

**Die Rolle der Phosphorylierung des negativen Elements
FREQUENCY in der circadianen Uhr von *Neurospora crassa***

INAUGURAL-DISSERTATION

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

Von
Diplom-Biologin Christina Querfurth
aus Speyer

INAUGURAL-DISSERTATION

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

Vorgelegt von

Diplom-Biologin Christina Querfurth

aus Speyer

Tag der mündlichen Prüfung:

**Die Rolle der Phosphorylierung des negativen Elements
FREQUENCY in der circadianen Uhr von *Neurospora crassa***

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael Brunner
2. Prof. Dr. Walter Nickel

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	V
Summary	VI
1. Einleitung	1
1.1 Circadiane Uhren.....	1
1.1.1 Circadiane Rhythmik.....	1
1.1.2 Generelles Modell	1
1.1.3 Der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr	3
1.2 <i>Neurospora crassa</i> als circadianes Modellsystem	4
1.3 Die molekularen Komponenten der circadianen Uhr von <i>N. crassa</i>	4
1.3.1 Die circadian regulierten Rückkopplungsschleifen von <i>N. crassa</i>	6
1.3.2 Die Aktivatoren der negativen Rückkopplungsschleife: WC-1 und WC-2	8
1.3.3 Die negativen Elemente des circadianen Oszillators: FRQ und FRH.....	10
1.3.4 Inhibition des WCC durch FRQ.....	13
1.3.5 Die Stabilität von FRQ und ihr Einfluss auf die circadiane Rückkopplung.....	14
1.3.5.1 Casein-Kinase 1a.....	15
1.3.5.2 Calmodulin-Kinase 1.....	15
1.3.5.3 Casein-Kinase II.....	16
1.3.5.4 Die Protein-Phosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A).....	17
1.3.6 Proteasomale Degradation von FRQ.....	17
1.3.7 Parallelen zu circadianen Oszillatoren höherer Eukaryoten.....	18
1.4 Zeitgeber: die Synchronisation mit der Umwelt	19
1.4.1 Licht.....	20
1.4.1.1 Die Lichtreaktion.....	20
1.4.1.2 Synchronisation durch Licht	23
1.4.1.3 Photoperiodismus	25
1.4.1.4 Andere Möglichkeiten der Licht-Signaltransduktion.....	27
1.4.2 Temperatur	28

1.4.2.1	Temperaturwahrnehmung	28
1.4.2.2	Die Umstellung der Uhr durch Temperatur	29
1.4.2.3	Grenzen des Temperaturbereichs für circadiane Rhythmik und Temperaturkompensation	30
1.4.2.4	Temperaturkompensation.....	30
1.5	Steuerung der <i>ccgs</i> durch die circadiane Uhr	31
2.	Material und Methoden	34
2.1	Material.....	34
2.1.1	Organismen.....	34
2.1.1.1	<i>Neurospora crassa</i>	34
2.1.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
2.1.1.3	<i>Escherichia coli</i>	35
2.1.2	Chemikalien.....	36
2.1.3	Oligonucleotide	37
2.1.3.1	DNA-Sequenzen für PCR-Primer	37
2.1.3.2	DNA-Sequenzen für direkte Klonierung.....	38
2.1.4	Plasmide	39
2.1.4.1	Plasmide für Transformation in <i>N. crassa</i>	39
2.1.4.2	Plasmide für Transformation in <i>S. cerevisiae</i>	39
2.1.5	Antikörper.....	39
2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Kulturbedingungen und Physiologische Methoden.....	41
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	41
2.2.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	41
2.2.1.3	<i>Yeast-two-Hybrid</i> Assay.....	41
2.2.1.4	Kultivierung von <i>N. crassa</i>	42
2.2.1.5	Analyse des circadiane Phänotyps durch <i>race tube assay</i>	43
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	44
2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985 & 1988)	44

2.2.2.2 Mutagenese mittels PCR	45
2.2.2.3 Deletion mittels PCR.....	46
2.2.2.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen	46
2.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten	46
2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese	47
2.2.2.7 Reinigung von DNA aus Agarosegelen	47
2.2.2.8 Sequenzierung von DNA.....	48
2.2.2.9 Transformation von <i>E. coli</i>	48
2.2.2.10 Minipräparation von Plasmiden	49
2.2.2.11 Midipräparation von Plasmiden	49
2.2.2.12 Präparation von genomischer DNA (gDNA) aus <i>N. crassa</i>	50
2.2.2.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	51
2.2.2.14 Transformation von <i>N. crassa</i>	51
2.2.3 Zellbiologische Methoden	52
2.2.3.1 Proteintotalextrakte von <i>N. crassa</i>	52
2.2.3.2 Subzelluläre Fraktionierung von <i>N. crassa</i>	52
2.2.4 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden	54
2.2.4.1 Proteinbestimmung.....	54
2.2.4.2 Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA).....	54
2.2.4.3 Proteinpräzipitation mit Methanol-Chloroform (Wessel u. Flügge, 1984)	54
2.2.4.4 Native Aufreinigung von His-markierten Proteinen aus <i>N. crassa</i>	55
2.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.2.4.6 Western Blot (Semi Dry System, Towbin et al., 1979).....	56
2.2.4.7 2D-Gelelektrophorese.....	57
2.2.4.8 Gelfiltrationschromatographie.....	58
2.2.4.9 Co-Immunopräzipitation	59
2.2.4.10 Dephosphorylierung von Gesamtzellextrakten	59

2.2.4.11	Aufreinigung von His-markierten Proteinen mit Phosphatase-Behandlung	60
2.2.4.12	Kinase-Aktivitäts-Assay.....	60
2.2.4.13	Proteinspaltung mit Hydroxylamin (modifiziert nach Bornstein & Balian, 1977)	60
3.	Ergebnisse.....	62
3.1	Untersuchung der Phosphorylierung von FRQ	62
3.2	Funktionelle Untersuchung einzelner FRQ-Domänen	63
3.3	Die Phosphorylierung des N-Terminus unterliegt einem trans-Mechanismus.....	67
3.4	Möglichkeit einer phosphorylierungsabhängigen Konformationsänderung	70
3.5	Deletion einer potentiellen nuklearen Exportsequenz	71
3.6	FRQ(310-326) bildet eine zweite CK-1a-Bindestelle	75
3.7	Stämme mit FCD-Mutationen zeigen keinen negativen Feedback	79
3.8	Untersuchung der Interaktion FCD1 – FCD2 – CK-1a.....	82
4.	Diskussion	86
5.	Literatur	94
6.	Anhang	108
6.1	Abkürzungsverzeichnis	108
6.2	Vektorkarten.....	110
6.2.1	pBM60 <i>Clal frq</i>	110
6.2.2	pBM60 <i>Clal frq</i> FCD1→ <i>SphI</i>	111
6.2.3	pFH64 FLAG-GFP-FRQ(2-412).....	112
6.2.4	pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683).....	113
6.2.5	pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683)ΔPEST1	114
6.2.6	pFH64 FLAG-GFP-FRQ(684-989).....	115
6.3	Sequenzvergleich von FRQ-Homologen verschiedener Ascomycota	116
7.	Danksagung	120
8.	Erklärung	120

ZUSAMMENFASSUNG

Die circadianen Uhren von Eukaryoten bestehen aus Proteinen, deren Zusammenspiel vernetzte positive und negative Rückkopplungsschleifen erzeugt. Diese steuern metabolische und physiologische Funktionen sowie das Verhalten der Organismen in einem robusten Rhythmus, der ungefähr der 24-stündigen Erdrotation entspricht. In der Uhr von *Neurospora crassa*, aktiviert der heterodimere Transkriptionsfaktor WHITE COLLAR-Komplex (WCC) als positives Element das Gen seines negativen Regulators, *frequency (frq)*. Das Protein FREQUENCY (FRQ) rekrutiert Casein-Kinase 1a (CK-1a) und vermittelt die Phosphorylierung des WCC, wodurch dieser inaktiviert wird. FRQ selbst wird im Verlauf eines circadianen Tages hyperphosphoryliert und abgebaut. Dadurch wird die Inaktivierung von WCC aufgehoben und ein neuer Zyklus beginnt. FRQ wird im Verlauf einer circadianen Periode an mehr als 75 Stellen phosphoryliert. Die genaue Funktion dieser hohen Anzahl an Phosphorylierungen ist bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass FRQ eine zweiteilige Bindestelle für Casein-Kinase 1a (CK-1a) enthält, die von zwei kurzen Segmenten, FCD1 und FCD2, gebildet wird. FCD1 ist in der basischen N-terminalen Domäne von FRQ lokalisiert, während FCD2 im sauren Mittelteil des Proteins liegt. Beide Segmente werden für eine stabile Interaktion von CK1a mit FRQ benötigt. Des Weiteren weisen die gesammelten Daten darauf hin, dass durch Interaktion des basischen, positiv geladenen N-Terminus von FRQ mit dem negativ geladenen Rest des Proteins FCD1 und FCD2 in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und so eine Bindestelle für CK-1a generiert wird. Durch fortschreitende, CK-1a-vermittelte Phosphorylierung des N-Terminus im Laufe eines circadianen Tages wird die elektrostatische Interaktion von N-Terminus und restlichem Protein immer schwächer und damit auch die Interaktion von FRQ und CK-1a. Einhergehend damit verliert FRQ mit fortschreitender Hyperphosphorylierung zunehmend die Fähigkeit, die CK1-abhängige Inaktivierung des WCC zu vermitteln. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen so einen Mechanismus auf, wie die Interaktion von CK-1a mit FRQ im Laufe eines circadianen Tages reguliert wird.

SUMMARY

Eukaryotic circadian clocks are comprised of proteins functioning together to produce a network of positive and negative feedback loops. These control a multitude of different metabolic, physiological and behavioral functions in a robust rhythm mimicking the 24-hour rhythm of the earth rotation. In the circadian feedback loop of *Neurospora crassa*, the heterodimeric transcription factor WHITE COLLAR complex (WCC) as the positive element activates the gene of its negative regulator, *frequency (frq)*. FREQUENCY (FRQ) recruits CASEIN KINASE 1a (CK-1a) and mediates the phosphorylation of WCC, thereby inactivating it. FRQ is hyperphosphorylated and degraded over the course of the circadian day, thereby abrogating the inhibition of WCC so that the cycle starts again. FRQ itself is phosphorylated during the circadian period at more than 75 sites. The functions of most of these phosphorylations are not known in detail.

In this work it could be shown that FRQ contains a bipartite binding site for CK-1a, consisting of two short segments, FCD1 and FCD2. FCD1 is located in the basic N-terminal part of FRQ, while FCD2 is located in the acidic middle domain. Both segments are necessary for stable interaction with CK-1a. Further data hint at the possibility that FCD1 and FCD2 are brought into close contact by interaction of the basic, positively charged N-terminal part with the acidic, negatively charged middle domain of FRQ, thereby forming a binding site for CK-1a. CK-1a-mediated phosphorylation of the FRQ N-terminus in the course of a circadian day weakens the ionic interaction of N-terminus and middle part of FRQ, which also leads to the weakening of the FRQ-CK-1a interaction. Hyperphosphorylated FRQ thereby loses its ability to mediate the CK-1a dependent inactivation of WCC. The results of this work propose a mechanism by which the interaction of FRQ and CK-1a is regulated in the course of the circadian day.

1. Einleitung

1.1 Circadiane Uhren

1.1.1 Circadiane Rhythmik

Alles Leben auf der Erde ist durch die Erdrotation einem 24stündigen Licht-Dunkel-Wechsel unterworfen. Wenn auch nicht überlebenswichtig, war es für Zellen und Organismen während der Evolution vorteilhaft, diesen Tag-Nacht-Wechsel im Voraus zu „wissen“, um ihre Physiologie schnell darauf einstellen zu können (Ouyang et al., 1998). Der Begriff leitet sich vom lateinischen *circa diem* („ungefähr ein Tag“) ab. Circadiane Rhythmen von metabolischen und physiologischen Funktionen und von Verhaltensweisen sind weit verbreitet bei Prokaryoten, eukaryotischen Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren und stellen eine Adaption an den Tag-Nacht-Rhythmus dar (Dunlap et al., 2004; Young und Kay, 2001). Die circadiane Rhythmik wird unter natürlichen Bedingungen mit der Erdrotation zu einer Periodenlänge von 24 Stunden synchronisiert. Unter konstanten Bedingungen (z. B. Dunkelheit) geht sie in Freilauf über und persistiert die Oszillation mit einer endogenen Periode, die von 24 Stunden abweicht (circadian) (Hastings und Schweiger, 1976). Diese Periodenlänge ist in physiologischen Temperaturbereichen weitgehend temperaturkompensierend. Unter konstanten Bedingungen kann sie durch abrupte Veränderungen der äußeren Bedingungen – z. B. im Dauerdunkel durch einen Lichtpuls oder bei konstanter Temperatur durch einen Temperaturpuls – phasenverschoben werden. Die Phasenverschiebung ist abhängig von der (subjektiven) Tageszeit, zu der der Puls gegeben wird: ein Lichtpuls am „frühen Abend“ verschiebt die Phase rückwärts, d.h. die subjektive Tageszeit ändert sich in „Nachmittag“. Ein Lichtpuls in der „späten Nacht“ wiederum verschiebt die subjektive Tageszeit nach vorn, die circadiane Uhr wird auf „morgens“ oder „Vormittag“ synchronisiert. Dieses Verhalten ist Grundlage für die Synchronisation der inneren Rhythmik mit externen „Zeitgeber“-Zyklen (z. B. der Tag-Nacht-Wechsel) (Johnson et al., 2003; Roenneberg et al., 2003). Die Anlagen zur circadianen Rhythmik sind vererbbar, und der „circadiane Oszillator“ (E. Bünning, 1936) arbeitet auf zellularem Niveau.

1.1.2 Generelles Modell

Alle circadianen Systeme basieren auf einem einheitlichen Prinzip. Sie bestehen aus den drei Komponenten „Input“, Oszillator und „Output“ (Abb. 1.1). Dieses konservierte Prinzip basiert wahrscheinlich auf einer konvergenten Entwicklung in allen biologischen Uhren.

Das Herzstück der circadianen Uhr, der Oszillator oder Schrittmacher, arbeitet auf Zellebene. Die beteiligten Transkriptionsfaktoren werden als positive Elemente der Uhr bezeichnet. In der Folge hemmt der Schrittmacher mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung seine eigene Synthese, indem sein negatives Element auf die Transkriptionsfaktoren einwirkt. Diese autoregulative negative Rückkopplungsschleife schwingt unter freilaufenden Bedingungen (konstante Lichtverhältnisse und Temperatur) mit einer konstanten endogenen Periode. Die Oszillationen circadianer Systeme lassen sich mit sinusförmigen Kurven darstellen, wobei eine Sinusfunktion einer Periode entspricht. Jedem Punkt der Sinuskurve läßt sich eine bestimmte circadiane Zeit (engl. *circadian time*, CT) zuordnen, wobei der Tagesbeginn (subjektiver Sonnenaufgang, Licht) als CT 0 und der Nachtbeginn (subjektiver Sonnenuntergang, Dunkelheit) als CT 12 definiert wird. Der Oszillator ist in der Lage, auf den „Input“ seine Umwelt zu reagieren. Mit „Input“ bezeichnet man den Akzeptor für Umweltreize, die als sogenannte „Zeitgeber“ fungieren und bei höheren Organismen auch den dazugehörigen Transduktionsweg. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um die tageszeitabhängigen Parameter Licht und Temperatur, aber auch z. B. die Verfügbarkeit von

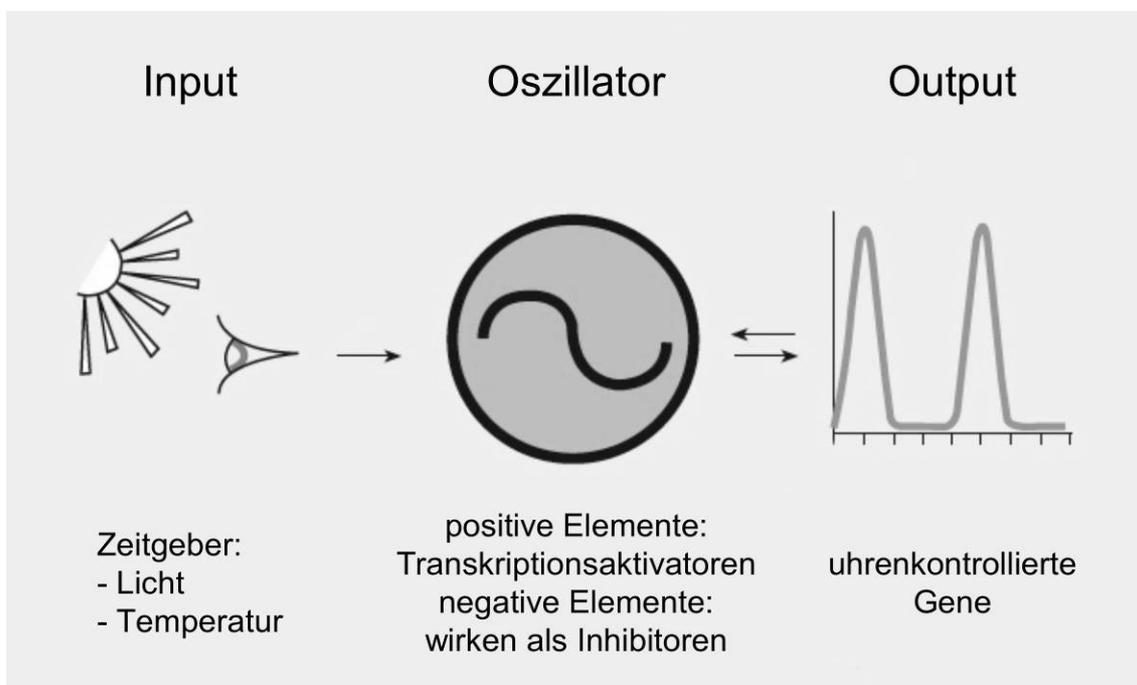


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der circadianen Uhr (abgewandelt nach Stevens et al., 2007). Umgebungsreize aktivieren die positiven Elemente der Uhr, die wiederum für die Expression der uhrenkontrollierten Gene sorgen. Gleichzeitig wird das negative Element exprimiert, das die Transkriptionsaktivatoren inhibiert und so seine eigene Synthese wieder abschaltet. Auch die uhrenkontrollierten Gene, die eine Vielzahl von Vorgängen innerhalb der einzelnen Zelle steuern, können auf die Transkriptions-/Translationsschleife der positiven und negativen Elemente einwirken.

Nahrung. Die Wahrnehmung zeitspezifischer Reize führt zur Synchronisation der inneren, circadianen Zeit mit der äußeren, astronomischen. Die Oszillation der zentralen Uhrengene beeinflusst als Folgereaktion die Expression circadian regulierter Gene (engl. *clock-controlled genes*, *ccgs*) und damit viele biochemische und physiologische Prozesse, sowie bei höheren Organismen auch das Verhalten und die Aktivität. Diese von der circadianen Uhr gesteuerten Funktionen bezeichnet man als „Output“. Tatsächlich scheint die Expression eines erheblichen Anteils aller Gene circadian reguliert zu sein. Experimente deuten darauf hin, dass bis zu 25 % des Transkriptom von *N. crassa* dem Einfluß der circadianen Rythmik unterliegt (Dong et al., 2008).

1.1.3 Der molekulare Mechanismus der circadianen Uhr

Auf molekularer Ebene der circadianen Rhythmik wirken der Akzeptor für den Zeitgeber Licht (ein Photorezeptor), der Transduktionsweg, der Oszillator und der Aktivator der Folgereaktion. Als Photorezeptoren dienen dabei Phytochrom (bei höheren Pflanzen), Rhodopsine (bei Tieren) und Flavoproteine, die als Blaulichtrezeptoren dienen (bei Pilzen). Bei höheren Organismen spielt die Signaltransduktion vom Ort des Rezeptors (z.B. Auge) zum Sitz des zentralen circadianen Schrittmachers (im Gehirn) eine Rolle. Der circadiane Rhythmus wird durch eine autoregulatorische negative Rückkopplung generiert. Transkriptionsfaktoren, die direkt oder indirekt durch solche Reize aktiviert werden, aktivieren Gene des zentralen Oszillators. Diese Transkriptionsfaktoren dienen als positives Element der Rückkopplung. Die Gene des Oszillators werden transkribiert und - zeitlich versetzt - translatiert. Das so gebildete Protein durchläuft eine Reihe von Modifikationen, wird abgebaut und erlangt auf dem Weg Zugang zum Zellkern, wo es die Aktivierung seines eigenen Gens inhibiert. Aus diesem Grund spricht man vom negativen Element der Uhr. Die positiven Elemente oszillieren selbst allenfalls schwach oder überhaupt nicht.

Mit entsprechendem Turnover sinken die Menge der mRNA des Oszillators und die Menge wie auch die Neusynthese des entsprechenden Proteins. Der fortschreitende Abbau des Proteins erlaubt schließlich ein erneutes Einsetzen der Transkription.

Die Menge des Uhrenproteins erreicht ihr Maximum erst mit einer gewissen Verzögerung im Vergleich zur Menge seiner mRNA. Dadurch wird gewährleistet, dass die Synthese des Oszillators nicht zu schnell gedämpft wird und infolgedessen zum Erliegen kommt. Die Mechanismen, welche dieser Zeitverzögerung zugrunde liegen, sind nicht vollständig aufgeklärt, es handelt sich aber wahrscheinlich um eine posttranskriptionelle Regulation. Mögliche Regulatoren sind z. B. tageszeitabhängiges Spleißen der mRNA (Cheng et al.,

1998; Stanewsky et al., 1997), regulierter Kernimport der Transkriptionsfaktoren (Vielhaber et al., 2000), Sekundärstrukturen der mRNA, die zu einer verzögerten Translation führen und RNA-bindende Proteine, die einen ähnlichen Effekt haben.

1.2 *Neurospora crassa* als circadianes Modellsystem

Der filamentöse Pilz *N. crassa* wurde bereits vor 50 Jahren als Modellorganismus für die Erforschung der circadianen Rhythmik etabliert (Pittendrigh et al., 1959). Seine nützlichsten Eigenschaften hierbei sind vor allem ein gut zu beobachtender circadianer Phänotyp sowie seine Zugänglichkeit für eine Reihe gut etablierter genetischer und molekularbiologischer Methoden. Seit dem Jahr 2003 ist das Genom vollständig sequenziert (Galagan et al., 2003; Borkovich et al., 2004). Die am weitesten verbreitete Methode der Untersuchung circadianer Phänotypen ist der sog. *race tube assay*. *Race tubes* sind Glasröhren, die mit Kulturmedium gefüllt sind und mit *N. crassa* inokuliert werden (Loros und Dunlap, 2001). Das Pilzmycel breitet sich im Wachstum entlang der Röhre aus. Dabei „dokumentiert“ *Neurospora* quasi seinen circadianen Rhythmus durch die abwechselnde Ausbildung von Zonen mit relativ feinem, durchscheinendem Mycel, gefolgt von dichteren Abschnitten, den sog. Banden, die durch die Bildung der Lufthyphen mit den asexuellen Sporen (Konidien) entstehen (s. auch Abb. , Kap. 2.2.1.3). Dieses einzigartige Wachstumsverhalten folgt bei Wildtyp-Stämmen unter freilaufenden Bedingungen bei konstanter Temperatur und Dauerdunkelheit (DD) einem konstanten Rhythmus von 22 Stunden und zeigt alle Merkmale circadianer Kontrolle: es dauert ungefähr einen Tag, reagiert auf Reize mit Phasenverschiebung und ist kompensiert in Temperatur und Nährstoffangebot. Auch mit molekularbiologischen Methoden lassen sich die circadianen Expressionsmuster und deren Abweichung in bestimmten circadianen Phänotypen verfolgen. Im Jahr 2003 entwickelten Morgan et.al. einen Luciferase-Reportergen-Assay, der es ermöglicht, die Aktivität von uhrenregulierten Gene *in vivo* direkt zu dokumentieren.

Die leicht durchzuführenden *race tube assays* führten so zur Entdeckung verschiedener Uhrenmutanten (Feldman und Hoyle, 1973) und zur Identifizierung (Feldman und Hoyle, 1976) und späteren Klonierung (McClung et al., 1989) des *frequency*-Locus (*frq*), wodurch das erste zentrale Element der circadianen Rhythmik in *N. crassa* entdeckt war.

1.3 Die molekularen Komponenten der circadianen Uhr von *N. crassa*

Zentrales Ziel der Erforschung circadianer Uhren ist es, zu verstehen, wie circadiane Oszillatoren auf molekularer Ebene aufgebaut und reguliert werden, um einen endogenen circadianen Rhythmus zu erzeugen. Um dies zu erreichen, werden immer neue Komponenten

der inneren Uhr identifiziert und ihre Regulation und Interaktion erforscht. Seit der Klonierung von *frq*, dem zweiten bei Eukaryoten klonierten circadianen Uhrengen (McClung et al., 1989), wurden mehr als 10 weitere Komponenten der circadianen Uhr von *N. crassa* identifiziert (Tabelle 1.1), von denen FRQ, WC-1 und WC-2 als Herzstück der circadianen Uhr bezeichnet werden. Die anderen Gene und ihre Produkte dienen der posttranslationalen Regulation und dem Abbau von FRQ, dessen Modifizierung im Laufe eines circadianen Tages einer der wichtigsten Abläufe innerhalb des Zusammenspiels der Uhrenkomponenten ist. Die Entdeckungen und Studien dieser Komponenten haben die circadiane Uhr von *N. crassa* zu

Uhrenprotein	Funktion
FRQ (<i>frequency</i>)	Essentiell für die Funktion der Uhr. Wirkt im Zellkern als negatives Element der autoregulativen circadianen Rückkopplungsschleife durch die Inaktivierung des WCC. Im Cytosol stabilisiert es die Assemblierung des WCC und wirkt so als positives Element.
WC-1 (<i>white collar 1</i>)	Essentiell für die Funktion der Uhr. Bildet mit WC-2 den heterodimeren Transkriptionsfaktor WCC (<i>white collar complex</i>) und aktiviert als positives Element der autoregulativen circadianen Rückkopplungsschleife die Transkription sowohl von <i>frq</i> als auch der <i>ccgs</i> . Als Blaulicht-Photorezeptor wird WC-1 benötigt, um sowohl die circadiane Uhr mit dem Tag-Nacht-Zyklus zu synchronisieren als auch um alle anderen bekannten Lichtreaktionen in <i>N. crassa</i> zu vermitteln.
WC-2 (<i>white collar 2</i>)	Essentiell für die Funktion der Uhr. Interaktionspartner von WC-1.
FRH (<i>frq-interacting rna helicase</i>)	Essentielle RNA-Helikase. Interagiert mit FRQ bei der Inaktivierung des WCC. Die genaueren Mechanismen sind noch unbekannt.
CK-1a (<i>casein kinase 1a</i>)	Hochkonservierte Komponente der Uhr. Bindet und phosphoryliert FRQ und vermittelt so dessen proteasomalen Abbau. Beteiligt an der FRQ-vermittelten Phosphorylierung (und damit Inaktivierung) des WCC.
CKA, CKB1, und CKB2 (<i>casein kinase II</i>)	Essentiell für die Funktion der Uhr. Phosphoryliert FRQ <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> und reguliert so dessen Stabilität und Repressorfunktion. Beteiligt an der FRQ-vermittelten Phosphorylierung (und damit Inaktivierung) des WCC.
CAMK-1 (<i>calcium/calmodulin-dependent protein kinase I</i>)	Phosphoryliert FRQ. Mutation führt zu leichten Veränderungen der lichtinduzierten Phasenverschiebung und der Periode.
PP1 (<i>protein phosphatase I</i>)	Dephosphoryliert FRQ und reguliert möglicherweise dessen Stabilität
PP2A (<i>protein phosphatase 2a</i>)	Reguliert die negative Rückkopplungsschleife, möglicherweise durch Dephosphorylierung von FRQ und WCC
FWD-1 (<i>F-box and WD40 repeat-containing protein 1</i>)	Essentielles Gen. Substratbindende Untereinheit des SCF-Komplexes, vermittelt die Ubiquitinierung von FRQ und so seinen Abbau.

Tab. 1.1: Die Komponenten der circadianen Uhr von *N. crassa* im Überblick

einem der am besten verstandenen Uhrensyste unter den Eukaryoten gemacht.

1.3.1 Die circadian regulierten Rückkopplungsschleifen von *N. crassa*

Die circadiane Uhr von *N. crassa* funktioniert durch eine autoregulative negative Rückkopplungsschleife, die den circadianen Rhythmus generiert (Dunlap, 1999; Young und Kay, 2001). Das positive Element bei *N. crassa* sind die beiden Transkriptionsfaktoren WC-1 und WC-2, als negatives Element dient FRQ, das mit FRH interagiert (Aronson et al., 1994a; Cheng et al., 2005; Crosthwaite et al., 1997; Linden et al., 1999). Abb. 1.2 zeigt unser derzeitiges Wissen der circadianen Rückkopplungsschleife von *N. crassa*. Während der späten (subjektiven) Nachtstunden im Dauerdunkel aktiviert der nukleäre heterodimere WC-Komplex (WCC), bestehend aus WC-1 und WC-2, das Gen *frq* durch Bindung an dessen Promotor (Froehlich et al., 2003). Diese Transkriptionsaktivierung führt zu einer Zunahme der *frq*-mRNA (Cheng et al., 2001b; Crosthwaite et al., 1997), deren Maximum in den (subjektiven) frühen Morgenstunden erreicht wird (Aronson et al., 1994a). Das FRQ-Protein erreicht sein Maximum dagegen später am Tag, mit einer vier- bis sechsstündigen Phasenverschiebung in Relation zur Oszillation der mRNA (Garceau et al., 1997). FRQ bildet homomeres Dimer und interagiert mit FRH (Cheng et al., 2001a, 2005). Obwohl der größte Teil von FRQ sich im Cytosol anreichert, wird doch ein signifikanter Anteil in den Zellkern transportiert und wirkt dort als Repressor der WCC-Aktivität, wodurch die *frq*-mRNA-Menge ungefähr ab dem (subjektiven) Mittag wieder sinkt und ihr Minimum gegen Mitte der (subjektiven) Nacht erreicht (Aronson et al., 1994a). Die Inhibierung der WCC-Aktivität geschieht durch Phosphorylierung dieses Transkriptionsfaktors, vermittelt durch FRQ (Schafmeier et al., 2005). Durch die Phosphorylierung sinkt die DNA-Bindekapazität des WCC und die Transkription von *frq* wird gestoppt (He und Liu, 2005; He et al., 2005b; Schafmeier et al., 2005). Um als Repressor wirken zu können, muss FRQ von CKII (Casein Kinase II) phosphoryliert werden (Yang et al., 2002, 2003, 2004).

Um die Inhibierung der WCC-Aktivität aufzuheben, muss FRQ zum richtigen Zeitpunkt abgebaut werden. Dies geschieht über einen phosphorylierungsabhängigen Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbauweg (Görl et al., 2001; He et al., 2003; Liu, 2005; Liu et al., 2000; Yang et al., 2001, 2002, 2003, 2004). Direkt nach der Synthese wird FRQ sofort und im Laufe der Zeit fortschreitend von verschiedenen Kinasen phosphoryliert, darunter Casein-Kinase 1a (CK-1a), CKII, und eine Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase (CAMK-1). Ist ein Maximum an Phosphorylierung erreicht, wird FRQ von FWD-1 rekrutiert, ein F-Box/WD-40-Protein, das als substratbindende Untereinheit zu einem Ubiquitin-Ligase-

Komplex des SCF-Typs (Skip-Cullin-F-Box) gehört. Dieser Komplex ubiquitiniert FRQ, welches dann vom Proteasom abgebaut wird. Fällt die FRQ-Menge unter eine kritische Schwelle, wird die Inhibierung des WCC aufgehoben und die Transkription von *frq* beginnt in der (subjektiven) späten Nacht erneut.

Neben seiner Funktion als Inhibitor der WCC-Aktivität wirkt FRQ jedoch auch stabilisierend auf WC-1 und WC-2 und sorgt so für eine positive Rückkopplung (Cheng et al., 2001b, 2002; Lee et al., 2000; Merrow et al., 2001; Schafmeier et al. 2006). Der genaue molekulare Mechanismus wurde vor kurzem erst von Schafmeier et al. identifiziert, es war jedoch bekannt, dass FRQ die Expression von WC-1 unabhängig von WC-2 posttranskriptionell reguliert (Brunner und Kaldi 2008; Cheng et al., 2001b, 2002; Lee et al.,

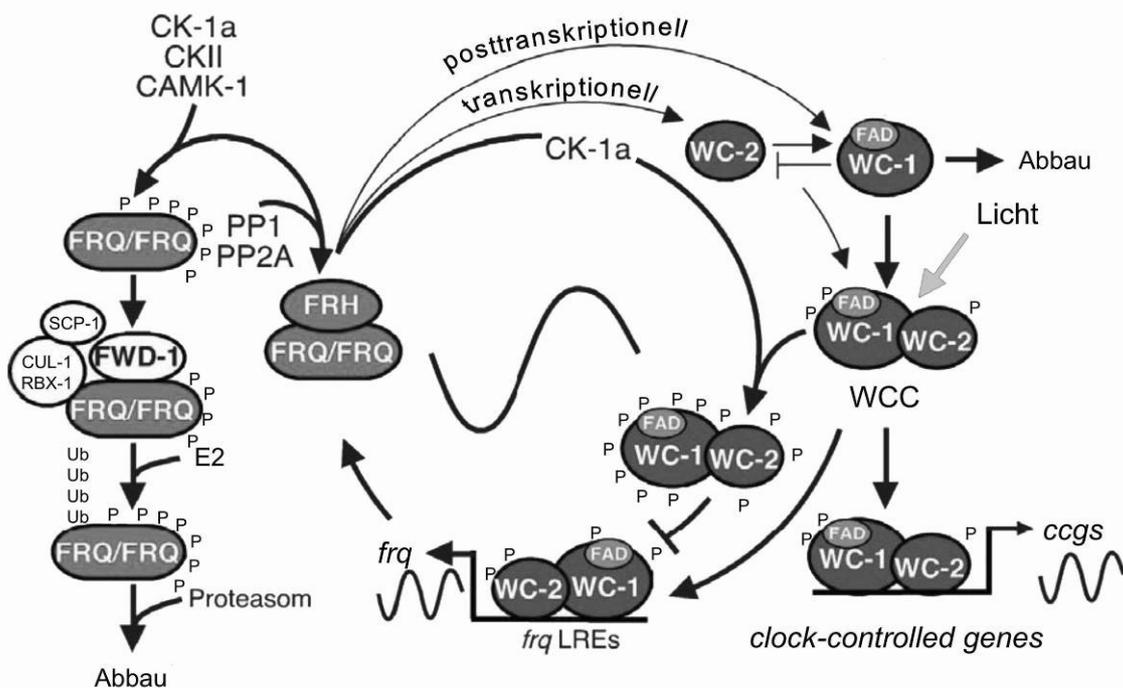


Abb. 1.2 (modifiziert nach Heintzen und Liu, 2007): Schematische Darstellung der circadianen Rückkopplungsschleifen (soweit bekannt). Hypophosphorylierter WCC bindet an die lichtresponsiven Elemente (LRE) des *frq*-Promotors und aktiviert die Transkription von *frq*. FRQ di- oder multimerisiert und interagiert mit einer RNA-Helikase (FRH). Die Funktion dieser Interaktion ist unbekannt. FRQ rekrutiert CK-1a, gelangt in den Kern und vermittelt dort die Phosphorylierung und damit die transkriptionelle Inaktivierung des WCC. Durch die Inaktivierung verliert WCC die Bindung an die DNS und wird stabilisiert. Die Bildung von WC-1 und WC-2 wird auf posttranskriptioneller und transkriptioneller Ebene von FRQ stimuliert, während WC-1 und WC-2 ihren Expressionslevel gegenseitig sowohl negativ als auch positiv regulieren. Der genaue Mechanismus dieser Regulation ist noch unbekannt, vermutlich tragen diese „kleinen“ Rückkopplungsschleifen zur Robustheit des zentralen Oszillators bei. Als Blaulichtrezeptor dient das FAD-bindende WC-1. Der WCC aktiviert auch die sog. uhrenkontrollierten (*clock-controlled genes*, *ccgs*) sowie die lichtinduzierten Gene, die dann wiederum die circadian gesteuerten physiologischen Veränderungen bewirken (z.B. Konidienbildung). Der Abbau von FRQ ist entscheidend und wird vermittelt durch fortschreitende Phosphorylierung von FRQ durch die Kinasen CK-1a, CAMK-1, CKII (und möglicherweise weiterer) sowie antagoniert durch die Dephosphorylierung durch Phosphatase PP1 und PP2A. Hoch phosphoryliertes FRQ wird von FWD gebunden, einem F-Box/WD40-Protein, der Substrat-rekrutierenden Untereinheit einer E3-Ubiquitin-Ligase vom SCF-Typ. Weitere Bestandteile dieses Komplexes sind SKP-1, Cullin und RBX-1, ein Protein mit RING-Domäne. Durch Bindung an den SCF-Komplex wird FRQ ubiquitiniert und proteasomal abgebaut.

2000, Schafmeier et al. 2006), während die Expression von WC-2 auf der Ebene der Transkription unterstützt wird (Cheng et al., 2001b). Der WCC ist in seiner aktiven, DNA-gebundenen Form instabil und wird schnell abgebaut, in der phosphorylierten, inaktiven, nicht DNA-gebundenen Form jedoch stabil. Diese stabilisierende Phosphorylierung ist abhängig von FRQ (Schafmeier et al., 2008). Die Tatsache, dass ähnliche ineinandergreifende positive Rückkopplungsschleifen auch in *Drosophila* und Säugetieren gefunden wurden, unterstützt die These, dass es sich hier um einen verbreiteten regulatorischen Mechanismus der eukaryotischen Uhr handelt (Glossop et al., 1999; Shearman et al., 2000b).

Durch die Expression von WC-1 und WC-2 unter der Kontrolle konstitutiver Promotoren konnte gezeigt werden, dass die positiven Rückkopplungsschleifen eine wichtige Rolle für die Robustheit und Stabilität der circadianen Uhr von *N. crassa* spielen, da sowohl die physiologische als auch die molekulare Oszillation stärker ausgeprägt sind, wenn die Menge der WC-Proteine auf diese Art künstlich erhöht wird (Cheng et al., 2001b). Interessanterweise änderte dieser Eingriff in die circadiane Uhr nur wenig an der Periode der Uhr, ein Phänomen, dass in ähnlicher Weise später auch in *Drosophila* beobachtet wurde (Kim et al., 2002). Während also eine Oszillation der WC-Proteine für eine funktionelle Rückkopplung nicht nötig ist, scheint das richtige Ineinandergreifen der Rückkopplungsschleifen für die Stabilität der Periodenlänge von ca. 24 Stunden wichtig zu sein, ein Mechanismus, der möglicherweise bei der Temperaturkompensation eine Rolle spielt. Ähnliche Rückschlüsse wurden aus Beobachtungen an *Drosophila* und Säugetieren gezogen (Kim et al., 2002; Preitner et al., 2002).

WC-1 und WC-2 regulieren sich auch gegenseitig und bilden so eine weitere Rückkopplungsschleife: während WC-2 durch die Bildung des WCC WC-1 stabilisiert, wirkt WC-1 als Repressor der Transkription von WC-2 (Cheng et al., 2002, 2003b). Diese gegenseitige Regulation optimiert die Akkumulation dergestalt, dass sowohl seine Funktion als Blaulicht-Rezeptor als auch innerhalb der Uhr mit der erforderlichen Sensivität funktionieren.

1.3.2 Die Aktivatoren der negativen Rückkopplungsschleife: WC-1 und WC-2

Ähnlich wie bei den positiven Elementen der Oszillatoren von *Drosophila* und Säugern handelt es sich bei WC-1 und WC-2 um Transkriptionsfaktoren mit PAS-Domänen (PER-ARNT-SIM) (Ballario et al., 1996; Linden und Macino, 1997). Das größere WC-1 hat dabei drei, WC-2 nur eine PAS-Domäne, und beide sind Zinkfinger-Proteine des GATA-Typs, die zum überwiegenden Teil im Zellkern lokalisiert sind (Lee et al., 2000; Schwerdtfeger und

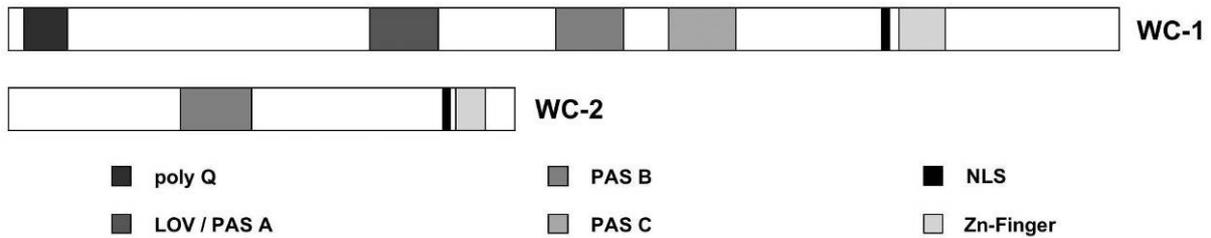


Abb. 1.3: Maßstabsgetreue schematische Darstellung von WC-1 und WC-2 mit den wichtigsten bisher identifizierten Domänen. Abkürzungen: polyQ = Glutaminreiche Sequenz, LOV = *light-oxigene-voltage*, licht-sensitive Domäne mit Flavin, PAS = Per-Arnt-Sim-Domäne, NLS = *n*ucleäres *l*okalisations*s*ignal, Zn-Finger = Zinkfinger-DNS-Bindedomäne des GATA-Typs. Die einzige PAS-Domäne von WC-2 trägt keine Zusatzbezeichnung.

Linden, 2000). WC-1 und WC-2 aktivieren das Gen *frq* durch Bindung über einen Zink-Finger an sogenannte *clock-responsive elements* (CRE) in dessen Promotor (Froehlich et al., 2003). Die N-terminale der drei PAS-Domänen (s. Abb. 1.3) von WC-1 ist licht-, sauerstoff- und spannungssensitiv und wird deshalb als LOV-Domäne bezeichnet (*light-oxigen-voltage*). Sie bindet ein Flavin als Chromophor, dient als Sensor für Licht aus dem blauen Spektrum und vermittelt alle bekannten Lichtreaktionen in *N. crassa* (Liu, 2003; Liu et al., 2003). Die anderen PAS-Domänen, PASB und PASC, sind weniger stark konserviert, zeigen aber Ähnlichkeit zu denen der Uhrenproteine BMAL1 und CYC von *Drosophila* und Säugern (Lee et al., 2000).

Über die PASC-Domäne von WC-1 und die einzige PAS-Domäne von WC-2 bilden die beiden Proteine einen heteromeren Komplex (Cheng et al., 2002, 2003; Talora et al., 1999). In Stämmen, deren *wc-2* deletiert oder in denen die WC-1-WC2-Interaktion unterbrochen wurde (etwa durch Deletion oder Mutation der entsprechenden PAS-Domänen), ist die WC-1-Menge sehr niedrig, was darauf schließen lässt, dass WC-2 durch die Bildung des WCC einen stabilisierenden Einfluss auf WC-1 hat (Cheng et al., 2002).

FRQ-Protein und *frq*-mRNA sind in *wc*-Mutanten schwach bis gar nicht nachweisbar (Crosthwaite et al., 1997), ektopische Expression von WC-Protein in *wc*-Mutanten (sog. *rescue*-Stämme) jedoch führt schnell zu einer Transkription von *frq*. WCC ist also nachweislich der direkte Aktivator von *frq* (Cheng et al., 2001b). Der *frq*-Promotor enthält unterschiedliche Bindestellen für den WCC: im Dauerdunkel (DD) bindet der D-WCC (Dunkel-WCC) direkt an die sog. *clock-box* (C-Box), ein distales LRE mit zwei GATG-Wiederholungen (Froehlich et al., 2003). DNA-Binde-Experimente *in vitro* haben gezeigt, dass D-WCC der circadianen Rhythmik folgend an die C-Box bindet und dass deren Zerstörung durch Mutation zu circadianer Arrhythmizität führt (Froehlich et al., 2003). Diese Bindung wurde durch Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) auch *in vivo* nachgewiesen

(He und Liu, 2005). Dass auch *in vitro* rekonstituierter WCC an die lichtresponsiven Elemente des *frq*-Promotors binden können, lässt den Schluss zu, dass für die DNA-Bindung keine weiteren Komponenten erforderlich sind (Froehlich et al., 2003; He et al., 2005b). Die Aktivierung von *frq* im Dunkeln erfordert die Zinkfinger-DNA-Bindedomäne von beiden WC-Proteinen. Wird bei einem der Proteine der Zinkfinger deletiert, findet keine Dunkelaktivierung mehr statt (Cheng et al., 2002; Collett et al., 2002; Crosthwaite et al., 1997). Im Gegensatz dazu braucht die Lichtaktivierung der *frq*-Transkription (abgesehen von der LOV-Domäne von WC-1) nur die DNA-Bindung von WC-2 (Cheng et al., 2003). Diese beiden molekular unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen (He et al., 2002) erlauben sowohl einen robusten circadianen Rhythmus unter freilaufenden Bedingungen als auch die Anpassung bzw. Neuprogrammierung der Uhr durch Signale der Umwelt.

1.3.3 Die negativen Elemente des circadianen Oszillators: FRQ und FRH

Unter den ersten Uhrenmutanten, die in Eukaryoten entdeckt wurden, waren *Neurospora*-Stämme mit Mutationen im *frq*-Locus, und so wurde bald deutlich, dass *frq* eine zentrale Rolle in der circadianen Uhr von *N. crassa* spielt (Feldman und Hoyle, 1973; Loros et al., 1986). Mutationen des *frq*-Gens führten entweder zu verlängerten (frq^1 , frq^7) oder zu verkürzten (frq^2 , frq^3) Perioden der Uhr (mit Periodenlängenvariationen von 16 bis 35 Stunden) oder zu Arrhythmizität (frq^9) (Aronson et al., 1994b; Liu et al., 2000). Eine Deletion des Leserahmens (frq^{10}) zerstört sowohl die Rhythmizität als auch die Temperaturkompensation der circadianen Uhr (Aronson et al., 1994b; Loros und Feldman, 1986). Ebenso wird *N. crassa* arrhythmisch durch die Expression von FRQ durch einen konstitutiven Promotor (Aronson et al., 1994a). Die rhythmische Expression von FRQ und sein Abbau zur rechten Zeit sind also essentiell für die Aufrechterhaltung der Uhrenfunktion. Wird *frq* dagegen durch einen induzierbaren Promotor exprimiert, kommt es ähnlich wie bei einem Lichtpuls unter freilaufenden Bedingungen in DD zu einer Umstellung der Uhr und infolgedessen zu einer Phasenverschiebung (Crosthwaite et al., 1995; Huang et al., 2006; Liu et al., 1998). Ab einem bestimmten Zeitpunkt seiner Expression im Laufe des circadianen Tages hemmt FRQ seine eigene Transkription (Aronson et al., 1994a; Mellow et al., 1997). Im mutierten frq^9 -Stamm (der aufgrund einer Punktmutation im Codon der Aminosäure 669 ein verkürztes FRQ exprimiert) ist die Menge der *frq* mRNA konstant hoch; exprimiert man in diesem Stamm jedoch Wildtyp-FRQ durch einen induzierbaren Promotor, so wird die Expression der mRNA reprimiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass FRQ das zentrale

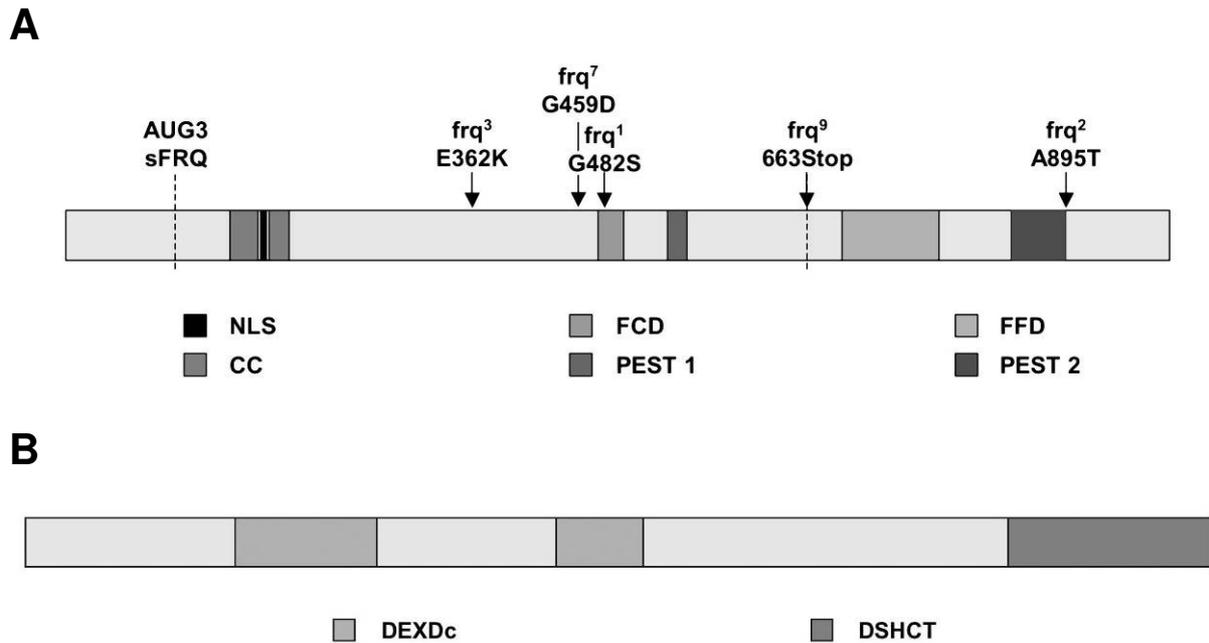


Abb. 1.4: Schematische Darstellung von FRQ und FRH. **(A)** FRQ mit den wichtigsten bisher identifizierten Domänen und circadian relevanten Punktmutationen. Die Verkürzungen des Proteins durch den internen Translationsstart von sFRQ am AUG3 sowie das durch Punktmutation entstandene Stop-Codon von *frq*⁹ (arrhythmisch) sind durch gestrichelte Linien markiert. Weitere Punktmutationen, die circadiane Phänotypen hervorrufen, sind durch Pfeile gekennzeichnet: *frq*³ und *frq*⁷ haben in DD eine gegenüber dem *wt* (22 h) verlängerte (24 und 29 h), *frq*¹ und *frq*² eine verkürzte Periodenlänge (ca. 16,5 und 19 h). Die genauen Mechanismen sind nicht bekannt. Abkürzungen: NLS = nucleäres Lokalisationssignal, CC = *coiled coil*, FCD = FRQ-CK-1a-Interaktionsdomäne, PEST = Prolin(P)-Glutamat(E)-Serin(S)-Threonin(T)-Domäne, FFD = FRQ-FRH-Interaktionsdomäne. **(B)** Die FRQ-interagierende Helikase FRH. DEXDc = DEAD/DEAH-Domäne, DSHCT = HelikaseC-Domäne.

Element der negativen Rückkopplungsschleife von *N. crassa* ist (Dunlap, 1999; Loros und Dunlap, 2001).

Die natürliche Form von FRQ ist insgesamt 989 Aminosäuren groß (ca. 110 kDa) und besitzt als einziges bisher experimentell nachgewiesenes strukturelles Element eine *coiled coil*-Domäne am Aminoende (s. Abb. 1.4), über die das Protein Dimere oder sogar Multimere bildet (Cheng et al., 2001a). Da FRQ bei einer Gelfiltration in einem Größenbereich zwischen ca. 250 bis >670 kDa in einen breiten Peak eluiert, ist es wahrscheinlich, dass das FRQ-Dimer mit verschiedenen weiteren Proteinen komplexiert ist (Görl, 2002). Diese Dimerisierung ist essentiell für die Funktion der Uhr. *In vivo* existieren zwei alternative Translationsformen von FRQ, die aufgrund ihres leichten Größenunterschiedes als IFRQ (*large* oder *long* FRQ) oder sFRQ (*small* oder *short* FRQ) bezeichnet werden. sFRQ ist wegen seines alternativen Translationsstarts am AUG3 (Met100) um 99 Aminosäuren kleiner als IFRQ, eine Folge eines temperaturabhängigen alternativen Splicings der mRNA (Garceau et al., 1997; Liu et al., 1997; Colot et al., 2005; Diernfellner et al., 2005). Obwohl der weitaus größere Teil von FRQ im Cytosol lokalisiert ist, enthält auch der Zellkern eine kleine, aber signifikante Menge von

FRQ. Diese Kernlokalisierung ist ebenfalls essentiell für die Funktion der circadianen Uhr (Luo et al., 1998), denn dort vermittelt FRQ die Phosphorylierung und damit Inaktivierung des WCC (Schafmeier et al., 2006). Cytoplasmatisches FRQ dagegen unterstützt die Akkumulation des WCC (Schafmeier et al., 2006).

FRH ist ein weiteres Protein, das in die Funktion der circadianen Uhr involviert ist (Cheng et al., 2005). Entdeckt wurde es als FRQ-interagierendes Protein bei einer Aufreinigung von FRQ aus Zellextrakt. Es handelt sich um ein Protein aus 1106 Aminosäuren (124 kDa) mit zwei DEAD/DEAH-Domänen und einer HelicaseC-Domäne, die beide auch in Mitgliedern der DExD/H-RNA-Helicase-Familie gefunden wurden. FRH gehört zur SKI2-Unterfamilie der RNA-Helicasen, die sowohl in Pilzen als auch in Säugern vorkommt. Sein Homolog in *Saccharomyces cerevisiae*, Dob1p/Mtr4p, bindet RNA und ist ein essentieller nukleärer Kofaktor des Hefe-Exosoms, ein wichtiger Regulator des RNA-Metabolismus in Eukaryoten (Allmang et al., 1999; de la Cruz et al., 1998; Hilleren und Parker, 2003; Jacobs et al., 1998; Mitchell und Tollervey, 2000; Torchet et al., 2002). Im Gegensatz zu den anderen Kernelementen der circadianen Uhr (FRQ, WC-1 und WC-2) ist FRH essentiell, ein Knockout-Stamm ist nicht lebensfähig. Experimente mit induzierbarer *frh*-RNAi zeigten, dass niedrige Expression von FRH einhergehen mit niedrigen FRQ-Mengen sowie Arrhythmizität, was die Rolle von FRH als Komponente der circadianen Uhr bestätigt (Cheng et al., 2005). Eine Konsequenz der geringen FRQ-Menge durch geringe FRH-Expression war eine erhöhte Menge von *frq*-mRNA, was auf eine Rolle in der negativen Rückkopplungsschleife der circadianen Uhr hinweist. Die bekannteste Funktion von RNA-Helicasen ist die Bindung und Entwindung von RNA, im Gegensatz zur Lokalisation dieser Funktion im Zellkern ist jedoch der größte Teil des FRQ-FRH-Komplexes cytosolisch. Da das FRH-Homolog der Hefe, Dob1p/Mtr4p, ein Kofaktor des Exosoms ist, könnte vielleicht auch FRH mit FRQ an RNA binden und deren Funktion und Abbau direkt circadian regulieren. Die genaue Funktion eines FRQ-FRH-Komplexes ist bis dato unbekannt. Bei Säugern ist jedoch ebenfalls ein RNA-bindendes Protein, NONO, mit PER1 assoziiert und scheint in der circadianen Uhr sowohl von Säugern als auch von *Drosophila* eine wichtige Rolle zu spielen (Brown et al., 2005).

Ein arrhythmischer *N. crassa*-Stamm, der aus einer EMS-Mutagenese hervorging, aber keine Mutation in einem der drei Haupt-Uhrenproteine trägt, wurde vor kurzem als Träger einer Punktmutation im FRH-Gen identifiziert. FRH(R806H) ist im Gegensatz zu einem *frh*-Knockout lebensfähig und auch nicht in irgendeiner Weise in Wachstum oder Konidienbildung beeinträchtigt. In diesem Stamm sind die FRQ-Mengen sehr hoch, während WCC sowohl reduziert als auch hypophosphoryliert ist (Shi et al., 2009, n. n. erschienen).

Dies zeigt, dass FRH sowohl an der positiven als auch an der negativen Rückkopplungsschleife beteiligt ist.

1.3.4 Inhibition des WCC durch FRQ

Vergleichbar zu negativen Elementen der circadianen Uhr in *Drosophila* und Säugern vermitteln FRQ und FRH die Inaktivierung des WCC und schließen die negative circadiane Rückkopplungsschleife (Cheng et al., 2001a; Denault et al., 2001; Mellow et al., 2001). Obwohl eine direkte Interaktion von FRQ und WCC nachweisbar ist, sind die Mengen dieses Komplexes doch so gering (Cheng et al., 2005; He et al., 2002; Schafmeier et al., 2005), dass eine Inhibition durch direkten physischen Kontakt (etwa durch Blockieren der DNA-Bindedomänen) nicht wahrscheinlich ist. Dies wird bei einer einfachen Auflistung der Stöchiometrie der einzelnen Komponenten und ihrer Lokalisation klar: WC-1 und WC-2 sind als Transkriptionsfaktoren zum überwiegenden Teil im Zellkern lokalisiert (Schwerdtfeger und Linden, 2000; Talora et al., 1999) und WC-1 limitiert die Bildung des WCC (Cheng et al., 2001b; Denault et al., 2001). Auch wenn FRQ und WC-1 ungefähr in gleicher Anzahl in der Zelle vorliegen, so ist doch FRQ im Gegensatz zu WCC zu über 90 % im Cytoplasma lokalisiert (Cheng et al., 2001a, 2005; Luo et al., 1998). Wahrscheinlicher ist also eine eher vermittelnde oder signalgebende Funktion.

Beide WC-Proteine sind – ähnlich wie FRQ – *in vivo* phosphoryliert (He et al., 2005b; Schafmeier et al., 2005; Schwerdtfeger und Linden, 2000; Talora et al., 1999). Der phosphorylierte Zustand im Dauerdunkel geht durch Belichtung in eine Hyperphosphorylierung über. Durch Aufreinigung von WCC aus *N. crassa* und Massenspektrometrie konnten fünf wesentliche *in vivo* Phosphorylierungsstellen von WC-1, unmittelbar C-terminal der Zinkfinger-DNA-Bindedomäne identifiziert werden (He et al., 2005b). Diese Phosphorylierungen sind lichtunabhängig: werden die entsprechenden Aminosäuren mutiert, zeigt *N. crassa* im Dauerdunkel Phänotypen wie kurze Periode, niedrige Oszillationsamplitude oder Arrhythmizität. Trotz niedrigen Mengen von WC-1 zeigen diese Mutanten normale bis leicht erhöhte Mengen von *frq*-mRNA und FRQ-Protein und eine frühere Transkriptionsaktivierung von *frq*. Phosphorylierung dieser Aminosäuren reguliert also die WCC-Aktivität negativ und ist ein essentieller Schritt in der Regulierung der circadianen Uhr.

Diese lichtunabhängige Phosphorylierung ist abhängig von FRQ (Schafmeier et al., 2005). In Stämmen mit funktionslosem FRQ wie *frq*¹⁰ (Knockout) oder *frq*⁹ (verkürztes Protein) sind sowohl WC-1 als auch WC-2 hypophosphoryliert, ihre Phosphorylierung kann jedoch durch

ektopische Expression von FRQ wiederhergestellt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Transkription von *frq* hypophosphoryliertes WC-Protein erfordert. Der aufgereinigte FRQ-FRH-Komplex kann *in vitro* die Bindung von WCC an DNA nicht inhibieren – ein weiterer Hinweis auf die Unwahrscheinlichkeit, dass FRQ WCC durch einfache physische Interaktion inhibiert. Einer Bindung des WCC an die lichtresponsiven Elemente des *frq*-Promotors wiederum geht dessen Dephosphorylierung voraus (He und Liu, 2005). Diese Erkenntnisse unterstützen ein Modell, nach dem FRQ mit FRH die Phosphorylierung des WCC vermittelt und diesen damit inaktiviert. FRQ hätte somit die Funktion einer Substrat-rekrutierenden Untereinheit einer oder mehrerer Kinasen, welche dann WC-1 und WC-2 phosphorylieren und deren DNA-Bindung aufheben.

Um dieses Modell zu verifizieren, wurden die beteiligten Kinasen identifiziert und die FRQ-abhängige Phosphorylierung des WCC *in vitro* nachvollzogen. Zu den FRQ-abhängig aktiven Kinasen gehören CK-1a und CKII, die WC-1 und WC-2 *in vitro* und *in vivo* phosphorylieren (Cheng et al., 2005; Görl et al., 2001; He et al., 2006). Protein-Kinase C (PKC) war unter den ersten Kandidaten, von denen angenommen wurde, sie würden den C-Terminus von WC-1 phosphorylieren und sowohl den Abbau von WC-1 als auch dessen Rolle in der Lichtreaktion regulieren (Franchi et al., 2005). Bis heute wurde jedoch kein Nachweis erbracht, dass PKC WC-1 tatsächlich *in vivo* phosphoryliert und ob dies bei der negativen circadianen Rückkopplung eine Rolle spielt. Konservierte Proline in zwei der fünf Phosphorylierungsstellen deuten eher auf eine Kinase hin, die bevorzugt solche Prolin-Serin-Motive phosphoryliert (He et al., 2005b; Sancar et al., 2009). Diese Voraussetzung erfüllt Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), deren Bedeutung für die circadiane Uhr von *Drosophila* bereits bekannt ist (Martinek et al., 2001).

1.3.5 Die Stabilität von FRQ und ihr Einfluss auf die circadiane Rückkopplung

FRQ wird unmittelbar nach der Synthese phosphoryliert und im Laufe eines circadianen Tages setzt sich dieser Prozess fort (Garceau et al., 1997). Im Dauerdunkel zeigt sowohl die Menge des Proteins als auch sein Phosphorylierungsmuster einen robusten Rhythmus. FRQ ist also am (subjektiven) frühen Morgen hypophosphoryliert und am (subjektiven) Abend, bevor es abgebaut wird, hyperphosphoryliert. Frühe Studien der FRQ-Phosphorylierung zeigten, dass diese Phosphorylierung den Abbau des Proteins einleitet und damit ein bestimmender Faktor der Periodenlänge der circadianen Uhr ist (Liu et al., 2000). In der letzten Zeit zeigt sich jedoch ein zunehmend differenzierteres Bild: FRQ-Phosphorylierungen spielen in mehreren regulatorischen Prozessen der Uhr eine Rolle, und die beteiligten Kinasen

und Phosphatasen, die den Phosphorylierungsgrad von FRQ kontrollieren, sind wichtige Komponenten der circadianen Uhr von *N. crassa* (Görl et al., 2001; He et al., 2003; Liu, 2005; Liu et al., 2000; Yang et al., 2001, 2002, 2003, 2004). Zurzeit sind drei Kinasen (CKI, CKII und CAMK-1) und zwei Phosphatasen (PP1 und PP2A) als Regulatoren der FRQ-Phosphorylierung nachgewiesen.

1.3.5.1 Casein-Kinase 1a

Das Homolog dieses Proteins in *Drosophila*, DOUBLETIME (DBT), und die Säugerhomologe CKI ϵ und CKI δ phosphorylieren PER und spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Periodenlänge der circadianen Oszillatoren von Insekten und Säugern (Kloss et al., 1998; Lowrey et al., 2000; Price et al., 1998; Xu et al., 2005). Diese evolutionäre Konservierung der Funktion ließ Görl et al. (2001) auf einen ähnlichen Mechanismus in *N. crassa* schließen. Von den zwei CKI-Homologen in *N. crassa*, CK-1a und CK-1b, zeigt CK-1a die größere Ähnlichkeit zu DBT. Beide Kinasen phosphorylieren die PEST-Domänen von FRQ *in vitro*, jedoch nicht eine Region, in der drei bereits bekannte Phosphorylierungsstellen liegen. Co-Immunopräzipitationen zeigen außerdem, dass CK-1a mit FRQ *in vivo* interagiert, was durch eine Aufreinigung von FRQ bestätigt wurde (Cheng et al., 2005). Deletion oder Mutation der CK-1a-Bindedomäne (FCD, s. Abb. 1.4) und der benachbarten PEST1-Domäne des FRQ-Proteins führt zu einer deutlichen Hypophosphorylierung von FRQ sowie zu einer erhöhten Stabilität durch eine niedrigere Abbaurate. Dies deutet auf eine direkte Regulation der FRQ-Stabilität durch CK-1a hin. CK-1a phosphoryliert aber nicht nur FRQ, sondern vermittelt auch die FRQ-abhängige Phosphorylierung von WC-1 und WC-2 und damit die Inhibition der WCC-Aktivität (He et al., 2006). Eine Gendisruption von *ck-1b* dagegen bewirkt zwar Wachstums- und Entwicklungsdefekte, zeigt aber keine Veränderung im Phosphorylierungsmuster oder der Oszillation von FRQ, was darauf hindeutet, dass CK-1b keine entscheidende Rolle in der Funktion der circadianen Uhr von *N. crassa* spielt (Yang et al., 2003).

1.3.5.2 Calmodulin-Kinase 1

CAMK-1 war die erste potentielle FRQ-Kinase, die durch biochemische Aufreinigung von FRQ identifiziert wurde (Yang et al., 2001). Sie zeigt *in vitro* den stärksten Phosphorylierungseffekt und phosphoryliert v. a. die FRQ-Region von Aminosäure 501 bis 519. Eine Gendisruption von *camk-1* führt in *N. crassa* zu Wachstums- und Entwicklungsdefekten, allerdings nur vorübergehend: scheinbar kann der Verlust der

Funktion von anderen Kinasen ausgeglichen werden. Dadurch werden Aussagen über eine circadiane Funktion durch FRQ-Phosphorylierung *in vivo* erschwert. Phase, Periodenlänge und lichtinduzierte Phasenverschiebung der Uhr weichen in dieser Mutante jedoch leicht von denen des Wildtyps ab.

1.3.5.3 Casein-Kinase II

Mithilfe der *camk-1*-Mutante (s. o.) gelang es, CKII zusammen mit FRQ aufzureinigen (Yang et al., 2002). Ein Knockout von *cka*, der katalytischen Untereinheit von CKII, ist zwar im Gegensatz zu anderen Eukaryoten lebensfähig, zeigt aber schwere Wachstums- und Entwicklungsdefekte. Die Phosphorylierung von FRQ ist in dieser Mutante stark abweichend vom Wildtyp, der größte Teil des Proteins bleibt hypophosphoryliert, was auf eine Phosphorylierung durch CKII *in vivo* hindeutet. Eine signifikant höhere FRQ-Expression als im Wildtyp lässt außerdem darauf schließen, dass eine Phosphorylierung durch CKII zum proteasomalen Abbau von FRQ führt (Yang et al., 2002).

Hohe Expressionsmengen von hypophosphoryliertem FRQ gehen in dieser Mutante einher mit fehlender circadianer Oszillation von *frq*- und *ccg*-mRNA im Dauerdunkel, was auf eine Rolle von CKII als Uhrenkomponente schließen lässt. Trotz der hohen FRQ-Expression, wodurch eigentlich die Aktivität des WCC inhibiert werden sollte, ist die RNA-Menge von *frq* erhöht. Die negative Rückkopplung scheint in dieser Mutante nicht funktional und die Phosphorylierung von FRQ durch CKII erforderlich für dessen Funktion als Transkriptionsrepressor zu sein. Des Weiteren konnte in der *cka*-Mutante mehr WCC zusammen mit hypophosphoryliertes FRQ co-präzipitiert werden als im Wildtyp. CKII-Phosphorylierung von FRQ erfüllt also drei Funktionen in der circadianen Uhr von *N. crassa*: Vorbereitung des Abbaus von FRQ, Inhibition der WCC-FRQ-Interaktion und Vermittlung der Inaktivierung des WCC. (Yang et al., 2002). Letzteres wurde 2006 von He et al. bestätigt durch die Rolle von CKII bei der FRQ-abhängigen Phosphorylierung von WC-1 und WC-2.

Die Rolle von CKII in der circadianen Uhr von *N. crassa* wurde weiterhin bestätigt durch das Ausschalten des Gens einer der beiden regulatorischen Untereinheiten von CKII, *ckb1* (Yang et al., 2003). FRQ ist in dieser Mutante hypophosphoryliert und stabiler als im Wildtyp, die circadianen Rhythmen von Konidienbildung und FRQ-Proteinoszillation haben lange Perioden, aber eine niedrige Amplitude. Ein ähnlicher Phänotyp ergibt sich, wenn diverse CKII-Phosphorylierungsstellen des FRQ-Proteins mutiert werden. Interessanterweise ist CKII auch eine wichtige Komponente der circadianen Uhr von *Drosophila*, es

phosphoryliert PER und reguliert so seine Repressorfunktion in der negativen Rückkopplungsschleife (Nawathean und Rosbash, 2004).

1.3.5.4 Die Protein-Phosphatasen 1 und 2A (PP1 und PP2A)

PP1 und PP2A stellen die beiden Hauptgruppen der Proteinphosphatasen in eukaryotischen Organismen. Um ihren vielfältigen Aufgaben innerhalb der Zelle gerecht zu werden, sind sie mit einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen assoziiert. Sowohl PP1 als auch PP2A sind wichtige Regulatoren der circadianen Uhr von *N. crassa* (Yang et al., 2004). So zeigt eine partiell funktionale Mutante von *ppp-1* (bei der eine katalytische Untereinheit von PP1 eine *missense*-Mutation trägt) einen Phänotyp mit kurzer Periodenlänge und phasenverschobener, vorzeitiger Konidienbildung, der hervorgerufen wird durch einen schnelleren Abbau von FRQ. Eine Gendisruption von *rgb-1* (einer regulatorischen Untereinheit von PP2A) wiederum zeigt keine Veränderung der FRQ-Stabilität, aber ein verändertes Phosphorylierungsmuster des Proteins im Vergleich zum Wildtyp. Sowohl Protein- als auch mRNA-Menge von *frq* sind in dieser Mutante niedrig und die Oszillation der Uhr zeigt eine verlängerte Periode und niedrige Amplitude. PP1 und PP2A haben unterschiedliche Rollen in der circadianen Uhr von *N. crassa* und regulieren diese zusammen mit den verschiedenen Kinasen. PP1 unterstützt durch Dephosphorylierung die Stabilität von FRQ, während PP2A in der negativen Rückkopplungsschleife wirkt und den Phosphorylierungsstatus des WCC reguliert (Schafmeier et al., 2005). Durch das Drosophila-Homolog von RGB-1, TWS, konnte nachgewiesen werden, dass PP2A auch ein wichtiger Regulator der Fliegen-Uhr ist (Sathyanarayanan et al., 2004).

1.3.6 Proteasomale Degradation von FRQ

Der phosphorylierungsabhängige Abbau von FRQ passiert ähnlich wie der von PER bei Drosophila und Säugern über den Ubiquitin-Proteasom-Weg (Eide et al., 2005; Grima et al., 2002; He et al., 2003; Ko et al., 2002). Der Abbau von ubiquitiniertem FRQ geschieht mithilfe des F-Box/WD-40-Proteins FWD-1, dessen Drosophila-Homolog Slimb am proteasomalen Abbau von PER beteiligt ist (He et al., 2003). FWD-1 funktioniert hierbei als substratrekrutierende Untereinheit für E3-Ubiquitinligasen des SCF_{FWD-1}-Komplexes. Während ein hyperphosphoryliertes Substrat von einer propellerartigen Struktur von β -Faltblättern (den sog. WD-40 *repeats*) erkannt und gebunden wird, bindet die E3-Ubiquitin-Ligase an die F-Box-Domäne des FWD-Proteins. Wird die F-Box von *fwd-1* deletiert, so kann die E3-Ligase nicht mehr binden und der Abbauweg wird unterbrochen. Es kommt zu einer

Akkumulation von hyperphosphoryliertem FRQ, was bestätigt, dass FRQ-Phosphorylierung dem Abbau vorausgeht. Die ΔF -Box-Mutante ist arrhythmisch sowohl in Bezug auf die Konidienbildung als auch in Bezug auf die Expression von FRQ und anderer uhrenkontrollierter Gene. Des Weiteren bildet FWD-1/ ΔF -Box *in vivo* einen stabilen Komplex mit FRQ – eine Interaktion, die im Wildtyp aufgrund der nachfolgenden schnellen Ubiquitinierung und Degradation von FRQ durch das Proteasom nur transient und daher nicht nachweisbar ist. Zusammengenommen mit den Daten der Experimente mit verschiedenen Kinasen und Phosphatasen ergibt sich ein Bild der Uhr, bei dem die fortschreitende Phosphorylierung von FRQ an vielen verschiedenen Stellen durch verschiedene Kinasen (und – antagonistisch dazu – die Dephosphorylierung durch Phosphatasen) die Stabilität von FRQ feinreguliert und so die Periodenlänge der Uhr bestimmt. Je höher also der Phosphorylierungsstatus von FRQ, desto höher seine Affinität zur WD-40-Domäne und seine Abbaurate. Die fortschreitende Phosphorylierung und deren Verzögerung durch Dephosphorylierung des negativen Elements der Uhren von Pilzen, Fliegen und Säugern sorgen so für eine hochkomplex regulierte zeitliche Verzögerung in der negativen Rückkopplungsschleife, um so einen stabilen circadianen Rhythmus zu erzeugen.

Das COP9-Signalosom wiederum, ein bei Eukaryoten konservierter Komplex aus mehreren Untereinheiten, reguliert die Stabilität des SCF_{FWD-1}-Komplexes in *N. crassa* (He et al., 2005a). Eine Mutation des COP9-Signalosoms in *N. crassa* führt zur Auto-Ubiquitinierung des SCF_{FWD-1}-Komplexes, da CULLIN-1 (eine Komponente des SCF-Komplexes) nicht mehr durch das CNS deneddyliert wird. Der SCF_{FWD-1}-Komplex wird dadurch abgebaut und der Abbau von FRQ von der Uhr entkoppelt. Interessanterweise zeigt diese Mutante mit Verlust der CNS-Funktion eine FRQ-unabhängige Oszillation mit langer Periodenlänge und temperaturkompensierter Konidienbildung, stabil im Dauerdunkel, Dauerlicht und in Temperaturzyklen.

1.3.7 Parallelen zu circadianen Oszillatoren höherer Eukaryoten

Sowohl im Mechanismus als auch auf Ebene der Uhrenproteine bestehen signifikante Übereinstimmungen zwischen der circadianen Uhr von *N. crassa* und denen von Insekten und Säugetieren. Die circadianen Oszillatoren von *Neurospora*, *Drosophila* und Säugern folgen dem gleichen Prinzip: sie basieren auf autoregulatorischen circadianen negativen Rückkopplungsschleifen (Dunlap, 1999; Young und Kay, 2001). Am Anfang all dieser autoregulierten Rückkopplungsschleifen stehen heterodimere Transkriptionsfaktoren mit PAS-Domänen als positive Elemente, die die negativen Elemente aktivieren. Die negativen

Elemente wiederum schließen die Rückkopplungsschleife, indem sie die positiven Elemente inaktivieren. Weitere Ähnlichkeiten bestehen bei den positiven Rückkopplungsschleifen, die in allen genannten Systemen existieren und die Stabilität der circadianen Uhr gewährleisten. (Cheng et al., 2001b; Glossop et al., 1999; Kim et al., 2002; Lee et al., 2000; Preitner et al., 2002; Shearman et al., 2000). Besonders WC-1 weist Homologien auf zu BMAL-1, einen bHLH-Transkriptionsfaktor der Säugetier-Uhr (Lee et al., 2000; Tauber et al., 2004). Ähnlich wie FRQ mit FRH bei *Neurospora* ist PER, das negative Element der Uhren von *Drosophila* und Säugern, mit einem RNA-bindenden Protein assoziiert (Brown et al., 2005). So haben alle Kernkomponenten der circadianen Uhr von *N. crassa* ihr funktionelles Gegenstück in den circadianen Uhren des Tierreichs, auch wenn kaum Sequenzhomologien existieren.

Stark konserviert ist dagegen auch die Regulation der Uhrenproteine: ähnlich wie FRQ wird PER im Laufe eines circadianen Tages fortschreitend phosphoryliert. Phosphorylierung führt auch im Fall von PER zum proteasomalen Abbau und ist ein wichtiger Schritt hin zu seiner Repressorfunktion (Young und Kay, 2001). Obwohl keinerlei Sequenzhomologien bestehen, werden PER und FRQ durch CKI und CKII phosphoryliert (Akten et al., 2003; Görl et al., 2001; Kloss et al., 1998; Lin et al., 2002; Lowrey et al., 2000; Nawathean und Rosbash, 2004; Price et al., 1998; Xu et al., 2005; Yang et al., 2002, 2003) und können durch die gleichen Phosphatasen wieder dephosphoryliert werden (Sathyanarayanan et al., 2004; Yang et al., 2004). Des Weiteren vermittelt eine konservierte SCF-E3-Ligase die phosphorylierungsabhängige Ubiquitinierung und so den Abbau sowohl von FRQ als auch von PER (Eide et al., 2005; Grima et al., 2002; He et al., 2003; Ko et al., 2002). Die Konservierung dieser postranslationalen Regulatoren der Uhr lässt die Vermutung zu, dass eine evolutionäre Verbindung zwischen eukaryotischen circadianen Oszillatoren besteht. Basierend auf dieser Beobachtung konnte CSN, ein hochkonservierter Regulator des Proteinabbaus bei Eukaryoten, als weitere Uhrenkomponente identifiziert werden (He et al., 2005a). Seine Dysfunktion wird mit dem Smith-Magenis-Syndrom in Verbindung gebracht, einer menschlichen Erbkrankheit, die neben anderen gravierenden Schädigungen einen abnormen circadianen Phänotyp und abweichendes Schlafverhalten zeigt (Gropman et al., 2007).

1.4 Zeitgeber: die Synchronisation mit der Umwelt

Die circadiane Uhr kann molekulare und physiologische Rhythmen unabhängig von externen Zeitgebern generieren. Unter freilaufenden Bedingungen regt sich die Uhr selbst an und der Rhythmus der Zelle entsteht durch die Rückkopplung der Signalkaskade. Um jedoch

mit der natürlichen Umwelt synchron zu bleiben, müssen circadiane Uhren in der Lage sein, auf die Rhythmen der Umgebung zu reagieren und sie in den eigenen Rhythmus zu integrieren. Dieser Prozess wird im Englischen als *entrainment* bezeichnet (Johnson et al., 2003), im Deutschen hat sich der Begriff Synchronisation durchgesetzt. Ein synchronisiertes circadianes System garantiert, dass alle Prozesse in der Zelle im Verlauf der Jahreszeiten täglich zu ihrem optimalen Zeitpunkt ablaufen, da sich Tages- und Nachtlänge durch die Verschiebung der Erdachse im Jahresverlauf verändern. Naturgegeben sind Licht und Temperatur die wichtigsten Zeitgeber der circadianen Uhr.

1.4.1 Licht

1.4.1.1 Die Lichtreaktion

Innerhalb des sichtbaren Lichtspektrums ist blaues Licht das wichtigste für die Synchronisation circadianer Uhren (Gehring und Rosbash, 2003). Bei *N. crassa* sind dazu nicht nur die Uhr, sondern alle bisher bekannten Lichtreaktionen blaulichtabhängig (Linden, 2002; Liu et al., 2003). Als Lichtrezeptor dient hier der bereits beschriebene heterodimere Transkriptionsfaktor WCC (Ballario et al., 1996; Crosthwaite et al., 1997; Linden und Macino, 1997; Talora et al., 1999). Neben seiner Funktion als positives Element der circadianen Rückkopplungsschleife dient WC-1 als einziger Blaulichtrezeptor von *N. crassa*, ein Hinweis auf die enge Verknüpfung von circadianer Uhr und Lichtreaktion (Froehlich et al., 2002; He et al., 2002). Ähnlich verhält es sich bei *Drosophila* (Krishnan et al., 2001).

Seine Funktion als Photorezeptor erhält WC-1 durch seine LOV-Domäne, eine spezialisierte Form der PAS-Domäne, an die ein Flavin-Molekül als Chromophor gebunden ist (Froehlich et al., 2002; He et al., 2002). Die Chromophor-Bindung ähnelt dabei der von anderen PAS-Domänen des LOV-Typs, die ebenfalls als Blaulicht-Rezeptoren dienen und Flavin-Bindemotive in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (Cheng et al., 2003a; Crosson und Moffat, 2001). Flavin (FAD oder FMN) bildet innerhalb der LOV-Domäne ein blaulichtabhängiges Addukt mit der Seitenkette eines hochkonservierten Cysteins (Crosson und Moffat, 2002; Crosson et al., 2003). Es gibt keine Daten darüber, was unmittelbar nach der Absorption eines Blaulicht-Photons durch WC-1 passiert, doch aufgrund der Ähnlichkeit zu anderen LOV-Domänen und deren Rolle als Blaulichtrezeptoren (z. B. PHY3) wird folgender Mechanismus vermutet: Blaulichtabsorption führt zur Bildung einer reversiblen kovalenten Bindung zwischen Cystein und Flavin. Durch diese Adduktbildung wird das planare Flavin-Molekül etwas gekippt und geht vom inaktiven in den aktiven Signalstatus über. Dieses „Kippen“ verursacht eine leichte, aber entscheidende Konformationsänderung in

den Peptidbindungen der Aminosäurekette der LOV-Domäne, die wiederum Ladungen bzw. Salzbrücken an der konservierten Proteinoberfläche verschieben. Dadurch ändert sich die Interaktionsaffinität mit weiteren Komponenten der Signalkaskade, was dann diese Signalkaskade auslöst (Crosson und Moffat, 2002; Crosson et al., 2003; Harper et al., 2003). Da noch keine Strukturanalysen der LOV-Domäne von WC-1 vorliegen, sind diese Annahmen spekulativ, aber der Konservierungsgrad von LOV-Domänen macht eine Konservierung des Mechanismus wahrscheinlich. Im Vergleich zur LOV2-Domäne von PHY3 besitzt WC-1 zusätzliche Aminosäuren, die laut computergestützter Strukturberechnung nahe der Peptide liegen, die bei PHY3 für die blaulicht-vermittelte Konformationsänderung verantwortlich sind. Sie bilden eine zusätzliche Schleife, deren Funktion bisher aber nicht bekannt ist. Es wird vermutet, dass sie den relativ langen Photozyklus von WC-1 bedingt (He und Liu, 2005; He et al., 2002; Heintzen, 2005). Beide Merkmale – die zusätzlichen Aminosäuren und ein verlängerter Photozyklus – wurden auch bei FKF1 gefunden, einem flavinbindenden Protein mit LOV-Domäne aus *Arabidopsis*, das den zyklischen Abbau eines Transkriptionsrepressors von CO (*constans*) reguliert (ein Schlüsselfaktor der photoperiodisch regulierten Blütenbildung) (Cheng et al., 2003a; Imaizumi et al., 2003, 2005).

Es besteht auch die Möglichkeit, dass die lichtinduzierte Konformationsänderung Phosphorylierungsstellen zugänglich macht, die vorher verborgen waren und auf diese Weise WC-1 zu einem besseren Substrat für Kinasen oder Phosphatasen macht (Heintzen, 2005). Dazu passt, dass WC-1 und WC-2 bei Lichtinduktion ihren Phosphorylierungsstatus ändern (Schwerdtfeger und Linden, 2000; Talora et al., 1999). Phosphorylierung und Dephosphorylierung sind der Schlüssel bei der Aktivierung oder Inaktivierung des WCC. Besonders WC-1 wird bei Belichtung stark hyperphosphoryliert; hält diese Belichtung länger an, kehrt es jedoch zu seiner hypophosphorylierten Form zurück (He et al., 2005a; Heintzen et al., 2001; Schwerdtfeger und Linden, 2001; Talora et al., 1999). Dies steht in Verbindung mit einem weiteren Phänomen der Lichtreaktion von *N. crassa*, der sogenannten Photoadaptation. Ursprünglich wurde angenommen, dass hyperphosphoryliertes WC-1 transkriptionell aktiv ist (Talora et al., 1999). Es hat sich aber herausgestellt, dass hyperphosphorylierter WCC inaktiv ist und nur die hypophosphorylierte Form die Transkription von Zielgenen aktivieren kann (He und Liu, 2005). So zeigt sich ein Anstieg der RNA von WCC-aktivierten Genen bereits bevor hyperphosphoryliertes WC-1 nachweisbar ist. Beim Auftreten von hyperphosphoryliertem WC-1 fallen die Transkript-Mengen bereits wieder. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung von WCC an die Promotoren der Zielgene von seinem

Phosphorylierungsstatus abhängt: hypophosphorylierter WCC bindet stärker als die hyperphosphorylierte Form. Eine ähnliche Beobachtung gelang für die WCC-Funktion im Dauerdunkel: auch hier ist die hypophosphorylierte Form transkriptionell aktiv (He et al., 2005b; Schafmeier et al., 2005).

Die Mechanismen, die unmittelbar nach der Lichtinduktion ablaufen, kann man sich also wie folgt vorstellen: bei Belichtung mit Blaulicht erfolgt eine schnelle Konformationsänderung, die den WCC in einen photoaktivierten Komplex verwandelt (L-WCC), der die Transkription seiner Zielgene induziert. Gleichzeitig leitet die Konformationsänderung die Phosphorylierung von L-WCC ein, die diesen wieder inaktiviert und eventuell auch zu seinem Abbau führt. Wie schon in Kap. 1.3.2 erwähnt, ist WC-1 ohne WC-2 instabil (Cheng et al., 2003b). Möglicherweise destabilisiert die lichtinduzierte Hyperphosphorylierung den WCC, so dass die beiden WC-Proteine dissoziieren und anfällig werden für weitere Phosphorylierung und proteasomalen Abbau. Tatsächlich wird hyperphosphoryliertes WC-1 abgebaut (He und Liu, 2005; Lee et al., 2000; Talora et al., 1999). Dies konnte auch indirekt nachgewiesen werden durch Expression einer dominant-negative Form von PKC, einer Kinase, die WC-1 phosphoryliert. In dieser Mutante akkumuliert WC-1, während in einer Mutante, die PKC konstitutiv überexprimiert, nur wenig WC-1 nachweisbar ist (Franchi et al., 2005).

Wie aber sind diese lichtinduzierten Signalkaskaden mit dem stabilen Rhythmus der Uhr verknüpft? Ein Zielgen des photoaktivierten WCCs ist *frq* (Crosthwaite et al., 1997). In der Promotorsequenz von *frq* wurden zwei lichtresponsive Elemente (LREs) identifiziert, an die WCC *in vivo* bindet (Froehlich et al., 2002, 2003; He und Liu, 2005). Von diesen wird das distale Element im Dauerdunkel gebunden und sorgt für die Aufrechterhaltung des circadianen Rhythmus unter freilaufenden Bedingungen (Froehlich et al., 2003). Der WC-Proteinkomplex, der bei Belichtung an den *frq*-Promotor bindet (L-WCC) ist jedoch größer als der, der im Dunkeln bindet (D-WCC). Durch Experimente *in vitro* konnte aber gezeigt werden, dass WC-1 und WC-2 die einzig notwendigen Faktoren für lichtabhängige Promotorbindung sind. Der größere L-WCC ist also nicht auf die Rekrutierung weiterer Faktoren zurückzuführen (Froehlich et al., 2002; He und Liu, 2005). WC-1 wiederum tendiert *in vivo* zur Bildung eines Homodimers mit dem Potential, einen großen trimeren Komplex aus zwei WC-1 und einem WC-2 zu bilden (Cheng et al., 2003b). Der trimere L-WCC würde also bei Belichtung an den *frq*-Promotor binden und der dimere D-WCC die Uhr im Dauerdunkel aktivieren. Bisher ist unklar, ob der L-WCC auch schon im Dunkeln in der Zelle existiert, oder ob er bei Belichtung erst aus dem D-WCC entsteht. Wie auch immer der Mechanismus

funktioniert, die Verbindung von Lichtreizwahrnehmung und Transkriptionsaktivierung von *frq* ist eine einfache Möglichkeit, durch diese Lichtreize die circadiane Uhr zu beeinflussen.

1.4.1.2 Synchronisation durch Licht

Crosthwaite et al. stellten 1995 aufgrund ihrer molekularbiologischen Experimente ein einfaches Modell vor, um den Neustart der Uhr durch Lichtreize bei Eukaryoten zu erklären. Dabei erklärt der schnelle Anstieg von *frq*-Transkript bei Lichtinduktion die gegensätzliche Wirkung von Licht auf die Uhr. Aufgrund des circadianen Rhythmus von *frq*-RNA im Dunkeln wird davon ausgegangen, dass ein Lichtreiz zu einem Zeitpunkt, zu dem die Menge an *frq*-RNA ansteigt (z. B. in der subjekt. Morgendämmerung) dazu führt, dass der Höhepunkt der Expression früher erreicht wird und der Zyklus der Uhr sich nach vorne (auf „später“) verschiebt. Lichtreize zu einem späteren Zeitpunkt (subjekt. Abenddämmerung), wenn die Menge der *frq*-RNA sinkt, ebendiesen Abfall verzögern und so den Zyklus nach hinten (auf „früher“) verschieben. Im Gegensatz dazu haben Lichtreize am subjektiven Mittag wenig bis keinen Effekt (Crosthwaite et al., 1995).

Ähliche Mechanismen sind auch aus anderen circadianen Systemen bekannt, wo lichtabhängige Induktion oder Abbau von Uhrenkomponenten die Uhrenumstellung dieser Organismen erklären (Ashmore und Sehgal, 2003; Shigeyoshi et al., 1997; Young und Kay, 2001). Interessanterweise wird *qrf*, eine *antisense*-RNA des *frq*-Locus, ebenfalls stark lichtinduziert, obwohl sie sich antizyklisch zur *frq*-RNA verhält. Mutanten, in denen die Lichtinduktion von *qrf* gestört ist, zeigen eine stärkere Phasenverschiebung der Uhr bei Lichtimpulsen, haben im Dauerdunkel jedoch eine normal funktionierende circadiane Uhr, was darauf hindeutet, dass *qrf* zwar die Lichtreaktion der Uhr dämpft, die zentrale Uhrenfunktion selbst jedoch nicht beeinflusst (Crosthwaite, 2004; Kramer et al., 2003).

Schnelle Veränderungen der Mengen von Uhrenkomponenten können den Einfluß von kurzen Lichtimpulsen auf die circadiane Uhr erklären, sie beantworten aber nicht die Frage, wie ganze Lichtperioden, also kontinuierliches Licht über mehrere Stunden hinweg, die Synchronisation ermöglicht (Johnson et al., 2004). Es ist durchaus möglich, dass trotz ständiger Beleuchtung nur die Dämmerung, also der Übergang von dunkel zu hell und umgekehrt, wahrgenommen wird (Johnson et al., 2004). Dieses „Stilllegen“ des Lichtreflexes während des Tages könnte von der Uhr selbst erreicht werden, indem die Lichtempfindlichkeit selbst circadian reguliert wird. Dieser Prozess wird mit dem englischen Begriff *gating* bezeichnet (Dragovic et al., 2002; Fleissner und Fleissner, 1992; Gillette und Mitchell, 2002; Heintzen et al., 2001; McWatters et al., 2000; Millar und Kay, 1996). In

manchen Modellen synchronisieren Lichtsignale die innere circadiane Uhr mit der äußeren Welt, indem Teile des circadianen Zyklusses wiederholt oder übersprungen werden. Alternativ kann man annehmen, dass Lichtimpulse den circadianen Zyklus dehnen (und so verlängern) oder stauchen (und so verkürzen). Da die Periodenlänge laut Aschoff'scher Regel von der Intensität des Lichts abhängt, wird diese Regel oft herangezogen, um Modelle der kontinuierlichen Synchronisation zu unterstützen (Johnson et al., 2004).

Fortschritte bei der Erforschung der Synchronisation wurden in jüngster Zeit erzielt bei Studien an *N. crassa*-Stämmen, die Mutationen im Gen des LOV-Proteins VVD (*vidid*) tragen (Elvin et al., 2005; Heintzen et al., 2001).

Das *vvd*-Gen kodiert ein sehr kleines PAS/LOV-Protein mit sehr starker Homologie zur PAS/LOV-Domäne von WC-1 (Heintzen et al., 2001). VVD ist ein WC-1-abhängiger Blaulichtrezeptor und wirkt als ein Repressor der Lichtreaktion, indem es Änderungen in der Lichtintensität wahrnimmt (Cheng et al., 2003a; Heintzen et al., 2001; Schwerdtfeger und Linden, 2001, 2003; Shrode et al., 2001). Die Tatsache, dass VVD die Aktivität des WCC hemmt, verweist auf eine Rolle bei der Synchronisation und Neuprogrammierung der Uhr von *N. crassa*. Des Weiteren ist die Transkription von *vvd* uhrenkontrolliert und entspricht damit den theoretischen Maßgaben einer Uhrenkomponente, die in der Lage ist, die Lichtsensitivität des zentralen Lichtrezeptors zu regulieren. Dazu passend zeigen *vvd*-deletierte Mutanten eine viel stärkere Umstellung der Uhr bei

Lichtimpulsen und gehemmt, wenn auch nicht völlig fehlendes *gating* (Heintzen et al., 2001). Die Konidienbildung unter konstanten Bedingungen (DD) ist bei dieser Mutante um ca. vier Stunden verzögert (phasenverschoben) (Elvin et al., 2005; Heintzen et al., 2001). Nähere Untersuchungen dieses Phänotyps zeigten, dass VVD die Phase der Uhr kontrolliert,

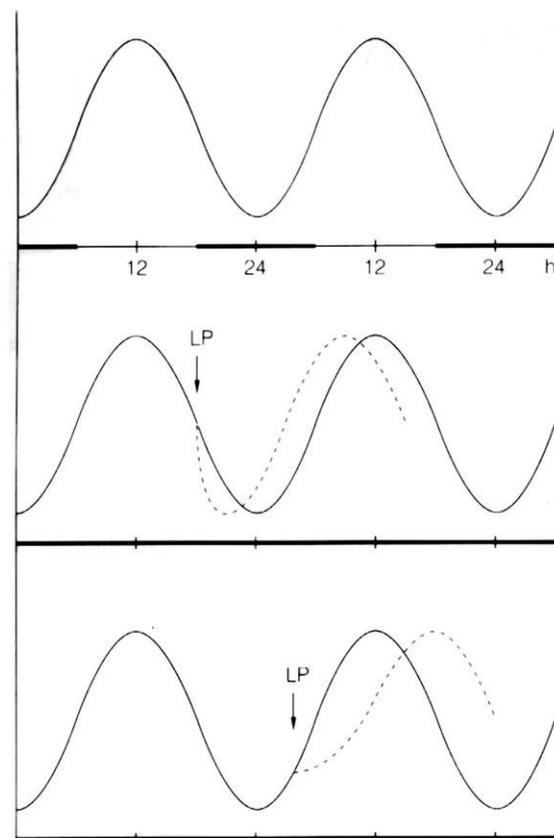


Abb. 1.5: Freilaufende Rhythmen und ihre Beeinflussung durch Lichtpulse (LP). Oben: normale Oszillation in einem 24-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus. Mitte: ein Lichtpuls im Dauerdunkel zum Zeitpunkt des subjektiven Abends verkürzt die Phase der Uhr. Unten: ein Lichtpuls kurz vor der subjektiven Morgendämmerung verschiebt die Oszillation nach hinten. (Aus: Kleinig, Hans: Zellbiologie)

indem es die Lichtreaktion in der Morgendämmerung über WCC-Repression hemmt. Beim Übergang in die Nacht (bzw. Dunkelheit) dagegen beschleunigt VVD den Abbau von *frq*-RNA. Durch die Hemmung der Uhrenumstellung durch VVD in der (subjektiven) Morgendämmerung kann die circadiane Uhr im Wildtyp fast ungestört von Lichtimpulsen in den Tag „laufen“. Erst am Ende des Tages, bei Einbruch der Dunkelheit, wird durch diesen Tagesoszillator die reprimierende Rückkopplung von *frq* und damit die Phase der uhrengesteuerten Konidienbildung kontrolliert (Elvin et al., 2005). In *vvd*-Mutanten bricht dieser Tagesoszillator zusammen und die Zelle kann die Phase ihrer inneren Uhr nicht mehr mit der Photoperiode (das heißt der äußeren, durch Licht definierten Zeit) in Korrelation setzen. *N. crassa* führt seine Oszillation zwar fort, jedoch deutlich phasenverschoben („verspätet“). Durch VVD ist *N. crassa* in der Lage, seine Konidienbildung immer auf die späten Nacht- bzw. frühen Morgenstunden zu terminieren, unabhängig von der Tageslänge. Dies konnte durch *race tube assays* mit verschiedenen Photoperioden (von unter 16 bis über 28 Stunden) gezeigt werden. Diese Fähigkeit geht in *vvd*-Mutanten verloren, was zu starker Konidienbildung während des (subjektiven) Tages in langen Photoperioden führt. Es wird davon ausgegangen, dass die zeitliche Einschränkung der Konidienbildung auf die Dunkelperiode diese während der Entwicklung vor Schädigung durch UV-Strahlung und Austrocknung schützen soll.

1.4.1.3 Photoperiodismus

Die Theorie, nach der circadiane Uhren genutzt werden könnten, um Änderungen in der Tageslänge zu messen, wurde zum ersten Mal 1936 von Erwin Bünning formuliert. Seine Theorie der externen Koinzidenz geht von einer rhythmisch auftretenden Lichtsensitivität aus, die mit Stimulation durch Licht von außen gleichzeitig auftreten muss, um eine photoperiodische Reaktion hervorzurufen. Mittlerweile ist dieses Modell für viele (wenn auch nicht alle) photoperiodischen Phänomene anerkannt (Saunders, 2005). Diese Art von Photoperiodismus konnte in *N. crassa* nachgewiesen werden durch Untersuchung der Sporenbildung (sexuell und asexuell) sowie des Carotinoidgehaltes zu verschiedenen Zeitpunkten des circadianen Tages (Roenneberg und Merrow, 2001; Tan et al., 2004b). Durch systematisches Variieren der Tageslänge konnten Tan et al. zeigen, dass die Konidienbildung zur Tagundnachtgleiche am stärksten ist (d. h. Licht- und Dunkelphase sind jeweils 12 h lang), gefolgt von verstärkter Bildung von Protoperithezien (Anlagen für sexuelle Sporen) und Carotenoide, wenn die Tage länger werden. All diese photoperiodischen Merkmale treten

in dem *frq*-deletierten *frq*¹⁰-Stamm nicht auf, was zeigt, dass für Photoperiodismus eine intakte circadiane Uhr benötigt wird.

Im Pflanzen-Modell sind die molekularen Mechanismen des Photoperiodismus am besten untersucht; hier konnten die Produkte des Gens *constans* (*co*) als Schlüsselkomponenten der photoperiodisch gesteuerten Blütenentwicklung identifiziert (Bünning, 1936; Suarez-Lopez et al., 2001; Yanovsky und Kay, 2002) und so das Modell der externen Koinzidenz photoperiodischer Reaktionen auf molekularer Ebene untermauert werden. Die circadiane Uhr von *Arabidopsis* steuert die Expression von *co* so, dass es an kurzen Tagen (in der Natur Frühjahr und Herbst) nur in der Dunkelheit exprimiert wird. Erst wenn die Tage länger werden, fällt die Expression von *co* in die Lichtphase des Photozyklus. Dadurch wird unter Langtag-Bedingungen CO durch aktiviertes Cryptochrom und Phytochrom A stabilisiert und kann seinerseits die für die Blütenentwicklung benötigten Gene aktivieren (Valverde et al., 2004).

Vermutlich gibt es bei *N. crassa* ähnliche Prozesse, die Photoperiodismus erzeugen oder unterstützen. So wurde z. B. bei der Untersuchung der Expression von *frq* RNA und Protein unter dem Einfluss von verschiedenen Photoperioden festgestellt, dass FRQ nicht mit den Übergängen von Licht zu Dunkelheit und umgekehrt phasiert (Tan et al. 2004a). Die Unabhängigkeit der FRQ-Oszillation vom Tag-Nacht-Übergang (und umgekehrt) zeigt zusammen mit anderen Beobachtungen, dass die circadiane Uhr von *N. crassa* über den vollen Licht-Dunkel-Zyklus hinweg funktionell ist (Elvin et al., 2005; Gooch, 1985; Tan et al., 2004a) und nicht nur passiv von ihm angetrieben wird – eine Voraussetzung für eine Rolle bei der Unterstützung von Photoperiodismus. Möglicherweise steuert die synchronisierte circadiane Uhr von *N. crassa* photoperiodische Reaktionen durch rhythmische Erzeugung von Lichtsensitivität, wie bei Pflanzen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, dass Synchronisation mit einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus nicht so einfach ist, wie es sich aus Lichtpuls-Experimenten ableiten lässt. Experimente mit so genannten Skelett-Photoperioden (im Dauerdunkel, der Tagesbeginn wird durch einen kurzen Lichtpuls imitiert) haben gezeigt, dass mit kurzen Lichtsignalen nicht die gleiche typische phasische Synchronisation erreicht wird wie bei Wildtypstämmen unter vollständigen Photoperioden (Elvin et al., 2005). *Vvd*-Mutanten zeigen dagegen sowohl unter vollständigen als auch in Skelett-Photoperioden die typische Phasierung, was darauf hinweist, dass zur Synchronisation eher lange Lichtperioden benötigt werden und dass VVD diesen Effekt vermittelt (Elvin et al., 2005).

Wie dieser Effekt von VVD auf molekularer Ebene genau funktioniert ist bisher nicht bekannt, möglicherweise beinhaltet er direkten oder indirekten Einfluss von VVD auf die Phosphorylierung bzw. Aktivität von WCC. WC-1 ist z. B. in *vvd*-Mutanten konstitutiv hyperphosphoryliert, was vielleicht auf die Aktivierung einer Phosphatase oder Repression einer Kinase durch VVD hinweist (Heintzen et al., 2001; Schwerdtfeger und Linden, 2001). Hyperphosphorylierung wiederum geht einher mit schnellem Abbau von WC-1 und neu synthetisiertes WC-1 ist in diesen Mutanten nicht nachweisbar (Heintzen et al., 2001; Schwerdtfeger und Linden, 2001). Aufgrund der Ähnlichkeit der LOV/PAS-Domäne von VVD zu der von WC-1 könnte VVD mit WC-1 um die Bindung an WC-2 konkurrieren und auf diese Weise die Transduktion von Lichtsignalen unterbinden. Einige Fakten sprechen gegen dieses Modell (schließen es jedoch nicht völlig aus): erstens bindet WC-1 nicht über die LOV/PAS-Domäne an WC-2 (Ballario et al., 1998; Cheng et al., 2003b; He et al., 2002) und zweitens ist VVD vornehmlich im Cytoplasma lokalisiert, während WCC zum überwiegenden Teil im Zellkern zu finden ist (Schwerdtfeger und Linden, 2003).

Aufgrund der Tatsache, dass hyperphosphoryliertes WC-1 die inaktive Form darstellt, sollte man eigentlich in *vvd*-Mutanten eine eher verminderte statt erhöhte Lichtreaktion erwarten. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Regulation der Lichtsensitivität komplex ist und möglicherweise noch weitere Faktoren und Aktivitäten in die initiale Aktivierung des WCC in *N. crassa* involviert sind (Heintzen, 2005).

1.4.1.4 Andere Möglichkeiten der Licht-Signaltransduktion

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *N. crassa* (www.broad.mit.edu/annotation/fungi/Neurospora_crassa_7) hat gezeigt, dass dieser Organismus über einige weitere Homologe von Proteinen verfügt, die potentiell zur Lichtsignaltransduktion dienen: Phytochrome (PHY-1, PHY-2), Cryptochrom (CRY), Opsin (NOP-1) sowie weitere LOV-Proteine (PHOT) (Froehlich et al., 2005). Dies bedeutet, dass dem Pilz möglicherweise weitere Blau- oder auch Rotlicht-Signalwege zur Verfügung stehen. Verschiedene Wissenschaftler haben Knockout-Stämme dieser Gene hergestellt und einzelne oder multiple Mutanten in Bezug auf ihre Lichtreaktion und die circadiane Uhr untersucht. Bisher konnte jedoch nicht festgestellt werden, dass eines dieser Gene einen wirklichen Einfluss auf das circadiane System oder die Lichtreaktion von *N. crassa* hat (Froehlich et al., 2005; Mark Elvin, Christian Heintzen, Ping Cheng und Yi Liu, unveröffentlichte Ergebnisse, zitiert in Heintzen und Liu, 2007). Die Expression von CRY ist jedoch lichtreguliert und könnte auch Vorgänge steuern, die bisher auf die Wirkung von lichtaktiviertem WCC

zurückgeführt werden (Froehlich et al., 2005). Die anderen putativen Photorezeptoren zeigen keine lichtabhängige Regulation. Die Transkription von *phy-1* ist uhrengesteuert, das Protein, seine Phosphorylierung und seine subzelluläre Verteilung sind jedoch keiner Oszillation unterworfen. Über die Bedeutung dieser putativen Photorezeptoren kann bisher nur spekuliert werden. Ihre Rolle bei der Lichtreaktion von *N. crassa* ist entweder subtil oder betrifft Signalwege, die bisher unbekannt sind.

1.4.2 Temperatur

Die Umgebungstemperatur beeinflusst das circadiane System auf drei Arten, von denen die wichtigste die Synchronisation ist: in einem 24-Stunden-Temperaturzyklus im Dauerdunkel (z. B. 12 h 25° C und 12 h 20° C) wird die höhere Temperatur vom Organismus generell als subjektiver Tag und die niedrigere Temperatur als subjektive Nacht wahrgenommen. Zweitens sind der circadianen Uhr durch die Temperatur Grenzen gesetzt. Oberhalb und unterhalb eines permissiven Temperaturbereichs ist die Uhr nicht funktional. Die dritte Art der Beeinflussung durch die Temperatur ist die Temperaturkompensation der circadianen Uhr. All diese Effekte wurden in *N. crassa* studiert.

1.4.2.1 Temperaturwahrnehmung

Die Expression von *frq* ist temperaturreguliert und kann damit als temperatursensitives Signal zur Regulation der circadianen Uhr von *N. crassa* dienen. Bei einer Erhöhung der Umgebungstemperatur kommt es zum Anstieg von *frq*-RNA, umgekehrt sinkt diese, wenn die Umgebungstemperatur fällt (Liu, 2003; Liu et al., 1998). Gleichzeitig ist FRQ posttranskriptionell temperaturreguliert: unter konstanten Temperaturbedingungen ist FRQ bei hohen Temperaturen stärker exprimiert als bei niedrigen, die *frq*-RNA jedoch bleibt weitgehend konstant (Colot et al., 2005; Diernfellner et al., 2005; Liu et al., 1997, 1998). Schon frühe Studien haben gezeigt, dass aus zwei verschiedenen Translationsstartcodons innerhalb des *frq*-Leserahmens zwei Isoformen des FRQ-Proteins entstehen: lFRQ (*large* oder *long* FRQ) und sFRQ (*small* oder *short* FRQ). Das relative Verhältnis dieser zwei Formen zueinander ist dabei temperaturabhängig: bei hohen Temperaturen entsteht bevorzugt lFRQ, während sFRQ zunimmt, je tiefer die Temperatur ist (Liu et al., 1997). Der Anteil an *frq*-Transkript in der Zelle bleibt dabei jedoch konstant (Colot et al., 2005). Lange wurde über einen alternativen Transkriptionsstart von *frq* spekuliert; die Ursache für die beiden FRQ-Isoformen liegt jedoch in einem temperaturabhängigen Spleißen der untranslatierten 5'-Region (5'-UTR) der *frq*-mRNA begründet. Durch das Spleißen eines Introns wird das erste

ATG-Codon des FRQ-Leserahmens entfernt und die Translation beginnt am dritten ATG-Codon des Leserahmens (Met100). Ähnlich wie beim temperaturabhängigen Spleißen in anderen Organismen entsprechen auch hier die Spleißstellen der RNA nicht dem üblichen Konsensus. Sie wird dadurch von der Spleiß-Maschinerie der Zelle nur bei niedrigen Temperaturen erkannt und effizient bearbeitet. Bei hohen Temperaturen liegt der größte Teil der *frq*-RNA ungespleißt vor und FRQ wird in voller Länge translatiert. Der Anstieg von FRQ wird jedoch davon nicht beeinflusst, sondern wird reguliert durch eine temperaturabhängige Translationskontrolle, die durch so genannte untranslatierte Leserahmen (uORF) in der 5'-UTR entsteht (Diernfellner et al., 2005). Auch sie entsprechen im Aufbau ihrer Ribosomen-Bindestelle nicht dem Konsensus. Sie werden bei tieferen Temperaturen effizienter translatiert und reduzieren dadurch die Effizienz der Translation von IFRQ und sFRQ, da die Ribosomen von der mRNA abfallen, bevor sie den Translationsstart von *frq* erreichen. Über eine temperaturgesteuerte Transkription von *frq* ist nichts bekannt.

Bei Mikroarray-Studien konnten 14 Gene identifiziert werden, die unter den Bedingungen eines 12 h/12 h-Temperaturzykluses oszillieren. Alle diese Gene sind ebenfalls uhrengesteuert und FRQ-abhängig (Nowrousian et al., 2003). Diese temperaturabhängige Oszillation geht in einem Δfrq -Stamm verloren, was darauf hinweist, dass die Synchronisation der Uhr durch Temperatur *frq*-abhängig ist. Auch wenn diese Daten eine Rolle von FRQ als Temperatursensor vermuten lassen, so könnte der Verlust der Temperaturreaktion in der Δfrq -Mutante auch eine Konsequenz der nichtfunktionellen Uhr sein. Da aber die Konidienbildung in Δfrq -Mutanten auf rhythmische Temperaturänderungen reagiert, kann FRQ nicht die einzige Komponente sein, welche Temperaturreaktionen vermittelt. Die verhältnismäßig geringe Anzahl der bei der Microarray-Studie gefundenen Gene und die Sensitivität der Methode könnten Erklärungen sein für die Tatsache, dass bisher keine temperaturabhängig oszillierenden Gene in Δfrq -Mutanten gefunden wurden. Alternativ dazu könnte die Temperaturreaktion der circadianen Uhr natürlich auch posttranskriptionell gesteuert sein.

1.4.2.2 Die Umstellung der Uhr durch Temperatur

Wie bereits erwähnt, steigt und fällt die Menge der *frq*-mRNA mit steigender und fallender Temperatur (Liu, 2003; Liu et al., 1998). Ähnlich wie Licht könnten diese temperaturinduzierten Änderungen der *frq*-Expressionsmenge also eine Umstellung der Uhr auslösen. Diese Ähnlichkeit besteht jedoch nur teilweise: Untersuchungen der RNA- und Proteinmenge von *frq* bei unterschiedlichen Temperaturen und während schrittweise geänderter Temperaturen deuten darauf hin, dass Unterschiede bestehen in den Mechanismen

der lichtinduzierten und temperaturinduzierter Umstellung der Uhr. Während die Menge der *frq*-mRNA bei hohen oder niedrigen Temperaturen gleich ist, oszilliert FRQ bei hoher Temperatur auf einem so hohen Level, dass die niedrigste FRQ-Menge des circadianen Tages höher ist als die höchste FRQ-Menge eines circadianen Tages bei niedriger Temperatur. Auf diese Weise kann ein Anstieg der Temperatur von der circadianen Uhr *N. crassas* als Neustart der Uhr vom Zeitpunkt der niedrigsten FRQ-Expression aus gewertet werden (subjektive Morgendämmerung). Umgekehrt suggeriert ein Temperaturabfall einen Neustart der Uhr vom Zeitpunkt der höchsten FRQ-Expression an (subjektive Abenddämmerung) (Liu et al., 1998).

1.4.2.3 Grenzen des Temperaturbereichs für circadiane Rhythmik und Temperaturkompensation

Die temperaturabhängige Expression von IFRQ und sFRQ eröffnet eine Möglichkeit zu erklären, wie Temperaturgrenzen für die circadiane Uhr festgelegt sein könnten (Liu et al., 1997). Obwohl jede der beiden Formen für sich in der Lage ist, den circadianen Rhythmus zu unterstützen, werden für einen normalen Rhythmus mit hoher Amplitude beide Formen benötigt. Stämme, deren erstes Startcodon mutagenisiert ist und die nur sFRQ exprimieren, verlieren ihre Rhythmizität bei hohen Temperaturen. Stämme mit mutagenisiertem dritten ATG, die nur IFRQ produzieren, sind bei niedrigen Temperaturen arrhythmisch. Dies lässt vermuten, dass die beiden Formen bei unterschiedlichen Temperaturen unterschiedlich funktionieren. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass Stämme, die nur eine der beiden Formen exprimieren, in der Periodenlänge vom Wildtyp (mit beiden Formen) abweichen. Andererseits kann jede Form die Rhythmizität der Uhr über die ganze Spanne des permissiven Temperaturbereichs erhalten, wenn sie nur in ausreichender Menge exprimiert wird (Colot et al., 2005; Diernfellner et al., 2005; Liu et al., 1997), was zeigt, dass sowohl Qualität als auch Quantität von FRQ für den Erhalt eines beständigen circadianen Rhythmus wichtig sind.

1.4.2.4 Temperaturkompensation

Die Entdeckung der temperaturabhängigen Änderungen der Menge und Formen von FRQ führten zu der Vermutung, dass diese Änderungen die Grundlage sind für die Temperaturkompensation der circadianen Uhr von *N. crassa*. Vor allem die gut definierte Temperaturabhängigkeit der Expression von IFRQ und sFRQ könnte ein Mechanismus sein, über den der Rückkopplungszyklus bei verschiedenen Temperaturen mit gleicher Geschwindigkeit aufrechterhalten wird. So würde sFRQ die Geschwindigkeit des Zyklus bei

niedrigen Temperaturen festlegen, aber mit steigender Temperatur an Effizienz verlieren und IFRQ seine Funktion übernehmen. Wenn diese Vermutung stimmt, dann sollte mit dem Verschwinden einer der beiden Formen auch die Temperaturkompensation verloren gehen. Solche Experimente wurden unabhängig voneinander durchgeführt (Colot et al., 2005; Diernfellner et al., 2005; Liu et al., 1997), jedoch mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen und Ergebnissen. Liu et al. und Colot et al. mutagenisierten jeweils die entsprechenden Startcodons. Dadurch kam es im Stamm mit fehlendem ersten ATG bei höheren Temperaturen zu einer ineffizienten Translation von sFRQ, da bei ungespleißter mRNA die Ribosomenbindestelle in ungünstiger Position zum dritten ATG (dem Translationsstart von sFRQ) liegt (s. auch Kap. 1.4.2.1). Die von Liu und Colot beobachtete normale Temperaturkompensation sowie der Verlust von Rhythmizität bei hohen Temperaturen in Stämmen, die nur sFRQ exprimieren, könnte also auch mit mangelnder FRQ-Menge zusammenhängen (Colot et al., 2005; Liu et al., 1997). Diernfellner et al. wählten einen anderen Zugang: sie optimierten die Spleißstelle von FRQ, so dass auch bei hohen Temperaturen ausschließlich und hocheffizient sFRQ exprimiert wurde. Das Ergebnis war, dass diese sFRQ-Stämme gegenüber dem Wildtyp sogar eine leichte Überkompensation zeigen: während sich die Wildtyp-Periodenlänge sich mit steigender Temperatur leicht verkürzt, wird die Periode von sFRQ minimal, aber signifikant länger (Diernfellner et al., 2005). Gleichzeitig ändert sich das Verhältnis von sFRQ zu IFRQ im Wildtyp vor allem durch die starke Zunahme von IFRQ, während die Menge von sFRQ weniger stark abnimmt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Temperaturkompensation nicht nur einfach von der temperaturabhängigen Expression der beiden FRQ-Formen abhängt. Es ist auch möglich, dass das Zusammenspiel von WCC und FRQ sowie FRH temperaturgesteuert ist, jedoch liegen dazu bisher keine Untersuchungen vor.

1.5 Steuerung der *ccgs* durch die circadiane Uhr

Subtraktive Hybridisierung, Screening-Techniken und (in jüngerer Zeit) Microarray-Experimente haben eine Fülle von Informationen über die Gene geliefert, die von der circadianen Uhr kontrolliert werden. Bisher konnten in unabhängigen Studien über 180 dieser *ccgs* (*clock controlled genes*) identifiziert werden. Das entspricht ungefähr 10 bis 14 % des gesamten Transkriptoms von *N. crassa* und (je nach Studie) 5 bis 20 % der untersuchten Gene. Ausgehend von diesen Daten wird erwartet, dass ca. 500 bis 2000 der geschätzten 10.000 bis 11.000 Gene von *N. crassa* *ccgs* sind und ihre Transkription direkt oder indirekt circadian reguliert ist. Der größte Teil dieser Gene steht unter dem Einfluss des *frq*-Locus, das

bedeutet, sie sind arrhythmisch in einem Δfrq -Stamm oder entsprechen in ihrer Periodizität der Periode der *frq*-Mutante, in der sie exprimiert werden (Bell-Pedersen et al., 1996b; Correa et al., 2003; Lewis et al., 2002; Loros et al., 1989; Nowrousian et al., 2003). Einige Gene oszillieren auch in Stämmen mit nichtfunktionalem FRQ und könnten unter der Kontrolle oder Teil eines anderen circadianen oder nichtcircadianen oszillatorischen Zyklus sein (Correa et al., 2003). Aus der bekannten oder vermuteten Funktion der identifizierten *ccgs* kann man schließen, dass die circadiane Uhr eine Vielzahl von Zellfunktionen wie Zellteilung, Signaltransduktion, Entwicklung, Stoffwechsel und Proteinabbau steuert. Der Einfluss der circadianen Uhr auf *N. crassa* ist also vergleichbar zu dem der Uhren anderer Organismen (Dunlap und Loros, 2004). Inwieweit sich die Oszillation dieser *ccgs* auch auf der Ebene der Proteine nachweisen lässt, ist jedoch bisher nicht bekannt.

Ausgehend von der großen Menge der bisher identifizierten *ccgs* ist doch relativ wenig darüber bekannt, wie deren Expression durch die circadiane Uhr (oder andere Oszillatoren) rhythmisch reguliert wird. Experimente haben gezeigt, dass *ccg-1* und *eas* (= *ccg-2*) hauptsächlich auf Ebene der Transkription circadian reguliert sind. Beide Gene besitzen Promotor-Elemente, die für ihre rhythmische Expression essentiell sind (Bell-Pedersen et al., 1996a, 2001). Diese uhrenkontrollierten Elemente unterscheiden sich von den WCC-Bindestellen im *frq*-Promotor, was bedeuten könnte, dass andere uhrenabhängige Transkriptionsaktivatoren oder –repressoren die primären Signale des WCC an diese „Output“-Gene weitergeben. Diese Annahme wird unterstützt von der Tatsache, dass es sich bei einigen *ccgs* um Transkriptionsfaktoren handelt (Bell-Pedersen et al., 2001; Correa et al., 2003; Lewis et al., 2002). Der WCC aktiviert jedoch auch etliche *ccgs* direkt und reguliert deren Oszillation. So enthalten z. B. die Promotoren der Gene *vvd* und *al-3* (*albino-3*) LREs, die vom WCC gebunden werden (Bell-Pedersen et al., 2005; Carattoli et al., 1994). Experimente mit cDNA-Microarrays mit einem $\Delta wc-1$ -Stamm mit induzierbar exprimiertem WC-1 haben gezeigt, dass etwa 7 % aller untersuchten Gene auf die Expression von WC-1 reagieren (Lewis et al., 2002). Unter Berücksichtigung der bekannten oder vermuteten Funktionen einiger *ccgs* – wie z. B. Proteinsynthese und -abbau oder Transkriptreifung – ist vorstellbar, dass die circadiane Uhr die Genexpression der Zelle auf vielen Ebenen reguliert und vielleicht Hierarchien zeitgesteuerter Signalkaskaden etabliert. Derartige Hierarchien wurden schon früher postuliert und Beweise, dass untergeordnete Oszillatoren Untergruppierungen circadian kontrollierter Ereignisse steuern, wurden in anderen Organismen gefunden (Heintzen et al., 1997; Pittendrigh, 1960; Staiger et al., 2003). Ebenso wahrscheinlich ist, dass einige uhrenkontrollierte Signalkaskaden durch Rückkopplung auf

die zentralen Oszillatoren einwirken. So ist das Gen *vvd* ein Beispiel für ein *ccg*, das über die Lichtempfindlichkeit des zentralen Oszillators von *N. crassa* auch die eigene Expression beeinflusst (Heintzen et al., 2001). Und die Expression des *qrf*-Transkripts könnte ein Beispiel sein für die Rückkopplungswirkung des circadianen „Outputs“ auf die Neustellung der Uhr (Kramer et al., 2003).

Um näher untersuchen zu können, wie die circadiane Uhr die Expression der *ccgs* kontrolliert, entwickelten Vitalini et al. (2004) ein genetisches Selektionssystem für Mutationen, die die Regulation von *ccg-1* und *ccg-2* beeinflussen. Dabei wurden zwei Arten von Mutationen einzelner Gene gefunden, die entweder die Expression von *ccg-1* allein oder von *ccg-1* und *ccg-2* verändern. Da diese Mutationen jedoch nicht den zentralen Oszillator direkt betreffen, bestätigen diese Daten ein Modell, nach dem die circadiane Uhr die Expression dieser *ccgs* indirekt steuert. Dies geschieht möglicherweise über einen Transkriptionsfaktor, der wiederum für die Expression sowohl eines Repressors als auch eines Aktivators von *ccg-1* und *ccg-2* benötigt wird. Mutationen, die nur die Expression von *ccg-1* betreffen, könnten die Regulationsebene unterhalb der o. g. betreffen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Organismen

2.1.1.1 *Neurospora crassa*

Der filamentöse Pilz *Neurospora crassa* (Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Sordariomycetidae; Sordariales; Sordariaceae;) erfüllt mit seiner anspruchslose Kultivierung, seinem schnellen Wachstum und der Möglichkeit, mit wenig Aufwand transgene Stämme zu erzeugen alle Voraussetzungen als Modellorganismus für viele biowissenschaftliche Fragestellungen. Sein Genom ist vollständig sequenziert (Galagan et al., 2003; Borkovich et al., 2004). *N. crassa* verfügt als einer der wenigen niederen Organismen über eine circadiane Uhr und sowohl molekularbiologische als auch biochemische Methoden sind gut etabliert. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Stämme.

Alle in verwendeten *N. crassa* Stämme besitzen die *bd*-Mutation (Loros et al., 1986; Sargent und Woodward, 1969).

Stamm	Genotyp	Phänotyp	Referenz
<i>frq</i> ⁺	<i>frq</i> ⁺ ; <i>bd A</i>	Wildtyp	Loros et al., 1986
<i>frq</i> ¹⁰	<i>frq</i> ¹⁰ ; <i>bd A</i>	Deletionsstamm von <i>frq</i>	Aronson et al., 1994
<i>frq</i> ¹⁰ ; <i>his-3</i>	<i>frq</i> ¹⁰ ; <i>bd A</i> ; <i>his-3</i>	Nichtfunktionelles <i>his-3</i> in <i>frq</i> ¹⁰ -Hintergrund	Bell-Pedersen et al., 1996
<i>frq</i> ⁺ ; FLAG-CK-1a	<i>frq</i> ⁺ ; <i>bd A</i>	QA-induzierbare FLAG-CK-1a im Wt/ <i>bd</i> -Hintergrund	Ozgur Tataroglu, n. veröffentlicht
<i>frq</i> ⁺ ; FLAG-GFP-N _{FRQ}	<i>frq</i> ⁺ ; <i>bd A</i>	Konst. exprimiertes FLAG-GFP-N _{FRQ} im Wt/ <i>bd</i> -Hintergrund	diese Arbeit
<i>frq</i> ⁺ ; FLAG-GFP-M _{FRQ}	<i>frq</i> ⁺ ; <i>bd A</i>	Konst. exprimiertes FLAG-GFP-M _{FRQ} im Wt/ <i>bd</i> -Hintergrund	diese Arbeit
<i>frq</i> ⁺ ; FLAG-GFP-C _{FRQ}	<i>frq</i> ⁺ ; <i>bd A</i>	Konst. exprimiertes FLAG-GFP-C _{FRQ} im Wt/ <i>bd</i> -Hintergrund	diese Arbeit
<i>frq</i> ¹⁰ ; FLAG-GFP-N _{FRQ}	<i>frq</i> ¹⁰ ; <i>bd A</i>	Konst. exprimiertes FLAG-GFP-N _{FRQ} im Δ <i>frq</i> / <i>bd</i> -Hintergrund	diese Arbeit
<i>frq</i> ⁺ ; FLAG-GFP-M _{FRQ1}	<i>frq</i> ⁺ ; <i>bd A</i>	Konst. exprimiertes FLAG-GFP-FRQ1(413-683) im Wt/ <i>bd</i> -Hintergrund	diese Arbeit

frq^+ ; FLAG-GFP- M_{FRQ7}	frq^+ ; <i>bd A</i>	Konst. exprimiertes FLAG-GFP-FRQ(413- 683) im Wt/bd- Hintergrund	diese Arbeit
frq^+ ; FLAG-GFP- $M_{FRQ(T513A)}$	frq^+ ; <i>bd A</i>	Konst. exprimiertes FLAG-GFP-FRQ(413- 683)(T513A) im Wt/bd- Hintergrund	diese Arbeit
frq^+ ; FLAG-GFP- $M_{FRQ(T513D)}$	frq^+ ; <i>bd A</i>	Konst. exprimiertes FLAG-GFP- FRQ(413- 683)(T513D) im Wt/bd- Hintergrund	diese Arbeit
frq^+ ; FLAG-GFP- $M_{FRQ\Delta PEST1}$	frq^+ ; <i>bd A</i>	Konst. exprimiertes FLAG-GFP-FRQ(413- 683) Δ PEST1 im Wt/bd- Hintergrund	diese Arbeit
frq^{10} ; FRQ Δ FCD1	$frq\Delta$ FCD1; <i>bd A</i>	U. <i>frq</i> -Promotor expr. FRQ Δ (310-326) im Δ <i>frq</i> /bd-Hintergrund	diese Arbeit
frq^{10} ; FRQ(T311A)	$frq(T311A)$; <i>bd A</i>	U. <i>frq</i> -Promotor expr. FRQ(T311A) im Δ <i>frq</i> /bd- Hintergrund	diese Arbeit
frq^{10} ; FRQ(L323N)	$frq(L323N)$; <i>bd A</i>	U. <i>frq</i> -Promotor expr. FRQ(L323N) im Δ <i>frq</i> /bd- Hintergrund	diese Arbeit
frq^{10} ; FRQ Δ FCD2	$frq\Delta$ FCD2; <i>bd A</i>	U. <i>frq</i> -Promotor expr. FRQ Δ (485-496) im Δ <i>frq</i> /bd-Hintergrund	diese Arbeit
frq^{10} ; FRQ Δ FCD1/2	$frq\Delta$ FCD1/2; <i>bd A</i>	U. <i>frq</i> -Promotor expr. FRQ Δ (310-326)(485-496) im Δ <i>frq</i> /bd-Hintergrund	diese Arbeit
frq^{10} ; FRQ(FCD1 \rightarrow SphI)	$frq(FCD1\rightarrow$ SphI); <i>bd A</i>	U. <i>frq</i> -Promotor expr. FRQ(FCD1 \rightarrow SphI) im Δ <i>frq</i> /bd-Hintergrund	diese Arbeit
frq^{10} ; FRQ(FCD2 \rightarrow FCD1)	$frq(FCD2\rightarrow$ FCD1); <i>bd A</i>	U. <i>frq</i> -Promotor expr. FRQ(FCD2 \rightarrow FCD1) im Δ <i>frq</i> /bd-Hintergrund	diese Arbeit

2.1.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Stamm	Beschreibung	Referenz
pJG9-4A	für <i>yeast two hybrid</i> -Assay, Selektion auf Adenin (starke Interaktion) oder Histidin (schwache Interaktion)	James et al., 1996
NMD3 "Shuffle"	MATa, his3, leu2, lys2, ura3, nmd3::KAN ^r + pURA3-NMD3	Gadal et al., 2001

2.1.1.3 *Escherichia coli*

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden chemokompetente Zellen (hergestellt nach der Inoue-Methode, Inoue et al., 1990; beschrieben in Sambrook und Russel, 2001) der Stämme

Stämme XL-1 Blue oder DH5- α verwendet. Beide Stämme ermöglichen Blau-Weiß-Selektion auf LB-Medium mit IPTG.

Stamm	Genotyp	Referenz
XL-1 Blue	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^q Z \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$	Stratagene 11011 N. Torrey Pines Road La Jolla, CA 92037 USA
DH5 α TM -T1 ^R	$F' \Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k^-, m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA$	Invitrogen Corporation 1600 Faraday Avenue Carlsbad, CA 92008 USA

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Laborchemikalien besaßen, sofern nicht gesondert angegeben, analysenreine (p. a.) Qualität.

<u>Substanz</u>	<u>Firma</u>
APS	Roth, Karlsruhe
Biotin	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Fluka, Steinheim
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol abs.	Riedel-de Haen, Seelze
Ethanol vergällt mit PE	ZBT, Uni Heidelberg
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Gerbu, Gaiberg
Glycin	Acros, New Jersey
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Grüssing, Filsum
Kaliumcarbonat	Applichem
Kaliumchlorid	J.T. Baker, Deventer, NL
Kaliumhydroxid	Riedel-de Haen, Seelze
Lithium-Hydroxid	Applichem
Luminol	Sigma, München
Magnesiumchlorid	J.T. Baker, Deventer, NL
β -Mercaptoethanol	Acros, New Jersey

Methanol	ZBT, Uni Heidelberg
Natriumazetat	Merck, Darmstadt
Natrium-Bisulfit	Sigma, München
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumhydroxid	J.T. Baker, Deventer, NL
Protein A-Sepharose	Amersham, Freiburg
Protein G-Agarose	Amersham, Freiburg
Radiochemikalien	Amersham, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Röntgenfilme	Bechtold, Kelkheim; Sigma, München
Saccharose	Fluka, Steinheim
Salzsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Seesand	Grüssing, Filsum
Sorbit	Roth, Karlsruhe
Sorbose	Sigma, München
Sulfolink	Pierce, Rockford, UK
TCA	J.T. Baker, Deventer, NL
Tris	Sigma, München
Wasserstoffperoxid	J.T. Baker, Deventer, NL

Alle übrigen Chemikalien wurden von der Firma Applichem (Darmstadt) bezogen. Die verwendeten Geräte, Enzyme, Standards und Kits sind an der entsprechenden Stelle im Text beschrieben.

2.1.3 Oligonucleotide

Die Synthese der Oligonucleotide erfolgte durch die Firma Thermo Electron GmbH - Biopolymers (Ulm). Alle Oligonucleotide wurden HPLC-aufgereinigt.

2.1.3.1 DNA-Sequenzen für PCR-Primer

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkungen
<i>Bgl</i> II-FRQ(2) fw	AAA AAG ATC TGC ATG CGG TAC CCC GGT GGC GGA TAG TGG GGA TAA ATC	-
<i>Sph</i> I-FRQ(412) fw	AAA AGC ATG CGG TAC CCC GGT GGG AAG CGG CGG TCG CAC	-
<i>Sph</i> I-FRQ(684) fw	AAA AGC ATG CGG TAC CCC GGT GGG ATC TGG	-

	TGA TGA AGT TGA	
<i>Spel</i> -FRQ(2-412) rv	TTT TAC TAG TTC AAC TTC CAT CTC CGC TTC	-
<i>Spel</i> -FRQ(413-683) rv	TTT TAC TAG TTC AGG ATC CTT CGA CCT CG	-
<i>Spel</i> -FRQ(684-989) rv	TTT TAC TAG TTC ACG AGG ATG AGA CGT CC	-
FRQ1 mut fw	CCG GAT GCG GAA AGC TGG GTG TAT CTC AAT C	Mutagenese
FRQ1 mut rv	GAT TGA GAT ACA CCC AGC TTT CCG CAT CCG G	Mutagenese
FRQ7 mut fw	GAA TAT GGA CTA CAT CCG TCA TCT GGA CCT TGT ATC TCC CGA ATT CTT GC	Mutagenese
FRQ7 mut rv	GCA AGA ATT CGG GAG ATA CAA GGT CCA GAT GAC GGA TGT AGT CCA TAT TC	Mutagenese
FRQ(S513A) mut fw	GCT GTC TCC GAA AAG GGC ACA AAG TTC CAG CTG TCT G	Mutagenese
FRQ(S513A) mut rv	CAG ACA GCT GGA ACT TTG TGC CCT TTT CGG AGA CAG C	Mutagenese
FRQ(S513D) mut fw	GCT GTC TCC GAA AAG GAC ACA AAG TTC CAG CTG TCT G	Mutagenese
FRQ(S513D) mut rv	CAG ACA GCT GGA ACT TTG TGT CCT TTT CGG AGA CAG C	Mutagenese
del FRQ(310-326) fw	TTC ACC GGA AAG ATC AGT GGA	5'-Phosphat
del FRQ(310-326) rv	GAC AAT ATG GTG AGG AAG CAG	5'-Phosphat
del FRQ(485-496) fw	GTT AAC GTA ACG CCG AGT TTT	5'-Phosphat
del FRQ(485-496) rv	ATA CAC CCA GCC TTC CGC AT	5'-Phosphat
FRQ-T311A fw	CAC CAT ATT GTC ATG GCC GAC AGG GAG AAG AAG	Mutagenese
FRQ-T311A rv	CTT CTT CTC CTT GTC GGC CAT GAC AAT ATG GTG	Mutagenese
FRQ-L323N fw	GCT GGT TGT CCG ACG CAA CGA GCA ACT GTT CAC CG	Mutagenese
FRQ-L323N rv	CGG TGA ACA GTT GCT CGT TGC GTC GGACAA CCA GC	Mutagenese
FCD2→FCD1 fw	CCT GGC CCA GCT GTT CAC CGG AAA GAT CAG T	5'-Phosphat
FCD2→FCD1 rv	TTA CAA AGC AGC AGC TTC TTC TTC TCC TTG TC	5'-Phosphat
YTH FCD1 fw	AAA AGA ATT CCA AAA GGT AGA AAA CTA TCT GC	-
YTH FCD1 rv	AAA AAG ATC TCT TTC CGG TGA ACA GTT GCT	-
YTH FCD2 fw	AAA AGA ATT CGA TGT TGC TCC GGA TGC GG	-
YTH FCD2 rv	AAA AAG ATC TGC TGT CGC TGC TGA ACT TG	-

2.1.3.2 DNA-Sequenzen für direkte Klonierung

Name	Sequenz (5'→3')	Bemerkungen
FRQ-FCD1 fw	CCT CAC CAT ATT GTC ATG ACC GAC AAG GAG AAG AAG AAG CTG GTT GTC CGA CGC TTG GAG CAA CTG TTC ACC GGA AAG ATC AGT GGA CTT AAG GGC ATG	-
FRQ-FCD1 rv	CCC TTA AGT CCA CTG ATC TTT CCG GTG AAC AGT TGC TCC AAG CGT CGG ACA ACC AGC TCC TTC TTC TTC TTG TCG GTC ATG ACA ATA TGG TGA GGC ATG	-

2.1.4 Plasmide

2.1.4.1 Plasmide für Transformation in *N. crassa*

Plasmid	Referenz
pBM60 <i>Clal frq</i>	M. Görl, unveröffentlicht
pFH64	F. Heise, unveröffentlicht
pFH64 FLAG-GFP-FRQ(2-412)	diese Arbeit
pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683)	diese Arbeit
pFH64 FLAG-GFP-FRQ1(413-683)	diese Arbeit
pFH64 FLAG-GFP-FRQ7(413-683)	diese Arbeit
pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683)(S513A)	diese Arbeit
pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683)(S513D)	diese Arbeit
pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683) Δ PEST1	diese Arbeit
pFH64 FLAG-GFP-FRQ(684-989)	diese Arbeit
pBM60 <i>Clal frq</i> Δ FCD1	diese Arbeit
pBM60 <i>Clal frq</i> Δ FCD2	diese Arbeit
pBM60 <i>Clal frq</i> Δ FCD1/2	diese Arbeit
pBM60 <i>Clal frq</i> (L323N)	diese Arbeit
pBM60 <i>Clal frq</i> (T311A)	diese Arbeit
pBM60 <i>Clal frq</i> FCD1 \rightarrow <i>SphI</i>	diese Arbeit
pBM60 <i>Clal frq</i> FCD2 \rightarrow FCD1	diese Arbeit

2.1.4.2 Plasmide für Transformation in *S. cerevisiae*

Plasmid	Referenz
pRS315- <i>nmd3</i> Δ NES1-eGFP	Gadal et al., 2001
pRS315-NMD3-eGFP	Gadal et al., 2001
pRS315- <i>nmd3</i> -FRQ(310-326)	diese Arbeit
pRS315- <i>nmd3</i> -FRQ(310-326)(L323N)	diese Arbeit
pGAD-C1	James et al., 1996
pGBD-C1	James et al., 1996
pGAD-SV40	D. Kammerer
pGBD-p53	D. Kammerer
pGAD-FCD1	diese Arbeit
pGAD-FCD1(L323N)	diese Arbeit
pGBD-FCD2	diese Arbeit

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper				
Name	Epitop	Hersteller	Art	Verdünnung
α -FRQ 3G11	N-term. Region v. FRQ, a 65 - 100	LMU München	monoklonal	1:10

α -WC-1	C-term. Peptid v. WC-1, aa 1156 - 1168	LMU München	polyklonal, Kaninchen	1:500
α -WC-2	GST-WC-2-PAS	Pineda Berlin	polyklonal, Kaninchen	1:1000
α - FLAG	DYKDDDK	Sigma	monoklonal	1:5000
α - CK-1a	DYKDDDK	Sigma	monoklonal	1:5000
Sekundäre Antikörper				
Name	Epitop	Hersteller	Art	Verdünnung
Goat- α mouse	Maus-IgG	BioRad München	polyklonal, Ziege, HRP-konjugiert	1:5000
Goat- α rabbit	Kaninchen-IgG	BioRad München	polyklonal, Ziege, HRP-konjugiert	1:5000

2.2 Methoden

2.2.1 Kulturbedingungen und Physiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium). Die Kulturen wurden kontinuierlich bei 37°C mit 180 rpm geschüttelt.

LB (Luria-Bertani)	1,0 % Tryptone (w/v)
Medium und	0,5 % Hefeextrakt (w/v)
Platten	1,0 % NaCl (w/v)
	100 µg/ml Apicillin
	(1,5 % Agar (w/v))

2.2.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Aufzucht von Hefe in Flüssigmedium oder auf Platten erfolgte in YPD-Medium mit bzw. ohne entsprechende Selektionsmarker.

YPD-Medium:	1,0 % Hefeextrakt (w/v)
	2,0 % Pepton (w/v)
	2,0 % Glucose (w/v)
	2,0 % Agar (w/v) für Platten

2.2.1.3 Yeast-two-Hybrid Assay

Der hier verwendete Hefestamm bietet die Möglichkeit, sowohl starke als auch schwache Interaktion nachzuweisen. Für die Untersuchung auf starke Interaktion wurde Selektionsmedium ohne Adenin und Histidin verwendet, für die Untersuchung auf schwache Interaktion Selektionsmedium ohne Histidin.

CD-Dropout-Medium:	0,67 % Hefe-Nitrogenbase ohne Aminosäuren (w/v)
	2,0 % Glucose (w/v)
	2,0 % Agar (w/v) für Platten
!	(20 mg/l Adeninsulfat)
!	(20 mg/l Histidin/HCl)
	20 mg/l Uracil
	20 mg/l L-Tryptophan
	20 mg/l L-Arginin/LiCl
	20 mg/l L-Methionin
	30 mg/l L-Tyrosin
	100 mg/l L-Leucin
	30 mg/l L-Isoleucin
	30 mg/l L-Lysin/HCl
	50 mg/l L-Phenylalanin
	100 mg/l L-Glutamat
	100 mg/l L-Aspartat
	150 mg/l L-Valin

200 mg/l L-Threonin
400 mg/l L-Serin

2.2.1.4 Kultivierung von *N. crassa*

Die Aufzucht von *N. crassa* folgte dem Protokoll nach Davis und de Serres (1970).

Standardmedium:	2 % Glucose (w/v), 0.5 % Arginin (w/v), 1 x Vogel's Medium 0,05 % Biotin (w/v)
für das Festmedium:	2 % (w/v) Agar zugegeben
50 x Vogel's:	123,5 g Natriumcitrat x 2H ₂ O 250 g KH ₂ PO ₄ 100 g NH ₄ NO ₃ 10 g MgSO ₄ x 7H ₂ O 5 g CaCl ₂ x H ₂ O 5 ml Spurenelemente-Lösung 2,5 ml Biotin-Lösung (0,1 mg/ml in 50 % (v/v) Ethanol) ad 1 l H ₂ O zur Konservierung wurden 500 µl Chloroform zugesetzt
Spurenelementlösung:	5 g Citrat x H ₂ O, 5 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O, 1 g (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ x 6H ₂ O, 0.25 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O, 0.05 g MnSO ₄ x H ₂ O, 0.05 g H ₃ BO ₃ anhydrid, 0.05 g Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O, ad 100 ml H ₂ O zur Konservierung wurde Chloroform zugesetzt

Zur Konidiengewinnung wurden 500 ml-Kolben mit 100 ml Festmedium inokuliert. Die Konidien der 7-10 Tage alten Mycelien wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen mit 1 M Sorbitol von den Hyphen gewaschen und durch sterile Trichter mit Mülleinlage filtriert. Einige Mutanten wie frq⁹ und frq¹⁰ wachsen meist weniger stark und bilden in der Regel deutlich weniger Konidien.

Für die Langzeitlagerung der Stämme wurden die Konidien suspensionen bei -20°C aufbewahrt. Konidien zur Transformation wurden dreimal mit 1M Sorbitollösung gewaschen (Zentrifugation bei 1500 g für 5 Minuten) und sofort verwendet.

Zur Gewinnung von Mycelien wurden Kolben mit 30 % ihres Gesamtvolumens mit Medium gefüllt und mit Konidien angeimpft. Nach 3-4 Tagen bei 25 °C wurde das Medium

mittels eines Büchnertrichters entfernt, die Mycelien zwischen einigen Lagen Haushaltspapier trockengepresst und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.1.5 Analyse des circadianen Phänotyps durch race tube assay

Unter freilaufenden Bedingungen (konstante Dunkelheit) oder bei regelmässiger Belichtung bildet *N. crassa* circadian reguliert Konidien. Bei Wachstum auf sogenannten *race tubes* werden diese Konidien als Bandenmuster sichtbar. Für die Analyse des Bandenmusters wurden Glasröhren mit je 7 ml *race tube*-Medium gefüllt, autoklaviert und anschließend auf einer absolut waagerechten Oberfläche zum Erstarren gebracht.

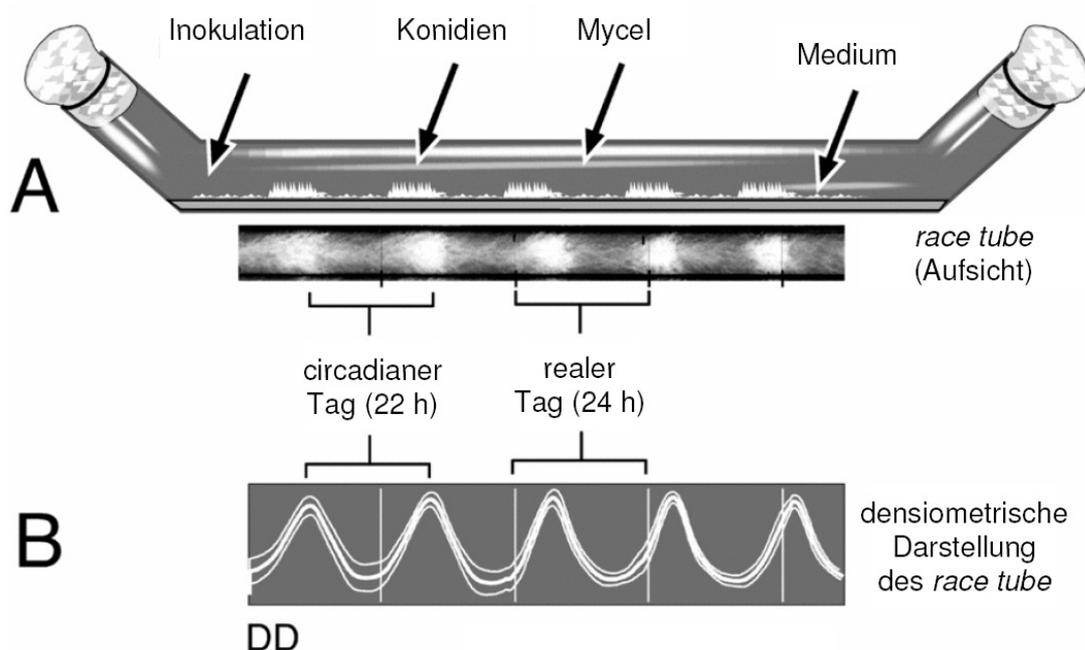


Abb. 2.1: Schema eines *racetube* (Abb. modifiziert nach N. Price-Lloyd, M. Elvin und C. Heintzen, 2005). **(A)** Die mit Medium gefüllten Glasröhrchen werden am Inokulationspunkt mit dem entsprechenden *Neurospora*-Stamm angeimpft. Das Wachstum verläuft ausschließlich in Längsrichtung. Der Wechsel zwischen vegetativem Mycel auf der Medienoberfläche und asexueller Sporenbildung (Lufthyphen) im asexuellen Lebenszyklus von *Neurospora crassa* erzeugt das Bandenmuster der Konidien. **(B)** Das Chrono-Programm errechnet aus der Dichte der bewachsenen Fläche die Periodenlänge des circadianen Tages.

An einem Ende wurden die Röhren beimpft und einen Tag im Dauerlicht inkubiert, bevor sie in konstante Dunkelheit bzw. in Licht/Dunkel-Zyklen transferiert wurden. Dabei wurden die Wachstumsfronten täglich markiert und der entsprechende Zeitpunkt vermerkt. Nach 5-7 Tagen Inkubation wurden die Racetubes eingescannt (Linoscan 1450, Heidelberger Druckmaschinen) und die Periodenlängen mit dem „Chrono II-Programm 11.1“ (T. Roenneberg, LMU München) analysiert.

Medium für *race tube assay*:
1× Vogels Medium N
0,3 % (w/v) Glucose
0,17 % (w/v) Arginin•HCl
0,01 % (w/v) Biotin
2 % (w/v) Agar

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

(Sofern nicht anders beschrieben nach Sambrook und Russel, 2001)

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985 & 1988)

PCR steht als Abkürzung für *polymerase chain reaction*. Hierunter versteht man die enzymatische Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnitts zwischen Oligonucleotiden, die gegenläufig an die komplementären Stränge binden. Die Oligonucleotide wurden im Überschuss zur zu vervielfältigenden DNA gegeben. Polymerasen heften Nucleotide an die freien 3'-Enden der Oligonucleotide und amplifizieren so geringste Mengen Matrizen-DNA millionenfach. Durch die Entdeckung von thermostabilen DNA-Polymerasen konnte die Methode automatisiert werden. Mit programmierbaren Thermocyclern werden die DNA-Doppelstränge erst denaturiert, dann erfolgt die Hybridisierung der Oligonucleotide. Im nächsten Schritt wird die DNA synthetisiert. Dieser Zyklus wird 30 – 40-mal wiederholt. Die PCR ist eine unentbehrliche Methode für viele Fragestellungen der molekularen Genetik. In dieser Arbeit wurde für Klonierungszwecke die Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Pfu, Fermentas; Phusion) verwendet, die eine „Proofreading-Aktivität“ und somit eine extrem geringe Fehlerquote besitzt. Für Test-PCRs genügte die weniger akkurate, dafür aber schneller arbeitende Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Taq, Fermentas).

Der Basisansatz für eine 25 µl-Reaktion enthielt:

10-30 ng Matrize
12,5 pmol Oligonucleotide (jeweils)
0,25 mM dNTPs (jeweils)
20 mM Tris-HCl, pH 8,8
10 mM KCl
10 mM (NH₄)₂SO₄
2 mM MgCl₂
0,1% Triton X-100
1 u Polymerase

Für präparative PCRs wurde das Volumen des Ansatzes verdoppelt.

Die Reaktion lief nach folgendem Schema im Thermocycler ab:

5 min Denaturierung bei 95 °C	
35 Zyklen	30 sec Denaturierung bei 95 °C 1 min Hybridisierung der Oligonucleotide 1 min Elongation bei 72 °C pro 1 kb
10 min abschließende Elongation bei 72 °C	

2.2.2.2 Mutagenese mittels PCR

Diese Methode dient der gezielten Veränderung eines Plasmids durch Einfügen einer Mutation (Punktmutation oder Insertion). Dazu werden zwei zueinander revers komplementäre Oligonucleotide synthetisiert, die die entsprechende Mutation tragen und beiderseits flankiert sind von kurzen unveränderten Bereichen. Diese hybridisieren in einer PCR-ähnlichen Reaktion mit den beiden Strängen der einzelsträngigen Plasmid-DNA (die *dam*-methyliert sein muss, s. u.) und wurden durch eine sehr leistungsfähige *proofreading*-Polymerase über die gesamte Länge des Plasmids amplifiziert. 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 Oligonucleotide). Diese Plasmide können nicht weiter vervielfältigt werden; als Matrix dient somit ausschließlich die (methylierte) Ausgangs-Plasmid-DNA (lineare Amplifikation). Diese sowie hemimethylierte Duplex-Stränge wurden anschließend durch *Dpn*I-Verdau spezifisch und vollständig abgebaut, so dass bei der Transformation in *E. coli*-Zellen nur mit mutagenisierter DNA transformiert wurde. Die Einzelstrangbrüche wurden 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 (Quiagen) durchgeführt: Für das Plasmid pBM60 *Cla*I und dessen Derivate wurde die DNA-Menge aufgrund der Größe (<15 kbp) von 10 ng auf 50 ng erhöht und die Extensionszeit auf 20 min verlängert. Durch anschließende Zugabe von *Dpn*I direkt zum Ansatz wurde die Matrize restriktionsverdaut. Die Produkte wurden nach dem Standardprotokoll in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert, welche auf LB-Festmedium mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden in 3 ml-Kulturen (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin über Nacht) aufgezogen. Plasmid-DNA wurde nach der Birnboim-Methode (s. u.) präpariert und durch Restriktionsfragmentanalyse und Sequenzierung überprüft.

2.2.2.3 Deletion mittels PCR

Um eine Deletion in ein Plasmid einzuführen, wurden zuerst zwei 5'-phosphorylierte Oligonucleotide so entworfen, dass sie unter Berücksichtigung des Leserahmens am jeweiligen 3'-Ende des zu deletierenden Bereiches beginnen. Bei der PCR mit hocheffizienter *proofreading* Polymerase wurde dann das gesamte Plasmid amplifiziert und der zu deletierende Bereich durch die Primer ausgespart. Die PCR entsprach im Wesentlichen der PCR-Mutagenese (s. Kap. 2.2.2.2) Das methylierte Matrizen-Plasmid wurde direkt im Anschluss mit *DpnI* restriktionsverdaut. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) und 200 ng in einer Ligationsreaktion zirkularisiert.

Ligationsansatz:	200 ng gereinigtes PCR-Produkt
	50 mM Tris-HCl pH 7,8
	10 mM MgCl ₂
	10 mM DTT
	0,5 mM ATP
	0,4 µl T4-Ligase
	2% PEG4000
	ddH ₂ O ad 20 µl

2.2.2.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Die Spaltung von Plasmid-DNA an spezifischen Sequenzen mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen erfolgte nach den Angaben der Hersteller im mitgelieferten Puffersystem. 1 - 10 µg Plasmid wurden dabei entsprechend der spezifischen Aktivität mit Enzym versetzt und 2 h bei der erforderlichen Temperatur inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend hitzeinaktiviert und auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Insertion eines DNA-Fragments in einen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen Vektors wurde Plasmid mit einem drei- bis sechsfachen molaren Überschuss des zu insertierenden Fragments gemischt. Der Ligationsansatz wurde 30 min bei RT inkubiert. 2 µl des Ligationsansatzes wurde anschließend in den gewünschten Bakterienstamm transformiert.

Ligationsansatz:	400 ng Plasmid-DNA
	X ng Insert-DNA
	50 mM Tris-HCl pH 7,8
	10 mM MgCl ₂
	10 mM DTT
	0,5 mM ATP
	0,4 µl T4-Ligase

ddH₂O ad 20 µl

2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Negativ geladene DNA-Moleküle bewegen sich in einem elektrischen Feld zum positiven Pol der Spannungsquelle. Dabei ist ihre Wandergeschwindigkeit abhängig von der Dichte der Matrix und von ihrer Größe: Kleine Moleküle wandern schneller als große. Diese Eigenschaft wird genutzt, um Gemische von DNA-Fragmenten verschiedener Größe elektrophoretisch voneinander zu trennen, um ihre Größe zu bestimmen oder Fragmente einer bestimmten Größe zu isolieren. Als Matrix dient dabei Agarose.

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden je nach gewünschter Trenneigenschaft, Fragmentgröße oder weiterer Verwendung 0,7-2 %ige Agarosegele (w/v) in 1x TAE-Puffer mit 10 µg/ml des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und bei 55-60 °C im Trockenofen gelagert. Beim Gießen des Gels wurde die Ethidiumbromidlösung zugegeben. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Kamm entfernt und die Gelkammer bis zur vollständigen Überschichtung des Gels mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden 6 x Auftragspuffer im Verhältnis 5:1 gemischt und mittels einer Pipette in die Taschen des Gels geladen. Zur Auftrennung der Proben wurde eine Gleichspannung von 60-85 V angelegt.

50x TAE-Puffer:	10 M Tris-Acetat (pH 7,7) 0,5 mM EDTA
6x Auftragspuffer:	200 mM Tris-Acetat (pH 7,7) 0,05 % (w/v) Xylencyanol 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerin

2.2.2.7 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

(Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega)

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten einer bestimmten Größe aus einem Gemisch vieler unterschiedlicher Fragmente, oder um ein PCR-Produkt von überschüssigen dNTPs und Oligonucleotiden zu trennen wurden diese auf einem Agarosegel aufgetrennt und unter längerwelligem UV-Licht (366 nm) das gewünschte Gelfragment herausgeschnitten. Das Gelfragment wurde gewogen, pro mg wurde 1 µl Membranbindelösung zugegeben und die Agarose durch Erwärmen des Ansatzes auf 60 °C vollständig gelöst. Die Lösung wurde auf die Silicagel-Säulen gegeben und zentrifugiert (1 min, 16.000 g, RT, Eppendorf-

Tischzentrifuge). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene Plasmid-DNA zunächst mit 700 μ l Membranwaschlösung und anschließend ein weiteres Mal mit 500 μ l Membranwaschlösung gewaschen (Zentrifugation s.o.). Die Säule wurde nach Entfernen des Durchflusses noch 5 min bei 16.000 g zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Schließlich wurde die DNA mit 25-50 μ l H₂O eluiert.

Membranbindelösung: 4,5 M Guanidin-Isothiocyanat
0,5 M Kaliumacetat pH 5,0

Membranwaschlösung: 10 mM Kaliumacetat pH 5,0
80% Ethanol
16,7 μ M EDTA pH 8.0

2.2.2.8 Sequenzierung von DNA

Für DNA-Sequenzierungen wurde die Firma Sequencing Laboratories GmbH (Göttingen) beauftragt. Aufgereinigte Plasmide konnten direkt, genomische DNA nach PCR-Amplifikation des Zielgens sequenziert werden. Als Primer für die Sequenzierungen wurden in allen Fällen spezifische Oligonucleotide verwendet. Die Sequenzanalysen und –vergleiche wurden mit dem Programm DNA Star durchgeführt.

2.2.2.9 Transformation von *E. coli*

Es wurden chemokompetente Zellen der Stämme DH5 α und XL1blue verwendet. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 2 μ l eines Ligationsansatzes oder 0,2 μ l Plasmid-DNA vermischt und 20-30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch eine Hitzeschockbehandlung für 90 sec bei 42 °C. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 45 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Ansätze wurden kurz abzentrifugiert, in ca. 100 μ l Medium resuspendiert und auf LB_{Amp}-Agar-Platten ausgestrichen. Nach erfolgter Übernacht-Inkubation der Platten konnten Einzelkolonien für Minipräparationen der transformierten Plasmide zu Testzwecken angeimpft werden.

SOC-Medium: 0,5% (w/v) Hefeextrakt,
0,2% (w/v) Trypton,
20 mM Glucose,
2.5 mM KCl,
10 mM MgCl₂,
10 mM MgSO₄,
10 mM NaCl

2.2.2.10 Minipräparation von Plasmiden

2 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4500 g und 4 °C in einer Eppendorf-Tischkühlzentrifuge geerntet. Das Kulturmedium wurde mit der Wasserstrahlpumpe vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 250 µl L1-Puffer vollständig resuspendiert. Nach der Zugabe von 250 µl L2-Lysis-Puffer erfolgte die Inkubation des Ansatzes für 2 Minuten bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit lysierten die Zellen und die Suspension wurde klar. Durch Zugabe von 250 µl gekühltem L3-Puffer und anschließende Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 12.000 g wurden Proteine, Zellwandbestandteile und bakterielles Chromosom präzipitiert. Der Überstand mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 0,8 Volumen Isopropanol und 20 min Zentrifugation bei 15.000 g und 4 °C wurde die Plasmid-DNA gefällt. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 500 µl 70 %igem Ethanol 10 min bei RT und 15.000 g gewaschen, um Salze und Reste des SDS zu entfernen. Das Ethanol wurde mit der Wasserstrahlpumpe entfernt und das Pellet getrocknet, bis es durchscheinend-wachsartig aussah. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl bidestilliertem, autoklaviertem Wasser aufgenommen.

Puffer L1: 50 mM Tris-HCl pH 8,0
 0,9 % Glucose (w/v)
 10 mM EDTA
 100 µg/ml RNaseA

Puffer L2: 200 mM NaOH
 1% (w/v) SDS

Puffer L3: 3 M Kaliumacetat pH 4,8

2.2.2.11 Midipräparation von Plasmiden

(Macherey und Nagel)

50 ml einer Übernachtskultur wurden durch 15 min Zentrifugation bei 4500 g und 4 °C geerntet. Die Midipräparationen beruhen ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Das Medium wurde entfernt und die Zellen in 4 ml S1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml S2-Puffer zugefügt, das Falcon verschlossen 6-8-mal invertiert und die Suspension auf diese Weise vorsichtig durchmischt. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Klärung der Suspension wurden 4 ml S3-Puffer zugefügt und die Suspension durch mehrmaliges Invertieren des Falcons homogen durchmischt, der Ansatz anschließend bei 4°C für 25 min mit 12.000 zentifugiert.

Während der Zentrifugation wurde eine Nucleobond Midi-Säule mit 3 ml N2-Puffer äquilibriert, der Überstand aus der Zentrifugation ohne Präzipitat auf die äquilibrierte Säule geladen und mittels Schwerkraft durch die Säule laufen gelassen. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule anschließend zweimal mit je 10 ml N3-Puffer gewaschen. Die an der Silikat-Membran der Säule gebundene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 5 ml N5-Puffer in ein 15 ml-Falcon-Gefäß eluiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert und bei 4 °C für 20 min bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 2 ml 70 %igem Ethanol 10 min bei 15.000 g gewaschen. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 100 µl bidestilliertem, autoklaviertem Wasser aufgenommen. Nach der Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Plasmid-DNA mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 500 µg/ml verdünnt und bei -20 °C gelagert.

S1-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg RNase A/ml
S2-Puffer:	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
S3-Puffer:	2,8 M Kaliumacetat (pH 5,1)
N2-Puffer:	100 mM Tris-H ₃ PO ₄ , pH 6,3 15 % Ethanol 900 mM KCl 0,15 % Triton X-100
N3-Puffer:	100 mM Tris- H ₃ PO ₄ , pH 6,3 15 % Ethanol 1,15 M KCl
N5-Puffer:	100 mM Tris- H ₃ PO ₄ pH 8,5 15% Ethanol 1 M KCl
10 x TE-Puffer:	100 mM Tris-HCl (pH 8) 10 mM EDTA

2.2.2.12 Präparation von genomischer DNA (gDNA) aus *N. crassa*

Etwa 200 µl im Mörser zerkleinertes Zellmaterial von *N. crassa* wurde in einem 2 ml Reaktionsgefäß zusammen mit 400 µl 2x CTAB und 30 min bei 60°C geschüttelt und anschließend mit 400 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) mittels eines Vortex-Mischers kräftig durchmischt. Bei der anschließenden Zentrifugation für 10min bei maximaler

Drehzahl in einer Eppendorf-Tischzentrifuge trennte sich der Ansatz in zwei Phasen. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in einem frischen Reaktionsgefäß erneut mit 350 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert. Der Überstand wurde durch einen Verdau mit 1 µg RNaseA (Applichem, Darmstadt) für 30 min bei 37°C von RNA-Verunreinigungen befreit. Anschließend wurde der Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und wie oben beschrieben präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und anschließend bei 50°C in 100 µl bidestilliertem, autoklaviertem Wasser resuspendiert.

2 x CTAB: 100 mM Tris/HCl pH 7,5,
 2% CTAB,
 1,4 M NaCl,
 20 mM EDTA,
 1% Na-Bisulfit

2.2.2.13 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA wurde mit einem NanoDrop Spektrophotometer ND-1000 (Peqlab, Erlangen) quantifiziert. Hierzu wurden 2 µl der entsprechenden Probe direkt gemessen. Die Konzentration wurde mittels der zugehörigen Software direkt ermittelt.

2.2.2.14 Transformation von *N. crassa*

Für die Transformation wurden Histidin-auxotrophe (*his3*) *N. crassa*-Stämme genutzt. Dieser Defekt wird durch eine Punktmutation hervorgerufen. Durch homologe Rekombination mit dem *his3*-Gen des Transformationsvektors wurden die Stämme wieder prototroph und wuchsen auf Medium ohne Histidin. Das gewünschte Insert integriert dabei gezielt mit an diesen Lokus (Aramayo und Metzberg, 1996).

Zu Transformationszwecken wurden Konidien des entsprechenden Stammes nach 5 – 7 Tagen Wachstum auf Festmedium geerntet (s.Kap. 2.2.1.2). Nach den Waschungen in 1M Sorbitollösung wurden die pelletierten Konidien in wenig 1 M Sorbitollösung resuspendiert, pro Transformationsansatz 50 µl der Konidiensuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA gemischt. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad, 2 mm Elektrodenabstand) überführt und auf Eis gekühlt. Die Elektroporation erfolgte mit 1,5 kV, 25 µF und 600Ω. Nach dem Stromstoß wurden die Konidien sofort in 1 ml kalter 1 M Sorbitollösung resuspendiert. Der Deckagar wurde zum Gebrauch in der Mikrowelle geschmolzen und auf 55-60° C abgekühlt.

Zum Ausplattieren wurden je Transformationsansatz 200 µl und 800 µl Suspension in je 8-10 ml flüssigen Deckagar (im Wasserbad bei 50 °C aufbewahren) gegeben, gut gemischt (mehrmals invertieren) und sofort auf vorgewärmte (Raumtemperatur) Bodenagarplatte

ausgebracht. Die Kolonien wurden nach 2–3 Tagen Inkubation bei 30 °C sichtbar und konnten auf Festagarröhrchen vereinzelt werden.

Bodenagar:	1x Vogels Salze mit Biotin 1,5 % (w/v) Agar 1x FIGS (erst nach dem Autoklavieren zugeben)
Deckagar:	1x Vogels Salze mit Biotin 18,2 % (w/v) Sorbit 2,8 % (w/v) Agar 1x FIGS (erst nach dem Autoklavieren zugeben)
10xFIGS:	20 % (w/v) Sorbose 0,5 % (w/v) Glucose 0,5 % (w/v) Fructose

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Proteintotalextrakte von *Neurospora crassa*

Das gefrorene Mycel wurde unter flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser gründlich zerrieben und fein gemahlen. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis vorgenommen. Das pulverisierte Mycel wurde in vorgekühlten Reaktionsgefäße gefüllt und mit einem Vol. Proteinextraktionspuffer (PEX) mit Inhibitoren versetzt. Während der folgenden Inkubation (30 min auf Eis) wurden die Ansätze ca. alle fünf Min. mittels eines Vortex-Mischers durchmischt. Die Ansätze wurden anschließend 10 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Eine zweite Zentrifugation erfolgt bei 4 °C und 25.000 g für 20 Min. Es bilden sich drei Phasen: oben eine Lipidschicht, unten unlösliche Zellbestandteile. Die mittlere Phase, der Zellextrakt, wurde mit der Pipette entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

bPEX:	50 mM HEPES-KOH pH 7,4 137 mM NaCl 5 mM Na ₂ EDTA pH 8,0 10 % (v/v) Glycerin
Inhibitoren:	1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin 1 mM PMSF ev. Phosphatase-Inhibitoren (PhosphoStop, Roche)

2.2.3.2 Subzelluläre Fraktionierung von *N. crassa*

Die Methode der subzellulären Fraktionierung wurde nach einem modifizierten Protokoll (Baum und Giles, 1985) durchgeführt. Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten in einer

Tischkühlzentrifuge mit Ausschwingrotor (A-8-11 für Eppendorf Zentrifuge 5417 C / 5417 R). Hierfür wurden 1,5 bis 2 ml pulverisiertes Mycel in 700 µl Puffer A aufgenommen und unter regelmäßigem Mischen 20 min auf Eis inkubiert. Das Homogenat wurde mittels einer Spritze (10 ml Vol.) durch eine Mulllage filtriert und dieser Durchlauf (ca. 600 µl) unter Rühren mit 1,2 ml Puffer B versetzt und in einem 2 ml Reaktionsgefäß auf 300 µl einer Puffermischung (A:B 1:1,7) geschichtet. Nach der Zentrifugation der Zelltrümmer durch die Pufferschicht (2 min bei 700 g und 4°C) wurde der gesamte Überstand abgenommen und in einem frischen Zentrifugenröhrchen auf 400 µl Saccharosegradient geschichtet. 120 µl des Überstandes wurden als Totalhomogenat zurückbehalten. Nach erneuter Zentrifugation (8 min bei 9000 g und 4°C) wurden 300 µl der cytosolischen Phase oberhalb des Saccharosegradienten als Probe entnommen und der Rest des Überstandes verworfen. Das Pellet enthielt die Zellkerne, welche in 50 bis 100 µl bPEX-Puffer (s. Kap. 2.2.3.1) resuspendiert wurden. Der Proteingehalt der Proben wurde mittels Bradford-Assay ermittelt. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch SDS-PAGE und anschließenden Western Blot.

Fraktionierungspuffer A:

- 50 mM Tris-HCl pH 7,5
- 5 mM Mg(OAc)₂
- 3 mM CaCl₂
- 5 mM Na₂EGTA pH 8,0
- 1 M Sorbit
- 7 % (w/v) Ficoll 400
- 20 % (v/v) Glycerin
- 5 mM DTT
- 1 µg/ml Leupeptin
- 1 µg/ml Pepstatin
- 1 mM PMSF

Fraktionierungspuffer B:

- 50 mM Tris-HCl pH 7,5
- 5 mM Mg(OAc)₂
- 5 mM Na₂EGTA pH 8,0
- 10 % (v/v) Glycerin
- 5 mM DTT
- 1 µg/ml Leupeptin
- 1 µg/ml Pepstatin
- 1 mM PMSF

Saccharosegradient:

- 25 mM Tris•HCl pH 7,5
- 5 mM Mg(OAc)₂
- 1 M Saccharose
- 10 % (v/v) Glycerin
- 5 mM DTT
- 1 µg/ml Leupeptin
- 1 µg/ml Pepstatin
- 1 mM PMSF

2.2.4 Proteinbiochemische und Immunologische Methoden

2.2.4.1 Proteinbestimmung

Die Konzentration von Proteinen wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Hierzu wurde das Protein Assay (BioRad, München) verwendet. Zur Quantifizierung diente eine Standardreihe mit 0 – 20 µg ImmunglobulinG. Die Proben wurden mit 1 ml Reagenz versetzt und nach 5 min die Absorption bei 595 nm bestimmt. Zur Absorptionsmessung diente ein SmartSpec 3000 Spetro-Photometer (BioRad, München).

2.2.4.2 Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA)

Um Proteine aus stark verdünnten wässrigen Lösungen für die Analyse mittels SDS-PAGE zu fällen, wurden die Proben mit 10 % (v/v) 3 M TCA versetzt. Nach Inkubation für 20 min auf Eis wurden die gefällten Proteine 15 min bei 15000 rpm und 4°C in einer Eppendorf-Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem reinem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach kurzer Trocknung in einem adäquaten Volumen Laemmli-Probenpuffer (s. u.) resuspendiert und anschließend für 5 min bei 95°C inkubiert.

2.2.4.3 Proteinpräzipitation mit Methanol-Chloroform (Wessel u. Flügge, 1984)

Diese Methode ist zuverlässig bei kleinsten Proteinmengen und funktioniert auch bei Proben, die Seifen oder hohe Salzkonzentrationen enthalten. Außerdem werden Lipide effizient entfernt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt, die Zentrifugationen in einer Tischkühlzentrifuge bei 4 °C.

Die gewünschte Proteinmenge wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dest. Wasser auf ein Vol. von 100 µl gebracht, mit 400 µl Methanol gemischt und 10 sec bei 9000 g zentrifugiert. 100 µl Chloroform wurden zupipettiert, gemischt und weitere 10 sec bei 9000 g zentrifugiert. Zur Phasentrennung wurden 300 µl dest. Wasser zugegeben, stark geschüttelt und 1 min bei 9000 g zentrifugiert. Das präzipitierte Protein sammelte sich an der Phasengrenze von Methanol/Wasser- und Chloroform-Phase. Die Methanol/Wasser-Phase wurde so vollständig wie möglich entfernt. Protein und Chloroform-Phase wurden mit weiteren 300 µl Methanol versetzt, gemischt und 2 min bei 9000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Es wurde in einem der folgenden Verwendung entsprechenden Puffer resuspendiert.

2.2.4.4 Native Aufreinigung von His-markierten Proteinen aus *N. crassa*

Das Mycel wurde unter flüssigem Stickstoff im Mörser fein zermahlen und dann im gleichen Volumen Lysispuffer für native Aufreinigung resuspendiert. Die Suspension wurde 20 min auf Eis inkubiert und dabei regelmäßig durchmischt. Die Zellwandtrümmer des Lysats wurden bei 4 °C und 10.000 g 10 Minuten abzentrifugiert, anschließend wurde der Extrakt bei 45.000 rpm 30 min ultrazentrifugiert. Währenddessen wurde 1 ml Ni-NTA-Agarose mit Lysispuffer äquilibriert. Die Konzentration des Überstands aus der Zentrifugation wurde bestimmt und 50 mg Protein in 5 ml Lysispuffer mit Inhibitoren mit der Ni-NTA-Agarose gemischt und auf einem Rotator bei 4 °C ü. N. unter Bewegung inkubiert. Eine 50 µl Probe des Lysats wurden mit SDS-Probenpuffer in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss vermischt, 5 min bei 95 °C gekocht und zur späteren SDS-PAGE-Analyse eingefroren.

Der Durchfluss wurde aufgefangen und bei –80 °C aufbewahrt. Eine 50 µl Probe des Durchflusses wurden mit SDS-Probenpuffer in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss vermischt, 5 min bei 95 °C gekocht und zur späteren SDS-PAGE-Analyse eingefroren. Die Säule wurde zweimal mit je 4 ml Waschpuffer gewaschen, der Durchfluss aufgefangen und nach dem Entnehmen einer Probe (s.o.) bei –80 °C aufbewahrt. Die Elution des Proteins erfolgte in vier Schritten mit je 500 µl Elutionspuffer. Den Eluat wurden ebenfalls Proben zur Untersuchung in einer SDS-PAGE entnommen.

Lysispuffer: 50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0
 300 mM NaCl

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0
 300 mM NaCl
 20 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0
 300 mM NaCl
 250 mM Imidazol

2.2.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte im Tris-Glycin-System nach Laemmli (1970). Es wurde hierzu entweder ein Gelsystem für große Gele (8 x 15 x 0,1 cm, Werkstatt der LMU, München) oder eines für kleine Gele, z. B. Testgele (7 x 7,2 x 0,1 cm, Mini-ProteanIII, BioRad, München) verwendet. Es wurden für sämtliche Analysen 7,5 %ige Trenngele mit 5 %igem Sammelgel benutzt. Die Proteinproben wurden durch eine fünfminütige Inkubation in Laemmli-Probenpuffer bei 95°C denaturiert. Die Läufe erfolgten in SDS-Laufpuffer bei 6 bis 10 mA und 200 V über Nacht, um eine optimale Auftrennung der einzelnen

Phosphorylierungsspezies bei FRQ zu erreichen. Zur Ermittlung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurden käufliche Marker verwendet (Rotimark (Roth, Karlsruhe), Peqlab Gold IV (Peqlab, Erlangen)).

Trenngel:	7,5 - 12 % (w/v) Acrylamid 0,2 - 1% (w/v) Bisacrylamid 375 mM Tris/HCl pH 8.8 0,1% (w/v) SDS 0,075% (w/v) APS 0,075% (v/v) TEMED
Sammelgel:	5% (w/v) Acrylamid 0,083% (w/v) Bisacrylamid 60 mM Tris/HCl pH 6.8 0,1% (w/v) SDS 0,05% (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED
4 x Probenpuffer:	240 mM Tris/HCl pH 6.8, 8 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 40 % (v/v) Glyzerin, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer:	50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS

2.2.4.6 Western Blot (Semi Dry System, Towbin et al., 1979)

Nach ausreichender Auftrennung wurde das Sammelgel für den Western Blot entfernt und das Trenngel in Transfer-Puffer äquilibriert.

Passend zugeschnittene Nitrocellulosemembran (Biorad) und sechs Whatman-Papierstücke wurden in Transfer-Puffer getränkt. Auf der mit Transfer-Puffer benetzten Anoden-Platte der Blotting-Apparatur wurden drei der angefeuchteten Whatman-Papiere gelegt. Auf dem Stapel wurden erst die Membran und darauf möglichst luftblasenfrei das Acrylamid-Gel platziert. Auf das Gel wurden die drei verbleibenden Whatman-Papiere gelegt und möglicherweise vorhandene Luftblasen aus dem Stapel entfernt, indem eine Glaspipette von der Mitte des Stapels mit leichtem Druck zu den Kanten hin gerollt wurde. Der Kathoden-Deckel wurde vor dem Aufsetzen ebenfalls leicht mit Transfer-Puffer befeuchtet. Bei einer maximalen Spannung von 10 V und 1,5 mA/cm² wurden die Proteine dann ca. zwei bis drei Stunden aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Um die Effizienz und die Gleichmäßigkeit des Transfers abzuschätzen wurde die Membran mit PonceauS angefärbt.

Nach dem Entfärben durch Waschen in TBS wurde die Membran 1 h mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS geblockt, um unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Im Folgenden wurde der primäre Antikörper (s. Tab.) hinzugefügt und für mindestens 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Blot-Membran mit TBS für jeweils 10 min wurde diese mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Dieser Schritt erfolgte ü. N. bei 4°C. Der Nachweis der Proteine erfolgte über Chemilumineszenz, wobei Meerrettich-Peroxidase, welche an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, ein Substrat umsetzt, was zu einer Freisetzung von Licht führt. Durch Auflegen von Röntgenfilmen für verschiedene Expositionszeiten wurden die Ergebnisse dokumentiert.

Transfer-Puffer:	25 mM Tris-HCl pH 8,3 192 mM Glycin 20 % Methanol (v/v)
PonceauS-Färbelösung:	0,2 % (w/v) PonceauS 3 % (w/v) Trichloressigsäure
TBS	50 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl

2.2.4.7 2D-Gelelektrophorese

Diese Methode diente in dieser Arbeit zur Bestimmung des pI sowie des Grades der Phosphorylierung von Proteinen. Die erste Dimension bestand aus einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) und die zweite Dimension aus einer SDS-PAGE (s.o.). Für die IEF wurden gebrauchsfertige „Ready-Strips“ (BioRad, München) mit einem immobilisierten pH-Gradienten (pH-Bereich 3-6, 4-7, 5-8 sowie 3-10) verwendet. 1 mg Gesamtprotein wurde einer Methanol/Chloroformfällung unterzogen und das Pellet in 240 µl 2D-Probenpuffer aufgenommen, mit 90 µl Rehydrierungspuffer vermischt und auf IEF-Streifen gegeben. Die Streifen wurden über Nacht bei 500 V rehydriert und anschließend gemäß Herstellerangaben isoelektrisch fokussiert (Protean IEF System, BioRad, München). Danach wurden die Streifen für die zweite Dimension nacheinander jeweils 15 min in beiden Äquilibrationspuffern inkubiert, mit Agarose auf einem SDS-Gel fixiert und der SDS-PAGE unterzogen.

2D-Probenpuffer:	7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 40 mM Tris, 1 % (w/v) DTT, 0,5 % (v/v) Servalyte 3-10, Complete plus EDTA Protease-Inhibitor Cocktail
------------------	--

Rehydrierungspuffer: 6 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
2 % (w/v) CHAPS
0,5 % (v/v) Servalyte 3-10
0,5 % (w/v) DTT
etwas Bromphenolblau

Äquilibriumspuffer I: 6 M Harnstoff,
30 % Glycerin,
2 % SDS,
390 mM Tris/HCl pH 8,8
130 mM DTT

Äquilibriumspuffer II: 6 M Harnstoff,
30% Glycerin,
2% SDS,
0,39 M Tris/HCl pH 8,8
135 mM Iodacetamid

Agarose zur Fixierung: 0,5 % Agarose in
SDS-Laufpuffer (s. Kap. 2.2.4.5)
1 Spatelspitze Bromphenolblau

2.2.4.8 Gelfiltrationschromatographie

Zur größenmäßigen Auftrennung nativer Proteinkomplexe wurde das Verfahren der Gelfiltrationschromatographie genutzt. Die Chromatographie wurde auf einem Äkta-Explorer System (Amersham, Freiburg) mit einer Superose-6-HR-10/30-Säule oder einer Sephadex200-Säule (je 25 ml Säulenvolumen, Amersham, Freiburg) entweder mit Gesamtzellextrakt oder mit His-aufgereinigtem Protein (s. Kap. 2.2.4.4) durchgeführt. 6 mg *N. crassa* Gesamtzellextrakt mit Proteaseinhibitoren versetztem Chromatographiepuffer auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt. Nach Ultrazentrifugation bei 45000 rpm für 30 min wurde 1 mg als Ladekontrolle abgenommen, mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Die restlichen 5 mg wurden in die Säule injiziert. Im Fall von His-aufgereinigtem Protein wurde das Eluat mit der höchsten Proteinkonzentration (Eluat 3) direkt injiziert. Der Säulenlauf fand bei einer Flußrate von 0,3 ml/min statt. Das Eluat wurde in 500 µl-Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen zwischen 7 und 24 ml Elutionsvolumen wurden direkt mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert (bei His-aufgereinigtem Protein) oder vorher mit Trichloressigsäure gefällt (bei Gesamtzellextrakt) und durch SDS-PAGE und anschließenden Western Blot analysiert.

Chromatographie-Puffer: 25 mM HEPES
1 % (v/v) Glycerin
150 mM Na-Acetat
1 mM EDTA

2.2.4.9 Co-Immunopräzipitation

Für Immunopräzipitationen mit polyklonalen Antikörpern wurden diese mittels Protein A Sepharose (Amersham, Freiburg) durchgeführt. Im Falle, dass monoklonale Antikörper zum Fällen verwendet wurden, wurde wegen der höheren Bindungskapazität für Maus-IgG ProteinG-Agarose benutzt. Für Proteine mit FLAG-Tag wurde Agarose mit kovalent gebundenem monoklonalem FLAG-Antikörper verwendet (Sigma). 20 - 40 µl der entsprechenden Beads wurden mit PEX-Puffer äquilibriert und bei 500 g für 5 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge sedimentiert. Anschließend wurden sie mit 1,5 ml monoklonalem oder 100 - 400 µl polyklonalem affinitätsgereinigtem Antikörper versetzt. Zur Bindung wurden die Ansätze 2 h bei RT unter Bewegung inkubiert. Die Sepharose wurde dreimal mit PEX mit Protease-Inhibitoren gewaschen. Für die Präzipitation wurden 1,5 – 5 mg Gesamtextrakt zugegeben und die Ansätze für über Nacht bei 4 °C rotiert. Es wurde eine Probe vom Überstand zur Analyse entnommen, die Sepharose mit den gefällten Proteinen erneut dreimal mit PEX gewaschen und schließlich 5 min bei 40 °C in Laemli-Probenpuffer inkubiert, um die Proteine zu eluieren. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 95 °C gekocht. Als Kontrolle dienten Ansätze mit Präimmunsereen der jeweiligen polyklonalen Antikörper, bzw. mit leeren Beads für monoklonale Antikörper.

2.2.4.10 Dephosphorylierung von Gesamtzellextrakten

Um die Phosphorylierung von FRQ und seine eigentliche Größe genauer darzustellen, wurden Proteinextrakte mit der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP, NEB, Frankfurt) behandelt. Hierzu wurden Gesamtproteinextrakte in einem besonderen Puffer hergestellt. Zu 300 µg der so erhaltenen Extrakte wurden 50 U der CIP gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Proben konnten im Anschluss wie gewohnt mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden.

Phosphatase-Puffer: 50 mM TRIS/HCl pH 8
 100 mM NaCl
 10% (v/v) Glycerin
 10 mM MgCl₂
 1 mM DTT
 1 mM PMSF
 5 µg/ml Leupeptin
 5 µg/ml Pepstatin A

2.2.4.11 Aufreinigung von His-markierten Proteinen mit Phosphatase-Behandlung

Um eine möglichst vollständige Dephosphorylierung größerer Mengen von FRQ zu erreichen, wurde His-markiertes FRQ zuerst an NiNTA-Sepharose gebunden. Nach der Waschung mit nativem Waschpuffer wurde die NiNTA-Sepharose zweimal mit Phosphatasepuffer gewaschen und dann mit 1.000 U λ -Phosphatase (NEB, Frankfurt) inkubiert (30 min bei 30°C). Die Reaktion wurde durch Waschen mit nativem Waschpuffer gestoppt und die Aufreinigung wie unter Kap. 2.2.4.4 beschrieben fortgesetzt.

Phosphatase-Puffer: 25 mM Tris/HCl pH 8
 150 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 0,1 % (v/v) β -Mercapto-Ethanol

2.2.4.12 Kinase-Aktivitäts-Assay

FLAG-CK-1a aus 3 mg Totalextrakt pro Ansatz (PEX-Puffer mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) wurde ü. N. an 30 μ l α FLAG-Agarose gebunden, danach der Überstand entfernt und die Agarose-Beads dreimal mit PEX gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, 50 μ l Kinase-Puffer zugefügt und die Ansätze unter leichter Bewegung im Heizblock bei 30 °C inkubiert. Nach 10, 30 und 60 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 2xLaemmli-Probenpuffer und Inkubation bei 40 °C für 5 min gestoppt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 95 °C aufgekocht. Je 10 μ l pro Probe wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt, mittels Western Blot auf Nitrocellulose übertragen und radioaktives P³² durch Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

Kinase-Assay-Puffer: 50 mM HEPES-KOH pH 7,4
 137 mM NaCl
 10 % (v/v) Glycerin
 1 mM Na₂EDTA pH 8,0
 0,4 mM EGTA
 6 mM Mg-Acetat
 1 mM ATP
 1 μ l/ml (v/v) P³²-ATP
 100 μ g/ml (w/v) Casein

2.2.4.13 Proteinspaltung mit Hydroxylamin (modifiziert nach Bornstein & Balian, 1977)

Hydroxylamin spaltet unter basischen Bedingungen die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren Asparagin und Glycin. Da diese Reaktion im Gegensatz zu einer enzymatischen Spaltung unter denaturierenden Bedingungen abläuft, sind die Proteine währenddessen nicht dem Einfluss von Proteasen oder Phosphatasen unterworfen.

Pro Ansatz wurde 500 µg Gesamtzelleextrakt oder aufgereinigtes Protein in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit Trichloressigsäure gefällt und das Pellet mit eiskaltem 100 %igem Ethanol gewaschen (s. Kap. 2.2.4.2). Inzwischen wurde der pH einer 5 M Hydroxylamin-Lösung mit LiOH-Granulat auf 9 eingestellt und die Lösung mit ddH₂O auf 4 M verdünnt. Das Pellet wurde in 50 µl Guanidinium-Puffer resuspendiert und anschließend 50 µl Hydroxylamin-Lösung zugegeben. Die Ansätze wurden 2 oder 4 h bei 55 °C im Heizblock inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch eine TCA-Fällung gestoppt, das Pellet in 50 µl Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95 °C gekocht.

Guanidinium-Puffer: 6 M Guanidinium/HCl pH 9
 200 mM K₂CO₃

Hydroxylamin-Lsg.: 4 M Hydroxylamin/LiOH pH 9

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Phosphorylierung von FRQ

Das Uhrenprotein FRQ wird unmittelbar nach seiner Synthese sehr stark phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen sind schon bei einer normalen SDS-PAGE-Analyse als multiple Banden reduzierter elektrophoretischer erkennbar. Das im Laufe des Tages hyperphosphorylierte FRQ wird mit einsetzender Dunkelheit abgebaut. Um die Anzahl der Phosphorylierungen genauer abschätzen zu können, wurde FRQ-Protein aus einer Dauerlicht-Kultur und Phosphatase-behandeltes FRQ-Protein einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen (s. Abb. 3.1). Als Kontrolle wurde ein unbeladener IEF-Streifen ebenfalls der Fokussierung unterzogen und anschließend in 1,5 cm lange Stücke geschnitten. Die Stücke wurden in je 2 ml 50 mM KCl-Lösung inkubiert und anschließend ihr pI bestimmt. Aus dieser Skala lässt ableiten, dass sich der pI von unphosphoryliertem gegenüber hyperphosphoryliertem FRQ um ca. Faktor 1,2 ändert. Mithilfe der Scansite-Software (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html) konnte ermittelt werden, dass diese Differenz einem Zustand von 60-100 Phosphorylierungen entspricht (s. dazu auch Bjellqvist et al., 1993). Ebenso wurde aus dem Experiment ersichtlich, dass unter LL-Bedingung so gut wie kein unphosphoryliertes FRQ vorhanden ist.

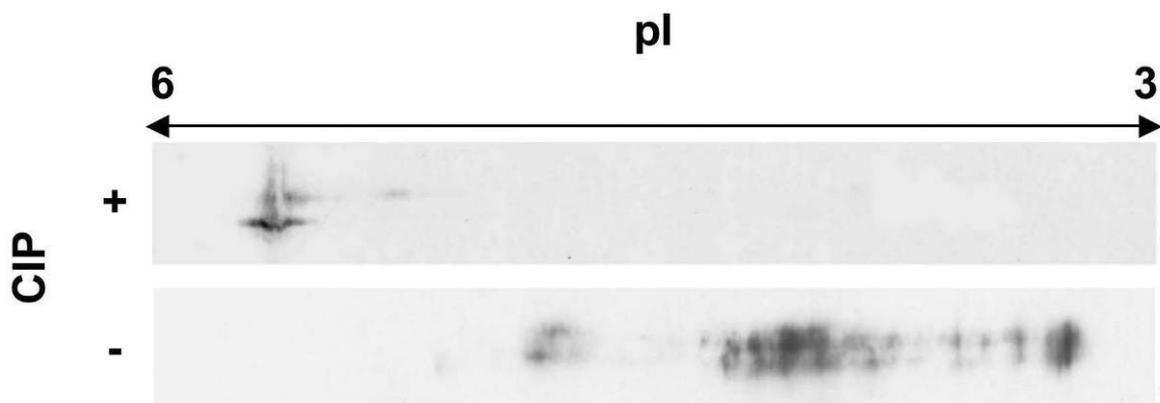


Abb. 3.1: 2D-Gelelektrophorese von unphosphoryliertem FRQ (oben) und FRQ aus einer LL-Kultur. Um eine möglichst vollständige Dephosphorylierung von FRQ zu erreichen, wurde FRQ mit einem His-Tag an NiNTA-Sepharose gebunden, gereinigt und vor der Elution und mit CIP (alkalischer Phosphatase) behandelt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte im Trennbereich von pI 6 bis pI 3. Durch die Phosphorylierungen nehmen die negativen Ladungen des Proteins zu, der pI verschiebt sich in den sauren Bereich.

3.2 Funktionelle Untersuchung einzelner FRQ-Domänen

Um FRQ in seinen Funktionen näher zu untersuchen, wurde es in drei Fragmente unterteilt und diese mit GFP fusioniert. Ein FLAG-Tag diente zur Detektion. Die Fragmentgrenzen wurden dabei so gewählt, dass sie in unkonservierten Bereichen des Proteins lagen, um möglichst keine funktionellen Domänen zu beschädigen (Abb. 3.2; s. auch Alignment von FRQ-Proteinen aus verschiedenen Spezies im Anhang). Die Fragmente wurden unter Kontrolle des *cpc1*-Promotors (konstitutiv aktiv) in einem *frq¹⁰*-Stamm (Δfrq) exprimiert. Dabei reichte das N-terminale Fragment (GFP-N_{FRQ}) bis AS 412, das mittlere von AS 413 bis 683 (GFP-M_{FRQ}) und das C-terminale (GFP-C_{FRQ}) Fragment von AS 684 bis 989. Durch die Fusion mit GFP überschritten alle Fragmente 60 kDa, wodurch eine ungerichtete Diffusion zwischen den einzelnen Zellkompartimenten vermieden wurde (s. Abb. 3.3 A). Die einzelnen

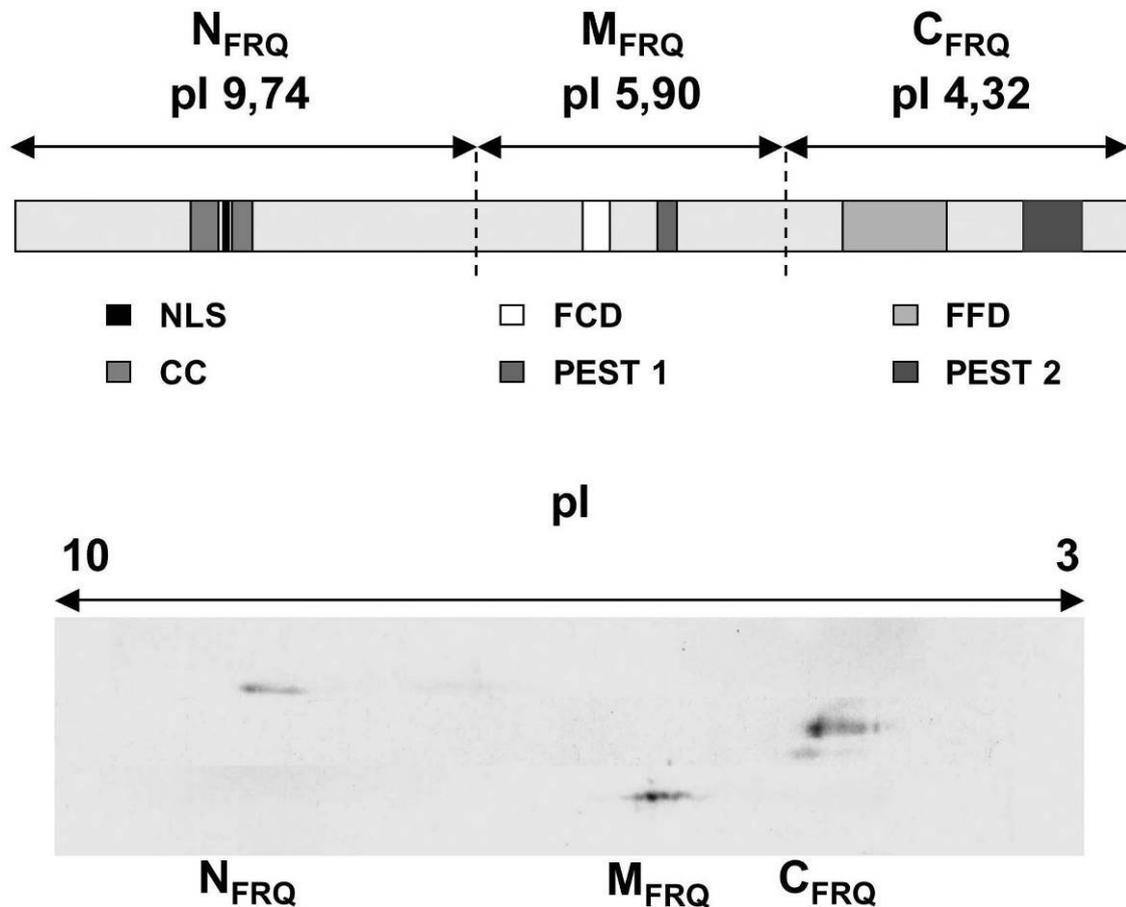


Abb. 3.2: Oben: Schematische Darstellung von FRQ und des pIs der einzelnen Proteinabschnitte. Als Grenzen wurden jeweils unkonservierte Bereiche gewählt, da diese im Gegensatz zu hochkonservierten Domänen oft keine Funktion haben. Unten: 2D-Gelelektrophorese der GFP-Fusionsfragmente, hier in einem Trennbereich von pI 10 bis pI 3 isoelektrisch fokussiert. Deutlich erkennbar ist der stark unterschiedliche pI der einzelnen Fragmente sowie deren geringer Phosphorylierungsstatus. N_{FRQ}: N-terminales Fragment (AS 2-412), umfasst die *coiled coil*-Domäne (CC) mit der Kernlokalisierungssequenz (NLS); M_{FRQ}: mittleres Fragment (AS 413-683), enthält die CK-1a-Bindedomäne (FCD) und die PEST1-Domäne; C_{FRQ}: C-terminales Fragment (AS 684-989), mit der FRH-Bindedomäne (FFD) und der PEST2-Domäne.

Fragmente haben einen stark unterschiedlichen pI: während der von GFP-N_{FRQ} mit einem errechneten Wert von 9,74 im basischen Bereich liegt und das Protein positive Ladungen trägt, liegen GFP-M_{FRQ} und GFP-C_{FRQ} mit errechneten pI-Werten von 5,9 bzw. 4,32 im sauren Bereich und tragen negative Ladungen. Abb. 3.2 zeigt eine Analyse der drei Fragmente mittels 2D-Gelelektrophorese: deutlich sind die stark unterschiedlichen pI-Werte zu erkennen. Des Weiteren zeigt die Analyse, dass alle drei Fragmente im Gegensatz zum vollständigen FRQ wenig bis gar nicht phosphoryliert sind. Dies ist auch bei einer normalen SDS-PAGE erkennbar, wo alle Fragmente einfache Banden abbilden und nicht multiple (Abb. 3.2 B), wie das vollständigen FRQ-Protein.

Die einzelnen Fragmente wurden einer subzellulären Fraktionierung unterzogen, um ihre Lokalisation in der Zelle zu bestimmen (Abb 3.3 B und C). Wie erwartet, reichert sich der

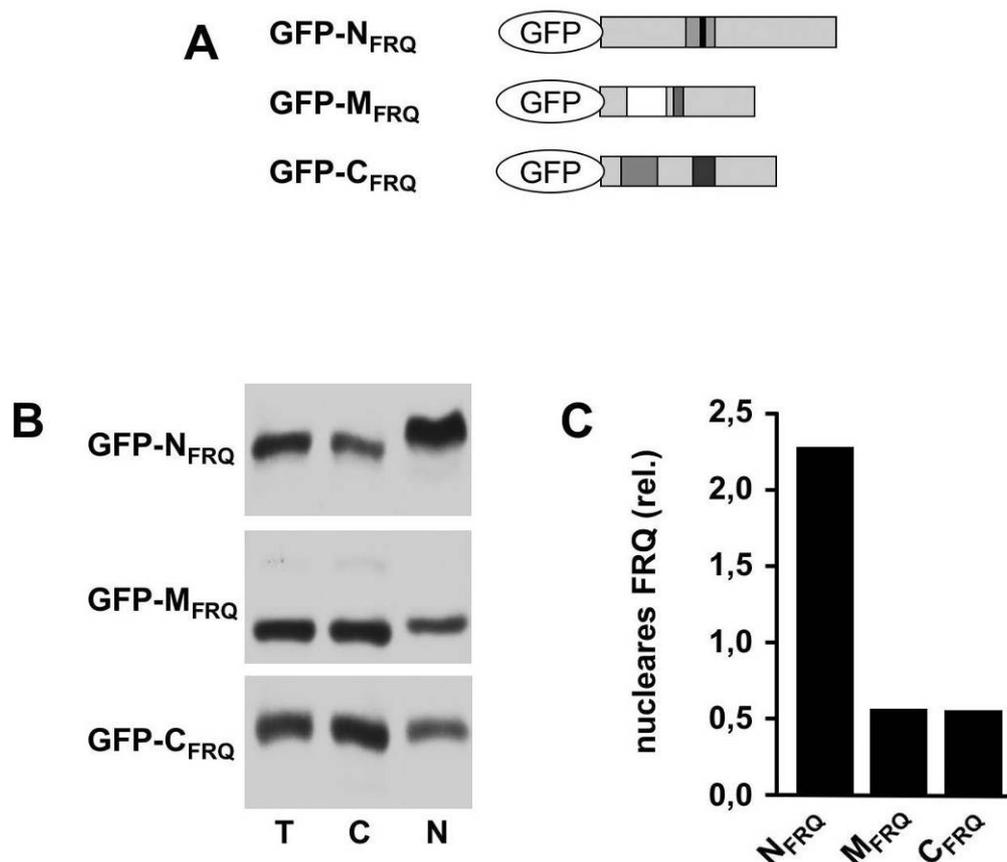


Abb. 3.3: (A) Maßstabgerechte schematische Darstellung der GFP-FRQ-Fusionsproteine. (B) Western Blot der subzellulären Fraktionierung der Zellhomogenate aus den GFP-FRQ-Stämmen (*frq*¹⁰-Hintergrund). Aufgetragen wurden jeweils 200 µg Totalhomogenat (T), cytosolische Fraktion (C) und Kernhomogenat (N). (C) Quantifizierung von (B): gezeigt wird jeweils das Verhältnis von FRQ-Anteil im Zellkern zu FRQ-Anteil im Totalhomogenat.

überwiegende Teil von GFP-N_{FRQ} im Zellkern an. Dies bestätigt die Ergebnisse von Luo et al. (1998), die in der N-terminalen Region des Proteins eine NLS lokalisiert haben (AS 195-199). Auffallend ist jedoch, dass diese NLS das Protein nicht vollständig im Zellkern lokalisiert, sondern sich trotzdem ein signifikanter Anteil im Cytosol findet. Bisher wurde für FRQ noch keine Kernexportsequenz (NES) gefunden. GFP-C_{FRQ} und GFP-M_{FRQ} sind hauptsächlich cytosolisch, mit einem geringen Anteil im Zellkern. Für diese Kernlokalisierung gibt es keine Erklärung, jedoch zeigt freies GFP eine Tendenz, sich im Kern anzureichern oder sich an den Zellkern anzulagern. Abb. 3.3 C zeigt eine Quantifizierung des Western Blots aus Abb. 3.3 B. Die Signale der Kernhomogenate wurden mit den jeweiligen Signalen der Totalhomogenate (T) normalisiert. Die Stabilität von FRQ ist ein ausschlaggebender Faktor der Periodenlänge der circadianen Uhr. Die Region, die die Stabilität am meisten beeinflusst, ist dabei der Mittelteil. Die hier lokalisierte PEST1-Region enthält eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen, vermutlich für CK-1a und CKII (Görl et al., 2001, Baker et al., 2009). Punktmutationen oder Deletionen dieser Region führen zu einer erhöhten Stabilität von FRQ und einer verlängerten Periode auf molekularer Ebene (phänotypisch sind diese Stämme meist arrhythmisch). Die Stabilität der einzelnen Fragmente wurde mittels ribosomaler Inhibition durch Zugabe von 10 µg/ml Cycloheximid (CHX) zum Kulturmedium untersucht (Abb 3.4 A). Dabei zeigte sich, dass sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Fragment über einen Zeitraum von zehn Stunden stabil sind und nicht abgebaut werden. Instabil ist dagegen das mittlere Fragment GFP-M_{FRQ}. Ein FLAG-GFP-Protein, welches als Kontrolle dient, unterliegt ebenfalls keinem Abbau. Der Mittelteil von FRQ kann also den Abbau von GFP induzieren. Dies bestätigt die Rolle der PEST1-Region für die Stabilität von FRQ (Görl et al., 2001, Querfurth et al., 2007).

Ein weiterer interessanter Effekt konnte in diesem Versuch beobachtet werden: das N-terminale Fragment wird nicht abgebaut, zeigt aber eine Hyperphosphorylierung, deutlich erkennbar an den multiplen Banden niedriger elektrophoretischer Mobilität. Dieses Phänomen einer Hyperphosphorylierung von FRQ bei Zugabe von CHX ist auch bei vollständigem FRQ-Protein (Wt und Mutanten) zu beobachten (s. Abb. 3.8), bisher war jedoch nichts über den Ort dieser Phosphorylierungen bekannt. Auch sind sie nur bei Zugabe von CHX zum Kulturmedium zu sehen, bei einem natürlichen Abbau von FRQ im Laufe eines circadianen Tages oder durch einen Licht-Dunkel-Transfer können diese Phosphorylierungsstufen nicht beobachtet werden. Um festzustellen, ob diese Phosphorylierungen auch bei vollständigem FRQ den N-Terminus betreffen, wurden Totalextrakte aus einer LL-Kultur und aus einer CHX-behandelten Kultur (2 Stunden) sowie ein Phosphatase-behandelter Totalextrakt einer

proteolytischen Spaltung durch Hydroxylamin unterzogen. Hydroxylamin spaltet unter denaturierenden, basischen Bedingungen die Peptidbindung zwischen Asparagin und Glycin. Das FRQ-Protein besitzt zwei solcher NG-Stellen (AS 388/389 und AS 561/562). Das N-terminale Spaltungsprodukt (AS 1-388) kann durch den verwendeten monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden (Abb 3.4 C). Schon unter LL-Bedingungen ist FRQ am N-Terminus deutlich phosphoryliert. Das Protein aus der CHX-behandelten Kultur zeigt dem gegenüber noch eine deutlich stärkere Phosphorylierung am N-Terminus.

Wie bereits erwähnt, sind eine Reihe von bekannten Mutationen, die die Periode der circadianen Uhr phänotypisch oder auf molekularer Ebene beeinflussen, im Mittelteil von FRQ lokalisiert (s. auch Abb 1.4 A). So verlängert *frq⁷* (G459D) die Periode und *frq¹* (G482S) verkürzt sie, die Stämme bleiben jedoch rhythmisch. Eine Deletion der PEST1-Sequenz oder die Mutation des Serins 513 führt zu einer Reduktion der FRQ-Phosphorylierung sowie zu

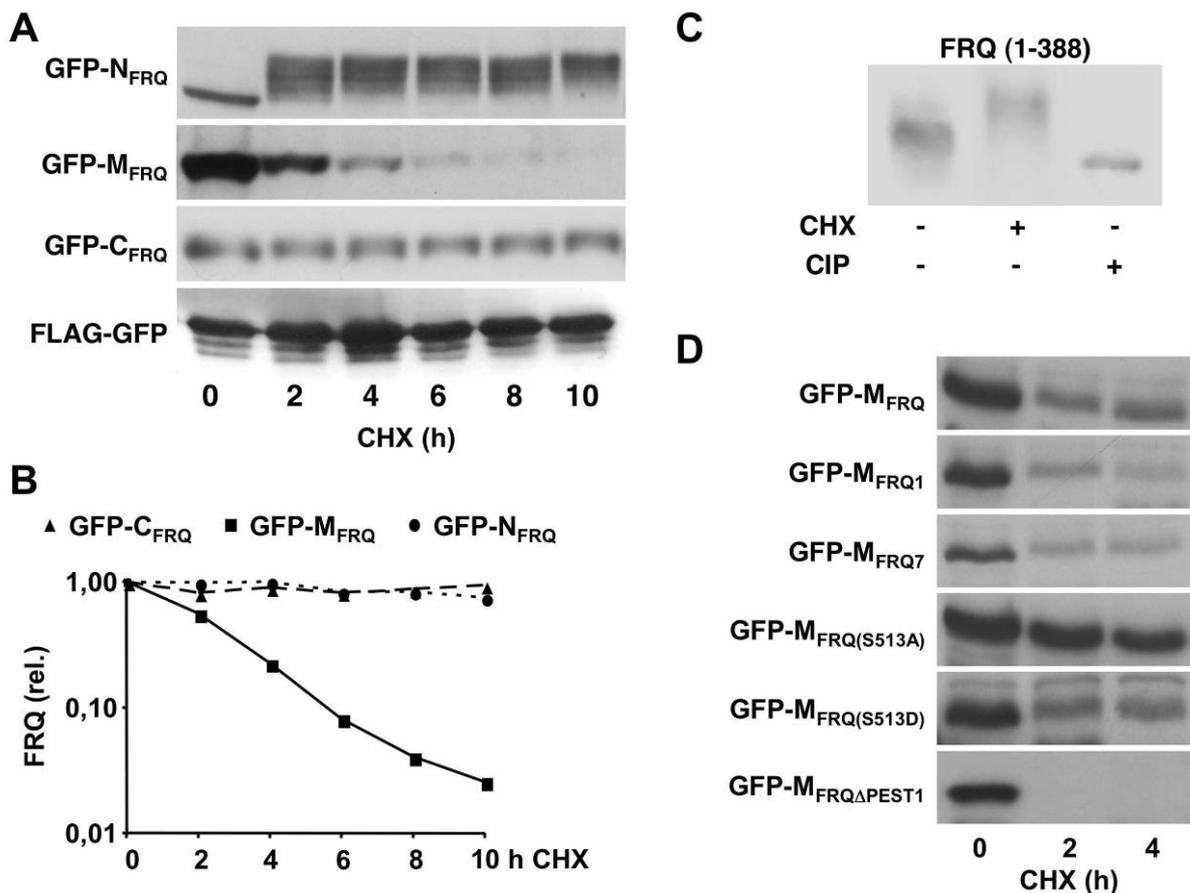


Abb. 3.4: (A) Abbau der GFP-FRQ-Fusionsproteine nach Zugabe von 10 CHX ($\mu\text{g/ml}$) zum Kulturmedium zum Zeitpunkt 0. GFP-M_{FRQ} wird abgebaut, GFP-N_{FRQ}, GFP-C_{FRQ} und FLAG-GFP sind stabil, wobei GFP-N_{FRQ} eine starke Hyperphosphorylierung zeigt. (B) Quantifizierung von (A). (C) Hydroxylamin-Proteolyse von Totalzellextrakten aus *frq⁺*-Stämmen. Rechts eine unbehandelte LL-Kultur, in der Mitte eine LL-Kultur, die mit CHX behandelt wurde (2 h). Links ein Totalzellextrakt, der mit alk. Phosphatase dephosphoryliert wurde. Der Western Blot zeigt das N-terminale proteolytische Spaltungsprodukt von FRQ (AS 1-388). Die Hyperphosphorylierung des Fragments aus der CHX-behandelten Kultur ist deutlich zu erkennen.

einem stark verzögerten Abbau des Proteins (Görl et al., 2001, Liu et al., 2000). Diese bekannten Mutationen wurden mittels PCR-Mutagenese in das GFP-Fusionskonstrukt GFP-M_{FRQ} eingebracht, um die durch sie verursachten Veränderungen in der Abbaurate zu untersuchen. Es zeigte sich jedoch, dass diese Mutationen keinen signifikanten Effekt auf den Abbau von GFP-M_{FRQ} haben (Abb 3.4 D). Kein mutiertes Fragment zeigt einen verzögerten Abbau im Vergleich zum Wildtyp, im Gegenteil, das Fragment, dessen PEST1-Domäne deletiert wurde, ist wesentlich instabiler als das Wildtyp-Fragment. Diese Ergebnisse sowie die Tatsache, dass GFP-M_{FRQ} keine Phosphorylierung zeigt, obwohl Mutationen des FRQ-Mittelteils im vollständigen FRQ Phosphorylierungsdefekte zeigen, könnten bedeuten, dass diese Mutationen wohl vor allem *trans*-Effekte verursachen, die auf den Mittelteil allein gar keine Wirkung haben. Die starke Instabilität von GFP-M_{FRQ}ΔPEST1 erklärt sich möglicherweise aus einem Faltungsdefekt des Proteins, der zu einem sofortigen Abbau führt.

3.3 Die Phosphorylierung des N-Terminus unterliegt einem *trans*-Mechanismus

Das GFP-Fusionsprotein GFP-N_{FRQ} enthält neben dem NLS auch die *coiled-coil*-Domäne, über die FRQ dimerisiert (Cheng et al, 2001a). GFP-N_{FRQ} sollte also ebenfalls als Homodimer in der Zelle vorliegen bzw. mit dem endogenen FRQ in einem *frq*⁺-Hintergrund dimerisieren können. Dies konnte durch eine Ko-Immunoprecipitation bestätigt werden. Im *frq*⁺-Hintergrund exprimiertes GFP-N_{FRQ}, GFP-M_{FRQ} und GFP-C_{FRQ} mit FLAG-Tag wurden mit FLAG-Antikörper aus Totalextrakt präzipitiert und auf kopräzipitiertes endogenes FRQ untersucht. Als Kontrolle diente ein *frq*⁺-Totalextrakt (Abb 3.5 A). Tatsächlich interagiert nur das N-terminale Fragment stabil mit endogenem (vollständigem) FRQ, es ist nicht möglich, FRQ mit einem der anderen Fragmente zu präzipitieren. Die geringe Menge von kopräzipitiertem FRQ erklärt sich aus der geringen Expression von GFP-N_{FRQ} gegenüber dem endogenen FRQ (s. Abb. 3.4 B und C) und der Tatsache, dass FRQ und GFP-N_{FRQ} in Cytosol und Zellkern unterschiedlich angereichert sind und nur ein geringer Teil von FRQ und GFP-N_{FRQ} heterodimerisieren – der Rest liegt als jeweiliges Homodimer vor.

Wird GFP-N_{FRQ} in dem *frq*-Deletionsstamm *frq*¹⁰ exprimiert, so zeigt es unter LL-Bedingungen keine Phosphorylierung, die bei einer SDS-PAGE als zusätzliche Banden geringerer elektrophoretischer Mobilität sichtbar sind. Bei Expression des Fragments in einem *frq*⁺-Hintergrund jedoch, wenn das Fragment mit endogenem FRQ interagiert, liegt GFP-N_{FRQ} unter LL-Bedingungen phosphoryliert vor (Abb 3.5. B und C). Dass es sich dabei tatsächlich um Phosphorylierung handelt, wurde durch die Behandlung von Totalextrakten mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsinnereien (*caly intestinal phosphatase*, CIP) untersucht

(Abb 3.5. B). Durch die Behandlung werden die multiplen Banden des endogenen FRQ und von GFP-N_{FRQ} im *frq*⁺-Hintergrund im Vergleich zur unbehandelten Probe deutlich reduziert. Bei dem im *frq*¹⁰-Hintergrund exprimierten GFP-N_{FRQ} tritt dagegen keine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität auf – das Protein liegt vollständig unphosphoryliert vor. Dies deutet auf einen *trans*-Phosphorylierungseffekt hin: die Kinase-Bindestelle ist nicht identisch mit der Phosphorylierungsstelle.

Ein weiterer *trans*-Effekt zeigt sich beim Abbauverhalten von GFP-N_{FRQ}. In einem *frq*¹⁰-Hintergrund (ohne endogenes FRQ) wird GFP-N_{FRQ} bei Behandlung der Kultur mit CHX zwar phosphoryliert, aber nicht abgebaut (Abb. 3.4 A). In einem *frq*⁺-Hintergrund dagegen wird GFP-N_{FRQ} bei CHX-Behandlung nicht nur phosphoryliert, sondern auch zusammen mit dem endogenen FRQ abgebaut (Abb 3.5. C). Dabei verschwindet unphosphoryliertes GFP-N_{FRQ} bereits nach zwei Stunden vollständig, während diese Form im *frq*¹⁰-Hintergrund beim gleichen Experiment über zehn Stunden hinweg präsent ist (Abb. 3.4 A). Da es sich nicht um

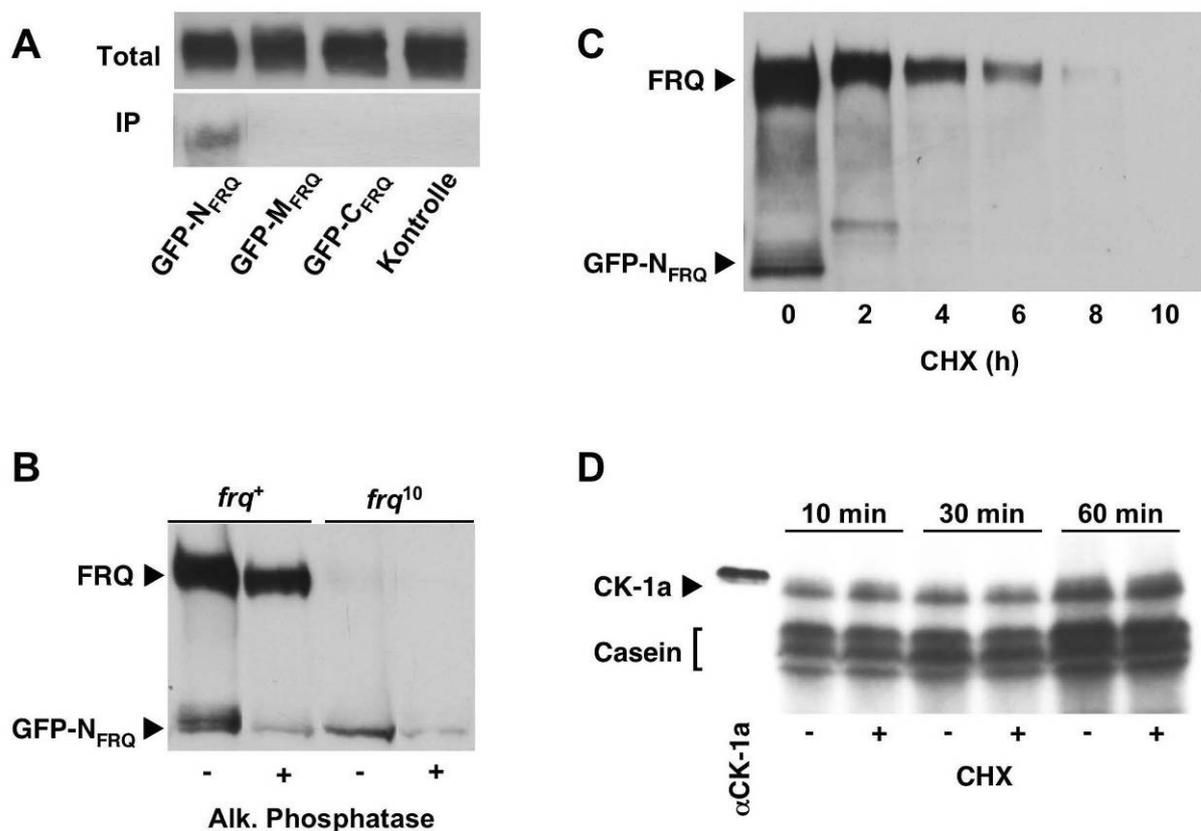


Abb. 3.5: (A) Co-Immunopräzipitation von endogenem FRQ mit den GFP-FRQ-Fusionsproteinen. Die Fusionsproteine GFP-N_{FRQ}, GFP-M_{FRQ} und GFP-C_{FRQ}, wurden jeweils im *frq*⁺-Hintergrundstamm exprimiert (oben, FRQ⁺ im Totalzellextrakt) und über ihren FLAG-Tag immunopräzipitiert. Die Eluate wurden auf copräzipitiertes FRQ untersucht (unten). Als Kontrolle diente *frq*⁺-Totalzellextrakt. (B) GFP-N_{FRQ} wird im Komplex mit endogenem FRQ phosphoryliert. Totalextrakte aus dem Stämmen *frq*⁺-GFP-N_{FRQ} und *frq*¹⁰-GFP-N_{FRQ} wurden mit alk. Phosphatase behandelt und der Phosphorylierungsstatus mit dem aus unbehandelten Extrakten verglichen. (C) Untersuchung der Abbaukinetik von GFP-N_{FRQ} im *frq*⁺-Hintergrund durch Behandlung der Kultur mit CHX. (D) Autoradiographie des CK-1a-Aktivitätsassays. Casein wurde mit FLAG-CK-1a aus unbehandelten und CHX-behandelten (20 min) Kulturen mit P³²-ATP phosphoryliert.

neu synthetisiertes Protein handeln kann, unterliegt stabiles GFP-N_{FRQ} möglicherweise einem stärkeren Einfluss durch endogene Phosphatasen.

Die Hyperphosphorylierung von FRQ durch Behandlung der *N. crassa*-Kultur mit Cycloheximid (CHX) stellt eine Besonderheit dar, da diese besonders stark phosphorylierte Proteinspezies bei einer SDS-PAGE-Analyse von Proteinextrakten unbehandelter Kulturen nicht auftritt. Auch ist FRQ bisher das einzige Uhrenprotein, an dem ein solcher Effekt beobachtet werden konnte, weder WC1 noch WC2 zeigen eine CHX-abhängige Phosphorylierung. Möglicherweise wird durch Behandlung der Kultur mit CHX eine kurzlebige Phosphatase schnell abgebaut oder eine der Kinasen, die FRQ phosphorylieren, hyperaktiviert. Eine der am besten studierten Kinasen dieser Art ist CK-1a. Sie bildet einen stabilen Komplex mit FRQ und bindet laut He et al. (2006) im mittleren Bereich von FRQ. Bei Phosphorylierungsexperimenten *in vitro* konnten jedoch auch Serine und Threonine im N-Terminus von FRQ identifiziert werden, die Ziele für eine Phosphorylierung durch CK-1a sind (Tang et al., 2009). Es bestünde die Möglichkeit, dass durch CHX hyperaktivierte CK-1a nicht auf eine stabile Interaktion mit FRQ angewiesen ist, sondern dieses auch ohne Bindung an den Mittelteil am N-Terminus hyperphosphoryliert.

Um diese These zu überprüfen, wurde ein Aktivitäts-Assay mit gereinigter CK-1a aus CHX-behandelten und unbehandelten Kulturen von einem *N. crassa*-Stamm durchgeführt, der neben der endogenen CK-1a eine qa-induzierbare FLAG-CK-1a exprimiert (O. Tataroglu, unveröffentlicht). Zwei Kulturen wurden 12 h mit QA induziert, anschließend wurde eine davon weitere 20 min mit CHX behandelt. (Da die Hyperphosphorylierung von FRQ schon eine Stunde nach Zugabe zum Kulturmedium zu sehen ist, sollte die Aktivierung der verantwortlichen Kinase unmittelbar passieren.) CK-1a aus dem Gesamtzellextrakt dieser Kulturen wurde mittels FLAG-Tag an α FLAG-Agarose angereichert und mit Casein und radioaktivem ATP inkubiert. Die zeitabhängige Phosphorylierung des Caseins wurde mit Autoradiographie dokumentiert (Abb. 3.5 D). Eine ATP-freie Probe diente als Kontrolle, dieser Teil des Western Blots wurde später mit Antikörper gegen CK-1a dekoriert (Abb. 3.4 D, erste Gelspur von links). Wie aus der Autoradiographie hervorgeht, ist die aufgereinigte Kinase aktiv und phosphoryliert nicht nur Casein, sondern auch sich selbst. Allerdings zeigt sich kein Unterschied in der Aktivität der CK-1a aus unbehandelter oder CHX-behandelter Kultur. CK-1a ist also nicht verantwortlich für die CHX-abhängige Hyperphosphorylierung des N-Terminus von FRQ.

3.4 Möglichkeit einer phosphorylierungsabhängigen Konformationsänderung

Das N-terminale Drittel von FRQ (AS 1-330) hat im unphosphorylierten Zustand einen stark basischen pI von 9,95, das heißt, es ist unter cytosolischen Bedingungen positiv geladen (Ladung +17,3 bei pH 7). Im Gegensatz dazu hat der Rest des Proteins (AS 331-989) einen sauren pI von 4,69 und ist damit negativ geladen (Ladung -35,4 bei pH 7). FRQ ist ein sehr flexibles Protein, das heißt, der negativ geladene C-Terminus könnte durchaus mit dem positiv geladenen N-Terminus über ionische Wechselwirkung interagieren. Das Ergebnis wäre eine Schleifenbildung bzw. eine eher kompakte, geschlossene Konformation von FRQ (s. Abb. 3.5 A, oben). Baker et al. (2009) lokalisierten im N-terminalen Drittel von FRQ ca. 21 Phosphorylierungsstellen. Wären diese vollständig phosphoryliert, so sänke der pI des N-Terminus von 9,95 auf 6,02 (Scansite-Software, http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html), die Ladung betrüge dann -3,7 bei pH 7. Damit wäre die ionische Wechselwirkung aufgehoben, FRQ würde in eine eher lineare, offene Konformation übergehen (Abb 3.6 A).

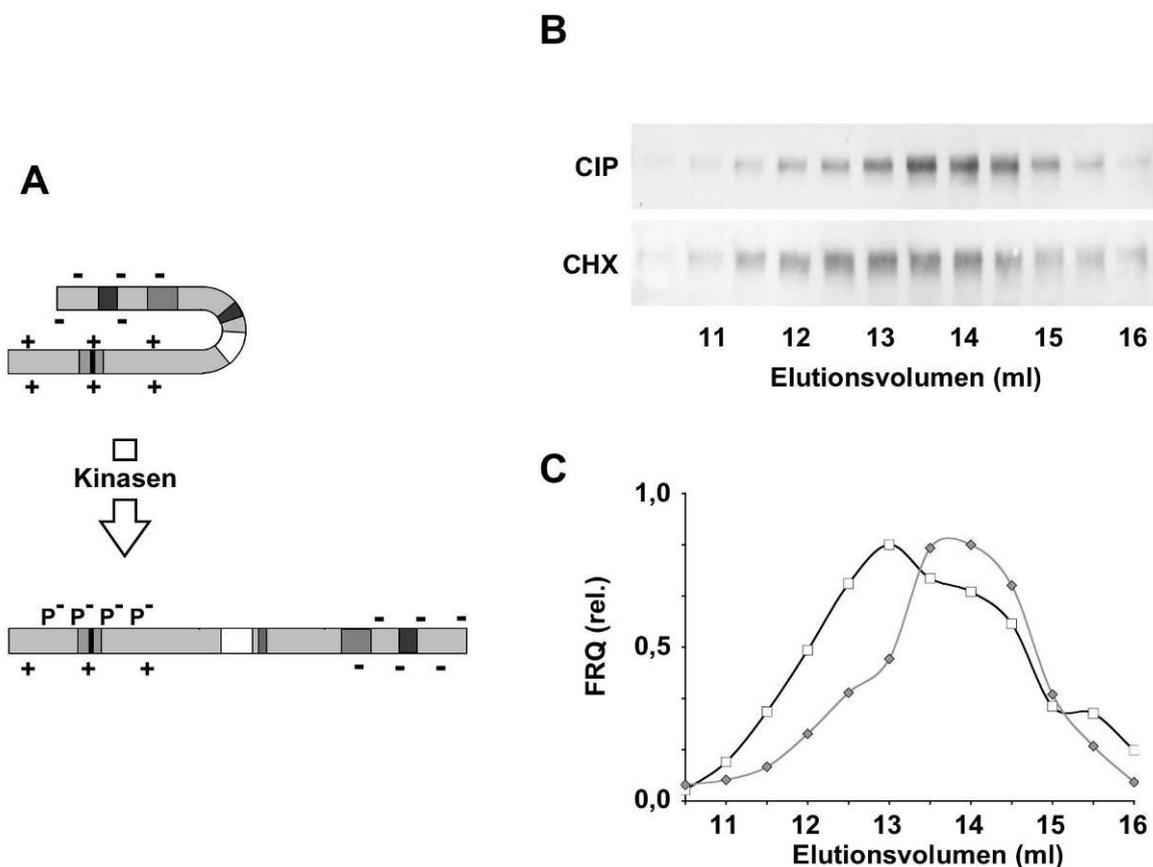


Abb. 3.6: (A) Darstellung der ladungsbedingten Konformationsänderung von FRQ. Der negativ geladene C-Terminus interagiert mit dem positiv geladenen N-Terminus, FRQ hat eine geschlossene Konformation. Wird der N-Terminus im Laufe eines circadianen Tages phosphoryliert, verändert sich seine Ladung, die Interaktion wird aufgehoben und FRQ erhält eine offene Konformation. (B) Western Blot der Gelfiltrationseluat von dephosphoryliertem FRQ (oben) und hyperphosphoryliertem FRQ aus CHX-behandelter Kultur (unten). (C) Quantifizierung der Gelfiltration.

Um dies experimentell zu überprüfen, wurden verschiedene Phosphorylierungsstadien von FRQ Gelfiltrationen (Superose 6, Amersham) unterzogen. Eine phosphorylierungsabhängige Konformationsänderung sollte sich dergestalt äußern, dass hyperphosphoryliertes FRQ wegen seiner offenen Konformation früher eluiert als hypophosphoryliertes FRQ, welches wegen der geschlossenen Konformation kleiner (oder besser kompakter) ist. Da unter normalen Wachstumsbedingungen zu beinahe jedem Zeitpunkt des circadianen Tages sowohl hypo- als auch hyperphosphoryliertes FRQ in unterschiedlicher Verteilung vorliegt, wurde FRQ mit einem C-terminalen His-Tag unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors (*qa*-Promotor) in *N. crassa* exprimiert. Um möglichst ausschließlich hyperphosphoryliertes FRQ zu erhalten, wurde eine Kultur nach 12 Stunden Induktion mit Chinasäure noch zwei Stunden mit Cycloheximid behandelt (10 µg/ml). His-Tag-FRQ wurde mittels NiNTA-Sepharose aus dem Zellextrakt isoliert. Für die Gelfiltration mit möglichst hypophosphoryliertem FRQ wurde das an NiNTA-Sepharose gebundene Protein vor der Elution mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die Eluate mit der höchsten Proteinkonzentration wurden jeweils der Gelfiltration (unterzogen und die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Verteilung des hypo- oder hyperphosphorylierten FRQ untersucht (Abb. 3.6 B). Deutlich zeigt sich, dass das Maximum der hypophosphorylierten Formen (obere Reihe, Phosphatase-behandelt) später eluiert als das der hyperphosphorylierten (untere Reihe, CHX-behandelt). Die Quantifizierung (Abb. 3.6 C) des Western Blot zeigt, dass sich die Maxima um etwa 1,5 Fraktionen unterscheiden. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Hypothese einer phosphorylierungsabhängigen Konformationsänderung.

3.5 Deletion einer potentiellen nuklearen Exportsequenz

Die subzelluläre Verteilung von FRQ ist dergestalt, dass der größte Teil des Proteins sich im Cytosol und nur ein kleiner Teil im Zellkern befindet. Diese Kernlokalisation ist trotz des geringen Anteils an der Gesamtmenge für die Funktion der circadianen Uhr entscheidend und abhängig von einer NLS im N-terminalen Drittel von FRQ. Unbekannt ist bisher jedoch der Mechanismus, über den FRQ aus dem Kern exportiert wird und der so erst die typische subzelluläre Verteilung von FRQ ermöglicht. Mittels des Online-Programms NetNES (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES>) (la Cour et al., 2004) können Leucin-reiche NES in Proteinsequenzen vorhergesagt werden. Diese Software ermittelt für FRQ eine NES, deren Wert über der vom Programm vorgesehenen Signifikanzschwelle liegt (Abb. 3.7 A, dunkler Pfeil), sowie eine weitere, die diese Schwelle nicht überschreitet (Abb. 3.7 A, heller Pfeil).

Durch subzelluläre Fraktionierung wurde die Verteilung von FRQ Δ (310-326) und FRQ zwischen Zellkern und Cytosol miteinander verglichen. Wie sich jedoch zeigte, war das Protein mit der deletierten putativen NES gegenüber der Wt-Form nicht signifikant im Zellkern angereichert, jedenfalls nicht in einem Maß, wie man es vielleicht von einem Protein erwartet hätte, dessen NES deletiert wurde. Dafür fällt jedoch der scheinbare Größenunterschied von FRQ Δ (310-326) im Vergleich zum FRQ auf (Abb 3.8 A und E). Dieser Größenunterschied kann bei einem Protein von 120 kDa nicht allein auf die Deletion von 17 Aminosäuren zurückzuführen sein. Es handelt sich dabei wohl eher um einen Phosphorylierungsdefekt. Um dies zu bestätigen, wurden Totalextrakte von FRQ und FRQ Δ (310-326) mit alkalischer Phosphatase behandelt und der Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot untersucht (Abb 3.8 C). Wie sich zeigte, sind FRQ und FRQ Δ (310-326) im unphosphorylierten Zustand bei elektrophoretischer Auftrennung fast gleich groß (Abb 3.8 C, Gelspuren 2 und 4), zusätzlich ist erkennbar, dass die untersten der multiplen Banden der unbehandelten FRQ-Proteine (Abb 3.8 C, Gelspuren 1 und 3) ebenfalls auf einer Höhe liegen. Dies bestätigt, dass es sich um ein phosphorylierungsabhängiges Phänomen handelt.

Ein derart signifikanter Phosphorylierungsdefekt durch die Deletion von 17 Aminosäuren (von denen nur eine ein potentiell Phospho-Threonin ist) kann mehrere Ursachen haben: erstens kann eine Kinase-Bindestelle betroffen sein. Zweitens könnte auch eine sogenannte Initialphosphorylierung betroffen sein. Dies sind Phosphorylierungsstellen, die – wenn phosphoryliert – anderen Kinasen als Erkennungsmerkmal für weitere Phosphorylierungen dient. Eine Kinase, die auf diese Weise ihr Substrat erkennt, ist CK-1a. Möglicherweise ist also das Threonin T311 die Initialphosphorylierungsstelle, von der alle weiteren Phosphorylierungen durch CK-1a abhängen. Der Phosphorylierungsdefekt ist allein durch das Fehlen eines Phospho-Threonins jedenfalls nicht erklärbar. Um zu untersuchen, ob es sich bei T311 möglicherweise um eine Initialphosphorylierung handelt, wurde das Codon von T311 im pBM60-*Cla*I-Vektor zu einem Alanin-Codon mutagenisiert, in *frq*¹⁰ transformiert und der so geschaffene Mutationsstamm *frq*(T311A) auf Phosphorylierungsdefekte des FRQ-Proteins untersucht. Wie jedoch aus Abb. 3.8 B hervorgeht, ist das Protein in keiner Weise in seiner Phosphorylierung kompromittiert. Der Stamm hat im Gegensatz zu FRQ Δ (310-326) auf *race tubes* einen rhythmischen Phänotyp, wenn auch mit leicht verlängerter Periode (Abb. 3.11 A). Es handelt sich bei T311 also nicht um eine Initialphosphorylierungsstelle.

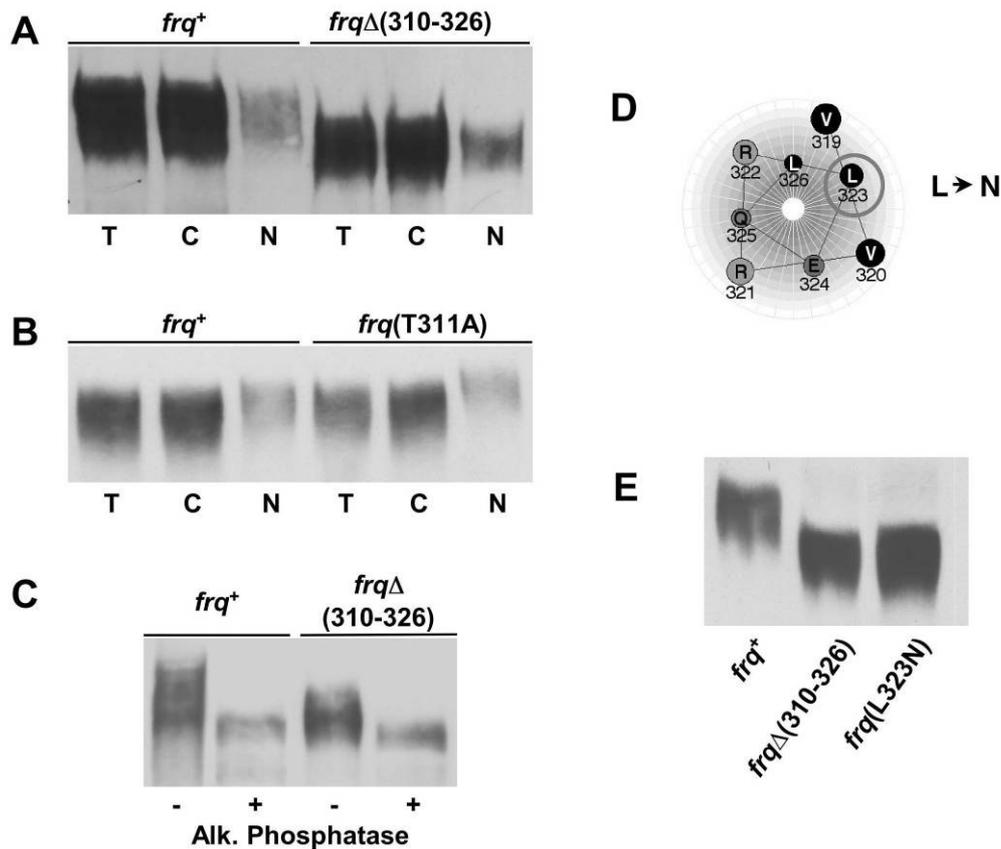


Abb. 3.8: (A) Subzelluläre Verteilung von FRQ in den Stämmen *frq*⁺ und *frq*Δ(310-326) (Deletion der putativen NES). (B) Subzelluläre Verteilung von FRQ in den Stämmen *frq*⁺ und *frq*(T311A). (C) Größenvergleich von FRQ aus den Stämmen *frq*⁺ und *frq*Δ(310-326) mit und ohne Behandlung mit alk. Phosphatase. (D) Darstellung des NES-relevanten Leucins (L323) und der umliegenden AS als Helix. Die Mutation L323N zerstört sowohl den Helix als auch die NES (nach NetNES). (E) Vergleich von FRQ aus den Stämmen *frq*⁺, *frq*Δ(310-326) und *frq*(L323N)

Wie bereits oben erwähnt, bildet die hochkonservierte Domäne u. U. um eine α -Helix. Diese Helix ist aber laut Vorhersage (s. oben) zufolge allein abhängig von L323 (Abb. 3.8 D). Wird dieses Leucin durch Mutagenese zu Asparagin ausgetauscht, löst sich laut computergestützter Strukturanalyse die Helix auf. Um die Abhängigkeit des Phosphorylierungsdefekts von der putativen Helix zu prüfen, wurde im pBM60-*Cla*I-Vektor das Codon von L323 zu einem Asparagin-Codon mutagenisiert, der Vektor in *frq*¹⁰ transformiert und der Phosphorylierungsstatus des in diesem Stamm exprimierten FRQ(L323N) mit dem von FRQ und FRQΔ(310-326) verglichen (Abb. 3.8 E). Wie deutlich erkennbar ist, zeigt das punktmutierte FRQ(L323N) einen sehr ähnlichen Phosphorylierungsdefekt wie FRQΔ(310-326). Die korrekte Phosphorylierung von FRQ scheint demzufolge abhängig zu sein von der Ausbildung einer α -Helix im Bereich der konservierten Domäne FRQ(310-326).

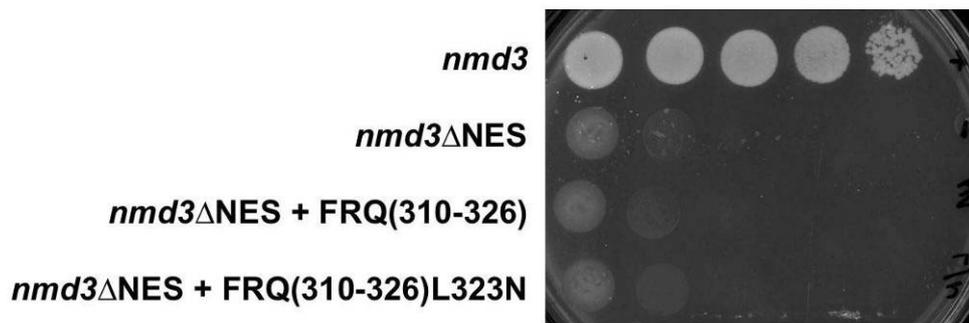


Abb. 3.9: Kernexport-Assay in *S. cerevisiae*. Nur Stämme, bei denen dieses Protein korrekt aus dem Kern exportiert wird, zeigen robustes Wachstum. Die endogene NES von *nmd3* wurde entweder durch die putative NES des FRQ aus *N. crassa* ersetzt (*nmd3*ΔNES+FRQ(310-326), 3. v. oben) oder durch die mutierte Form dieser Domäne (*nmd3*ΔNES+ FRQ(310-326)(L323N), unten). Als Kontrollen dienen wt-*nmd3* (oben) und *nmd3*ΔNES (2. v. oben).

Obwohl die Deletion dieser Domäne keine Veränderung in der Verteilung von FRQ zwischen Zellkern und Cytosol zufolge hat, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um eine NES handelt. Große Proteine wie FRQ beinhalten oft mehrere NES und NLS, die Deletion einer einzelnen könnte also durchaus von einer anderen kompensiert werden. Um experimentell zu untersuchen, ob die deletierte Region als NES funktionieren kann, wurde ein Selektions-Assay in *S. cerevisiae* herangezogen, basierend auf korrektem Kernexport (Gerstberger, 2003). Der Hefestamm NMD3 “Shuffle” ist nicht lebensfähig, wenn der Shuttle-Faktor NMD3 aufgrund einer fehlenden NES nicht in der Lage ist, die 60S-Ribosomen-Untereinheit aus dem Zellkern zu exportieren. Die NMD3-NES wurde in diesem Experiment durch die putative FRQ-NES (AS 310-326) ersetzt (Abb 3.9). Als Negativkontrolle dienten sowohl *nmd3*ΔNES als auch die putative FRQ-NES mit der Mutation L323N. Wie das Experiment jedoch zeigt, ist FRQ(310-326) nicht in der Lage, die endogene NES von NMD3 zu ersetzen. Es handelt sich also nicht um eine NES, sondern um eine für die Phosphorylierung von FRQ relevante Domäne, wahrscheinlich eine Helix, die als Binde- oder Erkennungsstelle für eine Kinase dient.

3.6 FRQ(310-326) bildet eine zweite CK-1a-Bindestelle

Das Uhrenprotein FRQ wird von einer Reihe von unterschiedlichen Kinasen phosphoryliert, aber nur für eine, nämlich CK-1a, konnte bisher eine stabile Interaktion mit FRQ und auch eine Kinasebindestelle nachgewiesen werden. Diese von He et al. (2006) lokalisierte Interaktionsdomäne (FCD) befindet sich im Mittelteil von FRQ (s. schematische Darstellung Abb. 1.4 A), im Bereich der Aminosäuren 470-530. Auch dieser Bereich ist

hochkonserviert. Was jedoch besonders auffallend ist: auch diese Region ist reich an Leucin und anderen hydrophoben Aminosäuren, und die Mutation der Leucine zu Alaninen reicht aus, um die Interaktion mit CK-1a aufzuheben (He et al., 2006). Deletionen in diesem Bereich (AS 470-530) resultieren in Hypophosphorylierung und erhöhter Stabilität von FRQ, was zu einem arrhythmischen Phänotyp führt (Liu et al., 2000; Görl et al., 2001). Genau dieser Bereich von FRQ wurde von der NetNES-Software als putative NES, deren Wert die vom Programm vorgesehene Signifikanzschwelle nicht erreicht, erkannt (Abb 3.6 A, hellgrauer Pfeil mit Fragezeichen).

Auch diese FRQ-CK-1a-Interaktionsdomäne (FCD) bildet nach diversen computergestützten Strukturvorhersagen eine α Helix. Beide Helices weisen signifikante Übereinstimmungen auf. Vergleicht man die essentiellen hydrophoben Bereiche miteinander, so fällt auf, dass die hydrophoben Aminosäuren in gleichen Abständen angeordnet sind. Beide Domänen enthalten jeweils ein Glutamin an der gleichen Position. Abb. 3.10 zeigt die Aminosäuresequenzen von FRQ(310-326) und FRQ(488-495) (ein Teil der von He et al. 2006

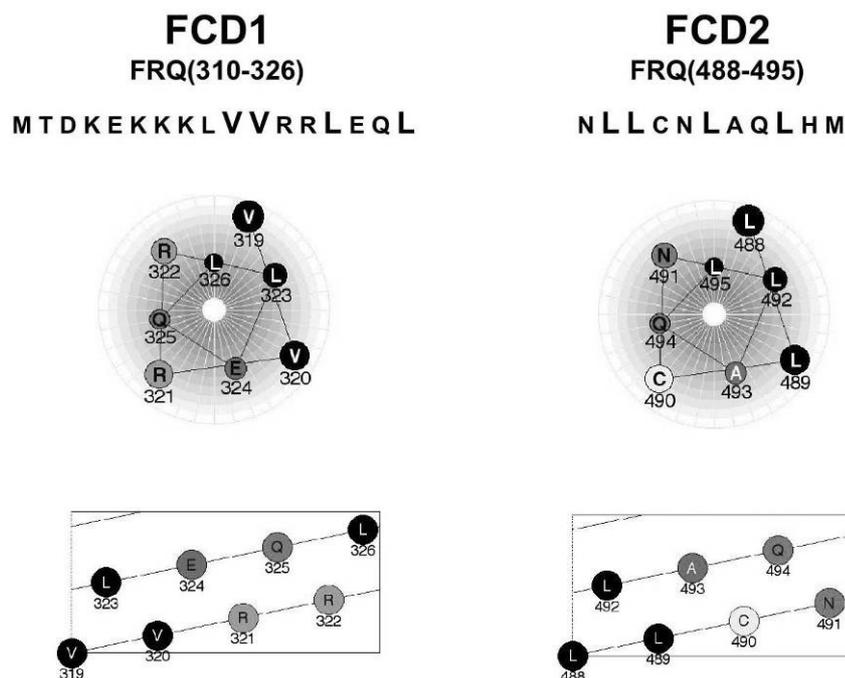


Abb. 3.10: Helikale Darstellung der beiden leucinreichen Sequenzbereiche (oben) von FRQ als Rad (Querschnitt des Helix, Mitte) oder Zylinder (Seitenansicht des Helix). Die hydrophoben Aminosäuren sind in der Sequenz vergrößert, in den grafischen Darstellungen schwarz hervorgehoben. (Protean-Programm, Lasergene, DNASTAR)

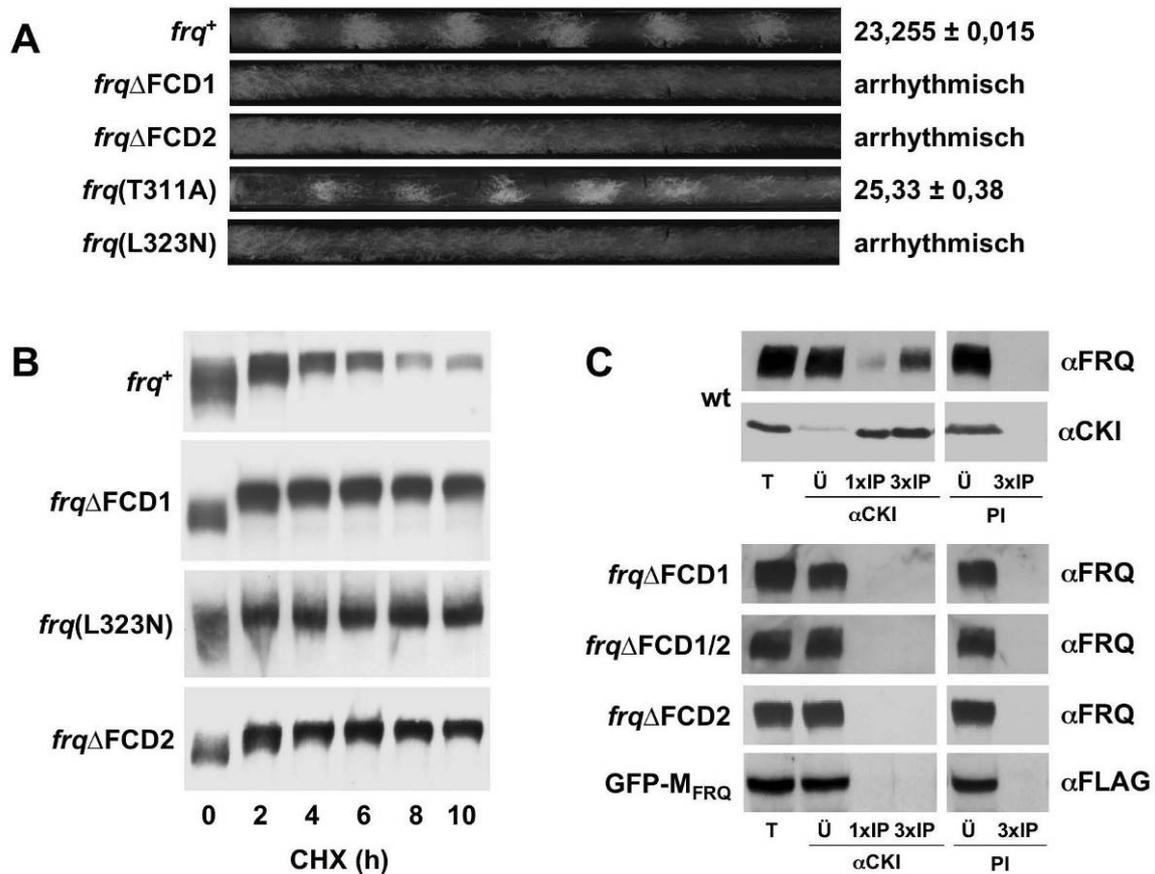


Abb. 3.11: (A) Analyse des circadianen Phänotyps der Stämme *frq*ΔFCD1, *frq*ΔFCD2, *frq*(T311A) und *frq*(L323N) mittels *race tube assay* im Dauerdunkel bei 25 °C. (B) Abbauverhalten von FRQ in den Stämmen *frq*ΔFCD1, *frq*ΔFCD2 und *frq*(L323N). Kulturen der gen. Stämme wurden bei Dauerlicht aufgezogen, nach Zugabe von CHX (10 µg/ml) zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die FRQ-Expression mittels Western Blot analysiert. (C) Co-Immunopräzipitation von FRQ mit CK-1a. CK-1a wurde mittels Antikörper aus Totalzellextrakten der Stämme *frq*⁺, *frq*ΔFCD1, *frq*ΔFCD2, *frq*ΔFCD1/2 und *frq*¹⁰ GFP-M_{FRQ} gefällt und die Präzipitate auf co-präzipitiertes FRQ-Protein untersucht. Von den eingesetzten Totalextrakten (T) wurden jeweils 200 µg auf ein SDS-Acrylamidgel (7,5 %) aufgetragen, vom Überstand (Ü) nach der Präzipitation die äquivalente Menge. Um auch geringe Mengen von copräzipitiertem FRQ nachweisen zu können (nicht die gesamte CK-1a ist mit FRQ komplexiert), wurde von den Präzipitaten nicht nur ein Äquivalent von 200 µg aufgetragen (1 x IP), sondern auch die dreifache Menge (3 x IP).

definierten FCD, oben) sowie die putative Helixstruktur der Domänen, dargestellt einmal im Schnitt (Mitte) und einmal als offener Zylinder (unten). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit nicht nur in der Struktur, sondern auch in der durch die nachfolgend beschriebenen Versuchsergebnisse bestätigten Funktion soll ab hier die Domäne FRQ(310-326) als FCD1 bezeichnet werden, die Domäne FRQ(470-530) als FCD2. Die Nummerierung weist auf die Position der jeweiligen Domäne innerhalb des Proteins hin (vom N-Terminus zum C-Terminus).

Um die Funktion der beiden Regionen zu vergleichen, wurde zunächst ein *N. crassa*-Stamm hergestellt, der ein FRQΔFCD2 exprimiert. Dies geschah durch PCR-Deletion der Codons für die AS 485-496 des FRQ-Leserahmens im Vektor pBM60-*Clal* und anschließender Transformation in den *frq*¹⁰-Stamm. Diese Deletion entspricht nicht dem

vollständigen, von He et al. definierten Bereich, umfasst aber alle für die Interaktion mit CK-1a relevanten Leucine. Im Folgenden wird diese Deletionsmutante als *frq*ΔFCD2 bezeichnet, die Mutante *frq*Δ(310-326) als *frq*ΔFCD1. Schon bei der SDS-PAGE-Analyse der Klone fiel auf, dass beide Mutationen zu der gleichen Hypophosphorylierung von FRQ führen (s. Abb. 3.13 A, oben). Ebenso zeigen beide Mutanten eine Überexpression von FRQ, was auf einen verzögerten Abbau des Proteins hinweisen könnte. Zur phänotypischen Bestimmung wurde ein *race tube assay* mit beiden Stämmen durchgeführt, zusammen mit *frq*⁺, *frq*(L323N) und *frq*(T311A) (Abb. 3.11 A). Wie sich herausstellte, zeigte *frq*ΔFCD2 wie von He et al. beschrieben einen arrhythmischen Phänotyp. Genauso verhielten sich auch *frq*ΔFCD1 und *frq*(L323N). Der Stamm *frq*(T311A) war dagegen rhythmisch.

Als nächstes wurde die Stabilität der mutierten FRQ-Proteine untersucht. Dazu wurden Kulturen der Stämme *frq*ΔFCD1, *frq*ΔFCD2 und *frq*(L323N) über zehn Stunden mit CHX behandelt und die Abbaurate der FRQ-Proteine untersucht (Abb. 3.11 B). Als Kontrolle diente dabei der *frq*⁺-Stamm, dessen Kulturen der gleichen Behandlung unterzogen wurden. Wie deutlich zu erkennen ist, ist bei allen drei Mutationen FRQ hypophosphoryliert und sein Abbau stark verzögert.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Mutanten in Verhalten und FRQ-Phosphorylierung wurde die Interaktion von CK-1a mit den FRQ-Mutationen ΔFCD1, ΔFCD2, L323N sowie einer *FRQ*ΔFCD1/2- Doppelmutante mittels Co-Immunopräzipitation untersucht. Dazu wurde CK-1a mit Antikörper aus Totalextrakten präzipitiert und die mit Laemli-Probenpuffer eluierten Präzipitate mittels Antikörperdekorierung des Western Blots auf copräzipitiertes FRQ untersucht (Abb. 3.11 C). Um unspezifische Interaktion auszuschließen, wurde als Kontrolle eine Immunopräzipitationen mit Präimmunsereum (PI) durchgeführt. Abb. 3.10 C zeigt den Western Blot des Experiments: oben als Kontrolle eine Co-Immunopräzipitation mit *wt*-Totalextrakt. FRQ wurde effizient mit CK-1a-Antikörper co-präzipitiert, während in der Kontrollfällung mit Präimmunsereum kein FRQ nachweisbar war. Im Gegensatz dazu konnte bei keinem der FCD-Mutationsstämmen FRQ mit CK-1a gefällt werden.

Für eine stabile, nachweisbare Interaktion von CK-1a und FRQ sind beide Domänen notwendig. Dies zeigt auch die CK-1a-Co-Immunopräzipitation mit Totalextrakten aus dem Stamm, der das mittlere FRQ-Fragment GFP-M_{FRQ} exprimiert. Auch hier ist keine Interaktion mit CK-1a nachweisbar. Dies könnte auch erklären, warum von diesem Proteinfragment weder phosphorylierte Formen nachweisbar sind noch Mutationen die Abbaurate verändern. Möglicherweise geht der Abbau dieses Fragments allein auf einen Faltungsdefekt zurück und

hat mit der natürlichen Funktion, die die PEST1-Domäne im vollständigen FRQ erfüllt, nichts zu tun.

3.7 Stämme mit FCD-Mutationen zeigen keinen negativen Feedback

Durch die relativ geringe Größe der für eine CK-1a-Interaktion benötigten Domäne FCD1 erhebt sich die Frage, ob ein Wiedereinfügen von FCD1 an beliebiger Stelle des N-Terminus von FRQ die Interaktion mit CK-1a und damit die Funktion von FRQ als negatives Element der circadianen Rückkopplungsschleife wiederherstellen kann. Dazu wurde die FCD1-Domäne mit umliegendem Bereich (ca. 30 AS) in die *SphI*-Restriktionsschnittstelle (AS 4/5) des FRQ-Leserahmens im Vektor pBM60-*Clal-frq*ΔFCD1 eingefügt (Abb 3.12). Dieser äußerste N-terminale Bereich des Proteins ist wenig konserviert, so dass die Wahrscheinlichkeit, eine relevante Domäne zu deletieren, gering ist. Der so entstandene Vektor pBM60-*Clal-frq*(FCD1→*SphI*) wurde in den *frq*¹⁰-Stamm transformiert und Klone isoliert und auf FRQ-Proteinexpression untersucht.

FRQ(FCD1→*SphI*) wird schwächer exprimiert als FRQΔFCD1 und zeigt ein Phosphorylierungsmuster, das Wt-FRQ ähnlich ist (Abb. 3.14 A). Dies zeigt, dass das Wiedereinfügen der FCD1 in den N-Terminus den Phosphorylierungsdefekt rettet. Die Untersuchung der Interaktion mit CK-1a mittels Co-Immunopräzipitation mit αCK-1a macht

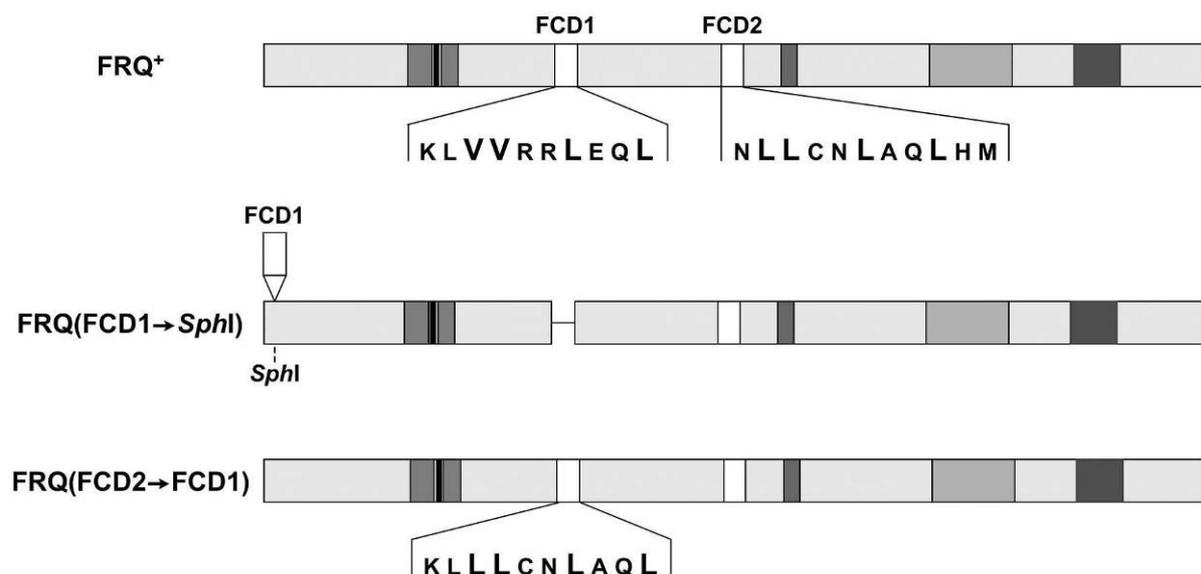


Abb. 3.12: Schematische Darstellung von FRQ mit seinen beiden CK-1a-Interaktionsstellen. Die signifikant angeordneten hydrophoben Aminosäuren sind hervorgehoben (oben). Durch Einsetzen der FCD1-Domäne und einiger umliegender Aminosäuren in die *SphI*-Restriktionsschnittstelle des FRQ-ORFs im Vektor pBM60-*Clal*-FRQΔFCD1 entsteht FRQ(FCD1→*SphI*) (Mitte). Die PCR-Mutagenese der hydrophoben Aminosäuren der FCD1 des Vektors pBM60-*Clal* gleicht diese denen der FCD2 an (unten).

deutlich, dass das Wiedereinfügen von FCD1 am N-Terminus von FRQ ausreicht, um die Interaktion von FRQ und CK-1a und damit auch die Phosphorylierung von FRQ(FCD1→*SphI*) zum Teil wiederherzustellen (Abb. 3.13 A). Die Menge des copräzipitierten FRQ(FCD1→*SphI*) ist dabei jedoch wesentlich geringer als bei dem Vergleichsexperiment mit Wt-FRQ. Die Untersuchung der Stabilität von FRQ(FCD1→*SphI*) durch die Behandlung der Kulturen mit Cycloheximid ergab, dass dieses Protein im Vergleich zum Wt-FRQ übermäßig schnell abgebaut (Abb 3.13 B). Dies kann vielleicht auf einen Faltungsdefekt des veränderten Proteins zurückgeführt werden, andererseits ist es auch möglich, dass stabilisierende Dephosphorylierungen des Proteins nicht mehr stattfinden können. Im *race tube assay* zeigt der Stamm einem arrhythmischen Phänotyp (Abb 3.13 C).

Auffallend ist die Ähnlichkeit der beiden FCD-Domänen in der Anordnung der hydrophoben Aminosäuren (Abb 3.10). Diese Tatsache legt den Gedanken nahe, dass es sich hierbei möglicherweise um eine Art Konsensus-Bindemotiv der Art $\Phi\Phi XX\Phi XQ\Phi$ für CK-1a handeln könnte (wobei Φ für eine hydrophobe Aminosäure steht). Sollte dies der Fall sein, so müsste das hydrophobe Motiv einer Domäne durch das der anderen ersetzbar sein. Zur

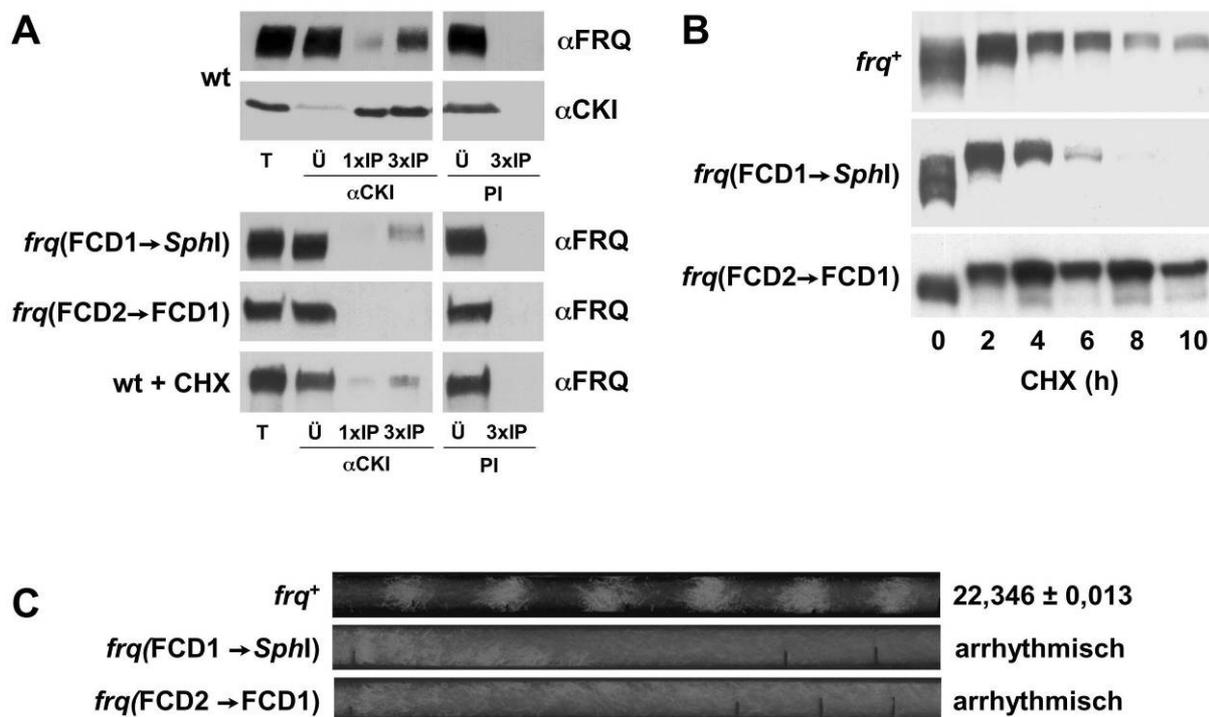


Abb. 3.13: (A) Co-Immunopräzipitation von FRQ mit CK-1a. CK-1a wurde mittels Antikörper aus Totalzellextrakten der Stämme *frq*⁺, *frq*(FCD→*SphI*) und *frq*(FCD2→FCD1) gefällt und die Präzipitate auf copräzipitiertes FRQ-Protein untersucht. (B) Abbauverhalten von FRQ in den Stämmen *frq*⁺, *frq*(FCD→*SphI*) und *frq*(FCD2→FCD1). Kulturen der gen. Stämme wurden bei Dauerlicht aufgezogen, nach Zugabe von CHX (10 µg/ml) zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die FRQ-Expression mittels Western Blot analysiert. (C) Analyse des circadianen Phänotyps der Stämme *frq*⁺, *frq*(FCD→*SphI*) und *frq*(FCD2→FCD1) mittels *race tube assay* im Dauerdunkel bei 25 °C. Bei allen Experimenten diente *frq*⁺ als Kontrolle.

Prüfung dieser Hypothese wurde das Bindemotiv der FCD1-Domäne mittels PCR-Mutagenese des Vektors pBM60-*Clal-frq* gegen das der FCD2-Domäne ausgetauscht (Abb. 3.12). Der so entstandene Vektor pBM60-*Clal-frq*(FCD2→FCD1) wurde in den *frq*¹⁰-Stamm transformiert und Klone, die das Protein FRQ(FCD2→FCD1) exprimieren, isoliert.

FRQ(FCD2→FCD1) zeigte den gleichen Phosphorylierungsdefekt wie FRQΔFCD1 oder FRQΔFCD2. Auch zeigte FRQ(FCD2→FCD1) keine nachweisbare Interaktion mit CK-1a (Abb. 3.12 A). Eine Untersuchung der Abbaukinetik des Proteins mit Cycloheximid-behandelten Kulturen ergab, dass FRQ(FCD2→FCD1) genau wie FRQΔFCD1 hyperstabil ist und über den Zeitraum von zehn Stunden wenig bis gar nicht abgebaut wird (Abb. 3.13 B). Auch der *race tube assay* zeigte, dass die beiden Domänen einander nicht ersetzen können – *frq*(FCD2→FCD1) zeigte wie FRQΔFCD1 ein arrhythmischen circadianen Phänotyp (Abb. 3.12 C). Beide Domänen sind also individuell notwendig, um die FRQ-CK-1a-Interaktion zu ermöglichen, es handelt sich bei ΦΦXXΦXQΦ nicht um ein Konsensus-Bindemotiv für CK-1a. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob eine Interaktion von FRQ und CK-1a vom Phosphorylierungsstatus von FRQ abhängig ist. Dazu wurde eine Co-Immunopräzipitation mit Totalextrakten einer *frq*⁺-Kultur durchgeführt, die zwei Stunden mit CHX behandelt worden war, um eine Hyperphosphorylierung von FRQ zu erreichen. Wie zu erkennen ist, kann hyperphosphoryliertes FRQ immer noch mit CK-1a co-präzipitiert werden, jedoch weniger als im Wildtyp.

Um eine mögliche Erklärung für die Arrhythmizität der *frq*ΔFCD-Stämme und der diversen FCD-Mutationen zu finden, wurde die WC-2-Expression dieser Stämme untersucht. Wie sich zeigte, entspricht diese in allen Stämmen der Expression von WC-2 in *frq*¹⁰, wo

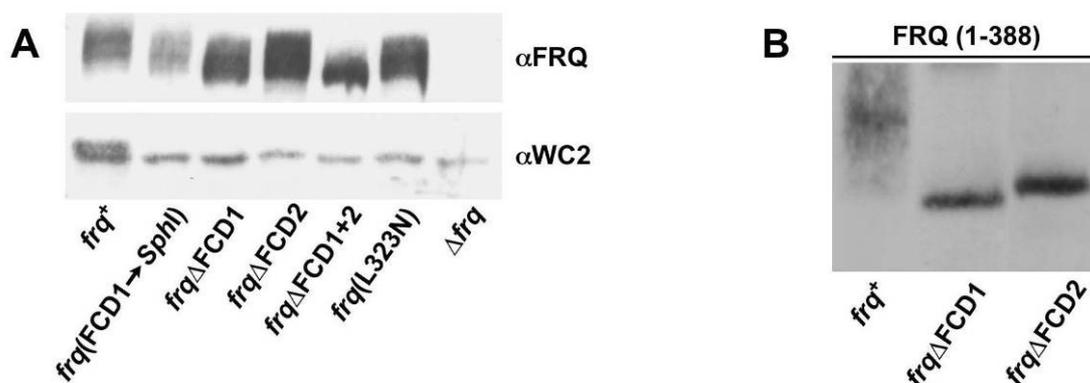


Abb. 3.14: (A) Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von FRQ (oben) und WC-2 (unten) in *frq*⁺, *frq*¹⁰ (Δ*frq*) und verschiedenen Stämmen mit deletierten oder mutierten FCDs. (B) Phosphorylierungsstatus des N-terminalen Fragments von FRQ aus den Stämmen *frq*⁺, *frq*ΔFCD1 und *frq*ΔFCD2. Totalzellextrakte der gen. Stämme wurden einer Hydroxylamin-Proteolyse unterzogen und die N-terminalen Fragmente mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

dieses Protein unterexprimiert ist (Abb. 3.14 A). Alle FCD-Mutanten zeigen ausserdem nur die hypophosphorylierte Form von WC-2. Da die Hyperphosphorylierung des WCC von funktionellem FRQ abhängt (Talora et al., 1999; He et al., 2005b; Schafmeier et al., 2005) und FRQ-gebundene CK-1a für diese Hyperphosphorylierung von WC2 verantwortlich ist (He et al., 2006), war dieses Ergebnis zum Teil zu erwarten. Allein im Stamm *frq(FCD1→SphI)*, bei dem sowohl die Phosphorylierung von FRQ(FCD1→SphI) als auch die Interaktion mit CK-1a zum Teil wiederhergestellt ist, hätte man eventuell mit einer wildtyp-ähnlichen Phosphorylierung von WC-2 gerechnet. Dass dem nicht so ist, erklärt die Arrhythmizität dieses Stammes: im hypophosphorylierten Zustand ist WC-2 transkriptionell aktiv, das mutierte FRQ wird ständig exprimiert, kann aber die Phosphorylierung des WCC nicht vermitteln. Dadurch findet keine negative Rückkopplung mehr statt, die Rückkopplungsschleifen der circadiane Uhr sind sozusagen entkoppelt, der Stamm zeigt keine rhythmische Konidienbildung mehr. Offenbar führt die Umpositionierung der FCD1 im Protein zwar zu einer potentiellen Wiederherstellung von CK-1a-Interaktion und FRQ-Phosphorylierung, die Hauptfunktion – nämlich die Inaktivierung des WCC – kann jedoch nicht wiederhergestellt werden.

3.8 Untersuchung der Interaktion FCD1 – FCD2 – CK-1a

Frühere Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass N-terminale Fragmente von FRQ, die über die *coiled coil*-Domäne mit endogenem Wt-FRQ interagieren können, in *trans* phosphoryliert werden (Abb. 3.4). Um zu untersuchen, ob diese Phosphorylierung von CK-1a vermittelt wird, wurden Totalextrakte aus LL-Kulturen der Stämme *frq*⁺, *frq*ΔFCD1 und *frq*ΔFCD2 einer proteolytischen Spaltung mit Hydroxylamin unterzogen und der Phosphorylierungsstatus des N-terminalen Fragments von FRQ (AS 1-388) mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (Abb. 3.14 B). Der Nachweis dieser Fragmente mit FRQ-Antikörper zeigt, dass diese sowohl bei FRQΔFCD1 als auch bei FRQΔFCD2 im Vergleich zum N-terminalen Fragment von FRQ eindeutig hypophosphoryliert sind. Die Phosphorylierung des N-Terminus von FRQ ist also tatsächlich von einer Interaktion des gesamten Proteins mit CK-1a abhängig. Der geringe Größenunterschied zwischen den Fragmenten von FRQΔFCD1 und FRQΔFCD2 ist auf die fehlenden 17 Aminosäuren von FRQΔFCD1 zurückzuführen.

Der N-terminale Phosphorylierungsdefekt von FRQΔFCD2 deutet auf einen *long range*-Effekt hin, da die FCD2-Domäne nicht im N-Terminus, sondern im Mittelteil von FRQ lokalisiert ist. Um zu untersuchen, ob FCD1 und FCD2 miteinander interagieren und so eine

zusammenhängende Bindestelle für CK-1a bilden, wurde ein *Yeast-two-hybrid*-Assay benutzt, bei dem die zu untersuchenden Proteinfragmente jeweils mit der DNA-bindenden oder der

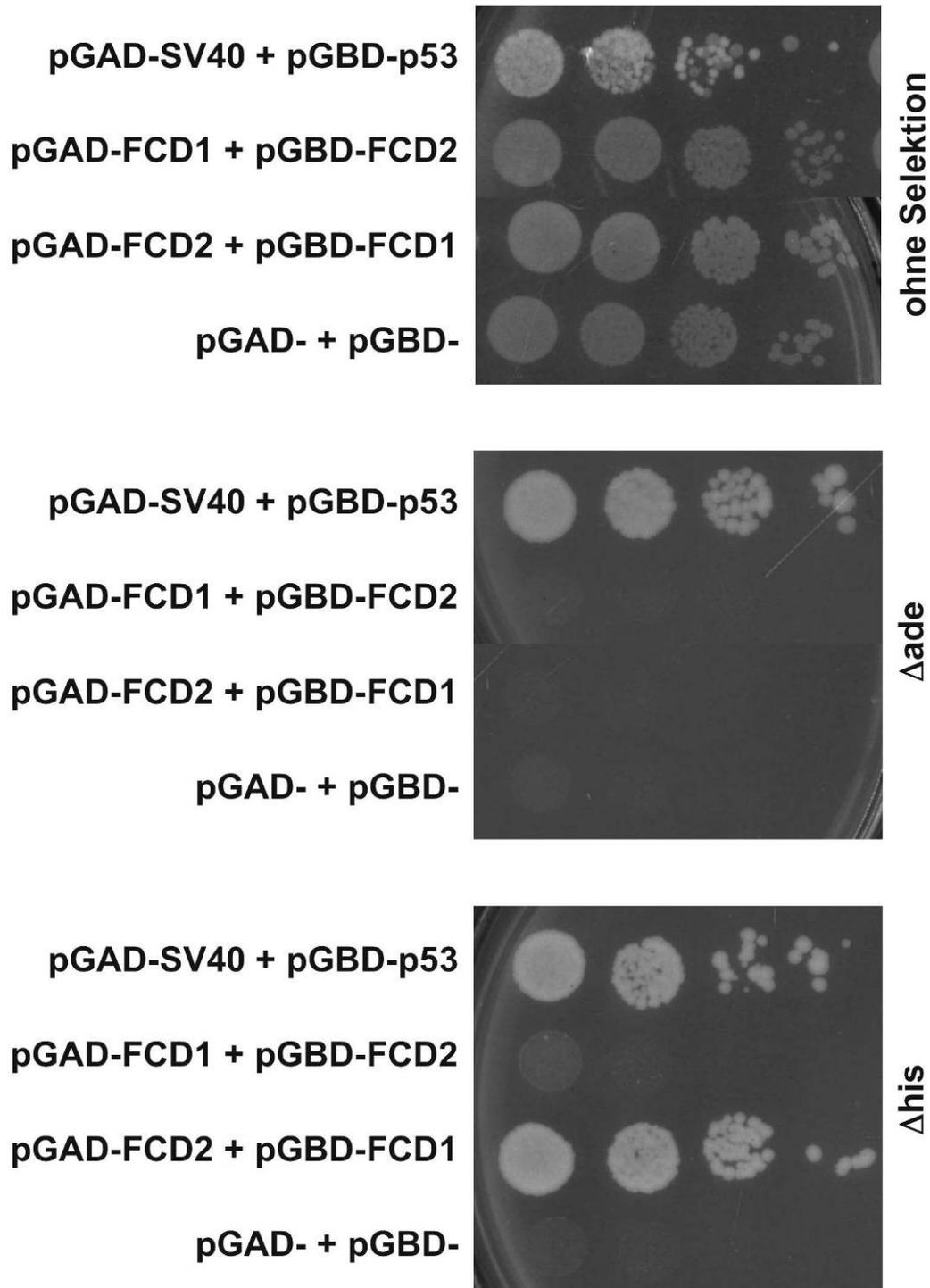


Abb. 3.15: *Yeast two hybrid*-Assay zur Untersuchung der Interaktion der beiden FRQ-FCDs. FCD1 und FCD2 wurden jeweils mit der DNS-bindenden Domäne (pGBD) und der aktivierenden (pGAD) des GAL4-Proteins aus *S. cerevisiae* fusioniert. Oben: Wachstum der Stämme ohne Selektion. Mitte: Wachstum unter starkem Selektionsdruck zur Untersuchung auf starke Interaktion. Unten: Wachstum unter schwachem Selektionsdruck zur Untersuchung auf schwache Interaktion. Als Kontrollen dienten pGAD-SV40 + pGDB-p53 (starke Interaktion) und pGAD- + pGDB- (keine Interaktion).

aktivierenden Domäne des GAL4-Proteins aus *S. cerevisiae* fusioniert werden. Kommt es zur Interaktion, werden Resistenzgene aktiviert und der Hefestamm ist auf dem gewünschten Selektionsmedium lebensfähig. Der Hefestamm pJG9-4A bietet außerdem die Möglichkeit, mittels zweier Selektionsmarker auf starke oder schwache Interaktion zu selektieren: eine schwache Interaktion ermöglicht nur Wachstum auf Δ His-Dropout-Medium, starke Interaktion dagegen führt dazu, dass der Hefestamm auch auf Δ Adenin-Dropout-Medium überleben kann. Um auszuschließen, dass aufgrund von Missfaltung oder abweichender Konformation der Fusionsproteine keine Interaktion zustande kommt, wurden die Nucleotidsequenzen der Proteinbereiche um FCD1 (AS 290-330) und FCD2 (AS 475-540) jeweils sowohl in den Vektor pGAD-C1 (mit der aktivierenden Domäne) als auch in den Vektor pGBD-C1 (mit der DNA-Bindedomäne) kloniert und in beiden möglichen Kombinationen in Hefe transformiert (Abb. 3.15). Als Kontrollen dienten jeweils die leeren Vektoren (keine Interaktion, Negativ-Kontrolle) und die Vektoren pGAD-SV40 und pGBD-p53 (starke Interaktion, Positiv-Kontrolle). Alle Stämme zeigen robustes Wachstum auf YPD-Medium (Abb. 3.15, oben), außer dem Positiv-Kontrollstamm ist jedoch keiner der anderen Stämme auf Δ Adenin-Dropout-Medium überlebensfähig (Abb. 3.15, Mitte). Auf Δ His-Dropout-Medium zeigt der Stamm pGAD-FCD2 + pGBD-FCD1 die gleiche Robustheit wie die Positiv-Kontrollstamm, ein klares Zeichen für eine schwache Interaktion zwischen FCD1 und FCD2. Der Stamm pGAD-FCD1 + pGBD-FCD2 dagegen ist auch hier nicht überlebensfähig (Abb. 3.15, unten). Dies muss nicht zwingend das Ergebnis der Kombination pGAD-FCD2 + pGBD-FCD1 in Frage stellen, wie bereits erwähnt, gibt es mehrere Gründe, warum eine Interaktion, die z. B. mit anderen Mitteln schon nachgewiesen wurde, im *Yeast-two-hybrid*-Assay nicht nachweisbar ist. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse dieses *Yeast-two-hybrid*-Assays darauf hin, dass die beiden FRQ-Domänen FCD1 und FCD2 schwach miteinander interagieren.

Als zweites Experiment wurde rekombinant exprimierte, aktiver CK-1a (Tataroglu, n. veröffentlicht) mittels Gelfiltration auf einer Sephadex200-Säule analysiert, um zu ermitteln, ob CK-1a als Monomer oder als Dimer vorliegt. Die CK-1a-enthaltenden Fraktionen wurden mittels Absorption bei 280 nm und Western Blot nachgewiesen.

Zur Erstellung einer Größen-Eichgerade der Säule wurde ein Proteingemisch aus vier verschiedenen Proteinen (Sigma) bekannter Größe gelfiltrierte. Es handelte sich dabei um β -Amylase (50 kDa, bildet ein Homotetramer von 200 kDa), BSA (66 kDa), Carbonic Anhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa). Abb. 3.16 A zeigt das Elutionsprofil dieser Eich-Gelfiltration. Zur Erstellung einer Eichgeraden (Abb. 3.16 C) wurden die

Elutionsvolumina (ml) der jeweiligen Maxima gegen den logarithmischen Wert der bekannten Proteingröße (kDa) aufgetragen. Aus dem Maximum des Elutionsprofils der Gelfiltration von

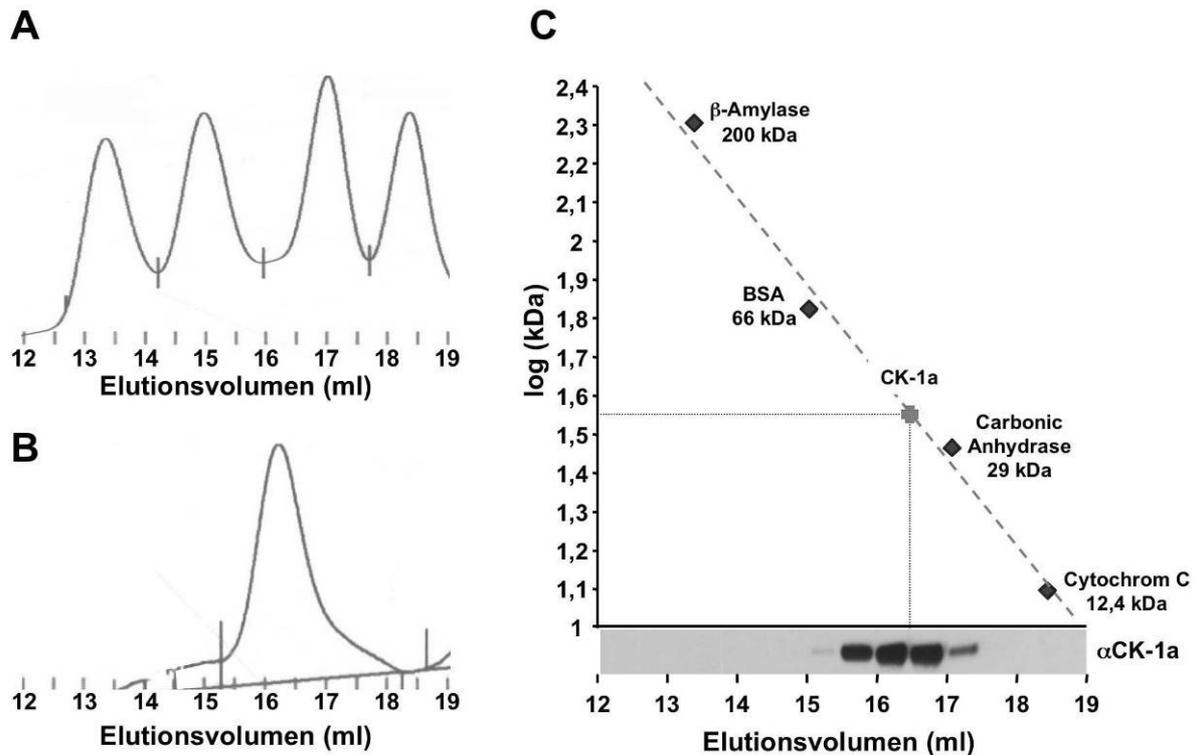


Abb. 3.16: (A) OD280-Elutionsprofil der Gelfiltration der Größenmarkerproteine. (B) OD280-Elutionsprofil der Gelfiltration der aufgereinigten rekombinanten CK-1a. (C) Eichgerade der Größenmarkerproteine, anhand der die Größe des CK-1a-Komplexes extrapoliert wurde. Das Filtrationseluat der CK-1a-Gelfiltration wurde in einzelnen Fraktionen von je 500 μ l gesammelt und diese zur Verifizierung des computergenerierten Elutionsprofils mittels SDS-PAGE und Western Blot auf das Vorhandensein von CK-1a getestet.

CK-1a (Abb. 3.16 B) konnte über diese Eichgerade auf die Größe von CK-1a geschlossen werden. CK-1a eluierte bei ca. 16,5 ml. Aus der Eichgeraden lässt sich damit für CK-1a ein Molekulargewicht von ca. 36 kDa errechnen – dies zeigt, dass CK-1a als Monomer vorliegt.

4. DISKUSSION

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass das Uhrenprotein FRQ phosphorylierungsabhängig zwischen einer geschlossenen und einer offenen Konformation wechselt und auf diese Weise aus zwei interagierenden einzelnen Domänen eine Bindestelle für CK-1a entsteht.

FRQ wird im Laufe eines circadianen Tages hyperphosphoryliert. Das Protein besitzt mit 188 Serin- und Threoninresten eine Vielzahl von potentiellen Phosphorylierungsstellen. Die in dieser Arbeit verwendete Technik der 2D-Gelelektrophorese (Abb. 3.1) zur Abschätzung der Anzahl der Phosphorylierungen ergibt zwar keine exakten Zahlen, die geschätzte Anzahl liegt zwischen 60 und 100 Phosphorylierungen. Mittels Massenspektrometrie konnten andere Arbeitsgruppen mindestens 75 Phosphorylierungsstellen von FRQ bestimmen (Baker et al., 2009; Tang et al., 2009). Die genaue Funktion dieser vielen Phosphorylierungsstellen ist nicht klar.

Bereits in früheren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass dem Abbau von FRQ seine Hyperphosphorylierung vorangeht (Liu et al., 2000; Görl et al., 2001; He et al., 2006). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Degradation von FRQ allein über 75 Phosphorylierungen erfordert. Die hohe Anzahl von Phosphorylierungen und die langsame Kinetik der Phosphorylierung von FRQ – über viele Stunden – könnten darauf hindeuten, dass diese eine Funktion bei der Regulation von FRQ auf der circadianen Zeitachse haben.

Proteinphosphorylierungen ändern die Konformation von Proteinen oder deren Interaktion mit anderen Biomolekülen (z. B. mit Proteinen, Metaboliten, Membranen oder Nucleinsäuren). Eine Vielzahl von Funktionen in der Zelle wird so über Proteinphosphorylierung reguliert. Hierzu gehören Proteinabbau, Aktivierung und Deaktivierung oder auch die Lokalisierung von Proteinen. Das Uhrenprotein FRQ ist größtenteils cytosolisch lokalisiert. Ein kleiner, aber signifikanter Teil befindet sich jedoch im Zellkern. Diese Kernlokalisation ist essentiell für die Funktion der Uhr (Luo et al., 1998), und der Import von FRQ geschieht innerhalb von Minuten (Diernfellner et al., eingereicht). Ungeklärt ist aber die Frage nach dem Export aus dem Zellkern. Während das Protein eine experimentell bestätigte NLS (nukleare Lokalisations-Sequenz) hat, ist bisher kein NES (nukleares Export-Signal) gefunden worden. Jüngste Experimente deuten jedoch darauf hin, dass hyperphosphoryliertes FRQ nicht mehr in den Zellkern importiert wird (Diernfellner et al., eingereicht). Im Verlauf eines circadianen Tages ist die Konzentration von neu synthetisiertem FRQ zunächst im Zellkern und im Cytosol gleich. In beiden Kompartimenten wird FRQ phosphoryliert, erreicht aber im Zellkern bereits früh seine Maximalkonzentration.

Im Cytosol akkumuliert es weiter, bis die Konzentration ein Vielfaches der Konzentration im Zellkern erreicht. Der Phosphorylierungsstatus des Proteins in beiden Kompartimenten unterscheidet sich dabei jedoch nicht erkennbar. Kernimport und -export sind also potentiell Funktionen, die abhängig sind vom Phosphorylierungsstatus von FRQ.

Die exzessive Phosphorylierung eines Proteins, wie sie bei FRQ zu beobachten ist, verändert die Ladung eines Proteins entscheidend. Laut Berechnung der Scansite-Software (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html) hat FRQ im unphosphorylierten Zustand einen pI von 5,65. Bei 75 Phosphorylierungen läge der pI bei 4,22. Dabei sind basische und saure Domänen nicht homogen entlang des Proteins verteilt: FRQ besitzt einen extrem basischen N-Terminus und demgegenüber einen sehr sauren Mittelteil und C-Terminus. Dies konnte gezeigt werden durch 2D-Gelelektrophorese entsprechender GFP-FRQ-Fusionsproteine (Abb. 3.2). Auffallend bei der Expression dieser GFP-fusionierten Fragmente (N_{FRQ} , M_{FRQ} und C_{FRQ}) war, dass diese im Gegensatz zu vollständigem FRQ wenig bis gar nicht phosphoryliert sind. Dies ist überraschend, insbesondere wäre zu erwarten gewesen, dass das mittlere Fragment phosphoryliert ist, da es eine Bindestelle für CK-1a enthält (He et al., 2006) (Abb. 3.2 und Abb. 3.3 B). Allein das N-terminale Fragment wird bei Expression in einem *frq*⁺-Stamm phosphoryliert (Abb. 3.5 B und C). Dieser N-Terminus von FRQ enthält eine *coiled coil*-Domäne, über welche FRQ Homodimere bildet. GFP- N_{FRQ} , das diese CC-Domäne ebenfalls besitzt, kann mit endogenem FRQ dimerisieren (Abb. 3.5 A) und wird im Komplex mit diesem phosphoryliert. Dies zeigt, dass die Phosphorylierung des N-Terminus einem *long range*-Effekt unterliegt und abhängig ist von FRQ-Domänen außerhalb des N-Terminus. In vollständigem FRQ ist der N-Terminus im Gegensatz zum isolierten Fragment GFP- N_{FRQ} stark phosphoryliert. Dies konnte durch die proteolytische Spaltung von FRQ aus einem Wt-Stamm mit Hydroxylamin gezeigt werden (Abb. 3.4 C).

Durch Behandlung von Mycelkulturen mit dem Translationsinhibitor CHX wird eine Hyperphosphorylierung von FRQ induziert, die den höchsten Phosphorylierungsstatus des Proteins im Laufe eines circadianen Tages noch übertrifft. Der Mechanismus ist unbekannt, und von allen Uhrenproteinen zeigt allein FRQ diese Modifizierung. Vermutlich wird eine kurzlebige Phosphatase schnell abgebaut, die unter normalen Bedingungen einer schnellen Hyperphosphorylierung entgegenwirkt. Diese CHX-induzierte Hyperphosphorylierung betrifft auch den N-Terminus von FRQ, wie die Hydroxylamin-Proteolyse von FRQ aus einem CHX-behandelten Wt-Stamm zeigt (Abb. 3.4 C). Interessanterweise wirkt CHX auf das in *frq*¹⁰ exprimierte GFP- N_{FRQ} genauso: das Fusionsprotein wird hyperphosphoryliert, auch ohne Kontakt zu endogenem FRQ. Ohne endogenes FRQ bleibt hyperphosphoryliertes

GFP-N_{FRQ} jedoch stabil, während es bei Koexpression mit vollständigem FRQ abgebaut wird. Dies zeigt, dass Phosphorylierungen am N-Terminus *per se* nicht den Abbau von FRQ regulieren. Sie müssen also eine andere Funktion haben. Zusammen mit dem Wissen um die stark unterschiedliche Ladung der einzelnen FRQ-Bereiche führte diese Beobachtung zu der Hypothese, dass die Konformation von FRQ von ionischer Wechselwirkung zwischen basischem N-Terminus und saurem restlichem Protein bestimmt wird. Diese Wechselwirkung könnte durch Phosphorylierung des N-Terminus aufgehoben werden.

Ein Gelfiltrationsexperiment mit Gesamtproteinextrakt aus einer Dauerlicht-Kultur (Schafmeier et al., 2005) lieferte bereits erste Hinweise darauf, dass der hydrodynamische Radius von FRQ mit seinem Phosphorylierungsstatus korreliert. Deutlich ist in dieser Abbildung erkennbar, dass hyperphosphorylierte Formen von FRQ früher eluieren als hypophosphorylierte. Dies wurde durch Gelfiltrationsexperimente mit aufgereinigtem FRQ bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass der hydrodynamische Radius von dephosphoryliertem FRQ kleiner ist als der von hyperphosphoryliertem FRQ (Abb. 3.6). Hypophosphoryliertes FRQ hat also offensichtlich eine kompaktere Form als hyperphosphoryliertes.

Bezogen auf das Verhalten von FRQ im Laufe eines circadianen Tages ergibt sich also folgendes Bild: bei neu synthetisiertem, hypophosphoryliertem FRQ interagiert der basische N-Terminus mit dem sauren Rest des Proteins. FRQ hat in diesem Stadium eine kompakte, „geschlossene“ Konformation. Im Laufe des Tages wird FRQ am N-Terminus phosphoryliert, dessen positive Ladungen dadurch neutralisiert werden. Die Interaktion mit dem Mittelteil bzw. C-Terminus wird schwächer und FRQ geht mehr und mehr in eine offene Konformation über. Da die Phosphorylierung langsam voranschreitet, kommt es wahrscheinlich nicht zu einem plötzlich „Umklappen“ des Proteins, sondern es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen offener und geschlossener Konformation ein, das sich im Laufe eines circadianen Tages von geschlossen zu offen verschiebt. Der Sinn könnte darin bestehen, bestimmte Phosphorylierungsstellen, die bei geschlossener Konformation nicht für Kinasen zugänglich sind, zu exponieren und so sowohl die Reihenfolge wie auch den zeitlichen Ablauf der Phosphorylierung von FRQ zu steuern. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch die Konformationsänderung Interaktionsdomänen für andere Proteine freigelegt werden, die für eine korrekte Funktion der Uhr nicht zu jedem Zeitpunkt des circadianen Tages zugänglich sein dürfen.

Die Untersuchungen zur Stabilität der GFP-FRQ-Fusionsproteine haben gezeigt, dass der Mittelteil von FRQ im Gegensatz zu N-Terminus und C-Terminus in der Lage ist, das an sich

stabile GFP zu destabilisieren (Abb. 3.4 A). Dies ist auf den ersten Blick eine Bestätigung verschiedener früherer Ergebnisse, die bereits zeigten, dass die Stabilität von FRQ maßgeblich von seinem Mittelteil und dessen Phosphorylierung abhängt. So konnten Liu et al. (2000) zeigen, dass in dieser Region drei putative Phosphorylierungsstellen liegen, die die Stabilität von FRQ stark beeinflussen. Ihr Austausch zu Alanin führt zu einem stark verlangsamten Abbau von FRQ. Görl et al. (2001) deletierten die PEST1-Domäne und erreichten damit ebenfalls eine Stabilisierung von FRQ. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese PEST1-Domäne *in vitro* von CK-1a phosphoryliert wird. He et al. (2006) konnten wiederum im Mittelteil von FRQ die Bindestelle für CK-1a (FCD2) identifizieren. Interessanterweise umfasst diese FCD sowohl die drei von Liu et al. identifizierten Phosphorylierungsstellen als auch die PEST1-Domäne. Baker et al. und Tang et al. (beide 2009) konnten durch ihre Massenspektrometrie-Experimente andererseits zeigen, dass es sich bei den drei von Liu et al. (2000) gefundenen putativen Phosphorylierungsstellen nicht um solche handelt, die *in vivo* phosphoryliert werden. Vielmehr verändert wahrscheinlich der Austausch dieser Serine und Threonine die Effizienz der CK-1a-Interaktion und führt so zu Hypophosphorylierung und verzögertem Abbau von FRQ. Ebenfalls im Mittelteil von FRQ liegen zwei Stellen, deren Mutation zu einer verkürzten bzw. verlängerten Periode führt: *frq¹* (G482S, Periodenlänge 16,5 h) und *frq⁷* (G459D, Periodenlänge 28 h). Zusammen zeigen diese Daten, dass der Mittelteil von FRQ eine wichtige Funktion bei der Regulation der Stabilität von FRQ hat.

Werden diese Mutationen jedoch im GFP-fusionierten Mittelteil von FRQ eingeführt, so haben sie keinen Effekt auf die Stabilität des Fusionsproteins. Die Deletion der PEST1-Domäne führt sogar zu einer weiteren Destabilisierung und nicht, wie bei $\text{FRQ}\Delta\text{PEST1}$, zu einer Stabilisierung (Abb. 3.4 D). Der Abbau des mittleren Fragments von FRQ unterliegt offensichtlich nicht den gleichen Mechanismen wie vollständiges FRQ. Es ist auch ohne Phosphorylierung instabil. Der Mittelteil von FRQ enthält FCD2, die von He et al. (2006) beschriebene CK-1a- Bindestelle. Dennoch war es nicht möglich, das GFP-fusionierte mittlere FRQ-Fragment mit CK-1a zu präzipitieren. Dies deutet darauf hin, dass FCD2 nicht ausreicht, um den Komplex mit CK-1a zu stabilisieren. Die fehlende Interaktion mit CK-1a wiederum könnte der Grund sein, warum $\text{GFP-M}_{\text{FRQ}}$ nicht phosphoryliert ist.

Den Nachweis, dass die von He et al. (2006) identifizierte FCD nicht ausreicht, um CK-1a stabil zu binden, gelang durch die Entdeckung einer zweiten CK-1a-Interaktionsstelle im Rahmen dieser Arbeit. Zur Unterscheidung wird gemäss ihrer Lage vom N- zum C-Terminus innerhalb des Proteins die neu entdeckte FCD als FCD1, die von He et al. identifizierte FCD

als FCD2 bezeichnet. Es handelt sich bei FCD1 um einen leucinreichen Abschnitt am Ende des N-terminalen Drittels von FRQ (AS 310-326), der von der NetNES-Software ursprünglich als putative NES identifiziert wurde (Abb 3.7). Diverse Untersuchungen an *N. crassa* und ein Hefe-Assay zeigten jedoch, dass dieses Peptid die subzelluläre Lokalisierung von FRQ oder anderen Proteinen nicht beeinflussen kann. Stattdessen ist FRQ, dessen FCD1 deletiert wurde, deutlich hypophosphoryliert und hyperstabil. Ein entsprechend mutierter Stamm ist arrhythmisch. Den gleichen Phänotyp zeigt ein Stamm, in dessen *frq* FCD2 deletiert wurde. Immunoprecipitations-Experimente zeigten, dass FRQ Δ FCD1 nicht mit CK-1a interagiert. FCD1 ist also, ebenso wie FCD2, für eine Interaktion mit CK-1a notwendig; die Deletion von nur einer der beiden unterbricht den Kontakt ebenso endgültig wie die Deletion beider, es gibt kein Übergangsstadium mit nur geringer Interaktion (Abb 3.11).

Sowohl FCD1 als auch FCD2 sind hochkonserviert und reich an Leucin und weiteren hydrophoben Aminosäuren. In ihrer Anordnung hydrophober Aminosäuren ähneln sich die beiden Domänen (Abb. 3.10 und Abb. 3.12). Die Leucinreste sind essentiell für die Interaktion mit CK-1a. He et al. (2006) konnten dies für FCD2 zeigen, indem sie die konservierten Leucine dieser Domäne austauschten und bei dieser Mutante keine Interaktion von FRQ und CK-1a nachweisen konnten. Genau das gleiche passiert, wenn Leucin 323 der FCD1 gegen Asparagin ausgetauscht wird: auch hier findet keine Interaktion von FRQ und CK-1a statt. Wahrscheinlich bilden die beiden FCDs amphipatische Helices, deren Struktur durch den Austausch der Leucine zerstört wird. Dies konnte durch computergestützte Strukturanalysen bestätigt werden. Die Tatsache, dass solche amphipatischen Helices bei der Dimerisierung von Proteinen eine Rolle spielen und ihre Entfernung von über 160 AS zueinander waren die Grundlage der Idee, dass beide Domänen miteinander interagieren könnten.

Trotz einer gewissen Ähnlichkeit beider FCDs in der Anordnung ihrer hydrophoben Aminosäuren sind sie nicht redundant: werden die hydrophoben Aminosäuren der FCD1 durch die der FCD2 ersetzt, kann die Interaktion von FRQ und CK-1a dadurch nicht wiederhergestellt werden und ein entsprechender Stamm ist arrhythmisch. FCD2 kann also FCD1 nicht ersetzen. Andererseits rettet das Wiedereinfügen der FCD1 an anderer Stelle des N-Terminus sowohl die FRQ-Phosphorylierung als auch die Interaktion mit CK-1a wenigstens zum Teil (Abb 3.13 A), allerdings ist das so veränderte FRQ(FCD1 \rightarrow *SphI*) deutlich instabiler als FRQ (Abb 3.13 B). Der WCC wird außerdem in diesem Stamm nicht phosphoryliert, was zeigt, dass keine negative Rückkopplung der molekularen Uhr stattfindet (Abb 3.14 A). Aus diesem Grund zeigt auch dieser Stamm keinen rhythmischen Phänotyp (Abb 3.13 C).

Erstmals konnte in dieser Arbeit durch Hydroxylaminproteolyse direkt gezeigt werden, dass eine fehlende Interaktion von FRQ und CK-1a die Hypophosphorylierung des N-Terminus von FRQ zufolge hat (Abb. 3.14 B). Dies mag im ersten Moment überraschen, befindet sich doch z. B. die FCD2 bei einem großen Protein wie FRQ in einiger Entfernung zu den von Baker et al. und Tang et al. (beide 2009) identifizierten Phosphorylierungsstellen des N-terminalen Drittels von FRQ. Zieht man jedoch eine ladungsbedingte Interaktion des positiv geladenen N-Terminus von FRQ mit dem negativ geladenen C-Terminus in Betracht, so könnten sich die beiden FCDs bei geschlossener Konformation in einer solchen räumlichen Position zueinander befinden, dass sie zusammen eine Plattform für die Bindung von CK-1a bilden (Abb 4.1). Zwei Argumente sprechen für dieses Modell: erstens sind beide Domänen für eine stabile Bindung von CK-1a notwendig. Egal, welche von beiden man deletiert, die Interaktion mit CK-1a geht nicht partiell, sondern vollständig verloren. Zweitens konnte bereits gezeigt werden, dass CK-1a sowohl Serine und Threonine in der N-terminalen Region (Baker et al., Tang et al., beide 2009) als auch in der mittleren Region um die PEST1-Domäne (Liu et al., 2000; Görl, 2002; Tang et al., 2009; Baker et al. 2009) phosphoryliert. Durch eine schleifenförmige Konformation von FRQ, die die beiden FCDs in unmittelbarem Kontakt zueinander bringen würde, lägen sowohl der N-Terminus als auch die PEST1-Domäne in räumlicher Nähe zueinander und benachbart zur CK-1a-Bindestelle und damit womöglich auch zum aktiven Zentrum einer dort gebundenen Kinase. Die Interaktion von FCD1 und FCD2 konnte in dieser Arbeit mittels *Yeast-two-Hybrid*-Assay nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Die Tatsache, dass es sich um eine nur schwache Interaktion handelt, passt zur Hypothese einer phosphorylierungsabhängigen Konformationsänderung von FRQ. Nach dieser Hypothese kommt die Interaktion des N-Terminus von FRQ mit dem Mittelteil und/oder dem C-Terminus vor allem durch ionische Wechselwirkung zu Stande und wird durch Phosphorylierung des N-Terminus aufgehoben. Eine stabile Interaktion, z. B. über eine hydrophobe Wechselwirkung der amphipatischen Helices der beiden FCDs, wäre möglicherweise nicht reversibel und damit nicht durch Phosphorylierung regulierbar. Noch ein Merkmal der FRQ-Aminosäuresequenz unterstützt die These der internen Dimerisierung der FCDs: die Aminosäuresequenz zwischen FCD1 und FCD2 ist einer der am wenigsten konservierten Bereiche von FRQ. Vergleiche mit anderen Ascomycota zeigen, dass dieser Bereich sogar in der Länge extrem stark variiert (s. Anhang). Dies spricht für die Tatsache, dass es sich um eine flexible Region handelt, die zur Schleifenbildung dienen könnte.

Trotzdem bleibt die Frage nach der Stöchiometrie der FRQ–CK-1a-Interaktion: bindet wirklich ein Molekül FRQ nur ein Molekül CK-1a? Die Ergebnisse der durchgeführten Co-Immunopräzipitationen sprechen an sich dafür. Es gibt jedoch Untersuchungen aus Säugetieren, nach denen CKI δ (welche bei der Phosphorylierung des Säuger-Uhrenproteins PER eine Rolle spielt) auch Dimere bildet und auf diese Weise ihre eigene Aktivität autoinhibieren kann (Longenecker et al., 1998). Möglicherweise könnte also doch je ein Molekül CK-1a an jede FCD binden, stabil würde diese Interaktion jedoch erst dadurch, dass die beiden CK-1a-Moleküle dimerisieren und so zwischen FCD1 und FCD2 eine Brücke bilden (Abb. 4.1). Das Ergebnis des Gelfiltrationsexperiments spricht jedoch gegen diese Annahme und dafür, dass CK-1a als Monomer an FRQ bindet (Abb. 3.16).

Weitere Unterstützung erfährt das Modell einer phosphorylierungsabhängigen Konformationsänderung durch die Tatsache, dass das N-terminale Drittel von FRQ erst spät am Tag phosphoryliert wird (Baker et al., 2009). Im Verlauf eines circadianen Tages beginnt die FRQ-Synthese am subjektiven Vormittag und der FRQ-Gehalt der Zelle steigt bis zum subjektiven Abend an, danach fällt er wieder ab. Gleichzeitig wird FRQ phosphoryliert, jedoch nicht gleichmäßig, sondern in einigen Regionen früher als in anderen. Die

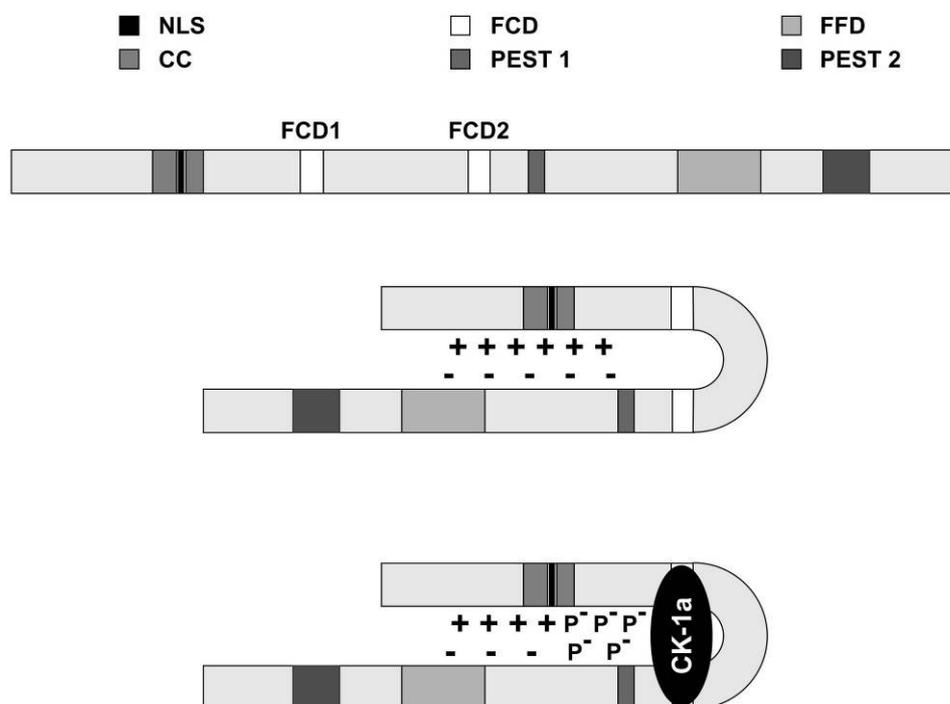


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Domänen von FRQ (oben). Im unphosphorylierten Zustand hat das Protein eine geschlossene Konformation (Mitte, vgl. auch Abb. 3.5 A), die die beiden FCDs in unmittelbare räumliche Nähe zueinander bringt (Mitte). Diese bilden dadurch eine Bindeplattform für CK-1a, die dann sowohl N-Terminus als auch Mittelteil von FRQ phosphoryliert (unten).

Hyperphosphorylierung des N-Terminus beginnt erst ab dem subjektiven Abend und steigert sich bis zur subjektiven Mitternacht. Gleichzeitig verändert sich im Laufe eines circadianen Tages die Interaktion von FRQ und CK-1a: grundsätzlich interagiert FRQ zwar zu jedem Zeitpunkt des circadianen Tages mit CK-1a, die Menge jedoch oszilliert. So ist am subjektiven frühen Vormittag, wenn FRQ hypophosphoryliert ist, viermal mehr CK-1a mit FRQ komplexiert als in der subjektiven frühen Nacht. Die Interaktion FRQ–CK-1a scheint also ebenfalls phosphorylierungsabhängig zu sein. Nach dem hier präsentierten Modell wäre hypophosphoryliertes FRQ, dessen zwei FCDs aufgrund der geschlossenen Konformation in engem Kontakt miteinander sind, ein besseres Substrat für CK-1a als hyperphosphoryliertes FRQ, das in offener Konformation vorliegt, so dass FCD1 und FCD2 nicht oder allenfalls schwach interagieren können. In gewisser Weise steuert CK-1a dadurch auch die Stärke ihrer Interaktion mit FRQ, da sie ja durch Phosphorylierung des N-Terminus von FRQ ihre eigene Bindestelle zerstört. Die Tatsache, dass zu jedem Zeitpunkt des circadianen Tages CK-1a mit FRQ interagiert, widerspricht dem nicht. Zum einen haben nie alle FRQ-Moleküle gleichzeitig den gleichen Phosphorylierungsstatus, es existieren immer verschieden phosphorylierte Spezies nebeneinander. Zum anderen verschwindet FRQ nie vollständig: wenn die Neusynthese beginnt und dieses junge, hypophosphorylierte FRQ mit CK-1a interagiert, ist immer noch altes, hyperphosphoryliertes FRQ aus dem vorherigen Zyklus vorhanden. Es existiert also zu jedem Zeitpunkt des circadianen Tages eine FRQ-Spezies, die mit CK-1a interagieren kann.

Aus alten und neu gewonnenen Daten setzt sich also ein Bild zusammen, wie der Phosphorylierungsstatus von FRQ und die Interaktion von CK-1a sich gegenseitig bedingen: Neu synthetisiertes FRQ ist hypophosphoryliert. Der positiv geladene N-Terminus des Proteins interagiert mit dem negativ geladenen Mittelteil/C-Terminus des Proteins, wodurch FCD1 und FCD2 miteinander in Kontakt gebracht werden und interagieren. Durch eine Initialphosphorylierung im Mittelteil von FRQ wird CK-1a rekrutiert, bindet an die interagierenden FCDs und beginnt, Serine und Threonine in Reichweite zu phosphorylieren. Währenddessen wird der FRQ-CK-1a-Komplex in den Zellkern transportiert und inaktiviert den WC-Komplex durch Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von FRQ durch CK-1a schreitet voran, bis die negativen Ladungen der Phosphatgruppen am N-Terminus dessen positive Ladung neutralisiert haben. Dies schwächt die Interaktion zwischen N-Terminus und Mittelteil/C-Terminus des Proteins, FRQ geht in die offene Konformation über und destabilisiert den Kontakt zwischen FCD1 und FCD2. CK-1a kann nicht mehr binden und verlässt den Komplex. Hyperphosphoryliertes FRQ wird aus dem Kern transportiert.

5. LITERATUR

Akten, B., Jauch, E., Genova, G. K., Kim, E. Y., Edery, I., Raabe, T., und Jackson, F. R. (2003). A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat. Neurosci.* *6*, 251–257.

Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., und Tollervey, D. (1999). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* *18*, 5399–5410.

Aramayo, R. und Metzberg, R.L. (1996). Gene replacements at the *his-3* locus of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.*, *43*, 9 - 13.

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

Aronson, B.D., Johnson, K.A. und Dunlap, J.C. (1994b). 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.

Aschoff, J. (1981). *Handbook of behavioral Neurobiology: Biological Rhythms*. Plenum Press, N. Y.

Ashmore, L. J., und Sehgal, A. (2003). A fly's eye view of circadian entrainment. *J. Biol. Rhythms* *18*, 206–216.

Baker, C. L., Kettenbach, A. N., Loros, J. J., Gerber, S. A., und Dunlap, J. C. (2009) Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the *Neurospora* circadian clock. *Mol Cell.* *15*, 354-63.

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

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

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

Bell-Pedersen, D., Dunlap J.C. und Loros J.J. (1992). The *Neurospora* circadian clock-controlled gene, *cgc-2*, is allelic to *eas* and encodes a fungal hydrophobin required for formation of the conidial rodlet layer. *Genes Dev.*, *6*, 2382 - 2394.

Bell-Pedersen, D., Loros J.J. und Dunlap J.C. (1996a). Distinct cis-acting elements mediate clock, light, and developmental regulation of the *Neurospora crassa eas* (*cgc-2*) gene. *Mol. Cell. Biol.*, *16*, 513 - 520.

Bell-Pedersen, D., Shinohara, M.L., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1996b). Circadian clock-controlled genes isolated from *Neurospora crassa* are late night- to early morning-specific. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13096-13101.

Bell-Pedersen, D., Lewis, Z. A., Loros, J. J., und Dunlap, J. C. (2001). The *Neurospora* circadian clock regulates a transcription factor that controls rhythmic expression of the output *eas* (*ccg-2*) gene. Mol. Microbiol. 41, 897–909.

Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., und Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: Lessons from diverse organisms. Nat. Rev. Genet. 6, 544–556.

Bjellqvist, B., Hughes, G.J., Pasquali, Ch., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.-Ch., Frutiger, S. & Hochstrasser, D.F., (1993) The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. Electrophoresis 14, 1023-1031

Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E.U., Sachs, M.S., Marzluf, G.A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D.J., Zelter, A., Kalkman, E.R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeadon, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W. und Pratt, R. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiol Mol Biol Rev., 68, 1-108.

Bornstein P, und Balian G. (1977) Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine. Methods Enzymol. 47, 132–145.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248 - 254.

Brown, S. A., Ripperger, J., Kadener, S., Fleury-Olela, F., Vilbois, F., Rosbash, M., und Schibler, U. (2005). PERIOD1-associated proteins modulate the negative limb of the mammalian circadian oscillator. Science 308, 693–696.

Brunner, M. und Kaldi, K. (2008). Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa*. Mol. Microbiol., 68, 255–262.

Bünning, E. (1936). Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 54, 590–607.

Carattoli, A., Cogoni, C., Morelli, G., und 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.

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

Cheng, P., Yang, Y. und Liu, Y. (2001b). Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98, 7408-7413.

Cheng, P., Yang, Y., Gardner, K.H. und 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.

Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q. und 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.

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

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

Christensen, M. K., Falkeid, G., Loros, J. J., Dunlap, J. C., Lillo, C., und Ruoff, P. (2004). A nitrate-induced *frq*-less oscillator in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Rhythms* 19, 280–286.

Collett, M.A., Garceau, N., Dunlap, J.C. und Loros, J.J. (2002). Light and clock expression of the *Neurospora* clock gene frequency is differentially driven by but dependent on WHITE COLLAR-2. *Genetics*, 160, 149-58.

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

Coogan, A.N. und Piggins, H.D. (2004). MAP kinases in the mammalian circadian system – key regulators of clock function. *J. Neurochem.*, 90, 769 – 775.

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

Correa, A., Lewis, A. Z., Greene, A. V., March, I. J., Gomer, R. H., und Bell-Pedersen, D. (2003). Multiple oscillators regulate circadian gene expression in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13597–13602.

Crosson, S., und Moffat, K. (2001). Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2995–3000.

Crosson, S., und Moffat, K. (2002). Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell* 14, 1067–1075.

Crosson, S., Rajagopal, S., und Moffat, K. (2003). The LOV domain family: Photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42, 2–10.

Crosthwaite, S. K. (2004). Circadian clocks and natural antisense RNA. *FEBS Lett.* 567, 49–54.

Crosthwaite, S.K., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1995). Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. *Cell*, 81, 1003 - 1012.

Crosthwaite, S.K., Dunlap, J.C., und Loros, J.J. (1997). *Neurospora wc-1* and *wc-2*: Transcription, photoresponses, and the origin of circadian rhythmicity. *Science*, 276, 763 - 769.

de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervy, D., und Linder, P. (1998). Dob1p (Mtr4p) is a putative ATPdependent RNA helicase required for the 30 end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17, 1128–1140.

Denault, D.L., Loros, J.J. und 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.

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

Diernfellner, A., Querfurth, C., Salazar, C., Höfer, T. und Brunner, M. (n. n. erschienen). Phosphorylation modulates rapid nucleo-cytoplasmic shuttling and cytoplasmic accumulation of *Neurospora* clock protein FRQ on a circadian time scale. (eingereicht bei *Genes and Development*)

Dong, W., Tang, X., Yu, Y., Nilsen, R., Kim, R., Griffith, J., Arnold, J. und Schüttler, H. B. (2008). Systems biology of the clock in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE*, 29; 3 (8), e3105.

Dragovic, Z., Tan, Y., Gorl, M., Roenneberg, T., und Merrow, M. (2002). Light reception and circadian behavior in 'blind' and 'clock-less' mutants of *Neurospora crassa*. *EMBO J.* 21, 3643 - 3651.

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

Dunlap, J. C., Loros, J. J., und DeCoursey, P. J. (2004). “Chronobiology.” Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland.

Dunlap, J. C., und Loros, J. J. (2005). Analysis of circadian rhythms in *Neurospora*: Overview of assays and genetic and molecular biological manipulation. *Methods Enzymol.* 393, 3–22.

Eide, E. J., Woolf, M. F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E. L., Giovanni, A., und Virshup, D. M. (2005). Control of mammalian circadian rhythm by CKIε-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2795–2807.

Elvin, M., Loros, J., Dunlap, J. C., und 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.

Feldman, J.F. und Hoyle, M.N. (1973). Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 75, 605 - 613.

Feldman, J.F. und Hoyle, M.N. (1976). Complementation analysis of linked circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 82, 9 - 17.

Fleissner, G., und Fleissner, G. (1992). Feedback loops in the circadian system. In "Circadian Rhythms" (M. Zatz, ed.), pp. 79–84. Elsevier, Amsterdam.

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

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

Froehlich, A.C., Loros, J.J. und 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.

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

Gadal, O., Strauß, D., Kessl, J., Trumppower, B., Tollervey, D. & Hurt, E. (2001). Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21, 3405-15.

Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C.P., Kinsey, J.A., Braun, E.L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G.O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metznerberg, R.L., Perkins, D.D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R.J., Osmani, S.A., DeSouza, C.P., Glass, L., Orbach, M.J., Berglund, J.A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D.O., Alex, L.A., Mannhaupt, G., Ebbole, D.J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M.S., Lander, E.S., Nusbaum, C. und Birren, B. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature.* 422, 859-68.

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

Gehring, W., und Rosbash, M. (2003). The coevolution of blue-light photoreception and circadian rhythms. *J. Mol. Evol.* 57, S286–S289.

Gerstberger, Thomas Christian (2003). Identifizierung von nukleären Export-Substraten mittels eines funktionellen Testsystems für nukleäre Exportsignale (NES) in der *Hefe Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation an der Fakultät für Biowissenschaften, Heidelberg.

Gillette, M. U., und Mitchell, J. W. (2002). Signaling in the suprachiasmatic nucleus: Selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.* 309, 99–107.

Glossop, N.R.; Lyons, L.C. und Hardin, P.E. (1999). Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science*, 286, 766 - 768.

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

Görl, M. (2002). Molekulare Mechanismen der circadianen Uhr in *Neurospora crassa*: Biochemische Charakterisierung von Frequency. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

Gooch, V. D. (1985). Effects of light and temperature steps on circadian rhythms of *Neurospora crassa* and *Gonyaulax polyedra*. In "Temporal Order" (N. I. Jaeger, ed.), pp. 232–237. Springer-Verlag, New York.

Granshaw, T., Tsukamoto, M., und Brody, S. (2003). Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Farnesol or geraniol allow expression of rhythmicity in the otherwise arrhythmic strains *frq¹⁰*, *$\Delta wc-1$* , and *$\Delta wc-2$* . *J. Biol. Rhythms* 18, 287–296.

Grima, B., Lamouroux, A., Chelot, E., Papin, C., Limbourg-Bouchon, B., und Rouyer, F. (2002). The F-box protein *slimb* controls the levels of clock proteins *period* and *timeless*. *Nature* 420, 178–182.

Gropman, A. L., Elsea, S., Duncan, W. C. Jr und Smith, A., C. (2007) New developments in Smith-Magenis syndrome (del 17p11.2). *Curr Opin Neurol.* 20, 125-34.

Harper, S. M., Neil, L. C., und Gardner, K. H. (2003). Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 301, 1541–1544.

Hastings, J.W. und Schweiger, H.G. eds. (1976) The molecular basis of circadian rhythms. Berlin: Dahlem Konferenzen.

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

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

He, Q., Cheng, P., Yang, Y., He, Q., Yu, H. und Liu, Y. (2003). FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J.*, 22, 4421-30.

- He, Q., Cheng, P., He, Q. Y., und Liu, Y. (2005a). The COP9 signalosome regulates the *Neurospora* circadian clock by controlling the stability of the SCF_{FWD-1} complex. *Genes Dev.* *19*, 1518–1531.
- He, Q., Shu, H., Cheng, P., Chen, S., Wang, L. und Liu, Y. (2005b). Light-independent phosphorylation of WHITE COLLAR-1 regulates its function in the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *J. Biol. Chem.* *280*, 17526–17532.
- He, Q., Cha, J., Lee, H., Yang, Y., und Liu, Y. (2006). CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *Genes & Dev.* *20*, 2252–2565.
- Heintzen, C. (2005). PAS proteins and the *Neurospora* circadian clock. In “The Circadian Clock in Eukaryotic Microbes” (F. Kippert, ed.). Landes/Eurekah Bioscience, Austin.
- Heintzen, C., Nater, M., Apel, K., und Staiger, D. (1997). AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *94*, 8515–8520.
- Heintzen, C., Loros, L. L., und 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.
- Heintzen C. und Liu Y. (2007). The *Neurospora crassa* circadian clock. *Adv Genet.* *58*, 25-66
- Hilleren, P. J., und Parker, R. (2003). Cytoplasmic degradation of splice-defective pre-mRNAs and intermediates. *Mol. Cell* *12*, 1453–1465.
- Huang, G., Wang, L., und Liu, Y. (2006). Molecular mechanism of suppression of circadian rhythm by a critical stimulus. *EMBO J.* *25*, 5349–5357.
- Imaizumi, T., Tran, H. G., Swartz, T. E., Briggs, W. R., und Kay, S. A. (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* *426*, 302–306.
- Imaizumi, T., Schultz, T. F., Harmon, F. G., Ho, L. A., und Kay, S. A. (2005). FKF1F-BOX protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science* *309*, 293–297.
- Inoue H., Nojima H., und Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* *96* (1), 23-8.
- Iwasaki, H., und Dunlap, J. C. (2000). Microbial circadian oscillatory systems in *Neurospora* and *Drosophila*: Models for cellular clocks. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 189–196.
- Jacobs, J. S., Anderson, A. R., und Parker, R. P. (1998). The 30 to 50 degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 30 to 50 exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* *17*, 1497–1506.
- James, P., Halladay, J. und Craig, E. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* *144* (4), 1425-1436.

Johnson, C. H., Elliott, J. A., und Foster, R. (2003). Entrainment of circadian programs. *Chronobiol. Int.* 20, 741–774.

Johnson, C. H., Elliott, J., Foster, R., Honma, K., und Kronauer, R. E. (2004). Fundamental properties of circadian rhythms. In “Chronobiology” (J. C. Dunlap, J. J. Loros und P. J. DeCoursey, eds.). Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland.

Kim, E. Y., Bae, K., Ng, F. S., Glossop, N. R., Hardin, P. E., und Edery, I. (2002). *Drosophila* CLOCK protein is under posttranscriptional control and influences light-induced activity. *Neuron* 34, 69–81.

Kleinig, Hans; Maier, Uwe (1999). Zellbiologie: Ein Lehrbuch. Begr. von Hans Kleinig und Peter Sitte. Neubearb. von Hans Kleinig und Uwe Maier. Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm; G. Fischer, 1999

Kloss, B., Price, J. L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., und Young, M. W. (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase I ϵ . *Cell* 94, 97–107.

Ko, H. W., Jiang, J., und Edery, I. (2002). Role for Slimb in the degradation of *Drosophila* period protein phosphorylated by Doubletime. *Nature* 420, 673–678.

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

Krishnan, B., Levine, J. D., Lynch, M. K., Dowse, H. B., Funes, P., Hall, J. C., Hardin, P. E., und Dryer, S. E. (2001). A new role for *cryptochrome* in a *Drosophila* circadian oscillator. *Nature* 411, 313–317.

Kyhse-Anderson, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 10, 203 - 207.

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

Lakin-Thomas, P.L. und Brody, S. (2000). Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Lipid deficiencies restore robust rhythmicity to null *frequency* and *white-collar* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 256 - 261.

Lakin-Thomas, P. L., und Brody, S. (2004). Circadian rhythms in microorganisms: New complexities. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 489–519.

Lee, K., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (2000). Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science* 289, 107-110.

Lewis, Z. A., Correa, A., Schwerdtfeger, C., Link, K. L., Xie, X., Gomer, R. H., Thomas, T., Ebbole, D. J., und Bell-Pedersen, D. (2002). Overexpression of WHITE COLLAR-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.* 45, 917–931.

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

Linden, H. (2002). Circadian rhythms: A WHITE COLLAR protein senses blue light. *Science* 297, 777–778.

Linden, H. und 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.

Linden, H., Ballario, P., Arpaia, G., und Macino, G. (1999). Seeing the light: News in *Neurospora* blue light signal transduction. *Adv. Genet.* 37, 35–54.

Liu, Y. (2003). Molecular mechanisms of entrainment in the *Neurospora* circadian clock. *J. Biol. Rhythms* 18, 195–205.

Liu, Y. (2005). Analysis of posttranslational regulations in the *Neurospora* circadian clock. *Methods Enzymol.* 393, 379–393.

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

Liu, Y., Mellow, M., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1998). How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science*, 281, 825 - 829.

Liu, Y., Loros, J.J. und Dunlap, J. (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. U S A.*, 97, 234 - 239.

Liu, Y., He, Q. und Cheng, P. (2003). Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 2131 – 2138.

Longenecker, K. L., Roach, P. J. und Hurley, T. D. (1998). Crystallographic studies of casein kinase I delta toward a structural understanding of auto-inhibition. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54, 473-475

Loros, J. J., und 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.

Loros, J.J., Richman, A. und Feldman J.F. (1986). A recessive circadian clock mutation at the *frq* locus of *Neurospora crassa*. *Genetics*, 114, 1095 - 1110.

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

Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (2001). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. *Annu. Rev. Physiol.*, 63, 757 - 794.

Lowrey, P. L., Shimomura, K., Antoch, M. P., Yamazaki, S., Zemenides, P. D., Ralph, M. R., Menaker, M., und Takahashi, J. S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation *tau*. *Science* 288, 483–492.

Luo, C., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1998). Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *EMBO J.* 17, 1228-1235.

Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A.S. und Young, M.W. (2001). A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, 105, 769 - 779.

Mattern, D. und Brody, S. (1979). Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Effects of unsaturated fatty acids. *J. Bacteriol.* 139, 977–988.

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

McWatters, H. G., Bastow, R. M., Hall, A., und Millar, A. J. (2000). The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock. *Nature* 408, 716–720.

Merrow, M.W., Garceau, N. und Dunlap, J. (1997). Dissection of a circadian oscillation into discrete domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3877 - 3882.

Merrow, M.W., Brunner, M., und Roenneberg, T. (1999). Assignment of circadian function for the *Neurospora* clock gene *frequency*. *Nature*, 399, 584 - 586.

Merrow, M.W. und Roenneberg, T. (2001a). Circadian clocks: Running on redox. *Cell*, 106, 141 - 143.

Merrow, M., Franchi, L., Dragovic, Z., Görl, M., Johnson, J., Brunner, M., Macino, G., und Roenneberg, T. (2001b) Circadian Regulation of the Light Input Pathway in *Neurospora crassa*. *EMBO J.*, 20, 307-315.

Millar, A. J., und Kay, S. A. (1996). Integration of circadian and phototransduction pathways in the network controlling CAB gene transcription in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 15491–15496.

Mitchell, P., und Tollervey, D. (2000). Musing on the structural organization of the exosome complex. *Nat. Struct. Biol.* 7, 843–846.

Morgan, L. W., Greene, A. V., und Bell-Pedersen, D. (2003). Circadian and light-induced expression of luciferase in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* 38, 327–332.

Nawathean, P. und Rosbash, M. (2004). The doubletime and CKII kinases collaborate to potentiate *Drosophila* PER transcriptional repressor activity. *Mol. Cell*, 13, 213-23.

Nowrousian, M., Duffield, G.E., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (2003). The frequency gene is required for temperature-dependent regulation of many clock-controlled genes in *Neurospora crassa*. *Genetics* 164, 923-933.

Ouyang, Y., Andersson, C. R., Kondo, T., Golden, S. S., und Johnson, C. H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 8660–8664.

de Paula, R. M., Lamb, T. M., Bennett, L., und Bell-Pedersen D. (2008). A connection between MAPK pathways and circadian clocks. *Cell Cycle* 7, 2630-4.

Pittendrigh, C.S., Bruce, V.G., Rosenzweig, N.S. und Rubin, M.L. (1959). A biological clock in *Neurospora*. *Nature*, 184, 169 - 170.

Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living things. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 25, 159 - 184.

Pregueiro, A. M., Price-Lloyd, N., Bell-Pedersen, D., Heintzen, C., Loros, J. J., und Dunlap, J. C. (2005). Assignment of an essential role for the *Neurospora frequency* gene in circadian entrainment to temperature cycles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 2210–2215.

Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez, M., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., und Schibler, U. (2002). The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110, 251–260.

Price, J. L., Blau, J., Rothenfluh, A., Adodeely, M., Kloss, B., und Young, M. W. (1998). Doubletime is a new *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94, 83–95.

Querfurth, C., Diernfellner, A., Heise, F., Lauinger, L., Neiss, A., Tataroglu, O., Brunner M. und Schafmeier, T. (2007). Posttranslational regulation of *Neurospora* circadian clock by CK1 α -dependent phosphorylation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*; 72, 177-83.

Roenneberg, T., und Merrow, M. (2001). Seasonality and photoperiodism in fungi. *J. Biol. Rhythms* 16, 403–414.

Roenneberg, T., Daan, S., und Merrow, M. (2003). The art of entrainment. *J. Biol. Rhythms* 18, 183–194.

Roenneberg, T., Dragovic, Z., und Merrow, M. (2005). Demasking biological oscillators: Properties and principles of entrainment exemplified by the *Neurospora* circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7742–7747.

Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sancar, G., Sancar, C., Brunner, M. und Schafmeier, T. (2009) Activity of the circadian transcription factor White Collar Complex is modulated by phosphorylation of SP-motifs. *FEBS Lett.*, 8. Mai 2009 [elektronische Vorabveröffentlichung]

Sargent, M.L. und Woodward, D.O. (1969). Genetic Determinants of Circadian Rhythmicity in *Neurospora*. *J. Bacteriol.*, 97, 861 – 866.

- Saunders, D. S. (2005). Erwin Bünning and Tony Lees, two giants of chronobiology, and the problem of time measurement in insect photoperiodism. *J. Insect Physiol.* 51, 599–608.
- Sathyanarayanan, S., Zheng, X., Xiao, R., und Sehgal, A. (2004). Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell* 116, 603–615.
- Schafmeier, T., Haase, A., Kaldi, K., Scholz, J., Fuchs, M., und Brunner, M. (2005). Transcriptional feedback of a *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell* 122, 235–246.
- Schafmeier, T., Káldi, K., Diernfellner, A., Mohr, C., und Brunner, M. (2006) Phosphorylation dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor towards a cytoplasmic activator. *Genes Dev* 20: 297–306.
- Schafmeier, T., Diernfellner, A., Schäfer, A., Dintsis, O., Neiss, A. und Brunner, M. (2008) Circadian activity and abundance rhythms of the *Neurospora* clock transcription factor WCC associated with rapid nucleo–cytoplasmic shuttling. *Genes Dev.* 22, 3397-3402
- Schwerdtfeger, C. und 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.
- Schwerdtfeger, C. und Linden, H. (2001). Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol.*, 39, 1080-1087.
- Schwerdtfeger, C., und Linden, H. (2003). VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J.* 22, 4846–4855.
- 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. und Reppert, S.M. (2000b). Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science*, 288, 1013 - 1019.
- Shi, M., Collett, M., Loros, J.J. und Dunlap J.C. (2009). FRQ-interacting Helicase (FRH) mediates negative and positive feedback in the *Neurospora* circadian clock. *N. n. erschienen.*
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takeida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, S., Shibata, S., Loros, J. J., Dunlap, J. C., und Okamura, H. (1997). Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the *mPer1* transcript. *Cell* 91, 1043–1053.
- Shrode, L. B., Lewis, Z. A., White, L. D., Bell-Pedersen, D., und 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.
- Staiger, D., Zecca, L., Kirk, D. A. W., Apel, K., und Eckstein, L. (2003). The circadian clock regulated RNA-binding protein AtGRP7 autoregulates its expression by influencing alternative splicing of its own pre-mRNA. *Plant J.* 33, 361–371.
- Stevens RG, Blask DE, Brainard GC, Hansen J, Lockley SW, Provencio I, Rea MS, Reinlib L. (2007). Meeting report: the role of environmental lighting and circadian disruption in cancer and other diseases. *Environ Health Perspect.*; 115 (9): 1357-62.

Suarez-Lopez, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., und Coupland, G. (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* *410*, 1116–1120.

Talora, C., Franchi, L., Linden, H., Ballario, P. und Macino, G. (1999). Role of a WHITE COLLAR-1:WHITE COLLAR-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J.*, *18*, 4961 – 4068.

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

Tan, Y., Merrow, M., und Roenneberg, T. (2004b). Photoperiodism in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Rhythms* *19*, 135–143.

Tang, C. T., Li, S., Long, C., Cha, J., Huang, G., Li, L., Chen, S. und Liu, Y. (2009) Setting the pace of the *Neurospora* circadian clock by multiple independent FRQ phosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (elektronische Vorab-Veröffentlichung)

Tauber, E., Last, K. S., Olive, P. J. und Kyriacou, C. P. (2004). Clock gene evolution and functional divergence. *J. Biol. Rhythms* *19*, 445–458.

Torchet, C., Bousquet-Antonelli, C., Milligan, L., Thompson, E., Kufel, J., und Tollervey, D. (2002). Processing of 30-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Mol. Cell* *9*, 1285–1296.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *79*, 267 – 271.

Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., und Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* *303*, 1003–1006.

Vogel, H.J. (1964). Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Naturalist*, *98*, 435 – 446.

Xu, Y., Padiath, Q. S., Shapiro, R. E., Jones, C. R., Wu, S. C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptacek, L. J. und Fu, Y. H. (2005). Functional consequences of a CKI δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* *434*, 640–644.

Yang, Y., Cheng, P., Zhi, G. und 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.

Yang, Y., Cheng, P. und Liu, Y. (2002). Regulation of the *Neurospora* circadian clock by casein kinase II. *Genes Dev.* *16*, 994-1006.

Yang, Y., Cheng, P., He, Q., Wang, L. und 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.

Yang, Y., He, Q., Cheng, P., Wrage, P., Yarden, O. und Liu, Y. (2004). Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev.* 18, 255-60.

Yanovsky, M. J., und Kay, S. A. (2002). Molecular basis of seasonal time measurement in *Arabidopsis*. *Nature* 419, 308–312.

Young, M.W. und Kay, S.A. (2001). Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat. Rev. Genet.* 2, 702-715.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden und entstehen folgende Publikationen:

Diernfellner, A., Querfurth, C., Salazar, C., Höfer, T. und Brunner, M. (n. n. erschienen). Phosphorylation modulates rapid nucleo-cytoplasmic shuttling and cytoplasmic accumulation of *Neurospora* clock protein FRQ on a circadian time scale. (Eingereicht bei *Genes and Development*)

Querfurth, C., Diernfellner, A., Heise, F., Lauinger, L., Neiss, A., Tataroglu, O., Brunner M. und Schafmeier, T. (2007). Posttranslational regulation of *Neurospora* circadian clock by CK1a-dependent phosphorylation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*; 72, 177-83

6. ANHANG

6.1 Abkürzungsverzeichnis

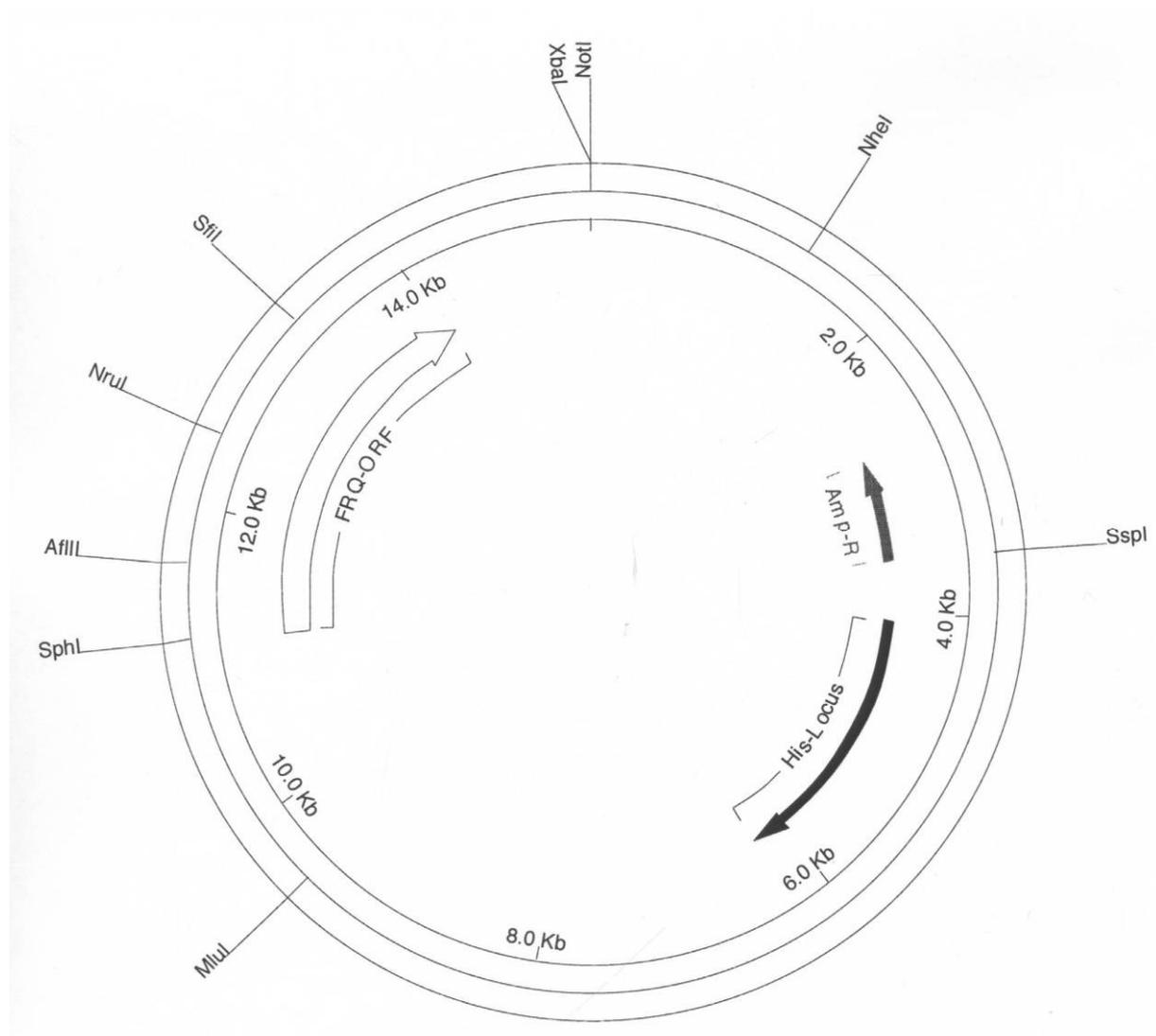
AS	Aminosäure
Abb	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>bd</i>	<i>band</i> -Mutation
BMAL-1, <i>bmal-1</i>	Brain-and-Muscle-Arnt-Like Protein 1
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>B. fuckeliana</i>	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
C-	Carboxy-
CC	<i>coiled coil</i>
<i>cgc</i>	Uhrenkontrolliertes Gen (Clock controlled gene)
CDK	Cyklinabhängige Kinase (Cyclin dependent kinase)
CHX	Cycloheximid
CIP	Alkalische Phosphatase (Calf intestine phosphatase)
CK-1, <i>ck-1</i>	Casein Kinase 1
CLK, <i>clk</i>	CLOCK
CRY, <i>cry</i>	Cryptochrom
CSN	COP9-Signalosom
CT	Circadiane Zeit (circadian time)
CYC, <i>cyc</i>	CYCLE
DBT, <i>dbt</i>	Doubletime
DD	Dauerdunkel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxiribonucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethyleneglycol- <i>bis</i> (β -aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetat
FCD	FRQ-CK-1a-Interaktionsdomäne
FFD	FRQ-FRH-Interaktionsdomäne
FRH, <i>frh</i>	FRQ-interacting Helicase
FRQ, <i>frq</i>	Frequency
GFP	Green Fluorecent Protein
<i>G. zea</i>	<i>Gibberella zea</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethanolsulfat
<i>his-3</i>	<i>N. crassa</i> Histidinlokus 3
HMW	High Molecular Weight (-Marker)
<i>H. spinulosa</i>	<i>Hypocrea spinulosa</i>
IP	Immunfällung
kDa	Kilo-Dalton
LD	Licht-Dunkel
LL	Dauerlicht
LMW	Low Molecular Weight (-Marker)
LOV	Light-Oxygen-Voltage (-Domäne)
LRE	Light responsive element

<i>L. australiensis</i>	<i>Leptosphaeria australiensis</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MOPS	3-[N-Morpholino]ethansulfonat
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
<i>M. grisea</i>	<i>Magnaporthe grisea</i>
N-	Amino-
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
OD	optische Dichte
ORF	Open Reading Frame (Offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Per-Arnt-Sim (-ähnliche Domäne)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PER, <i>per</i>	Period
PEST	Pro-Glu-Ser-Thr-Asp (-reiche Region)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Phe	Phenylalanin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPase	Protein Phosphatase
Pro	Prolin
<i>P. anserina</i>	<i>Podospora anserina</i>
<i>P. nodorum</i>	<i>Phaeosphaeria nodorum</i>
<i>P. tritici-repentis</i>	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>
QA, <i>qa</i>	Quinic Acid (Chinasäure)
rel.	relativ
rib.	ribosomal
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
<i>S. fimicola</i>	<i>Sordaria fimicola</i>
<i>S. sclerotiorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TIM, <i>tim</i>	Timeless
U	Unit (Einheit)
ü. N.	über Nacht
(5')-UTR	Untranslatierte Region der mRNA (am 5'-Ende)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WC-1, <i>wc-1</i>	White Collar-1
WC-2, <i>wc-2</i>	White Collar-2
WCC	White-Collar-Komplex
WT, <i>wt</i>	Wildtyp

6.2 Vektorkarten

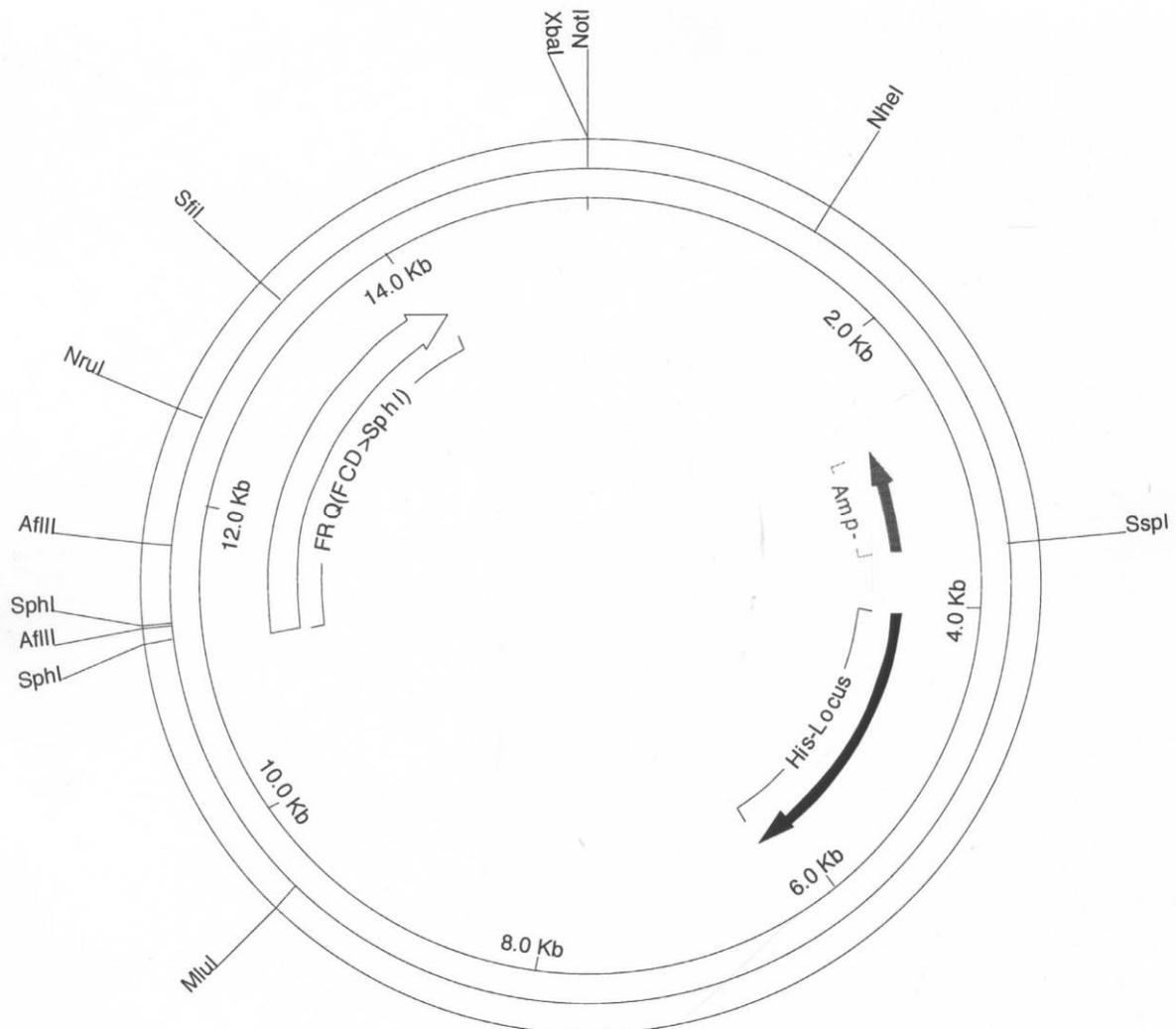
6.2.1 pBM60 *ClaI* *frq*

His-komplementierender *Neurospora*-Transformationsvektor (15279 bp), Ampicillin-resistent. Alle einzigartigen Restriktionsschnittstellen sind angegeben. Nur geringfügig in der Größe abweichend, aber mit den gleichen einzigartigen Restriktionsschnittstellen sind die Vektoren pBM60 *ClaI* *frq*ΔFCD1, pBM60 *ClaI* *frq*ΔFCD2, pBM60 *ClaI* *frq*ΔFCD1/2, pBM60 *ClaI* *frq*(L323N) und pBM60 *ClaI* *frq*FCD2→FCD1.



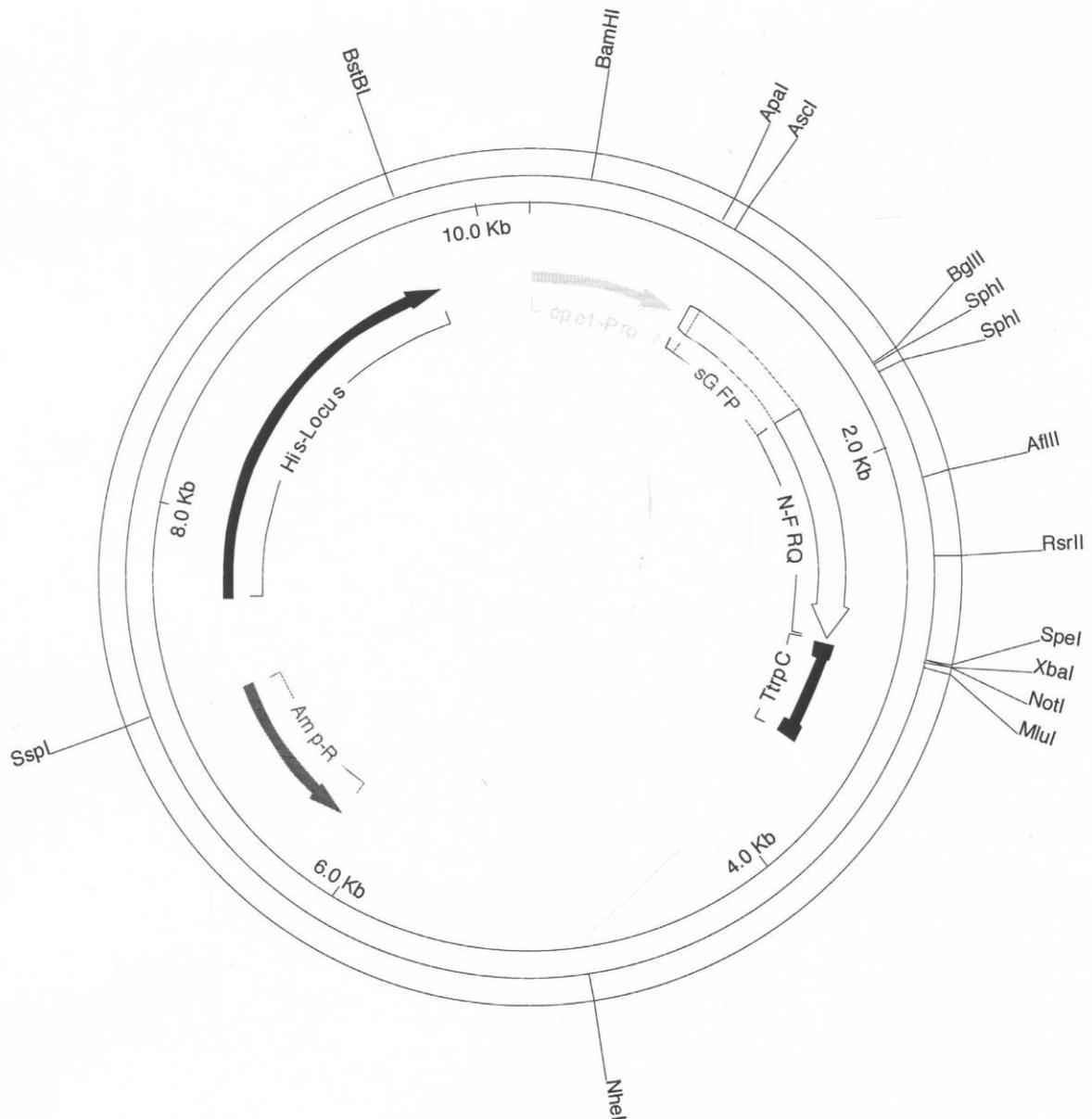
6.2.2 pBM60 *ClaI* *frq* FCD1→*SphI*

His-komplementierender *Neurospora*-Transformationsvektor (15327 bp), Ampicillin-resistent. Alle einzigartigen Restriktionsschnittstellen von pBM60 *ClaI* *frq* sind angegeben.



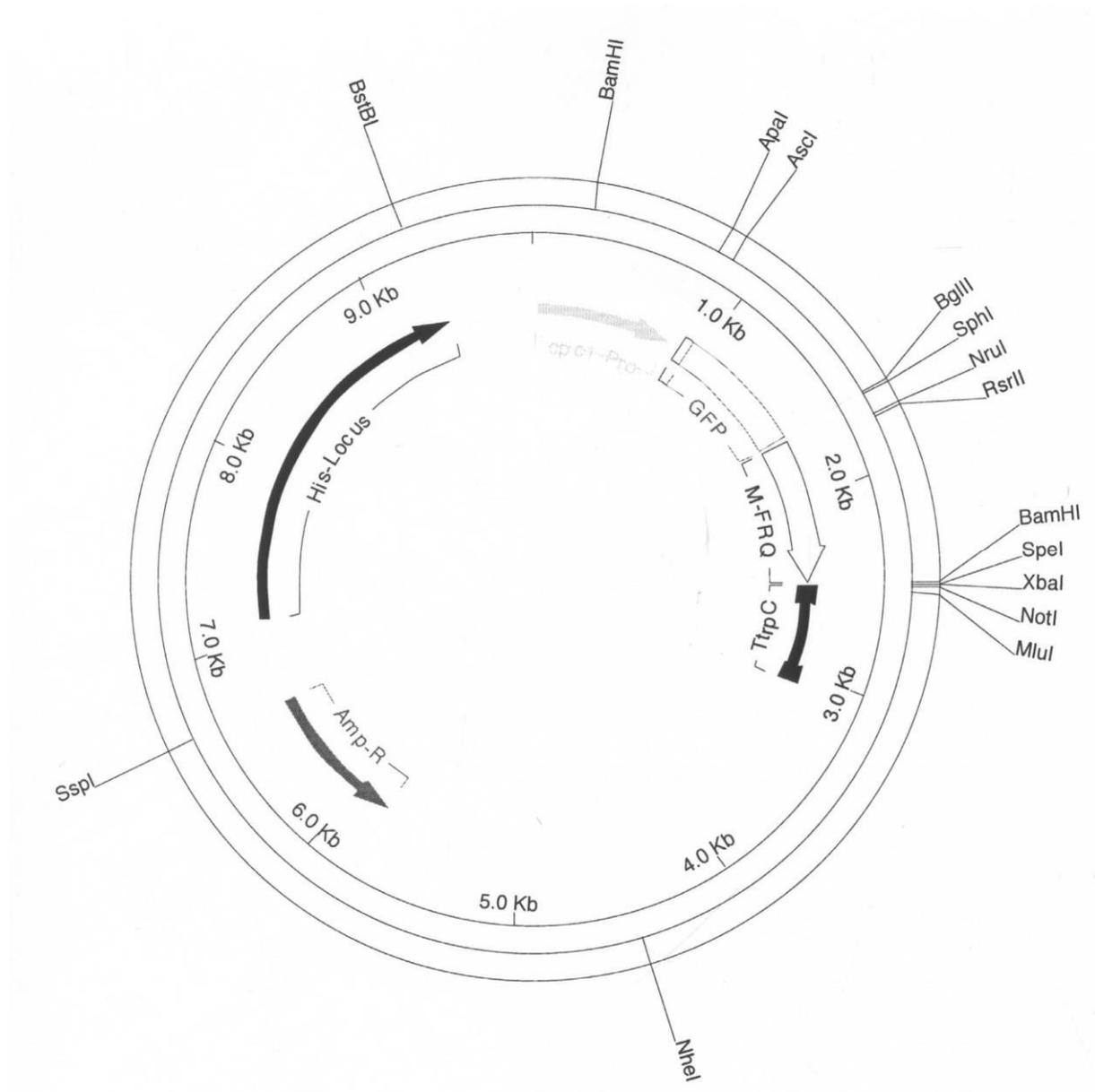
6.2.3 pFH64 FLAG-GFP-FRQ(2-412)

His-komplementierender *Neurospora*-Transformationsvektor (10231 bp), Ampicillin-resistent. Alle einzigartigen Restriktionsschnittstellen für den Ausgangsvektor pFH64 FLAG-GFP sind angegeben.



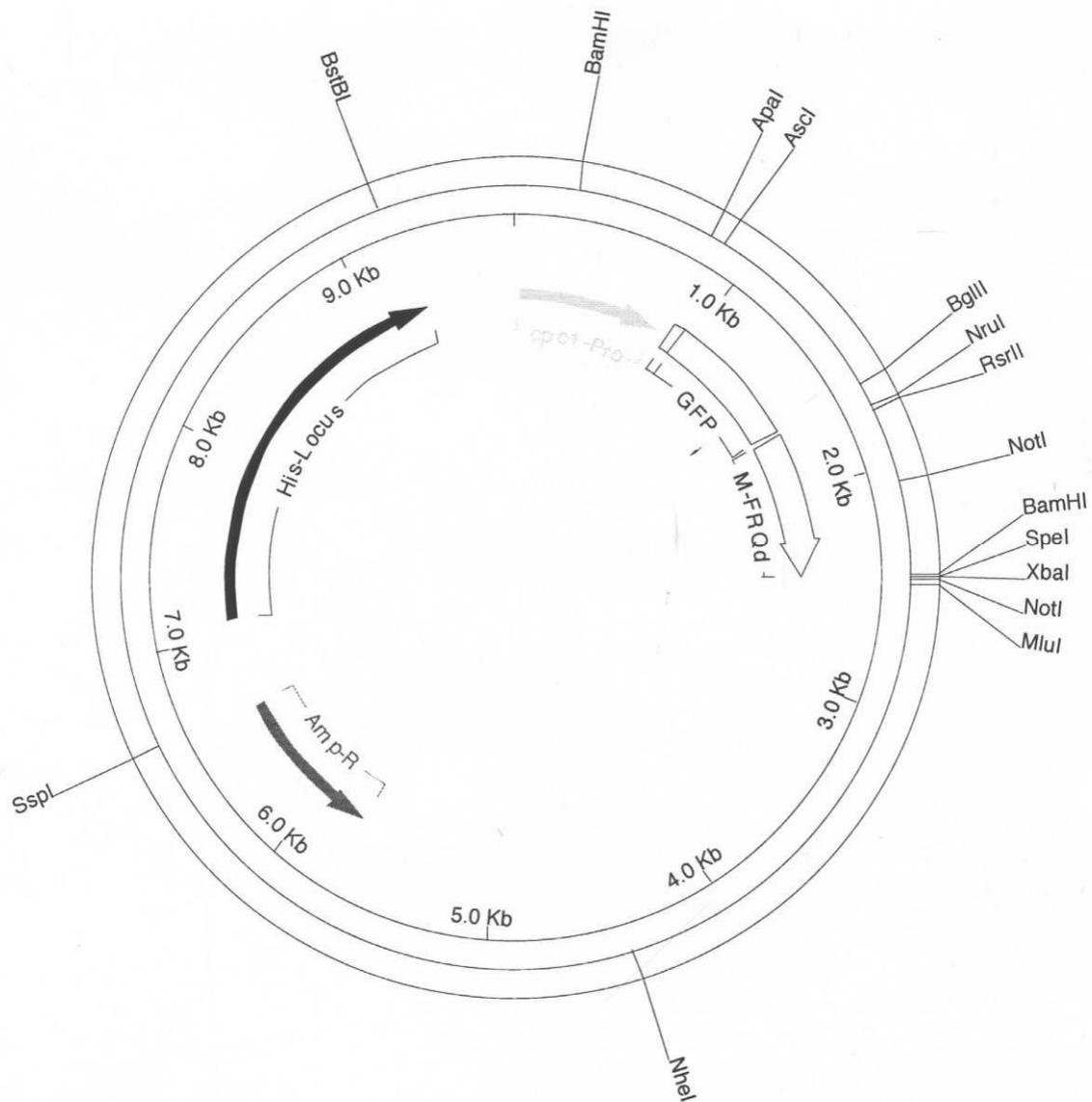
6.2.4 pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683)

His-komplementierender *Neurospora*-Transformationsvektor (9811 bp), Ampicillin-resistent. Alle einzigartigen Restriktionsschnittstellen für den Ausgangsvektor pFH64 FLAG-GFP sind angegeben. Genau gleich sind die Vektoren pFH64 FLAG-GFP-FRQ1(413-683), pFH64 FLAG-GFP-FRQ7(413-683), pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683)(S513A) und pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683)(S513D)



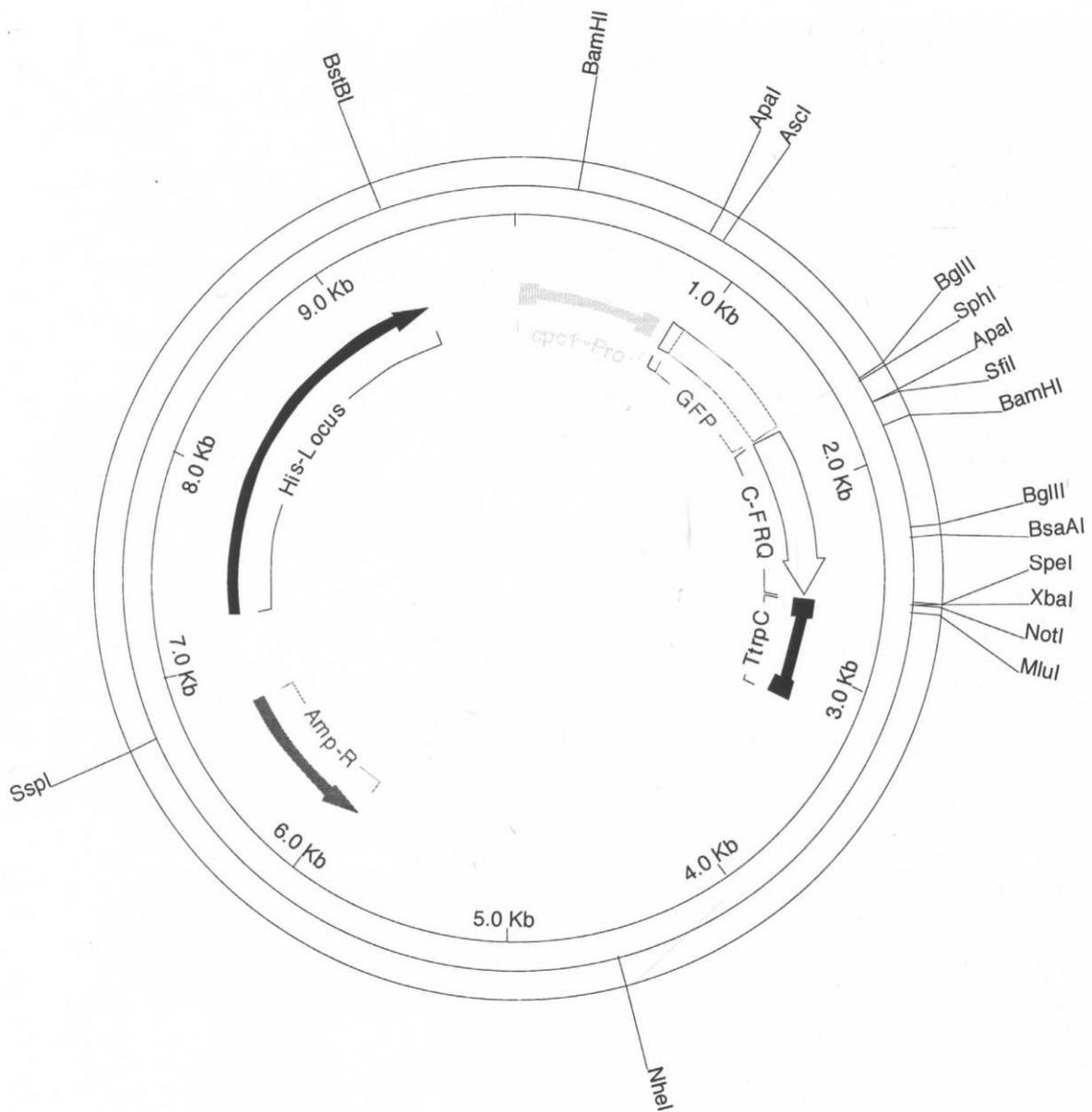
6.2.5 pFH64 FLAG-GFP-FRQ(413-683) Δ PEST1

His-komplementierender *Neurospora*-Transformationsvektor (9769 bp), Ampicillin-resistent. Alle einzigartigen Restriktionsschnittstellen für den Ausgangsvektor pFH64 FLAG-GFP sind angegeben.



6.2.6 pFH64 FLAG-GFP-FRQ(684-989)

His-komplementierender *Neurospora*-Transformationsvektor (9916 bp), Ampicillin-resistent. Alle einzigartigen Restriktionsschnittstellen für den Ausgangsvektor pFH64 FLAG-GFP sind angegeben.



		P P T G - - - P P E G L R E A R I L P Q D - - - - - N - M K K S R S R D N G S A S N S G G D Q T E S Majority											
		430		440		450		460		470		480	
358													NcFRQ
363													SfFRQ
357													PaFRQ
350													GzFRQ
368													HsFRQ
345													LaFRQ
255													MgFRQ
352													BfFRQ
351													SsFRQ
345													PtFRQ
354													PnFRQ
		G G S G N G S G - - - - S G - - - - - N T S P P G G G P A P E Q R P T R P L D L D P D R V Q V P S E N M E Y I R H L G L V Majority											
		490		500		510		520		530		540	
402													NcFRQ
407													SfFRQ
396													PaFRQ
408													GzFRQ
427													HsFRQ
398													LaFRQ
298													MgFRQ
391													BfFRQ
393													SsFRQ
391													PtFRQ
398													PnFRQ
		P P E L L T G S S T - - - - D V A P D A E G W V Y L N L L C N L A Q L H I I N V T P D F I R S A V S E K S T K F Q L S P Majority											
		550		560		580		590		600			
462													NcFRQ
467													SfFRQ
456													PaFRQ
460													GzFRQ
483													HsFRQ
450													LaFRQ
358													MgFRQ
437													BfFRQ
439													SsFRQ
434													PtFRQ
412													PnFRQ
		D G R K I R W R G G T D G T K F S S D S S G D S S Q K S P P T D D T E D G S D K G G R R K K K K T G Q G D - - - - A S Majority											
		610		620		640		650		660			
521													NcFRQ
526													SfFRQ
515													PaFRQ
517													GzFRQ
543													HsFRQ
509													LaFRQ
417													MgFRQ
493													BfFRQ
495													SsFRQ
486													PtFRQ
453													PnFRQ
		S K E A S K L G - P Q R S A S S D S F H Y K P L F V H Q P S S A E T S L E E - - - - S S - G S V E E S N L G - - - N S Majority											
		670		680		690		700		710		720	
574													NcFRQ
579													SfFRQ
566													PaFRQ
577													GzFRQ
600													HsFRQ
568													LaFRQ
473													MgFRQ
551													BfFRQ
553													SsFRQ
542													PtFRQ
507													PnFRQ
		G W G F S G S G S T S S R K K R R D D G A I I Y S G A P F C T D L S G D P G D M - - - - - S P T T Y M T A T G Majority											
		730		740		750		760		770		780	
628													NcFRQ
633													SfFRQ
619													PaFRQ
631													GzFRQ
655													HsFRQ
620													LaFRQ
528													MgFRQ
599													BfFRQ
601													SsFRQ
601													PtFRQ
564													PnFRQ
		Q A Q G S S S G - - - - - A R H L L Q R - T L S G S S L P R R P L S D A S - - - S V A E V L D L D S D N - Majority											
		790		800		810		820		830		840	
679													NcFRQ
684													SfFRQ
669													PaFRQ
681													GzFRQ
705													HsFRQ
680													LaFRQ
578													MgFRQ
656													BfFRQ
659													SsFRQ
654													PtFRQ
617													PnFRQ

	- P S V L S D D D G D S E S E D E D L E F P W S D S P A S L E V Q - - - - P L E A S G L G G V L P E D H F A V V V T T R R R	Majority
	850 860 FFD 880 890 900	
726	- P E L V A D D G S S P N D E D F V F P W C E D P A K V R I Q P I A K E V M E P S G L G G V L P D D H F V M L V T T R R R	NcFRQ
731	- P D L V S D D G F S S P N D E D F V F P W C E D P A K V R I Q P I A K E V M E P S G L G G V L P D D H F A I F V V T T R R R	SfFRQ
713	- - Y L P S D E - - - E T D D D M E F F W S D S S A L V R P K - M S E T F L E P C G L G G V L P E D H F A V V V V T T R R R	PaFRQ
730	D P P S L T D D T D D A S D V D L D F T W S D K A Q Y M Q H Y - - - - P L E P C G L G G V L P E D H F M V V V V T T R R R	GzFRQ
755	I P E L V T D S G D E S S K L S M E F F W S D S E P Q I L E V R - - - - P L E P C G L G G V L P E D H F M V V V V T T R R R	HsFRQ
734	- - - - - E A I A L E D D I E M E F F W S D S S Q Q Y L E V R - - - - P L E P S G L G G V L P E D D N F M V V V T T K R R	LaFRQ
626	S D D F M A D V S - S D S E D E M E W E Y S D S E E Y G T T P T - - - - L L C L E A Y G L G G V Q P P E D H F L V E V I T H R R	MgFRQ
702	T P S V L S D D T D F E F T T D V A C G G P E P S P S L T E F - - - - - V A S G I G G V Q P P A D H L L Y K V H T R R W	BfFRQ
705	T P S V L S D D D V D F E F T T D L A C G S P G P S P S S P V D F - - - - - S A S G L G G V Q P P A D H L L F K V H T R R W	SsFRQ
692	G R T V L S N D D D L G F S P E S L K - D D S G N T S P - E L M N - - - - - F E A S G L G G V Q P P E D D N F S I H V R R S Q	PtFRQ
653	- A T V S S E E Y F G F S P A F L R N D T S G S G S P A E L M D - - - - - F E A S G L G G V R P E D D N F A I R V R S Q	PnFRQ
	V I T - - - - P V V Q R H L S G R R R S S - - - - - - - - - - - - - - - - E T T - - - D S I V E R L A I L R T S S P	Majority
	910 920 930 940 950 960	
785	V V R - - - - P I L Q R Q L S R S T T S E - - - - - - - - - - - - - - - - D T A - - - E F I A E R L A A I R T S S P NcFRQ	
790	V M R - - - - P T L Q R H L S R S T T S E - - - - - - - - - - - - - - - - D T A - - - E I I A E R L A S I R T S S P SfFRQ	
767	P I N - - - - C V V D T H L R D R S V S V - - - - - - - - - - - - - - - - D N A - - - E V I A R R L E A C M S T S S P PaFRQ	
785	S K Q D E - - - L S S I Q M A G G R - - I G - - - - - - - - - - - - - - - - E S T - - - D A V V R R L L A T M S T S S P GzFRQ	
810	S K L D A - - - R V G Q R L E G Q R K L S E - - - - - - - - - - - - - - - - E M T - - - D I V V N R L L A T M S T S S P HsFRQ	
783	P H G M E - - - P G E K T P A L G R T K S D - - - - - - - - - - - - - - - - E T T R T T D S I V N L L A S M S T S S P LaFRQ	
682	R R D R Q D K N E D E R P P F P R E R S D - - - - - - - - - - - - - - - - S T T - - - A S V M E R I K L L A S S P MgFRQ	
755	A T N K D H A V P F K V S K F S A P R P T S - K I L H T I S Q S S L D S F H D P - - - - - K P Q N K V N N I I Q K L A H L A D P V N BfFRQ	
758	T I D - D H A P V K V S K F S A P R P T S R K I V H T I P K S S L D S F H N P - - - - - P Q D K V D S I I L D K L A H L A T F S N SsFRQ	
745	V S T - - - - - A P S H I S T R R R S S - L Y P K A I Q D A L Y S PtFRQ	
707	T Q T - - - - - V P I A L T G R R R S N - V Y S K R I L R A L G K PnFRQ	
	E P - A P R S S R - M L S S S P I Q I E Y I S G R L K R L N P V S L P P P A S F Y P P F S T S S S D V D S D - - - - -	Majority
	970 980 990 PEST2 1000 1010 1020	
820	L P - P - R S H R - - L T V A P L Q V E Y V S G Q F R R L N P A P L P P P A I F Y P P F S T D S S W D D G D L L A S - D NcFRQ	
825	L P - P P R S R N - - L I L A P L Q I E Y V A G E F H R L N P A S L P P P A M F Y P P F S T D S S W D D G D L L A S - V SfFRQ	
802	L P - P R R N S R T G R T N S P I Q I E Y V E G R M L R L K P A S L P P P A M Y L P P P S N E S D T D S G S - I D M - T PaFRQ	
820	V S G A L R S L P T M G - P L P I Q I E Y M S G R I K R L T P V S L P P P A I F F P P F S P S E S T V D S D - - - - - GzFRQ	
847	R P - S V R R L S N M S D S S K I K I E Y L S G R I K R L E P V S L P P P A I F F P P F S - - A D S C S E D - - - - - HsFRQ	
823	R N - M P A G R P V L H K T G N I E I E Y L S G R I K R L N P V P L P P P A I F F P P F S - S T S S Y N S E - - - - - LaFRQ	
721	R P - - V R P V R - Q S L A R T K M I E Y K T V R L N R L D P V E L P P P A A S F V P P F S T S S S D I D - - E S - D MgFRQ	
814	E S P - - - P H R - P Y E S S P I K T E H I S E E L I L H P S P L P P P S S Y Y N M L S - - - - - G - - - - - BfFRQ	
817	E P A T P L P S Q - S H E S S P V K T E N I S E E L I V L Q P S T L P A P S S Y Y S M F S - - - - - G - - - - - SsFRQ	
772	H P E A S E T T S P R E S P Q P V F Q Q K I L S A N R K S L P S S A L P P A S F L P F D S C S S G D V D S D L A S N - A PtFRQ	
734	E S S A D T S T S P T S P Q R V I K S D I I S A S R K T L P N S E L P P A S Y L P F D S T S S G D V D S D S D S V D L PnFRQ	
	D D E S E E A D D D S S S - - - - - E G L M S R R A N P H Q S D D - - Y M D D V D L S S G D E D G D V D M	Majority
	1030 PEST2 1040 1050 1060 1070 1080	
875	D E E V E E E E D S Y S - - - - - E G Q I S R R A N P H F S D N N T Y M R K D D L A F - D T E T D V R M NcFRQ	
881	E E E V E E E E S F S - - - - - E G Q M S R R A N P H F S D N N T Y M R K E D L A F - D T E T D V R M SfFRQ	
859	S A E N D D V E Q D S T S - - - - - Q S L I S R R A N P H F S D A R - L E E D E S E S - E L E G D V N M PaFRQ	
873	D D M S D D M D T S E S L - - - - - E D L M G Q R K L Q H Q S D G - - Y P D G V D L S S G D E E G D E P D GzFRQ	
898	D F G S D D F D S S S - - - - - E E F M S R R A N P H Q S D D - - Y P D G V D L S S G D E D G E E P E HsFRQ	
875	L D L G S D A D D E S S - - - - - E E F M S R R A N P H Q S D N E - Y P D G V D I T S G D E V G E E P D LaFRQ	
775	L L E S E E Q D A E L C G P L S F I P P S I G R P S L F R L T E S N S L Y P D S - A Y P E G Q D L S Q S D E E D E A S MgFRQ	
856	T E T T G E Y S D S S S - - - - - F M G I S H L R R D E P L E K G E D - L M S D N D I Q V S S D D G G A M D I BfFRQ	
862	T E T T G E Y S D S S S - - - - - F S G I A H L R R D E P L E K G E D - L M S D N D I Q V S S D D G G A M D I SsFRQ	
831	S D A E S E P D D S S E S P - - - - - A T A M Q I L N I A P - - - - - G S E D S E S E S D Y E E D D D G S V D L PtFRQ	
794	A D E S S E A D S S E G P - - - - - A T A M Q M M N I M S T S H H D S G D S G S E A S Q Y S E D T D D G S V D L PnFRQ	
	D D A A - - - - - D D D D E S P D S G A V A R R L A - - - - - G S S A A V A G G G S G L S T S A G K L V D L L H A G	Majority
	1090 1100 1110 1120 1130 1140	
922	D S - - - - - D D N R L S - D S G H N M R A M M - - - - - P R A E A V D G D D S P L A A V T G K E V D M L H T G NcFRQ	
928	D S S - - - - - H D H R M S S D S G L M M R S V M - - - - - R R P V A V D G D G S P L A A T V T G R D V D M L H T S SfFRQ	
905	G A - - - - - D A V V G A V S D D A H R P P A - - - - - D R M E S G - - - - - T T G R V A M L L H P G PaFRQ	
944	D S P S Q N M Y A A S R D P K A L P N R P R Q A A R R T - - - - - S S A A A A A G T A R G A S K S N S A N P A L S H D A GzFRQ	
919	D D I D A - - - - - S R M V D D M S L P G L G R V P R G S Q - - - - - A S T E V P P G S S R G R S N S A S A E A V L R A G G HsFRQ	
922	D E L A P - - - - - T D D D E E M E S A G D E G G A S R G R - - - - - A A G P R S A R P S L P S G K S A G H R A V R R T Q - LaFRQ	
834	D D V G I L Q I G G T G N S K N K P G K V S V N R N R Q G L D M H L R S S G L V R R P Q T D I S N G P S K Q P D A R T G - MgFRQ	
904	E D A E E - - - - - D D D D - S V D M L A Y V R G I D - - - - - P K A V A T Q E E R Y E M E A S D K S V Q L G S A A BfFRQ	
909	E D A E E - - - - - D D D D E S I D M L A Y V R G I D - - - - - P T G V A A Q E E K Y E W E A S D K S V Q L G S A A SsFRQ	
880	L A T A R Q Q D P T A V R A S E R E Y D A A L A D R L A E E I P A G S S A A T A G G G S G F N S P A G G L L E A A A K R PtFRQ	
847	L A T A R Q Q D P N T I L N Q E R E Y D A A V A D R L A E E I V A G S S A A T A G G G S G F N T P A A G L R R E D S A R PnFRQ	
	S S V A T A G G A E S G Y S S S L E D -	Majority
	1150 1160 1170 1180	
967	S S V A T A G G A E S G Y S S S M E D V S S S	NcFRQ
975	S S V A T A G G A E S G Y S S S M E D V S S S	SfFRQ
941	S S V A T A G G D E S G Y S S S M E D D A T	PaFRQ
974	S S V A T A G A A E S G Y S S S D E S P	GzFRQ
996	S S A A T A G G V E S D F S I S S S Q G	HsFRQ
973	S L A A T A G G E E S G Y S S S A E E S	LaFRQ
893	S S V A T A G R A E S G Y N S S L E D	MgFRQ
951	S K S V L P L P L E E S D E V E L	BfFRQ
957	S K S V N P M F S S E A S E V E L	SsFRQ
940	E K R L S R E S R S S M I S A Q S R L K R A R T S D S V N N P H A Q K S P K T S R A E	PtFRQ
907	K Q R A S - - - - T S G S L S S R S K L K R S R T S D - - G R V V K S K N Q K T S D	PnFRQ

Gleiche Aminosäuren wurden grau unterlegt. Die wichtigsten Domänen des FRQ-Proteins von *N. crassa* wurden gekennzeichnet. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde auf die Kennzeichnung der *coiled coil*-Region verzichtet. Sie befindet sich in dem hochkonservierten Bereich unmittelbar neben der NLS (s. auch Abb. 1.4 A)

7. DANKSAGUNG

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Brunner bedanken, denn er brachte mir trotz vieler Sackgassen und Rückschläge sehr viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die Studium und Doktorarbeit niemals möglich geworden wären, besonders auch meiner Mutter und meinem Bruder Michael für's Korrekturlesen. Ein großer Dank geht aber auch an meine Kollegen, die nicht nur meine schlechte Laune und meine Zeiten der überstrapazierten Nerven geduldet und überstanden haben, sondern mir mit ihrem Fachwissen, ihrer konstruktiven Kritik und ihren vielen Ideen immer wieder den nötigen Schwung gegeben haben.

Ganz besonders sind hier zu nennen Martina Franke-Schaub, die im bürokratischen Wahnsinn nie den Überblick verlor, Dr. Axel Diernfellner und seine tatkräftige Unterstützung, Dr. Tobias Schafmeier, der sich mit unendlicher Geduld Löcher in den Bauch fragen ließ, Johanna Scholz, der ich danke für Hilfe, Motivation und tapferes Mitleiden am Mensa-Essen und Sabine Schultz, die am Mittwoch Abend (fast) immer das gleiche vorhatte wie ich. Mein Dank gilt auch dem Rest der Arbeitsgruppe Brunner und einigen sehr netten Kollegen, die uns schon verlassen haben: Ulrike Bätz, Stilianos Ciprianidis, Orfeas Dintsis, Felix Heise, Linda Lauinger, Erik Malzahn, Christian Maurer, Andrea Neiss, Thomas Pils, Cigdem und Gencer Sancar, Claudia Seelenmeyer, Julia Stefanski und Ozgur Tataroglu.

Zum Schluss gilt es noch, einem Menschen zu danken, der auch bei den härtesten Rückschlägen der vergangenen sechs Jahre immer für mich da war und an mich glaubte, wenn ich selbst das nicht mehr tat: meinem Ehemann Lutz.

8. ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Die Dissertation wurde in dieser oder ähnlicher Form noch keiner anderen Fakultät oder sonstiger Prüfungsbehörde vorgelegt.

Heidelberg, den

Christina Querfurth