Desensibilisierung des WCC-Photosystems von VIVID (VVD) gedämpft [78, 81, 82]. VVD ist ein Blaulichtrezeptor [78, 83], der fast nur aus einer FAD-bindenden LOV-Domäne besteht [84, 80]. Das Gen gehört zur Gruppe I L, wird vom WCC kontrolliert und im Dunkeln nicht exprimiert [78, 81, 82]. Bei Lichtexposition steigt die *vvd*-Transkription schnell an und erreicht nach ca. 15 min ihr Maximum. Danach fällt die mRNA-Menge auf ein kleines aber noch detektierbares Gleichgewichtsniveau. Die Proteinmenge erreicht ihr Maximum etwa 30 min

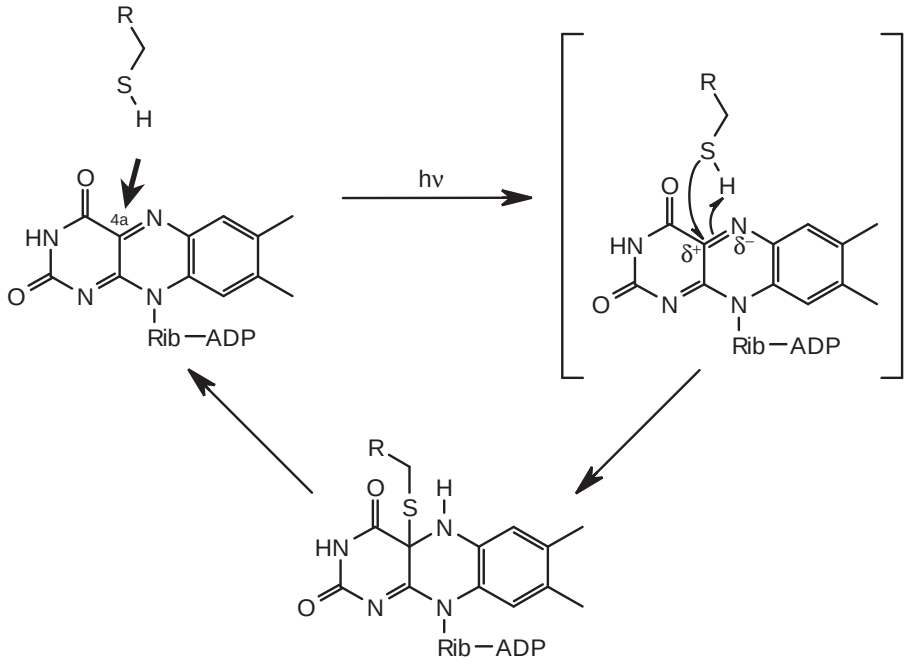

Abbildung 7: Lichtabhängiger Reaktionszyklus von FAD in der LOV-Domäne von VVD [80] und wahrscheinlich auch WC-1.

nach Expositionsbeginn, im Dauerlicht wird VVD ständig in geringerer Menge exprimert [85]. VVD bewirkt die schnelle Lichtadaptation der WCC-abhängigen Transkription von frühen lichtinduzierbaren Genen (dazu gehört auch *vvd* selbst). In einem *vvd*-defizienten Stamm werden diese Gene bei Lichtexposition längere Zeit transkribiert, und hyperphosphoryliertes WC-1 ist mehrere Stunden nachweisbar [78, 81]. VVD befindet sich fast vollständig im Cytosol [84]; wie es den Phosphorylierungszustand und die Aktivität des größtenteils nukleären WCC beeinflussen kann ist unbekannt.

Die *frq*-Transkription wird durch Licht stark induziert. Daher spiegelt die *frq*-mRNA-Menge in Licht-Dunkel-(LD-)Zyklen unmittelbar die Lichtverhältnisse wider, der Rhythmus ist scheinbar allein lichtgesteuert [86]. Weil aber die Phase der Konidienbildung in LD- oder Temperaturzyklen *entrained* wird, muss die circadiane Uhr unter diesen Bedingungen weiterlaufen. VVD ist für das Licht-*Entrainment* der circadianen Uhr sehr wichtig [78, 85]. Wird *Neurospora* vom Licht ins Dunkle überführt, wird *vvd* rhythmisch mit stark gedämpfter Amplitude exprimiert, bis nach 40 h keine *vvd*-mRNA mehr nachweisbar ist [78]. Für den Rhythmus der frei laufenden Uhr im Dunkeln wird VVD nicht benötigt [85]; es beeinflusst die Phase der Konidienbildung nach einem L→D-Transfer. VVD dämpft die Lichtreaktion in der Morgendämmerung, indem es den WCC inhibiert, und es verändert die *frq*-mRNA-Menge während der Abenddämmerung, vermutlich durch verstärkten Abbau. Beide Effekte zusammen tragen zum Licht-*Entrainment* bei. Die Kristallstruktur von VVD wurde im inaktiven sowie lichtaktivierten Zustand geklärt; wie bei pflanzlichen Phototropinen bildet sich nach

Blaulichteinstrahlung ein kovalentes Addukt zwischen der Thiolgruppe eines Cysteinrests und C4a des Riboflavinrests, was zu einer leichten Konformationsänderung des Proteins führt [80].

1.7 Temperaturwahrnehmung

Zwei benachbarte Promotoren kontrollieren die Transkription von *frq*, die zugehörigen mRNAs besitzen lange 5'-untranslatierte Regionen (UTR) und werden auf komplexe Weise gespleißt [87, 88, 89]. Zusätzlich wird eine *antisense*-RNA in geringer Menge transkribiert, die den kodierenden Bereich von FRQ abdeckt [90]. Ein einziger Leserahmen kodiert die große (*large*, „l“, 989 Aminosäurereste) und kleine (*small*, „s“, 890 Aminosäurereste) FRQ-Isoform, die durch Translationsinitiation an Position 1 (ATG #1) bzw. 100 (ATG #3) entstehen [26].

Das Verhältnis der Isoformen wird durch temperaturabhängiges Spleißen reguliert: Beim Herausspleißen eines bestimmten Introns wird die Translationsinitiationsstelle von l-FRQ entfernt, es kann nur noch s-FRQ entstehen. Dieser Spleißvorgang ist temperaturabhängig, weil die Nukleotidsequenzen der Spleißstellen von den üblichen Konsensussequenzen abweichen und von der Spleißmaschinerie bei erhöhten Temperaturen nicht mehr zuverlässig erkannt werden. Deshalb wird das betreffende Intron bevorzugt bei niedrigerer Temperatur herausgespleißt, was zur Akkumulation einer mRNA führt, die nur s-FRQ kodiert. Wird das Intron nicht entfernt, sind beide möglichen Initiationsstellen in der mRNA vorhanden, die Translation beginnt aber am ersten Startkodon und es entsteht l-FRQ.

Die Gesamtmenge an FRQ wird durch temperaturabhängige alternative Translationsinitiation bestimmt: Die 5'-UTR von *frq* enthält mehrere kleine offene Leserahmen (*upstream* ORFs, uORFs), von denen zwei in allen Spleißvarianten der *frq*-mRNA erhalten bleiben. Die Translationsinitiationsstellen dieser Leserahmen weichen von der bekannten Konsensussequenz ab und werden vom Translationsinitiationskomplex bei erhöhter Temperatur leichter überlesen. Damit kann die Initiation am FRQ-Startkodon stattfinden und das Protein wird translatiert. Bei geringerer Temperatur wird dagegen häufiger ein uORF translatiert, und weil auf dessen 3'-Seite keine Reinitiation stattfindet, sinkt die Translationshäufigkeit des FRQ-Leserahmens.

Als Konsequenz dieser beiden Regulationsmechanismen werden l-FRQ und s-FRQ temperaturabhängig exprimiert: Die l-FRQ-Menge steigt mit zunehmender Temperatur deutlich, während die s-FRQ-Menge fast unverändert bleibt. Dies hat Konsequenzen für das Temperatur-*Entrainment* (Abb. 8): Die maximale FRQ-Menge während eines circadianen Tages bei geringer Temperatur liegt unter der minimalen bei hoher Temperatur. Bei einer plötzlichen Temperaturabsenkung wird die Uhr auf die circadiane Zeit des FRQ-Maximums eingestellt (Abenddämmerung), egal welche circadiane Zeit vor dem Temperaturwechsel vorlag. Steigt die Temperatur plötzlich an, wird die circadiane Uhr

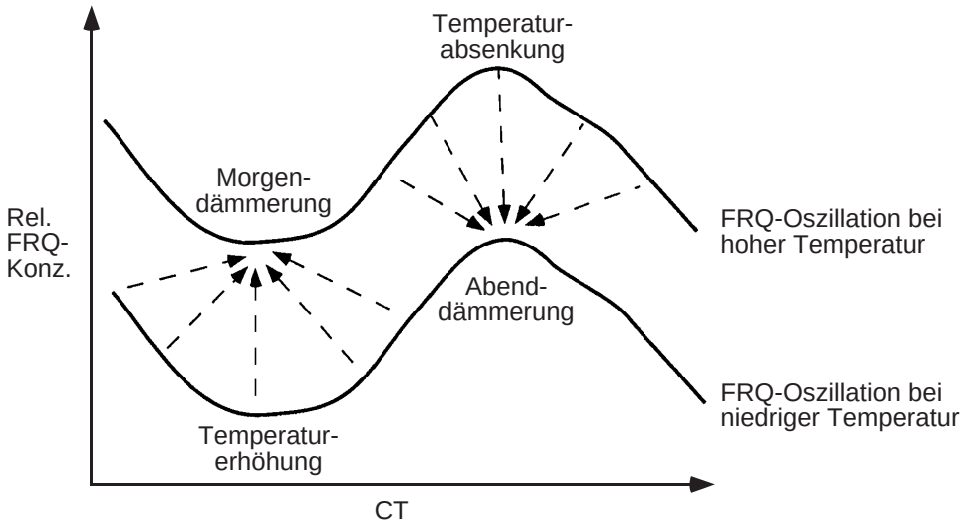

Abbildung 8: Modell des Stellens der circadianen Uhr von *N. crassa* bei schnellen Temperaturwechseln (nach [91], verändert)

auf den Zeitpunkt des FRQ-Minimums (Morgendämmerung) eingestellt, ebenfalls unabhängig von der vorherigen circadianen Zeit.

1.8 Kerntransport von Proteinen [92]

Die Kompartimentierung eukaryontischer Zellen macht eine Vielzahl von Transportprozessen erforderlich, um Biomembranen als Abgrenzungen dieser Kompartimente zu überwinden. Proteine beispielsweise werden durch Ribosomen im Cytosol und am rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert*, viele müssen aber die Zellorganellen des sekretorischen Wegs durchlaufen bzw. in andere membrangebundene Organellen wie Mitochondrien, Plastiden, Peroxysomen und den Zellkern importiert werden, um dort ihre Funktion zu erfüllen. Der Zellkern im Besonderen exportiert aber auch eine große Menge von Ribonukleinsäuren bzw. Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs) wie mRNAs, tRNAs und ribosomale Untereinheiten (diese werden im Zellkern durch einen hochkomplexen Mechanismus aus rRNAs und im Cytosol translatierten Proteinen zusammengesetzt). Er besitzt eine Doppelmembran, die von Kernporen durchbrochen ist. Diese sind mit den Proteinen des Kernporenkomplex (Nukleoporinen) [93, 94] besetzt, die Import- und Exportprozesse katalysieren und regulieren (der Export von Ribonukleinsäuren bzw. RNPs soll an dieser Stelle nicht erläutert werden, es sei auf entsprechende Übersichtsartikel verwiesen [95, 96]). Kernporen bilden keine dichte Barriere wie die innere Mitochondrienmembran, sondern haben einen Innendurchmesser von 9 nm und sind für kleine Moleküle, Ionen sowie Proteine unter ca. 40–60 kDa durchlässig. Größere Proteine,

* einige auch in der Mitochondrienmatrix bzw. dem Plastidenstroma

Proteinkomplexe sowie RNPs benötigen Transportsysteme und müssen bestimmte Transportsignale tragen, um von diesen Systemen erkannt zu werden. Anders als die Signalpeptide beim kotranslationalen Proteinimport ins raue endoplasmatische Retikulum oder dem posttranlationalen Import ins Mitochondrium werden die Kerntransportsignale nach der Translokation nicht entfernt, was insbesondere bei Organismen sinnvoll erscheint, die eine offene Mitose (unter Auflösung der Kernhülle) durchführen.

1.8.1 Import

Das am besten untersuchte Beispiel ist der Kernimport von Proteinen mit einem „klassischen“ stark basischen Kernlokalisationssignal (*nuclear localisation signal* [97], NLS), wie es auch in FRQ vorkommt. Es besteht aus einer Folge basischer Aminosäurereste; bekanntestes Bespiel ist das NLS der Simian Virus 40 (SV40) Large T Antigen mit der Sequenz P**KKKRK**V. Ähnlich sind zweigeteilte NLS aufgebaut; sie besitzen eine weitere kurze Folge basischer Aminosäurereste, die mit der ersten durch einen flexiblen Abschnitt verbunden ist (bekanntestes Beispiel: Nukleoplasmin, **KR**PAATKKAGQA**KKKK**). Beide werden von Importin α erkannt, das zur großen Gruppe der Karyopherine gehört. Importin α fungiert als Adaptorprotein, über das die zu importierenden Proteine mit Importin $\beta 1$ assoziieren, einem weiteren Mitglied der Karyopherin-Familie. Der Komplex aus Importin α, Importin $\beta 1$ und NLS-Protein transloziert in den Zellkern, wobei Importin $\beta 1$ intermediär an Phenylalanin-Glycin-(FG-)Wiederholungen bestimmter Nukleoporine bindet. Im Kern verdrängt Ran·GTP (s. u.) Importin α, das dabei das Importsubstrat freigibt; Importin $\beta 1$ gelangt im Komplex mit Ran·GTP ins Cytosol zurück.

Außer den Proteinen mit klassischem NLS gibt es eine ganze Reihe von Importsubstraten, bei denen keine so offensichtliche Konsensus-Sequenz zu finden ist. Manche besitzen einige basische Aminosäurereste in ihrem NLS (u. a. ribosomale oder Histonproteine), andere z. B. einen größeren glycinreichen Bereich (M9-Domäne in hnRNP A1). Sie binden direkt (ohne Vermittlung eines Adaptor-Proteins) jeweils an bestimmte Importine und werden analog den klassichen NLS-Proteinen in den Zellkern transporiert, wobei sie ebenfalls durch Ran·GTP freigesetzt werden. Auch Importin $\beta 1$ kann ohne Adaptor mit Substraten assoziieren; dabei werden verschiedene Interaktionsflächen genutzt, die nicht mit der Importin α-Bindestelle übereinstimmen. Einige Proteine treten selbst mit den FG-Wiederholungen von Nukleoporinen in Kontakt und benötigen daher wahrscheinlich keine Importine, allerdings müssen sie zur Anreicherung im Zellkern festgehalten werden (Retention, z. B. im Nukleolus, durch Bindung an Chromatin oder die Innenseite der Kernhülle), weil sie sonst wieder durch die Kernporen entweichen können.

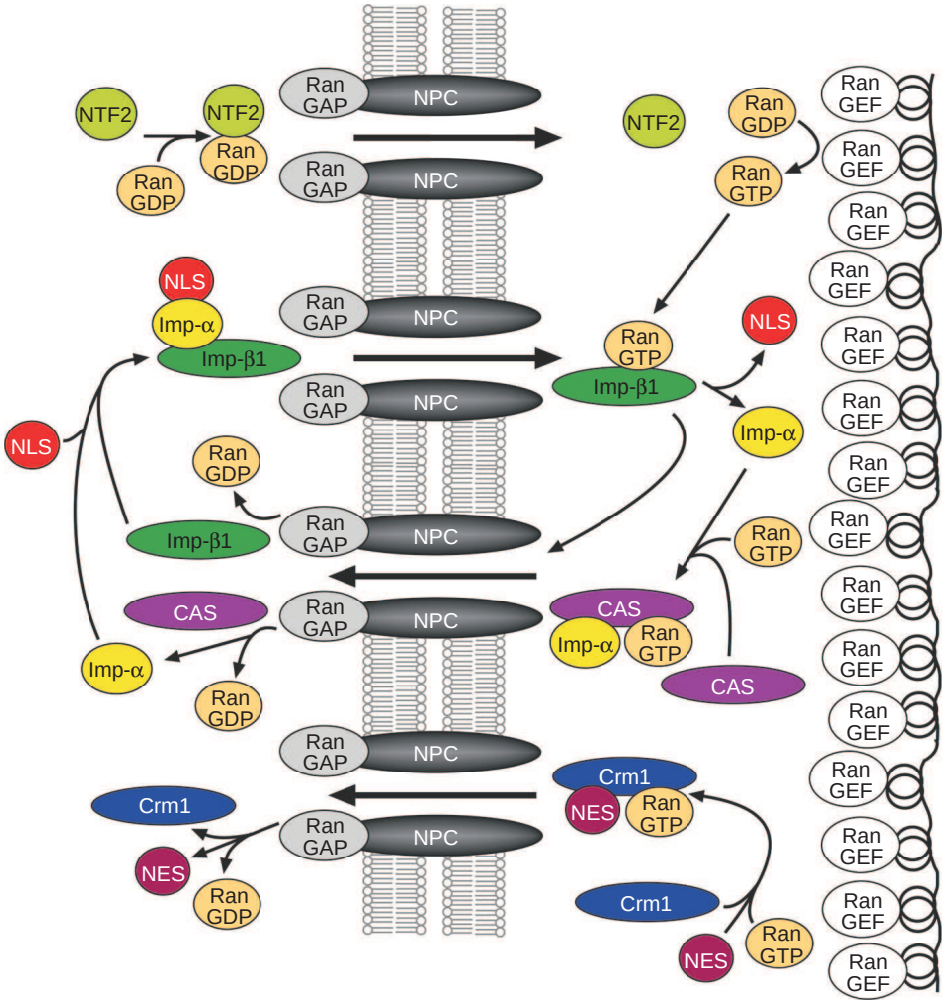

Abbildung 9: Wichtige Kernimport- und -exportprozesse, vereinfachtes Schema nach [92] (verändert); NPC: Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*), NLS: Importsubstrat mit klassischem NLS, NES: Exportsubstrat mit leucinreichem NES, Imp-α/β1: Importin α/β1, übrige Abkürzungen siehe Text

1.8.2 Export

Der Export von Proteinen aus dem Zellkern erfolgt durch sogenannte Exportine, die ebenfalls zu den Karyopherinen gehören. Ähnlich wie beim Import konnte für einen Teil dieser Proteine ein Konsensus-NES (*nuclear export signal*, Kernexportsignal) bestimmt werden, das mehrere hydrophobe Aminosäurereste (Φ) – deutlich bevorzugt ist Leucin – in bestimmten Abständen aufweist ($\Phi X_{2-3}\Phi X_{1-3}\Phi X\Phi$, z. B. Proteinkinase A-Inhibitor: **L**ALK**L**AG**L**D**I**) [98, 99]. Dieses wird vom Exportin CRM1 erkannt, welches aber auch leucinreiche NES bindet, die deutlich von der Konsensus-Sequenz abweichen. Nach Assoziation mit Ran·GTP transloziert der Komplex ins Cytosol, wobei CRM1 – wie die β-Importine – intermediär an FG-Wiederholungen bestimmter Nukleoporine bin-

det. Sobald das Ran-gebundene GTP zu GDP hydrolysiert worden ist, zerfällt der Komplex. Der CRM1-abhängige Export kann durch Leptomycin B gehemmt werden [100].

Neben CRM1 existieren weitere Exportine für unterschiedliche Substrate, die denselben Ran·GTP-abhängigen Transportmechanismus verwenden. Unter diesen besitzt CAS eine spezielle Funktion, es bringt Importin α zurück ins Cytosol. Die meisten der bisher identifizierten Transportsubstrate von Msn5p, einem *S. cerevisiae*-Exportin, zu dem auch in anderen Organismen Homologe existieren (Exportin 5-Orthologe, [101]), sind phosphorlyiert, so dass dieses ein Phosphoprotein-spezifischer Transporter sein könnte. Daneben exportiert Msn5p aber auch kurze doppelsträngige RNAs (sogenannte microRNAs, miRNAs) [102].

1.8.3 Direktionalität des Transports durch Ran

Ran ist ein Mitglied der Ras-Familie kleiner GTPasen, besitzt aber keinen Membrananker und ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert. Wie andere Ras-verwandte GTPasen hat es nur eine recht geringe intrinsische GTPase-Aktivität, die aber durch Aktivatorproteine um ein Vielfaches gesteigert werden kann (s. u.). Im Cytosol ist Ran fast ausschließlich mit GDP beladen, im Zellkern dagegen mit GTP. Dieser Unterschied wird durch die Verteilung von RanGAP (GTPase-aktivierendes Protein) und RanGEF (Guaninnukleotid-Austauschfaktor, *guanine nucleotide exchange factor*) bedingt: RanGAP ist im Cytosol lokalisiert und stimuliert die GTPase-Aktivität von Ran um mehrere Größenordnungen. RanGEF dagegen ist chromatingebunden (es interagiert direkt mit den Histonen 2A und 2B; Häufigkeit: etwa ein RanGEF-Molekül pro Nukleosom) und bewirkt so im Zellkern den Austausch von GDP gegen das im großen Überschuss vorliegende GTP.

Ran besitzt große Bedeutung für die Direktionalität der Kerntransportvorgänge, gleichzeitig ist es bisher die einzige bekannte Komponente, die Energie in den Prozess einspeist (durch Hydrolyse von GTP). Ran·GTP bewirkt die Freisetzung des Importsubstrats bzw. des beladenen Importin α im Zellkern und ist in alle Karyopherin-Exportvorgängen direkt involviert. Auf der cytosolischen Seite führt GTP-Hydrolyse zur Dissoziation des Karyopherin-Ran-Komplexes. Neben RanGAP sind zwei weitere Proteine an der Stimulation der GTPase-Aktivität von Ran beteiligt: RanBP1 (Ran-bindendes Protein 1) ist ein lösliches exklusiv cytosolisches Protein und assoziiert mit dem Ran·GTP-RanGAP-Karyopherin-Komplex; es macht Ran·GTP für RanGAP zugänglicher. Das Nukleoporin RanBP2 befindet sich an den cytosolischen Fäden des Kernporenkomplexes; es enthält vier Kopien der RanBP1-homologen Ran-Bindedomäne. Ein Teil des RanGAP ist SUMOyliert und bindet fest daran. RanBP2 kommt nur in Organismen mit offener Mitose vor und ist vermutlich zusammen mit dem chromatingebundenen RanGEF wichtig für die schnelle Wiederherstellung der Ran·GDP/Ran·GTP-Verteilung nach der Mitose. Die Asymmetrie dieser Verteilung ist absolut notwendig, weil sonst Transportpro-

zesse ineffizient sein könnten (nukleocytoplasmatisches *Shuttling* ohne Freisetzung des transportierten Proteins) bzw. in die falsche Richtung ablaufen könnten.

Da Ran am karyopherinvermittelten Import von Proteinen nicht teilnimmt, muss es nach Abschluss eines Exportvorgangs wieder in den Zellkern gebracht werden. NTF2, das als Homodimer vorliegt, bindet cytosolisches Ran·GDP und tranloziert dieses in den Zellkern, wobei es vorübergehend mit FG-Wiederholungen von Nukleoporinen in Kontakt ist. Im Kern wird GDP unter dem Einfluss von RanGEF gegen GTP ausgetauscht, der NTF2-Ran-Komplex zerfällt und NTF2 gelangt unbeladen wieder ins Cytosol zurück.

1.8.4 Regulation der Transportprozesse und *Shuttling*

Viele Kerntransportvorgänge werden reguliert, wie z. B. bei Signaltransduktionsprozessen, die auf die Genexpression Einfluss nehmen. Im einfachsten Fall wird ein Transkriptionsfaktor im Cytosol bereitgehalten und gelangt erst nach einem bestimmten Stimulus in den Zellkern (Beispiel: Glucocorticoidrezeptor). Umgekehrt kann ein Transkriptionsfaktor auch wieder aus dem Zellkern exportiert werden, sobald seine Aufgabe beendet ist (falls er nicht einfach inaktiviert oder abgebaut wird). Auch komplexe Signalkaskaden, die von Rezeptoren in der Plasmamembran ausgehen, transduzieren sehr oft in den Zellkern. Eine Reihe von Regulationsmechanismen kann die Kerntransportvorgänge beeinflussen [103, 104, 105] (welche davon tatsächlich zum Tragen kommen, ist vom jeweiligen Transportsubstrat abhängig):

- Maskierung des Transportsignals durch
  - kovalente Modifikation (besonders Phosphorylierung, aber auch Ubiquitinierung oder SUMOylierung [106])
  - Konformationsänderung des Proteins (Maskierung in *cis*)
  - Homooligomerisierung (Maskierung in *trans*)
  - Assoziation mit anderen Proteinen (z. B. 14-3-3-Proteinen nach Phosphorylierung [107])
- Demaskierung des Transportsignals durch
  - Enfernung kovalenter Modifikationen
  - Konformationsänderung des Proteins
  - partiellen Abbau (der maskierenden Domäne)
  - Dissoziation von Homo- oder Heterooligomeren
  - Abbau des maskierenden Bindungspartners
- Bildung eines zusammengesetzten Transportsignals durch Oligomerisierung

- Assoziation eines Proteins ohne Transportsignal mit einem Transportsignal-tragenden Protein („Huckepack“-Mechanismus)
- Retention (Bindung an Strukturen, die nicht transportiert werden können, z. B. Cytoskelett, Membranproteine, Chromatin)
- Veränderung der Affinität des Transportsubstrats zum Karyopherin (z. B. durch Phosphorylierung [108, 109])
- Veränderung der Expressionsmuster von Karyopherin-Isoformen, die unterschiedliche Substrataffinitäten oder -spezifitäten besitzen (längerfristige Regulation, z. B. bei der Zelldifferenzierung)

Karyopherine, Ran und NTF2 „shutteln“ – durch den Mechanismus der Transportprozesse bedingt – ständig zwischen Zellkern und Cytosol. Aber auch andere Proteine befinden sich mitunter nicht ständig im selben Kompartiment, sondern werden immer wieder importiert und exportiert. Voraussetzung für ein solches karyopherinvermitteltes *Shuttling* ist, dass das Protein (bzw. der Proteinkomplex) sowohl NLS als auch NES besitzt [110]. Die Verteilung im dynamischen Gleichgewicht hängt dann davon ab, ob Import oder Export bevorzugt stattfindet. Natürlich können auch hier die obigen Regulationsmechanismen eingreifen; bei den meisten wird ein Teil der Proteinpopulation vom *Shuttling* ausgenommen oder wieder zugelassen. Wird dagegen die Affinität des Transportsubstrats zu einem der Karyopherine verändert, hat dies Auswirkungen auf die Kinetik dieser Transportrichtung. So kann die Gleichgewichtslage sehr subtil reguliert werden, was den Nachteil des ständigen Energieverbrauchs (GTP-Hydrolyse durch Ran) kompensiert.

1.8.5 Bedeutung des Kerntransports für die circadianen Uhren in anderen Modellorganismen

Regulierter Kerntransport und nukleocytoplasmatisches *Shuttling* sind wichtige Prozesse für die circadianen Uhren anderer Organismen. In *D. melanogaster* fungiert ein Dimer aus CLOCK (CLK) und CYCLE (CYC) als positives Element, das die Transkription von *period* (*per*) und *timeless* (*tim*) bewirkt. PER und TIM akkumulieren zu Beginn der subjektiven Nacht als Komplex im Cytosol und gelangen in den Zellkern, nachdem PER von CK-2 [111, 112] und TIM von SHAGGY (SHG), einem GSK3-(Glykogensynthasekinase 3-)Homolog, phosphoryliert worden ist [113]. Dort reprimiert PER nach Bindung an CLK/CYC die Transkription seiner eigenen mRNA und der von *tim*. TIM „shuttelt“ unabhängig von PER, wie durch Hemmung mit Leptomycin B gezeigt wurde, doch beide beeinflussen sich gegenseitig in ihrer subzellulären Lokalisation [114].

In Säugetieren aktiviert ein Dimer aus CLK und dem CYC-homologen BMAL1 (*brain and muscle ARNT-like protein* 1) die Transkription von drei *per*- und zwei *cryptochrome*- (*cry*-)Genen. Der Kom-

plex aus CRY und PER (insbesondere mPER2) reprimiert die CLK/BMAL1-vermittelte Transkription und wirkt so als negatives Element auf seine eigene Synthese. PER1 und PER2 besitzten Kernexportsignale, die für deren *Shuttling* verantwortlich sind [115, 116]. mPER1 bewirkt den nukleären Export von CRY1 und CRY2, eine Voraussetzung für die Funktion der circadianen Uhr [117]. Die NLS von CRY1 und PER2 sind beide notwendig, um einen größeren Anteil des Komplexes in den Kern zu bringen. Durch Leptomycin B kann dieser Anteil noch gesteigert werden, und da für CRY kein eigenes NES bekannt ist, „shutteln“ beide Proteine wahrscheinlich als Komplex [118]. BMAL1 besitzt ein funktionales NLS und zwei NES; sein durch Leptomycin B inhibierbares *Shuttling* ist für die nukleäre Akkumulation von CLK nötig [119, 120].

1.9 Aufgabenstellung

FRQ übt seine Funktionen innerhalb der circadianen Uhr sowohl im Cytosol als auch im Zellkern aus, und es ist sehr wahrscheinlich, dass eine präzise Einstellung der Konzentrationen des Proteins in den beiden Kompartimenten wesentliche Voraussetzung für das korrekte Funktionieren der circadianen Uhr ist. Ziel dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, wie die Verteilung bewirkt wird, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass FRQ trotz eines funktionalen Kernlokalisationssignals größtenteils im Cytosol vorkommt. Möglicherweise spiegelt die subzelluläre Verteilung ein dynamisches Gleichgewicht wider, welches durch ständigen Kernimport und -export bedingt wird, in das aber auch Neusynthese und proteolytischer Abbau eingehen. Bisher wurde kein Kernexportsignal beschrieben, und auch Kofaktoren, die die Lokalisation von FRQ beeinflussen (insbesondere Import- und Exportfaktoren, aber auch Kinasen und andere modifizierende Enzyme) sind nicht bekannt.

2 Methoden

2.1 Molekulargenetik

Eine umfassende Sammlung molekulargenetischer Methoden ist [121]; die in dieser Arbeit verwendeten Standardmethoden wurden direkt oder in abgewandelter Form daraus übernommen.

2.1.1 *In vitro*-Mutagenese

Bei dieser Methode befinden sich die gewünschten Mutationen (Punktmutation(en), Insertion oder Deletion), beiderseits flankiert von kurzen unveränderten Bereichen, auf zwei zueinander revers komplementären Oligonukleotiden. Diese hybridisieren in einer PCR-ähnlichen Reaktion mit den beiden Strängen der aufgeschmolzenen Plasmid-DNA (die *dam*-methyliert sein muss, s.u.) und werden durch eine thermostabile DNA-Polymerase hoher Genauigkeit über die gesamt Länge des Plasmids extendiert. Nach einigen Zyklen entstehen durch Verschmelzen mutierter Einzelstränge Plasmide mit den gewünschten Mutationen auf beiden Strängen, die zueinander versetzte Einzelstrangbrüche tragen (auf der 5'-Seite der eingesetzten Oligonukleotide). Diese Plasmide können nicht vervielfältigt werden, so dass sich eventuelle Fehler bei der Duplikation nicht fortpflanzen können; als Matrix dient somit ausschließlich die (methylierte) Ausgangs-Plasmid-DNA (lineare Amplifikation). Diese wird im Folgenden durch *Dpn* I-Verdau spezifisch und vollständig abgebaut (auch aus hemimethylierten Duplex-Strängen), so dass *E. coli* nur mit mutagenisierter DNA transformiert wird. Die Einzelstrangbrüche werden nach der Transformation durch bakterielle Ligasen geschlossen, wodurch zirkuläre kovalent geschlossene Plasmide entstehen, die repliziert und propagiert werden können.

Die Reaktionen wurden mit geringfügigen Modifikationen gemäß den Herstellerangaben zum QuikChange II XL-Kit durchgeführt: Für das Ausgangsplasmid pBM60 *Cla* I-Fr. (15,3 kbp) und dessen Derivate wurde die DNA-Menge von 10 ng auf 50 ng erhöht und die Extensionszeit auf von 15 auf 20 min verlängert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in A.3.2 aufgelistet; es wurden jeweils 10 pmol eingesetzt. Die Produkte wurden nach Anleitung des Herstellers in XL10-gold kompetente *E. coli*-Zellen transformiert, welche in Petrischalen mit LB-Festmedium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausplattiert wurden. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Plasmid-DNA wurde nach 2.1.11 präpariert und durch Restriktionsfragmentanalyse sowie Sequenzierung überprüft.

2.1.2 Topo-TA™-Klonierung

Die Methode nutzt die einzeln überhängenden Desoxyadenoysl-Reste, welche durch Taq-Polymerase an den 3'-Enden der PCR-Produkte angefügt werden. Diese sind komplementär zu 3'-überhängenden Desoxythymidyl-Resten des Plasmids pCR2.1-topo, das zusätzlich an den 3'-Enden kovalent gebundene *Vaccinia*-Topoisomerase I trägt. Lagern sich dA- und dT-Reste komplementär aneinander, schließen die Topoisomerasemoleküle die benachbarten Einzelstrangbrüche und es entsteht ein zirkuläres kovalent geschlossenes Plasmid.

Die Reaktion wurde gemäß Anleitung des Herstellers durchgeführt. PCR-Produkte der Pfu-Polymerase wurden nochmals 10 min bei 72 °C mit 5 U Taq-Polymerase inkubiert, um die gewünschten dA-Überhänge zu erhalten. Wegen der starken 3'→5'-Exonukleaseaktivität der Phusion™-Polymerase wurden deren PCR-Produkte nach 2.1.8 isoliert, mit 1× Taq-Polymerasepuffer, 2 mM $MgCl_2$ sowie 0,2 mM dATP ergänzt und wie oben verfahren. Ergab eine PCR nennenswerte Mengen von Nebenprodukten, wurde das Gemisch durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das gewünschte Produkt nach 2.1.8 isoliert.

Die Ligationsprodukte wurden nach Anleitung des Herstellers in OneShot™-kompetente DH5α-T1™ *E. coli*-Zellen transformiert, welche in Petrischalen mit LB-Festmedium, das 50 µg/ml Kanamycin enthielt, ausplattiert wurden. Zur Erleichterung der Selektion positiver Klone war 1 h vor dem Ausplattieren der transformierten Bakterien 80 µl 20 mg/ml X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid, gelöst in Dimethylformamid) ausgestrichen worden*. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Plasmid-DNA von farblosen Klonen wurde nach 2.1.11 präpariert und durch Testrestriktionsverdaus, Agarosegelelektrophorese und Sequenzierung überprüft.

2.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

Das Zielplasmid sowie die zu inserierende DNA (PCR-Produkt oder Plasmid) wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten (s. 2.1.6). Falls dabei Fragmente gleicher oder sehr ähnlicher Größe entstanden, die elektrophoretisch nicht oder nur schlecht abzutrennen gewesen wären, wurde zusätzlich mit einem dritten Restriktionsenzym verdaut, welches nur das nicht benötigte

* pCR2.1 ohne Insertionen erlaubt in DH5α-T1™ α-Komplementation von LacZ (in diesem Stamm werden nur geringe Mengen des Repressors LacI chromosomal exprimiert; es ist keine Induktion nötig, weil sich die Plasmide in großem Überschuss zum Repressor befinden). Negative Klone sind blau gefärbt, da sie funktionale β-Galaktosidase besitzen, die X-gal zu 5-Brom-4-chlorindoxyl hydrolysiert, das durch Luftsauerstoff zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert wird.

DNA-Fragment in kleinere aufspaltete. Die Resitriktionsfragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese (2.1.7) der Größe nach aufgetrennt; die benötigten Fragmente wurden nach 2.1.8 aus dem Gel isoliert. Aliquota der wiedergewonnenen DNA wurden durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert; die Konzentrationen wurden durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten mit der des DNA-Größenmarkers abgeschätzt.

Die Ligation unter Verwendung des Quick Ligation Kits (Fermentas) erfolgt genau nach den Angaben des Herstellers. „Klassische“ Ligationsreaktionen erfolgten bei 16 °C über Nacht (höhere Effizienz) oder 1 h bei Raumtemperatur. Ein typischer Reaktionsansatz bestand aus:

2 µl 10× T4-Ligationspuffer
100–400 ng (größenabhängig) Vektor-DNA
Insert-DNA in 2–3-fachem molaren Überschuss
2,5 U T4-DNA-Ligase
ad 20 µl H_2O

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Insert-DNA. Kompetente *E. coli* der Stämme XL1-blue, DH5α™ oder DH5α-T1™ wurden nach 2.1.10 mit den Ligationsprodukten transformiert. Die Analyse der Klone erfolgte nach Plasmidminipräparation (2.1.11) durch Testrestriktionsverdaus bzw. Test-PCR und Agarosegelelektrophorese. Plasmide von positiven Klonen wurden mit Hilfe von Plasmidpräparationskits (Macherey-Nagel) gewonnen und ggf. durch Sequenzierung kontrolliert.

2.1.4 Klonierungsstrategien

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide finden sich im Anhang A.3 ab Seite 103. Falls nicht anders angegeben, wurde für die Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion Pfu-Polymerase verwendet. Alle Mutagenesen und (Sub-)Klonierungen wurden durch Sequenzierung der Übergänge zwischen Insertion und Vektor bzw. des mutagenisierten Bereichs überprüft.

pBM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS$_2$–MBP–CLD
pBM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS$_2$–MBP–GFP
Die Oligonukleotide SV40 SphI sense und SV40 SphI antisense wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, 2 min auf 95 °C erhitzt und zur Hybridisierung langsam (0,1 °C/s) auf Raumtemperatur abgekühlt. Ein 20-facher molarer Überschuss wurde in pBM60 *Cla* I-Fr. ligiert, das mit *Sph* I linearisiert worden war. Die korrekte Insertion wurde durch Restriktionsfragmentanalyse und Sequenzierung überprüft.

Durch *in vitro*-Mutagenese wurde nach Aminosäurerest 623 eine *Pac* I-Restriktionsschnittstelle so eingefügt, dass sie im FRQ-Leseraster kein Stopp-Kodon kodiert (Oligonukleotide frq9 Stop PacI

mut F und frq9 Stop PacI mut R; das zusätzliche Stopp-Kodon liegt zwar im FRQ-Leserester, befindet sich aber **vor** der *Pac* I-Schnittstelle hat daher keine weitere Bedeutung). Auf die gleiche Weise wurde bei ATG#3 (Aminosäurerest 100) eine *Nsi* I-Restriktionsschnittstelle (Oligonukleotide frq ATG#3 NsiI mut F und frq ATG#3 NsiI mut R) eingeführt. Beide Mutagenesen wurden durch Restriktionsfragmentanalyse und Sequenzierung überprüft.

Der Leserahmen des Maltosebindeproteins (MBP) von *Kluyveromyces lactis* wurde durch PCR mit den Primern MBP BamHI NsiI F und MBP PacI HindIII bzw. MBP Stop PacI HindIII R aus pMALcRI amplifiziert und über *Nsi* I und *Pac* I in das oben erhaltene Plasmid kloniert. Es entstanden damit pBM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP–CLD und pBM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP Stop. Der sGFP-Leserahmen wurde mittels sGFP Pac Nsi F und sGFP Stop Sfi Pac R aus pMF272 [122] amplifiziert und über *Pac* I und *Sfi* I in pBM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP–CLD kloniert, wodurch pBM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP–GFP entstand.

pFH64 NLS–sGFP–2xFlag
pFH64 2xFlag–sGFP–2xSV40-NLS

Der Leserahmen von sGFP wurde durch Taq-Polymerase (Pfu und Phusion™ ergaben keine Produkte) aus pMF272 [122] mit folgenden Primern amplifiziert:

Konstrukt	Primer	
SV40-NLS–sGFP–2xFlag	SV40-NLS sGFP Hind F	sGFP 2xFlag Asc TAA Xma R
2xSV40-NLS–sGFP–2xFlag	2xSV40-NLS sGFP Hind F	sGFP 2xFlag Asc TAA Xma R
FRQ-NLS–sGFP–2xFlag	FRQ-NLS sGFP Hind F	sGFP 2xFlag Asc TAA Xma R
2xFlag–sGFP–2xSV40-NLS	Xma ATG Asc 2xFlag sGFP F	sGFP 2xSV40 TAA XbaI R

Die PCR-Produkte wurden durch TopoTA™ (2.1.2) in pCR2.1 kloniert und vollständig sequenziert. Die Konstrukte mit N-terminalem NLS wurden über *Hin*d III und *Xma* I, 2xFlag–sGFP–2xSV40-NLS über *Xma* I und *Xba* I in pFH64 subkloniert.

pBM60 *Cla* I-Fr. Strep II

Die Oligonukleotide Strep II SphI F und Strep II SphI F wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, 2 min auf 95 °C erhitzt und zur Hybridisierung langsam (0,1 °C/s) auf Raumtemperatur abgekühlt. Ein 20-facher molarer Überschuss wurde in pBM60 *Cla* I-Fr. ligiert, das mit *Sph* I linearisiert worden war. Die korrekte Insertion wurde durch Sequenzierung überprüft.

pBM61 qa-2 FRQ-cTAP

Durch PCR mit den Oligonukleotiden Spe AatII frq 3' Nco TAP F und TAP EcoRV TAA Xba R wurde die C-terminale TAP-Markierung (553 bp) aus pBS1479 [123] amplifiziert, dabei wurden vor der

Markierung die 3'-terminalen Nukleotide des FRQ-Leserahmens ab der *Aat* II-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Das Fragment wurde über *Aat* II und *Xba* I in pBS FRQ (*Sal* I–*Xba* I) kloniert, welches den C-terminalen Teil des FRQ-Leserahmens ab der *Sal* I-Schnittstelle enthält. Daraus wurde ein Fragment von 1398 bp mit *Sfi* I und *Not* I ausgeschnitten und in pBM61 qa-2 FRQ-His_6 inseriert, aus dem ein 920 bp großes Fragment mit *Sfi* I und *Bsp*120 I ausgeschnitten worden war (*Not* I und *Bsp*120 I erzeugen kompatible 5'-überhängende Enden, s. 3.9 auf Seite 83).

pGEX 4T3 FRQ

Der l-FRQ-Leserahmen (3 kbp) wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden FRQ Bcl Mun Nco F und FRQ TAA Xba Not Nsi R aus pBS II *Cla* I-Fr. [124] amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *Bcl* I und *Not* I in pGEX 4T3 kloniert.

pFH64 FRH-$Flag_2$

Der FRH-Leserahmen inkl. eines 68 bp großen Introns wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden FRH EcoRI Nco F und FRH 2xFlag TAA Xba R aus genomischer DNA mit Phusion™-Polymerase amplifiziert und nach 2.1.2 in pCR2.1 kloniert. Über die Restriktionsschnittstellen *Eco*R I und *Xba* I wurde FRH-$Flag_2$ in pFH64 subkloniert.

pFH-Plasmide

Das Prinzip der Klonierungsstrategie ist in Abb. 3.9 auf Seite 83 zu sehen. Durch *in vitro*-Mutagenese mit den Oligonukleotiden pBM60 Delta HindIII mut F und pBM60 Delta HindIII mut R wurde eine *Hin*d III-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende des *his-3*$^+$-Fragments zusammen mit einer benachbarten *Sph* I-Schnittstelle aus pBM60 entfernt (pBM60 Δ*Hin*d III Δ*Sph* I). Der *trpC*-Terminator von *Aspergillus nidulans* wurde durch PCR mit TtrpC NotI F und TtrpC Bsp120I R aus pBC-hygro [125] amplifiziert (608 bp) und nach 2.1.2 in pCR2.1 kloniert (pCR2.1 TtrpC). T*trpC* wurde mit *Bsp*120 I und *Not* I ausgeschnitten und in die *Not* I-Restriktionsschnittstelle von pBM60 Δ*Hin*d III Δ*Sph* I subkloniert (pFH62). Die Orientierung der Insertion wurde verifiziert (Sequenzierung mit T3).

Alle Promotoren wurden analog zum TrpC-Terminator amplifiziert (s. u.) und in pCR2.1 kloniert:

Promotor	Länge (bp)	Matrize	Primer	
qa-2	1147	pBA50 [22]	qa2 NotI F	qa2 Bsp120I R
cpc-1	806	pBC-hygro [125]	cpc1 NotI F	cpc1 Bsp120I R
ccg-1	937	pMF272 [122]	Pccg-1 NotI F	Pccg-1 Bsp120I R
β-tub	367	genom. DNA (vgl. [126])	Ptub NotI F	Ptub ApaI R
β-tub lang	733	genom. DNA	PtubL NotI F	Ptub ApaI R

Die Promotoren wurden mit *Bsp*120 I und *Not* I ausgeschnitten und in die *Bsp*120 I-Restriktionsschnittstelle von pFH62 subkloniert. Die Oritentierung der Insertionen wurde überprüft (Sequenzierung mit TtrpC seq 5' R und T3).

2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [127]

Für präparative Zwecke wurde Pfu- oder Phusion™-Polymerase verwendet (letztere insbesondere für große PCR-Produkte), die beide eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzen und somit Basenfehlpaarungen während der Polymerisation korrigieren können. Phusion™-Polymerase ist eine gentechnisch veränderte Form der Pfu-Polymerase, die durch festere DNA-Bindung eine höhere Prozessivität und Geschwindigkeit erreicht. Phusion™-Amplifikationen wurden genau nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für analytische Zwecke oder Amplifikationen, bei denen Pfu- und Phusion™-Polymerase versagt hatten, wurde Taq-Polymerase verwendet, die keine 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Klonierungen von Taq-Amplifikaten wurden daher grundsätzlich vollständig sequenziert.

Typische Taq- bzw. Pfu-Reaktionsansätze enthielten:

2,5 µl 10×Puffer mit $(NH_4)_2SO_4$	10 µl 10×Puffer mit $MgSO_4$
2 mM $MgCl_2$	je 0,2 mM dATP/dGTP/dTTP/dCTP
je 0,2 mM dATP/dGTP/dTTP/dCTP	je 100 pmol Primer
je 25 pmol Primer	0,1–1 ng Plasmid-DNA oder
10–100 pg Plasmid-DNA oder	100 ng genomische DNA
10–100 ng genomische DNA	5 U Pfu-Polymerase
2,5 U Taq-Polymerase	ad 100 µl H_2O
ad 25 µl H_2O	

Primer wurden so gewählt, dass die Schmelztemperatur des zur Matrize komplementären Teils etwa 58 °C betrug und das 3'-Ende jeweils mit mindestens einem dG- oder dC-Rest abschloss. Als Extensionsgeschwindigkeiten wurden 1 000 bp/min für Taq- und 500 bp/min für Pfu-Polymerase angenommen. Damit ergibt sich folgendes Basis-Temperaturprogramm, dessen Parameter (Anlagerungstemperatur, Extensionszeit, Zyklenanzahl, ggf. auch Denaturierungsdauer) den jeweiligen Erfordernissen angepasst wurden:

	Denaturierung	95 °C	4 min
25–30×	Denaturierung	95 °C	1 min
	Anlagerung	55 °C	1 min
	Extension	72 °C	1–2 min/1 000 bp
	Extension	72 °C	5 min

2.1.6 Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdaus von DNA erfolgten in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen nach den Vorgaben der Enzymhersteller. Bei Doppelverdaus wurde der Reaktionspuffer gewählt, bei dem beide Enzyme eine ausreichende Aktivität (>50 %) besitzen, und die Enzymmenge ggf. erhöht. War dies nicht möglich, so erfolgte zunächst der Verdau mit der geringeren NaCl-Konzentration, dann wurde das Enzym – sofern möglich – durch Erhitzen inaktiviert, NaCl und das zweite Enzym ergänzt und nochmals inkubiert. Entfiel auch diese Möglichkeit, wurde die DNA nach dem ersten Verdau nach 2.1.8 reisoliert und dann weiterverdaut. Restriktionsverdaus im selben Puffer bei unterschiedlichen Temperaturen wurden zuerst mit dem betreffenden Enzym bei der niedrigeren Temperatur durchgeführt; nach Hitzeinaktivierung (sofern möglich) wurde das zweite Enzym hinzugegeben und bei der höheren Temperatur inkubiert. Einige präparative Verdaus wurden unter Verringerung der Enzymmengen über Nacht durchgeführt. Für Kontrollverdaus zur Restriktionsfragmentanalyse wurde 1 µl Plasmid-DNA nach 2.1.11 in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt; davon wurden je 10 µl auf analytische Agarosegele aufgetragen (2.1.7).

2.1.7 Agarosegelelektrophorese

Doppelsträngige DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe wurden durch horizontale Agarosegelelektrophorese in TAE-Puffer voneinander getrennt. Je nach gefordertem Auflösungsbereich wurden Agarose-Konzentrationen von 0,5–1,5% (w/v) verwendet; zum Anfärben der DNA wurden schon beim Gießen des Gels 0,05 µg/ml des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid zugefügt. Analytische und kleine präparative Gele (L×B×H 7×9×1,5 cm) liefen 45–90 min bei 80 V, große präparative (L×B×H 14×11×1,5 cm) 1,5–3 h bei 150 V (Elektrophoreseapparaturen: Eigenkonstruktionen der Feinmechanikwerkstatt des Theoretikums der Universität Heidelberg). Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert.

2.1.8 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen

Unter langwelliger UV-Bestrahlung wurden mittels eines Skalpells Bereiche mit den gewünschten DNA-Fragmenten aus den Agarosegelen ausgeschnitten. Überschüssige Agarose wurde entfernt, die

Gelstücke wurden in 1,5 ml- oder 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und gewogen. Die DNA wurde gemäß Anleitung des Herstellers mit Hilfe des Promega Wizard SV PCR Cleanup & Gel Extraction Kit isoliert; dabei werden die Wasserstoffbrücken des Agarose-Gels durch chaotrope Salze aufgebrochen und die DNA bindet bei hoher Ionenstärke an eine Silikamembran [128]. Nach dem Waschen mit ethanolhaltigem Puffer hoher Ionenstärke wird bei geringer Ionenstärke eluiert. Hier erfolgte die Elution mit 25–50 µl nukleasefreiem H_2O. PCR-Produkte wurden bei Bedarf analog aufgereinigt.

2.1.9 Präparation kompetenter *E. coli* [129]

Die folgende Beschreibung bezieht sich sowohl auf BL21 als auch XL1-blue und DH5α™/DH5α-T1™. Der Expressionsstamm BL21 wächst deutlich schneller als die Klonierungsstämme, so dass für ihn kürzere Inkubationszeiten einzuplanen sind.

Der jeweilige *E. coli*-Stamm wurde in einer Petrischale mit LB-Festmedium ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine einzelne Kolonie (Durchmesser 2–3 mm) wurde mit einer Impföse in 25 ml SOB-Medium in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben überführt. Dieser wurde 6–8 h bei 37 °C und 300 UpM geschüttelt. Mit der Starterkultur (BL21 1 ml, DH5α™/DH5α-T1™ 5 ml, XL1-blue 10 ml) wurden 250 ml SOB in einem 1 l-Erlenmeyerkolben inokuliert und über Nacht bei 18 °C unter Schütteln mit 180 UpM inkubiert.

Sobald die Zelldichte eine OD_{600} von 0,55 erreicht hatte, wurde der Kolben sofort in ein Eis-Wasser-Bad überführt und unter leichtem Schwenken 10 min darin belassen. Anschließend wurden die Bakterien durch zehnminütige Zentrifugation bei 2 500 × g und 4 °C sedimentiert. Das Medium wurde vollständig dekantiert, verbleibende Tropfen abgesaugt bzw. abgewischt. Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert und nochmals sedimentiert. Das Medium wurde wieder vollständig entfernt und die Zellen vorsichtig in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Nach Zughabe von 1,5 ml Dimethylsulfoxid wurde der Ansatz durch Schwenken gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Das gesamte Volumen wurde möglichst schnell in 50 µl-Aliquota auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und jedes sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei – 80 °C gelagert.

2.1.10 Transformation kompetenter *E. coli*

1,5 ml-Reaktionsröhrchen mit je 50 µl Suspension kompetenter *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, nach 10 min mit je 1–5 µl des Ligationsansatzes versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 15 min auf Eis wurde 90 s bei 42 °C inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach 1–2 min wurden je 0,8 ml SOC-Medium hinzugefügt und 1 h unter Schütteln (300 UpM) bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 1 min bei 5 000 × g in der Tischzentrifuge sedimentiert, in ca. 100 µl SOC-Medium resus-

pendiert und in Petrischalen mit LB-Festmedium, das 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausplattiert. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.11 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Minipräparation für Testrestriktionsverdau und Test-PCR

Je 3 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Antibiotikum (in der Regel 100 µg/ml Ampicillin) in einem Reagenzglas wurden mittels eines sterilen Zahnstochers inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 2 ml der Bakteriensuspension wurden in einem 2 ml-Reaktionsgefäß 1 min bei 5 000 × g in der Tischzentrifuge sedimentiert, der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 200 µl Lösung 1 resuspendiert, mit 400 µl Lösung 2 versetzt (alkalische Lyse [130]), durch mehrfaches Invertieren gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 300 µl Lösung 3 hinzugegeben (Neutralisation und Ausfällung von Kaliumdodecylsulfat, Proteinen und der mit Proteinen assoziierten genomischen DNA), gründlich aber vorsichtig gemischt und 10 min bei 14 000 × g und 4 °C in der gekühlten Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand (ca. 800 µl) wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 0,7 Volumina 2-Propanol versetzt, gemischt und 20 min bei 16 000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 0,5 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 16 000 × g und 4 °C), an der Luft getrocknet und in 20 µl H_2O aufgenommen.

Minipräparation für Klonierung, Sequenzierung, *Neurospora*-Transformation

Die Aufreinigung basiert ebenfalls auf der alkalischen Lyse [130], die Plasmid-DNA wird aber nicht durch Alkoholfällung gewonnen, sondern bei hoher Ionenstärke in Gegenwart von chaotropen Salzen an eine Silikamembran gebunden [128], mit einem chaotrophaltigem Puffer und einem ethanolhaltigem Puffer hoher Ionenstärke gewaschen und bei geringer Ionenstärke (5 mM Tris·HCl pH 8,5 oder H_2O) eluiert. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers.

Midipräparation

Auch diese Aufreinigung bedient sich der alkalischen Lyse [130], die Plasmid-DNA wird jedoch an eine Anionenaustauschermatrix gebunden, mit ethanolhaltigem Puffer geringer Ionenstärke gewaschen und durch einen Puffer hoher Ionenstärke eluiert. Schließlich wird die DNA mit 0,7 Volumina Isopropanol gefällt, mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 5 mM Tris·HCl pH 8,5 oder H_2O aufgenommen. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Extinktion einer verdünnten Lösung in 5 mM Tris·HCl pH 7,5 bei 260 nm in einer Quarzküvette mit 10 mm Schichtdicke bestimmt. Messwerte zwischen 0,1 und 1,0 wurden als verlässlich betrachtet, in anderen Fällen musste die Messung in anderer Verdünnung wiederholt werden. Als Umrechungsfaktor für doppelsträngige DNA wurde 50 µg/ml für eine Extinktion von 1,00 bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke angenommen.

2.2 *Neurospora*-Genetik

2.2.1 Transformation von Makrokonidien durch Elektroporation

Makrokonidien (von einer 5–10 Tage alten Kultur auf Festmedium) wurden wie unter 2.5.1 beschrieben in 1 M Sorbit geerntet und 10 min bei 2 000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Konidien wurden dreimal mit 50 ml 1 M Sorbit gewaschen. Die sedimentierten Konidien wurden mit wenig 1 M Sorbit resuspendiert und auf Eis gestellt. Je 50 µl wurden mit 1 µg der zu transfomierenden DNA gründlich gemischt und in 2 mm-Elektroporationsküvetten überführt. Nach 15 min auf Eis wurden die Konidien bei 1,5 kV, 24 μF und 600 Ω elektroporiert (typische Abklingkonstante 10–13 ms), sofort in 1 ml eiskaltem 1 M Sorbit suspendiert und in Reaktionsgefäße auf Eis überführt. 200 und 800 µl wurden mit je 8 ml 55 °C warmem Deckagar gemischt und in 10 cm-Petrischalen mit 20 ml Bodenagar ausplattiert. Als Negativkontrollen wurden äquivalente Konidienmengen ohne DNA-Zusatz verwendet. Nach dem Erkalten wurden die Petrischalen 2–3 Tage bei 30 °C inkubiert, bis sichtbare Kolonien (2–4 mm Durchmesser) entstanden waren.

Einzelne Klone wurden mit einer sterilen Impföse ausgestochen und in Reagenzgläser mit 3 ml *Neurospora*-Standardmedium transferiert. Nach 2–3 Tagen bei 30 °C wurden Teile des neu gewachsenen Myzels auf Schrägagar-Röhrchen bzw. Erlenmeyerkolben mit Standard-Festmedium überimpft. Diese wurden bei 30 °C bzw. Raumtemperatur im Licht inkubiert, bis Luftmyzel und Makrokonidien entstanden waren (erkennbar an der orangenen Farbe, Farbintensität und Konidienausbeute sind sehr vom Stamm abhängig; FRQ-defiziente Stämme bilden im allgemeinen nur schwach Konidien).

2.2.2 Präparation genomischer DNA

Myzelstücke wurden auf sterile Reagenzgläser mit je ca. 3 ml Standardmedium überimpft und 2–3 Tage bei 30 °C inkubiert, bis sich an der Flüssigkeitsoberfläche eine kompakte Schicht gebildet hatte. Das Myzel wurde mit einem Metallhaken (aufgebogene Impföse) entnommen, trockengetupft

und jeweils in ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit etwas Seesand (ca. 200 µl) überführt. Bis zum Zellaufschluss wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Der 2×CTAB-Puffer wurde mit 1 % (w/v) $NaHSO_3$ supplementiert. Maximal vier Proben gleichzeitig wurden im kalten Zustand jeweils mit 250 µl $CHCl_3$/Isoamylalkohol 24:1 und 250 µl 2×CTAB-Puffer versetzt, gut verschlossen und im Ribolyser arretiert (dabei musste schnell gearbeitet werden, damit die Proben möglichst wenig antauten). Durch zwei Zyklen von 20 bzw. 10 s mit maximaler Intensität (6,5) wurden die Zellen aufgebrochen.

Nachdem mit allen Proben so verfahren worden war, wurden sie 30 min bei 60 °C inkubiert und danach 5 min bei 16 000 × g zentrifugiert. Die Überstände wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit je 250 µl $CHCl_3$/Isoamylalkohol 24:1 transferiert, ohne die trübe Interphase mitzuschleppen. Nach kurzem Ausschütteln wurde nochmals zentrifugiert, und die Überstände wurden wiederum in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Je 2 µg RNase A wurden zugefügt, und nach Mischen wurde 1 h bei Raumtemperatur oder 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die DNA wurde durch Zugabe von je 0,7 Volumina 2-Propanol ausgefällt und durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 16 000 × g und 4 °C ausgefällt. Die Überstände wurden verworfen und die Niederschläge mit jeweils 0,5 ml eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 16 000 × g und 4 °C wurden die Überstände entfernt und die Niederschläge bei Raumtemperatur oder 37 °C getrocknet. Die DNA wurde in je 100 µl H_2O oder 5 mM Tris·HCl pH 7,5 aufgenommen (ggf. wurde das Wiederauflösen durch Erhitzen auf 50 °C beschleunigt).

2.3 Proteinbiochemie

2.3.1 Analytische Gelfiltrationschromatographie

Totalextrakt (2.4.3) bzw. Kernextrakt (2.4.2) oder umgepuffertes Cytosol* wurden mit 10 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 250 U/ml Benzonase und 10 µg/ml Distamycin A versetzt und 30 min bei 4 °C und 40 000 UpM im Rotor TLA-55 zentrifugiert, der Niederschlag wurde verworfen. 5 mg Gesamtprotein wurden auf eine mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Superose 6-Säule geladen, der Säulenlauf wurde mit 0,5 ml/min durchgeführt. Nach dem Entleeren der 500 µl-Auftragsschleife wurden 0,5 ml-Fraktionen aufgefangen; diese wurden mit Trichloressigsäure nach 2.3.4 gefällt und in je 60 µl SDS-PAGE-Auftragspuffer aufgenommen.

* Cytosol entsprechend 7 mg Gesamtprotein wurde mit Proteinextraktionspuffer auf 2 ml ergänzt, vermischt und durch Ultrafiltration bei 4 °C auf ca. 500 µl eingeengt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, um die hohe Viskosität des Cytosols (bedingt durch Ficoll und Sorbit aus Fraktionierungpuffer A) zu reduzieren.

2.3.2 Immunpräzipitation

Pro Fällungsansatz wurden ca. 30 µl Affinitätsmatrix (Protein A-, Protein G-Sepharose bzw. αFLAG®-Agarose) verwendet. Die Matrix wurde in einem 1,5 ml- oder 2 ml-Reaktionsgefäß 2–3-mal mit dem 20–40-fachen Volumen TBS bei Raumtemperatur gewaschen (Zentrifugation 1 min bei 500 × g). Monoklonale Antikörper wurden mit Protein G-Sepharose, polyklonale mit Protein A-Sepharose 1 h unter Rotieren bei Raumtemperatur – ggf. unter Zugabe von TBS – inkubiert. Die Matrix wurde sedimentiert, 3–4-mal mit dem 20–40-fachen Volumen TBS gewaschen und zu je 30 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Bindung des Antigens erfolgte unter Rotieren bei 4 °C über Nacht. Danach wurde die Matrix bei 4 °C sedimentiert und 3–4-mal mit dem 20–40-fachen Volumen TBS bei 4 °C gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch dreiminütiges Kochen mit 40 µl 2× SDS-PAGE-Auftragspuffer eluiert. Nach Zentrifugieren (1 min bei 16 000 × g) wurde die Flüssigkeit mit einer 50 µl-Gaschromatographiespritze (Nadelinnendurchmesser 0,2 mm) abgenommen.

2.3.3 *In vitro*-Dephosphorylierung von Totalextrakten oder Kernextrakten

Die Proeinextrakte wurde nach 2.4.3 bzw. 2.4.2 hergestellt, allerdings wurde als Puffer Dephosphorylierungspuffer verwendet. Ein Volumen entsprechend 200 µg Gesamtprotein wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit Dephosphorylierungpuffer auf 25,5 µl ergänzt, 1,5 µl 20×$MgCl_2$/DTT (Endkonzentrationen: 5 mM $MgCl_2$ und 1 mM DTT) sowie 3 µl (60 U) alkalische Kälberdarmphosphatase (CIAP) hinzugefügt und nach Mischen 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kochen mit 10 µl 4×SDS-PAGE-Auftragspuffer gestoppt.

2.3.4 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Um verdünnte Proteinlösungen für den Auftrag auf SDS-Polyacrylamidgele zu konzentrieren oder unerwünschte Salze zu entfernen, wurde mit 0,02 % (w/v) Natriumdesoxycholat und 6 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt. Nach 5 min auf Eis wurde 5 min bei 10 000 × g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt; der Niederschlag wurde in 1×SDS-PAGE-Auftragspuffer aufgenommen. Zu niedriger pH-Wert (erkennbar am Farbumschlag des Bromphenolblaus im Auftragspuffer nach Gelb) wurde sofort durch Überblasen der Lösung mit Ammoniakdampf und anschließendes Schütteln korrigiert (Farbumschlag zurück nach Blau, ggf. Vorgang wiederholen).

2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteintotalextrakte und Kernextrakte wurden 1:20, Totalhomogenate und Cytosol 1:10 mit H_2O verdünnt. Je 10 µl wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz [131] (BioRad Protein Assay-Konzentrat 1:5 mit H_2O verdünnt) gemischt. Nach 10 min wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen (Referenz: Bradford-Reagenz mit 10 µl H_2O). Zur Kalibrierung der Messung wurde eine Standardreihe mit Immunglobulin G erstellt; die lineare Regression ergab einen Ordinatenabschnitt von 0 und eine Steigung von 42.

2.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteingemische in Lösung wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese [132] aufgetrennt. Verwendet wurden große Gele mit den Abmessungen 12 cm×14 cm×1 mm (Elektrophoreseapparaturen: Eigenkonstruktion der Feinmechanikwerkstatt des Theoretikums der Universität Heidelberg) sowie 1 mm dicke „Minigele“ (MiniProtean 3-System, BioRad). Falls nicht anders angegeben, enthielten die Gele 7,25 % (w/v) Acrylamid und 0,25 % (w/v) N,N'-Methylen-bis(acrylamid). Große Gele wurden mit Hilfe von „Gelschuhen“ gegossen, in denen die Gelplatten vertikal befestigt waren. Zur Abdichtung wurde zunächst ein knapp 1 cm hohes Bodengel gegossen (16 % (w/v) Acrylamid, 0,05 % (w/v)N,N'-Methylen-bis(acrylamid), auf das nach Ende der Polymerisation (30–45 min) das eigentliche Trenngel folgte (das MiniProtean III-System enthält eine Gießapparatur mit Dichtung, benötigt also kein Bodengel). Durch vorsichtiges Überschichten mit 600 µl (große Gele) bzw. 200 µl (Minigele) 2-Propanol wurde eine gerade und blasenfreie Oberkante des Trenngels erhalten sowie der Zutritt von Luftsauerstoff vermindert. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war (>1 h), wurde der 2-Propanol entfernt und das Sammelgel gegossen (Polymerisationszeit 45–60 min). Die Höhe des Sammelgels unterhalb der Geltaschen betrug ca. 1 cm (große Gele) bzw. 0,5 cm (Minigele).

Die Proben wurden mit demselben Volumen 2× oder $\frac{1}{3}$ Volumina 4× SDS-PAGE-Auftragspuffer versetzt und 3 min auf 95 °Cerhitzt. Auf große Gele wurden 200 µg, auf Minigele 100 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen, falls nicht anders vermerkt. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA (Minigele) bzw. 35 mA (große Gele) oder bei ensprechend reduzierter Stomstärke über Nacht, bis die gewünschte Auftrennung erreicht war (Kontrolle ggf. mittels eines gefärbten Proteingrößenmarkers).

Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R250

Falls keine Immundetektion erforderlich war, wurden die Proteine nach der Elektrophorese im Gel angefärbt. Das Gel wurde bei Raumtemperatur in Coomassie-Färbelösung geschwenkt, bis es voll-

ständig tiefblau war. Die Färbelösung wurde entfernt, das Gel mit H_2O abgespült und bei Raumtemperatur mit Coomassie-Entfärbelösung geschwenkt, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren und das übrige Gel fast vollständig entfärbt war. Um überschüssigen Farbstoff aus der Lösung zu adsorbieren, wurde beim Entfärben ein Stück Zellstoff zugefügt. Die Gele wurden per Computer eingescannt, mit 10 % (v/v) Glyzerin äquilibriert und anschließend in Plastikfolie eingeschweißt.

2.3.7 Elektrotransfer und Immundetektion („*Western Blot*“)

Zum immunologischen Nachweis wurden die Proteine elektrophoretisch nach dem *semi dry*-Verfahren aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die verwendeten Transferapparaturen sind eine Eigenkonstruktion der Werkstatt der Ludwig-Maiximilians-Universität München, sie beinhalten zwei je 17 cm$\times$17 cm große Graphitplatten. Sechs dicke Filterpapiere und ein Stück Nitrozellulosemembran (alle nur wenig größer als das Gel) wurden mit Transferpuffer getränkt. Drei der Papiere wurden luftblasenfrei auf die mit Puffer angefeuchtete untere Graphitplatte gelegt, darauf wurden die Nitrozellulosemembran und das Polyacrylamidgel (ohne Sammel- und Bodengel) platziert. Luftblasen wurden entfernt und die drei übrigen Filterpapiere blasenfrei darüber geschichtet. Schließlich wurde der Deckel mit der angefeuchteten oberen Graphitplatte aufgesetzt und mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte 1,5 h (kleinere Proteine) bis 2,5 h (große Proteine) bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA (große Gele) bzw. 100 mA (Minigele), mindestens aber 5 V und höchstens 10 V.

Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in H_2O geschwenkt, mit Ponçeau S-Lösung gefärbt und durch Schwenken in H_2O so weit entfärbt, dass die Proteinbanden ohne starke Hintergrundfärbung sichtbar waren. Die Banden des Proteingrößenmarkers wurden mit wasserfestem Kugelschreiber eingezeichnet und die Spuren des Gels beschriftet. Die Membran wurde zur Dokumentation photokopiert und durch Schwenken in H_2O und anschließend TBS vollständig entfärbt. Um unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran durch einstündiges Schwenken in einer Lösung von 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS blockiert.

Die Nitrozellulosemembran wurde 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C (monokl. αFRQ 3G11: 2 h bei Raumtemperatur) in einer Lösung des Primärantikörpers und 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS unter Schwenken inkubiert und anschließend dreimal 5 min bei Raumtemperatur mit TBS gewaschen. Danach wurde die Membran zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C (monokl. αFRQ 3G11: 4 °C über Nacht) in einer Lösung des Sekundärantikörpers und 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS unter Schwenken inkubiert und anschließend dreimal 5 min mit TBS bei Raumtemperatur gewaschen.

Schließlich wurde die Membran mit 5 ml Luminolreagenz versetzt und 3 µl 30 % H_2O_2 zugegeben, diese Lösung wurde eine Minute lang ständig über die Membran pipettiert. Die Membran wurde

monokl.	Maus	αFLAG®		1:2 000
monokl.	Maus	αHis$_5$		1:3 000
monokl.	Maus	αFRQ	3G11	1:10
polykl.	Kaninchen	αFRQ-Mitte		1:200
polykl.	Kaninchen	αFRQ C-Terminus		1:300
polykl.	Kaninchen	αCK1a		1:250
polykl.	Kaninchen	αWC-1		1:500
polylk.	Ziege	αMaus-IgG	Peroxidase-Konjugat	1:5 000
polykl.	Ziege	αKaninchen-IgG	Peroxidase-Konjugat	1:10 000

Tabelle 1: Verdünnungen der Antikörper für die Immundetektion; alle wurden in 5 % (w/v) Magermilchpulver/TBS verwendet.

in eine Kunststofffolie eingeschlagen, überschüssiges Luminolreagenz abgewischt und die Folie in eine Photokassette geklebt. Röntgenfilme wurden unterschiedlich lang in der Photokassette belichtet und maschinell entwickelt.

2.3.8 Glutathion-Affinitätschromatographie von GST-FRQ

Eine 25 ml-Vorkultur von BL21 pGEX 4T3 FRQ in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurde bei 37 °C geschüttelt, bis die stationäre Wachstumsphase erreicht war. 500 ml Autoinduktionsmedium, das 100 mg/l Ampicillin enthielt, wurde mit 5 ml der Vorkultur inokuliert und über Nacht bei 25 °C unter Schütteln (180 UpM) inkubiert. Nach 16 h wurden die Bakterien (OD_{600} 4,0) sedimentiert (10 min bei 5 000 × g und 4 °C) und in 20 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mittels dreier Passagen durch den eisgekühlten Microfluidizer aufgeschlossen (die Flüssigkeit durchströmt darin unter hohem Druck die mikroskopisch kleinen Kanäle einer Keramik, wodurch starke Scherkräfte entstehen, die die Bakterien zerreißen). Das Volumen erhöhte sich dabei auf 50 ml, weil vorsichtshalber etwas Puffer vor und nach der Hauptmenge des Lysats mit aufgefangen wurde. Das Lysat wurde durch Ultrazentrifugation (30 min bei 4 °C und 40 000 UpM im T865-Rotor) geklärt, der Niederschlag wurde in 25 ml H_2O resuspendiert.

200 µl Glutathion-Sepharose™ 4B wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß dreimal mit 1,3 ml PBS gewaschen, d. h. im Puffer suspendiert, 1 min bei 1 000 × g und Raumtemperatur sedimentiert; der Pufferüberstand wurde verworden. Alle nachfolgenden Schritte wurden – falls nicht anders angegeben – bei 4 °C durchgeführt. Die Affinitätsmatrix wurde in ca. 1 ml des geklärten Lysats resuspendiert und in einem 50 ml-Polystyrolröhrchen mit dem Rest des Bakterienlysats vereinigt. Die Bindung erfolgte durch Rotieren über Nacht.

Durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 1 000 × g wurde die Glutathion-Sepharose™ 4B sedimentiert, der Überstand wurde fast vollständig dekantiert. Die Affintätsmatrix wurde im verbliebenen

Lysat resuspendiert und in eine leere 2 ml-Einweg-Chromatographiesäule überführt. Nachdem der Lysatrest abgelaufen war, wurde die Matrix dreimal mit je 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und fünfmal mit je 500 µl Glutathion-Elutionspuffer bei Raumtemperatur eluiert. Zwischen den einzelnen Elutionsschritten wurde jeweils 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.4 Zellbiologie

2.4.1 Zellfraktionierung [133]

Gefrorenes Myzel wurde unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff im Mörser mit etwas säuregewaschenem Seesand fein zermahlen. 10 ml davon wurden mit 10 ml Fraktionierungspuffer A (supplementiert mit 1 mM PMSF, 3 µg/ml Leupeptin, 3 µg/ml Pepstatin A und 3 mM DTT) versetzt, auf Eis gestellt und regelmäßig geschüttelt, bis das Myzelpulver vollständig aufgetaut und eine homogene Suspension entstanden war.

Die nicht zu zähflüssige Suspension wurde durch Verbandmull filtriert, um Sand und grobe Zelltrümmer zu entfernen. Unter Rühren wurden 20 ml eiskalter Fraktionierungspuffer B hinzugegeben und die Suspension in einem 38 ml-Polyallomer-Zentrifugenröhrchen auf 5 ml einer Mischung der Fraktionierungspuffer A und B im Verhältnis 1:1,7 geschichtet. Nach achtminütiger Zentrifugation im JS-24.38-Rotor bei 1 400 UpM und 4 °C wurde die obere Phase abgenommen, durchmischt und ein 1,5 ml-Aliquot als Totalhomogenat zurückbehalten. Der Rest wurde in einem 38 ml-Polykarbonat-Zentrifugenröhrchen auf 5 ml eiskalten „Stufengradient“-Puffer gegeben. Nach 15–20-minütiger Zentrifugation im JS-24.38-Rotor bei 7 000 UpM und 4 °C wurde die obere Phase (Cytosol) abgenommen und durchmischt, der Stufengradient dekantiert und verworfen. Die Zellkerne befanden sich als zäher Niederschlag am Boden des Zentrifugenröhrchens.

2.4.2 Kernextraktion

Die Zellkerne wurden direkt nach der Fraktioniernung in 200–400 µl (je nach Ausbeute) Proteinextraktionspuffer resuspendiert, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und durch Ultraschall aufgebrochen (Branson Sonifier 250 mit Mikrospitze, 2 Serien à 10 s, Intensität 2–3, Impulsverhältnis 50 %). Anschließend wurde 20 min bei 25 000 × g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt; der Niederschlag wurde verworfen.

2.4.3 Proteintotalextrakt

Gefrorenes Myzel wurde unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff im Mörser mit etwas säuregewaschenem Seesand fein zermahlen und in 15 ml-Polypropylenröhrchen (oder bei sehr kleinen Mengen 2 ml-Reaktionsgefäße) überführt. Nach Zugabe desselben Volumens Proteinextraktionspuffer (supplementiert mit 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Pepstatin A) wurde auf Eis gestellt und regelmäßig geschüttelt, bis das Myzelpulver vollständig aufgetaut und homogene Suspensionen entstanden waren. Die Suspensionen wurden 20 min bei 4 700 × g (15 ml-Polypropylenröhrchen) bzw. 10 min bei 10 000 × g (2 ml-Reaktionsgefäße) und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und 20 min bei 25 000 × g und 4 °C zentrifugiert. Ohne die oben schwimmende Lipidschicht mitzuschleppen wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und zur späteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren (Aufbewahrung bei – 80 °C).

2.5 Physiologie

2.5.1 Gewinnung von Makrokonidien

Zur Gewinnung von Makrokonidien wurde *Neurospora crassa* (als Konidiensuspension oder Myzelfragment) auf sterile 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml *Neurospora*-Festmedium (ggf. supplementiert mit 0,5 mg/ml Histidin·HCl) und Wattestopfen überimpft und ca. eine Woche bei Raumtemperatur im Licht inkubiert, bis sie vollständig mit Myzel bewachsen waren und sich das Luftmyzel orange verfärbte (je nach Stamm unterschiedlich intensiv). Die Konidien wurden mit 50 ml Wasser (bzw. 50 ml 1 M Sorbit für Elektroporation, vgl. 2.2.1) aufgeschlämmt und die Suspension durch sterilisierten Verbandmull filtriert, um Myzelreste zu entfernen. Die Konzentration der Suspension wurde durch Messen der Lichtstreuung bei 420 nm bestimmt (1 OD_{420} enspricht $2{,}86 \cdot 10^6$ Konidien). Die Konidiensuspensionen wurden in 50 ml-Polypropylenröhrchen bei – 20 °C gelagert.

2.5.2 Gewinnung von Myzel

Sterile Erlenmeyerkolben wurden zu einem Drittel ihres Volumens mit *Neurospora*-Flüssigmedium gefüllt und mit 20–40 OD_{420} Konidiensuspension pro 100 ml inokuliert. Die Kolben wurden unter Schütteln (ca. 120 UpM) im Licht bei 25 °C inkubiert, bis sie vollständig und dicht mit Myzel bewachsen waren. Das Myzel wurde im Büchner-Trichter auf Filterpapier durch Vakuum geerntet, kurz per Hand zwischen saugfähigem Papier trockengepresst und sofort in Polypropylenröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das schockgefrorene Myzel wurde ggf. bis zur Verwendung bei – 80 °C aufbewahrt.

2.5.3 Induktion mit Chinasäure

Da der *qa-2*-Promotor einer Katabolit-Repression unterliegt (u. a. durch Glukose, die zu 2 % (w/v) im Standardmedium enthalten ist), musste das Medium zur Induktion vollständig gewechselt werden. Dazu wurde das Myzel im Büchner-Trichter auf Filterpapier durch Vakuum geerntet, jedoch ohne es vollständig trocken werden zu lassen. Das Myzel wurde in etwa dem halben Ausgangsvolumen H_2O resuspendiert, kurz gerührt und wieder geerntet. Dieser Waschschritt wurde noch einmal wiederholt. Schließlich wurde das Myzel im Ausgangsvolumen Chinasäure-Induktionsmedium resuspendiert und weiter inkubiert.

Sollten mehrere Proben desselben Stamms unter gleichen Bedingungen angezogen und danach induziert werden, wurde zunnächst ein großes Volumen verwendet und wie oben verfahren. Das Myzel wurde aber vor dem Resuspendieren im Induktionsmedium in mehrere gleich große Stücke zerteilt und auf kleinere Erlenmeyerkolben verteilt. Damit wurde sicher gestellt, dass alle Proben den gleichen Ausgangszustand hatten und beim Wechsel des Mediums exakt gleich behandelt wurden.

2.5.4 *Race tube*-Analyse

Um das Funktionieren der circdianen Uhr auf physiologischer Ebene zu überprüfen, dient der in 1.2 auf Seite 6 beschriebene *race tube assay*. Die hier verwendeten *race tubes* sind 40 cm lange Glasröhren von 14 mm Innendurchmesser, die an den Enden um 45° nach oben gebogen sind. Das Medium (s. A.4.1 auf Seite 106) wird aufgekocht und heiß eingefüllt (jeweils ca. 7 ml). Nach dem Verschließen mit Wattestopfen werden die Enden mit Aluminiumfolie abgedeckt und die gefüllten *race tubes* autoklaviert. Sie müssen auf einer absolut waagerechten Oberfläche erkalten, damit eine gleichmäßige Schicht Festmedium entsteht.

Die *race tubes* werden an einem Ende mit frischen Konidien oder etwas Konidiensuspension inokuliert und 1–2 Tage bei Licht inkubiert, bis Myzel gewachsen und eine definierte Wachstumsfront erkennbar ist. Danach werden sie ins Dunkle gestellt (bzw. definierten Licht-Dunkel-Zyklen ausgesetzt), bis die gesamte Länge der Röhren bewachsen ist. Um Periodendauer und Phase der Zyklen bestimmen zu können, wird die Wachstumsfront täglich unter Rotlicht markiert. Nach Ende des Experiments werden die *race tubes* eingescannt (Luftmyzel mit Konidien reflektiert das Licht des Scanners stärker als normales Myzel, so dass es beim Auflicht-Scan heller erscheint) und densitometrisch analysiert.

3 Ergebnisse

Die im Folgenden genannten *N. crassa*-Stämme tragen alle die *bd*-Mutation, so dass dies nicht jedes Mal explizit angemerkt wird. Dies gilt auch dann, wenn – vereinfachend – die Bezeichnung „Wildtyp“ gewählt wurde. Falls nicht anders angegeben, wurde bei 25 °C und unter ständiger Beleuchtung (LL) kultiviert. So wird durch Aktivierung des Blaulichtrezeptors WC-1 fortwährend *frq* transkribiert und damit FRQ stark exprimiert; die circadiane Uhr läuft aber nicht.

3.1 Subzelluläre Verteilung von FRQ in Abhängigkeit von der Expressionsstärke

FRQ ist ein Protein von 989 Aminosäureresten mit der molekularen Masse 108 kDa, das vielfach phosphoryliert wird (Hyperphosphorylierung) und daher bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eine dichte Abfolge von Banden mit geringerer elektrophoretischer Mobilität bildet (apparente molekulare ca. 130–150 kDa). Die Konzentration von FRQ ist im Cytosol größer als im Zellkern, obwohl es ein funktionelles NLS besitzt und Kernlokalisation für die Funktion der circadianen Uhr unabdingbar ist [41].

FRQ-Moleküle dimerisieren über die *coiled coil*-Region, möglicherweise werden auch höhere Oligomere gebildet (vgl. 3.2.1; welche Regionen des Proteins neben der *coiled coil* dafür verantwortlich sind ist nicht bekannt). Die *coiled coil*-Interaktion ist notwendig für das Funktionieren der circadianen Uhr [45].

Selbstassoziation ist eine denkbare Möglichkeit, die subzelluläre Verteilung eines Proteins zu regulieren. Dabei könnten entweder bestimmte Regionen maskiert (z. B. ein NLS) oder durch damit einhergehende Konformationsänderungen freigelegt (etwa ein NES) werden. Nach dem Massenwirkungsgesetz ist die Bildung solcher Oligomere von der Konzentration der Monomere abhängig. Daher wurde FRQ im *frq-knock-out*-Stamm frq^{10} unter dem heterologen *qa-2*-Promotor 14 h bei unterschiedlichen Konzentrationen des Induktors Chinasäure exprimiert, um verschiedene FRQ-Konzentrationen innerhalb der Zelle zu erhalten (Abb. 10). Die FRQ-Mengen steigen deutlich von 15,6 µM bis 1,56 mM Chinasäure, während darüber eine Sättigung erreicht wird, d.h. maximale Induktion vorliegt. Fraktionierung der Zellen zeigt, dass die relative Verteilung des Proteins dagegen

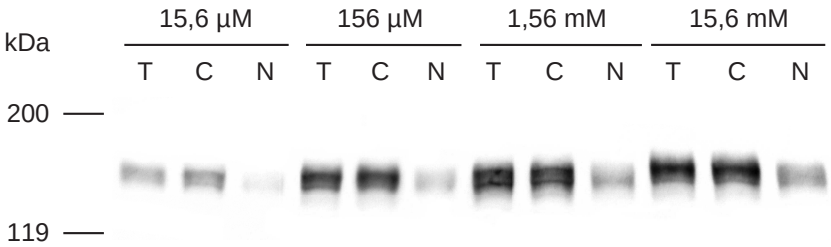

Abbildung 10: Subzelluläre Verteilung von FRQ nach 14-stündiger Induktion über *qa-2*-Promotor mit verschiedenen Chinasäure-Konzentrationen; die Expressionsstärke ist von der Induktorkonzentration abhängig, die relative Verteilung ändert sich aber nicht. T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

von der Konzentration unabhängig ist. Ein Hinweis darauf, dass konzentrationsabhängige Oligomerisierung die subzelluläre Lokalisation von FRQ bedingt, ergibt sich also nicht (vgl. dazu auch 3.2.1).

3.2 Lokalisation von FRQ und FRQ^9

Der arythmische Stamm *frq*^{9} exprimiert auf Grund einer Leserasterverschiebung ein C-terminal um ca. 30 % verkürztes Protein (662 Aminosäurereste, 73 kDa), welches wie das Wildtyp-Protein vielfach phosphoryliert ist [21] und – bei insgesamt reduzierter Menge – vorwiegend im Kern zu finden ist (Abb. 11). Werden FRQ und FRQ^9 koexprimiert, ändert sich die subzelluläre Verteilung von FRQ^9: Zwischen Totalhomogenat und Cytosol ist kaum mehr ein Unterschied erkennbar, während

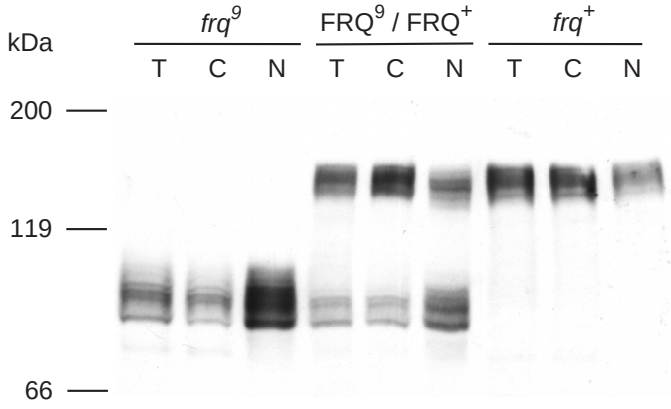

Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisation von FRQ und FRQ^9; FRQ/FRQ^9: *frq*^{9} *bd*BM60 *Cla* I-Fr. In den Ausgangsstämmen ist FRQ stärker im Cytosol, in FRQ^9 hauptsächlich im Kern konzentriert. Wird FRQ^9 mit FRQ koexprimiert, sinkt sein Anteil im Kern zugunsten des cytosolischen bei insgesamt geringerer Expressionsstärke. T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

die Konzentration im Kern relativ zum Cytosol deutlich abgenommen hat. Dies zeigt, dass FRQ^9 mit FRQ assoziiert und FRQ die Lokalisation dieses Komplexes maßgeblich bestimmt.

Weiterhin verringert sich die Gesamtmenge an FRQ^9. Ursache ist wahrscheinlich die geringere mRNA-Menge, denn FRQ reprimiert die Synthese seiner eigenen mRNA wie auch von *frq*^{9}-mRNA, die sich nur durch die Deletion einer einzelnen Base vom Wildtyp-Gen unterscheidet; FRQ^9 vermag dies – trotz hoher nukleärer Konzentration – nicht [21]. Bei Koexpression ist die Repression durch FRQ dominant, so dass *frq*- wie auch *frq*^{9}-mRNA in gleicher Menge, nämlich wie beim Wildtyp, vorliegen*.

Die N-terminalen 336 Aminosäurereste, welche die *coiled coil*-Region und das NLS von FRQ sowie das Epitop des monoklonalen Antikörpers 3G11 beinhalten, sind zwischen den FRQ-Orthologen stark konserviert und vom Rest des Proteins durch ein variables Segment getrennt (vgl. Abb. 4 auf Seite 10). Daher wurde dieser Bereich als putative Domäne angesehen, im *Cla* I-Fragment mit GFP fusioniert (FRQ(1–336) GFP, [134]), und *frq*^{10} sowie *frq*$^+$ damit transformiert. Das Fusionsprotein (berechnete molekulare Masse 64 kDa) zeigt in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nur wenige Phosphorylierungsstufen und wird noch schwächer exprimiert als FRQ^9, verteilt sich aber subzellulär in beiden Hintergrundstämmen völlig analog zu diesem (Abb. 12). Die Kernlokalisation von FRQ^9 ist damit unabhängig von der Mehrzahl der Phosphorylierungen und wird vollständig durch die N-terminalen 336 Aminosäurereste bestimmt. Ebenso sind diese für die Assoziation mit FRQ und damit wahrscheinlich auch für Homooligomerisierung notwendig und hinreichend. Die

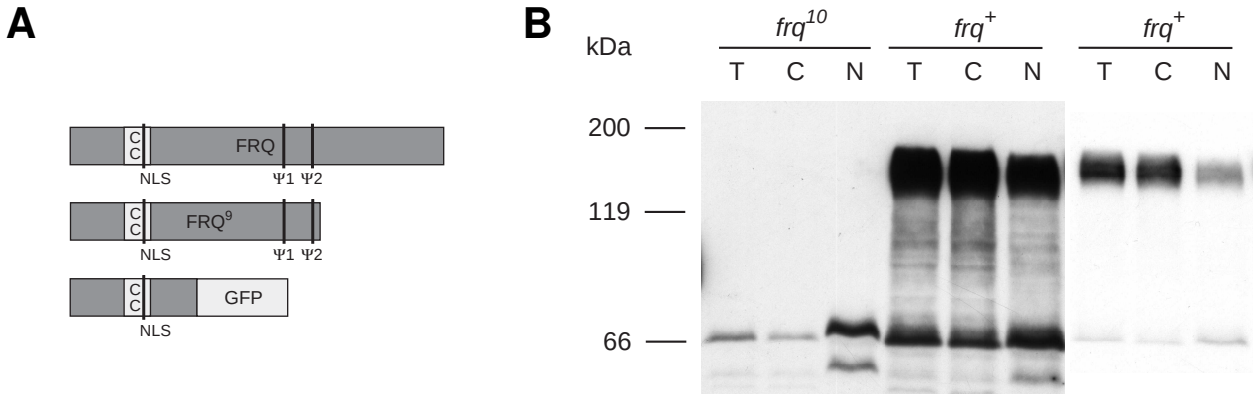

Abbildung 12: A: Schematischer Aufbau von FRQ, FRQ^9 und FRQ(1–336) GFP. **B**: Subzelluläre Lokalisation von FRQ(1–336) GFP exprimiert in *frq*^{10} und *frq*$^+$ (der Bildteil mit dunklem Hintergrund zeigt eine längere Exposition); wie bei FRQ^9 steigt durch Koexpression mit FRQ der Anteil des cytosolischen Proteins. T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

* Bei FRQ/FRQ^9 handelt es sich um *frq*^{9} BM60 *Cla* I-Fragment, einen *frq*^{9}-Stamm, der mit einem 8679 bp großen Restriktionsfragment aus genomischer DNA transformiert wurde, das einen funktionalen *frq*$^+$-Locus enthält. Da sich beide Loci nur durch die Deletion eines einzigen Basenpaars im kodierenden Bereich unterscheiden, unterliegen sie der gleichen Transkriptionsregulation.

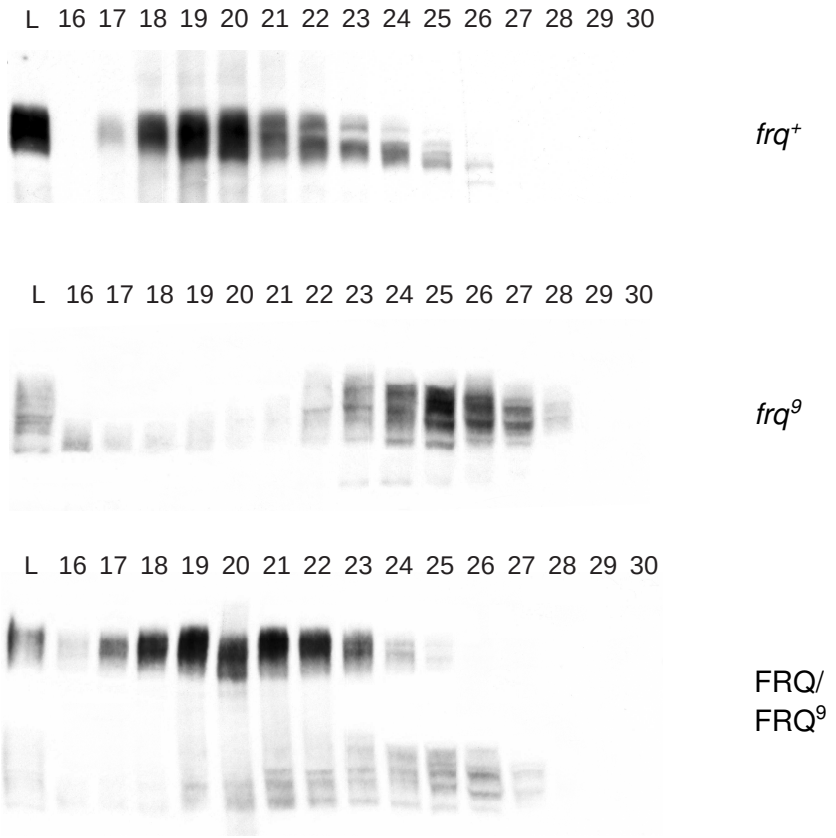

Abbildung 13: Analytische Gelfiltration von Proteintotalextrakten aus **A** *frq*$^{+}$, **B** *frq*^{9} und **C** *frq*^{9} BM60 *Cla* I-Fr. (FRQ/FRQ^{9}). L: Ladekontrolle (100 µg Gesamtprotein)

Expressionsstärke des Fusionsproteins steigt – anders als FRQ^{9} – durch Koexpression mit FRQ. Zwar wird auch hier die Transkription durch negative Rückkopplung reduziert, jedoch scheint dies überkompensiert zu werden, indem Assoziation mit FRQ die Stabilität des Fusionsproteins deutlich erhöht.

3.2.1 Analyse von FRQ/FRQ^{9}-Komplexen durch Gelfiltration

Wenn die Kernlokalisation von FRQ^{9} durch Assoziation mit FRQ vermindert werden kann, sollten bei Koexpression von FRQ^{9} und FRQ andere Populationen von Komplexen auftreten als in *frq*^{9} und *frq*$^{+}$. Daher wurden Totalextrakte (jeweils 5 mg Gesamtprotein) dieser beiden Stämme sowie von *frq*^{9} BM60 *Cla* I-Fragment durch Gelfiltration auf einer Superose 6 16/200-Säule aufgetrennt (2.3.1) und je $\frac{1}{3}$ der Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abb. 13). FRQ wie auch FRQ^{9} verteilen sich über viele Elutionsfraktionen; die FRQ-Komplexe eluieren größtenteils früher als die von FRQ^{9}. Weil beide jeweils über die *coiled coil*-Region dimerisieren, liegen die apparenten molekularen Massen über denen der jeweiligen Monomere. Möglicherweise werden auch höhere

Oligomere gebildet; da FRQ (bzw. FRQ^9) aber wahrscheinlich keine ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur ausbildet (s. 3.3.5), ist eine genaue Aussage schwierig*.

Bei Koexpression von FRQ^9 und FRQ (*frq^9* BM60 *Cla* I-Fragment) eluiert ein Teil des FRQ^9 schon wesentlich früher als in *frq^9*, tritt also in Komplexen mit höherer apparenter molekularer Masse auf. Es kommt zu einer stärkeren Überlappung des Elutionsprofils mit dem von FRQ, weil beide (über die *coiled coil*-Region) assoziieren. FRQ^9 verteilt sich hier insgesamt über einen größeren

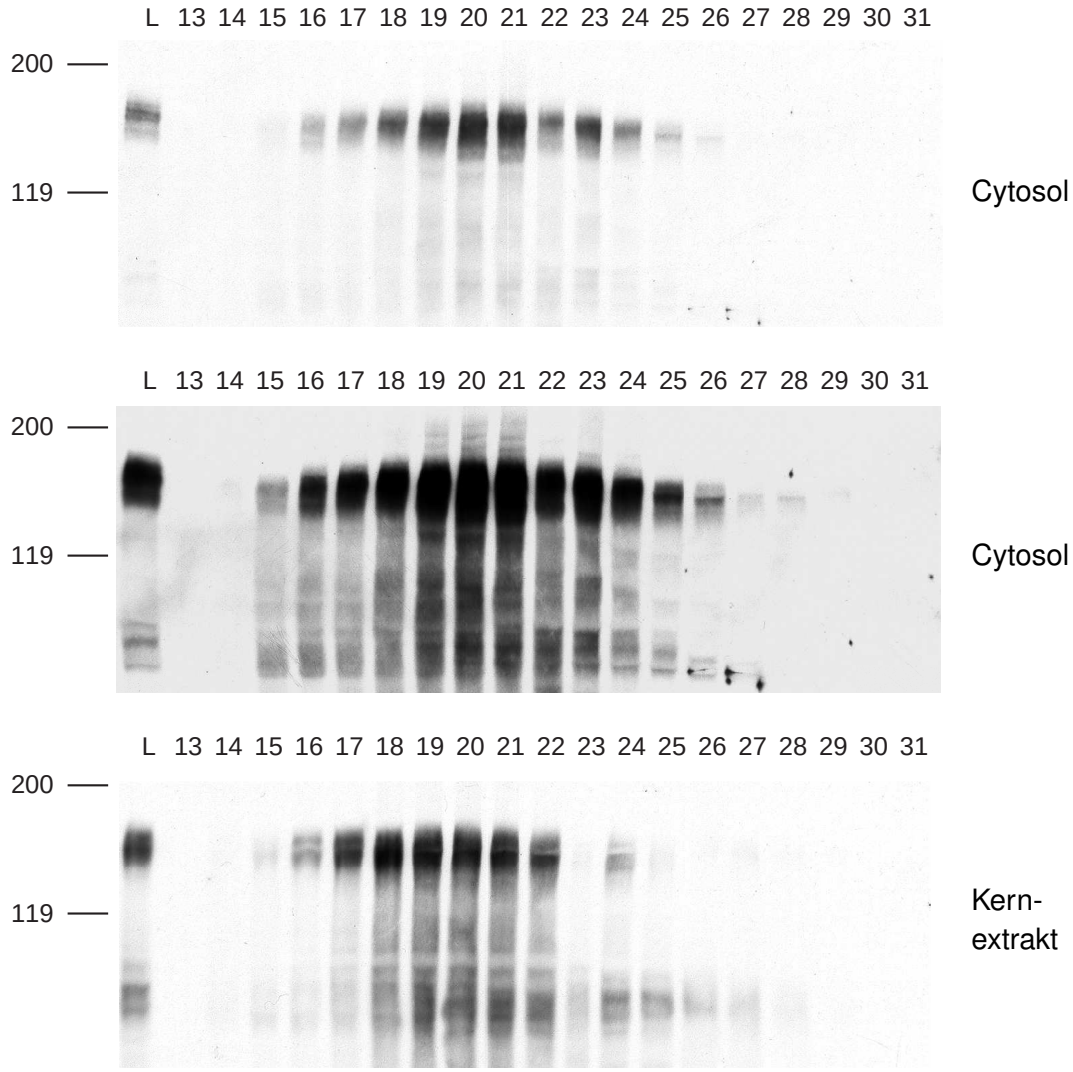

Abbildung 14: Analytische Gelfiltration von Cytosol und Kernextrakt aus FRQ/FRQ^9 (*frq^9* BM60 *Cla* I-Fr.); das Bild mit dunklem Hintergrund zeigt eine längere Belichtung. L: Ladekontrolle (100 µg Gesamtprotein).

* Filamentöse/extendierte Proteine oder Proteinkomplexe eluieren in der Gelfiltration früher als globuläre mit gleicher molekularer Masse, und wenig strukturierte Proteine können viele verschiedene Konformationen annehmen, so dass ihr Laufverhalten uneinheitlich und zwischen diesen Extremen zu erwarten ist.

Bereich; ein Teil der Population eluiert wie im *frq*^{9}-Stamm, bildet also vermutlich reine FRQ^9-Komplexe.

Um Unterschiede zwischen cytosolischen und nukleären FRQ/FRQ^9-Komplexen zu erkennen, wurden Cytosol und Kernextrakt aus *frq*^{9} BM60 *Cla* I-Fragment (ebenfalls je 5 mg Gesamtprotein) durch Gelfiltration analysiert; das Cytosol wurde zuvor durch Ultrafiltration in Proteinextraktionspuffer umgepuffert, weil die hohe Viskosität des Fraktionierungspuffers (bedingt durch den Gehalt an Ficoll, Sorbit und Glyzerin) die Auftrennung bei der Gelfiltration negativ beeinflussen würde. Wiederum wurde je $\frac{1}{3}$ der Fraktionen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abb. 14). Für FRQ ist zwischen Kernextrakt und Cytosol kaum ein Unterschied sichtbar, bei FRQ^9 dagegen sind die cytosolischen Komplexe größer (eluieren früher) als die nukleären, ihr Elutionsprofil deckt sich stärker mit dem von FRQ. Folglich befinden sich FRQ^9-Komplexe vorwiegend im Kern, während FRQ^9/FRQ-Komplexe bzw. reine FRQ-Komplexe bevorzugt im Cytosol zu finden sind. Durch den großen Überschuss an FRQ gegenüber FRQ^9 wird ein Teil des FRQ^9-Proteins ins Cytosol verschoben (verglichen mit einem reinen *frq*^{9}-Stamm), während umgekehrt eine Auswirkung von FRQ^9 auf FRQ nicht zu erkennen ist.

Da das NLS von FRQ der *coiled coil*-Region unmittelbar folgt, könnte FRQ-Oligomerisierung das NLS maskieren und somit zu cytosolischer Lokalisation führen (vgl. 3.1). Die FRQ-Elutionsprofile von Cytosol und Kernextrakt unterscheiden sich jedoch nicht, so dass auch die Gelfiltrationsdaten gegen dieses Modell sprechen. Das Ergebnis schließt NLS-Maskierung als Regulationsmechanismus aber nicht grundsätzlich aus, denn auch eine Konformationsänderung innerhalb der Komplexe, die keine Auswirkung auf das Elutionsprofil hat, könnte eine (De-)Maskierung bewirken.

3.3 Lokalisation von FRQ-Proteinen mit partiellen Deletionen

3.3.1 C-terminal verkürzte FRQ-Formen

In der Sequenz des C-Terminus von FRQ sind keine eindeutigen Kandidaten für Kernexportsignale zu identifizieren. Um evtl. einen Bereich einengen zu können, der für die dominant cytosolische Lokalisation von FRQ verantwortlich ist, wurde eine Reihe von C-terminalen Verkürzungen generiert (Abb. 15 A zeigt eine maßstäbliche schematische Übersicht). Durch *in vitro*-Mutagenese wurden vorzeitige Stopp-Kodons im FRQ-Leserahmen des Plasmids pBM60 *Cla* I-Fr. eingeführt; *frq*^{10} *bd his-3* wurde mit den mutagenisierten Plasmiden transformiert. Die verkürzten FRQ-Proteine zeigten alle in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese – wie das Wildtyp-Protein – eine Abfolge mehrerer Banden, die unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen (Hyperphosphorylierung) entsprechen (Abb. 15 B). Dies ließ sich durch Inkubation der Extrakte mit alkalischer Phosphatase bestätigen; es blieb jeweils nur eine einzelne Bande hoher elektrophoretischer Mobilität übrig (Abb. 15 C). Die

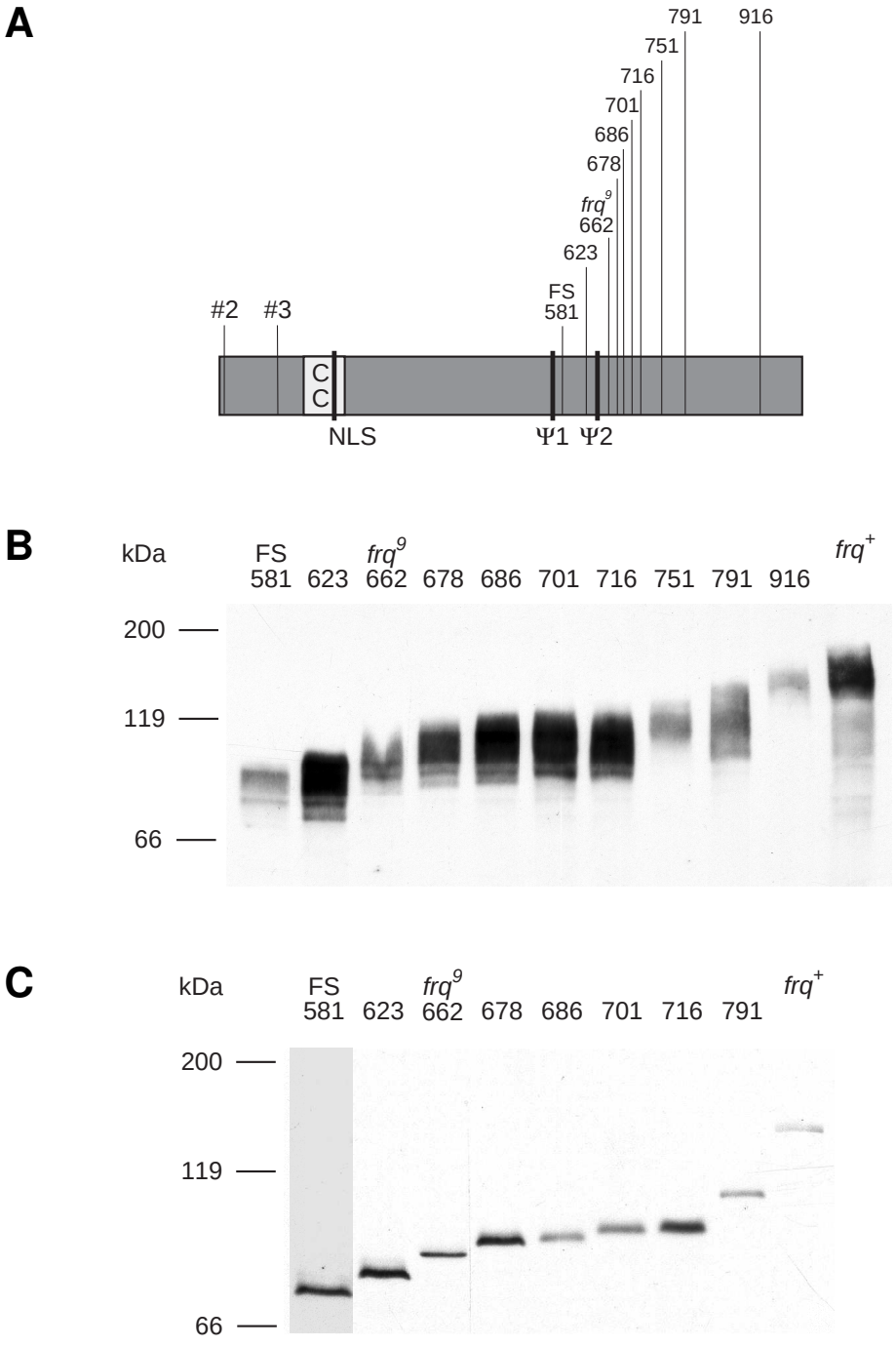

Abbildung 15: C-terminale Verkürzungen von FRQ; die Zahlen bezeichnen den Aminosäurerest, nach dem das Stopp-Kodon eingeführt wurde. **A**: Maßstäbliche schematische Darstellung; #2, #3: alternative Start-Kodons, vgl. [89]; Ψ1, Ψ2: Pseudo-NLS; CC: *coiled coil*-Bereich; FS: Leseraster-verschiebung (*frame shift*); NLS: Kernlokalisationssequenz. **B**/**C**: Expression der FRQ-Verkürzungen (je 200 µg Gesamtprotein); **B**: Kernextrakt, **C**: dephosphorylierter Kernextrakt (der Bildausschnitt mit dunklem Hintergrund zeigt eine längere Exposition)

Expressionsstärke der einzelnen Konstrukte ist sehr unterschiedlich (zwei waren nach Dephosphorylierung nicht mehr detektierbar, weil während der Dephosphorylierungsprozedur – trotz Proteaseinhibitoren – auch in gewissem Umfang Proteinabbau stattfindet). Möglicherweise ist die Sekundär-/Tertiärstruktur des Proteins bei einigen Mutanten erheblich gestört (z. B. unvollständige oder fehlerhafte Faltung einer Domäne), so dass es von der Zelle als defekt eingestuft und daher rasch abgebaut wird (s. a. limitierte Proteolyse von FRQ, 3.3.5). Eine andere Erklärung wäre, dass ein vorher im

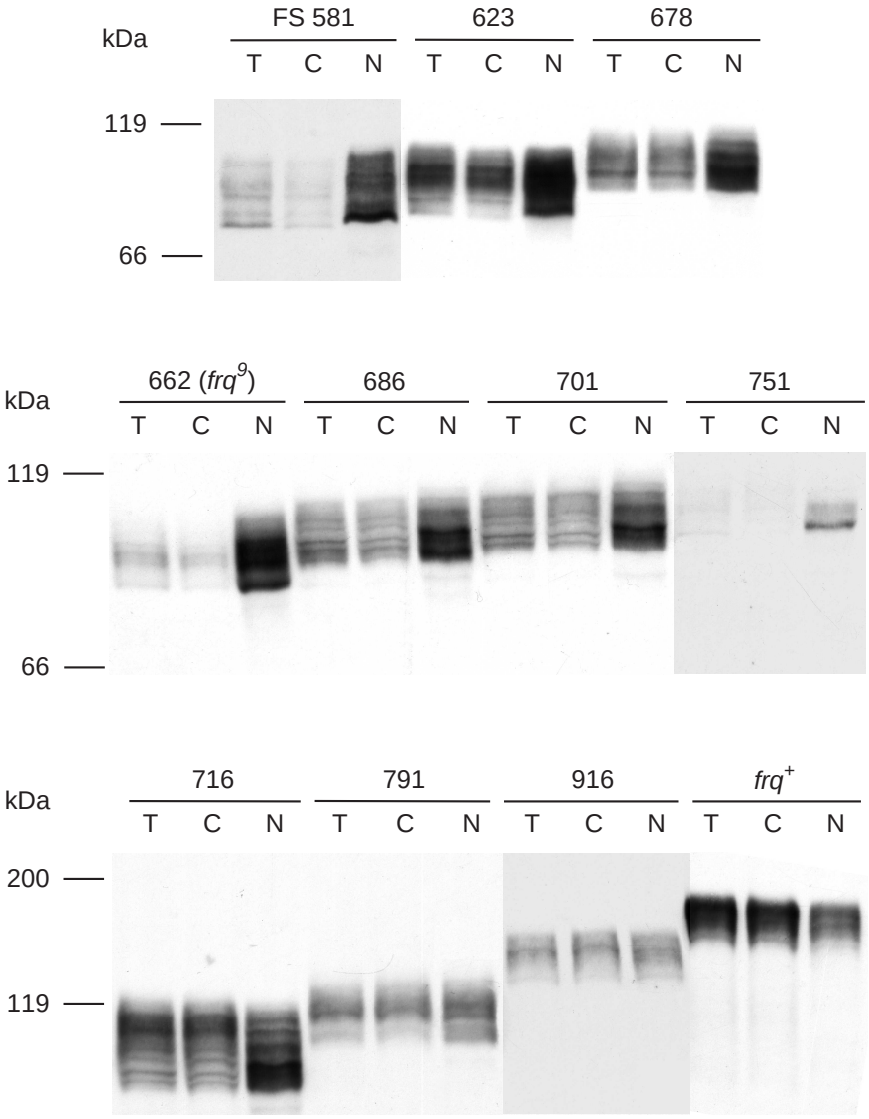

Abbildung 16: Subzelluläre Lokalisation von C-terminalen FRQ-Verkürzungen; die Zahlen bezeichnen den Aminosäurerest, nach dem die Mutation eingeführt wurde. Detektion mit monokl. αFRQ-Anitkörper 3G11; Bildausschnitte mit dunklem Hintergrund zeigen längere Expositionen. FS: Leserasterverschiebung (*frame shift*); T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

Inneren des Proteins verborgenes Abbausignal freigelegt wird und so dessen Lebensdauer herabsetzt. Bei noch stärkerer Verkürzung fehlt dann auch das putative Abbausignal, so dass die Stabilität wieder steigt.

Wie schon bei der Expression von induzierbarem FRQ mit verschiedenen Induktor-Konzentrationen (Abb. 10) gezeigt, beeinflusst die Expressionsstärke die Lokalisation nicht (Abb. 16). Die subzelluläre Verteilung der verkürzten FRQ-Proteine ändert sich nicht abrupt, sondern zeigt einen langsamen Übergang von überwiegend kernlokalisiert (581 FS, 623 Stop – 751 Stop) über Gleichverteilung zwischen Kern und Cytosol (791 Stop und 916 Stop) bis zu überwiegend cytosolisch (FRQ^{wt}). Es scheint keinen klar definierten Bereich zu geben, der für die Dominanz des C-Terminus über das NLS von FRQ verantwortlich ist. Entweder wirken mehrere NES synergistisch, die mit stärkerer Verkürzung sukzessiv entfernt werden, oder der C-Terminus vermag das NLS im N-Terminus zu maskieren, und diese Maskierung nimmt mit fortschreitender Verkürzung des Proteins ab. Denkbar wäre auch eine Reihe von Phosphorylierungsstellen, die für den Kernexport benötigt werden und bei der C-terminalen Verkürzung nach und nach verloren gehen. Aus dem bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sichtbaren Phosphorylierungsmuster der Proteine lässt sich dies jedoch nicht ableiten. Bei FRQ 716 Stop und 791 Stop ist zu erkennen, dass im Cytosol stärker phosphorylierte Formen dominieren, während im Kern schwächer phosphorylierte angereichert sind. Dieser Effekt ist in höher auflösender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auch bei FRQ 916 Stop und FRQ^{wt} zu sehen (Daten hier nicht gezeigt). Das Muster der Hyperphosphorylierung hat aber keine Bedeutung für die subzelluläre Lokalisation, wie eine nicht-hyperphosphorylierte Deletionsmutante verdeutlicht (vgl. 3.3.2).

3.3.2 FRQ-Varianten mit zentralen Deletionen

Zur Charakterisierung der Region um die frq^9-Mutation wurden zwei Deletionsmutanten von FRQ erzeugt (Abb. 17 A): In der ersten wurde der phylogenetisch hoch konservierte Bereich der Aminosäurereste 584–677 durch *in vitro*-Mutagenese des *Cla* I-Fragments* deletiert (FRQ Δ584–677). Für die zweite wurde der C-Terminus von FRQ ab Position 712 mit dem Konstrukt FRQ(1–336) GFP (vgl. 3.2 auf Seite 49) fusioniert; formal wurden also die Aminosäurereste 337–711 durch GFP ersetzt (FRQ 337–711::GFP).

Nach Transformation von frq^{10} *bd his-3* wurde die subzelluläre Verteilung der Proteine analysiert (Abb. 17 B). FRQ Δ584–677 verhält sich wie FRQ; auch das Phosphorylierungsmuster ist nicht sichtbar verändert. FRQ 337–711::GFP dagegen wird schwächer exprimiert als FRQ, erscheint als

* Die oben beschriebende C-terminal verkürzte FRQ-Variante FS 581 entstand zufällig durch eine Leserasterverschiebung, Nukleotidsequenz s. A.3.2 auf Seite 105.

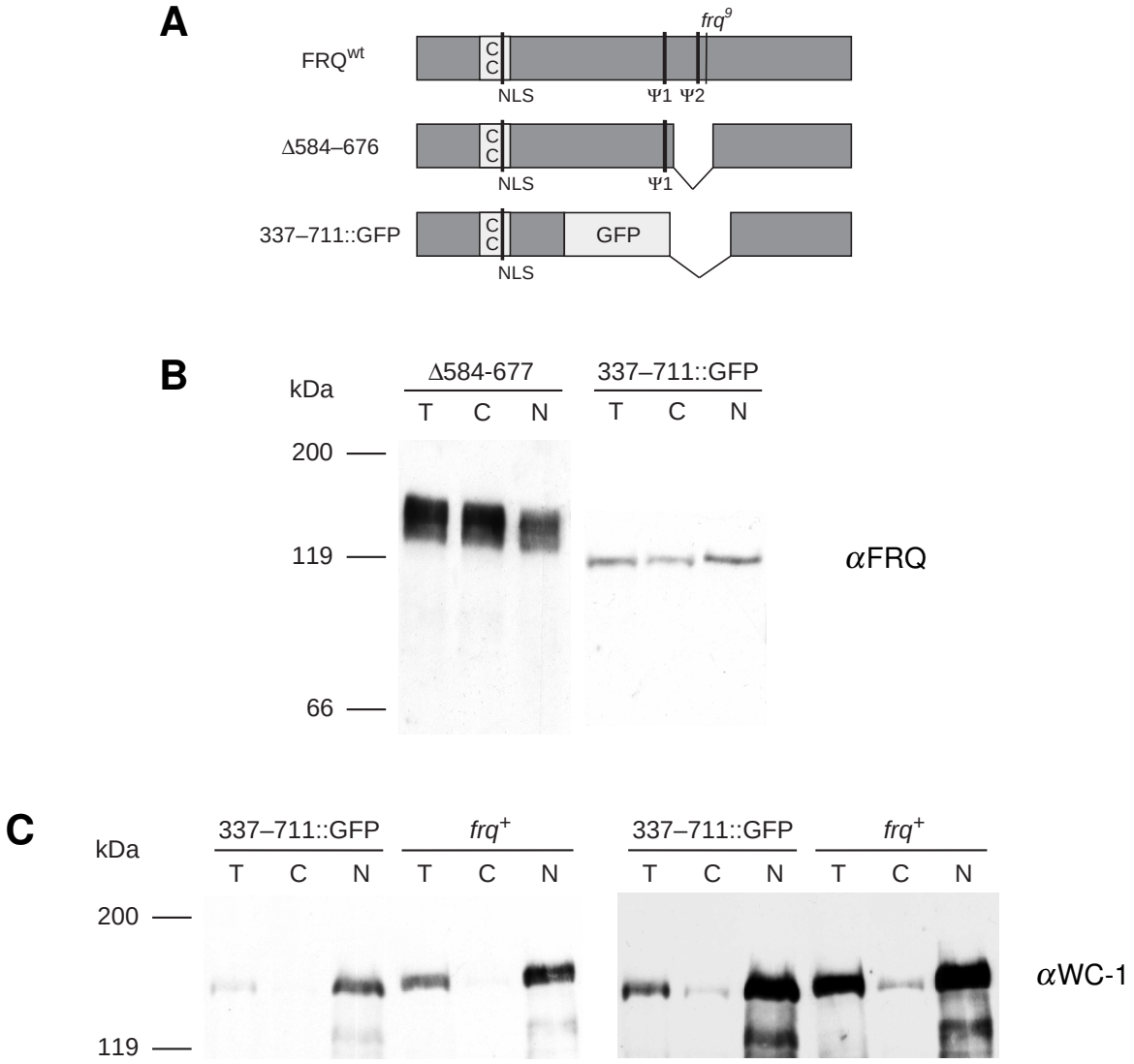

Abbildung 17: Charakterisierung der FRQ-Deletionsmutanten. **A**: Schematische Darstellung, **B**: Subzelluläre Lokalisierung, **C**: Test der positiven Rückkopplung auf die Expression von WC-1 (der Bildteil mit dunklem Hintergrund zeigt eine längere Exposition); T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

einzelne Bande (keine Hyperphosphorylierung) und ist im Kern etwas höher konzentriert als im Cytosol (vergleichbar mit FRQ 791 Stop, s. Abb. 16).

Durch Deletion der Aminosäuren 337–711 wurde eine Region des Proteins entfernt, die für einen Großteil der Phosphorylierungen von FRQ wichtig ist, diese Hyperphosphorylierungen sind aber für die subzelluläre Verteilung nicht von Bedeutung. Weiterhin kann der C-Terminus ohne das Vorhandensein dieses Bereichs nicht hyperphosphoryliert werden, obwohl er eine große Anzahl von potentiellen Phosphorylierungstellen (PEST2-Region) besitzt. Die PEST2-Region ist bedeutsam für die

cytosolische Funktion von FRQ, die Akkumulation des WCC zu fördern [33]. Die WC-1-Expression ist mit FRQ 337–711::GFP gegenüber dem Wildtyp zwar verringert (Abb. 17 C), die Mutante scheint aber in ihrer Wirkung auf den WCC (positive Rückkopplung) noch funktional zu sein. Die im Vergleich zum Wildtyp geringere Expression von FRQ 337–711::GFP könnte die Differenz bei den WC-1-Mengen erklären.

3.3.3 FRQ-Assoziation mit Caseinkinase 1a

Die fehlende Hyperphosphorylierung von FRQ 337–711::GFP wirft die Frage auf, ob im deletierten Bereich nicht nur potentielle Phosphorylierungsstellen sondern auch Kinasebindungsstellen zu finden sind, die als Plattform für die Phosphorylierung anderer Regionen des Proteins dienen können. In [43] wurde gezeigt, dass Caseinkinase 1a mit FRQ assoziiert ist und *in vitro* beide PEST-Regionen phosphoryliert. Deshalb wurde CK 1a mit polyklonalem Antikörper gebunden an Prote-

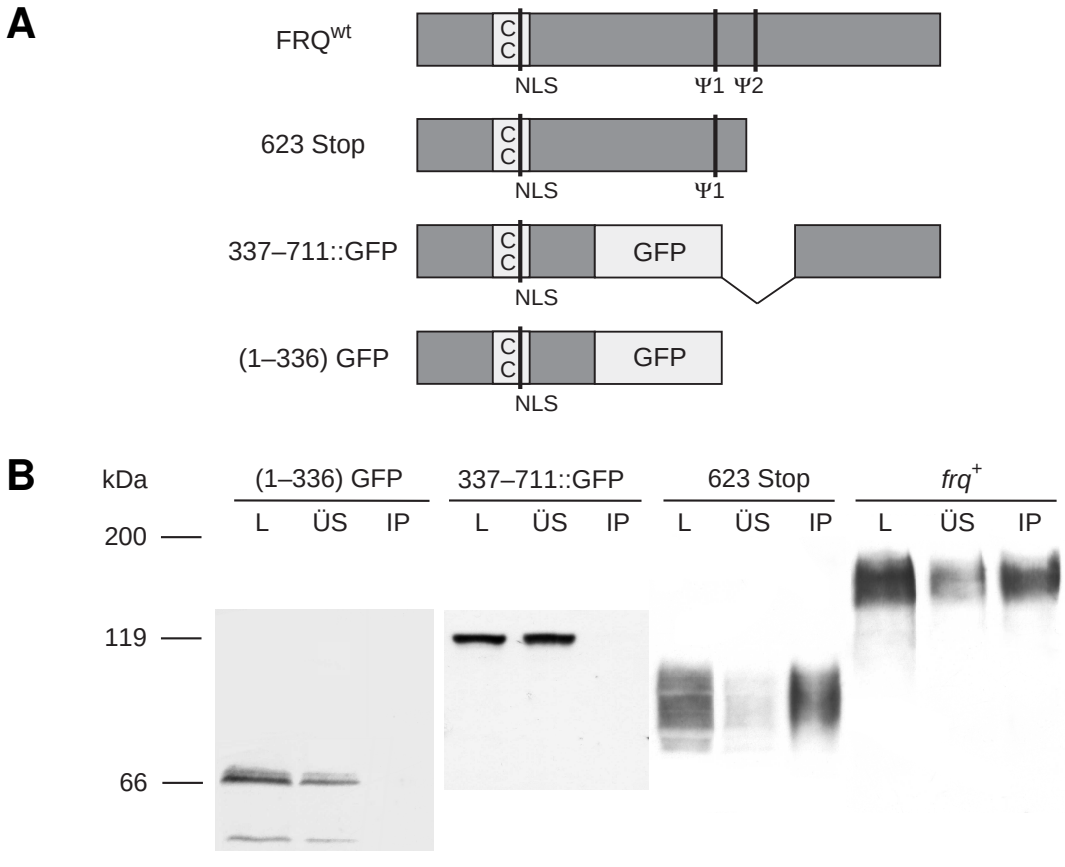

Abbildung 18: Koimmunpräzipitation von FRQ-Deletionsmutanten mit Caseinkinase 1a. **A**: Schematische Darstellung der FRQ-Konstrukte; **B**: Fällung von Totalextrakten (je 5 mg Gesamtprotein) mit polykl. αCK 1a-Antikörper gekoppelt an Protein A-Sepharose, Detektion mit monokl. αFRQ-Antikörper 3G11. L: Ladekontrolle, ÜS: Überstand (je 200 µg Gesamtprotein), IP: Immunpräzipitat (33 %); die Bildausschnitte mit dunklem Hintergrund zeigen längere Expositionen

in A-Sepharose aus Proteintotalextrakten (je 5 mg Gesamtprotein) immunpräzipitiert, die gefällten Proteine durch Kochen mit Lämmli-Auftragspuffer eluiert und jeweils $\frac{1}{3}$ des Eluats durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Die Immundetektion mit monoklonalem αFRQ-Antikörper 3G11 (Abb. 18) zeigt, dass zusammen mit CK 1a FRQ und FRQ 623 Stop, nicht aber FRQ(1–336) GFP oder FRQ 337–711::GFP gefällt werden können. Da Letztere auch nicht hyperphosphoryliert sind, könnte Bindung/Phosphorylierung durch CK 1a notwendige Voraussetzung für die progressive Phosphorylierung von FRQ durch andere Kinasen sein. Die CK 1a-Bindungsstelle wurde in [56] auf die Aminosäurereste 435–558 eingegrenzt in Übereinstimmung mit den hier erhaltenen Daten.

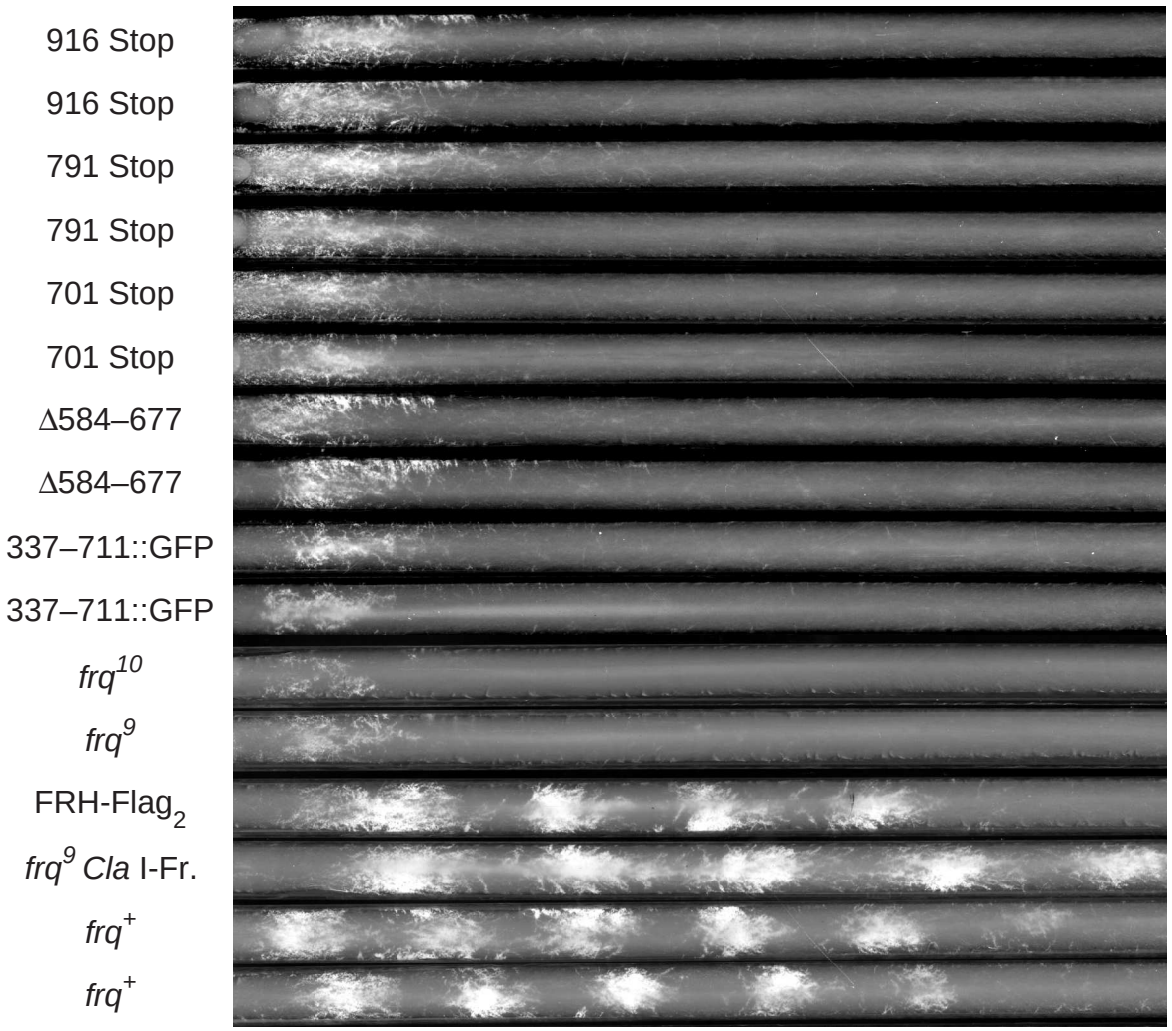

Abbildung 19: *Race tube*-Analyse von ausgewählten FRQ-Mutanten bei 25 °C. Alle Stämme wurden nach dem Inokulieren 24 h im Licht inkubiert und dann ins Dunkle gestellt. Sowohl die C-terminal verkürzten FRQ-Proteine als auch die mit zentralen Deletionen können den Rhythmus des *frq*^{10}-Hintergundstamms nicht wiederherstellen. FRH-Flag$_2$: *bd* FH64 FRH-Flag$_2$, s. 3.4

3.3.4 Physiologische Rhythmizität der *frq*-Mutanten

Alle oben beschriebenen *frq*-Mutanten sind durch Modifikation des *Cla* I-Fragments entstanden. Weil dieses den gesamten *frq*-Locus umfasst und frq^9 bzw. frq^{10} komplementieren kann, wurden exemplarisch einige dieser Stämme durch *race tube*-Analyse auf physiologische Rhythmizität untersucht (Abb. 19). Alle getesteten Stämme zeigen kein Bandenmuster der Konidienbildung und sind somit arythmisch. Dies betrifft auch die Mutanten mit den kleinsten Deletionen (Δ584–677 und 916 Stopp), bei denen allerdings phylogenetisch stark konservierte Bereiche deletiert wurden (vgl. 4 auf Seite 10; Aminosäurereste 584–677 sowie am C-Terminus Aminosäurereste 967–985). Offensichtlich werden diese Bereiche für die Funktion von FRQ benötigt.

Das sichtbare Phosphorylierungsmuster in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und die subzelluläre Verteilung des FRQ-Konstrukts lassen keine Aussage über das Funktionieren der circadianen Uhr zu. Allerdings besteht die prinzipielle Möglichkeit, dass die Uhr auf molekularer Ebene noch funktioniert und nur Signaltransduktionswege außerhalb des zentralen Oszillators betroffen sind; dies wurde hier nicht überprüft.

3.3.5 Limitierte Proteolyse von FRQ

In 3.3.1 wurde die Möglichkeit erörtert, dass der C-Terminus von FRQ das NLS maskieren könnte; dieser müsste dazu eine definierte Konformation annehmen. Über die räumliche Struktur von FRQ gibt es jedoch bisher keine Daten. Strukturvorhersagen über FRQ lassen sich nur begrenzt treffen, denn außer den in Abb. 4 auf Seite 10 gezeigten Homologen sind keine strukturverwandten Proteine bekannt; von den gängigen Algorithmen wird lediglich die α-helikale *coiled coil*-Region vorhergesagt. Möglicherweise geben zwischen den FRQ-Homologen stark konservierte Bereiche einen Anhaltspunkt für Domänengrenzen, doch vermutlich besitzt FRQ keine ausgeprägte Tertiärstruktur (SMART [135] klassifiziert den größten Teil außerhalb der *coiled coil*-Region als *low complexity*).

Durch limitierte Proteolyse lassen sich grobe Informationen gewinnen, da ungefaltete Teile oder solche mit labiler Struktur leichter durch Proteasen angreifbar sind als stabil gefaltete Strukturen. Mit spezifischen Antikörpern können solche stabileren Fragmente nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese identifiziert werden. wt-Totalextrakt ohne Proteinaseinhibitoren wurde 30 min auf Eis mit unterschiedlichen Mengen Trypsin bzw. Proteinase K inkubiert; die Reaktion wurde durch Kochen mit Lämmli-Probenpuffer gestoppt. Die FRQ-Fragmente wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert und nach Elektrotransfer durch verschiedene Antikörper detektiert, die jeweils ein Epitop am N-Terminus (Aminosäurereste 65–100 [136]), aus der Mitte von FRQ (Aminosäurereste 508–648 [134]) bzw. am C-Terminus (Aminosäurereste 823–989 [89]) erkennen (Abb. 20).

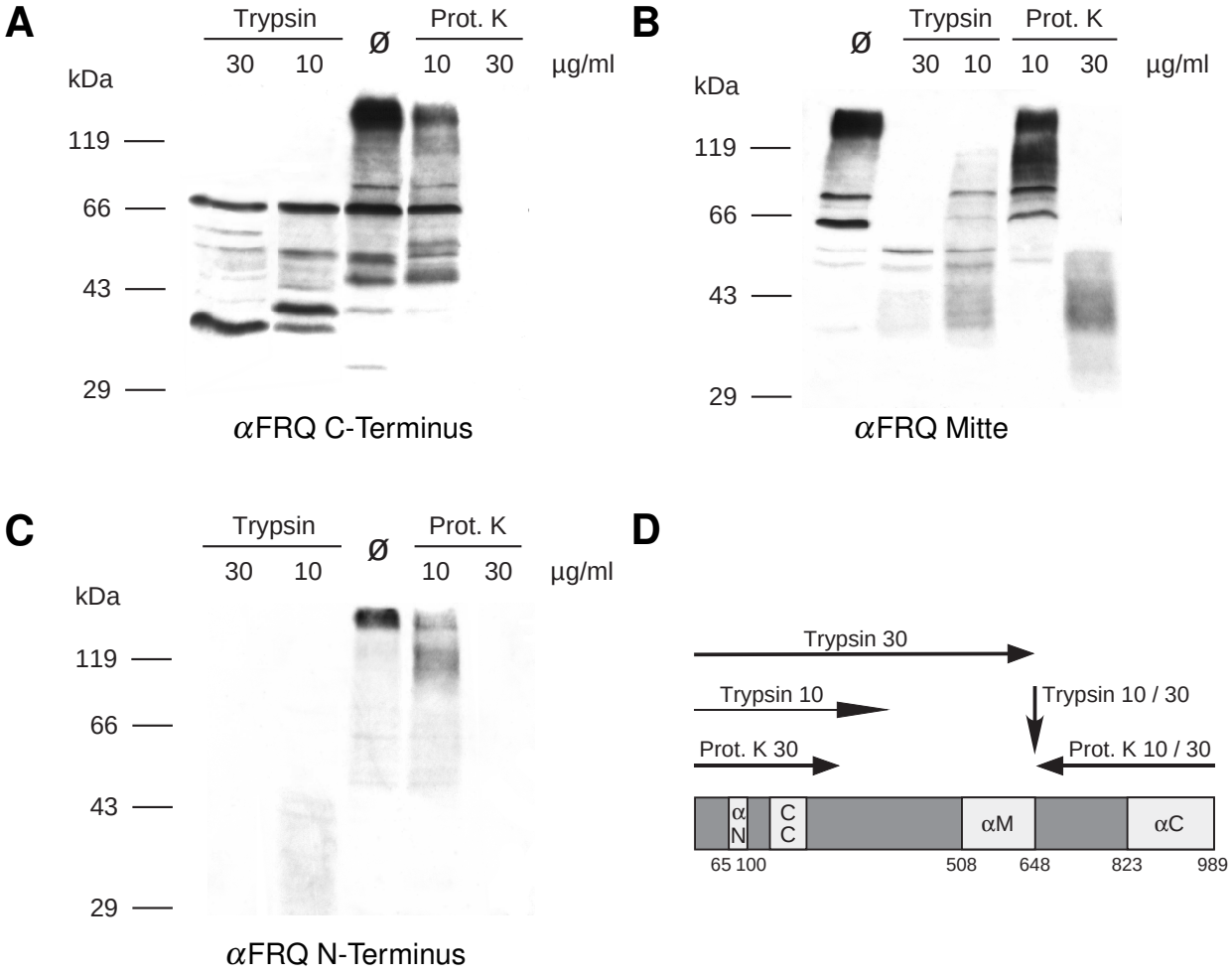

Abbildung 20: Limitierte Proteolyse von FRQ. wt-Totalextrakt entsprechend 200 µg Gesamtprotein wurde 30 min auf Eis mit Proteinase K bzw. Trypsin (jeweils 10 bzw. 30 µg/ml) inkubiert; Immundetektion: **A** polykl. αFRQ C-Terminus (αC), **B** polykl. αFRQ Mitte (αM), **C** monokl. αFRQ N-Terminus 3G11 (αN), **D**: schematische Übersicht (maßstäblich) der einzelnen Antikörper-Epitope in FRQ sowie der vermuteten Proteolysestufen; CC: *coiled coil*.

Der C-terminale Antikörper (A) zeigt beim Trypsinverdau mit 10 µg/ml zwei scharfe Banden im Bereich ca. 35–40 kDa, die ohne Proteasen nicht auftreten, also keine Kreuzreaktionen des Antikörpers sind und wegen der hohen Signalintensität nicht als Abbauprodukte anderer kreuzreaktiver Proteine in Frage kommen (das stark kreuzreaktive Protein bei 66 kDa wird nicht abgebaut). Diese Banden werden vom N-terminalen Antikörper (A) nicht, vom zentralen (B) nur sehr schwach detektiert. Beim stärkeren Verdau (30 µg/ml Trypsin) verschwindet die obere Bande wieder, während die untere an Intensität weiter gewinnt; das Volllängenprotein ist in keinem Fall mehr sichtbar. Die berechnete molekulare Masse des C-Terminus von FRQ hinter dem mittleren Epitop beträgt 37 kDa, was mit den beobachteten Banden gut übereinstimmt. Weiterhin ist FRQ^9 (≙ 662 Stop) hyperphos-

phoryliert (vgl. Abb.11), FRQ 337–711::GFP dagegen nicht (vgl. Abb. 17), ein Indiz dafür, dass der C-Terminus keine in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sichtbaren Phosphorylierungen zeigt.

Beim Verdau mit 10 µg/ml Proteinase K und Detektion mit dem C-terminalen Antikörper (A) hat das Signal des unverdauten FRQ an Intensität verloren, die übrigen Banden lassen sich nicht FRQ-Fragmenten zuordnen. Auch bei der Detektion mit dem N-terminalen Antikörper (C) nimmt die Signalintensität des Volllängenproteins ab, gleichzeitig erscheinen eine breite diffuse Bande im Bereich 90–120 kDa (wahrscheinlich hyperphosphorylierte Fragmente unterschiedlicher Größe); das gleiche Bild liefert der Antikörper αFRQ-Mitte (B). Anscheinend baut Proteinase K FRQ vom C-Terminus her ab, wobei die verbleibenden großen Fragmente, die die beiden vorderen Epitope tragen, hyperphopsphoryliert sind. Trypsin dagegen spaltet ein größeres nicht hyperphosphoryliertes C-terminales Fragment ab.

Stärkerer Verdau mit Proteinase K (30 µg/ml) oder Verdau mit Trypsin resultiert bei Detektion mit αFRQ-Mitte-Antikörper in einer Anzahl von Banden bzw. einem diffusen Signal im Bereich 35–50 kDa, die von den beiden terminalen Antikörpern nicht erkannt werden (der N-terminale Antikörper detektiert lediglich Fragmente mit sehr schwacher Signalintensität und sehr diffuser Verteilung im Bereich 30–45 kDa). Im Zentrum bildet FRQ folglich eine stabile weniger proteasesensitive Struktur aus (diese Region umfasst vermutlich die *coiled coil*-Region sowie den darauf folgenden konservierten Bereich). Evtl. ist aber auch am C-Terminus, der das NLS von FRQ maskieren könnte, eine relativ stabile Struktur vorhanden (vgl. Trypsinverdau).

3.4 Lokalisation von FRQ im Vergleich mit FRH

FRQ befindet sich im Komplex mit der essentiellen RNA-Helikase FRH (Frequency interacting RNA helicase, 1106 Aminosäurereste, 124 kDa), die im Zellkern deutlich stärker konzentriert ist als im Cytosol und für das Funktionieren der circadianen Uhr benötigt wird [46].

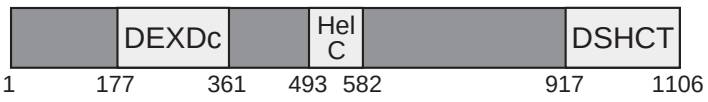

Abbildung 21: Schematischer Aufbau von FRH (FRQ-interacting RNA helicase). DEXDc: konserviert in ATP-abhängigen Helikasen vom DEAD/DAEH-box-Typ, HelC: häufig in Helikasen und helikaseverwandten Proteinen, DSHCT: konserviert in DEAD-box-Helikasen

Um zu erfahren, ob sich die Lokalisationen der beiden Proteine gegenseitig beeinflussen, wurde die Helikase mit einer C-terminalen Epitopmarkierung (2×FLAG®) versehen, die Immundetektion und -fällungen ermöglichen sollte. Dazu wurde der kodierende Bereich inklusive eines 68 bp großen

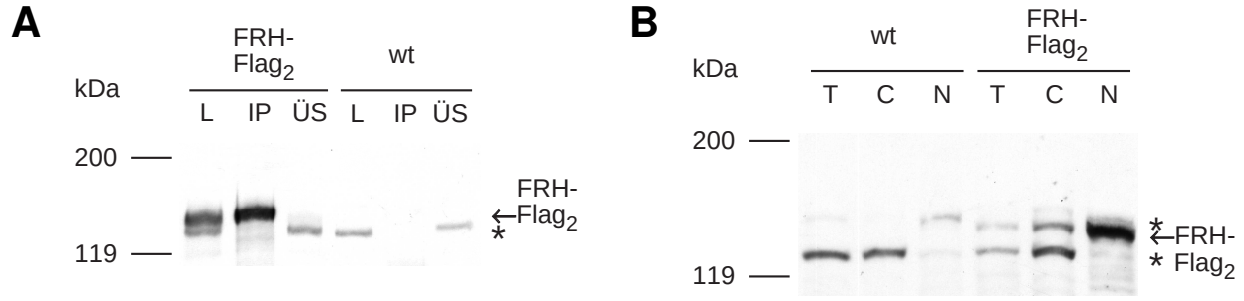

Abbildung 22: Charakterisierung von FRH-FLAG$_2$. **A**: Immunpräzipitation aus Totalextrakt (je 3 mg Gesamtprotein); L: Ladekontrolle, ÜS: Überstand (je 100 µg Gesamtprotein), IP: Immunpräzipitat (30 % der Gesamtmenge). **B**: subzelluläre Verteilung; T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein. Detektion mit monokl. αFLAG®-Antikörper; $\star$: unspezifische Bande

Introns durch PCR aus genomischer DNA amplifiziert; am C-Terminus wurde dabei eine degenerierte Wiederholung der FLAG®-Sequenz eingeführt. Das PCR-Produkt wurde durch Topo-TA™-Klonierung in den Vektor pCR2.1 kloniert (2.1.2) und aus diesem über die Restriktionsschnittstellen *Eco*R I und *Xba* I in den Vektor pFH64 subkloniert, der eine konstitutive Expression unter dem *cpc-1*-Promotor ermöglicht (s. 3.9 auf Seite 83).

Nach der Transformation von *bd his-3* zeigte die Immundetektion mit monokl. αFLAG®-Antikörper im Proteintotalextrakt nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ein Signal bei ca. 130–135 kDa, was mit der berechneten Masse von 127 kDa gut übereinstimmt. Durch Immunpräzipitation mit αFLAG®-Agarose wird das Protein vollständig depletiert (Abb. 22 A). Das Protein ist im Zellkern deutlich höher konzentriert als im Cytosol (Abb. 22 B).

Da FRH eine RNA-Helikase ist, sollte untersucht werden, ob die Assoziation mit FRQ RNA-abhängig ist. Die αFLAG-Immunpräzipitation wurde deshalb in Gegenwart von RNase bzw. RNase-Inhibitor wiederholt (Abb. 23). Die FRH-Fällung blieb unverändert (A), und auch FRQ wurde unter allen Bedingungen in vergleichbarer Menge mitgefällt (B), so dass eine RNA-Abhängigkeit nicht vorliegt. Die Fällungseffizienz von FRQ beträgt hier ca. 10 %, was scheinbar in Widerspruch zu der Aussage steht, dass alles FRQ mit FRH assoziiert ist; in diesem Fall ist aber neben FRH-Flag$_2$ noch endogenes FRH vorhanden. Eine Quantifizierung der beiden Proteine wurde in Ermangelung eines geeigneten FRH-Antikörpers nicht durchgeführt, und weil FRH essentiell ist, konnte kein FRH-Deletionsstamm aus Ausgangsstamm für die Transformation verwendet werden. Selbst bei Depletion von FRH-Flag$_2$ und vollständiger FRQ-Assoziation mit FRH bzw. FRH-Flag$_2$ kann daher nur ein Teil des FRQ mitgefällt werden. Abb. 23 C zeigt als Kontrolle WC-1; anders als in [46] ist keine Assoziation von WC-1 mit FRH nachweisbar, es verbleibt hier im Überstand.

Weil FRH im Zellkern deutlich höher konzentriert ist als im Cytosol, ist es unwahrscheinlich, dass es für die vorwiegend cytosolische Lokalisation von FRQ verantwortlich ist; umgekehrt könnte

aber FRQ für die Lokalisation des cytosolischen Anteils von FRH wichtig sein. Deshalb wurde untersucht, ob sich die Assoziation von FRQ mit FRH zwischen Zellkern und Cytosol unterscheidet.

FRH-$FLAG_2$ aus Kernextrakten und Cytosol* (je 3 mg Gesamtprotein) wurde mit αFLAG®-Agarose immunpräzipitiert und nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf FRH-$Flag_2$-Fällung und FRQ-Kopräzipitation überprüft (Abb. 24). Sowohl aus Cytosol als auch aus Kernextrakt wurde FRH-$FLAG_2$ fast vollständig depletiert. FRQ wurde aus beiden Kompartimenten in vergleichbarer Ausbeute mitgefällt. FRH muß daher nicht nur im Zellkern sondern auch im Cytosol im Überschuß zu FRQ vorliegen, obwohl FRH im Kern angereichert ist und FRQ im Cytosol. Es ist nicht klar, ob der Unterschied in der FRQ-Ausbeute bei der Kopräzipitation zwischen beiden Kompartimenten signifikant ist, deshalb kann nicht abschließend beantwortet werden, ob FRQ-Bindung die Lokalisation von FRH verändert.

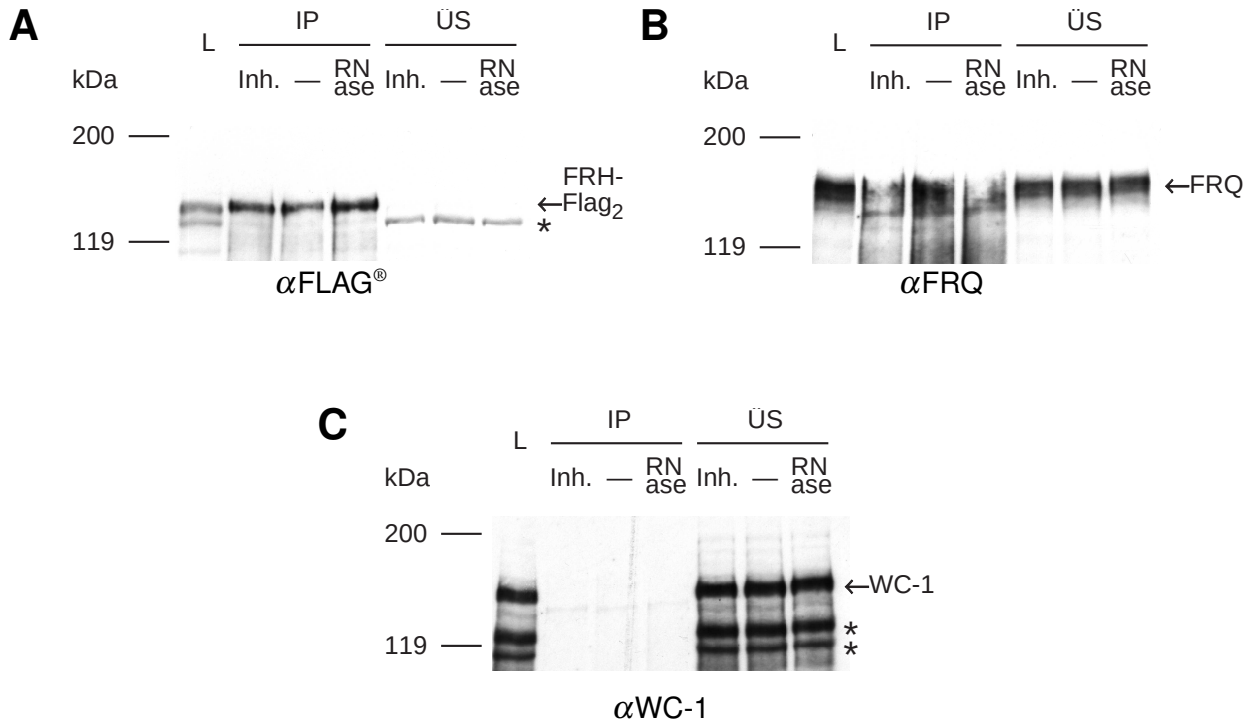

Abbildung 23: Immunpräzipitation von FRH-$FLAG_2$ aus Proteintotalextrakt (3 mg Gesamtprotein) mit αFLAG®-Agarose in Gegenwart von 0,1 µg/µl RNase A bzw. 1 U/µl RNase-Inhibitor (RNasin®). L: Ladekontrolle, ÜS: Überstand (je 100 µgGesamtprotein), IP: Immunpräzipitat (30 % des Eluats). Detektion mit Antikörper **A** monokl. αFLAG®, **B** monokl. αFRQ 3G11 und **C** polykl. αWC-1; $\star$: unspezifische Bande

* Wie bei der Gelfiltration wurde das Cytosol zuvor durch Ultrafiltration in Proteinextraktionspuffer umgepuffert, um die Viskosität zu verringern.

3.5 Der C-Terminus von FRQ als putative cytoplasmatische Lokalisationsdomäne (CLD)

Wie in 3.3.1 gezeigt, ist der C-Terminus für die cytosolische Lokalisation von FRQ von Bedeutung. Es sollte untersucht werden, ob dieser ein beliebiges Protein mit Kernlokalisationssequenz in das Cytosol verlagern kann. Dazu wurde in die *Sph* I-Restriktionsschnittstelle am N-Terminus des FRQ-Leserahmens eine Tandem-Wiederholung des SV40 Large T Antigen NLS[137] (PKKKRKV) eingefügt, und die Aminosäurereste 101–623 wurden durch Maltose-Bindeprotein (MBP, durch PCR aus pMAL-cRI amplifiziert) ersetzt. Das Fusionsprotein trägt das Epitop des monoklonalen FRQ-Antikörpers 3G11 (Aminosäurereste 65–100) und kann so nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese immunologisch detektiert werden. Als Kontrolle wurde ein MBP mit Stopp-Kodon verwendet, so dass die putative CLD nicht exprimiert wird. Da dieses Protein in Gesamtzellextrakten wie auch Kernextrakten nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt), wurde unmittelbar nach dem MBP noch GFP eingefügt, um das Fusionsprotein zu stabilisieren.

Abbildung 25 zeigt den schematischen Aufbau sowie die subzelluläre Verteilung der Konstrukte. Das Fusionsprotein mit der putativen CLD (berechnete molekulare Masse 93 kDa) ist weitaus hö-

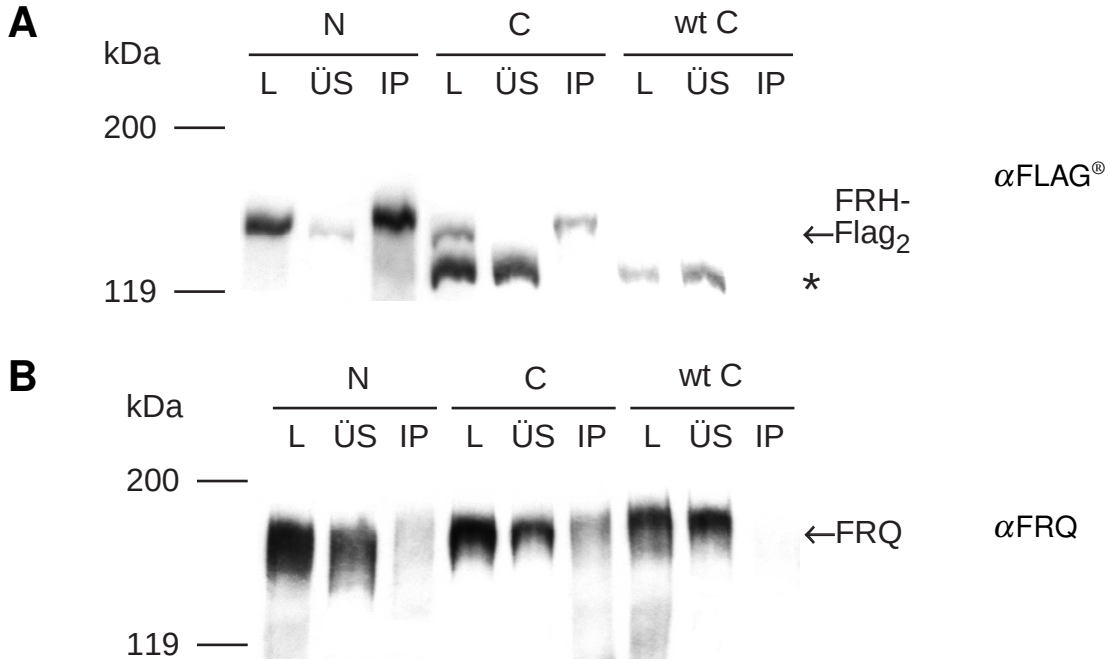

Abbildung 24: Immunpräzipitation von FRH-$FLAG_2$ aus Cytosol und Kernextrakt (je 3 mg Gesamtprotein) mit αFLAG®-Agarose; L: Ladekontrolle, ÜS: Überstand (je 100 µg Gesamtprotein ≙ 3,3 %), IP: Immunpräzipitat (25 % des Eluats ≙ 750 µg Gesamtprotein); N: Kernextrakt, C: Cytosol, wt C: Cytosol von *bd* als Negativkontrolle. Detektion mit monokl. Antikörper **A** αFLAG® bzw. **B** αFRQ 3G11; $\star$: unspezifische Bande

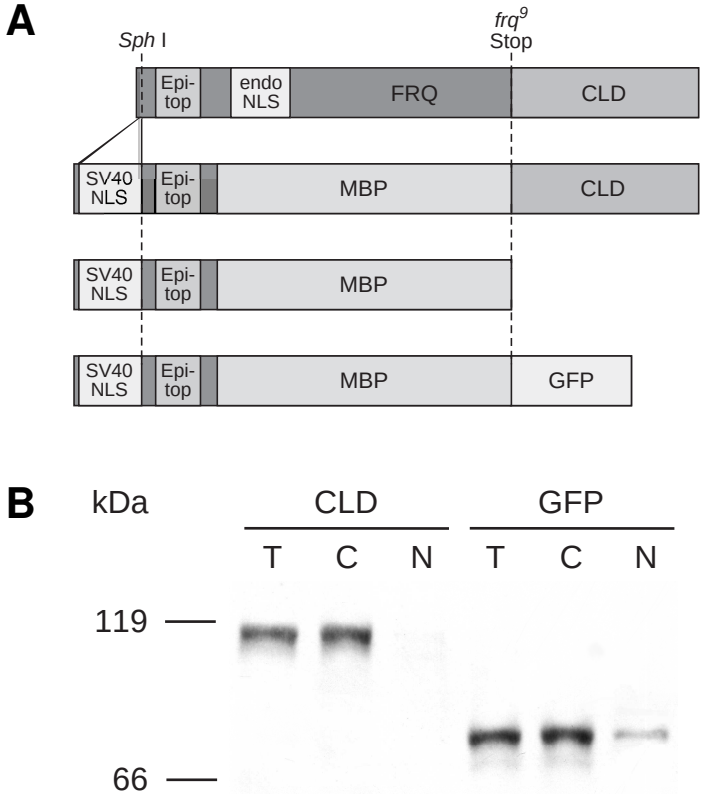

Abbildung 25: Schematischer Aufbau **A** und subzelluläre Verteilung **B** von SV40-NLS–MBP-Fusionsproteinen mit FRQ-C-Terminus (putative CLD) und GFP. T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

her im Cytosol konzentriert, während das Fusionsprotein mit GFP (80 kDa) etwas stärker im Kern lokalisiert ist. Offensichtlich vermag selbst das SV40-NLS, die in vielen Organismen als starkes heterologes Modell-NLS Verwendung findet, keinen größeren Anteil des Gesamtproteins in den Kern zu verschieben. Dennoch wird diese Verteilung durch den C-Terminus von FRQ beeinflusst, denn bei vergleichbarem cytosolischen und Gesamtsignal ist das Kernsignal erkennbar schwächer. Denkbar wäre, dass ein Teil der Proteine während der Fraktionierungsprozedur passiv aus dem Zellkern diffundiert, doch sind die Proteine mit 80 bzw. 93 kDa dafür zu groß [138].

3.6 Subzelluläre Lokalisation von NLS-sGFP-Konstrukten

Nachdem das Fusionsprotein SV40-NLS–MBP–GFP nur in geringer Menge im Zellkern zu finden war (vgl. Abb. 25), wurden systematisch NLS-GFP-Konstrukte generiert, um die Funktion verschiedener Kernlokalisationssequenzen in *N. crassa* zu testen; eine Übersicht zeigt Abb. 26 A.

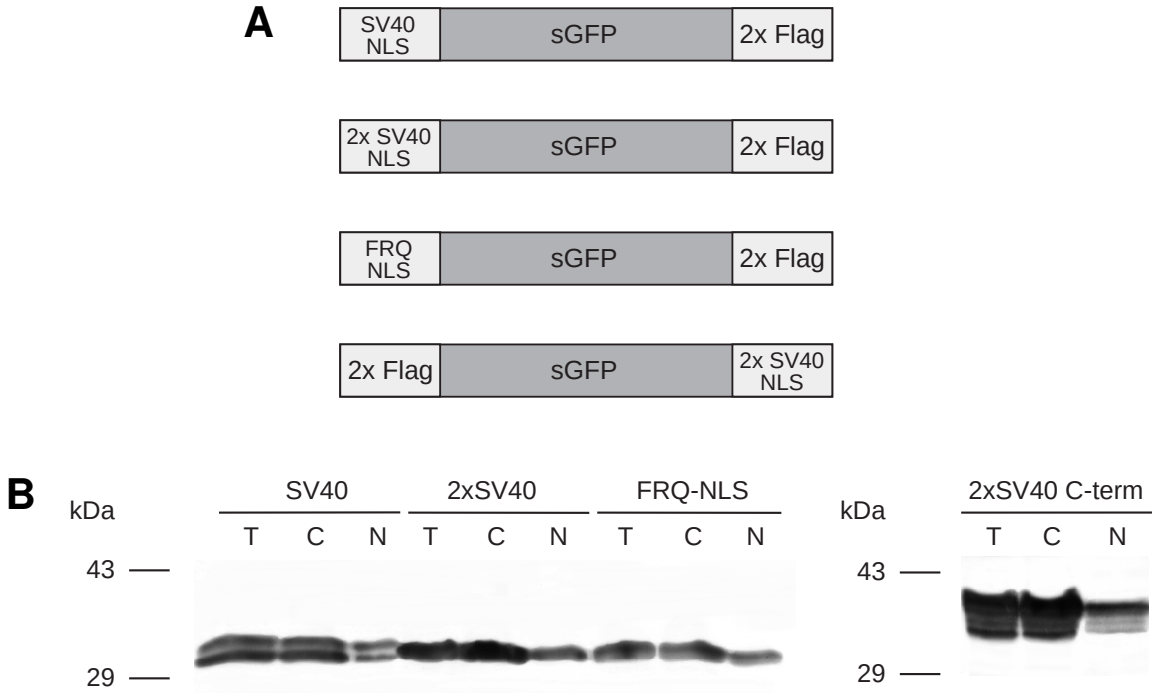

Abbildung 26: Schematische Darstellung **A** und subzelluläre Verteilung **B** der NLS-GFP-Konstrukte; Detektion mit monokl. α-FLAG®-Antikörper. T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

Als Epitopmarkierung wurde eine C-terminale doppelte FLAG®-Markierung gewählt, als N-terminales NLS wurden 1×SV40, 2×SV40 und FRQ(193–208), ein Fragment, welches das NLS enthält und für Kernlokalisation hinreichend ist [41], verwendet. sGFP wurde durch PCR aus pMF272 [122] amplifiziert, die beschriebenen Sequenzen wurden zusammen mit einer Translationsinitiationssequenz über die PCR-Primer eingeführt. Bei einem weiteren Konstrukt wurde die Reihenfolge umgekehrt, also $FLAG_2$–sGFP–SV40-NLS_2. Die PCR-Produkte wurden wie unter 2.1.2 beschrieben durch Topo-TA™ in pCR2.1 kloniert, sequenziert und in pFH64 (s. 3.9) subkloniert, um konstitutive Expression zu erhalten. Transformiert wurde jeweils *frq*^{10} *bd his-3*.

In Abbildung 26 B ist die subzelluläre Verteilung der NLS-GFP-Konstrukte zu sehen; die apparente molekulare Masse von 30–35 kDa stimmt mit der berechneten (31 kDa) gut überein. Unerwartet treten bei zwei Konstrukten (SV40-NLS–sGFP–$FLAG_2$ und besonders $FLAG_2$–sGFP–SV40-NLS_2) mehrere Banden auf, die verschiedene Phosphorylierungsstufen darstellen könnten; bei Letzterem ist die oberste Bande, deren apparente molekulare Masse mit fast 40 kDa schon recht deutlich von der berechneten abweicht, mit Abstand die intensivste. Keines der Konstrukte ist wie erhofft im Kern angereichert; alle sind überwiegend cytosolisch. Warum keins der NLS zu deutlicher Kernlokalisation führt ist unklar; zumindest vom FRQ-NLS ist bekannt, dass es in *N. crassa* zu starker Anreicherung im Kern führen kann (FRQ^9). Möglicherweise diffundieren die Proteine während der Zellfraktio-

nierungsprozedur wieder aus den Zellkernen, denn sie besitzen eine Größe, die passive Diffusion durch Kernporenkomplexe erlaubt [138]. Dies trifft jedoch nicht für das SV40-NLS_2–MBP–sGFP-Konstrukt aus 3.5 zu, welches ebenfalls größtenteils im Cytosol zu finden ist.

Fluoreszenzmikroskopisch konnten die Proteine wegen des hohen Hintergrundsignals (Eigenfluoreszenz der Hyphen) nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.7 Nukleo-cytoplasmatisches *Shuttling* von Frequency?

Die beobachtete subzelluläre Verteilung von FRQ kann auf verschiedene Weisen erreicht werden: Einerseits könnte ein *concentration sensing* dafür sorgen, dass die Konzentration im Zellkern einen bestimmten Schwellenwert nicht übersteigt. Ein kernlokalisiertes Protein (ein hypothetischer „Retentionsfaktor“, der z. B. ein NES maskiert) könnte durch FRQ-Bindung quasi „austitriert“ werden, so dass überschüssiges FRQ sofort wieder exportiert werden würde*. Das verkürzte FRQ^9-Protein dürfte dieser Beschränkung nicht unterliegen (z. B. wegen Fehlens des Exportssignals).

Andererseits kann die beobachtete Verteilung auch durch ein dynamisches Gleichgewicht von Kernimport und -export erzeugt werden, das durch das Wechselspiel von NLS und (noch nicht identifizierten) NES/CLD bestimmt wird; FRQ würde also ständig zwischen den beiden Kompartimenten „shutteln“. Wenn FRQ^9 ebenfalls „shuttelt“, müsste es notwendigerweise ein – relativ schwaches – NES tragen. FRQ^{wt} müsste dann wiederum ein zusätzliches stärkeres NES besitzen, oder das beiden gemeinsame NES müsste in FRQ^{wt} „aktiver“ sein.

Unter LL-Bedingungen gehen kontinuierliche Neusynthese (und Abbau) von FRQ in einen solchen dynamischen Gleichgewichtszustand ein. Wird die Synthese plötzlich unterbunden, sollte vorübergehend ein Netto-Efflux von FRQ aus dem Zellkern auftreten. Wird dagegen im Gleichgewicht zusätzliches FRQ durch Induktion von einem heterologen Promotor exprimiert, müsste vorübergehend stärkerer Import stattfinden. In beiden Fällen würde sich nach kurzer Zeit das Gleichgewicht auf einem anderen Niveau wieder einstellen, bei einem *concentration sensing* dürfte sich dagegen die Konzentration von FRQ im Zellkern nicht ändern.

3.7.1 Verteilung von FRQ nach Induktion von heterologem Promotor

Zunächst wurde untersucht, ob der Kernimport von neu synthetisiertem FRQ durch bereits vorhandenes nukleäres FRQ beeinflusst wird. Das durch monoklonalen αHis_5-Antikörper spezifisch nachweisbare FRQ-His_6 wurde unter der Kontrolle des *qa-2*-Promotors mit 15,6 mM Chinasäure in

* Zwar müsste auch die nukleäre Konzentration dieses Faktors reguliert sein, aber wenn dieser vollständig im Zellkern lokalisiert wäre, reichte es aus, nur dessen Gesamtmenge über ein Gleichgewicht aus Expression und Abbau zu regulieren.

frq$^+$ und *frq*^{10} als Hintergrundstämmen induziert. Weil unter ständiger Beleuchtung kultiviert wurde, lag in *frq*$^+$ zu Versuchsbeginn eine konstante Verteilung von FRQ vor. Eine Induktionskinetik über neun Stunden wurde aufgenommen und die subzelluläre Lokalisation durch Zellfraktionierung und anschließende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt (Abb. 27). Detektiert wurde mit monokl. αHis$_5$-Antikörper (nur das neu synthetisierte FRQ-His$_6$) und monokl. αFRQ-Antikörper 3G11 (Gesamt-FRQ).

In *frq*^{10} ist ab zwei Stunden nach Induktionsbeginn FRQ-His$_6$ nachweisbar, dessen Menge im Verlauf der Induktion deutlich zunimmt. Das Protein wird sukzessiv phosphoryliert und von Beginn an auch in den Zellkern importiert, wobei die Anstiege in Cytosol und Zellkern parallel verlaufen. In

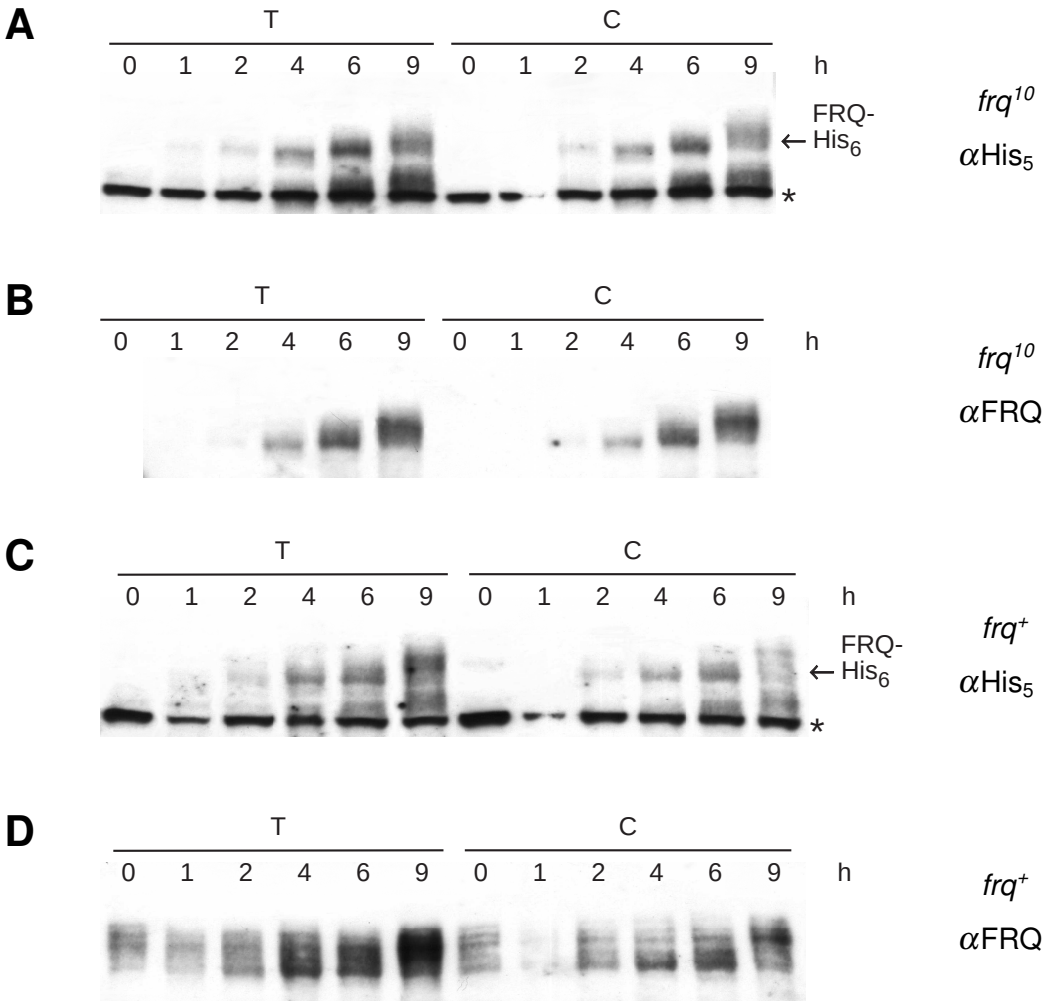

Abbildung 27: Kinetik der Verteilung von neu synthetisiertem FRQ-His$_6$ nach Induktion mit 15,6 mM Chinasäure bei 25 °C, LL in **A**/**B** *frq*^{10}- und **C**/**D** *frq*$^+$-Hintergrund; Immundetektion mit monokl. Antikörper **A**/**C** αHis$_5$ bzw. **B**/**D** αFRQ 3G11. $\star$: unspezifische Bande; T: Totalhomogenate, C: Cytosol (je 200 µg Gesamtprotein)

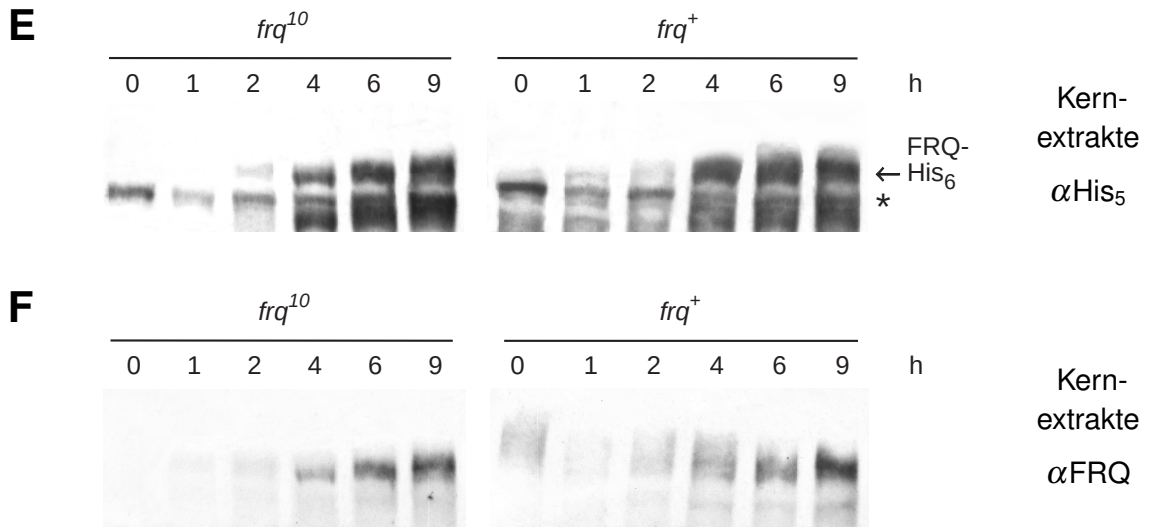

Abbildung 27: (Fortsetzung) Kinetik der Verteilung von neu synthetisiertem FRQ-His_6 nach Induktion mit 15,6 mM Chinasäure bei 25 °C, LL in *frq*^{10}- und *frq*$^{+}$-Hintergrund; Immundetektion mit monokl. Antikörper **E** αHis_5 bzw. **F** αFRQ 3G11. Kernextrakte (je 200 µgGesamtprotein); $\star$: unspezifische Bande

frq^{+} ist die Induktionskinetik nahezu identisch (lediglich bei der Phosphorylierung des cytosolischen Anteils treten leichte Unterschiede auf, wie ein Vergleich der Bandenmuster bei 9 h zeigt). Wichtig ist, dass trotz bereits vorhandenem FRQ weiteres neu synthetisiertes FRQ-His_6 in den Zellkern importiert wird (Abb. 27 E/F rechte Hälfte), die beiden Populationen beeinflussen sich zunächst nicht. Bei 6 und 9 h ist kein hyperphosphoryliertes FRQ^{wt} im Zellkern mehr erkennbar; zum einen kann es proteolytisch abgebaut worden sein (Phosphorylierung der PEST1-Region dient als Abbausignal [43], allerdings lässt sich nicht vom sichtbaren Phosphorylierungsmuster direkt auf diese speziellen Phosphorylierungen schließen), zum Anderen kann es aus dem Zellkern exportiert worden sein. Beim *concentration sensing* dürfte überhaupt kein zusätzliches nukleäres FRQ akkumulieren, solange „überschüssiges“ schneller wieder aus dem Zellkern entfernt wird, als es synthetisiert wird, bzw. gar nicht erst in den Zellkern importiert werden kann (dies würde erfordern, dass die Information über die FRQ-Konzentration im Zellkern auf irgendeinem Weg ins Cytosol übertragen wird). Daher sind diese Daten ein Indiz für ein *Shuttling* als Mechanismus zur Einstellung der FRQ-Verteilung.

3.7.2 FRQ-Umverteilung nach Unterbrechen der Translation?

frq^{+}-Myzel, das unter ständiger Beleuchtung gewachsen war, wurde mit 10 µg/ml des Translationsinhibitors Cycloheximid versetzt und die subzelluläre Verteilung von FRQ über die folgenden Stunden durch Zellfraktionierung, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Detektion mit monokl. αFRQ-Antikörper 3G11 untersucht (Abb. 28). Über den beobachteten Zeitaum wird FRQ sukzessiv

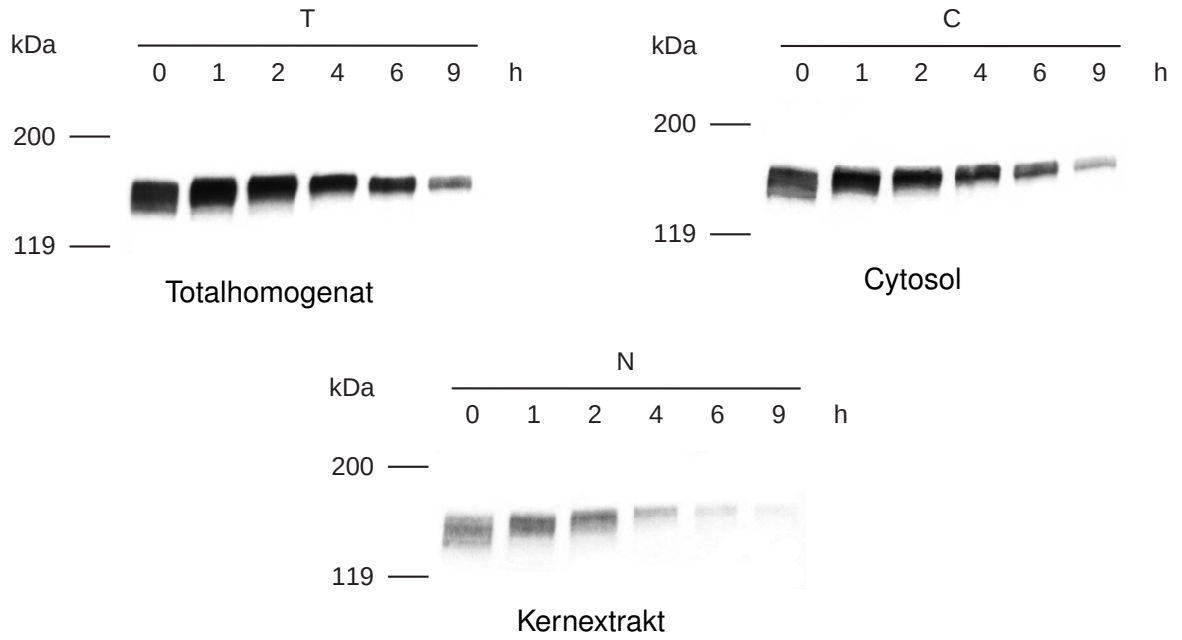

Abbildung 28: Subzelluläre Verteilung von FRQ in *frq*$^+$, 25 °C LL nach Translationsinhibition durch 10 µg/ml Cycloheximid; die Abbaukinetiken in Cytosol und Zellkern sind gleich. T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

hyperphosphoryliert* und abgebaut, wobei die Kinetiken in Cytosol und Zellkernen gleich sind. Dies bedeutet nicht zwingend, dass die Abbauraten in beiden Kompartimenten identisch sind, es reicht aus, wenn im Falle des *Shuttling* der Abbau wesentlich langsamer als der Austausch zwischen den Kompartimenten ist.

Das gleiche Experiment wurde mit *frq*^{9} wiederholt (Abb. 29). Wegen der besseren Auflösung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese im betreffenden Größenbereich ist der Effekt der plötzlichen Hyperphosphorylierung durch Cycloheximid hier sehr deutlich zu sehen. Die Abbaukinetik ähnelt der von *frq*$^+$ mit einem entscheidenden Unterschied: Innerhalb der ersten Stunde nach Versuchsbeginn nimmt die anfangs hohe FRQ^9-Konzentration im Zellkern stark ab, während die cytosolische etwas zunimmt und die Gesamtmenge (T) sich nur wenig verändert. Im weiteren Verlauf sinken die FRQ-Konzentrationen in Cytosol und Zellkern nahezu parallel. Es ist unwahrscheinlich, dass die Abbaurate des nukleären FRQ^9 zunächst hoch ist und nach kurzer Zeit drastisch reduziert wird, um dann genau identisch mit der cytosolischen zu sein. Gemäß dem *Shuttling*-Modell wird aber nach Unterbrechen der Translation FRQ netto aus dem Kern exportiert, bis ein neues Gleichgewicht erreicht ist, so wie es Abb. 29 zeigt.

* Warum Cycloheximid zu solch schneller und starker Hyperphosphorylierung von FRQ führt, ist noch nicht bekannt. Eine Erklärung wäre, dass Phosphatasen mit kurzer Lebensdauer wegen fehlender Neusynthese verschwinden und deshalb das Kinase-Phosphatase-Gleichgewicht zugunsten der – *bona fide* stabileren – Kinasen verschoben wird.

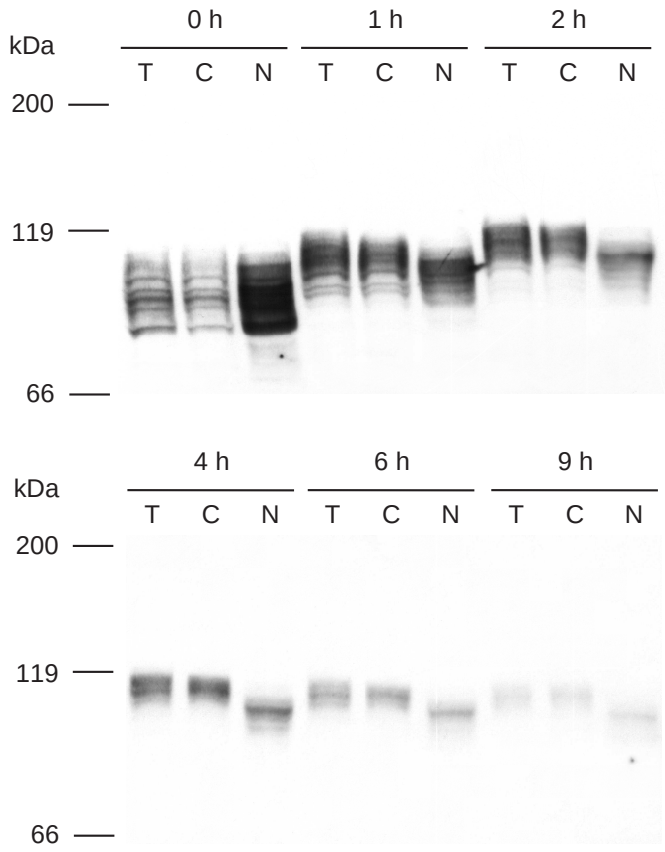

Abbildung 29: Subzelluläre Verteilung von FRQ^{9} in *frq^{9}*, 25 °C LL nach Translationsinhibition durch 10 µg/ml Cycloheximid. T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

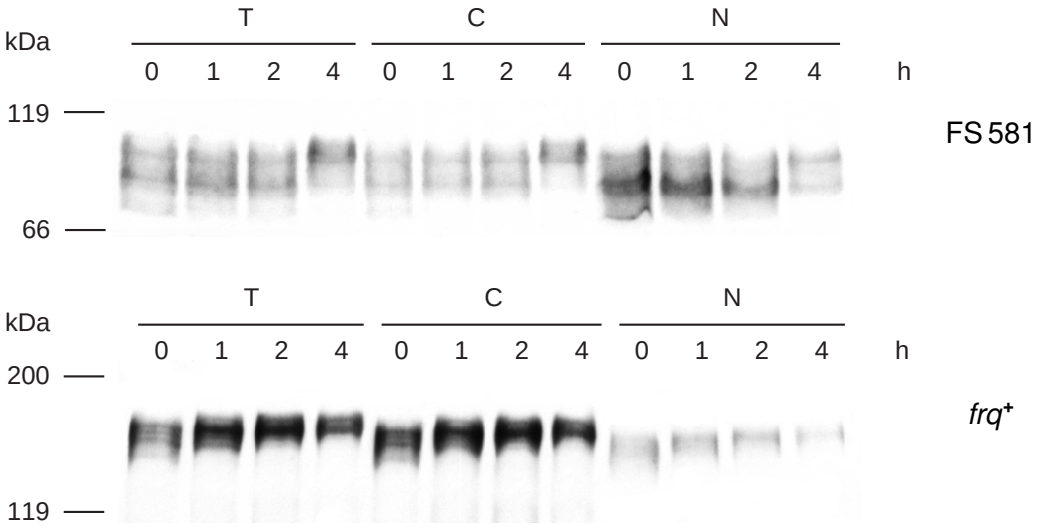

Abbildung 30: Subzelluläre Verteilung von FRQ FS 581 im Vergleich zu FRQ^{wt} (*frq^{+}*) bei 25 °C LL nach Translationsinhibition durch 10 µg/ml Cycloheximid. T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

Die verkürzte FRQ-Form FS 581 reagiert unerwartet auf Cycloheximid (Abb. 30), weil sich das Phosphorylierungsmuster erst nach mehr als zwei Stunden ändert (auch wird das Protein vorher kaum abgebaut). Wie bei *frq*^{9} sinkt aber auch hier mit Einsetzen der Hyperphosphorylierung die Konzentration im Zellkern deutlich ab (sogar unter die Konzentration im Cytosol), während die Gesamtmenge sich kaum verändert. Um zu belegen, dass die verzögerte Reaktion auf Cycloheximid kein Versuchsartefakt ist, wurde *frq*$^{+}$-Myzel im Parallelversuch genauso behandelt wie die Mutante; es zeigt das schon aus Abb. 28 bekannte Verhalten.

Die Auswirkung eines L→D-Transfers auf die Lokalisation von FRQ und FRQ^{9} wurde im Stamm *frq*^{9} BM60 *Cla* I-Fragment untersucht; als Referenz diente Myzel, das zusätzlich mit 10 µg/ml Cycloheximid behandelt wurde (Abb. 31). Nach L→D-Transfer allein veränderte sich FRQ während der Versuchdauer von 4 h kaum, FRQ^{9} wurde ohne sichtbare Hyperphosphorylierung nach und nach abgebaut. Die FRQ^{9}-Konzentrationen im Zellkern lagen zu allen Zeitpunkten über denen im Cytosol. In Gegenwart von Cycloheximid verhielten sich die Proteine fast genau so wie in *frq*$^{+}$ und *frq*^{9}: Beide wurden hyperphosphoryliert und stetig abgebaut (FRQ^{9} evtl. etwas schneller als in *frq*^{9}; mög-

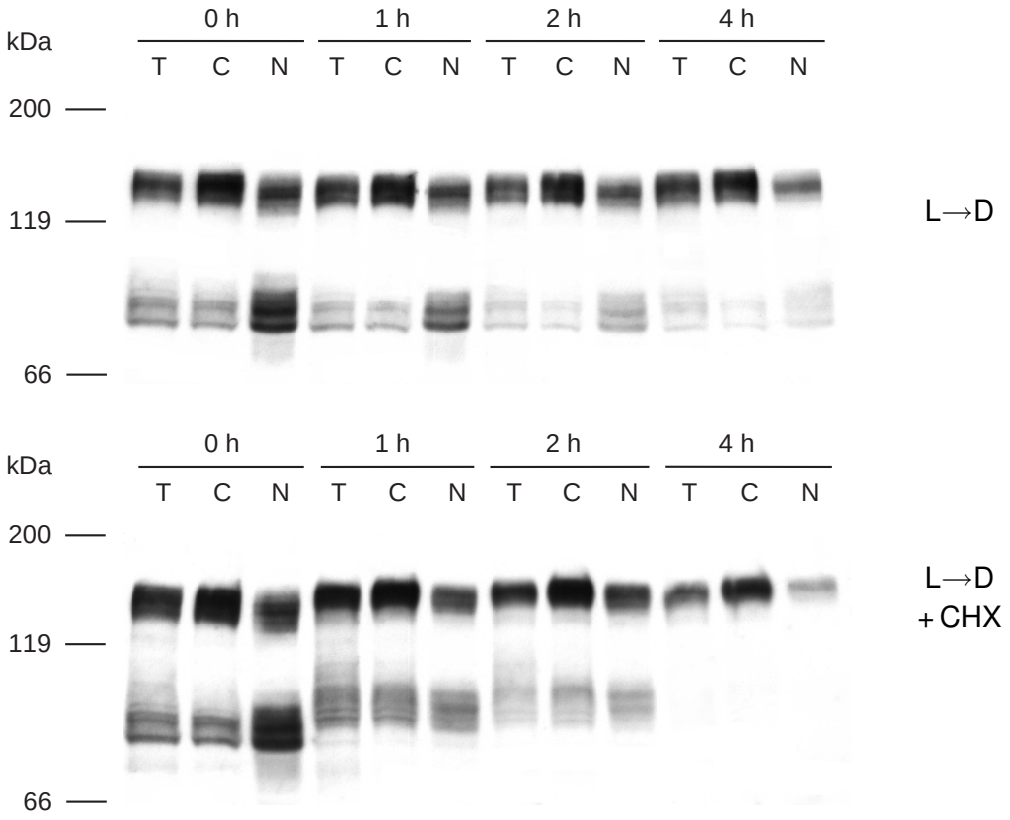

Abbildung 31: Subzelluläre Verteilung von FRQ und FRQ^{9} in *frq*^{9} BM60 *Cla* I-Fr. nach Repression durch L→D-Transfer oder Repression und Translationsinhibition durch 10 µg/ml Cycloheximid (CHX). T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

licherweise ist die Assoziation mit FRQ dafür verantwortlich), und die hohe FRQ^9-Konzentration im Zellkern sank wie in *frq*^{9} binnen einer Stunde auf cytosolisches Niveau ab, während die Gesamtmenge sich kaum veränderte. Im Folgenden blieb das Verhältnis von cytosolischem zu nukleären FRQ^9– ebenfalls wie in *frq*^{9} – konstant. Warum die FRQ^9-Umverteilung beim einfachen L→D-Transfer nicht auftrat, lässt sich erklären: In dem Fall wird zwar die WCC-vermittelte lichtabhängige Transkription von *frq*- und *frq*^{9}-mRNA schnell unterbunden, die vorhandenen Mengen reichen aber aus, um die Translation noch eine Weile fortzusetzen. Die mRNA verschwindet nicht abrupt, sondern wird allmählich abgebaut, und so kommt auch die Translation langsam zum Erliegen. Weil die FRQ^9-Neusynthese nicht plötzlich abbricht, kommt es nicht zum schnellen Efflux; die relative Verteilung bleibt erhalten (diese ist nicht von der absoluten Konzentration des Proteins abhängig, vgl. 3.1 und Abb. 10 auf Seite 48).

Im Gleichgewicht liegt FRQ im Cytosol in hoher Konzentration vor, ein Netto-Efflux aus dem Zellkern nach Translationsinhibition ist nur schwer nachzuweisen. Um dieses Problem zu umgehen, wurde FRQ-His_6 unter Kontrolle des *qa-2*-Promotors im *frq*^{10}-Hintergrundstamm mit 15,6 mM Chinasäure induziert, bis gut nachweisbare Mengen des Proteins entstanden waren (4 h), und anschließend die Expression gestoppt. Cycloheximid unterbricht die Translation zwar vollständig, zeigt aber viele pleiotrope Effekte; deshalb wurde die Transkription durch Entfernen des Induktors und Repression mit Glukose* beendet (und in einem Vergleichsexperiment zusätzlich Cycloheximid verwendet). Dazu wurde das Induktionsmedium abgesaugt, das Myzel zweimal mit H_2O gewaschen und – auf mehrere Kolben verteilt – in Standardmedium bzw. Standardmedium mit 10 µg/ml Cycloheximid weiter inkubiert. Nach 15, 75 und 140 min wurde geerntet und anschließend die FRQ-His_6-Verteilung wie zuvor beschrieben analysiert (Abb. 32).

Die FRQ-His_6-Menge nimmt trotz Repression weiter zu, da nach Unterbrechen der Transkription noch ausreichend mRNA vorhanden ist, um die Translation einige Zeit fortzusetzen. Solange noch größere Mengen FRQ-His_6 neu gebildet werden, akkumuliert ein Teil davon weiterhin im Zellkern. Erst wenn die mRNA abgebaut ist, kommt die Translation zum Erliegen, der Export kann den Import kompensieren, und die Akkumulation im Kern hört auf (in diesem Experiment ist der Zeitpunkt nicht enhalten). Mit Cycloheximid sollte die Neusynthese sehr schnell versiegen, doch nimmt die FRQ-His_6-Menge auch hier zwischen 15 min und 75 min weiter zu. Dass Cycloheximid in die Zellen gelangt und wirksam ist, zeigt die Hyperphosphorylierung an. Anders als bei der alleinigen Repression wird aber kein FRQ-His_6 mehr im Zellkern angereichert.

Die Interpretation des Versuchsergebnisses allein auf der Grundlage des bisher formulierten *Shuttling*-Modells ist nicht konsistent:

* Der *qa-2*-Promotor unterliegt einer Katabolit-Repression u. a. durch Glukose; Neurospora-Standardmedium enthält 2 % (w/v) Glukose.

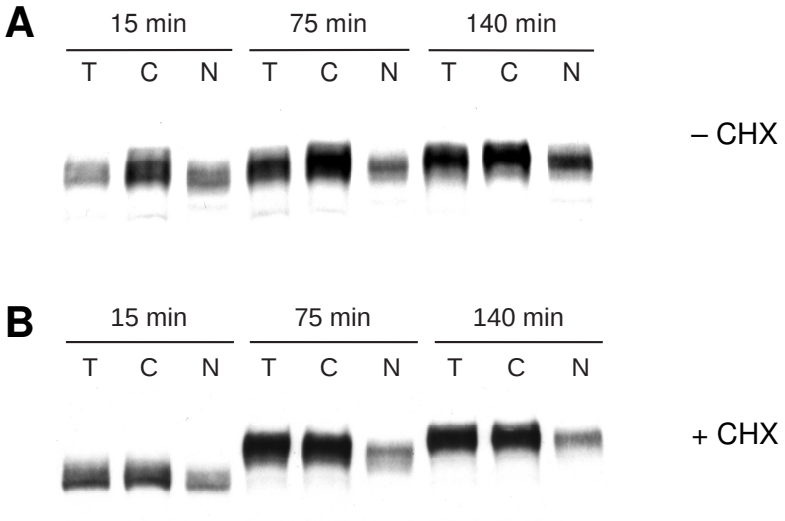

Abbildung 32: Subzelluläre Verteilung von FRQ nach vierstündiger Induktion mit 15,6 mM Chinasäure und anschließender Repression mit 2 % (w/v) Glukose **A** ohne und **B** mit zusätzlicher Translationsinhibition durch 10 µg/ml Cycloheximid. T: Totalhomogenat, C: Cytosol, N: Kernextrakt, je 200 µg Gesamtprotein

1. Es ist ein recht großes Maß an Neusynthese erforderlich, damit der Kernimport den -export überwiegen kann. Warum dies auch noch längere Zeit nach Repressionsbeginn möglich sein soll, ist nicht klar; die mRNA müsste dazu vergleichsweise langlebig sein.

2. Obwohl trotz Cyclohexmid noch neues Protein gebildet wird, akkumuliert fast nichts davon im Zellkern.

Das Modell kann daher erweitert werden um die Annahme, dass FRQ eine Modifikation erhält, mit der es nicht mehr importiert werden kann. Dies sollte hauptsächlich im Zellkern geschehen, so dass FRQ nur einen einzigen Import-Export-Zyklus (bzw. nur wenige Zyklen) durchläuft, der dazu noch relativ langsam geschieht. Solange noch unmodifiziertes FRQ im Cytosol vorhanden ist – selbst wenn die Translation schon geendet hat – kann weiterer Import stattfinden, und wenn der Export noch langsamer stattfindet als der Import, ist eine nukleäre Akkumulation sichtbar.

Bei Transkriptionsrepression allein wird auch nach einiger Zeit noch etwas neues FRQ synthetisiert, selbst wenn die mRNA-Mengen schon gering sind und die Veränderung der FRQ-Menge im Cytosol nicht auffällt. Dieses neue FRQ ist aber importkompetent, kann also vorübergehend im Zellkern akkumulieren, wo die FRQ-Menge klein ist und die Änderung daher sichtbar wird. Mit Cycloheximid stoppt die Translation abrupt (wenn auch im vorliegenden Fall mit einiger Verzögerung), so dass schlagartig kein importkompetentes FRQ mehr entstehen kann. Zwar ist eine ähnlich große cytosolische FRQ-Menge entstanden wie bei alleiniger Repression, aber weil nun nicht einmal mehr geringe Mengen neu synthetisiert werden können, findet keine Akkumulation im Zellkern mehr statt.

Eine weiter gehende Interpretation wäre, dass Cycloheximid die gleiche Modifikation im Cytosol auslöst, wie sie normalerweise nur im Zellkern stattfindet, das neu synthetisierte FRQ also überhaupt nicht mehr in den Zellkern gelangen kann. Angesichts der starken Hyperphosphorylierung, die Cycloheximid bei FRQ bewirkt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um eine Phosphorylierung handeln könnte.

3.8 Affinitätsaufreinigung von Frequency

Mit FRQ assoziierte Proteine können durch Koimmunfällung nachgewiesen werden. Diese Methode ist äußerst empfindlich, kann also im Bereich der sehr kleinen physiologischen Konzentrationen der Uhrenproteine und bei geringen Proteinmengen eingesetzt werden. Allerdings muss schon vorher genau bekannt sein, nach welchen Proteinen gesucht werden soll, und die jeweiligen Antikörper müssen verfügbar sein bzw. epitopmarkierte Proteine durch gentechnologische Methoden erzeugt werden. Das Spektrum erfassbarer potentieller Bindungspartner ist also sehr limitiert.

Ein weniger spezifischer Ansatz ist die Affinitätsaufreinigung von entsprechend markiertem FRQ mit anschließender massenspektrometrischer Analyse. So können die assoziierten Proteine anhand ihrer molekularen Massen und Fragmentierungsmuster bestimmt werden. Da das *N. crassa*-Genom vollständig sequenziert ist, bestehen gute Chancen, die gefundenen Fragmente zuordnen zu können, eine ausreichende Sequenzabdeckung der betreffenden Proteine vorausgesetzt. Die Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Analyse ist zwar sehr hoch, dennoch muss das Zielprotein nicht nur isoliert sondern auch angereichert werden. Für *N. crassa* stehen bisher keine Promotoren zur Verfügung, die Überexpression (verglichen mit den physiologischen Konzentrationen der Uhrenproteine) erlauben*. Daher muss die eingesetzte Gesamtproteinmenge groß genug gewählt werden, so dass eine ausreichende Menge des Zielproteins enthalten ist. Dies setzt wiederum voraus, dass die Selektivität der Affinitätsaufreinigung hoch genug ist, um abundante Proteine als falsch positive auszuschließen.

Um Kofaktoren zu identifizieren, die evtl. für die Lokalisation bzw. den nukleären Im- oder Export von FRQ verantwortlich sind, wurden verschiedene affinitätschromatographische Methoden auf ihre Verwendbarkeit in *N. crassa* getestet.

* Ob die Verhältnisse bei überexprimiertem Zielprotein den physiologischen entsprechen, ist nicht immer klar: Bindungspartner, die nur schwach exprimiert werden, können u.U. nicht mehr detektiert werden. Dafür können evtl. andere Proteine, die bei physiologischen Konzentrationen des Zielproteins nicht daran binden, mit dem großen Überschuss assoziieren. Schließlich könnte das überexprimierte Protein Signalkaskaden aktivieren, die Expression und Bindungsverhältnisse anderer Proteine beeinflussen.

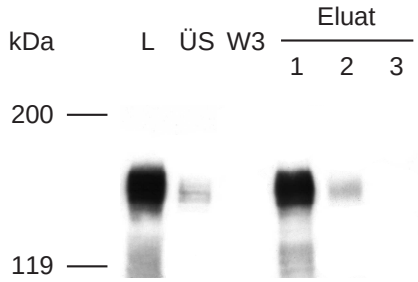

Abbildung 33: Bindung von FRQ-His_6 aus Proteintotalextrakt (5 mg Gesamtprotein) an Ni-NTA-Agarose. L: Ladekontrolle, ÜS: Überstand (je 200 µg Gesamtprotein), W3: letzte Waschfraktion (3 %), Eluat 1–5: je 10 % der Gesamtmenge

3.8.1 Ni^{2+}-Affinitätschromatographie mit His_6-Markierung

Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (*immobilized metal ion affinity chromatography*, IMAC) [139, 140, 141, 142] ist eine sehr häufig verwendete Methode, um Proteine spezifisch aus einem Proteingemisch anzureichern und aufzureinigen. Dabei wird die Eigenschaft einiger Aminosäuren (in erster Linie Histidin, aber auch Cystein) genutzt, mit Ionen der Übergangsmetalle (meist Ni^{2+}, daneben auch Co^{2+}, seltener Cu^{2+} und Zn^{2+} [143]) Komplexe zu bilden*. Die Metallionen sind zu diesem Zweck über einen mehrzähnigen Liganden an eine Matrix gebunden. Die mit Abstand am häufigsten verwendete Variante ist die Bindung einer gentechnologisch eingeführten Polyhistidin-Markierung [147, 148, 149] (meist 6 Histidinreste [150, 151, 152], üblich sind aber auch 5–10) an durch NTA-Agarose immobilisiertes Ni^{2+}. Nitrilotriessigsäure [153] (*nitrilotriacetic acid*, NTA) ist ein vierzähniger Ligand, so dass bei oktaedrischer Koordination noch zwei Plätze frei sind, die durch Histidinseitenketten besetzt werde können. Eine Markierung mit mehr Histidinresten bindet aus reaktionskinetischen Gründen stärker, weil in der unmittelbaren Umgebung des Ni^{2+}-Ions mehr potentielle Liganden zur Verfügung stehen, falls ein Histidinrest sich ablöst. Eine geringe Imidazolkonzentration (5–10 mM) im Bindepuffer verhindert die Bindung von Proteinen mit einzelnen exponierten Histidinresten†.

Die Elution erfolgt unter recht milden Bedingungen durch Kompetition mit Imidazol in höherer Konzentration, möglich ist aber auch saure Elution (Protonierung der Imidazolseitenkette des Histidins, das damit nicht mehr an Ni^{2+} binden kann) oder Komplexierung des Ni^{2+} durch einen starken Chelator wie EDTA. Verunreinigungen durch andere histidinreiche Proteine können evtl. abgetrennt werden, wenn eine lange Polyhistidinmarkierung verwendet und mit einem Imidazolgradienten eluiert wird.

* Phosphoproteine lassen sich dagegen z. B. durch Affinitätschromatographie mit Fe^{3+} anreichern [144, 145, 146]

† Selbst Bindung unter denaturierenden Bedingungen ist möglich (Aufreinigung z. B. von *inclusion bodies*, die durch chaotrope Salze und Detergentien solubilisiert wurden).

FRQ mit C-terminaler His_6-Markierung (FRQ-His_6) wurde unter der Kontrolle des *qa-2*-Promotors durch 14-stündige Induktion mit 15,6 mM Chinasäure im *frq*^{10}-Hintergrund exprimiert. Proteintotalextrakt in IMAC-Lysepuffer (5 mg Gesamtprotein) wurde analog zur Immunpräzipitation mit 50 µl PBS-gewaschener Ni-NTA-Agarose über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Die Affinitätsmatrix wurde 3× mit 1,5 ml IMAC-Waschpuffer gewaschen und mit 3× 300 µl IMAC-Elutionspuffer eluiert. Eine Ladekontrolle sowie Aliquota von Überstand, letzter Waschfraktion und Eluaten wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert und FRQ durch monokl. αFRQ-Antikörper 3G11 detektiert (Abb. 33). FRQ-His_6 konnte aus dem Totalextrakt nahezu vollständig depletiert werden und wurde im Eluat stark angereichert.

Eine Aufreinigung mit größerer Gesamtproteinmenge und Auftrag des gesamten TCA-gefällten Eluats führte nicht zu einer FRQ-Anreicherung, die nach Kolloidal-Coomassie-Färbung des Gels sichtbar gewesen wäre; dafür war eine Reihe anderer Proteine zu sehen (Daten nicht gezeigt). Eines davon, das größenmäßig FRQ nahekommt (AccNr. XP_964914, berechnete molekulare Masse 103 kDa), wurde durch Massenspektroskopie identifiziert; es trägt in einem kurzen Bereich von zehn Aminosäurenresten sechs Histidinreste (HGIHHHKDHH, 368–377)*. Auch andere Proteine, die Übergangsmetallionen wie Zn^{2+} koordinieren, z. B. die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren WC-1 und WC-2 (A. K. Behera, T. Schafmeier, persönliche Mitteilung), werden von Ni-NTA-Agarose gebunden.

3.8.2 *Tandem Affinity Purification* (TAP) [155, 123]

Die Methode beruht auf der Bindung von Protein A aus *Staphylococcus aureus* an Immunglobulin G sowie Calmodulin bindendem Peptid (CBP) an Calmodulin in Gegenwart von Ca^{2+}. Das TAP-Tag besteht aus zwei Immunglobulin-Bindedomänen des Protein A von *Staphylococcus aureus*, einer Tabak-Mosaikvirus- (*tobacco etch virus*, TEV)-Protease-Spaltstelle und dem Calmodulin bindenden Peptid (CBP). In dieser Form wird es am N-Terminus von Proteinen verwendet, am C-Terminus ist die Reihenfolge umgekehrt. Für die Aufreinigungsprozedur ist dies wichtig, denn die Bindung von Protein A an Immunglobulin G ist so fest, dass sie nur durch drastische Elutionsbedingungen (niedriger pH-Wert) wieder gelöst werden kann, was für viele Anwendungen nicht akzeptabel ist, da dies oft zum Zerfall von Proteinkomplexen und zu Proteindenaturierung führt. Die feste Bindung erlaubt andererseits aber sehr stringente Bindungs- und Waschbedingungen, falls eine hohe Selektivität erforderlich ist. Die „Elution“ nach der Bindung an immobilisiertes Immunglobulin G erfolgt durch Verdau mit TEV-Protease, die spezifisch die Aminosäuresequenz ENLYFQ↓G spaltet, somit

* Ein weiteres Protein mit lokaler Histidin-Häufung (sieben Histidinreste in den C-terminalen acht Aminosäureresten, HHHHDHHH-COOH) ist z. B. das Genprodukt UreE aus *Proteus mirabilis*, ein Ni^{2+}-bindendes Protein, das für die Bildung aktiver Urease bei geringen Ni^{2+}-Konzentrationen benötigt wird [154].

wird die saure Elution umgangen. Im zweiten Schritt bindet das CBP in Gegenwart von Ca^{2+} an immobilisiertes Calmodulin; TEV-Protease sowie verbliebene Verunreinigungen werden entfernt und das Zielprotein (bzw. der das Zielprotein enthaltene Komplex) durch einen Ca^{2+}-Chelator (meist EDTA) eluiert. Insgesamt erfolgt die Aufreinigung mit Hilfe des TAP-Tags unter milden Bedingungen; lediglich Interaktionen, die auf divalente Kationen angewiesen sind, können zerstört werden (durch Wahl eines spezifischeren Ca^{2+}-Chelators lässt sich dies ggf. verhindern).

Für die Aufreinigung von FRQ wurde das C-terminale TAP-Tag gewählt. Es wurde in pBM61 qa-2 FRQ-His_6 eingeführt und ersetzt dessen His_6-Markierung. FRQ-cTAP ist damit unter der Kontrolle des *qa-2*-Promotors und kann durch Chinasäure induziert werden.

frq^{10} *bd his-3* wurde mit pBM61 qa-2 FRQ-cTAP transformiert und exprimierte nach 14-stündiger Induktion mit 15,6 mM Chinasäure ein Protein, das im Proteintotalextrakt nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit monokl. αFRQ-Antikörper 3G11 nachgewiesen wurde und FRQ in Größe (berechnete molekulare Masse 129 kDa) und Bandenmuster gleicht (FRQ-TAP). Der Protein A-Teil des TAP-Tags konnte mit Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Antikörper* nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt); möglicherweise reicht die Sensitivität und Spezifität des Antikörpers nicht aus. Die vollständige genomische Integration des TAP-markierten *frq* wurde durch PCR verifiziert (Daten nicht gezeigt).

Proteintotalextrakt (5 mg Gesamtprotein) wurde analog zur Immunpräzipitation unter Rotieren über Nacht bei 4 °C mit 50 µl IgG-Sepharose inkubiert, die Affinitätsmatrix wurde nach dreimaligem Waschen mit je 1,5 ml Proteinextraktionspuffer durch Kochen mit 50 µl 2× SDS-PAGE-Auftragspuffer eluiert. FRQ-TAP bindet nur sehr schwach an IgG-Sepharose (Abb. 34); zwischen Ladekontrolle und Überstand ist kein Unterschied zu sehen. Obwohl das gesamte Eluat aufgetragen worden war, ist das Signal noch etwas schwächer als das der Ladekontrolle; die Ausbeute beträgt etwa 1 %. Es ist nicht auszuschließen, dass das Tag nicht korrekt exprimiert wird, da es durch PAP-

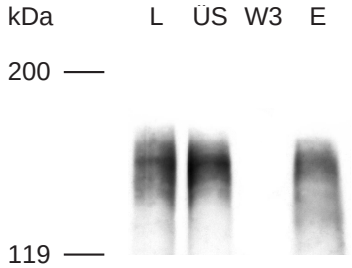

Abbildung 34: Bindung von FRQ-TAP aus Proteintotalextrakt (5 mg Gesamtprotein) an IgG-Sepharose. L: Ladekontrolle, ÜS: Überstand (je 200 µg Gesamtprotein ≙ 4 %), W3: letzte Waschfraktion (3 %), E: Eluat (100 %)

* mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter αPeroxidase-Antikörper, der Homooligomere bildet, was die Empfindlichkeit verbessert; die Bindung an die Immunglobulin-Bindedomäne aus Protein A erfolgt außerhalb der Antigenbindestellen.

Antikörper nicht detektiert werden kann; die geringe Bindung an IgG-Sepharose wäre dann lediglich unspezifisch. Das C-terminale TAP-Tag eignet sich daher nicht zur Aufreinigung von FRQ aus *N. crassa*.

3.8.3 Strep-Tag II-Affinitätschromatographie an StrepTactin [156]

Die Methode ist eine Weiterentwicklung der hochaffinen Bindung von Biotin an Streptavidin. Ein schwach an Streptavidin bindender C-terminaler Peptidrest war durch zufallsgesteuerte Mutagenese und Selektion auf hohe Streptavidin-Affinität optimiert worden (Strep-Tag, AWRHPQFGG-COOH) [157]. Dieser ersetzte das Biotin und konnte gentechnisch wie andere Epitopmarkierungen an den C-Terminus des Zielproteins gekoppelt werden; die Elution vom immobilisierten Streptavidin erfolgte durch Biotin [158]. Nach Aufklärung der Kristallstruktur von Streptavidin mit gebundenem Strep-Tag wurde die Peptidsequenz systematisch variiert, um nicht mehr auf einen freien C-Terminus angewiesen zu sein [159]. Das entstandene Strep-Tag II (NWSHPQFEK) kann sowohl an N- und C-Terminus als auch zwischen den Domänen eines Proteins verwendet werden. Basierend auf der o. g. Kristallstrukturanalyse wurde das Streptavidin durch zufällige ortsgerichtete Mutagenese verändert, um eine höhere Affinität zum Strep-Tag II zu erreichen [160]. Das optimierte Protein wurde Strep-Tactin genannt und wird mit Desthiobiotin eluiert, das nicht oxidationsempfindlich ist und nach der Elution wieder ausgewaschen werden kann, so dass die Affinitätsmatrix wiederverwendbar ist. Die Elution mit Biotin ist zwar weiterhin möglich, doch ist die Bindung nahezu irreversibel.

Das Strep-Tag II sollte am N-Terminus von FRQ eingefügt werden. Zwei komplementäre Oligonukleotide, die das Strep-Tag II kodieren und zur *Sph* I-Restriktionsschnittstelle kompatible 3'-überhängende Enden besitzen, wurden miteinander hybridisiert und in pBM60 *Cla* I-Fr. kloniert, das zuvor mit *Sph* I linearisiert worden war. Das entstandene Plasmid wurde durch PCR und Sequenzierung auf korrekte Integration des Inserts überprüft.

Transformiert wurde *frq*^{10} *bd his-3*, die Proteintotalextrakte wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Das vom monoklonalen αFRQ-Antikörper 3G11 detektierte Protein stimmt in apparenter molekularer Masse, Bandenmuster und Expressionsstärke mit FRQ^{wt} überein. Durch Immunpräzipitation mit monokl. αStrep-Tag II-Antikörper wurde das Protein zum großen Teil aus dem Totalextrakt depletiert und im Immunpräzipitat stark angereichert (Abb. 35 A)*.

Proteintotalextrakt in Puffer W entsprechend 100 mg Gesamtprotein wurde bei 4 °C auf eine StrepTactin-Sepharose-Säule mit 0,5 ml Matrixvolumen geladen (Fluss durch Schwerkraft). Der Durchlauf wurde ein zweites Mal geladen, danach wurde 5× mit 1 ml Puffer W gewaschen und 6× mit 500 µl Puffer E eluiert. Eine Ladekontrolle sowie Aliquota des Durchlaufs, der Wasch- und

* Der direkte Nachweis mit monokl. αStrep-Tag II-Antikörper oder Meerrettichperoxidase-gekoppeltem StrepTactin nach Elektrotransfer war wegen hohem Hintergrundsignal und geringer Empfindlichkeit nicht möglich.

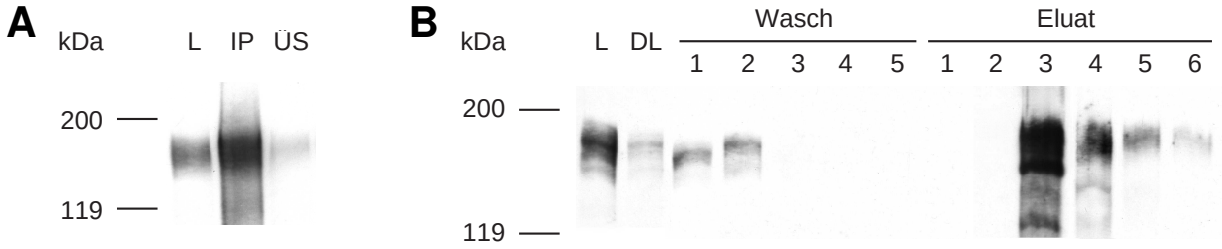

Abbildung 35: A Immunpräzipitation mit monokl. αStrep-Tag II-Antikörper (3 mg Gesamtprotein) und **B** StrepTactin-Affinitätschromatographie (100 mg Gesamtprotein) von Strep-Tag II–FRQ aus Proteintotalextrakt; Detektion mit monokl. αFRQ-Antikörper 3G11. L: Ladekontrolle (100 µg), ÜS: Überstand (100 µg≙ 3,3%), IP: Immunpräzipitat (50 % der Gesamtmenge ≙ 1,5 mg Gesamtprotein), DL: Durchlauf (100 µg Gesamtprotein ≙ 0,1 %), Wasch: je 3 % der Fraktion, Eluat: je 2 % der Fraktion ≙ 2 mg Gesamtprotein

Elutionsfraktionen wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Detektion mit monokl. αFRQ-Antikörper 3G11 analysiert (Abb.35 B).

Durch StrepTactin wurde Strep-Tag II–FRQ fast vollständig aus dem Proteintotalextrakt depletiert und von Desthiobiotin mit einem scharfen Maximum in hoher Konzentration eluiert. Um zu überprüfen, ob diese Methode die Aufreinigung von FRQ im Komplex mit anderen Proteinen erlaubt, wurden die Elutionsfraktionen mit polyklonalem αCK-1a-Antikörper getestet (Abb. 36). Weder konnte CK-1a im Eluat nachgewiesen werden noch ist eine Abnahme im Proteintotalextrakt zu beobachten; da CK-1a aber im großen Überschuss zu FRQ vorliegt, wird auch im günstigsten Fall nur ein Bruchteil der Gesamtmenge zusammen mit FRQ isoliert. Möglicherweise reicht die Empfindlichkeit des Antikörpers nicht aus, dies zu detektieren.

Der Rest der Elutionsfraktionen wurde mit TCA gefällt (2.3.4), in je 50µl 1× SDS-PAGE-Auftragspuffer aufgenommen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach Kolloidal-Coomassie-Färbung war wie bei der Ni^{2+}-Affinitätschromatographie kein FRQ erkennbar, dafür aber eine Reihe anderer Proteine (Daten nicht gezeigt). Auch hier reicht die Selektivität nicht aus, um FRQ aus *Neurospora*-Totalextrakten aufzureinigen.

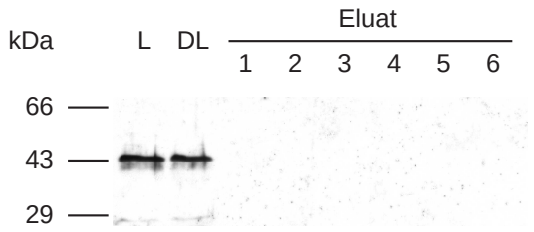

Abbildung 36: Affinitätschromatographie von Strep-Tag II–FRQ aus 100 mg Gesamtprotein an Strep-Tactin, Detektion mit polykl. αCK-1a-Antikörper. L: Ladekontrolle, DL: Durchlauf (je 100 µg Gesamtprotein ≙ 0,1%), Eluat: je 2 % der Fraktion ≙ 2 mg Gesamtprotein

3.8.4 Glutathion S-Transferase-Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose

Glutathion S-Transferasen (GST) sind Enzyme der Phase II des Fremdstoffmetabolismus, die Elektrophile durch Konjugation mit reduziertem Glutathion detoxifizieren. Die GST von *Schistosoma japonica* [161, 162, 163] wird für die Affinitätschromatographie heterolog exprimierter Proteine verwendet [164, 165]; sie bindet mit hoher Spezifität an immobilisiertes Glutathion und wird unter milden Bedingungen durch Kompetition mit freiem Glutathion von der Affinitätsmatrix eluiert. Proteine, die kein oxidierendes Milieu benötigen, können so als Fusion mit (meist N-terminalem) GST aufgereinigt werden. Nachteile sind, dass GST recht groß ist (26 kDa) und dimerisiert [166, 167], was in manchen Fällen störend ist.

FRQ sollte rekombinant als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert werden, um Mengen zu erhalten, die zur Produktion eines Antiserums benutzt werden können, das möglichst alle Bereich des Proteins detektiert. Auch für *in vitro*-Versuche wie Phosphorylierung oder proteolytischer Abbau könnte das Protein dienen, das bei heterologer Expression in Bakterien keine der eukaryontischen posttranslationalen Modifikationen trägt. Der FRQ-Leserahmen wurde durch PCR aus pBS II *Cla* I-Fr. amplifiziert, dabei wurden am 5'-Ende des kodogenen Strangs eine *Bcl* I- und am 3'-Ende eine *Xba* I-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde mit diesen beiden Restriktionsenzymen verdaut und in pGEX 4T3 kloniert, der mit *Bam H*I und *Xba* I geschnitten worden war*. Die Vektoren der pGEX 4T-Reihe kodieren eine N-terminale GST mit nachfolgender Thrombin-Spaltstelle, so dass die GST wieder entfernt werden kann bzw. statt mit freiem Glutathion zu eluieren das Fusionsprotein auf der Affinitätsmatrix mit Thrombin verdaut werden kann. Von dieser Möglichkeit wurde hier kein Gebrauch gemacht, zumal für FRQ eine interne Thrombin-Spaltstelle nach Aminosäurerest 195 vorhergesagt wird (ExPASy PeptideCutter [168, 169]).

Der *E. coli*-Expressionsstamm BL21 wurde mit pGEX 4T3 FRQ transformiert. Weil bereits unter physiologischen Bedingungen im Ursprungsorganismus GST dimerisiert und FRQ oligomerisiert, sollte die Aggregation des Fusionsproteins in *E. coli* möglichst unterbunden werden. Dazu wurde GST-FRQ bei 25 °C über Nacht durch Laktose-Autoinduktion [170] exprimiert; die geringe Temperatur und die „langsame" Induktion sollten die Akkumulation hoher Konzentrationen un- bzw. fehlgefalteten Proteins, die gewöhnlich zu Aggregation neigen, verhindern. Bei der Autoinduktion wird ein Medium, das neben Laktose auch Glukose und Glyzerin enthält, verwendet. Zu Beginn des Wachstums (unmittelbar nach der Inokulation) reprimiert Glukose die Transkription des *lac*-Promotors. Da diese bevorzugt von *E. coli* metabolisiert wird, ist sie mit fortschreitendem Wachstum

* *Bcl* I- und *Bam H*I-Restriktionsschnittstellen besitzen kompatible 5'-überhängende Enden, allerdings ist *Bcl* I sensitiv für *dam*-Methylierung, kann daher nur bei PCR-Produkten oder Plasmiden, die aus *dam*⁻-Stämmen isoliert wurden, verwendet werden.

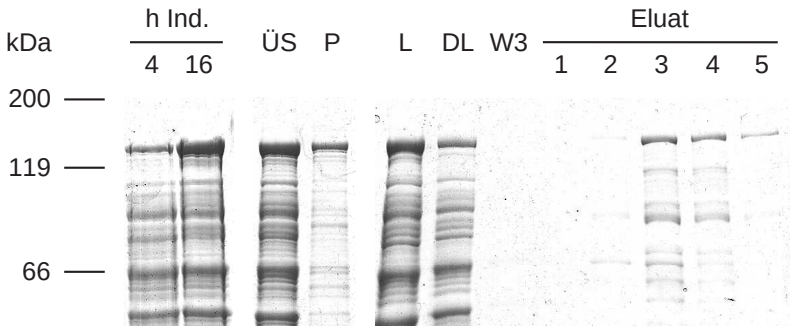

Abbildung 37: Affinitätschromatographie von GST-FRQ (aus 1000 OD_{600} *E. coli* BL21) an Glutathion-Sepharose. 4 h/16 h Ind.: Expressionskontrolle, ÜS: Überstand, P: Pellet, L: Ladekontrolle, DL: Durchlauf (je 0,15 OD_{600}, P: 0,3 OD_{600}), W3: letzte Waschfraktion (1 %), Eluate je 0,3 %. Coomassie Brilliant Blue R250-Färbung nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

nach einiger Zeit verbraucht, der Stoffwechsel wird auf Lactose umgestellt und die Induktion beginnt von selbst. Laktose ist kein so effizienter Induktor wie Isopropyl-β-D-thioglaktopyranosid (IPTG), und die Glukosemenge nimmt stetig ab, so dass die Induktion schleichend beginnt und langsam steigt; Inkubation über Nacht bis in die stationäre Phase ist möglich.

Die genaue Aufreinigungsprozdur ist unter 2.3.8 auf Seite 43 beschrieben und wird hier nur kurz zusammengefasst: Nach 16-stündiger Induktion bei 25 °C wurden die Bakterien sedimentiert, in PBS resuspendiert und aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch Ultrazentrifugation geklärt; durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Coomassie-Färbung des Gels wurden Aliquota von Überstand und resuspendiertem Niederschlag auf die Löslichkeit des Fusionsproteins getestet (Abb. 37). Mehr als 80 % des GST-FRQ befinden sich im Überstand, daher wurde dieser unter Rotieren über Nacht bei 4 °C mit 200 µl PBS-gewaschener Glutathion-Sepharose inkubiert. Die Affinitätsmatrix wurde in einer 2 ml-Einweg-Chromatographiesäule gesammelt, dreimal mit je 2 ml eiskaltem PBS gewaschen und fünfmal mit je 500 µl Glutathion-Elutionspuffer bei Raumtemperatur eluiert. Eine Ladekontrolle sowie Aliquota von Durchlauf, letzter Waschfraktion und der Eluate wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Coomassie-Färbung des Gels analysiert (Abb. 37).

Ca. $\frac{3}{4}$ des GST-FRQ wurde an Glutathion-Sepharose gebunden, jedoch wurde nur ein kleiner Bruchteil wieder eluiert, der zudem mit anderen Proteinen und/oder GST-FRQ-Abbauprodukten verunreinigt ist. Obwohl der weitaus größere Teil des Proteins löslich exprimiert wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass GST-FRQ bei den hohen lokalen Konzentrationen während der Elution aggregiert und die unlöslichen Aggregate in der Säulenmatrix stecken bleiben. Kontaminationen durch andere Proteine können auftreten, da FRQ vermutlich nicht korrekt gefaltet ist und hydrophobe Bereiche exponiert werden, die mit hydrophoben Strukturen anderer Proteinen interagieren oder von Chaperonen erkannt werden. Auch zur Selbstaggregation tragen solche exponierten hydrophoben Bereiche natürlich bei.

Im Vergleich zu der in *N. crassa* maximal erreichbaren Expression ist die heterologe Expression in *E. coli* um mehrere Größenordnungen stärker, denn in *Neurospora*-Proteintotalextrakten kann FRQ nur immunologisch nachgewiesen werden. Obwohl FRQ ein sehr großes Protein im Vergleich zu bakteriellen Proteinen ist, kann es in *E. coli* in voller Länge, löslich und in guter Ausbeute exprimiert werden. Optimierung der Binde- und Elutionsbedingungen von GST-FRQ könnte ein reineres Produkt in höherer Ausbeute liefern. Alternativ können andere Affinitätsmarkierungen, wie z. B. das in *Neurospora* gut verwendbare Strep-Tag II (3.8.3) für die Aufreinigung von rekombinantem FRQ getestet werden.

3.9 Konstruktion von neuen Expressionsplasmiden für *N. crassa*

Um *N. crassa* zu transformieren, wurde eine Anzahl verschiedener Vektoren geschaffen, die zur Selektion entweder Resistenz gegen Hygromycin B [171, 172, 125] oder Benomyl [126, 173] verleihen und an zufälligen Stellen in das Genom integriert werden oder auxotrophen Mutanten wie *his-3* [174, 175, 176] wieder prototrophes Wachstum ermöglichen und spezifisch durch homologe Rekombination in das Genom integriert werden müssen*.

Diverse *his-3* komplementierende Vektoren auf der Basis von pDE3 [178] und pBM60 [175] sind in unserem Labor mit gutem Erfolg eingesetzt worden, doch gab es bisher keine universellen Plasmide, die verschiedene Promotoren mit einem mehrere Restriktionsschnittstellen umfassenden Polylinker und einem Transkriptionsterminator verbinden.

Als Basis für eine Reihe solcher Vektoren wurde pBM60 gewählt, ein *his-3* komplementierendes Plasmid der dritten Generation, das auf beiden Seiten der zu inserierenden DNA homolog rekombinieren kann (Doppel-*cross over*, kann durch Transfomation linearisierter DNA erreicht werden).

Zunächst wurde eine *Hin*d III-Restriktionsschnittstelle zusammen mit einer benachbarten *Sph* I-Schnittstelle† durch *in vitro*-Mutagenese aus pBM60[175] entfernt, um *Hin*d III im Polylinker wieder als einzelne Restriktionsschnittstelle nutzen zu können (pBM60 Δ*Hin*d III Δ*Sph* I). Beim Einfügen der Promotor- und Terminator-Regionen sollten möglichst keine Restriktionsschnittstellen aus dem Polylinker des Ausgangsvektors verloren gehen; deshalb wurde eine Klonierungsstrategie gewählt, die sich die kompatiblen Enden von *Bsp*120 I und *Not* I zunutze macht; diese beiden Restriktionsschnittstellen sind die äußersten einzeln vorkommenden des Polylinkers von pBM60.

* Anders als in *S. cerevisiae* können in *N. crassa* keine Plasmide stabil propagiert werden, und transformierte DNA wird vorwiegend an zufälligen Orten in das Genom integriert. Allerdings wurden Mutanten gefunden, die die Häufigkeit homologer Rekombination drastisch erhöhen [177].

† Diese befinden sich am 5'-Ende des *his-3*$^+$-Fragments; über *Hin*d III war das *his-3*$^+$-Fragment in pBM60 kloniert worden.

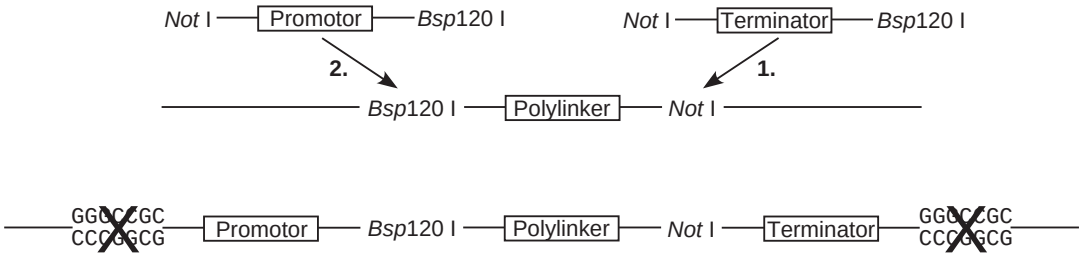

Abbildung 38: Klonierungsstrategie der pFH-Plasmide

Folgende Promotoren und Transkriptionsterminatoren wurden verwendet:

- β-Tubulin-Promotor, konstitutiv (aus genomischer DNA eines *bd*-Stammes, vgl. [126])
- *qa-2*-Promotor, induzierbar durch Chinasäure (aus pBA50 [22])
- *cpc-1*-Promotor, konstitutiv (aus pBC-hygro [125])
- *A. nidulans trpC*-Terminator, mit Polyadenylierungsstelle (aus pBC-hygro [125])
- *ccg-1*-Promotor, konstitutiv, durch Glukose unvollständig reprimierbar (aus pMF272 [122])

Die Promotoren und der Terminator wurden mittels PCR amplifiziert; dabei wurde jeweils am 5'-Ende ein *Not* I- und am 3'-Ende ein *Bsp*120 I-Schnitt eingeführt. Die PCR-Produkte wurden an den 3'-Enden durch Taq-Polymerase um ein einzelnes A verlängert und mittels Topo-TA™ in pCR2.1 kloniert (2.1.2). Die Konstrukte wurden sequenziert und durch *Bsp*120 I- und *Not* I-Restriktionsverdau wieder ausgeschnitten. Der *trpC*-Terminator wurde in die *Not* I-Restriktionsschnittstelle von pBM60 Δ*Hin*d III Δ*Sph* I eingefügt und die Orientierung der Insertion durch Restriktionsverdaus überprüft. Dieses Plasmid wurde pFH62 genannt; es enthält unmittelbar vor der *Apa* I/*Bsp*120 I-Restriktionsschnittstelle einen T3-Promotor, mit dem Inserts im Polylinker sequenziert werden können (auch der *trpC*-Terminator wurde auf diese Weise nochmals überprüft). Zum Sequenzieren von Inserts in umgekehrter Richtung kann das Oligonukleotid TtrpC 3' seq verwendet werden.

Die Promotoren wurden in die *Bsp*120 I-Restriktionsschnittstelle von pFH62 eingefügt, die Orientierung der Insertion wurde über Restriktionsverdaus getestet. Durch Sequenzierung über T3-Promotor und das Oligonukleotid TtrpC 3' seq wurden die Promotoren nochmals überprüft. Es wurden folgende Plasmide erhalten (s. Vektorkarten in Abb. 39): pFH64 (*cpc-1*-Promotor), pFH66 (*qa-2*-Promotor), pFH68 (β-Tubulin-Promotor), pFH70 (β-Tubulin-Promotor lang*), pFH72 (*ccg-1*-Promotor)). Zum Sequenzieren von Inserts in pFH64 und pFH66 können die Oligonukleotide

* pFH68 ermöglicht keine stärkere Expression als pFH64 (Daten nicht gezeigt). Es wurde vermutet, dass das in [126] verwendete DNA-Fragment nur einen β-Tubulin-Minimalpromotor enthält, deshalb wurde eine um ca. 300 bp längere Variante des β-Tubulin-Promotors getestet.

Vektor	**pFH62**	**pFH64**	**pFH66**	**pFH68**	**pFH70**	**pFH72**
Promotor	–	*cpc-1*	*qa-2*	*βtub*	*βtub*L	*ccg-1*
Apa I	●	●	●	●	●	●
*Hin*d III	●	●	●	●	●	❍
*Eco*R I	●	●	●	●	●	●
Sma I	●	●	●	●	●	●
*Bam H*I	●	❍	●	●	●	●
Spe I	●	●	●	●	●	●
Xba I	●	●	●	●	●	●
Not I	●	●	●	●	●	●
Nde I	●	❍	●	●	●	●
Nhe I	●	●	●	●	●	❍
Ssp I	●	●	●	●	●	●

Tabelle 2: Übersicht der neuen *his-3*-komplementierenden Transformationsvektoren für *N. crassa*. Angegeben sind der Promotor (davon ist nur *qa-2* induzierbar, *ccg-1* wird durch Glukose unvollständig reprimiert), die nutzbaren Restriktionsschnittstellen des Polylinkers sowie die für Linearisierungen zur Transformation verfügbaren Restriktionsschnittstellen (*Nde* I, *Nhe* I und *Ssp* I).

Pcpc-1 5' seq und Pqa-2 5' seq verwendet werden; TtrpC 3' seq für Sequenzierungen in umgekehrter Richtung ist bei allen beschriebenen Plasmiden verwendbar (Nukleotidsequenzen s. Seite 103). Tab. 2 zeigt eine Übersicht der verwendbaren Restriktionsschnittstellen der einzelnen Vektoren.

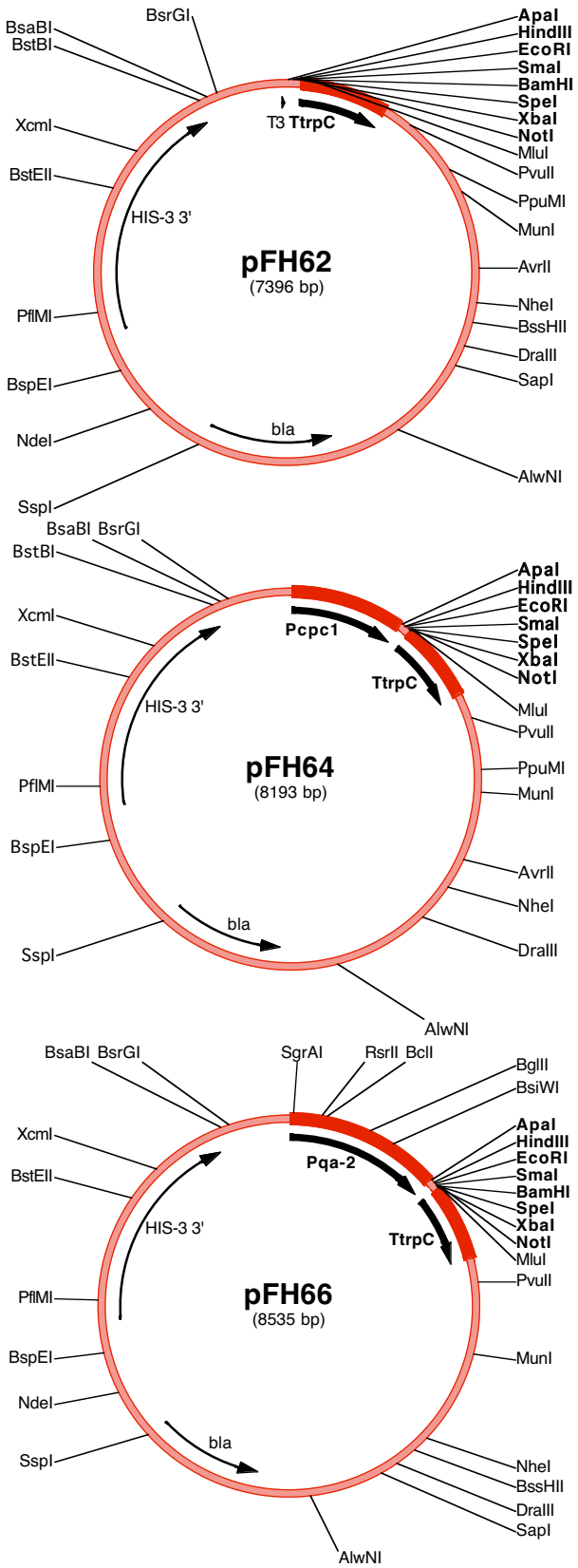

Abbildung 39: Schematische Darstellung der pFH-Plasmide; einfach vorkommende Restriktionsschnittstellen sind angegeben. bla: β-Laktamase (Ampicillin-Resistenz); T3: T3-Promotor (für Sequenzierungen verwendbar)

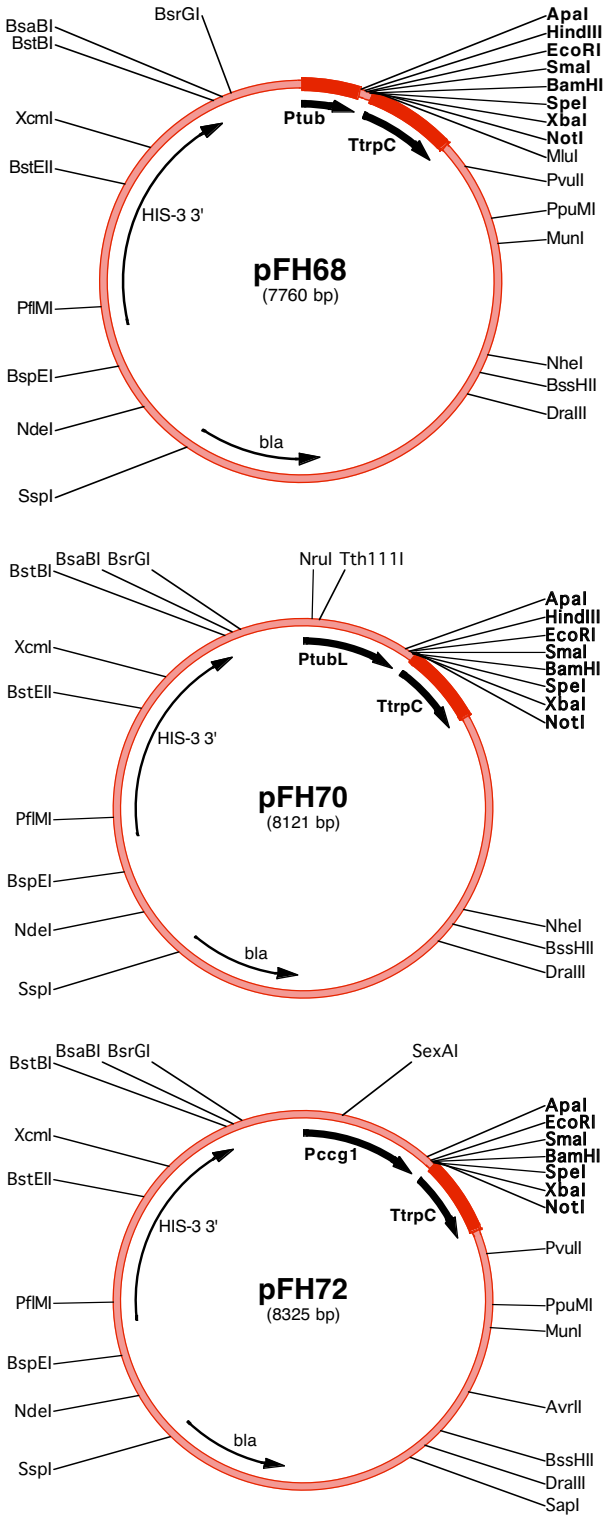

Abbildung 39: Schematische Darstellung der pFH-Plasmide; einfach vorkommende Restriktionsschnittstellen sind angegeben. bla: β-Laktamase (Ampicillin-Resistenz)

4 Diskussion

4.1 Subzelluläre Lokalisation von FRQ

Kernlokalisation ist für die negative Rückkopplung von FRQ (Repression der WCC-abhängigen Transkription und damit auch seiner eigenen mRNA) zwingend erforderlich [41], die positive Rückkopplung (Unterstützung der Akkumulation des WCC) erfolgt aber im Cytosol, wobei nicht nur eine hohe cytosolische FRQ-Konzentration, sondern auch bestimmte Phosphorylierungen nötig sind [33]. Die subzelluläre Verteilung von FRQ ist also ein wichtiger Faktor in der circadianen Uhr von *Neurospora crassa*. Ausgehend von der Beobachtung, dass FRQ trotz eines funktionalen Kernlokalisationssignals sowohl unter ständiger Lichtinduktion (LL) als auch über den circadianen Tag hinweg im Zellkern geringer konzentriert ist als im Cytosol, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welcher Bereich des Proteins für dieses Phänomen verantwortlich ist und auf welche Weise die subzelluläre Verteilung reguliert wird.

Selbstassoziation könnte die subzelluläre Verteilung von FRQ beeinflussen, indem beispielsweise das NLS oder ein – putatives – NES maskiert bzw. durch damit einhergehende Konformationsänderungen des Moleküls demaskiert werden. Insbesondere da das NLS von FRQ unmittelbar auf die *coiled coil*-Region folgt (je nach Strukturvorhersage ist der *coiled coil*-Bereich evtl. sogar noch etwas größer und erstreckt sich über das NLS hinweg), liegt die Vermutung nahe, dass *coiled coil*-abhängige Dimerisierung das NLS maskieren könnte. In [45] wurde gezeigt, dass FRQ über seine *coiled coil*-Region mit sich selbst assoziiert, was für die Funktion der circadianen Uhr unabdingbar ist, die Interaktion hat laut Autoren aber keinen Einfluß auf die Lokalisation. Sie zeigen die subzelluläre Verteilung einer Mutante, in der hydrophobe Aminosäurereste, die für die Assoziation der *coiled coil*-Regionen wichtig sind, zu hydrophilen mutiert wurden und damit die Interaktion verhindert wird. Bei der Fraktionierung (Abb. 6 ebd.) sind die Mengen von FRQ^{wt} und *coiled coil*-Mutante im Zellkern gleich, im Cytosol scheint die FRQ^{wt}-Menge aber signifikant größer zu sein, was von den Autoren nicht kommentiert wird. Es könnte also sein, dass die Gesamtmenge bei der Mutante zwar geringer ist, der nukleäre Anteil aber höher; die Qualität der Daten lässt hier kein abschließendes Urteil zu, ebensowenig kann eine – schwächere – FRQ-Assoziation, evtl. bedingt durch andere Bereiche als die *coiled coil*-Region, ausgeschlossen werden.

Da der Oligomerisierungsgrad eines Komplexes u. a. von der Konzentration der Monomere abhängt, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Expressionsstärke von FRQ Auswirkungen auf die Lokalisation hat. FRQ unter der Kontrolle eines induzierbaren heterologen Promotors wurde bei verschiedenen Induktor-Konzentrationen exprimiert; die relative Verteilung änderte sich dabei nicht. Diese Erkenntnis allein schließt nicht aus, dass Homooligomerisierung die subzelluläre Lokalisation von FRQ steuern kann; die Selbstassoziation könnte durch andere Prozesse (z. B. kovalente Modifikationen) reguliert werden, was allein durch unterschiedlich starke Expression nicht beeinflusst werden kann. Die Analyse von FRQ-Komplexen aus Myzel, das unter konstanter Beleuchtung (LL) gewachsen war, durch Gelfiltration ergab jedoch keine Unterschiede im Elutionsprofil von cytosolischem und nukleärem FRQ; Änderungen der Konformation oder der Komplexzusammensetzung müssten also entweder sehr labil oder nur geringfügig sein (z. B. Assoziation mit einem kleinen Protein).

Die Mutante *frq*^{9} exprimiert durch Leserasterverschiebung ein um ∼30 % verkürztes FRQ-Protein (FRQ^9), welches bei insgesamt geringerer Menge stark im Zellkern angereichert ist. Offensichtlich ist der C-Terminus von FRQ für die cytosolische Lokalisation wichtig. FRQ^9 besitzt neben dem NLS auch die *coiled coil*-Region, kann folglich dimerisieren [45]. Da die cytosolische Lokalisation bei FRQ^{wt} trotz NLS dominiert, wurde durch Koexpression getestet, ob eine der beiden Formen die Verteilung der anderen beeinflussen kann. FRQ-Koexpression verschiebt einen Teil des FRQ^9-Proteins ins Cytosol, seine eigene Verteilung wird jedoch nicht verändert; die dominante Eigenschaft des C-Terminus von FRQ wirkt nicht nur in *cis* sondern auch in *trans*. Ein noch stärker verkürztes FRQ-Konstrukt, an das gentechnisch C-terminal GFP fusioniert wurde und das immer noch NLS und *coiled coil*-Region besitzt (FRQ(1–336) GFP), verhält sich – bei noch schwächerer Expression – genauso wie FRQ^9, ist aber anders als FRQ und FRQ^9 nicht hyperphosphoryliert.

Die subzelluläre Verteilung von FRQ/FRQ^9-Komplexen wurde durch Gelfiltration untersucht. Separat exprimiert besitzen FRQ und FRQ^9 breite Elutionsprofile, die nur relativ wenig überlappen; FRQ^9-Komplexe eluieren später als FRQ-Komplexe. Werden beide koexprimiert, nimmt die Überlappung zu, ein Teil des FRQ^9 eluiert früher. Diese Verschiebung betrifft aber nur den cytosolischen Anteil, der nukleäre eluiert wie FRQ^9 in *frq*^{9}. FRQ verändert demnach die Lokalisation von FRQ^9 durch direkte Interaktion.

FRQ wird durch das Proteasom abgebaut [48], dies kann theoretisch sowohl im Cytosol als auch im Zellkern stattfinden. Wäre der nukleäre Abbau gegenüber dem cytosolischen bevorzugt und der Import von FRQ langsamer als der Abbau, würde dies die subzelluläre Verteilung erklären wie auch die Abbaukinetik nach Translationsunterbrechung (Abb. 28 auf Seite 70). Der Import von FRQ^9 müsste dagegen wesentlich schneller sein, andernfalls könnte es nicht im Kern angereichert werden. Da in *frq*^{9} keine negative Rückkopplung stattfindet [21], ist die mRNA-Menge viel größer als in *frq*$^+$, und somit sollte auch die Translationsrate hoch sein. Die Abbaukinetik unterscheidet sich

Mutation	Expression	Cytosol	Nukleus	Hyperphosh.	Schema
(1–336) GFP	–	–	++++	–	
FS 581	–	–	++++	+	
623 Stop	+++	+	+++	+	
FRQ^{9}(662 Stop)	+	–	++++	+	
678 Stop	++	+	+++	+	
686 Stop	+++	+	+++	+	
701 Stop	+++	+	+++	+	
337–711::GFP	+	+	++	–	
716 Stop	+++	+	++	+	
751 Stop	– –	(+)	(++)	+	
791 Stop	++	+	+	+	
916 Stop	–	+	+	+	
Δ584–677	++++	++	+	+	
FRQ^{wt}	++++	++	+	+	

Tabelle 3: Übersicht der FRQ-Deletionsmutanten (mit maßstäblicher schematischer Darstellung), der jeweiligen relativen Expressionsstärken und subzellulären Verteilungen

aber nicht wesentlich von der bei FRQ^{wt} (Abb. 29), was angesichts der kleineren Proteinmenge im Gleichgewicht nach diesem Modell eigentlich zu erwarten gewesen wäre. FRQ(1–336) GFP ist deutlich instabiler als FRQ^{9}, müsste theoretisch also weniger im Zellkern akkumulieren. Dies ist nicht der Fall, die relative Verteilung ist die gleiche wie bei FRQ^{9}(s. Abb. 11 und 12). Auch die Lokalisation der verkürzten FRQ-Varianten kann nicht mit der Proteinstabilität korreliert werden; schwache Expression führt nicht zu cytosolischer Lokalisation (Abb. 16). Daher kommt bevorzugter nukleärer Abbau von FRQ als Ursache für die beobachtete subzelluläre Verteilung nicht in Frage.

Um die für die vorwiegend cytosolische Lokalisation von FRQ verantwortliche Region näher einzugrenzen, wurde die subzelluläre Verteilung einer Reihe C-terminal verkürzter FRQ-Konstrukte sowie zweier FRQ-Konstrukte mit zentralen Deletionen bestimmt (Tabelle 3 fasst die Ergebnisse zusammen). Deletion der phylogenetisch hoch konservierten Region um den Ort der *frq*^{9}-Mutation herum (Δ584–677, vgl. Abb. 4 auf Seite 10) hat keine Auswirkungen auf subzelluläre Verteilung, Expressionsstärke und Hyperphosphorylierung des Proteins. Auch am äußersten C-Terminus von FRQ befindet sich ein kurzer sehr stark konservierter – serinreicher – Abschnitt (Aminosäurereste 967–985). Fehlt dieser (FRQ 916 Stop), ist das Protein im Cytosol nicht mehr höher konzentriert als im Zellkern, allerdings geht der deletierte Bereich hier deutlich über den konservierten hinaus, so dass eine eindeutige Zuordnung nicht möglich ist. Keines der mutierten FRQ-Proteine konnte bei Expression im *frq*-Deletionsstamm *frq*^{10} den circadianen Rhythmus wiederherstellen.

Die subzelluläre Verteilung ändert sich mit fortschreitender Verkürzung von FRQ nicht plötzlich, sondern es findet ein gradueller Übergang statt von „überwiegend cytosolisch“ über Gleichverteilung

zu starker Anreicherung im Zellkern. Dieses Verhalten ist durch ein einzelnes Kernexportsignal nicht zu erklären; es müssten mehrere existieren, die bei den Verkürzungen sukzessiv verloren gehen.

Eine andere Möglichkeit ist, dass der C-Terminus von FRQ eine Struktur ausbildet, die das NLS in *cis* maskiert. Diese könnte durch C-terminale Trunkierungen sukzessiv ihre Fähigkeit zur Maskierung verlieren. In [41] wurde gezeigt, dass Deletion des NLS die Kernlokalisation von FRQ vollständig verhindert; die Mutante ist arythmisch. Ektopische Reinsertion am N-Terminus stellte sowohl die Kernlokalisation als auch den Rhythmus wieder her, allerdings scheint die subzelluläre Verteilung gegenüber frq^+ stark verändert (Abb. 4 B, ebd.): Bei insgesamt geringerer Expression ist der Anteil im Zellkern wesentlich höher. Die Ursache könnte sein, dass wegen der anderen räumlichen Anordnung keine Maskierung des NLS durch den C-Terminus mehr möglich ist.

Drittens könnten Phosphorylierungen im C-Terminus den Kernexport regulieren, wobei entweder der phosphorylierte Bereich selbst recht ausgedehnt sein müsste oder evtl. Interaktionsstellen von Kinasen darin vorkommen könnten. Als Mechanismen sind z. B. Msn5-abhängiger Export (Msn5p ist ein *S. cerevisiae*-Exportin, das am nukleären Transport phosphorylierter Proteine beteiligt ist) oder NLS-Maskierung durch Bindung von 14-3-3-Proteinen denkbar. Letztere sind eine Familie stark saurer Proteine, die in allen Eukaryonten vorkommen und hauptsächlich an Phosphoserinreste binden. Dadurch können sie andere funktionelle Proteinbereiche (z. B. ein Transportsignal) maskieren [107]. Auch die bereits erwähnte Maskierung in *cis* durch den C-Terminus kann durch Phosphorylierungen reguliert sein.

Cytosolisches FRQ ist stärker phosphoryliert als nukleäres, was die Vermutung nahelegt, dass der Netto-Phosphorylierungsstatus von FRQ die subzelluläre Lokalisation bestimmt. Mehrere Argumente sprechen gegen diese Hypothese:

1. FRQ 337–711::GFP wird nicht hyperphosphoryliert und ist dennoch in Cytosol und Zellkern fast gleich konzentriert.

2. Auch die am meisten verkürzten FRQ-Konstrukte – mit Ausnahme von FRQ(1–336) GFP – sind hyperphosphoryliert und werden trotzdem stark im Zellkern angereichert.

3. Die cytosolischen und nukleären Populationen der stark verkürzten Formen unterscheiden sich nicht in ihren Phosphorylierungsmustern (s. Abb. 16).

4. Obwohl durch Cycloheximid im Cytosol wie auch im Zellkern eine starke zusätzliche Phosphorylierung von FRQ ausgelöst wird (es entstehen teilweise Phosphorylierungsstufen, die unter physiologischen Bedingungen nicht nachweisbar sind), wird FRQ nicht umgehend vollständig aus dem Zellkern exportiert, sondern verbleibt zunächst dort und verschwindet langsam mit ähnlicher Kinetik wie im Cytosol .

Auch wenn Hyperphosphorylierung *per se* offensichtlich nicht die FRQ-Verteilung reguliert, könnten doch einzelne Phosphorylierungen im C-Terminus, die durch klassiche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nicht aufgelöst werden, die subzelluläre Lokalisation des Proteins bestimmen. Als Methode, dies zu überprüfen, bietet sich die 2 D-Gelelektrophorese mit isoelektrischer Fokussierung als erster Dimension an. Gerade bei FRQ 337–711::GFP müsste es wegen der fehlenden Hyperphosphorylierung möglich sein, einen eventuellen Unterschied im Phosphorylierungsmuster zwischen nukleärer und cytosolischer Population nachzuweisen.

Obwohl das C-terminale Drittel von FRQ eine Vielzahl potentiell phosphorylierbarer Serin- und Theroninreste enthält (darunter auch die PEST-2-Region), wird es anscheinend nicht hyperphosphoryliert; die vielfachen Phosphorylierungen finden hauptsächlich im mittleren Teil von FRQ statt. Durch Koimmunpräzipitation wurde gezeigt, dass CK-1a, die PEST-2 *in vitro* phosphoryliert [43], den Bereich der Aminosäurereste 337–711 (bzw. einen Teilbereich daraus) benötigt, um mit FRQ assoziieren zu können (konsistent mit diesen Daten wurde die CK 1a-Bindungsstelle in [56] auf die Aminosäurereste 435–558 eingegrenzt). CK-1a-Bindung und Hyperphosphorylierung* finden im selben Teil von FRQ statt; CK-1a kann diesen zusätzlich als Plattform nutzen, um von dort aus andere Regionen von FRQ (z. B. PEST-2) oder andere Proteine des FRQ-Komplexes (FRH?) zu phosphorylieren. Interessanterweise scheint FRQ 337–711::GFP auch ohne CK-1a-Bindungsstelle die Akkumulation des WCC zu unterstützen; S885 und S887 werden vermutlich von anderen Kinasen phosphoryliert.

Laut [46] befindet sich alles FRQ im Komplex mit der essentiellen RNA-Helikase FRH (FRQ *interacting* RNA *helicase*), welche für die Funktion der circadianen Uhr benötigt wird. FRH ist stark im Zellkern angereichert und daher wahrscheinlich nicht für die cytosolische Lokalisierung von FRQ verantwortlich. Umgekehrt könnte FRQ aber einen Teil der FRH ins Cytosol verschieben. Weil kein geeigneter FRH-Antikörper für Immundetektion und -fällung verfügbar war, wurde FRH gentechnologisch mit einer Epitopmarkierung (2×FLAG™) versehen und unter einem heterologen Promotor exprimiert. FRH-$Flag_2$ akkumulierte wie das nicht-markierte Protein hauptsächlich im Zellkern und konnte durch Immunfällung vollständig depletiert werden; ca. 10 % des gesamten FRQ wurde mitgefällt (beide Fällungen wurden durch die Zugabe von RNase oder RNase-Inhibitor nicht beeinflusst, die Interaktion scheint nicht RNA-abhängig zu sein).

Sowohl bei der Immunpräzipitation von FRH aus Cytosol als auch aus Kernextrakten wurde FRQ mitgefällt, FRH selbst wurde depletiert. Obwohl FRQ im Cytosol angereichert ist, FRH dagegen im Zellkern, ist die FRQ-Ausbeute bei beiden Kopräzipitationen ähnlich. FRH sollte daher nicht

* Diese muss natürlich nicht allein durch CK-1a erfolgen. Neben anderen Kinasen könnte CK-II eine wichtige Rolle spielen (vgl.[52, 53]), die das Motiv (S/T)xx(^{P}S/^{P}T) phosphorylieren kann [57]. Nach einer initialen Phosphorylierung durch eine andere Kinase wird von CK-II automatisch eine weitere Phosphatgruppe angehängt, in (S/T)[xx(S/T)]$_n$-Motiven sogar mehrfach.

nur im Zellkern, sondern auch im Cytosol im Überschuss zu FRQ vorhanden sein. Falls der festgestellte Unterschied bei der Kofällung jedoch signifikant ist, würde dies bedeuten, dass die FRH-FRQ-Assoziation im Zellkern geringer ist als im Cytosol und FRQ wahrscheinlich FRH im Cytosol festhält. Dies ließe sich durch Immunpräzipitation von FRQ untermauern: Aus Cytosol würde viel, aus Kernextrakt nur wenig FRH mitgefällt werden.

Anders als in [46] beschrieben wurde kein WC-1 mit FRH kopräzipitiert. Dies lässt sich evtl. damit begründen, dass nur ein Teil des WCC mit FRH assoziiert, das Verhältnis von endogener zu epitopmarkierter FRH unbekannt ist und so die Empfindlichkeit der Detektion evtl. nicht ausreicht, doch müsste bei einer Fällungsausbeute von 10 % FRQ wenigstens eine Spur WC-1 detektierbar sein (FRQ und WC-1 kommen in vergleichbarer Menge vor, WC-1 ist wie FRH im Zellkern konzentriert).

Zur genauen Analyse wird ein FRH-Antikörper benötigt, oder das endogene FRH muss durch homologe Rekombination am ursprünglichen Lokus mit einer Epitopmarkierung versehen werden. Nur so ist die Detektion bzw. Fällung der gesamten FRH möglich, und es können Aussagen zur Stöchiometrie getroffen werden.

4.2 C-Terminus von FRQ als CLD?

Die subzelluläre Verteilung der C-terminal verkürzten FRQ-Konstrukte warf die Frage auf, ob das C-terminale Drittel von FRQ als cytoplasmatische Lokalisationsdomäne wirkt, also ein beliebiges kernlokalisiertes Protein ins Cytosol verschieben kann. Fusioniert an ein Testprotein mit heterologem NLS verschob es dieses zu einem kleinen Teil vom Zellkern ins Cytosol. Obwohl eine Tandem-Wiederholung des Simian Virus 40 Large T-Antigen NLS (PKKKRKV, hier SV40-NLS genannt) benutzt wurde, das in vielen Organismen als starkes NLS wirkt, blieb das Testprotein auch ohne die putative CLD zum größten Teil im Cytosol. Es ist wenig wahrscheinlich, dass das Protein durch passive Diffusion während der Fraktionierungsprozedur aus den Zellkernen entwichen ist, weil es mit 80 kDa zu groß ist, um ohne die Vermittlung von Exportinen die Kernporen passieren zu können. In einem weiteren Versuch konnte weder das SV40-NLS noch das FRQ-NLS sGFP nennenswert im Zellkern anreichern. Hier wäre passive Diffusion durch die Kernporen möglich (die relative molekulare Masse der GFP-Konstrukte liegt bei etwa 31 kDa).

Die Charakterisierung des C-terminalen FRQ-Drittels als CLD erfordert ein Testprotein (wesentlich größer als 40 kDa, um passive Diffusion durch Kernporen zu verhindern), das stark im Zellkern angereichert ist, ohne dort von DNA oder anderen nukleären Strukturen gebunden zu werden. Durch Sequenzanalyse von obligat kernlokalisierten Proteinen müsste sich eine für *N. crassa* optimierte klassische NLS finden lassen, die zu Lokalisationsexperimenten an ein heterologes Protein gekoppelt wird. Alternativ könnte auch ein kernlokalisiertes *Neurospora*-Protein im Ganzen verwendet

werden, um die Auswirkung der putativen CLD in einem Fusionsprotein zu untersuchen. Soll eine fluoreszenzmikroskopische Nachweismethode mit GFP etabliert werden, muss sichergestellt werden, dass die Expressionsstärke ausreicht, um das Protein trotz der relativ starken Hintergrundfluoreszenz der Hyphen zu detektieren.

4.3 Nukleo-cytoplasmatisches *Shuttling* von FRQ?

Verschiedene Modelle sind denkbar, die das beschriebene subzelluläre Verteilungsverhalten von FRQ erklären: Zum einen kann die maximale Konzentration im Zellkern begrenzt werden (*concentration sensing*). FRQ könnte im Zellkern ein anderes Protein binden, das seinen Export verhindert (ein hypothetischer „Retentionsfaktor“, der z. B. eine – bisher noch putative – CLD maskiert). Überschreitet die FRQ-Konzentration die des „Retentionsfaktors“, wird das überschüssige FRQ wieder exportiert. Analog dazu könnte ein Bindungspartner FRQ vor proteolytischem Abbau schützen, indem er ein Abbausignal maskiert (dieser Abbauweg müsste allerdings spezifisch im Zellkern stattfinden). Die starke FRQ^9-Akkumulation im Zellkern ist mit beiden Varianten vereinbar, wenn sich das entsprechende Signal im C-Terminus von FRQ befindet. Die graduelle Änderung der subzellulären Verteilung bei zunehmender C-terminaler Verkürzung hingegen wäre schwer zu erklären, weil ein Punkt auftreten müsste, an dem der Bindungspartner nicht mehr binden kann, obwohl das Export- oder Abbausignal noch vorhanden ist; das so verkürzte Protein dürfte nahezu ausschließlich nur im Cytosol vorkommen. Erst weitere Verkürzung würde auch das Signal entfernen und die Lokalisation wäre dann größtenteils nukleär.

Concentration sensing könnte auch erfolgen, indem FRQ eine Signalkaskade in Gang setzen, die abhängig von seiner nukleären Konzentration ein Signal aus dem Zellkern ins Cytosol überträgt, das seinen Import hemmt. Dieses Signal müsste mit weiterer FRQ-Verkürzung immer schwächer werden. Generell gegen ein solches *concentration sensing* spricht die Konzentrationsunabhängigkeit der relativen Verteilung bei der Expression unterschiedlicher FRQ-Mengen durch Chinasäure-Induktion. Auch bei den verkürzten FRQ-Konstrukten ist die Verteilung nicht von der Expressionsstärke abhängig (das schwach exprimierte FRQ 916 Stop beispielsweise kommt in Zellkern und Cytosol in gleicher Konzentration vor).

Das *Shuttling*-Modell geht davon aus, dass die Verteilung eines Proteins, das sowohl NLS als auch NES besitzt, von einem dynamischen Gleichgewicht bestimmt wird, in dem Import und Export ständig ablaufen (daneben gehen natürlich auch Neusynthese und Abbau in den Gleichgewichtszustand ein). Durch Beeinflussung der Import- und/oder Exportkinetik kann die Gleichgewichtslage verschoben werden: Phosphorylierungen können z. B. die Affinität eines Lokalisationssignals zu sei-

nem Transportprotein modulieren [108, 109]. Weiterhin kann die Netto-Verteilung verändert werden, indem ein Teil der Population diesen dynamischen Prozessen entzogen wird (s. u.)

Wenn nukleo-cytoplasmatisches *Shuttling* vorliegt, bewirkt künstliche Hemmung eines der beiden Transportprozesse eine starke Umverteilung. CRM1-abhängiger Export wird allgemein durch Leptomycin B inhibiert; dieses hat aber keine Auswirkung auf die subzelluläre Verteilung der Uhrenproteine (T. Schafmeier, persönliche Mitteilung), und der für den Wirkmechanismus von Leptomycin B benötigte Cysteinrest in CRM1 (C529 in *S. pombe* [100]) fehlt dem *N. crassa*-Homolog. Deshalb wurden andere Experimente durchgeführt, um Hinweise auf ein eventuelles *Shuttling* zu erhalten:

Wird bei einem *frq*$^{+}$-Hintergrundstamm im Gleichgewicht unter LL weiteres (epitopmarkiertes) FRQ über einen heterologen Promotor (Chinasäure/*qa-2*-Promotor) induziert, wird dieses ohne zeitliche Verzögerung zusätzlich zum bereits vorhandenen FRQ in den Zellkern importiert. Die Importkinetik ist der im *frq*^{10}-Hintergrund sehr ähnlich, aber nicht völlig identisch (die Phosphorylierungmuster unterscheiden sich, und nach einigen Stunden scheint das ursprünglich vorhandene FRQ aus dem Kern exportiert oder abgebaut zu werden). Beim *concentration sensing* dürfte kein zusätzliches FRQ im Zellkern akkumulieren.

FRQ^{9} ist im Gleichgewicht stark im Zellkern angereichert; wird die Translation durch Cycloheximid plötzlich unterbrochen, sinkt die Konzentration dort schnell ab, während die cytosolische etwas ansteigt; der weitere Abbau erfolgt in beiden Kompartimenten mit gleicher Kinetik. Da es unwahrscheinlich ist, dass FRQ^{9} im Zellkern zuerst sehr schnell, dann aber mit gleicher Kinetik wie im Cytosol abgebaut wird, muss FRQ^{9} ins Cytosol exportiert worden sein. Ohne *de novo*-Synthese stellt sich ein neuer Gleichgewichtszustand mit anderer subzellulärer Verteilung ein, aus dem langsam FRQ^{9} durch proteolytischen Abbau entfernt wird.

Vorübergehende heterologe Induktion von FRQ im *frq*^{10}-Hintergrund mit anschließender Repression bzw. Repression und Translationsinhibition (s. 3.7.2 ab Seite 73) zeigte, dass einige Zeit nach Transkriptionsende ohne sichtbare Veränderung der cytosolischen Menge noch FRQ netto in den Zellkern importiert werden kann, wenn nur die Transkription reprimiert wird, nicht aber wenn auch die Translation unterdrückt wird (in beiden Fällen waren die cytosolischen Konzentrationen fast gleich). Dies führte zu einem erweiterten *Shuttling*-Modell*:

Neu synthetisiertes FRQ wird relativ langsam in den Kern importiert und erfährt dort eine Modifikation (oder mehrere), die einen erneuten Kernimport erschwert bzw. verhindert (wahrscheinlich Maskierung des NLS; der genaue Mechanismus bleibt offen, wenngleich Phosphorylierungen vermutlich beteiligt sind). Nach dem Export verbleibt dieses maturierte FRQ im Cytosol, bis es abgebaut wird. Denkbar ist auch, dass nicht jedes FRQ-Molekül beim ersten Kernimport obligatorisch

* Das Modell ist natürlich nicht das einzig denkbare, bedarf aber nur wenig neuer Annahmen und putativer Komponenten, daher soll es als Ausgangspunkt für weitere Experimente dienen, die es untermauern, erweitern oder widerlegen können.

modifiziert wird, sondern nur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit, so dass einige *Shuttling*-Zyklen stattfinden können, bevor die Maturation das Molekül aus dem dynamischen Gleichgewicht entfernt; die beiden Varianten sind mit den gezeigten Daten nicht unterscheidbar). Verkürzte FRQ-Formen maturieren schwächer oder langsamer, so dass sie netto stärker im Zellkern vertreten sind.

Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sind insgesamte deutliche Indizien für ein *Shuttling* von FRQ, beweisen dies aber nicht. Zwei Ansätze könnten direkte Nachweise liefern:

1. Fluoreszierendes (GFP-markiertes) FRQ wird exprimiert und die Population in einem Zellkern durch einen starken Laserpuls gebleicht (Zerstörung des Fluorophors). Im Falle von *Shuttling* steigt das Fluoreszenzsignal im Kern recht schnell wieder an, weil gebleichtes nukleäres und nicht-gebleichtes cytosolisches FRQ gegeneinander ausgetauscht werden können (*fluorescence recovery after bleaching*, FRAB). Bisher konnte noch kein GFP-markiertes FRQ fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

2. FRQ wird mit einer Markierung versehen, die spezifisch im Zellkern modifiziert wird. Wenn modifiziertes FRQ auch im Cytosol nachgewiesen werden kann, ist dies ein Beweis, dass FRQ nach Import in den Kern wieder exportiert worden ist* (ob dieser Prozess auch mehrmals möglich ist, kann dieses Experiment nicht auflösen). Zu diesem Zweck wurde eine kurze Sequenz aus dem N-Terminus von Histon 3A in die *Sph* I-Restriktionsschnittstelle des FRQ-Leserahmens eingefügt. Diese Sequenz (*histone tail*) wird im Zellkern an einem Lysinrest methyliert (ein- bis dreifach). Es sind Antikörper kommerziell verfügbar, mit denen die methylierte Sequenz spezifisch immunologisch nachgewiesen werden kann. Markiertes FRQ (weder aus Cytosol noch aus Zellkernen) wurde von keinem der Antikörper detektiert (Daten nicht gezeigt).

4.4 Affinitätsaufreinigung von FRQ

Die Zielsetzung war, FRQ in ausreichender Menge und Reinheit zu erhalten, um massenspektrometrisch Phosphorylierungsstellen und Bindungspartner identifizieren zu können. Daneben sollte FRQ für *in vitro*-Versuche und die Antikörperproduktion in voller Länge rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden. Dazu wurden verschiedene affinitätschromatographische Verfahren an *N. crassa* und *E. coli* getestet.

* Da *Neurospora* eine geschlossene Mitose ausführt (die Kernmembran wird nicht aufgelöst), kann auch während der Mitose kein modifziertes FRQ an der Exportmaschinerie vorbei aus dem Zellkern entweichen.

Mit einer C-terminalen TAP-Markierung fusioniertes FRQ aus *Neurospora* wurde nicht in nennenswerter Menge durch immobilisiertes IgG gebunden. Allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, dass wirklich eine vollständige TAP-Markierung exprimiert wurde, weil eine direkte Immundetektion des Protein A-Anteils nicht möglich war. Angesichts der Beobachtung, dass TAP-Markierungen häufiger verstümmelt exprimiert werden (Prof. Dr. Nikolaus Pfanner, persönliche Mitteilung), scheint es ratsam, zunächst nur eine reine Protein A-Markierung auszuprobieren. Proteine können damit in der Regel nicht nativ aufgereinigt werden (die hoch affine Protein A–IgG-Bindung erfordert drastische Elutionsbedingungen), aber massenspektrometrische Analysen von Phosphorylierungsmustern und Bindungspartnern sind prinzipiell möglich.

Des Weiteren wurden das Ni^{2+}-NTA/His_6-System und das StrepTactin/Strep-Tag II-System getestet; mit beiden kann FRQ aus *N. crassa*-Proteintotalextrakten depletiert, angereichert und partiell aufgereinigt weren. Die Anreicherung ist jedoch in beiden Fällen nicht ausreichend, um FRQ massenspektrometrisch in angefärbten SDS-Polyacrylamidgelen zu identifizieren. Histidinreiche oder Übergangsmetallionen koordinierende Proteine werden von immobilisiertem Ni^{2+} ebenfalls gebunden und treten als Kontaminationen auf. StrepTactin bindet auch biotinylierte Proteine, allerdings ist die Bindung so fest, dass diese von Desthiobiotin nicht eluiert werden und damit als Kontamination im Eluat keine wesentliche Rolle spielen dürften, jedoch begrenzen sie die Wiederverwendbarkeit der Affinitätsmatrix.

Diese Ergebnisse legen nahe, eine Doppelstrategie analog der TAP zu versuchen. Ein solches System wird bereits kommerziell für die Proteinaufreinigung aus *E. coli* vertrieben. Am günstigsten ist es, zuerst die Ni^{2+}-NTA/His_6- und danach die StrepTactin/Strep-Tag II-Affinitätschromatographie durchzuführen:

- Das Ni^{2+}/His_6-System ist kompatibel mit hohen Konzentrationen kationischer, nichtionischer und z. T. zwitterionischer Detergentien (und großen Ionenstärken), so dass stringente Binde- und Waschbedingungen gewählt werden können, um unspezifische Bindung z. B. durch hydrophobe Wechselwirkung zu minimieren. Selbst denaturierende Aufreinigung in Gegenwart von Chaotropen ist möglich, nur können dann natürlich keine Bindungspartner des Zielproteins mehr erhalten werden, und die Elution in einem StrepTactin-kompatiblen Puffer (geringere Chaotrop-Konzentration) muss ohne Aggregation möglich sein.

- Proteine, die auch ohne His_6-Epitopmarkierung an immobilisierte Ni^{2+}-Ionen binden, werden mit großer Wahrscheinlichkeit im nachfolgenden Reinigungsschritt entfernt; umgekehrt binden die biotinylierten Proteine sehr wahrscheinlich nicht an Ni-NTA.

- Die Puffersysteme sind kompatibel, d. h. das Eluat der Ni-NTA-Matrix kann meist ohne Pufferwechsel (<250 mM Imidazol) direkt auf eine StrepTactin-Matrix appliziert werden.

- Der Elutionspuffer des StrepTactin-Systems ist im Wesentlichen ein biologischer Standard-Puffer, der ggf. besonderen Erfordernissen angepasst werden kann (physiologischer pH-Wert, keine hohe Imidazolkonzentration, daher ist für viele nachfolgende Anwendungen ein Pufferwechsel nicht nötig).

Die ungewollte Aufreinigung unspezifisch bindender Proteine lässt sich ggf. noch weiter reduzieren, wenn für beide Chromatographieschritte unterschiedliche Trägermaterialien verwendet werden (immobilisiertes StrepTactin ist auf verschiedenen Trägermaterialien erhältlich).

GST-markiertes FRQ wurde in *E. coli* BL21 in hoher Ausbeute als lösliches Protein exprimiert und durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion partiell aufgereinigt. Obwohl ca. 75 % des GST-FRQ von der Affinitätsmatrix gebunden wurde, konnte nur ein kleiner Bruchteil wieder eluiert werden, der zudem mit vergleichsweise großen Anteilen anderer Proteine verunreinigt war. Weil GST *in vivo* als Dimer vorliegt und auch FRQ in *Neurospora* oligomerisiert, ist die Gefahr groß, dass das Fusionsprotein bei den hohen lokalen Konzentrationen, die während der Elution herrschen, aggregiert und deshalb größtenteils in der Säulenmatrix stecken bleibt. Evtl. lassen sich die Elutionsbedingungen noch optimieren, und Veränderungen des Binde- und Waschpuffers könnten Verunreinigungen zurückdrängen. Wenn sich die Ausbeute signifikant steigern lässt, kann das Produkt durch andere Verfahren (z. B. Gelfiltration) weiter aufgereinigt werden. Um GST als Ursache für Aggregation auszuschließen, sollten alternativ die in *N. crassa* erfolgreich verwendeten Systeme Ni^{2+}-NTA/His_6 und StrepTactin/Strep-Tag II auch mit rekombinant in *E. coli* exprimiertem FRQ getestet werden. In *Neurospora* exprimiertes GST-FRQ konnte dagegen bisher nicht an immobilisiertes Glutathion gebunden werden (Daten nicht gezeigt).

4.5 pFH-Vektoren

Mit der pFH-Serie wurde ein Satz von *Neurospora*-Transformationsvektoren für die *his-3*-Komplementation geschaffen, der verschiedene Promotoren mit einem Translationsterminator kombiniert. Um einen Expressionsvektor für ein Protein zu erhalten, muss nur dessen Leserahmen zusammen mit einer Translationsinitiationssequenz (z. B. durch PCR aus cDNA amplifiziert) inseriert werden.

Es wurde darauf Wert gelegt, möglichst viele Restriktionsschnittstellen des Polylinkers in allen Vektoren für Insertionen zur Verfügung zu haben (d. h. durch Einfügen von Promotor und Terminator sollten möglichst keine Schnittstellen für spätere Klonierungen verloren gehen, was mit der verwendeten Klonierungsstrategie gewährleistet wurde; diese kann auf andere Basisvektoren mit gleichem Polylinker, wie z. B. pBC-hygro, direkt übertragen werden). Dies erleichtert einerseits die Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme für die Klonierung des Leserahmens, andererseits lässt sich

dieser meist mit den gleichen Restriktionsenzymen von einem pFH-Vektor in einen anderen subklonieren; eine erneute PCR ist nicht erforderlich.

Die Vektor-Serie kann um zusätzliche Promotoren erweitert werden; ein Vektor nur mit Transkriptionsterminator ist verfügbar. Als Verbesserungsmöglichkeiten kommen in Betracht:

- Erweiterung des Polylinkers um seltene Restriktionsschnittstellen (z. B. *Nsi* I, *Asc* I, *Pac* I, *Sbf* I)
- Einführung einer seltenen Restiktionsschnittstelle, die effizient geschnitten wird, (z. B. *Swa* I), um das Linearisieren der Vektoren vor der Transformation zu erleichtern
- Insertion von Translationsinitiationssequenz und/oder Epitopmarkierungen
- Verwendung eines Rekombinase-Systems, das den einfachen Transfer von Insertionen zwischen den Vektoren erlaubt

Ein wichtiges Ziel ist es, die Komplementation anderer auxotropher Mutanten als Selektionsmarker in *N. crassa* zu etablieren und geeignete Transformationsvektoren zu konstruieren, damit die mehrfache Transformation eines Stammes möglich ist. Gegenüber der Einführung von Resistenzgenen bietet die Auxotrophie-Komplementation folgende Vorteile:

- Bei jeder Transformation entstehen in der Regel zunächst Heterokarya, weil nicht alle Zellkerne eines Makrokonidiums transformiert werden. Ist die Integration für das Wachstum nachteilig, entsteht ein Selektionsdruck, die transformierten Zellkerne zu eliminieren. Daher muss so lange auf den ursprünglichen Marker selektiert werden, bis homokaryonte Klone isoliert worden sind. Dies ist bei der Komplementation von Auxotrophien einfach und preiswert möglich, weil *Neurospora* standardmäßig auf Minimalmedien herangezogen wird. Sollen Experimente mit heterokaryonten Stämmen durchgeführt werden, so sind diese auch im größeren Maßstab erschwinglich, weil keine teuren Xenobiotika zugesetzt werden müssen.
- Die Integration ins Genom erfolgt durch homologe Rekombination an einem vorher bestimmten Lokus, daher sind Positionseffekte ausgeschlossen und die Rekombinationsfrequenz pro Kern ist auf ein Mal festgelegt [*].
- Viele Xenobiotika sind in *Neurospora* unwirksam, vermutlich weil sie durch effiziente MDR-(*multiple drug resistance*-) homologe Transporter [179] aus den Zellen entfernt werden. Zwar sind Stämme verfügbar, in denen die betreffenden Gene deletiert wurden, es scheint aber wenig sinnvoll, diese heranzuziehen, nur um einen weiteren Selektionsmarker verwenden zu können

[*] einzige Ausnahme wäre, wenn zusätzlich zur homologen Rekombination noch ektopische Integration stattfände, was aber angesichts der relativ geringen Rekombinationshäufigkeit nur selten vorkommen dürfte.

(der Vorteil gegenüber Auxotrophiekomplementation, keine neuen Stämme etablieren zu müssen, wäre dahin, und die Deletionsstämme weisen evtl. weitere – unerwünschte – Merkmale auf).

Nachteilig ist, dass jeder gewünschte Zielstamm vor der Transformation die betreffende(n) Mutation(en) tragen muss. Entweder muss schon zu Beginn eines Experiments klar sein, wie viele verschiedene Transformationsschritte nötig sein werden, und auf dieser Grundlage ein Ausgangsstamm gewählt werden (z. B. *bd* oder *frq*^{10} *bd* mit einer entsprechenden Anzahl von Auxotrophie-Mutationen), oder ein bereits bestehender Stamm muss erst durch Kreuzung die gewünschte(n) Auxotrophie-Mutation(en) erwerben, was einerseits zeitaufwändig, andererseits manchmal riskant oder unmöglich ist, wenn z. B. zwei Kopien eines Gens im Genom vorhanden sind, die beim Kreuzen durch RIP (*repeat induced point mutations*)* mutiert werden können.

* Genduplikationen im haploiden Genom, die etwa 1 kbp oder länger sind, werden im sexuellen Lebenszyklus während der Mitosen vor der Kernverschmelzung (s. Abb. 1 auf Seite 5) häufig in beiden Kopien stark mutiert (hauptsächlich CG→TA-Transitionen) und auch C-methyliert, abhängig vom Grad der Übereinstimmung und dem Abstand der Kopien im Genom; Tandem-Wiederholungen sind besonders anfällig.

A Materialien und Geräte

A.1 Stämme und Genotypen

A.1.1 *N. crassa*

bd	FGSC
bd his-3	FGSC
bd BM60 *Cla* I-Fr. (1–383) GFP	C. Querfurth [134]
bd BM61 qa-2 FRQ-His_6	M. Görl [136] / diese Arbeit
bd FH64 FRH-$Flag_2$	diese Arbeit
bd frq^9	FGSC [180]
bd frq^9 BM60 *Cla* I-Fr.	M. Görl [136]
bd frq^{10}	FGSC [21]
bd frq^{10} *his-3*	FGSC
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. Strep II	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP–CLD	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP Stop	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP–GFP	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. (1–383) GFP	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 384–717::GFP	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 581 FS	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. Δ584–677	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 623 Stop	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 678 Stop	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 686 Stop	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 701 Stop	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 716 Stop	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 751 Stop	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 791 Stop	diese Arbeit
bd frq^{10} BM60 *Cla* I-Fr. 916 Stop	diese Arbeit
bd frq^{10} BM61 qa-2 FRQ-His_6	M. Görl [136]
bd frq^{10} BM61 qa-2 FRQ-TAP	diese Arbeit
bd frq^{10} FH64 SV40-NLS–sGFP–Flag	diese Arbeit
bd frq^{10} FH64 2xSV40-NLS–sGFP–2xFlag	diese Arbeit
bd frq^{10} FH64 FRQ-NLS–sGFP–2xFlag	diese Arbeit
bd frq^{10} FH64 2xFlag–sGFP–2xSV40-NLS	diese Arbeit

A.1.2 *E. coli*

XL1-blue	*rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *sup*E44 *rel*A1 *lac hsd*R17 [F´ *pro*AB *lac*I^{q}ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]
XL10	*rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *sup*E44 *rel*A1 *lac* Hte Δ(*mcr*A)183 Δ(*mcr*CB-*hsd*SMR-*mrr*)173 [F´ *pro*AB *lac*I^{q}ZΔM15 Tn10 (Tet^R) *Amy* Cam^R]
DH5α	F$^-$ ϕ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_k^-, m_k^+) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ$^-$
DH5α-T1^R	F$^-$ ϕ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *deo*R *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_k^-, m_k^+) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ$^-$ *ton*A
BL21	F$^-$ *omp*T *hsd*S(r^-_B m^-_B) *gal dcm*

A.2 Plasmide

pBS II *Cla* I-Fr.	[124]
pBS FRQ *Sal* I–*Xba* I	M. Görl [136]
pBS1479	AG Hurt, BZH [123]
pGEX 4T3	GE Healthcare
pGEX 4T3 FRQ	diese Arbeit
pMAL-cRI	NEB
pMF272	[122]
pBM60	[175]
pBM60 *Cla* I-Fr.	M. Görl [136]
pBM60 *Cla* I-Fr. Strep II	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP–CLD	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP Stop	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. SV40-NLS_2–MBP–GFP	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. (1–383) GFP	C. Querfurth [134]
pBM60 *Cla* I-Fr. 384–717::GFP	C. Querfurth [134]
pBM60 *Cla* I-Fr. Δ584–677	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. 581 FS	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. 623 Stop	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. 678 Stop	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. 686 Stop	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. 701 Stop	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. 716 Stop	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. 751 Stop	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. 791 Stop	diese Arbeit
pBM60 *Cla* I-Fr. 916 Stop	diese Arbeit
pBM61 qa-2 FRQ-His_6	M. Görl [136]
pBM61 qa-2 FRQ-TAP	diese Arbeit
pFH64 FRH-$Flag_2$	diese Arbeit
pFH64 FRQ-NLS–sGFP–2xFlag	diese Arbeit

pFH64 SV40-NLS–sGFP–2xFlag	diese Arbeit
pFH64 2xSV40-NLS–sGFP–2xFlag	diese Arbeit
pFH64 2xFlag–sGFP–2xSV40-NLS	diese Arbeit
pFH62	diese Arbeit
pFH64	diese Arbeit
pFH66	diese Arbeit
pFH68	diese Arbeit
pFH70	diese Arbeit
pFH72	diese Arbeit

A.3 Oligonukleotide

Alle Nukleotidsequenzen sind in 5'→3'-Richtung angegeben, Restriktionsschnittstellen sind hervorgehoben. Die lyophilisierten Oligonukleotide (Thermo Electron, Ulm, und Sigma-Genosys, Steinheim) wurden in H_2O aufgenommen (50 μM) und bei –20 °C gelagert.

A.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

FRQ Bcl Mun Nco F	TTTT**TGATCACAATTG**G**CCATGG**CGGATAGTGGGGAT
FRQ TAA Xba Not Nsi R	CCCC**ATGCATGCGGCCGCTCTAGA**TTACGAGGATGAGACGTCCTC
Spe AatII frq 3' Nco TAP F	CCCC**ACTAGT**GACGTCTCATCCTCGGCCA**CCATGG**AAAAGAGAAG-ATGGAAAAAG
TAP EcoRV TAA Xba R	CCCC**TCTAGA**TTA**GATATC**GGTTGACTTCCCCGCGGAA
SV40-NLS sGFP Hind F	CCCC**AAGCTT**CACCATGGCCCCCAAGAAAAAGCGCAAGGTAGAAG-TGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
2xSV40-NLS sGFP Hind F	CCCC**AAGCTT**CACCATGGCCCCCAAGAAAAAGCGCAAGGTAGAAC-CTAAAAAGAAGAGGAAGGTCGAGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
FRQ-NLS sGFP Hind F	CCCC**AAGCTT**CACCATGGCCTTACCTAGAAGAAAGAAACGTGAGT-TGGAGGCAACGCTCCGGCACTTTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
sGFP 2xFlag Asc TAA Xma R	TTTT**CCCGGG**TTAA**GGCGCGCC**CTTATCGTCGTCATCCTTGTAAT-CTTTGTCATCATCGTCTTTATAGTCGGCCTTGTACAGCTCGTCCA-TGCC
Xma ATG Asc 2xFlag sGFP F	CCCC**CCCGGG**CACCATG**GGCGCGCC**TGACTATAAAGACGATGATG-ACAAAGATTACAAGGATGACGACGATAAGGCCGTGAGCAAGGGCG-AGGAGCTG
sGFP 2xSV40 TAA XbaI R	TTTT**TCTAGA**TTACTCGACCTTCCTCTTCTTTTTAGGTTCCACTT-TGCGCTTTTTCTTGGGGGCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
MBP BamHI NsiI F	CCCC**GGATCC**GCC**ATGCAT**ACTGAAGAAGGTAAACTGGTAATC
MBP Stop PacI HindIII R	CCCC**AAGCTTAATTAA**GTCTGCGCGTCTTTCAG
MBP PacI HindIII R	CCCC**AAGCTTAATTAA**AGTCTGCGCGTCTTTCAG
sGFP Pac Hind R	GGGG**AAGCTTAATTAA**CTTGTACAGCTCGTCCATGCC
sGFP Pac Nsi F	GGGG**TTAATTAA**G**ATGCAT**GTGAGCAAGGGCGAGGAG

sGFP Stop Sfi Pac R	GGGG**TTAATTAAGGCC**ACGCG**GGCC**TCACTTGTACAGCTCGTCCA-TGCC
FRH EcoRI Nco F	CCCC**GAATTC**CA**CCATGG**ACGACCTCTTTGAGGTTTTCG
FRH 2xFlag TAA Xba R	CCCC**TCTAGA**TTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTTTGTCAT-CATCGTCTTTATAGTCCAGATACAGACTGTTGAAAGAAACAATGTC
cpc1 NotI F	TTTT**GCGGCCGC**TCCGTCTCCATTGGCTCTTGGC
cpc1 Bsp120I R	TTTT**GAATTCGGGCCCC**TTGTTGCCCTGCTTTCCGTG
qa2 NotI F	TTTT**GCGGCCGC**TAGAGTCCTTGACAAGCAGTCGC
qa2 Bsp120I R	TTTT**GAATTCGGGCCC**TGTGTTTGGTACCTCTGGTTGGG
Pccg-1 NotI F	CCCC**GCGGCCGC**TAGAAGGAGCAGTCCATCTGCG
Pccg-1 Bsp120I R	CCCC**GGGCCC**TTTGGTTGATGTGAGGGGTTGTG
Ptub NotI F	CCCC**GCGGCCGC**TCGACAGGGGGCCTTCCAC
PtubL NotI F	CCCC**GCGGCCGC**ATTTGCAGGTCGGGCTCAAC
Ptub ApaI R	CCCC**GGGCCC**TTGACGGTTTGGTGATGACGAAC
TtrpC NotI F	AAAA**GCGGCCGC**ATGTCAACAAGAATAAAACGCGTTTC
TtrpC Bsp120I R	AAAA**GGGCCC**TCTAGCTAGAAAGAAGGATTACC

A.3.2 *In vitro*-Mutagenese

pBM60 Delta HindIII mut F	CTATAGAACTCGAGCAGCTAGAGCTTGCCATCTCCACC
pBM60 Delta HindIII mut R	GGTGGAGATGGCAAGCTCTAGCTGCTCGAGTTCTATAG
frq ATG#3 NsiI mut F	GACGAGAGCCATATC**ATGCAT**GTCGATCCTCCTTTTTATCAAAAGG
frq ATG#3 NsiI mut R	CCTTTTGATAAAAAGGAGGATCGAC**ATGCAT**GATATGGCTCTCGTC
frq9 Stop PacI mut F	GGCTCAGAGGATGCTGTCGATGAGAGCTAA**TTAATTAA**CTCGAAG-TGGGATTTTAGCGGATCG
frq9 Stop PacI mut R	CGATCCGCTAAAATCCCACTTCGAG**TTAATTAA**TTAGCTCTCATC-GACAGCATCCTCTGAGCC
frq9 SphI mut2 F	GGCGATATGTCGCCAACATAAC**GCATGC**CGGCCGGCCGCGAGGTCG
frq9 SphI mut2 R	CGACCTCGCGGCCGGCCG**GCATGC**GTTATGTTGGCGACATATCGCC
FRQ 686 Stop mut F	CGAAGGATCCGGATCTTGAGATGAAGTTGAACATGTGC
FRQ 686 Stop mut R	GCACATGTTCAACTTCATCTCAAGATCCGGATCCTTCG
FRQ 701 Stop mut F	GACGTTGTCTGGATCGTGACTTCCTATTAGGCCGC
FRQ 701 Stop mut R	GCGGCCTAATAGGAAGTCACGATCCAGACAACGTC
FRQ Sfi Stop mut F	GCCCGCGTGGCCTAGGTGTTGGATTTCG
FRQ Sfi Stop mut F	CGAAATCCAACACCTAGGCCACGCGGGC
FRQ Nco Bam Stop mut F	CGA**GGATCC**TGCCTAGGTTCGGATTCAGC
FRQ Nco Bam Stop mut F	GCTGAATCCGAACCTAGGCA**GGATCC**TCG
CLD Stop PEST2 F2	GTCAGACCTATCCTGTAGCGGCAGTTGTCAC
CLD Stop PEST2 F2	GTGACAACTGCCGCTACAGGATAGGTCTGAC
CLD PEST2 Stop F2	GCGTTCGATACCTAGACTGATGTGCGGATG
CLD PEST2 Stop R2	CATCCGCACATCAGTCTAGGTATCGAACGC
FRQ D584-677 AscI mut F	GGGAGGTTCGGTCCCTCAAGG**GGCGCGCC**CCGCGAGGTCGAAGGA-TCCGG

FRQ D584-677 AscI mut R	CCGGATCCTTCGACCTCGCGG**GGCGCGCC**CCTTGAGGGACCGAAC-CTCCC

FRQ-Trunkierungen

Position Stopp-Kodon	Mutagenese-Oligonukleotide
623	frq9 Stop PacI mut F/R
662	(*frq*^{9})
678	frq9 SphI mut2 F/R
686	FRQ 686 Stop mut F/R
701	FRQ 701 Stop mut F/R
716	FRQ Sfi Stop mut F/R
751	FRQ Nco Bam Stop mut F/R
791	CLD Stop PEST2 F2 F/R
916	CLD PEST2 Stop R2 F/R
Δ584–677	FRQ D584-677 AscI mut F/R

Sequenz der FS 581-Mutation

Die Mutation FRQ FS 581 (Leserasterverschiebung durch Insertion eines zusätzlichen G) entstand zufällig bei der *in vitro*-Mutagenese zu FRQ Δ584–677. Nachfolgend ist ein Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen im Bereich der Mutation gezeigt:

```
            G  R  F  G  S  L  K  G  R  A  P  R  G  R  R  I  R  I  W  .
FS 581      GGGAGGTTCGG**G**TCCCTCAAGGGGCGCGCCCCGCGAGGTCGAAGGATCCGGATCTGGTGAT
Δ584–677    GGGAGGTTCGG_TCCCTCAAGGGGCGCGCCCCGCGAGGTCGAAGGATCCGGATCTGGTGAT
            G  R  F  G   P  S  R  G  A  P  R  E  V  E  G  S  G  S  G  D
```

A.3.3 Direkte Insertion

SV40 SphI sense	CCCAAGAAAAAGCGCAA**GGTACC**TAAAAAGAAGAGGAAGGTCATG
SV40 SphI antisense	ACCTTCCTCTTCTTTTTA**GGTACC**TTGCGCTTTTTCTTGGGCATG
Strep II SphI F	CAGTGGTCCCACCCGCAGTTCGAGAAGGGATCCATG
Strep II SphI R	GATCCCTTCTCGAACTGCGGGTGGGACCACTGCATG

A.3.4 Sequenzierung

T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
Pcpc1 seq 3' F	GCAGCGCCCTCCTGTTCC
TtrpC seq 5' R	GCATTAATGCATTGCAGATGAGC

A.4 Medien

A.4.1 *N. crassa*

50× Vogels Medium N [181]
123,5 g Natriumcitrat·2 H_2O
250 g KH_2PO_4
100 g NH_4NO_3
10 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$
5 g $CaCl_2 \cdot H_2O$
5 ml Spurenelemente-Lösung
2,5 ml Biotin-Lösung (0,1 mg/ml in 50 % (v/v) Ethanol)
ad 1 l H_2O

Spurenelemente-Lösung
5 g Zitronensäure·H_2O
5 g $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$
1 g $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6\,H_2O$
0,25 g $CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$
50 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$
50 mg H_3BO_3
50 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$
ad 100 ml H_2O

***Neurospora*-Standardmedium**
1× Vogels Medium N
2 % (w/v) Glucose
0,6 % (w/v) Arginin·HCl
für Festmedium:
2 % (w/v) Agar

Chinasäure-Induktionsmedium
1× Vogels Medium N
0,1 % (w/v) Glucose
0,2 % (w/v) Arginin·HCl
0,3 % (w/v) Chinasäure (aus 30 % (w/v) pH 5,0–6,0)

***Race tube*-Medium**
1× Vogels Medium N
0,3 % (w/v) Glucose
0,6 % (w/v) Arginin·HCl
2 % (w/v) Agar

Bodenagar
10 ml 50× Vogels Medium N
7,5 g Agar
ad 450 ml H_2O

Deckagar
10 ml 50× Vogels Medium N
91 g Sorbit
14 g Agar
ad 450 ml H_2O

10×FIGS
20 % (w/v) Sorbose
0,5 % (w/v) Glukose
0,5 % (w/v) Fruktose
autoklavieren

autoklavieren, nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C jeweils mit 50 ml 10×FIGS supplementieren

A.4.2 *E. coli*

LB-Medium
1 % (w/v) Bacto-Pepton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl
1,5 % (w/v) Agar (für Festmedien)
pH 7,0 mit NaOH einstellen
autoklavieren

NZY⁺-Medium
1 % (w/v) N-Z-Amin®(Caseinhydrolysat)
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
pH 7,5 mit NaOH einstellen
autoklavieren, 25 mM $MgSO_4$
und 20 mM Glukose zufügen

SOB-Medium
2 % (w/v) Trypton-Pepton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,05 % (w/v) NaCl
2,5 mM KCl
pH 7,0 mit NaOH einstellen
autoklavieren
10 mM $MgCl_2$ zufügen

SOC-Medium
2 % (w/v) Trypton-Pepton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,05 % (w/v) NaCl
2,5 mM KCl
pH 7,0 mit NaOH einstellen
autoklavieren, 10 mM $MgCl_2$
und 20 mM Glukose zufügen

Laktose-Autoinduktionsmedium
1 % (w/v) N-Z-Amin®/ Trypton-Pepton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
25 mM Na_2HPO_4
25 mM KH_2PO_4
25 mM $(NH_4)_2SO_4$
1 mM $MgSO_4$
0,5 % (v/v) Glyzerin
0,22 % (w/v) Laktose·H_2O
0,06 % (w/v) Glukose·H_2O

A.5 Puffer und Lösungen

A.5.1 Proteinbiochemie

IMAC-Lysepuffer
50 mM NaH_2PO_4
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
ad pH 8,0 mit NaOH

IMAC-Waschpuffer
50 mM NaH_2PO_4
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
ad pH 8,0 mit NaOH

IMAC-Elutionspuffer
50 mM H_3PO_4
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
ad pH 8,0 mit NaOH

Puffer W
100 mM Tris·HCl pH 8,0
150 mM NaCl
1 mM Na_2EDTA

Puffer E
100 mM Tris·HCl pH 8,0
150 mM NaCl
1 mM Na_2EDTA
2,5 mM Desthiobiotin

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
20 mM KH_2PO_4·KOH pH 7,4
140 mM NaCl

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)
10 mM Tris·HCl pH 7,4
140 mM NaCl

Proteinextraktionspuffer
50 mM HEPES·KOH pH 7,4
140 mM NaCl
5 mM Na_2EDTA
10 % (v/v) Glyzerin

Dephosphorylierungspuffer
50 mM Tris·HCl pH 8,5
150 mM NaCl
10 % (v/v) Glyzerin

Gelfiltrationspuffer
25 mM HEPES·KOH pH 7,4
140 mM NaCl
1 mM Na_2EDTA pH 8,0
1 % (v/v) Glyzerin
0,05 % (v/v) Triton X-100

Glutathion-Elutionspuffer
50 mM Tris
20 mM Glutathion
pH 8,0

A.5.2 Zellfraktionierung

Puffer A
1 M Sorbit
7 % (w/v) Ficoll 400
20 % (v/v) Glyzerin
50 mM Tris·HCl pH 7,5
5 mM $Mg(CH_3COO)_2$
5 mM Na_2EDTA
5 mM Na_2EGTA
3 mM $CaCl_2$
3 mM DTT

Puffer B
10 % (v/v) Glyzerin
25 mM Tris·HCl pH 7,5
5 mM $Mg(CH_3COO)_2$
5 mM EDTA

Stufengradient
1 M Saccharose
10 % (v/v) Glyzerin
25 mM Tris·HCl pH 7,5
5 mM $Mg(CH_3COO)_2$
1 mM DTT

Aufbewahrungspuffer für Zellkerne
25 % (v/v) Glycerin
25 mM Tris·HCl pH 7,5
5 mM $Mg(CH_3COO)_2$
0,1 mM EDTA
3 mM DTT

A.5.3 Kompetente *E. coli*

Transformationspuffer [129]
10 mM PIPES·KOH pH 6,7
250 mM KCl
55 mM $MnCl_2$
15 mM $CaCl_2$
steril filtrieren

A.5.4 DNA-Präparation

Lösung 1
50 mM Glucose
25 mM Tris·HCl pH 8,0
10 mM Na-EDTA pH 8,0
0,1 mg/ml RNase A

Lösung 2
0,2 M NaOH
1 % (w/v) SDS

Lösung 3
3 M KCH_3COO
2 M CH_3COOH
pH 4,9 (nicht einstellen)

2×CTAB-Puffer
2 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
0,1 M Tris·HCl pH 7,5
1,4 M NaCl
20 mM EDTA
1 % (w/v) $NaHSO_3$ (unmittelbar vor Gebrauch zugeben)

A.5.5 Gelelektrophorese und Elektrotransfer

SDS-PAGE Trenngel
6–18 % (w/v) Acrylamid
0,08–0,25 % (w/v) N,N'-Methylen-bis(acrylamid)
0,25 M Tris·HCl pH 8,8
0,1 % (w/v) Natriumlaurylsulfat

SDS-PAGE Bodengel
15 % (w/v) Acrylamid
0,1 % (w/v) N,N'-Methylen-bis(acrylamid)
0,25 M Tris·HCl pH 8,8
0,1 % (w/v) Natriumlaurylsulfat

SDS-PAGE Sammelgel
5 % (w/v) Acrylamid
0,085 % (w/v) N,N'-Methylen-bis(acrylamid)
60 mM Tris·HCl pH 6,8
0,1 % (w/v) Natriumlaurylsulfat

SDS-PAGE Elektrophoresepuffer
50 mM Tris
384 mM Glyzin
0,1 % (w/v) SDS
pH 8,5 (nicht einstellen!)

4× SDS-PAGE Auftragspuffer
240 mM Tris·HCl pH 6,8
8 % (w/v) SDS
40 % (v/v) Glyzerin
20 % (v/v) β-Mercaptoethanol
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Elektrotransferpuffer
20 mM Tris
150 mM Glyzin
20 % (v/v) Methanol
0,08 % (w/v) SDS
pH 8,5 (nicht einstellen!)

Ponçeau S-Färbelösung
3 % (w/v) Trichloressigsäure
0,2 % (w/v) Ponçeau S

Luminol-Reagenz
100 ml 0,1 M Tris·HCl pH 8,5
0,5 ml 44 mg/ml Luminol in DMSO
0,22 ml 15 mg/ml Cumarinsäure in DMSO

unmittelbar vor Gebrauch zusetzen:
pro 5 ml: 3 µl 30 % H_2O_2

Coomassie-Färbelösung
40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) CH_3COOH
0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250

Coomassie-Entfärbelösung
40 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) CH_3COOH

TAE-Puffer
40 mM Tris·CH_3COOH pH 7,6
1 mM EDTA

6× DNA-Auftragspuffer
6 mM Na-EDTA pH 8,0
30 % (v/v) Glyzerin
0,06 % (w/v) Bromphenolblau
0,06 % (w/v) Xylencyanol FF

A.6 Proteaseinhibitoren

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	200 mM	2-Propanol
Leupeptin	1 mg/ml	H_2O
Pepstatin A	1 mg/ml	Methanol
EDTA	0,5 M	H_2O, pH 8,0 mit NaOH

A.7 Enzyme

A.7.1 Restriktionsendonukleasen

*Bsp*120 I	ER0131	Fermentas, Burlington/Kanada
*Eco*R I	R0101	New England Biolabs, Beverly/USA
Not I	R0189	New England Biolabs, Beverly/USA
Nsi I	R0127	New England Biolabs, Beverly/USA
Pac I	R0547	New England Biolabs, Beverly/USA
Sfi I	R0123	New England Biolabs, Beverly/USA
Sph I	11 026 950 001	Roche Diagnostics, Basel/Schweiz
Xba I	R0145	New England Biolabs, Beverly/USA
Xma I	R0180	New England Biolabs, Beverly/USA

A.7.2 Sonstige

Pfu DNA Polymerase	2,5 U/µl	EP0501	Fermentas, Burlington/Kanada
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	EP0401	Fermentas, Burlington/Kanada
Phusion™ DNA Polymerase	2 U/µl	F-530	Finnzymes, Espoo/Finnland
T4 DNA Ligase	1 U/µl	EL0015	Fermentas, Burlington/Kanada
alkalische Phosphatase (CIAP)	10 U/µl	M0290	New England Biolabs, Beverly/USA
RNase A	90 U/mg	A3832	AppliChem, Darmstadt
Benzonase	50 U/µl	1.01694	Merck, Darmstadt
Proteinase K	20 mg/ml	P8102	New England Biolabs, Beverly/USA
Trypsin (lyophilisiert)	221 U/mg	TRL 37C662	Worthington, Freehold/USA

A.8 Antikörper

monokl. Maus αStrep-Tag II		2-1508-025	IBA, Göttingen
monokl. Maus αFLAG® M2	1:2 000	F-3165	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
monokl. Maus αHis$_5$	1:3000	34660	Qiagen, Hilden
monokl. Maus αFRQ (3G11)	1:10	M. Görl [136]	AG Brunner, BZH
polykl. Kaninchen αFRQ Mitte	1:200	C. Querfurth [134]	AG Brunner, BZH
polykl. Kaninchen αFRQ C-Terminus	1:300	A. Diernfellner [89]	AG Brunner, BZH
polykl. Kaninchen αCK-1a	1:250	M. Görl [136]	AG Brunner, BZH
polykl. Kaninchen αWC-1	1:500	M. Görl [136]	AG Brunner, BZH
Konjugate mit Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP):			
polykl. Ziege αKaninchen-IgG	1:10 000	170-6515	Bio-Rad, Hercules/USA
polykl. Ziege αMaus-IgG	1:5 000	170-6516	Bio-Rad, Hercules/USA

A.9 Sonstige Proteine

Proteinstandard I	Rinder-γ-Globulin	500-0005	Bio-Rad, Hercules/USA
RNasin® (rekombinant)	Plazenta-RNase-Inhibitor	N251	Promega, Madison/USA

A.10 Affinitätsmatrizes

αFLAG®-Agarose	A-2220	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Protein A-Sepharose CL-4B	17-0963	GE Healthcare Biosciences, Uppsala/Schweden
Immunglobulin G-Sepharose™ 6 FF	17-0969	GE Healthcare Biosciences, Uppsala/Schweden
Glutathion-Sepharose™4B	17-0756	GE Healthcare Biosciences, Uppsala/Schweden
Ni-NTA-Agarose	30210	Qiagen, Hilden
StrepTactin®-Sepharose™, 1 ml-Säule		Strep-Tag Starter-Kit (s. u.)

A.11 Kits

Ligation	Quick Ligation Kit	M2200	Fermentas, Burlington/Kanada
Topo TA™-Klonierung	Topo TA Cloning™ Kit	K4520	Invitrogen, Carlsbad/USA
In vitro-Mutagenese	QuikChange II XL	200522	Stratagene, La Jolla/USA
PCR	Phusion™ HF PCR Kit	F-553	Finnzymes, Espoo/Finnland
Plasmid-Minipräparation	NucleoSpin® Plasmid	740 588	Macherey-Nagel, Düren
Plasmid-Midipräparation	NucleoBond® PC 100	740 573	Macherey-Nagel, Düren
DNA-Gelextraktion	Wizard SV PCR&Gel	A9282	Promega, Madison/USA
Strep-Affinitätschromatographie	Strep-Tag-Starter Kit	2-1101-000	IBA, Göttingen

A.12 Verbrauchsmaterial

Einweg-Chromatographiesäule	Poly-Prep	731-1550	Bio-Rad, Hercules/USA
Einweg-Handschuhe	peha Soft®	942 160	Hartmann, Heidenheim
Einweg-Pipettenspitzen 10 µl		771 290	Greiner, Frickenhausen
Einweg-Pipettenspitzen 200 µl		739 290	Greiner, Frickenhausen

Einweg-Pipettenspitzen 1000 µl		740 290	Greiner, Frickenhausen
Elektroporationsküvetten 2 mm		904-002	Steinbrenner, Wiesenbach
Filterpapier, dick	GB004	10 427 9xx	Whatman, Brentford/UK
Halbmikroküvetten 1 cm	Polystyrol	67.742	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulosemembran 0,45 μm	Optitran®-BA-S 85	10 439 196	Whatman, Brentford/UK
Polypropylenröhrchen 15 ml		188 271	Greiner, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 50 ml		62.547.254	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml		72.690	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 2,0 ml		72.695	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml	„safelock“	0030 120.086	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm	Super RX		Fujifilm, Düsseldorf
Rundfilterpapier		10 300 1xx	Whatman, Brentford/UK
Ultrafiltrationsröhrchen	Centricon® YM-50	4243	Millipore, Billerica/USA
Ultrazentrifugationsgefäß 1,5 ml	Polyallomer	357448	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Ultrazentrifugenröhrchen 8 ml	Polykarbonat	355647	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Verbandmull			Hartmann, Heidenheim
Zentrifugenröhrchen 38 ml	Polyallomer	326823	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Zentrifugenröhrchen 38 ml	Polykarbonat	Sorvall 03480	Thermo-Fisher, Waltham/USA

A.13 Chemikalien

Acrylamid 30 %	A1409	AppliChem, Darmstadt
Acrylamid-Bisacrylamid 29:1, 30 %	A0852	AppliChem, Darmstadt
Agar	05040	Fluka, Buchs/Schweiz
Agarose	2267	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	A0839	AppliChem, Darmstadt
Arginin·HCl	A3709	AppliChem, Darmstadt
Biotin	1.24514	Merck, Darmstadt
Bradford-Reagenz 5×Konzentrat	500-0006	Bio-Rad, Hercules/USA
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid	A1007	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	8122	Merck, Darmstadt
$CaCl_2 \cdot H_2O$	A3587	AppliChem, Darmstadt
$CHCL_3$	7386	J. T. Baker, Phillipsburg/USA
Chinasäure	22580	Fluka, Buchs/Schweiz
Coomassie Brilliant Blue R 250	A1092	AppliChem, Darmstadt
Cetyltrimethylammoniumbromid	H-6269	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	12078	Grüssing, Filsum
p-Cumarinsäure	C9008	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Cycloheximid	A0879	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	1.02950	Merck, Darmstadt
Distamycin A	20722	Serva, Heidelberg
Dithiothreit	1008	Gerbu, Gaiberg
dNTP-Mix, je 10 mM	R0191	Fermentas, Burlington/Kanada
EDTA, diNatrium-	8043	Carl Roth, Karlsruhe
EGTA	A0878	AppliChem, Darmstadt

Essigsäure	45731	Fluka, Buchs/Schweiz
Ethanol	32205	Riedel-deHaën, Seelze
Ethidiumbromidlösung 1 %	2218	Carl Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	A2252	AppliChem, Darmstadt
Fruktose	4981	Carl Roth, Karlsruhe
Glukose·H_2O	1.08342	Merck, Darmstadt
Glutathion	A2084	AppliChem, Darmstadt
Glyzerin 87 %	A3561	AppliChem, Darmstadt
Glyzin	A1377	AppliChem, Darmstadt
H_3BO_3	0055	J. T. Baker, Phillipsburg/USA
HCl $_{(aq)}$ 37 %	1.00317	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco 212750	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
HEPES [182]	9150	Carl Roth, Karlsruhe
Histidin·HCl	A3738	AppliChem, Darmstadt
H_2O_2 30 %	1.07209	Merck, Darmstadt
Imidazol	1.04716	Merck, Darmstadt
Isoamylalkohol	1.00979	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	A1493	AppliChem, Darmstadt
KCH_3COO	12240	Grüssing, Filsum
KCl	A3582	AppliChem, Darmstadt
KH_2PO_4	0240	J. T. Baker, Phillipsburg/USA
KOH	30614	Riedel-de Haën, Seelze
Laktose·H_2O	8921	Carl Roth, Karlsruhe
Leupeptin·0,5 H_2SO_4 [183, 184, 185, 186]	A2183	AppliChem, Darmstadt
Luminol	A2185	AppliChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	8.05740	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	T145	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	1.06009	Merck, Darmstadt
$Mg(CH_3COO)_2 \cdot 4\,H_2O$	0160	J. T. Baker, Phillipsburg/USA
$MgCl_2 \cdot 6\,H_2O$	63072	Fluka, Buchs/Schweiz
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	1.05882	Merck, Darmstadt
$MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$	1.05927	Merck, Darmstadt
$MnSO_4 \cdot H_2O$	63555	Fluka, Buchs/Schweiz
NaCl	0278	J. T. Baker, Phillipsburg/USA
$Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$	A3567	AppliChem, Darmstadt
$NaHSO_3$	S-8890	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
$Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	A2193	AppliChem, Darmstadt
NaN_3	6688	Merck, Darmstadt
NaOH	1.06498	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat·2 H_2O	32320	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumdesoxycholat	30970	Fluka, Buchs/Schweiz
NH_3 $_{(aq)}$ 25 %	1.05432	Merck, Darmstadt
$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6\,H_2O$	A2312	AppliChem, Darmstadt
NH_4NO_3	10150	Grüssing, Filsum
$(NH_4)_2S_2O_8$	9592	Carl Roth, Karlsruhe
$(NH_4)_2SO_4$	2019	Gerbu, Gaiberg
N-Z-Amin®	C-7290	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA

Pepstatin A [187, 188, 189, 190, 186]	A2205	AppliChem, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid	8.21127	Merck, Darmstadt
PIPES [182]	A3495	AppliChem, Darmstadt
Ponçeau S	A1405	AppliChem, Darmstadt
2-Propanol	1.09634	Merck, Darmstadt
Saccharose	A4734	AppliChem, Darmstadt
SDS	20765	Serva, Heidelberg
Seesand, säuregewaschen	4309	Carl Roth, Karlsruhe
Sorbit	2039	J. T. Baker, Phillipsburg/USA
Sorbose	102939	MP Biomedicals, Solon/USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	A1148	AppliChem, Darmstadt
Trichloressigsäure	A5055	AppliChem, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	4855	Carl Roth, Kalrsruhe
Triton X-100	37240	Serva, Heidelberg
Trypton-Pepton (aus Casein)	Difco 211705	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
Xylencyanol FF	A1408	Merck, Darmstadt
Zitronensäure·H_2O	124910010	Acros Organics, New Jersey/USA
$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	1.08883	Merck, Darmstadt

A.14 Geräte

Agarosegelelektrophorese-Apparaturen	Eigenbau der Feinmechanik-Werkstatt des Theoretikums der Universität Heidelberg	
Chromatographiesystem	Äkta Explorer	GE Healthcare Biosciences,
Gelfiltrationssäule	Superose 6 HR10/300	Uppsala/Schweden
Elektrophorese-Netzgeräte	EPS 601, EPS 301	GE Healthcare Biosciences, Uppala/Schweden
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	Bio-Rad, Hercules/USA
	Capacitance Extender	Bio-Rad, Hercules/USA
	Pulse Controller Plus	Bio-Rad, Hercules/USA
Elektrotransfer-Apparaturen	Eigenbau der Werkstätten der Universität München	
Elektrotransfer-Netzgerät	NG 1620-BL	McVoice
Entwicklermaschine	SRX-108A	Konica Minolta
Feinwaage	BP 121 S	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationssystem	Gel Max	Intas, Göttingen
Horizontalschüttler	3015	GFL, Burgwedel
Inkubationsschüttler	Multitron	Infors HT, Bottmingen/Schweiz
Inkubator	MIR 153	Sanyo
Inkubator	BD 53	Binder, Tuttlingen
Inkubator	Heraeus B 6760	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Laborwaage	EW 600-2M	Kern, Balingen
Magnetrührer, heizbar	MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikropipetten	Pipetman® P	Gilson, Middleton/USA
pH-Meter	766 calimatic	Knick, Berlin
pH-Elektrode	SE 100	Knick, Berlin
Photometer	SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Hercules/USA

Repetierpipette	Distriman®	Gilson, Middleton/USA
Ribolyser	Fast Prep 120	MP Biomedicals, Solon/USA
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-Apparaturen, groß	Eigenbau der Feinmechanik-Werkstatt des Theoretikums der Universität Heidelberg	
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese-Apparaturen, klein	Mini-Protean 3	Bio-Rad, Hercules/USA
Thermocycler	Primus 25	MWG Biotech, Ebersberg
Thermocycler	Primus 96 advanced	Peqlab, Erlangen
Thermocycler	iCycler 170-8720	Bio-Rad Hercules/USA
Tisch-Inkubationsschüttler	Thermomixer compact 5350	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Inkubationsschüttler, kühlbar	Thermomixer comfort 5355	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Rüttler	Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Bohemia/USA
Tisch-Thermostat	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Ultrazentrifuge	Optima™ MAX	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Festwinkelrotor	TLA-55	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Festwinkelrotor	MLA-80	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Tisch-Zentrifuge	5415 D	Eppendorf, Hamburg
Festwinkelrotor	F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Zentrifuge, kühlbar	5417 R	Eppendorf, Hamburg
Festwinkelrotor	F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
Festwinkelrotor	F45-30-11	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Zentrifuge, kühlbar	Heraeus Multifuge 1 L-R	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Ausschwingrotor	Heraeus 7500 2002 G	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Trockenschrank	Heraeus T 12	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Ultraschallgenerator	Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury/USA
Ultraschallwandler	Converter 102	
Ultrazentrifuge	Sorvall WX Ultra 80	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Festwinkelrotor	Sorvall T647.5	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Festwinkelrotor	Sorvall T865	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Vakuum-Konzentrator	Savant SpeedVac® SC 110	GMI, St. Paul/USA
Wasserbad, kühlbar	Haake C 10–K 10	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Zellaufschluss *E. coli*	Microfluidizer M-110L	Microfluidics, Newton/USA
Zentrifuge, kühlbar	Avanti J-25	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Festwinkelrotor	JA-10	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Festwinkelrotor	JA-25.50	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Ausschwingrotor	JS-24.38	Beckman-Coulter, Fullerton/USA

A.15 Sonstiges

Gaschromatographiespritze 50 µl	1705 N	Hamilton, Reno/USA
Gaschromatographiespritze 250 µl	1725 N	Hamilton, Reno/USA
Gaschromatographiespritze 500 µl	1750 LTN	Hamilton, Reno/USA
Quarzküvette mikro	104.002B QS	Hellma, Mülheim
Quarzküvette ultramikro	105.201	Hellma, Mülheim
Zentrifugenbecher für JA-10	355607	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Zentrifugenröhrchen für JA-25.50	361694	Beckman-Coulter, Fullerton/USA

Zentrifugenröhrchen für T647.5	Sorvall 03232	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Zentrifugenröhrchen für T865	Sorvall 03719	Thermo-Fisher, Waltham/USA
Zentrifugenröhrchen für MLA-80	355647	Beckman-Coulter, Fullerton/USA
Zentrifugenröhrchen Glas 15 ml	8441	Corex®
	00152	DuPont
Zentrifugenröhrchen Glas 30 ml	8445	Corex®
	00156	DuPont

B Abkürzungen

ARNT Aromatischer-Kohlenwasserstoff-Rezeptor-Kerntranslokator (*aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator*)

ATP Adenosin-5´-triphosphat

BMAL1 *Brain and muscle ARNT-like protein 1*

BP bindendes Protein

BZH Biochemiezentrum der Universität Heidelberg

CAS

CBP Calmodulin bindendes Peptid

CIAP, CIP alkalische Kälberdarmphosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*)

CK Caseinkinase

CLD Cytoplasmatische Lokalisationsdomäne

CLK CLOCK

CRM1 *Chromosomal Region Maintenance 1*

CRY CRYPTOCHROME

CT Circadiane Zeit (*circadian time*)

CTAB Cetyltrimethylammoniumbromid

CYC CYCLE

DD Dauerdunkel

DTT 2,3-Dithiothreit

EDTA Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (*ethylenediamine N,N,N',N'-tetraacetic acid*)

EGTA Ethylenglykol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (*Ethyleneglycol-bis(β-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid*)

FGSC Fungal Genetics Stock Center

FRH FRQ *interacting RNA helicase*

FRQ FREQUENCY

GAP GTPase-aktivierendes Protein

GEF Guaninnukleotid-Austauschfakter (*guanine nucleotide exchange factor*)

GFP Grün fluoreszierendes Protein

HEPES N-(2-Hydroxyethyl)-N'-Piperazinethansulfonsäure

hnRNP heterogenes Kern-RNP (*heterogenous nuclear* RNP)

HRP Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*)

LB *lysogenic broth*

LL Dauerlicht

LOV Licht, Sauerstoff, elektrische Spannung (*light, oxygen, voltage*)

MBP Maltose bindendes Protein

NES Kernexportsignal (*nuclear export signal*)

NLS Kernlokalisationssignal (*nuclear localisation signal*)

NTA Nitriltriessigsäure (*nitrilotriacetic acid*)

NTF Kerntransportfaktor (*nuclear transport factor*

ORF offener Leserahmen (*open reading frame*)

PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese

PAS PER, ARNT, SIM

PBS Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung (*phosphate buffered saline*)

PCR Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*)

PER PERIOD

PEST Proteinregion reich an Prolin (P)-, Glutamat/Aspartat (E/D)-, Serin (S)- und Threonin (T)-Resten

Pfu *Pyrococcus furiosus*

PIPES Piperazin-N,N'-bis(ethansulfonsäure)

PK Proteinase K

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

PP, PPase Proteinphosphatase

QA Chinasäure (*quinic acid*, acidum sinense)

RIP durch Wiederholungen erzeugte Punkmutationen (*repeat induced point mutations*)

RNP Ribonukleoprotein

RT Raumtemperatur

SCF Skp1, Cul1, F-Box-Protein

SDS Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecylsulfate*)

SIM Single minded

SUMO Kleiner Ubiquitin-ähnlicher Modifikator (*small ubiquitin-like modifier*)

TAE Tris, Acetat, EDTA

TAP Doppel-Affinitätsaufreinigung (*tandem affinity purification*)

Taq *Thermus aquaticus*

TBS Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (*tris buffered saline*)

Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol

UpM Umdrehungen pro Minute

WC Weißer Kragen (*White Collar*)

WCC *White Collar Complex*

WT Wildtyp

Literaturverzeichnis

[1] Pittendrigh, C. S. (1960) On temporal organization in living systems. *Harvey Lect*, **56**, 93–125.

[2] Aschoff, J. (1981) Biological rhythms. *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Plenum Press.

[3] de Mairan, J. J. d. (1729) Observation botanique. *Histoire de l'Academie Royale des Science*, pp. 35–36.

[4] Dunlap, J. C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, **96**, 271–290.

[5] Perkins, D. D. (1992) Neurospora: the organism behind the molecular revolution. *Genetics*, **130**, 687–701.

[6] Davis, R. H. (2000) *Neurospora - Contributions of a Model Organism*. Oxford University Press.

[7] Payen, A. (1843) Extrain d'un rapport addressé à M. Le Maréchal Duc de Dalmatie, Ministre de la Guerre, Président du Conseil, sur une altération extraordinaire du pain du munition. *Ann Chim Phys*, **9**, 5–21.

[8] Went, F. A. F. C. (1901) Monilia sitophila (Mont.) Sacc., ein technischer Pilz Javas. *Zentralbl Bakteriol Abt II*, **7**, 544–550, 591–598.

[9] Möller, A. (1901) Phycomyceten und Ascomyceten. Untersuchungen aus Brasilien. In Schimper, A. F. A. (ed.), *Botanische Mitteilungen aus den Tropen*. Fischer, Jena.

[10] Kitazima, K. (1925) On the fungus luxuriantry grown on the bark of trees injured by the great fire of Tokyo on Sept. 1, 1923. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, **1**, 15–19.

[11] Shear, C. L. and Dodge, B. O. (1927) Life histories and heterotallism of the red bread-mold fungi of the Monilia sitophila group. *J Agr Res*, **34**, 1019–1042.

[12] Beadle, G. W. and Tatum, E. L. (1941) Genetic control of chemical reactions in Neurospora. *Proc Natl Acad Sci USA*, **27**, 499–506.

[13] Beadle, G. W. and Tatum, E. L. (1945) Neurospora. 2. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. *Am J Bot*, **32**, 678–686.

[14] Beadle, G. W. (1945) Biochemical genetics. *Chem Revs*, **37**, 15–96.

[15] Pittendrigh, C. S., Bruce, V. G., Rosenzweig, N. S., and Rubin, M. L. (1959) Growth patterns in Neurospora: A biological clock in Neurospora. *Nature*, **184**, 169–170.

[16] Sargent, M. L., Briggs, W. R., and Woodward, D. O. (1966) Circadian nature of a rhythm expressed by an invertaseless strain of Neurospora crassa. *Plant Physiol*, **41**, 1343–1349.

[17] Belden, W. J., Larrondo, L. F., Froehlich, A. C., Shi, M., Chen, C.-H., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2007) The band mutation in Neurospora crassa is a dominant allele of ras-1 implicating RAS signaling in circadian output. *Genes Dev*, **21**, 1494–1505.

[18] Sargent, M. L. and Woodward, D. O. (1969) Genetic determinants of circadian rhythmicity in Neurospora. *J Bacteriol*, **97**, 861–866.

[19] Gardner, G. F. and Feldman, J. F. (1980) The frq locus in Neurospora crassa: a key element in circadian clock organization. *Genetics*, **96**, 877–886.

[20] Loros, J. J., Richman, A., and Feldman, J. F. (1986) A recessive circadian clock mutation at the frq locus of Neurospora crassa. *Genetics*, **114**, 1095–1110.

[21] Aronson, B. D., Johnson, K. A., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (1994) Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science*, **263**, 1578–1584.

[22] Aronson, B. D., Johnson, K. A., and Dunlap, J. C. (1994) Circadian clock locus frequency: protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 7683–7687. Comparative Study.

[23] Ryan, F. J., Beadle, G. W., and Tatum, E. L. (1943) The tube method of measuring the growth rate of Neurospora. *Amer J Bot*, **30**, 784–799.

[24] Froehlich, A. C., Noh, B., Vierstra, R. D., Loros, J., and Dunlap, J. C. (2005) Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus Neurospora crassa. *Eukaryot Cell*, **4**, 2140–2152. Comparative Study.

[25] Price-Lloyd, N., Elvin, M., and Heintzen, C. (2005) Synchronizing the Neurospora crassa circadian clock with the rhythmic environment. *Biochem Soc Trans*, **33**, 949–952.

[26] Garceau, N. Y., Liu, Y., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (1997) Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY. *Cell*, **89**, 469–476.

[27] Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P., and Macino, G. (1999) Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J*, **18**, 4961–4968.

[28] Schwerdtfeger, C. and Linden, H. (2000) Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in Neurospora crassa. *Eur J Biochem*, **267**, 414–422.

[29] He, Q., Shu, H., Cheng, P., Chen, S., Wang, L., and Liu, Y. (2005) Light-independent phosphorylation of WHITE COLLAR-1 regulates its function in the Neurospora circadian negative feedback loop. *J Biol Chem*, **280**, 17526–17532.

[30] Schafmeier, T., Haase, A., Kaldi, K., Scholz, J., Fuchs, M., and Brunner, M. (2005) Transcriptional feedback of Neurospora circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell*, **122**, 235–246.

[31] Lee, K., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2000) Interconnected feedback loops in the Neurospora circadian system. *Science*, **289**, 107–110.

[32] Cheng, P., Yang, Y., and Liu, Y. (2001) Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the Neurospora circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 7408–7413.

[33] Schafmeier, T., Kaldi, K., Diernfellner, A., Mohr, C., and Brunner, M. (2006) Phosphorylation-dependent maturation of Neurospora circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes Dev*, **20**, 297–306.

[34] Brunner, M. and Schafmeier, T. (2006) Transcriptional and post-transcriptional regulation of the circadian clock of cyanobacteria and Neurospora. *Genes Dev*, **20**, 1061–1074.

[35] Denault, D. L., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2001) WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of Neurospora. *EMBO J*, **20**, 109–117.

[36] Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K. H., and Liu, Y. (2002) PAS domain-mediated WC-1/WC-2 interaction is essential for maintaining the steady-state level of WC-1 and the function of both proteins in circadian clock and light responses of Neurospora. *Mol Cell Biol*, **22**, 517–524.

[37] Froehlich, A. C., Liu, Y., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2002) White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science*, **297**, 815–819.

[38] Froehlich, A. C., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2003) Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 5914–5919.

[39] Belden, W. J., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2007) Execution of the circadian negative feedback loop in Neurospora requires the ATP-dependent chromatin-remodeling enzyme CLOCKSWITCH. *Mol Cell*, **25**, 587–600.

[40] Crosthwaite, S. K., Dunlap, J. C., and Loros, J. J. (1997) Neurospora wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science*, **276**, 763–769.

[41] Luo, C., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (1998) Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *EMBO J*, **17**, 1228–1235.

[42] Merrow, M. W., Garceau, N. Y., and Dunlap, J. C. (1997) Dissection of a circadian oscillation into discrete domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 3877–3882.

[43] Görl, M., Merrow, M., Huttner, B., Johnson, J., Rönneberg, T., and Brunner, M. (2001) A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in Neurospora crassa. *EMBO J*, **20**, 7074–7084.

[44] Lewis, M. T., Morgan, L. W., and Feldman, J. F. (1997) Analysis of frequency (frq) clock gene homologs: evidence for a helix-turn-helix transcription factor. *Mol Gen Genet*, **253**, 401–414. Comparative Study.

[45] Cheng, P., Yang, Y., Heintzen, C., and Liu, Y. (2001) Coiled-coil domain-mediated FRQ-FRQ interaction is essential for its circadian clock function in Neurospora. *EMBO J*, **20**, 101–108.

[46] Cheng, P., He, Q., He, Q., Wang, L., and Liu, Y. (2005) Regulation of the Neurospora circadian clock by an RNA helicase. *Genes Dev*, **19**, 234–241.

[47] Liu, Y., Loros, J., and Dunlap, J. C. (2000) Phosphorylation of the Neurospora clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 234–239.

[48] He, Q., Cheng, P., Yang, Y., He, Q., Yu, H., and Liu, Y. (2003) FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in Neurospora establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J*, **22**, 4421–4430. Comparative Study.

[49] He, Q. and Liu, Y. (2005) Degradation of the Neurospora circadian clock protein FREQUENCY through the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem Soc Trans*, **33**, 953–956.

[50] He, Q., Cheng, P., He, Q., and Liu, Y. (2005) The COP9 signalosome regulates the Neurospora circadian clock by controlling the stability of the SCF FWD-1 complex. *Genes Dev*, **19**, 1518–1531.

[51] Yang, Y., Cheng, P., Zhi, G., and Liu, Y. (2001) Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the Neurospora circadian clock protein FREQUENCY. *J Biol Chem*, **276**, 41064–41072.

[52] Yang, Y., Cheng, P., and Liu, Y. (2002) Regulation of the Neurospora circadian clock by casein kinase II. *Genes Dev*, **16**, 994–1006.

[53] Yang, Y., Cheng, P., He, Q., Wang, L., and Liu, Y. (2003) Phosphorylation of FREQUENCY protein by casein kinase II is necessary for the function of the Neurospora circadian clock. *Mol Cell Biol*, **23**, 6221–6228.

[54] Yang, Y., He, Q., Cheng, P., Wrage, P., Yarden, O., and Liu, Y. (2004) Distinct roles for PP1 and PP2A in the Neurospora circadian clock. *Genes Dev*, **18**, 255–260.

[55] Pregueiro, A. M., Liu, Q., Baker, C. L., Dunlap, J. C., and Loros, J. J. (2006) The Neurospora checkpoint kinase 2: a regulatory link between the circadian and cell cycles. *Science*, **313**, 644–649.

[56] He, Q., Cha, J., He, Q., Lee, H.-C., Yang, Y., and Liu, Y. (2006) CK I and CK II mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the Neurospora circadian negative feedback loop. *Genes Dev*, **20**, 2552–2565.

[57] Hrubey, T. W. and Roach, P. J. (1990) Phosphoserine in peptide substrates can specify casein kinase II action. *Biochem Biophys Res Commun*, **172**, 190–196.

[58] Merrow, M. W. and Dunlap, J. C. (1994) Intergeneric complementation of a circadian rhythmicity defect: phylogenetic conservation of structure and function of the clock gene frequency. *EMBO J*, **13**, 2257–2266. Comparative Study.

[59] Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the pest hypothesis. *Science*, **234**, 364–368.

[60] Rechsteiner, M. and Rogers, S. W. (1996) Pest sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **21**, 267–271.

[61] Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A., and Macino, G. (1996) White collar-1, a central regulator of blue light responses in Neurospora, is a zinc finger protein. *EMBO J*, **15**, 1650–1657.

[62] Ballario, P., Talora, C., Galli, D., Linden, H., and Macino, G. (1998) Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of Neurospora crassa white collar proteins. *Mol Microbiol*, **29**, 719–729.

[63] He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K. H., and Liu, Y. (2002) White Collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science*, **297**, 840–843.

[64] Linden, H. and Macino, G. (1997) White Collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in Neurospora crassa. *EMBO J*, **16**, 98–109.

[65] He, Q. and Liu, Y. (2005) Molecular mechanism of light responses in Neurospora: from light-induced transcription to photoadaptation. *Genes Dev*, **19**, 2888–2899.

[66] Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q., and Liu, Y. (2003) WHITE COLLAR-1, a multifunctional neurospora protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of wc-2. *J Biol Chem*, **278**, 3801–3808.

[67] Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C. C., van der Horst, G. T., Hastings, M. H., and Reppert, S. M. (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, **288**, 1013–1019.

[68] Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., and Schibler, U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, **110**, 251–260.

[69] Bae, K., Lee, C., Sidote, D., Chuang, K. Y., and Edery, I. (1998) Circadian regulation of a Drosophila homolog of the mammalian clock gene: PER and TIM function as positive regulators. *Mol Cell Biol*, **18**, 6142–6151.

[70] Cyran, S. A., Buchsbaum, A. M., Reddy, K. L., Lin, M.-C., Glossop, N. R. J., Hardin, P. E., Young, M. W., Storti, R. V., and Blau, J. (2003) Vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in theDrosophila circadian clock. *Cell*, **112**, 329–341.

[71] Kaldi, K., Gonzalez, B. H., and Brunner, M. (2006) Transcriptional regulation of the Neurospora circadian clock gene wc-1 affects the phase of circadian output. *EMBO Rep*, **7**, 199–204.

[72] Franchi, L., Fulci, V., and Macino, G. (2005) Protein kinase C modulates light responses in Neurospora by regulating the blue light photoreceptor WC-1. *Mol Microbiol*, **56**, 334–345.

[73] Schmidhauser, T. J., Lauter, F. R., Russo, V. E., and Yanofsky, C. (1990) Cloning, sequence, and photoregulation of al-1, a carotenoid biosynthetic gene of Neurospora crassa. *Mol Cell Biol*, **10**, 5064–5070.

[74] Schmidhauser, T. J., Lauter, F. R., Schumacher, M., Zhou, W., Russo, V. E., and Yanofsky, C. (1994) Characterization of al-2, the phytoene synthase gene of Neurospora crassa. cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J Biol Chem*, **269**, 12060–12066.

[75] Carattoli, A., Cogoni, C., Morelli, G., and Macino, G. (1994) Molecular characterization of upstream regulatory sequences controlling the photoinduced expression of the albino-3 gene of Neurospora crassa. *Mol Microbiol*, **13**, 787–795.

[76] Loros, J. J., Denome, S. A., and Dunlap, J. C. (1989) Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in Neurospora. *Science*, **243**, 385–388.

[77] Merrow, M., Franchi, L., Dragovic, Z., Görl, M., Johnson, J., Brunner, M., Macino, G., and Rönneberg, T. (2001) Circadian regulation of the light input pathway in Neurospora crassa. *EMBO J*, **20**, 307–315.

[78] Heintzen, C., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2001) The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell*, **104**, 453–464.

[79] Grimaldi, B., Coiro, P., Filetici, P., Berge, E., Dobosy, J. R., Freitag, M., Selker, E. U., and Ballario, P. (2006) The neurospora crassa White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Mol Biol Cell*, **17**, 4576–4583.

[80] Hunt, S. M., Elvin, M., Crosthwaite, S. K., and Heintzen, C. (2007) The PAS/LOV protein VIVID controls temperature compensation of circadian clock phase and development in neurospora crassa. *Genes Dev*, **21**, 1964–1974.

[81] Schwerdtfeger, C. and Linden, H. (2001) Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in Neurospora crassa. *Mol Microbiol*, **39**, 1080–1087.

[82] Shrode, L. B., Lewis, Z. A., White, L. D., Bell-Pedersen, D., and Ebbole, D. J. (2001) vvd is required for light adaptation of conidiation-specific genes of Neurospora crassa, but not circadian conidiation. *Fungal Genet Biol*, **32**, 169–181.

[83] Cheng, P., He, Q., Yang, Y., Wang, L., and Liu, Y. (2003) Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 5938–5943.

[84] Schwerdtfeger, C. and Linden, H. (2003) VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J*, **22**, 4846–4855.

[85] Elvin, M., Loros, J. J., Dunlap, J. C., and Heintzen, C. (2005) The PAS/LOV protein VIVID supports a rapidly dampened daytime oscillator that facilitates entrainment of the Neurospora circadian clock. *Genes Dev*, **19**, 2593–2605.

[86] Tan, Y., Dragovic, Z., Roenneberg, T., and Merrow, M. (2004) Entrainment dissociates transcription and translation of a circadian clock gene in Neurospora. *Curr Biol*, **14**, 433–438. Comparative Study.

[87] Liu, Y., Garceau, N. Y., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (1997) Thermally regulated translational control of FRQ mediates aspects of temperature responses in the Neurospora circadian clock. *Cell*, **89**, 477–486.

[88] Colot, H. V., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2005) Temperature-modulated alternative splicing and promoter use in the circadian clock gene frequency. *Mol Biol Cell*, **16**, 5563–5571.

[89] Diernfellner, A. C. R., Schafmeier, T., Merrow, M. W., and Brunner, M. (2005) Molecular mechanism of temperature sensing by the circadian clock of Neurospora crassa. *Genes Dev*, **19**, 1968–1973.

[90] Kramer, C., Loros, J. J., Dunlap, J. C., and Crosthwaite, S. K. (2003) Role for antisense RNA in regulating circadian clock function in Neurospora crassa. *Nature*, **421**, 948–952.

[91] Bell-Pedersen, D. (2000) Understanding circadian rhythmicity in Neurospora crassa: from behavior to genes and back again. *Fungal Genet Biol*, **29**, 1–18.

[92] Pemberton, L. F. and Paschal, B. M. (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, **6**, 187–198.

[93] Lim, R. Y. H. and Fahrenkrog, B. (2006) The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 342–347.

[94] Tran, E. J. and Wente, S. R. (2006) Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell*, **125**, 1041–1053.

[95] Johnson, A. W., Lund, E., and Dahlberg, J. (2002) Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci*, **27**, 580–585.

[96] Cole, C. N. and Scarcelli, J. J. (2006) Unravelling mRNA export. *Nat Cell Biol*, **8**, 645–647.

[97] Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., and Corbett, A. H. (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem*, **282**, 5101–5105.

[98] la Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*, **17**, 527–536.

[99] Kutay, U. and Güttinger, S. (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol*, **15**, 121–124.

[100] Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999) Leptomycin B inactivates CRM1/Exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9112–9117.

[101] Shibata, S., Sasaki, M., Miki, T., Shimamoto, A., Furuichi, Y., Katahira, J., and Yoneda, Y. (2006) Exportin-5 orthologues are functionally divergent among species. *Nucleic Acids Res*, **34**, 4711–4721.

[102] Kim, V. N. (2004) MicroRNA precursors in motion: Exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*, **14**, 156–159.

[103] Kaffman, A. and O'Shea, E. K. (1999) Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 291–339.

[104] Jans, D. A., Xiao, C. Y., and Lam, M. H. (2000) Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays*, **22**, 532–544.

[105] Poon, I. K. H. and Jans, D. A. (2005) Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic*, **6**, 173–186.

[106] Shcherbik, N. and Haines, D. S. (2004) Ub on the move. *J Cell Biochem*, **93**, 11–19.

[107] Muslin, A. J. and Xing, H. (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal*, **12**, 703–709.

[108] Fontes, M. R. M., Teh, T., Toth, G., John, A., Pavo, I., Jans, D. A., and Kobe, B. (2003) Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin-alpha. *Biochem J*, **375**, 339–349.

[109] Harreman, M. T., Kline, T. M., Milford, H. G., Harben, M. B., Hodel, A. E., and Corbett, A. H. (2004) Regulation of nuclear import by phosphorylation adjacent to nuclear localization signals. *J Biol Chem*, **279**, 20613–20621.

[110] Gama-Carvalho, M. and Carmo-Fonseca, M. (2001) The rules and roles of nucleocytoplasmic shuttling proteins. *FEBS Lett*, **498**, 157–163.

[111] Lin, J.-M., Kilman, V. L., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M., and Allada, R. (2002) A role for casein kinase 2alpha in the drosophila circadian clock. *Nature*, **420**, 816–820.

[112] Akten, B., Jauch, E., Genova, G. K., Kim, E. Y., Edery, I., Raabe, T., and Jackson, F. R. (2003) A role for ck2 in the drosophila circadian oscillator. *Nat Neurosci*, **6**, 251–257.

[113] Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A. S., and Young, M. W. (2001) A role for the segment polarity gene shaggy/gsk-3 in the drosophila circadian clock. *Cell*, **105**, 769–779.

[114] Ashmore, L. J., Sathyanarayanan, S., Silvestre, D. W., Emerson, M. M., Schotland, P., and Sehgal, A. (2003) Novel insights into the regulation of the Timeless protein. *J Neurosci*, **23**, 7810–7819.

[115] Vielhaber, E. L., Duricka, D., Ullman, K. S., and Virshup, D. M. (2001) Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. *J Biol Chem*, **276**, 45921–45927.

[116] Yagita, K., Tamanini, F., Yasuda, M., Hoeijmakers, J. H. J., van der Horst, G. T. J., and Okamura, H. (2002) Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock protein. *EMBO J*, **21**, 1301–1314.

[117] Loop, S. and Pieler, T. (2005) Nuclear import of mPER3 in Xenopus oocytes and HeLa cells requires complex formation with mPER1. *FEBS J*, **272**, 3714–3724.

[118] Chaves, I., Yagita, K., Barnhoorn, S., Okamura, H., van der Horst, G. T. J., and Tamanini, F. (2006) Functional evolution of the photolyase/cryptochrome protein family: importance of the C terminus of mammalian CRY1 for circadian core oscillator performance. *Mol Cell Biol*, **26**, 1743–1753.

[119] Tamaru, T., Isojima, Y., van der Horst, G. T. J., Takei, K., Nagai, K., and Takamatsu, K. (2003) Nucleocytoplasmic shuttling and phosphorylation of BMAL1 are regulated by circadian clock in cultured fibroblasts. *Genes Cells*, **8**, 973–983.

[120] Kwon, I., Lee, J., Chang, S. H., Jung, N. C., Lee, B. J., Son, G. H., Kim, K., and Lee, K. H. (2006) BMAL1 shuttling controls transactivation and degradation of the CLOCK/BMAL1 heterodimer. *Mol Cell Biol*, **26**, 7318–7330.

[121] Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[122] Freitag, M., Hickey, P. C., Raju, N. B., Selker, E. U., and Read, N. D. (2004) GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in Neurospora crassa. *Fungal Genet Biol*, **41**, 897–910.

[123] Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218–229.

[124] McClung, C. R., Fox, B. A., and Dunlap, J. C. (1989) The Neurospora clock gene frequency shares a sequence element with the Drosophila clock gene period. *Nature*, **339**, 558–562.

[125] Silar, P. (1995) Two new easy to use vectors for transformations. *Fungal Genetics Newsletter*, **42**, 73.

[126] Orbach, M. J., Porro, E. B., and Yanofsky, C. (1986) Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of Neurospora crassa and its use as a dominant selectable marker. *Mol Cell Biol*, **6**, 2452–2461.

[127] Müller, H.-J. (2001) *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Spektrum, Akad. Verlag.

[128] Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., van Dillen, P. M. W., and van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, **28**, 495–503.

[129] Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene*, **96**, 23–28.

[130] Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513–1523.

[131] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248–254.

[132] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.

[133] Baum, J. A. and Giles, N. H. (1985) Genetic control of chromatin structure 5' to the qa-x and qa-2 genes of Neurospora. *J Mol Biol*, **182**, 79–89.

[134] Querfurth, C. Unveröffentlicht.

[135] Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5857–5864.

[136] Görl, M. (2002) Molekulare Mechnismen der circadianen Uhr in Neurospora crassa: Biochemische Charakterisierung von Frequency. PhD thesis Universität Heidelberg.

[137] Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, **39**, 499–509.

[138] Yoneda, Y., Hieda, M., Nagoshi, E., and Miyamoto, Y. (1999) Nucleocytoplasmic protein transport and recycling of Ran. *Cell Struct Funct*, **24**, 425–433.

[139] Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598–599.

[140] Sulkowski, E. (1985) Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol*, **3**, 1–7.

[141] Sulkowski, E. (1989) The saga of IMAC and MIT. *Bioessays*, **10**, 170–175.

[142] Porath, J. (1992) Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*, **3**, 263–281.

[143] Yip, T. T., Nakagawa, Y., and Porath, J. (1989) Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography. *Anal Biochem*, **183**, 159–171.

[144] Andersson, L. and Porath, J. (1986) Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe3+) affinity chromatography. *Anal Biochem*, **154**, 250–254.

[145] Muszynska, G., Andersson, L., and Porath, J. (1986) Selective adsorption of phosphoproteins on gel-immobilized ferric chelate. *Biochemistry*, **25**, 6850–6853.

[146] Muszynska, G., Dobrowolska, G., Medin, A., Ekman, P., and Porath, J. O. (1992) Model studies on iron(III) ion affinity chromatography. II. interaction of immobilized iron(III) ions with phosphorylated amino acids, peptides and proteins. *J Chromatogr*, **604**, 19–28.

[147] Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., and Stüber, D. (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal-chelate adsorbent. *Bio/Technology*, **6**, 1321–1325.

[148] Hochuli, E. (1989) Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent. *Biologically Active Molecules* , **?**, 217–239.

[149] Schmitt, J., Hess, H., and Stunnenberg, H. G. (1993) Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol Biol Rep*, **18**, 223–230.

[150] Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D., and Henco, K. (1994) 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol*, **31**, 371–387.

[151] Crowe, J., Masone, B. S., and Ribbe, J. (1995) One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Mol Biotechnol*, **4**, 247–258.

[152] Crowe, J., Masone, B. S., and Ribbe, J. (1996) One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Methods Mol Biol*, **58**, 491–510.

[153] Hochuli, E., Döbeli, H., and Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr*, **411**, 177–184.

[154] Sriwanthana, B., Island, M. D., Maneval, D., and Mobley, H. L. (1994) Single-step purification of Proteus mirabilis urease accessory protein UreE, a protein with a naturally occurring histidine tail, by nickel chelate affinity chromatography. *J Bacteriol*, **176**, 6836–6841.

[155] Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, **17**, 1030–1032.

[156] Skerra, A. and Schmidt, T. G. (2000) Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol*, **326**, 271–304.

[157] Schmidt, T. G. and Skerra, A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng*, **6**, 109–122.

[158] Schmidt, T. G. and Skerra, A. (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the SStrep tagänd immobilized recombinant core streptavidin. *J Chromatogr A*, **676**, 337–345.

[159] Schmidt, T. G., Koepke, J., Frank, R., and Skerra, A. (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol*, **255**, 753–766.

[160] Voss, S. and Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng*, **10**, 975–982.

[161] Lim, K., Ho, J. X., Keeling, K., Gilliland, G. L., Ji, X., Rüker, F., and Carter, D. C. (1994) Three-dimensional structure of Schistosoma japonicum glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV. *Protein Sci*, **3**, 2233–2244.

[162] McTigue, M. A., Bernstein, S. L., Williams, D. R., and Tainer, J. A. (1995) Purification and crystallization of a schistosomal glutathione S-transferase. *Proteins*, **22**, 55–57.

[163] McTigue, M. A., Williams, D. R., and Tainer, J. A. (1995) Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from Schistosoma japonica and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J Mol Biol*, **246**, 21–27.

[164] Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31–40.

[165] Aatsinki, J. T. and Rajaniemi, H. J. (2005) An alternative use of basic pGEX vectors for producing both N- and C-terminal fusion proteins for production and affinity purification of antibodies. *Protein Expr Purif*, **40**, 287–291.

[166] Maru, Y., Afar, D. E., Witte, O. N., and Shibuya, M. (1996) The dimerization property of glutathione S-transferase partially reactivates Bcr-Abl lacking the oligomerization domain. *J Biol Chem*, **271**, 15353–15357.

[167] Tudyka, T. and Skerra, A. (1997) Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal, enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of Escherichia coli. *Protein Sci*, **6**, 2180–2187.

[168] Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3784–3788.

[169] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M., Appel, R., and Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In Walker, J. M. (ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*, pp. 571–607. Humana Press.

[170] Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif*, **41**, 207–234.

[171] Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J., and Selker, E. (1989) Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in Neurospora crassa transformation. *Fungal Genetics Newsletter*, **36**, 79–.

[172] Carroll, A. M., Sweigard, J. A., and Valent, B. (1994) Improved vectors for selecting resistance to hygromycin. *Fungal Genetics Newsletter*, **41**, 22.

[173] Campbell, J., Enderlin, C., and Selitrennikoff, C. (1994) Vectors for expression and modification of cDNA sequences in Neurospora crassa. *Fungal Genetics Newsletter*, **41**, 20–21.

[174] Aramayo, R. and Metzenberg, R. L. (1996) Gene replacements at the his-3 locus of Neurospora crassa. *Fungal Genetics Newsletter*, **43**, 9–13.

[175] Margolin, B., Freitag, M., and Selker, E. (1997) Improved plasmids for gene targeting at the his-3 locus of Neurospora crassa by electroporation. *Fungal Genetics Newsletter*, **44**, 34–36.

[176] Haag, J. R., Lee, D. W., and Aramayo, R. (2003) A GATEWAY destination vector for high-throughput construction of Neurospora crassa histidine-3 gene replacement plasmids. *Fungal Genetics Newsletter*, **50**, 6–8.

[177] Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., and Inoue, H. (2004) Highly efficient gene replacements in Neurospora strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 12248–12253.

[178] Ebbole, D. (1990) Vectors for construction of translational fusions to beta-galactosidase. *Fungal Genetics Newletter*, **37**, 15–16.

[179] Sá-Correia, I. and Tenreiro, S. (2002) The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of Saccharomyces cerevisiae genome sequence. *J Biotechnol*, **98**, 215–226.

[180] Loros, J. J. and Feldman, J. F. (1986) Loss of temperature compensation of circadian period length in the frq-9 mutant of Neurospora crassa. *J Biol Rhythms*, **1**, 187–198.

[181] Vogel, H. (1957) A convenient growth medium for Neurospora (medium N). *Microbial Genet Bull*, **13**, 42–43.

[182] Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., and Singh, R. M. M. (1966) Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, **5**, 467–477.

[183] Aoyagi, T., Miyata, S., Nanbo, M., Kojima, F., and Matsuzaki, M. (1969) Biological activities of leupeptins. *J Antibiot (Tokyo)*, **22**, 558–568.

[184] Aoyagi, T., Takeuchi, T., Matsuzaki, A., Kawamura, K., and Kondo, S. (1969) Leupeptins, new protease inhibitors from Actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*, **22**, 283–286.

[185] Kondo, S. I., Kawamura, K., Iwanaga, J., Hamada, M., and Aoyagi, T. (1969) Isolation and characterization of leupeptins produced by Actinomycetes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **17**, 1896–1901.

[186] Umezawa, H. (1976) Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. *Methods in Enzymology*, **45**, 678–695.

[187] Aoyagi, T., Kunimoto, S., Morishima, H., Takeuchi, T., and Umezawa, H. (1971) Effect of pepstatin on acid proteases. *J Antibiot (Tokyo)*, **24**, 687–694.

[188] Kunimoto, S., Aoyagi, T., Nishizawa, R., Komai, T., and Takeuchi, T. (1974) Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. *J Antibiot (Tokyo)*, **27**, 413–418.

[189] Morishima, H., Takita, T., Aoyagi, T., Takeuchi, T., and Umezawa, H. (1970) The structure of pepstatin. *J Antibiot (Tokyo)*, **23**, 263–265.

[190] Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., and Hamada, M. (1970) Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*, **23**, 259–262.

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die auf die eine oder andere Weise am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren. Prof. Michael Brunner danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit, in seiner Forschungsgruppe arbeiten zu dürfen. Er war ein nie versiegender Quell von Ideen und jederzeit bereit, neue Ergebnisse zu diskutieren und zu interpretieren. Prof. Irmgard Sinning gewährte einem Teil unserer Gruppe – so auch mir – Asyl in ihren Laborräumen, solange die Renovierung unserer fest zugesagten Räumlichkeiten auf sich warten ließ.

Viele Kollegen aus dem BZH erlaubten mir – besonders in der Aufbauphase unserer Gruppe –, ihre Geräte zu benutzen, und halfen mit „Verbrauchsmaterial“ aus, wenn es mal einen Engpass gab; auch auf Fragen gab es fast immer eine hilfreiche Antwort.

Alok-Kumar Behera unterstützte mich bei der Klonierung der pFH-Plasmide; seine freundliche aufgeschlossene Art wird mir immer in Erinnerung bleiben. Thomas Pils sorgte dafür, dass trotz aller Biologie auch die Chemie nicht zu kurz kam. Christina Querfurth danke ich für intensive Diskussionen und gegenseitige Unterstützung bei der Laborroutine.

Allen Mitgliedern der AG Brunner (derzeitigen wie ehemaligen) sei gedankt für die gute Arbeitsatmosphäre; sie erklärten mir bereitwillig neue Methoden und waren bei Fragen und Problemen immer zur Stelle. Auch die Mitglieder der AG Weber habe ich als freundliche und hilfsbereite Kollegen „an der Laborbank gegenüber“ zu schätzen gelernt.

Dr. Dorothea Keßler danke ich für nette und fruchtbare – meist biochemische – Diskussionen sowie gute Tipps und profunde Ratschläge. Andrea Neiß und Maria Wegener halfen mir freundlicherweise beim Korrekturlesen (Maria insbesondere im Hinblick auf die neue Rechtschreibung).

Schließlich, aber sicher nicht zuletzt, möchte ich meinen Eltern und meiner Freundin Sarah danken, auf deren Unterstützung ich immer bauen konnte, denen ich aber gerade in der Endphase der Doktorarbeit sicher zu wenig Aufmerksamkeit geschenkt habe; besonders meine Freundin musste ich das ein ums andere Mal vertrösten. Sarah, vielen Dank für Deine Nachsicht!

Diese Arbeit wurde zum Teil finanziert mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) durch das Graduiertenkolleg des Zentrums für Molekularbiologie Heidelberg (ZMBH).