

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von

Diplombiochemikerin Andrea Haase
aus: Halle / Saale

Tag der mündlichen Prüfung:

"Biochemische Analyse und Charakterisierung der White Collar Proteinkomplexe: Aufklärung des molekularen Mechanismus des negativen Feedbacks von FRQ auf den WCC in der circadianen Uhr von *Neurospora crassa*"

Gutachter: Prof. Dr. Michael Brunner

Prof. Dr. Felix Wieland

**Für meine lieben Eltern, meinen Bruder
und seine Freundin Claudia**

**In der höchsten Stellung gibt es das geringste Maß an
Handlungsfreiheit.**

(Gaius Verlerius Catull, 84- 54 v. Chr., röm. Dichter)

0) Danksagung

Zuerst möchte ich in der vorliegenden Arbeit denen danken, die mich auf meinem bisherigen Weg begleitet haben. Vor allen Dingen danke ich meinen Eltern Frau Brigitte Haase, geb. Lenzer und Herrn Franz Albert Richard Haase aus Domnitz sowie meinem Bruder, Herrn Mathias Haase und seiner Freundin Frau Claudia Schulz aus Köln.

An dieser Stelle auch ein Dankeschön an all meine Lehrer, Dozenten, Trainer sowie Kollegen und Freunde. Hier möchte ich namentlich nennen: Herrn Schwabe, Herrn Kammel, Frau Bertram, sowie Herrn Prof. Dr. Mecke, Herrn Prof. Dr. Bohley, Herrn Prof. Dr. Bonnhoefer, Herrn Prof. Huber, Herrn Prof. Oesterhelt, Herrn Prof. Frommherz und Herrn Prof. W. Neupert. Ein weiterer Dank geht an all meine lieben Kollegen wie Herrn Felix Heise, Herrn Dr. Christoph Kluck, Frau Dr. Kriztina Kaldi, Frau Dr. Valerie Panneels, Frau Astrid Hendricks, Herrn Dr. Stephan Sigrist und seine Frau für ihre Gastfreundschaft, Herrn Dr. Dierk Reiff ebenso wie Frau Dr. Sunanda Marella Surendrenat, meinen Mitarbeitern Frau Johanna Scholz für ihren unermüdlichen Einsatz sowie Herrn Marc Aurel Fuchs. Ganz besonders möchte ich danken Frau Dr. Dorothea Kessler und Herrn Prof. Heiner Schirmer für ihre unermüdliche Diskussion und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Schließlich danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. M. Brunner. Besonders danke ich ihm für seine junge, unkomplizierte, dynamische Art und die vielfältigen Möglichkeiten zu Diskussionen.

1) Inhaltsverzeichnis

0) Danksagung	4
1) Inhaltsverzeichnis	5
2) Zusammenfassung	8
2) Abstract	9
3) Einleitung	10
3.1) Die circadiane Uhr und der Mensch: Bedeutung im Alltag	10
3.2) Die circadiane Uhr und der Mensch: Bedeutung im medizinischen Kontext	10
3.3) Die circadiane Uhr in der Biologie allgemein	11
3.4) Die circadiane Uhr im Tierreich	12
3.4.1) <i>Drosophila melanogaster</i>	12
3.4.2) <i>Mus musculus</i>	13
3.5) <i>Neurospora crassa</i> als Modell für die innere Uhr	14
3.6) FRQ - Das zentrale Uhrenprotein von <i>Neurospora crassa</i>	15
3.7) WC-1/ WC-2 – Transkriptionsfaktorenkomplex	15
3.8) Der Transkriptions- / Translations basierende zentrale Feedbackloop	16
3.9) Interlocked und Interconnected Feedbackloops	17
3.10) VVD und andere Proteine in zusätzlichen Loops	17
3.11) Die temperaturabhängige Steuerung: long und short FRQ	17
3.12) Licht als Zeitgeber der inneren Uhr	18
4) Material und Methoden	19
4.1) Verwendete Stämme von <i>E. coli</i>	19
4.2) Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	19
4.3) Verwendete Stämme von <i>Neurospora crassa</i>	19
4.4) Physiologische Methoden	19
4.4.1) Anzucht von <i>E. coli</i>	19
4.4.2) Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	20
4.4.2.1) Medium	20
4.4.2.2) Hefe Transformation (Lithiumacetat Methode)	21
4.4.2.3) Rödel Hefe Extrakt (denaturierend)	22
4.4.3) Anzucht von <i>Neurospora crassa</i>	22
4.4.3.1) Medien for <i>Neurospora crassa</i>	22
4.4.3.2) Suspension von Konidien	28
4.4.3.3) Inoculieren von Flüssigkulturen	29
4.4.3.4) Mikrokonidien	29
4.4.3.5) 35S- Labelling von <i>Neurospora</i>	30
4.4.3.6) Carotenoidanalyse	31
4.4.3.7) Circadianes Zeitexperiment (Circadian Time Course CTC)	31
4.4.3.8) Kreuzung von <i>Neurospora crassa</i>	32
4.4.3.9) Behandlung mit Cycloheximid	33
4.4.3.10) <i>Neurospora</i> Transformation (Sphaeroblasten Protokoll)	34
4.5) Molekularbiologische Methoden	36
4.5.1) Genomische DNA	36
4.5.2) RNA Isolation	37
4.5.3) PCR	38

4.5.4) PCR aus <i>Neurospora</i> Konidien	40
4.5.5) <i>In vitro</i> Transkription und Translation	41
4.5.6) TNT Transkription & Translation	41
4.5.7) RNA Gel	42
4.5.8) Northern Blot.....	43
4.6) Zellbiologische Methoden	44
4.6.1) Immunfluoreszenz für slime-Mutante (<i>Neurospora crassa</i>)	44
4.6.2) Fraktionierung von <i>Neurospora crassa</i>	44
4.6.3) Kernextrakte.....	46
4.7) Proteinbiochemische Methoden.....	47
4.7.1) Verwendete Antikörper.....	47
4.7.2) Herstellung der Antikörper	47
4.7.2.1) Herstellung des Antigens: Reinigung von Inclusion bodies	47
4.7.2.2) Injektion der Hasen.....	49
4.7.3) Peptidkopplung via Maleimide aktiviertem Carrier Protein	49
4.7.4) Peptidkopplung via Bisdiazobenzidine.....	50
4.7.5) Affinitycolumn (Biogel/ BioRad).....	50
4.7.6) Affinitätsaufreinigung der Antikörper.....	51
4.7.7) PD 10 Säule zum Pufferwechsel	52
4.7.8) Immunopräzipitation.....	52
4.7.9) Totale Proteinextrakte von <i>Neurospora crassa</i>	52
4.7.10) Bradford: Proteinkonzentration	53
4.7.11) Blue Native.....	54
4.7.12) SDS-PAGE.....	55
4.7.13) Coomassie Färbung	56
4.7.14) Silberfärbung.....	56
4.7.15) Semi Dry Western Blot.....	57
4.7.16) Dekorieren der Blots.....	58
4.7.17) Gelfiltration: Superose 6.....	59
4.7.18) Aufreinigung von GST Fusionsproteinen.....	60
5) Ergebnisse.....	62
5.1) Molekulare Analyse von WC-2, WC-1 und FRQ	62
5.1.1) Subzelluläre Lokalisierung der Uhrenproteine	62
5.1.2) Quantifizierung der Uhrenproteine.....	64
5.1.3) Die Komplexe	66
5.1.4) Die Komplexe im Cytosol und im Kern	67
5.1.5) Die Stöchiometrie des WCC	68
5.1.6) Die Phosphorylierung von WC-2: Im Cytosol und im Kern	69
5.1.8) Die Phosphorylierung von WC-2: Abhängigkeit von WC-1	70
5.1.9) Die Phosphorylierung von WC-2: Abhängigkeit von Licht	70
5.1.10) Die Phosphorylierung von WC-2: Abhängigkeit von FRQ.....	71
5.1.11) Die FRQ abhängige Phosphorylierung erfolgt nur im WCC.....	72
5.2) Funktionen der Phosphorylierung.....	73
5.2.1) Kinetiken.....	74
5.2.2) Induktion von FRQ in <i>frq⁹</i>	75
5.2.4) Bindung des WCC an den <i>frq</i> Promotor.....	77
5.3) Die Phosphorylierungsstellen	78

5.4)Aufreinigung von WC-2 über ein TAP Tag	83
5.5) Ausblick	83
6) Diskussion	85
7) Literaturverzeichnis	89
8) Abkürzungsverzeichnis	98

2) Zusammenfassung

Fast alle Lebewesen haben ihren eigenen Lebensrhythmus an den täglichen Tag- Nacht-Rhythmus angepasst. Der Rhythmus wird gesteuert von der sogenannten inneren Uhr. Das sind molekulare Oszillatoren mit einer endogenen Periode von circa einem Tag. Daher der Name circadiane Uhr (lateinisch: „circa“ bedeutet ungefähr und „dies“ bedeutet Tag).

Für das Verständnis der inneren Uhr ist es essentiell, die Interaktion der verschiedenen bekannten Uhrenproteine auf molekularem Niveau zu analysieren. Der Schleimpilz *Neurospora crassa* besitzt mindestens 3 Proteine, die für das Funktionieren der inneren Uhr notwendig sind.

Das zentrale Uhrenglied von *Neurospora crassa* heißt frequency (*frq*) und wird rhythmisch synthetisiert. Diese Rhythmik lässt sich sowohl auf RNA Ebene wie auch auf Proteinebene erkennen, wobei Protein-Peak und RNA-Peak jeweils 4-6 h phasenversetzt zu detektieren sind. Von grundlegender Bedeutung für das Funktionieren der inneren Uhr ist eine negative Rückkopplungsschleife, die durch das Uhrenprotein FRQ ausgeführt wird. Die Expression von FRQ führt zunächst zu einer Assemblierung von FRQ in einem hochmolekularen Komplex unbekannter Stöchiometrie und Zusammensetzung, der dann phosphoryliert und auf einem bisher nicht genauer untersuchten Weg in den Kern transportiert wird. Dort bewirkt der FRQ- Komplex eine Abschaltung seiner eigenen Biosynthese (transkriptionelle Regulation) wie auch das Abschalten verschiedener "Output"- Gene (ebenfalls auf transkriptioneller Ebene). Der genaue Mechanismus dieser Abschaltung ist unbekannt. Dieser ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und läuft wahrscheinlich zum großen Teil durch eine von FRQ induzierte Phosphorylierung des White Collar Proteinkomplexes (WCC). Dabei kommt es zu einer direkten Interaktion von FRQ mit dem WCC, der von den beiden anderen essentiellen Uhrenproteinen White- Collar 1 und White- Collar 2 gebildet wird. Bei diesen beiden Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die über eine PAS- Domäne miteinander interagieren können und über einen GATA-Typ Zn-Finger die Transkription sowohl von *frq* als auch von anderen für das Output wichtigen Genen aktivieren.

Ich habe mich mit der molekularen Analyse der verschiedenen Komplexe beschäftigt, d.h. mit der Anzahl, dem stöchiometrischen Aufbau und der Regulierung. Die zentralen Fragen sind, wie viele verschiedene Komplexe existieren und wie ihre genaue Stöchiometrie ist, wo diese Komplexe zu welchem circadianen Zeitpunkt lokalisiert sind und was ihre genaue Funktion in dem jeweiligen Kompartiment ist. Außerdem stellt sich die Frage, ob diese Funktion durch weitere Ereignisse wie z.B. Phosphorylierung weiter reguliert wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es mir, die Natur des negativen Feedback des FRQ Proteins auf den WCC auf eine FRQ abhängige Phosphorylierung des WCC zurückzuführen. Ich habe die Natur dieser Phosphorylierung eingehend untersucht und charakterisiert. Gleichzeitig habe ich die Phosphorylierungsstellen eingegrenzt und entsprechende Punktmutanten hergestellt und ebenfalls untersucht. Darüber hinaus gelang es mir WC-2 als TAP-Tag zu klonieren und nativ aus *Neurospora* aufzureinigen. Außerdem habe ich versucht, über verschiedene Ansätze neue, potentielle Interaktionspartner und deren Funktion zu identifizieren.

2) Abstract

Nearly all organisms have adapted their own life rhythm to the daily day- night- rhythm. The rhythm is regulated by the so called inner clock. These are molecular oscillators with an endogenous period of approximately one day. Therefore they are called circadian clocks (latin "circa" meaning approximately and "dies" meaning a day).

For the understanding of the endogenous clock it is essential to study the interaction of the different known clock proteins on a molecular level. The fungus *Neurospora crassa* has at least 3 proteins which are essential for the endogenous clock.

The central clock gene is called frequency (*frq*) and is synthesized rhythmically. The rhythm is detectable on RNA and on protein level, with RNA and protein peak being separated by a 4- 6 h phase delay. Of fundamental meaning for the circadian clock is the negative feedback of FRQ. After the expression of FRQ, FRQ is assembled into a high molecular weight complex of unknown stoichiometry, which is then phosphorylated and transported into the nucleus. There FRQ shuts off its own synthesis (transcriptional regulation) and shuts off the synthesis of the output genes (also transcriptional regulation). The exact mechanism of the shut off is not known. This was the subject of the following thesis. It probably is a FRQ induced phosphorylation of the White Collar protein complex (WCC). Thereby FRQ directly interacts with the WCC, which is composed of the other two essential clock proteins White Collar 1 and White Collar 2. These are transcription factors that interact via a PAS domain and regulate the expression of frequency and of output genes via a GATA typ Zn finger.

I have worked on the molecular analysis of the different complexes meaning the number, the stoichiometric structure and the regulation of the different complexes. The central questions are how many different complexes exist, what is the exact stoichiometry of them, where are they located at the different circadian timepoints and what is the exact function of them in the specific compartement. Besides this there is the question whether their function is regulated in addition by for instance a phosphorylation.

In this work I have revealed the nature of the negative feedback of FRQ. It is a FRQ dependent phosphorylation of the WCC. I have studied the nature of this phosphorylation in detail and I have determined the putative phosphorylation sites and generated point mutants. I have cloned a TAP tagged version of WC-2 and purified WC-2 via the TAP tag out of *Neurospora*. Besides this I have searched with various methods for new putative interaction partners of WC-2.

3) Einleitung

3.1) Die circadiane Uhr und der Mensch: Bedeutung im Alltag

Der tägliche Tag- Nacht- Zyklus hat Auswirkungen auf fast alle Lebewesen. Diese haben sich an den 24- Stunden- Rhythmus, der sich täglich wiederholt, angepasst. So auch der Mensch. Beim Menschen schwanken z.B. die Körpertemperatur, viele Hormone, die Schmerzempfindlichkeit und die Bewegung circadian. Jedem von uns ist klar was passiert, wenn sich plötzlich die äußeren Bedingungen verändern, wie es z.B. bei einem Jet Lag der Fall ist. Viele der inneren Prozesse des Menschen sind dann nicht mehr in Phase mit der Umwelt. Der Mensch braucht einige Tage, um sich den neuen Gegebenheiten anzupassen.

Warum ist dies so? Der Mensch reagiert nicht nur auf seine Umwelt sondern er besitzt eine autonom laufende innere Uhr. Diese nimmt die täglichen Schwankungen vorweg, so dass der Mensch bereits an Veränderungen angepasst ist, bevor diese dann eintreten. Beobachten kann man dies beispielsweise beim Essen. Die Verdauungssäfte werden nicht erst produziert nachdem die Nahrung bereits gegessen ist. Der Körper bereitet sich im Vorfeld immer um die gleiche Zeit, gesteuert von der inneren Uhr, auf die Nahrungsaufnahme vor. Als Resultat stellt sich dann ein Hungergefühl ein.

Ein weiteres Beispiel ist der tägliche Schlaf- Wachrhythmus. So wachen wir morgens auch ohne ein äußeres Zutun immer ungefähr um die gleiche Uhrzeit auf, wobei es natürlich Früh- und Spätaufsteher gibt. Auch das ist genetisch verankert und Teil unserer inneren Uhr genauso wie das abendliche Müdewerden.

Es gibt also im täglichen Leben sehr viele Prozesse, die von der inneren Uhr gesteuert werden, ohne dass uns dies im Einzelnen immer bewusst ist.

3.2) Die circadiane Uhr und der Mensch: Bedeutung im medizinischen Kontext

Die medizinische Relevanz der inneren Uhr ist nicht ohne weiteres ersichtlich. Doch es gibt viele medizinische Bereiche, wo die Grundlagenforschung zur inneren Uhr verwendet wird. So z.B. in der Chemotherapie. Es ist nicht egal, wann die Medikamente gegeben werden, da der Körper zu verschiedenen Zeiten verschieden reagiert. So kann man bei Gabe der Chemotherapeutika zu bestimmten Zeiten die Dosis recht niedrig halten und so die Nebenwirkungen minimieren ohne dass die Wirkung nachlässt, während zu anderen Zeiten viel mehr von dem Medikament eingesetzt werden müsste. Das ist eine Frage der Lebensqualität der Patienten und auch natürlich der Kosten.

Ebenso wurde gezeigt, dass die Anfälligkeit für bestimmte Krebsarten mit der inneren Uhr zusammenhängt. Auch hier wäre eine weitere Erforschung sinnvoll.

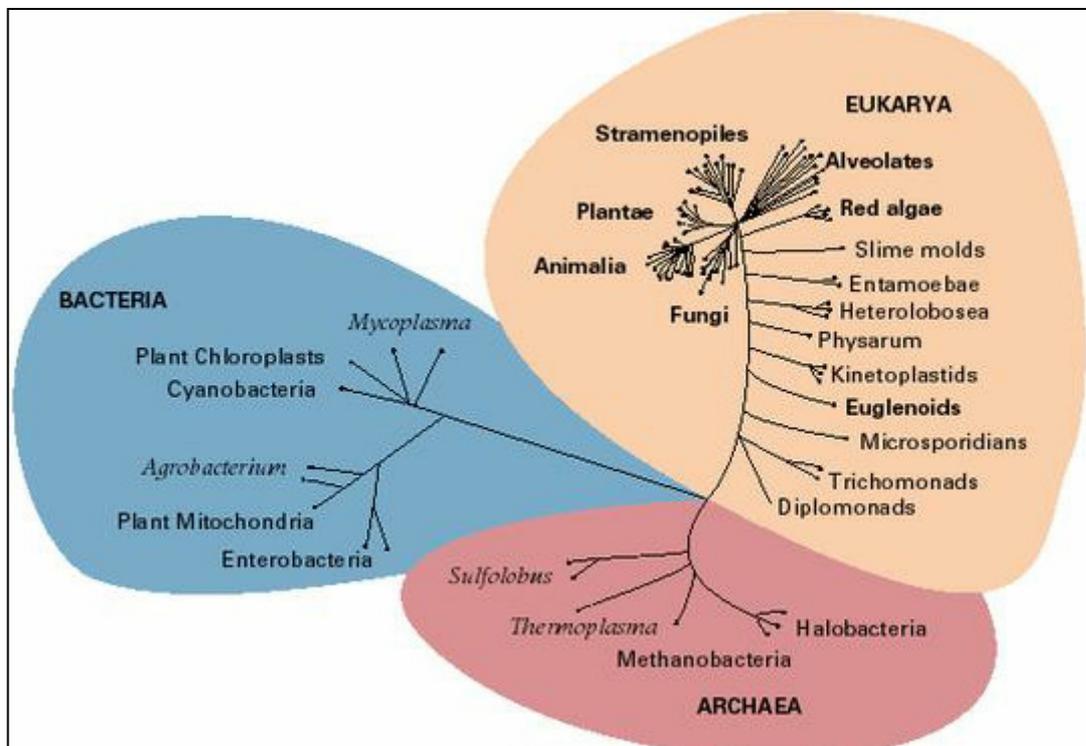
Auch bei der Verbesserung der Arbeitssicherheit bei Schichtarbeitern flossen Erkenntnisse der Grundlagenforschung ein. Gerade in der Nachtzeit traten gehäuft Unfälle auf. Der Mensch ist dann auf Grund seiner inneren Uhr auf Schlafen programmiert. Er soll jedoch arbeiten. Licht hingegen ist der wichtigste Zeitgeber der inneren Uhr und dient dazu, sie jeden Morgen neu einzustellen. Demzufolge wurden einfach die Beleuchtungsverhältnisse an den

Arbeitsplätzen verbessert, so dass die Arbeiter mehr Licht hatten. Das stellte die innere Uhr von Nacht auf Morgen um und es traten weitaus weniger Unfälle auf.

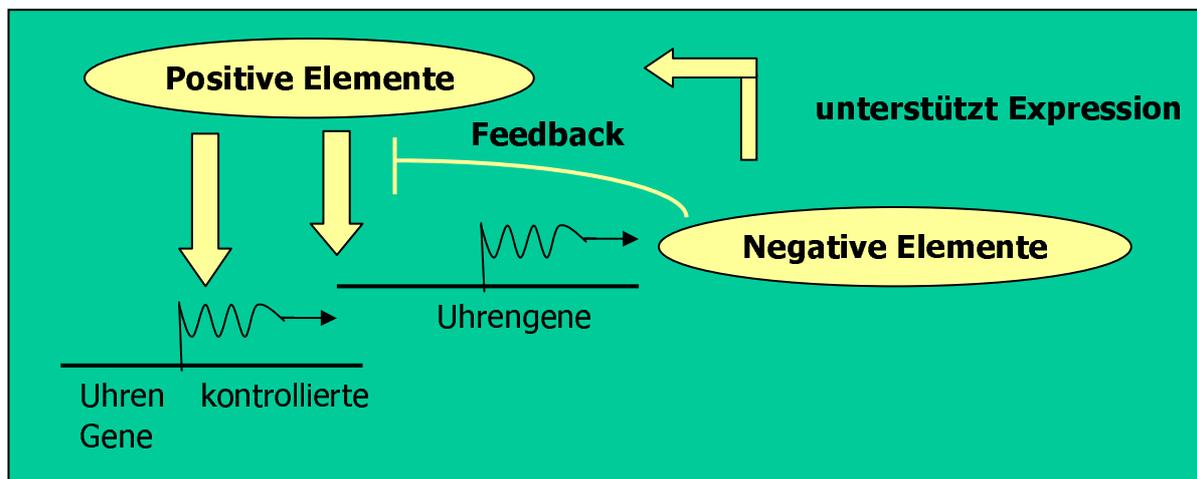
3.3) Die circadiane Uhr in der Biologie allgemein

Im Tier- und Pflanzenreich (siehe folgende Abbildung) sind innere Uhren recht weit verbreitet. Unter den höheren Eukaryoten sind sie sogar fast ubiquitär vorhanden. Sogar im Bakterienreich, bei den Cyanobakterien gibt es innere Uhren. Lediglich im Reich der Archae sind bisher keine inneren Uhren nachgewiesen (Dunlap, 1999, Dunlap et al. 1999).

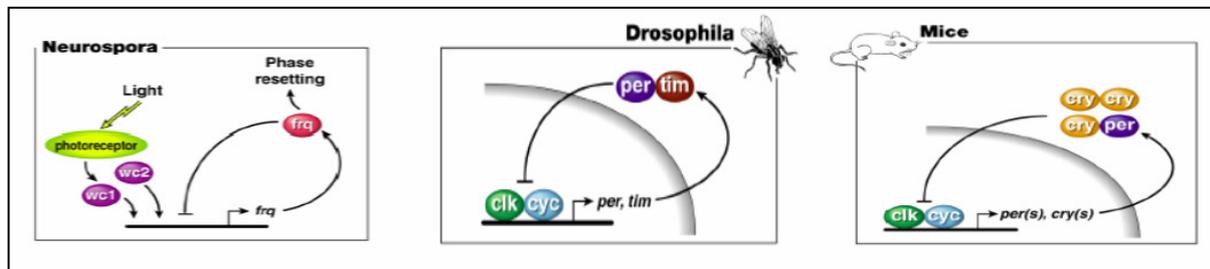
Die ersten Studien der inneren Uhr wurden im Jahr 1789 von einem Franzosen vorgenommen. Er untersuchte die Blätter von *Mimosa pudica*, die sich abends immer einfallen. Das Öffnen und Schließen der Blätter lässt sich auch in einer konstant dunklen Umgebung beobachten. Daher schloß DeMairan, dass es sich hierbei um einen inneren autonomen Mechanismus der Pflanze handelt. Eben dieser Mechanismus ist heute als die innere Uhr bekannt.



In der folgenden Abb. sei nun das Grundprinzip einer inneren Uhr skizziert (Dunlap, 1999):



Es existieren positive Elemente, die die Transkription der Uhrgene und der uhrenkontrollierten Gene regulieren. Die Uhrgene führen zur Bildung von negativen Elementen. Diese wirken in einem Feedback auf die positiven Elemente zurück und schalten diese ab (Dunlap et al. 1999). Nachfolgend sind schematisch die positiven und negativen Elemente für die drei Modellorganismen: *Neurospora*, *Drosophila* und Maus dargestellt (Devlin & Kay, 2001).



Für *Neurospora* sind dies als positive Elemente WC-1 und WC-2 und als negative Elemente IFRQ und sFRQ. Für *Drosophila* heißen die positiven Elemente CLOCK (CLK) und CYCLE (CYC) und die negativen Elemente PER und TIM. Im Säuger sind die positiven Elemente CLOCK und BMAL1 und die negativen heißen PER (wobei es mehrere PER's gibt) und CRY (Devlin & Kay, 2001, Dunlap 1998, Dunlap 1999).

Das Grundprinzip der inneren Uhr ist immer gleich. Allerdings gibt es auch Unterschiede. So ist z.B. *Drosophila* eine Nachtuhr, d.h. die negativen Elemente werden in der Nacht gebildet. Säuger und *Neurospora* sind hingegen Taguhren, d.h. die negativen Elemente werden tagsüber gebildet.

Es gibt noch mehr Unterschiede. Alle inneren Uhren laufen zellautonom. Doch bei höheren Säugern gibt es mehrere Uhren, die von einer Masterclock gesteuert werden. Die Masterclock sitzt im Gehirn, im Suprachiasmatischen Nucleus (SCN). Sie ist allen anderen Uhren (in der Leber, im Testis etc.) übergeordnet und steuert diese.

3.4) Die circadiane Uhr im Tierreich

3.4.1) *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila* gibt es hauptsächlich zwei Dinge, die von der inneren Uhr gesteuert werden. Das eine ist das Schlüpfen der erwachsenen Fliegen aus dem Verpuppungskokon und das andere ist die Schlaf-Wachaktivität. Das Schlüpfen erfolgt immer ungefähr zur Morgendämmerung. Dabei können die erwachsenen Fliegen mehrere Stunden in ihrem Kokon ausharren, um auf die nächste Dämmerung zu warten (Williams & Sehgal 2001). Die Aktivität ist normalerweise bimodal. Unter frei laufenden Bedingungen, d.h. in konstanter Dunkelheit, verschwindet die Bimodalität und die Aktivität tritt während des gesamten subjektiven Tages auf (Williams & Sehgal 2001).

Die positiven Elemente der *Drosophila* Uhr sind CLOCK und CYCLE. CLOCK wird rhythmisch exprimiert, während CYCLE konstitutiv exprimiert wird. CLOCK und CYCLE bilden über ihre PAS-Domänen ein Heterodimer und sorgen für die Expression der uhrenkontrollierten Gene und von Per und Tim. Per und Tim bilden die negativen Elemente der *Drosophila* Uhr (Panda et al. 2002).

Die Transkription von Per und Tim erfolgt am frühen Tag. Da Tim lichtabhängig abgebaut wird, akkumulieren Tim und Per erst bei Einbruch der Dämmerung. Beide Proteine heterodimerisieren und gelangen in den Kern. Dort interagieren sie mit CLOCK und CYCLE, so dass ihre Transkription abgeschaltet wird. Der Abbau beider Proteine, von Tim spät in der Nacht und von Per in den Morgenstunden, erlaubt der Per und Tim RNA wieder zu steigen. Eine zyklische Phosphorylierung von Per und Tim ist an der Regulation des Abbaus beteiligt. Dabei wird Per von der Kinase Doubletime (DBT) phosphoryliert. Die Phosphorylierung macht Per in Abwesenheit von Tim instabil. Zusätzlich besitzen beide Proteine, Per und Tim, eine cytoplasmatische Lokalisierungsdomäne, die die Proteine im Cytoplasma hält bis sie heterodimerisieren. Erst dann können sie in den Kern gelangen (Young 1998, Williams & Sehgal 2001).

Die zentrale Uhr selbst befindet sich über mehrere Hirnareale verteilt, wobei die Uhr in jeder Zelle autonom läuft. Der Sitz der inneren Uhr in Drosophila sind hauptsächlich die lateralen Neurone im Zentralhirn. Per und Tim werden in den lateralen Neuronen im Zentralhirn, in den Gliazellen im optischen Lobus sowie in den Photorezeptorzellen der Kompaktaugen exprimiert. Per und Tim werden auch noch in verschiedenen Regionen des Körpers exprimiert. Per z.B. in den Antennen, in den Malphigischen Tubuszellen, in den Ovarien, im Testis und im Verdauungstrakt (Young 1998, Williams & Sehgal 2001).

Der Lichtinput erfolgt über dCRY, welches im Auge von Drosophila exprimiert ist. Licht wirkt indem es die Level an Tim reduziert (Cashmore 2003). Tim wird durch Lichtinput instabil. Tim wird dabei durch Lichtinput phosphoryliert, ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut (Young 1998, Williams & Sehgal 2001).

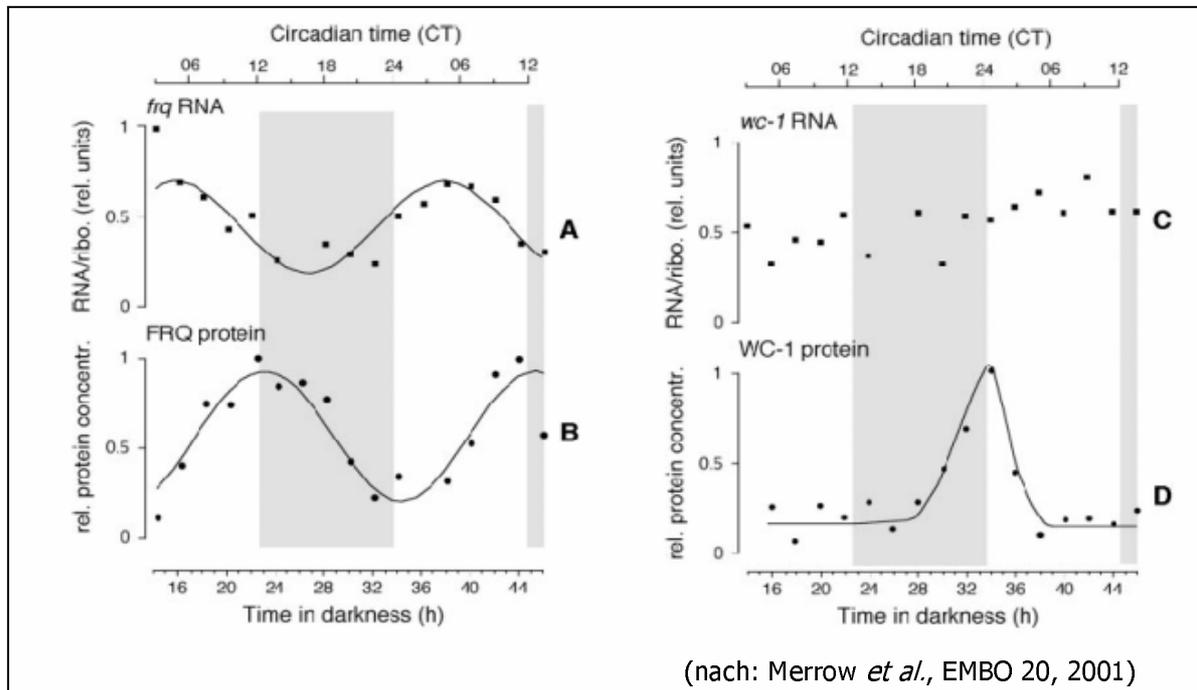
3.4.2) Mus musculus

Das zentrale Kernstück der inneren Uhr bei Säugern ist der Suprachiasmatische Nucleus (SCN), ein paariges Organ im Hypothalamus. Dort ist der Sitz der sogenannten Masterclock, die alle weiteren Uhren steuert.

Die positiven Elemente der circadianen Uhr heißen BMAL1 und CLOCK. BMAL1 ist das Ortholog von CYCLE bei Drosophila. Die mRNA von BMAL1 wird rhythmisch exprimiert. CLOCK hingegen wird konstitutiv exprimiert. CLOCK und BMAL1 bilden ein Heterodimer über ihre PAS Domänen und sind verantwortlich für die Expression der uhrengesteuerten Gene und von den PER's und CRY's. Dabei gibt es 3 Per Gene und 2 Cry Gene. PER und CRY bilden die negativen Elemente der inneren Uhr und sind auf RNA und Proteinebene rhythmisch. Somit bilden CLOCK, BMAL1, PER's und CRY's den „Core Oszillator“ von Säugern (Reppert & Weaver 2001).

Zu Beginn eines circadianen Tages wird durch akkumulierendes CLOCK:BMAL1 Heterodimer mPer und mCry mRNA gebildet. Dabei sind die Peaks der mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten erreicht. Die mPer1 mRNA hat ein Maximum am frühen Morgen, während mPer2 am späten Morgen ein Maximum erreicht und mPer3 am frühen Morgen und mCRY1 fast in der Mitte des circadianen Tages ihr Maximum erreichen. In der Mitte des circadianen Tages (bei CT12) sind die mPER's und mCRY's gemeinsam exprimiert und bilden ein Heterodimer und wandern in den Kern. Dort interagieren die mCRY's mit dem CLOCK:BMAL1 Heterodimer und schalten diesen ab. Gleichzeitig aktiviert mPer2 die Expression von BMAL1. Schließlich werden die Per's und Cry's abgebaut und ein neuer Zyklus kann starten (Reppert & Weaver 2001, Harmer et al. 2001).

3.5) *Neurospora crassa* als Modell für die innere Uhr



Neurospora crassa ist seit langem ein etabliertes Modellsystem nicht nur zur Analyse der inneren Uhr. FRQ ist das zentrale Uhrenglied (Aronson *et al.* 1994 a und b). Es assembliert in mehrere hochmolekulare Komplexe und interagiert im Kern negativ mit dem White Collar Komplex WCC, um diesen abzuschalten (Ballario *et al.* 1996, Ballario *et al.* 1998, Crosthwaite *et al.* 1997). Der WCC bindet an zwei LRE (light responsive elements) im *frq* Promotor und reguliert die Synthese von *frq* RNA's (Froehlich *et al.* 2002, Froehlich *et al.* 2003). Vom FRQ Protein existieren 2 Varianten: long FRQ (lFRQ) und short FRQ (sFRQ) (Garceau *et al.* 1997). Diese sind wichtig bei der Temperaturkompensation der inneren Uhr (siehe Kapitel 3.11) (Liu *et al.* 1997, Liu *et al.* 1998).

Wie in der obigen Abbildung zu erkennen ist, werden *frq* RNA und FRQ Protein rhythmisch exprimiert. Hingegen ist bei WC-1 die RNA konstant und nur das Protein rhythmisch, jedoch phasenversetzt zu FRQ. Im Gegensatz dazu ist WC-2 als RNA und als Protein konstant exprimiert (siehe Abb. oben nach Merrow *et al.* 2001).

Das Interessante am FRQ Protein ist die Tatsache, dass es gleichzeitig zwei vollkommen konträre Funktionen erfüllt. Zum einen hat es eine negative Rolle. Es inhibiert den WCC und schaltet diesen ab. Zum anderen wirkt es, indem es die Expression von WC-1 unterstützt und so die Funktion des WCC positiv reguliert. Diese zwei konträren Rückkopplungsschleifen greifen ineinander (Cheng *et al.* 2001 b, Lee *et al.* 2000).

3.6) FRQ - Das zentrale Uhrenprotein von *Neurospora crassa*

FRQ ist ein Protein von ca. 120 kDa. Es besitzt keine nennenswerten Proteindomänen außer den coiled coil Regionen.

Es gibt langes und kurzes FRQ, die sich in einem verkürzten N-Terminus unterscheiden. Beide werden von dem selben Gen kodiert (Garceau et al 1997). Im upstream Bereich der *frq* RNA, die einen außergewöhnlich langen 5'-UTR besitzt, finden sich noch sogenannte μ ORF's mit unbekannter Funktion. Darüber hinaus wird vom *frq* Gen noch eine antisense RNA abgelesen, die ebenfalls im circadianen System von *Neurospora* eine Rolle spielt (Kramer et al. 2003).

Die Expression von FRQ ist abhängig vom WCC (Collet et al. 2002). FRQ assembliert schnell in einem großen Komplex unbekannter Stöchiometrie (Cheng et al. 2001 a).

FRQ wird im Verlauf eines Tages extensiv phosphoryliert und danach abgebaut (Yang et al 2002, Yang et al. 2003, Liu et al. 2000). Besonders erwähnenswert in diesem Zusammenhang sind 2 Regionen in dem Protein, die als PEST- Sequenzen bezeichnet werden. PEST-Sequenzen sind Pro, Glu, Ser, Thr reiche Sequenzen, die phosphoryliert werden können und oft für die Regulation der Proteininstabilität verantwortlich sind. Im Fall von FRQ ist dies nur zum Teil richtig. Für PEST1 ist diese Aussage korrekt (Goerl et al 2003). Für PEST2 ist die Phosphorylierung eine Regulation der Funktion. PEST2 wird erst spät im circadianen Tag phosphoryliert und das Protein schaltet dann einen interlocked Feedbackloop ein. Nach der Phosphorylierung von PEST2 kann es die Synthese von WC-1 positiv regulieren (Schafmeier et al. unveröffentlicht).

Der Abbauweg von FRQ ist nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, dass FRQ ubiquitinyliert wird und dann vermutlich über das Proteasom abgebaut wird (He et al. 2003). Es sind bisher mindestens 3 Kinasen identifiziert, die FRQ regulieren.

3.7) WC-1/ WC-2 – Transkriptionsfaktorenkomplex

WC-1 ist ein Protein von ungefähr 150 kDa (Ballario et al. 1996). Es besitzt am N-Terminus eine putative Transaktivierungsdomäne, die noch nicht näher charakterisiert wurde. Außerdem besitzt es einen Zn- Finger, der der DNA- Bindung dient. Vor dem Zn- Finger befinden sich zwei PAS Domänen und eine LOV Domäne. Die PAS Domänen sind Protein-Protein Interaktionsdomänen. Der Name leitet sich ab von den Proteinen PER, ARNT und SIM, bei denen eine solche Domäne und deren Funktion erstmals charakterisiert wurde. Die LOV Domäne bindet FAD und dient der Lichtperzeption. WC-1 ist der zentrale Blaulichtrezeptor von *Neurospora crassa* (Cheng et al. 2003, He et al. 2002, Lee et al. 2003). Es existiert noch ein weiterer bisher unbekannter Blaulichtrezeptor.

Über ein Stück der zweiten PAS Domäne interagiert WC-1 mit WC-2 (Cheng et al 2002). WC-2 ist ein ca. 60 kDa großes Uhrenprotein (Linden et al. 1997). Es besitzt am N-Terminus ebenfalls eine noch nicht näher charakterisierte Transaktivierungsdomäne. Darüber hinaus besitzt es eine PAS Domäne zur Interaktion mit WC-1 und einen Zn- Finger zur DNA Bindung.

WC-1 ist sehr instabil und kann in Abwesenheit von WC-2 nicht nachgewiesen werden.

WC-1 existiert demnach ausschließlich im Komplex mit WC-2. WC-2 ist im molaren Überschuss vorhanden und dient damit als Plattform zur Interaktion mit verschiedenen Proteinen (Denault et al. 2001, Collet et al. 2001). Es existiert nur ein WCC Komplex

definierter Stöchiometrie. WC-2 existiert noch in zwei weiteren Proteinkomplexen. Der WCC existiert nur im Kern. Der WCC bindet an zwei LRE (light responsive elements) im *frq* Promotor und kontrolliert dessen Transkription. Außerdem kontrolliert er die Synthese von anderen RNA's (Bell-Pedersen et al. 2001, Bell-Pedersen et al 1996 a und b). Teilweise handelt es sich dabei um uhrenkontrollierte Gene und teilweise um lichtgesteuerte Gene.

Die Regulation des WCC erfolgt direkt über Licht, welches über FAD in der LOV Domäne von WC-1 perzipiert wird (Cheng et al 2003, He et al. 2002). Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung in der LOV Domäne. Ein hochkonserviertes Cys bildet ein kovalentes Photoaddukt mit FAD und konserviert so die Konformationsveränderung des Komplexes. Es werden mit drei verschiedenen Kinetiken die lichtgesteuerten Gene exprimiert. Die schnellsten exprimieren schon wenige Minuten nach dem Lichtpuls. Das Maximum der Transkription liegt bei 15 min. Nach 2 h ist wieder der Ausgangswert erreicht. FRQ gehört ebenfalls zu den lichtregulierten Genen, da die innere Uhr über Licht jeden Tag neu eingestellt wird. Licht ist der wichtigste Zeitgeber. Ein weiterer Zeitgeber ist Temperatur. Temperatur wirkt auf den WCC nur indirekt über FRQ.

Desweiteren wird der WCC sehr extensiv über FRQ reguliert. Diese Regulation soll nachfolgend genau beschrieben werden.

3.8) Der Transkriptions- / Translations basierende zentrale Feedbackloop

Der zentrale Feedbackloop besteht aus FRQ, WC-1 und WC-2. WC-1 und WC-2 bilden den WCC. Dieser befindet sich nur im Kern und bindet an zwei LRE (light responsive elements) im *frq* Promotor. Dort sorgt er für die Transkription von *frq*. FRQ assembliert in FRQ Komplexe. Diese werden phosphoryliert und wandern in den Kern. Dort interagieren sie mit dem WCC und schalten diesen ab (Luo et al. 1998). Die RNA Synthese kommt zum Stillstand. Die noch vorhandenen Proteine werden abgebaut. Irgendwann ist FRQ unterhalb eines Schwellenwertes. Damit ist der negative Teil aufgehoben und FRQ kann den WCC nicht länger inhibieren. Ein neuer Zyklus beginnt. Dieses ist der zentrale negative Transkriptions-Translationsfeedbackloop von FRQ, WC-1 und WC-2. Wichtig sind die Regulationspunkte. Die *frq* RNA wird nicht sofort transkribiert. Es gibt eine zeitliche Verzögerung von ca. 4 Stunden zwischen RNA und Protein. Auf RNA und auf Proteinebene wird *frq* periodisch exprimiert. Zwischen beiden Kurven ist eine zeitliche Verzögerung von ca. 4 h. Das bedeutet RNA und Protein sind ca. 4 h phasenversetzt. Außerdem wird FRQ Protein zunächst assembliert und phosphoryliert. Bei der Phosphorylierung sind mehrere Kinasen beteiligt (Yang et al. 2001, Yang et al. 2002, Yang et al. 2003). Es werden mehrere Regionen in FRQ extensiv phosphoryliert. Die Kinetik der verschiedenen Phosphorylierungen ist verschieden. Es gibt frühe und späte Phosphorylierungen. Die Phosphorylierungen erfüllen verschiedene Funktionen. Teilweise regulieren sie die Proteinstabilität, teilweise regulieren sie die Funktion von FRQ. Die letzte Zeitverzögerung ist die Stabilität von FRQ. Damit erfolgt die Regulation des zentralen Loops auf mehreren Ebenen. Zum einen gibt es verschiedene *frq* RNA's. Zum anderen existiert noch Splicing. Es werden verschiedene FRQ Proteine gebildet. Diese assemblieren und werden stufenweise durch verschiedene Kinasen phosphoryliert. Schließlich gibt es den Kerntransport, die Interaktion mit dem WCC und letztendlich die Ubiquitylierung und den Abbau von FRQ. Auf all diesen Ebenen erfolgt eine Regulation.

3.9) Interlocked und Interconnected Feedbackloops

Es existieren noch mindestens drei andere Feedbackloops, die in den ersten zentralen eingreifen. Einer davon besteht aus FRQ und WC-1 (Cheng et al. 2001 b, Lee et al. 2000). Während FRQ im Kern negativ auf die Aktivität des WCC wirkt, unterstützt es im Cytosol positiv die Expression von WC-1 Protein auf post-transkriptioneller Ebene. Damit ist dies ein positiver Translationsloop. FRQ wirkt außerdem in einem weiteren Feedbackloop positiv auf die Synthese von WC-2. Die ist jedoch ein Transkriptionsloop, da FRQ die Synthese von *wc-2* RNA positiv reguliert. Ein weiterer Loop ist ein Gatingloop. Hier wirkt VVD (*vivid*), ein kleines Protein von 21 kDa (Heintzen et al 2001).

3.10) VVD und andere Proteine in zusätzlichen Loops

Vivid (VVD) ist ein kleines Protein mit einer LOV-Domäne. Es ist neben WC-1 der zweite Blaulichtrezeptor von *Neurospora*. Es moduliert die Lichtantwort des WCC. Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt (Heintzen et al. 2001). VVD wird im Dunkeln nicht exprimiert und nach Lichteinstrahlung sehr schnell in großen Mengen gebildet. Es liegt im Cytosol vor. WC-1 wird nach Lichteinstrahlung phosphoryliert und wird sehr instabil. Es wird schnell abgebaut. Neu synthetisiertes WC-1 ist zunächst nicht in der Lage Licht zu perzipieren. Circa 2 h nach Lichteinstrahlung wird VVD abgebaut. Zwei Stunden ist genau die Zeitspanne, in der *Neurospora* nach einem Lichtpuls inaktiv ist (Schwerdtfeger et al. 2001). Es sei denn der zweite Lichtpuls ist von deutlich höherer Lichtintensität als der erste. Dieses Phänomen heisst "Gating" (Heintzen et al. 2001, Shrode et al 2001). VVD selbst ist auch ein Photorezeptor (Schwerdtfeger et al. 2003). VVD wird ebenfalls unter Kontrolle des WCC transkribiert. Es ist nicht circadian.

In *vvd*-Mutanten bleibt phosphoryliertes WC-1 über mehrere Stunden stabil und wird nicht gleich abgebaut.

Vermutlich existieren noch weitere Loops, die jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht näher charakterisiert sind.

3.11) Die temperaturabhängige Steuerung: long und short FRQ

Circadiane Uhren sind temperaturkompensiert. Das bedeutet, dass sich die Periode im physiologischen Temperaturbereich nicht verändert. Bei *Neurospora* wäre dies der Bereich zwischen 18 und 28°C.

Bei *Neurospora* existieren mehrere Formen von FRQ, lFRQ und sFRQ (langes und kurzes FRQ) (Garceau et al. 1997). Bei höheren Temperaturen wird vermehrt lFRQ gebildet, während bei tiefen Temperaturen vermehrt kurzes FRQ (sFRQ) gebildet wird. Bei höheren Temperaturen nimmt auch die Gesamtmenge an FRQ zu. So erfolgt die Temperaturkompensation der inneren Uhr (Liu et al. 1997, Liu et al. 1998).

3.12) Licht als Zeitgeber der inneren Uhr

Der wichtigste Zeitgeber der inneren Uhr ist Licht. Licht wird perzipiert von WC-1 im WCC. WC-1 ist ein Blaulichtrezeptor (Linden et al. 1997). Es besitzt dafür eine hochkonservierte LOV Domäne (Cheng et al. 2003). Ausgelöst durch Licht kommt es zunächst zu einer Phosphorylierung des WCC vermutlich durch Proteinkinase C (Arpaia et al. 1999, Schwerdtfeger et al. 2000). Sowohl WC-1 als auch WC-2 werden lichtabhängig phosphoryliert und damit aktiviert. Es folgt eine Induktion von *frq* RNA und schließlich wird FRQ Protein gebildet (Crostwaite et al. 1995). So wird die innere Uhr entsprechend durch Licht reguliert.

Die Funktion des WCC im Lichtinputweg ist unabhängig von seiner Funktion in der inneren Uhr zu sehen. Wird beispielsweise WC-1 überexprimiert so werden die uhrenkontrollierten Gene aktiviert, nicht jedoch die lichtinduzierten (Lewis et al. 2002).

4) Material und Methoden

4.1) Verwendete Stämme von *E. coli*

XL-1 blue
BL21 DH5 α

4.2) Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

W303

4.3) Verwendete Stämme von *Neurospora crassa*

frq⁺, bd
*frq*¹⁰, bd
*frq*⁹, bd
 Δ wc-1, bd
 Δ wc-2, bd
*frq*⁹, bd, qa2 FRQ
 Δ wc-1, bd, qa2 FRQ
*frq*¹⁰, bd, qa2 WC-1
 Δ wc-2, bd, qa2 WC-2
 Δ wc-2, bd, qa2 Y466Q
 Δ wc-2, bd, qa2 Y466E
 Δ wc-2, bd, qa2 S476A
 Δ wc-2, bd, qa2 S476E
 Δ wc-2, bd, qa2 T488A
 Δ wc-2, bd, qa2T488E
 Δ wc-2, bd, qa2 T523A

4.4) Physiologische Methoden

4.4.1) Anzucht von *E. coli*

Zur Anzucht von *E. coli* Bakterien wird LB Medium verwendet. Dieses wird je nach Bedarf mit den entsprechenden Antibiotika (siehe Tabelle) versetzt. Die Anzucht erfolgt in einem Schüttelinkubator bei 37°C mit 180 rpm. Zunächst werden die transformierten Bakterien auf einer Platte vorselektioniert. Einzelne Kolonien werden ausgewählt und im 2 ml Ansatz angezogen. Von den richtigen Klonen wird eine größere Kultur gezüchtet (ca. 50 ml). Schließlich wird im präparativen Maßstab (bis zu 8l in je 8 x 2l Kolben) gearbeitet, um z.B. eine große Menge Protein aufzureinigen.

Inkubationsschrank. Anschließend können einzelne Kolonien in ein YPD Flüssigmedium (3 bis 30 ml) überimpft werden. Die Arbeiten mit Hefen erfolgen an einer Sterilbank mit sterilen Arbeitsgeräten.

Zur dauerhaften Lagerung werden ebenfalls Glycerinstocks angelegt (finale Konzentration an Glycerin hier 15%). Die YPD Platten werden mit Parafilm umwickelt und können ebenfalls mehrere Wochen aufbewahrt werden. Dabei verfärben sich einige Hefekulturen rot, was auf einen veränderten Stoffwechsel unter diesen Bedingungen zurückzuführen und normal ist.

Laktatmedium:

	1 l	5 l
0.3 % Hefeextrakt	3 g	15 g
0.1 % Galaktose	1 g	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g	5 g
NH ₄ Cl	1 g	5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.5 g	2.5 g
NaCl	0.5 g	2.5 g
MgSO ₄ x H ₂ O	0.6 g	3 g
FeCl ₃	0.3 ml (1 %)	1.5 ml (1 % stock)
Lactat	22 ml (90 %)	110 ml (90 % stock)

Laktatmedium wird für spezielle Experimente verwendet. Eine 50 ml Laktatkultur wird von einer YPD – Platte angeimpft und unter Schütteln bei 30°C mit 135 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 2 inkubiert.

Anschließend wird eine zweite und später entsprechend weitere Präkulturen von der ersten (z.B. 100 ml bis zu 1l mit einer 1:100 oder 1:200 Verdünnung (OD₆₀₀ 0.1 bis 0,2) angeimpft.

Berechnung: $(0.1 \times 100 \text{ ml}) / (\text{gemessene OD}_{600})$

4.4.2.2) Hefe Transformation (Lithiumacetat Methode)

Kultur:

Eine 50 ml YPD Vorkultur von einer frischen YPD Platte über Nacht anziehen. Von dieser werden 2 50 ml YPD Kulturen 1: 10 und 1:100 angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von ~ 0.5 wird abgeerntet und kompetente Hefezellen hergestellt.

Kompetente Zellen:

In 50 ml Falcon- Röhren werden die Hefen geerntet (5' bei 2200 rpm in einer Haereus Zentrifuge). Das Pellet wird mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen und nochmals pelletiert, resuspendiert in 1 ml 100 mM Lithiumacetat. Die Zellen werden in ein Eppendorfgefäß transferiert und nochmals in einer Tischzentrifuge für 15" bei 14 000 rpm pelletiert.

Zuletzt wird resuspendiert in 400 µl 100 mM Lithiumacetat (RT).

Transformation:

50 µl der kompetenten Zellen werden bei 15" mit 14 000 rpm abzentrifugiert und mit 240 µl 50 % (w/v) PEG 4000 versetzt. Es werden 36 µl 1 M Lithiumacetat und 5 µl Lachssperma DNA (10 mg/ ml, vorbehandelt mit Hitzeschock 5' 95°C, dann Schock gekühlt auf Eis) hinzugefügt.

10 µl der zu transformierenden DNA (1 bis 2 µg) werden beigefügt und 70 µl Wasser. Anschließend vortexen und Hitze behandeln (30' bei 30°C, 20' bei 42°C). Dann vorsichtig abzentrifugieren und in Wasser resuspendiert ausplattieren auf Selektionsmedium.

4.4.2.3) Rödel Hefe Extrakt (denaturierend)**Kultur:**

Von einer 50 ml Kultur mit einer OD von 1- 4 werden 2 OD Einheiten (bzw. 4 OD) abgenommen. Diese werden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert für 5' bei 14 000 rpm.

Extrakt:

Die Zellen werden in 250 µl 30 - 50 mM Tris pH 8.0 resuspendiert. Dann werden 50 µl Rödel Mix hinzugefügt. Es wird für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend fügt man 220 µl 72% TCA hinzu und inkubiert für 15' auf Eis. Dann wird abzentrifugiert für 15' bei 14 000 rpm bei 4°C in einer gekühlten Tischzentrifuge. Das Pellet wird mit 1 ml Aceton (-20°C) gewaschen und dabei gevortext. Anschließend nochmals 15' bei 14 000 rpm bei 4°C zentrifugieren. Das Pellet wird bei 56°C für 15 min getrocknet und dann in 133 µl (10 µl pro 0,3 OD) 1x Lämmli (versetzt mit Tris Base) resuspendiert. Davon werden 0,3 OD Einheiten auf ein Gel aufgeladen.

Rödel Mix:

	500 µl	1000 µl
1.85 N NaOH	92.5 µl (10 N)	185 µl (10 N)
2- Mercaptoethanol	37 µl	74 µl
20 mM PMSF	50 µl (0.2 M)	100 µl (0.2 M)
bidest Wasser	320. 5 µl	641 µl

4.4.3) Anzucht von *Neurospora crassa***4.4.3.1) Medien for *Neurospora crassa***

Vogel's Minimalmedium N:

[Vogel, H.J. (1964) *Am. Naturalist* 98, 435]

[Vogel, H.J. (1956) *Microb. Genet. Bull.* 13, 42 -43]

50x Vogel's (1l):	Na ₃ citrat x 5 H ₂ O	150 g
	KH ₂ PO ₄ (anhyd)	250 g
	NH ₄ NO ₃	100 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 g

CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5 g
(seperat in 20 ml H ₂ O vorlösen und langsam zusetzen)	
Biotin	2,5 ml
Spurenelemente	5 ml

- 2-3 ml Chloroform , lagern bei Raumtemperatur

Biotinlösung: - 0,1 mg/ ml Biotin in 50% Ethanol (lagern bei -20°C)
 - Zu benutzen innerhalb von 6 Monaten
 - (Biotin ist nicht stabil in wässrigen Lösungen!)

Spurenelemente (0.1 l):	Zitronensäure x 1 H ₂ O	5 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	5 g
	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	1 g
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,25 g
	MnSO ₄ x 1 H ₂ O	0,05 g
	H ₃ BO ₃	0,05 g
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,05 g

- 1 ml Chloroform als Schutz, lagern bei Raumtemperatur

Minimalmedium: 1x Vogel's Salze, 2% Glucose, 0.5% Arginin, 50 ng/ ml Biotin
 (Biotin ist das einzige Vitamin. Es wird nicht von *Neurospora* synthetisiert. Es ist bereits im 50x Vogels enthalten. Da es jedoch nicht toxisch aber instabil ist, wird es nochmals zugefügt.)

Flüssigmedium: - Vogel's and Glucose werden getrennt autoklaviert!

3x Arginine:	1.5 g / 100 ml	1 l: 15 g
3x Glucose:	6 g / 100 ml	1 l: 60 g
3x Vogel's:	6 ml / 100 ml	1 l: 60 ml
	30 µl Biotin / 100 ml	300 µl

Festmedium:

1x Vogel's, 2% Glucose, 0.5% Arginin, 50 ng/ ml Biotin, 2% Agar
 Vor dem Autoklavieren immer zusätzlich mit Aluminiumfolie zudecken.

Für Konidien: 100 ml Festmedium in einem 500 ml Erlenmeyergefäß

2 g	Glucose
0.5 g	Arginin
2 ml	50x Vogel's
10 µl	Biotin
2 g	Agar

Für Slants: - in der Mikrowelle wird das Festmediumsgemisch zum Lösen erhitzt
 - 2 ml Festmedium/ Reaktionsgefäß

Für Racetubes: 1x Vogel's, 0.3% Glucose, 0.5% Arginin, 50 ng/ ml Biotin, 2% Agar
 Die niedrigere Glucosekonzentration ist für schnelleres Wachstum und daher bessere Bandenbildung erforderlich (0.3% an Stelle von 2%)
 Auch hier in der Mikrowelle zum Lösen erhitzen und mit einer Spritze in die Glasröhrchen (7 ml pro Röhrchen) einfüllen.

Volume (ml)	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Glucose (g)	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,7	3
Arginine (g)	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	2,1	2,4	2,7	3
50x Vogel's (ml)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Biotin (µl)	10	20	30	40	50	60	70	80	19	100
Agar (g)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20

Spezielle Additive:

Selektionsmarker:

Hygromycin B: - Stock 50 mg/ml in Wasser, lagern bei -20°C,
 - nach dem Autoklavieren zusetzen
 - finale Konzentration 200 µg/ ml

Benomyl: - Stock 0,5 mg/ml in EtOH, DMF etc. lösen unter milden Erhitzen,
 - lagern bei -20°C
 - nach dem Autoklavieren zusetzen
 - finale Konzentration: 0.5 - 1 µg/ ml
 - es ist zu beachten, dass sich die Effektivität von Benomyl bei steigender Temperatur erniedrigt. Daher muss bei Experimenten bei 37°C die Benomylkonzentration verdoppelt werden.

Inducer:

Chinasäure: -Stock 1,5 M (ungefähr 30% w/v) in Wasser lösen, pH Wert auf ungefähr 6 mit NaOH einstellen, lagern bei -20°C
 - finale Konzentration: 1.5×10^{-2} M

Supplements für auxotrophe Stämme: (*Neurospora* Newsletter 4: 21- 25, 1963)

Generell gilt: - lösen in Wasser, entweder autoklavieren oder Chloroform zusetzen und bei 4°C lagern
 - 0.2 - 0.5 mg/ ml Aminosäuren
 - 10 µg Vitamine
 - 0.2 - 0.5 mg/ml Purine, Pyrimidine

Einige der unten genannten Konzentrationen sind höher als in der Literatur angegeben. Diese beziehen sich aber auf optimales Wachstum nicht auf Minimalbedingungen. Vor allem in Kolben sind höhere Konzentrationen für Kreuzungen, Keimung oder für die Reife nötig.

Adenosine (final 0.5 mg/ ml), Adenine sulfat, Adenylsäure, Uracil (final 1 mg/ ml) & Tyrosin (final 0.4 mg/ml) sind zu unlöslich für eine konzentrierte Stocklösung.

Anthranilsäure: (= o- Aminobenzoesäure) wird in einer finalen Konzentration von 50 µg/ ml eingesetzt. Es werden 5 mg/ 100 ml vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

Supplement	Menge pro ml Stock Lösung	ml Stocklösung/ 100 ml Medium
p-Aminobenzoesäure	0.4 mg	0.5 ml.
Cholinchlorid	2.0	1.5
Inositol	5.0	1.0
Nicotinamid	5.0	0.2
Ca-pantothenat	1.0	1.0
Pyridoxin HCl	1.0	1.0
Thiamin	1.0	1.0
L-Arginin	40.0	1.25
L-Histidin HCl	25.0	2.0
DL-Homoserin	10.0	2.0
Indol	1.0	2.0
L-Leucin	5.0	4.0
L-Lysin	20.0	2.5
L-Methionin	10.0	5.0
L-Phenylalanin	10.0	2.0
L-Prolin	10.0	5.0
Sulfanilamid	3.4	1.0
L-Threonin	5.0	2.0
L-Arginin & L-Lysin	20.0 & 40.0	2.5
L-Isoleucin & L-Valin	3.0 & 7.0	3.0
Format (Na)	30	1.0
L-Tryptophan	10.0 (titrieren mit NaOH! , pH~11.7!)	5.0
L-Tyrosin	4.0	10.0

Für unsere Stämme:

T13, G3 (wc-2 Allele): defizient in der Biosynthese von Trp, Anthranilsäure zusetzen (final: 50 µg/ ml)

His 3 Stämme: defizient in His Biosynthese (Stock: 50 mg/ml, use 1 ml/ 100 ml, final: 0.5 mg/ ml)

Δwc-1, aro-9: defizient in Biosynthesis von aromatischen Aminosäuren

Stock (mg/ ml)	use ml/ 100 ml	finale Konzentration (mg/ ml)
Thr (1,92)	5, 2	0.1
p- aminobenzoic acid (0,5)	0.4, 0.5	0.002
Tyr (4)	10	0.4
Phe (10)	2	0.2
Trp (10) (+NaOH!)	5	0.5

Andere Medien:**Nelson B Medium:**

Das Nelson B Medium ist ein spezielles Medium für Slime Mutanten (FGSC no: 1118 & 4761)

Flüssigmedium:

7.5% (w/v)	Sorbitol
1.5% (w/v)	Sucrose
1x	Vogel's

Slime- medium (nach Prof. Schliwa, LMU München):

Volumen (ml)	50	100	150	200
50x Vogel's	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml
25x Zucker	2 ml	4 ml	6 ml	8 ml
Nutrient Broth (Difco) [final: 0.75%]	375 mg	750 mg	1125 mg	1500 mg
Hefe Extract (Oxoid or Difco) [final: 0.75%]	375 mg	750 mg	1125 mg	1500 mg
Mannitol [final: 2%]	1 g	2 g	3 g	4 g
Agar [final: 1.5%]	0.75 g	1.5 g	2.25 g	3 g

Komplettes Medium:

1) Laut FGSC ist das Kompletmedium ein Minimalmedium mit 0.5% Hefe Extract und 0.5% N-Z-Case (Sheffield).

Für "minimale" und "komplette" Slants werden 1% Sucrose und 1% Glycerol als C-Quelle verwendet und 1.5% Agar.

2) Für Sorbose Kompletmedium (HY Malling, 1996, NN 9, 13pp) gilt folgendes Rezept:

Agar	1.5 g
D-sorbose	1.5 g
Glucose	0.05 g
Fructose	0.05 g
Hefeextrakt	20 mg
50x Vogel's	2 ml

bidest Wasser auf 100 ml

3) Für Horowitz Kompletmedium (Ryan 1950, Methods in Medical Research 3, 51pp) sind anzumischen:

5x Komplette Salze	20 ml	<u>5x Komplette Salze:</u> (1 l)	
Glycerol	1.6 ml	K tartrate	25 g
5% Casein hydrolysate	0.5 ml	Na nitrate	20 g
Hefeextrakt	0.5 g	KH ₂ PO ₄	5 g
Malzextrakt	0.5 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2.5 g
bidest Wasser	100 ml	NaCl	0.5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.5 g		

Kreuzungsmedium: (Synthetisches Kreuzungsmedium oder SC Medium)

Die Biotinkonzentration wird ca. 100-fach erhöht (das macht wahrscheinlich keinen Unterschied) und Phosphat wird hier als K_2HPO_4 und KH_2PO_4 statt als monobasisches Salz allein zugesetzt. Dabei ist der pH in diesem Mischungsverhältnis schon automatisch 6.5 auch ohne zusätzliche pH Einstellung. Weiteres Vorgehen siehe Kreuzungsprotokoll.

Kreuzungsmedium (Westergaard & Mitchell, 1947):

5x Westergaard's Salze	100 ml
H ₂ O	400 ml
Sucrose (final 2 %)	10 g
Biotin (final 100 ng/ ml)	0,5 ml
Agar (final 1.5 %)	7.5 g

- überprüfen pH 6.5 (gegebenfalls einstellen mit 1 N NaOH)
- nach dem Autoklavieren eventuell trübe, da es präzipitieren kann

5x Westergaard's Salze (500 ml):

KNO ₃	2.5 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1.25 g
NaCl	0.25 g
CaCl ₂	0.25 g
Spurenelemente	0.25 ml (siehe Minimalmedium)

Plattierungsmedium:

Das Plattierungsmedium enthält Sorbose, die *Neurospora* nicht verstoffwechseln kann. Das schränkt das radiale Wachstum ein und *Neurospora* wächst dadurch in kleinen runden Kolonien.

Die Platten werden bei RT (18- 23°C) für 18 - 24 h inkubiert. Die Kolonien werden unter einem Binokular gepickt, um zu verhindern, dass sie ineinander wachsen, da die Hyphen sonst sehr schnell überlappen.

Folgende zwei Plattierungsmedien wurden verwendet:

1) 1x Vogel's, 2% D-Sorbose, 0.05% Glucose, 0.05% Fructose, 50 ng/ ml Biotin, 1.5 - 2 % Agar

2) Für besonders kleine Kolonien verwendet man SC medium + 1% D-Sorbose, 0.01% Glucose, 1.5 - 2 % Agar

(Sorbose ist in SC Medium effektiver als in Vogel's Minimalmedium)

Spotting Medium:

Das Spottingmedium ist ein modifiziertes Kreuzungsmedium. Es basiert nur auf Vogel's Minimalmedium anstelle von SC. Damit wächst *Neurospora* durch den Zusatz von Sorbose auch hier radial, allerdings etwas stärker und schneller als in SC Medium. Für schnelleres Wachstum wird zusätzlich bei 32°C für 24 h inkubiert.

1x Vogel's, 0.4% Sucrose, 0.8% D-Sorbose, 1.5% Agar in Petrischalen

Fries Minimal Medium:

5x Fries salts	20 ml
Sucrose	2 g (final 2%)
Biotin	0,5 mg
Agar	1.5 g

Auf 100 ml mit Wasser auffüllen.

5x Fries salts: (1 l)

NH ₄ tartate	25 g
NH ₄ nitrate	5 g
KH ₂ PO ₄	5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2.5 g
NaCl	0.5 g
CaCl ₂	0.5 g
Spurenelemente	0.5 ml

Conidial Banding Medium:

H ₂ O	100 ml
50x Vogel's	2 ml
Natriumacetate (anhydrous)	1.2 g
5% Casamino acids	0.5 ml
Agar	2 g

4.4.3.2) Suspension von Konidien***Vorbereitung:***

Die Erlenmeyer Kolben (500 ml) werden mit 100 ml Vogels Minimal Medium (fest) gefüllt und autoclaviert. Optimal ist es, wenn die Kolben kurz vor dem Erkalten geschwenkt werden. Das erhöht die Oberfläche und damit den Anteil an Luftmycel und damit an Konidien. Weiterhin werden sterile Mulltrichter und steriles Wasser für die Ernte vorbereitet.

Wachstum:

Die Stämme werden von einem Slant oder von einer Konidiensuspension an drei Punkten auf dem Festmedium angeimpft und für mindestens 5 Tage und höchstens 3 Wochen inkubiert. Die kürzere Inkubationszeit eignet sich besonders für Transformation von Konidien. Die längere Inkubationszeit hingegen für die Lagerung der Konidien bei -20°C, da bei längerem Wachstum die Konidien voll ausreifen können und eine besonders stabile Zellwand besitzen. Das Wachstum erfolgt bei RT bei Dauerlicht (LL) und optimalerweise bei guter Luftfeuchtigkeit für 2 Wochen.

Ernte:

Man fügt ca. 25 – 50 ml destilliertes Wasser [steril!] hinzu und schwenkt die Kolben. Dabei ist es wichtig ca. 5 bis 10 Minuten zu warten, damit sich die aufgewirbelten Konidien wieder absetzen können und in Wasser resuspendiert werden. Man sollte bei der Ernte von mehreren verschiedenen Stämmen ca. 15 Minuten dazwischen warten, da sonst Kreuzkontaminationen durch in die Luft aufgewirbelte Konidien entstehen. Steriles Arbeiten ist sehr wichtig. Daher arbeitet man an Hypochlorit gesäuberten Flächen in der Nähe einer offenen Flamme (Bunsenbrenner). Die Suspension wird durch einen Mullfilter filtriert, um Mycele und Medienverunreinigungen abzutrennen. Außerdem können die Konidien mehrfach mit sterilem Wasser gewaschen werden, wenn erforderlich oder wie bei einer Transformation mit 1M Sorbose (führt nicht zum Platzen von unreifen Konidien und erhöht somit die Keimfähigkeit). Anschließend erfolgt eine Konzentrationsbestimmung. Entweder erfolgt die Konzentrationsbestimmung über eine OD 420 nm Messung in einem Spektrophotometer oder über eine Hefezählkammer. Letzteres ist zwar genauer, aber auch umständlicher. Die Konidien enthalten normalerweise Carotenoide, so dass eine 1:10 oder 1:100 Verdünnung bei 420 nm ausgemessen wird. Kleinere Mengen an Konidien können über sterile Watte in einem abgeschnittenen Eppendorfgefäß filtriert werden. Es gilt: eine OD von 1 (OD/ml) entsprechen ca. $2,86 \times 10^6$ Konidien/ml. Eine exakte Bestimmung ist nur im Hämocytometer möglich, da verschiedene Stämme (vor allem VVD Allele) unterschiedliche Mengen, einzelne Stämme (vor allem Albino Mutanten) auch gar kein Carotenoid enthalten.

Die Lagerung erfolgt als Suspension bei -20°C . Das Auftauen erfolgt in handwarmen Wasser und die Konidien sollten so schnell wie möglich, maximal nach ca. 6 Monaten verwendet werden. Eine Lagerung und wiederholtes Einfrieren schadet der Keimfähigkeit. Generell ist ein mehrfaches Wiedereinfrieren möglich.

4.4.3.3) Inoculieren von Flüssigkulturen

Für ein normales Wachstum verwendet man 1/10 des Volumens einer Konidien suspension mit einer OD von 1,6. Das bedeutet 4 OD pro 25 ml. Für ein langsames Wachstum verwendet man nur 2 OD pro 25 ml. Von den VVD Allelen verwendet man generell nur die Hälfte, da diese eine erhöhte Carotenoidmenge enthalten und somit eine scheinbare höhere OD besitzen.

Das Wachstum erfolgt Standard gemäß bei 25°C mit 125 rpm in einem Schüttelinkubator bei normaler Luftfeuchtigkeit und Luftdruck bei Dauerlicht (LL).

4.4.3.4) Mikrokonidien

Referenz: Rossier, Oulevey, Turian, Arch. Microbiol. 91, 345 pp (1973)

Medium:

Verwendet wird ein SC- Medium (synth. Kreuzungsmedium nach Westergaard & Mitchell) mit 0.5% Sucrose und 2% Agar. Es wird in Glasröhrchen der Abmessung 16 x 150 mm zu je 6 ml eingefüllt. Nach dem Abkühlen auf ca 60°C wird 60 μl 0,1 M Iodoacetate (frisch ! und steril filtriert)) hinzugefügt. Danach werden die Glasröhrchen schräg gestellt und mit Watte

verschlossen. Wenn sie fest sind, können sie als Schrägagarröhrchen für ca. 1 Woche bei 4°C gelagert werden. Sie sollten nach Möglichkeit jedoch sofort verwendet werden.

Wachstum:

Die Stämme werden normal beimpft und für 7- 10 Tage in einem LD 12/12 Zyklus bei 25°C und sehr guter Luftfeuchtigkeit (einfach die Watte regelmäßig befeuchten) angezogen. Mit einer Impföse kann der Fortschritt der Mikrokonidienbildung unter einem Mikroskop verfolgt werden. Dabei sollte man keine Makrokonidien berühren. Die Nadel wird in 20 µl Wasser kurz eingetaucht und nach einigen Tagen kann man kleine Mikrokonidien (kleiner als 1 µm im Durchmesser) beobachten.

Ernte:

Mit ca. 2,5 ml sterilem Wasser werden die Konidien ab gespült. Es wird für 30- 60 sec gevortext. Anschließend benutzt man einen Millex Durapore 5 µm Filter, um Makrokonidien, Mycelreste, Medienreste etc. von den Mikrokonidien abzutrennen. Dabei ist der Verlust an Mikrokonidien gering (kleiner 1%) und die Abtrennungseffizienz von Makrokonidien bei über 95%. Somit ist dieses Verfahren sehr gut. Wichtig ist der richtige Filter, so dass die Mikrokonidien nicht verloren gehen. Einige Filter sind zu ungenau, d.h. die Porengröße schwankt zu stark. Diese eignen sich nicht. Hier wurden immer Millipore Filter verwendet. Anschließend werden sie im Hämocytometer gezählt. Es sollten 10^3 - 10^6 Konidien/ Slant sein. Eventuell können sie durch zentrifugieren bei 2000 g aufkonzentriert werden (5 min).

Plattieren:

Auf einem Sorboseagar werden die geernteten Konidien ausplattiert (1x Vogel's, 2% sorbose, 2% Agar). Es werden ca. 2000 Mikrokonidien/ Platte ausplattiert. Inkubiert wird bei 34°C. Die Keimfähigkeit schwankt zwischen 1 - 20%, sie ist also eher niedrig. Nach 3 bis 5 Tagen können einzelne Kolonien gepickt und auf Slants transferiert werden. Eventuell nicht abgetrennte Makrokonidien haben eine deutlich bessere Keimfähigkeit (volle Platten, große Kolonien schon nach 1 Tag).

4.4.3.5) ^{35}S - Labelling von *Neurospora*

Tag 1:

300 ml Minimalmedium werden mit 12 OD angeimpft (schütteln bei 25°C, LL, 1 d).

Tag 2:

Transferieren der angekeimten Konidien in 300 ml SO_4 - reduziertes Medium (1/4 normales 50x Vogel's und 3/4 SO_4 - reduziertes 50x Vogel's). Weiterschütteln lassen.

Tag 3:

Jetzt wird Radioaktivität (5 mCi ^{35}S - SO_4) zugesetzt. Das Labeln erfolgt über Nacht.

4.4.3.6) Carotenoidanalyse

Wachstum:

Es werden 1.25 OD in 20 ml angeimpft und für ungefähr 2 d bei 30°C wachsen gelassen.

Extraktion:

In einem Ribolyser (Hybaid) werden die Zellen mit Sand aufgebrochen. Dazu werden 2 ml Eppendorfgefäße mit 400 mg Sand, 400 mg Glaskügelchen, 500 µl Methanol und 750 µl Hexan vorbereitet. Das Gewebe wird mit Papiertüchern sorgfältig getrocknet und pro Eppendorfgefäß wird ca. 0.15 g verwendet. Im Ribolyser: Speed 6.5, Zeit 45 sec zum Aufbruch verwenden.

Anschließend wird runter zentrifugiert 20 min bei 14 000 rpm.

Quantifizierung:

Die Auswertung erfolgt im Spektrophotometer bei 445 nm.

4.4.3.7) Circadianes Zeitexperiment (Circadian Time Course CTC)

Vorbereitung (Dienstagabend):

- 17 Kölbchen (100 ml) mit 25 ml Minimalmedium
- animpfen mit je 4 OD
- Wachstum für 24 h bei LL 25°C 125rpm, dann DD Transfer

Die (abends)	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
	T	T	T E E E E
	Uhrzeit (Uhr)	20	8 11 14 17 20
Start			3 6 9 12
			15 18 21 24
			27 30 33 36
			39 42 45 48

T = Transfer

E = Ernte

Ernteschema (Freitag)

11:00	14:00	17:00	20:00
DD 3	DD 6	DD 9	DD 12
DD 15	DD 18	DD 21	DD 24
DD 27	DD 30	DD 33	DD 36
DD 39	DD 42	DD 45	DD 48

4.4.3.8) Kreuzung von *Neurospora crassa*

Kreuzungsmedium (Westergaard & Mitchell, 1947):

5x Westergaard's Salze	100 ml
H ₂ O	400 ml
Sucrose (final 2 %)	10 g
Biotin (final 100 ng/ ml)	0,5 ml
Agar (final 1.5 %)	7.5 g

- überprüfen pH 6.5 (gegebenfalls einstellen mit 1 N NaOH)
- nach dem Autoklavieren eventuell trübe, da es präzipitieren kann

5x Westergaard's Salze (500 ml):

KNO ₃	2.5 g
KH ₂ PO ₄	2.5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1.25 g
NaCl	0.25 g
CaCl ₂	0.25 g
Spurenelemente	0.25 ml (siehe Minimalmedium)

Die für das Wachstum der beiden Stämme notwendigen Zusätze (z.B. Aminosäuren) müssen zugesetzt werden. Aber hohe Konzentration an Ammonium oder Amino Stickstoff inhibiert die Kreuzung. Aminosäuren sollten insgesamt niedriger als 0.3 mg/ ml sein, Purine oder Pyrimidine Supplements sollten ebenfalls auf einem Minimallevel im Kreuzungsmedium bleiben. Normalerweise wird der Elternstamm mit den wenigsten Anforderungen der weibliche Stamm und wird zuerst ausplattiert. Russo, et al. (1985 N.N. 32:10-11) haben zusätzlich die Vogels Salze modifiziert um die NH₄NO₃ Konentration ca. 10-fach zu erniedrigen. Das so modifizierte Vogels wird ebenfalls als 50x Stock angesetzt.

Kreuzung:

Die Kreuzung wird bei Raumtemperatur (RT), d.h. bei 25°C und im Dunkeln (mit Aluminiumfolie umwickelt) durchgeführt. Bei höheren Temperaturen entwickeln sich keine Perithezien. Man benötigt zwei unterschiedliche Kreuzungstypen („mating types“), Typ a und Typ A. Zuerst wird der „weibliche“ („female“) Stamm durch mehrere Punkte auf der Platte inokkuliert. Dieser bedeckt schon nach 1 bis 2 Tagen die Platte vollständig. Dann wird der zweite „männliche“ („male“) Stamm aufgebracht, entweder als Konidiensuspension oder von einem Slant. Wichtig ist, dass das Kreuzungsmedium sehr hoch in die Petriplatten eingebracht wird und dass es frisch ist, da der gesamte Versuch recht lange läuft und ansonsten die Platten

austrocknen. Der zweite „männliche“ Stamm wird durch ca. 10 Punkte auf die Platte aufgebracht. Nach ca. 1 Woche sieht man Protoperithezien, die sich bald zu Perithezien entwickeln. Man wartet bis man die Ascosporen als schwarze Punkte auf der Oberfläche des Petrigefäßes sieht. Diese sind zunächst noch unreif. Man wartet noch ca. 1 bis 2 Wochen. Anschließend werden die Ascosporen durch ca. 1 ml steriles Wasser abgespült und auf eine 4% Agarplatte gespült. Unter einem Mikroskop, oder besser Binokular werden die Sporen mit einer Impfnadel gepickt und in Minislants (1ml kleine Schrägagarröhrchen) geerntet. Jetzt müssen sie durch einen Hitzeschock aktiviert werden. Dabei werden gleichzeitig eventuell kontaminierende Mycele oder Makrosporen abgetötet.

Die Kreuzung läßt sich nun beschleunigen, indem man die Platten zum Zeitpunkt, wo die ersten Ascosporen auftauchen für einige Tage auf 30°C transferiert. Frühestens 18 Tage nach Beginn der Kreuzung können die Ascosporen gepickt werden. Jedoch auch Wochen später ist dies noch möglich, so dass die Platten mit Parafilm umwickelt sehr lange gelagert werden können.

Auskeimen der Sporen:

Nachdem die Sporen mit Wasser (gegebenenfalls mit 0,1% Agar versetzt) geerntet und auf eine 4% Agar Platte zum Picken gespült wurden (dabei können sie mit einem Drigalski Spatel verteilt werden, wobei für jede Kreuzung ein neuer Spatel verwendet werden sollte) können einzelne Sporen unter dem Binokular gepickt werden. Nun werden die Minislants für 30 bis 40 Minuten in ein 60°C Wasserbad gestellt. In einem Inkubationsofen sind 60 Minuten nötig. Dabei werden sie zum Auskeimen stimuliert („Aktivierung“).

Achtung: Alkoholabflammen tötet die Ascosporen nicht ab! (Newmeyer et al. 1971 N.N. 18:1 Alternativ können die Ascosporen auch auf eine Minimalmediumplatte ausplattiert werden und dann Hitze aktiviert werden. Das Picken erfolgt nach dem Auskeimen (ca. 20 h später, da sie sehr schnell zuwächst, da keine Sorbose im Medium enthalten ist) ungefähr 18 bis 23 h (20°C), 15 bis 16 h (25°C), 5 bis 7 h (34°C) später.

In Minislants können die Stämme zunächst als Stocks eingefroren werden. Dazu die Minislants vorher beschriften und mit Parafilm umwickeln.

Analyse:

Die Analyse hängt von der Art der Kreuzung ab und kann erfolgen als Racetube Experiment, RNA oder Proteinanalyse, weitere Kreuzung oder ähnliches.

Manchmal scheitert eine Kreuzung in SC Medium. Sie sollte dann in Corn Meal Agar (Difco, without Glucose) wiederholt werden. Generell wird eine Kreuzung immer mehrfach mit beiden Stämmen als männlich und weiblich angesetzt.

4.4.3.9) Behandlung mit Cycloheximid

Wachstum:

In 100 ml Erlenmeyerkolben wird 25 ml Minimalmedium mit 2 bis 4 OD Einheiten Konidien angeimpft. Das komplette Experiment sollte innerhalb von 3 Tagen beendet sein.

Normalerweise lässt man die Kulturen für ca. 24 h wachsen. Anschließend führt man eventuell einen LD Transfer durch und inkubiert für die angegebene Zeit im Dunkeln (D).

Danach schließt sich die Cycloheximidbehandlung an. Dazu gibt man Cycloheximid in einer finalen Konzentration von 100 µg/ml ausgehend von einer Stocklösung mit 10 mg/ml (gelöst in Wasser, gelagert bei -20°C) hinzu. Die Stocklösung wird also 1:100 eingesetzt. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten werden die *Neurospora*zellen geerntet.

4.4.3.10) *Neurospora* Transformation (Sphaeroblasten Protokoll)

Referenzen:

Schweizer et al. 1981 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5086-5090

Vollmer and Yanofsky 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4869-4873

Orbach et al. 1986 Mol. Cell. Biol. 6:2452-2461

Vorbereiten der Konidien:

Dies kann bereits am Vortag geschehen. Von 7 Tage alten Kulturen (ca. 5 bis 6 500 ml Kolben) werden die Konidien mit sterilem Wasser geerntet. Die Kolben werden nochmals mit sterilem Wasser nachgespült und beides wird vereinigt. Anschließend werden die Konidien suspensionen durch Mull filtriert. Mit Wasser wird auf 100 ml aufgefüllt und das ganze auf zwei 50 ml Falconröhrchen verteilt zum zentrifugieren (3000 rpm für 5 min).

Die Konidien werden in 20 ml sterilem Wasser resuspendiert. Es wird auf 50 ml Wasser aufgefüllt und nochmals zentrifugiert. Wiederum wird in 20 ml Wasser resuspendiert. Dann wird eine 1:1000 Verdünnung in einem Hämocytometer ausgezählt bzw. die OD bei 420 nm bestimmt. Eine OD von 1 entspricht 2.86×10^6 Konidien/ ml. Die Konidien können jetzt bei 4°C für einen Tag gelagert werden.

Keimung:

In 150 ml Minimalmedium werden 2×10^9 Konidien (= 700 OD Einheiten) angeimpft und bei 30°C für 4 bis 6 h bei 200 bis 300 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wird unter einem Mikroskop der Fortschritt der Keimung verfolgt. Ziel ist es ca. 90% Keimung zu erreichen. Es wird abgebrochen, wenn einzelne Konidien lange Filamente entwickeln, so dass die Keimung nicht zu heterogen verläuft. Die Länge der Filamente sollte maximal den doppelten Durchmesser der Konidien betragen.

Anschließend werden die gekeimten Konidien in 50 ml Falconröhrchen geerntet (1500 bis 2000 rpm für 10 min). Die Konidien werden gepoolt und in 50 ml Wasser resuspendiert und nochmals pelletiert. Sie werden insgesamt zweimal gewaschen. Anschließend werden sie in 1M Sorbitol gewaschen und in 10 ml 1M Sorbitol resuspendiert. Sie werden dann in einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Das totale Volumen beträgt dann ca. 11 ml.

Sphaeroblastenbildung :

Es werden 4 ml von 5 mg/ml Novozym 234 zugesetzt (unsterilisiertes Pulver in 1 M Sorbitol). Durch Schwenken wird gemischt. Anschließend wird bei 30°C in einem Schüttler bei 80 bis 100 rpm für 30 bis 60 min inkubiert. Maximal dauert der Vorgang 2 h.

Um den Fortschritt der Sphaeroblastenbildung zu kontrollieren werden 5 µl der Konidien suspension auf einem Objektträger mit 5 µl Wasser gemischt. Die Sphaeroblasten schwellen an und platzen. Wichtig ist nicht überzuverdueren. Das schränkt die Lebensfähigkeit ein.

Danach werden die Konidien vorsichtig in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Der Kolben wird mit 1M Sorbitol nachgespült. Es wird auf 50 ml mit 1M Sorbitol aufgefüllt und abzentrifugiert (1500 rpm für 10 min). Anschließend wird zweimal mit 1M Sorbitol und einmal mit STC gewaschen. Letztendlich werden die Konidien in 7,5 ml STC, 2 ml PTV und 100 µl DMSO resuspendiert. Sie werden aliquotiert und zunächst bei -20°C für einen Tag, später bei -80°C eingefroren.

Jetzt werden die totale Lebensfähigkeit (auf Sorbitolhaltigem Minimalager) und die % Sphaeroblasten (auf Minimalager, wo Sphaeroblasten nicht wachsen) bestimmt.

Transformation:

Die Sphaeroblasten werden aufgetaut. Ein Wiedereinfrieren der Sphaeroblasten ist kein Problem. In einem sterilem Eppendorfgefäß werden 1µl DNA (Volumen 1-5 µl) mit 5 µl Heparin gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach werden 100 µl Sphaeroblasten hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es wird 1 ml PTC (RT) hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Anschließend wird für 20 Minuten bei RT inkubiert. Die Mischung wird in 50°C warmen Topagar gegeben und jeweils 10 ml pro Platte werden ausplattiert. Wichtig ist eine Kontrolle ohne DNA. Die transformierten Kolonien sollten bei Inkubation bei 30°C nach 2 Tagen sichtbar sein. Wichtig ist, dass verschiedene DNA- Mengen und verschiedene Sphaeroblastmengen (100, 200, 500 µl) versucht werden.

Puffer, Lösungen, Medien:

STC:	<u>final</u>	<u>500 ml</u>	
	1 M Sorbitol	91 g	
	50 mM Tris/ HCl (pH 8,0)	25 ml (1M)	
	50 mM CaCl ₂	25 ml (1M)	
PTC:	<u>final</u>	<u>500 ml</u>	<u>100 ml</u>
	40% PEG 4000	200 g	40 g
	50 mM Tris/ HCl (pH 8,0)	25 ml (1M)	5 ml (1M)
	50 mM CaCl ₂	25 ml (1M)	5 ml (1M)
10x FIGS (autoklavieren)		<u>500 ml</u>	<u>100 ml</u>
	Sorbose	100 g	20 g
	Fructose	2.5 g	0.5 g
	Glucose	2.5 g	0.5 g
Bottom Agar		<u>500 ml</u>	
	50x Vogels	10 ml	
	distilled water	440 ml	
	0.3% Arginin	1.5 g	
	Agar	7.5 g	
entsprechende Supplementse hinzufügen, autoklavieren, abkühlen auf 50°C und dann hinzufügen:			
	10x FIGS	50 ml	
Selectionsmarker			
	Benomyl	1 ml von 0.5 mg/ ml stock (final 1 µg/ ml)	
	Hygromycin (200 µg/ ml)	2 ml von 50 mg/ ml stock (final 200 µg/ ml)	

Achtung: Die Effektivität von Benomyl nimmt mit steigender Temperatur ab. Daher sollte die Menge bei Experimenten bei 37°C verdoppelt werden.

Top Agar	<u>500 ml</u>
50x Vogels	10 ml
Sorbitol	91 g
Agar	14 g
dest. Wasser	auf 450 ml
Supplements hinzufügen & autoklavieren, abkühlen auf 50°C und hinzufügen:	
10x FIGS	50 ml
Anschließend aliquotieren in 30- 50 ml in 50 ml tubes und bei 4°C lagern. Wenn es gebraucht wird, dann wird es kurz in der Mikrowelle erhitzt.	
Supplemente:	
Benomyl	100 µl/ 50 ml (final 1 µg/ ml)
Hymgromycin (200 µg/ ml)	nicht in Topagar !

Heparin Stock 5 mg/ ml in STC (frisch!!!)

Regeneration Mix	<u>100 ml</u>
0.5 M MgSO ₄ x 7 H ₂ O	12.3 g
0.5x Vogel's	1 ml (50x)
2x Sucrose	2 g
1x Glucose	1 g

4.5) Molekularbiologische Methoden

Generell wurde nach den Angaben in Sambrook und Fritsch gearbeitet.

4.5.1) Genomische DNA

Zellaufschluß:

Etwas tiefgefrorenes Mycel wird in einem vorgekühlten Mörser mit einem Pistill mit Sand unter flüssigem Stickstoff aufgerieben. Das Mycelpulver kommt in ein Eppendorfgefäß mit 250 µl CTAB Puffer und wird für 30 min bei 60°C inkubiert.

DNA Extraktion:

Es wird 250 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und 10 min bei RT mit ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wird 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand kommt in ein frisches Eppendorfgefäß und wird nochmals mit Chloroform extrahiert. Schließlich wird der Überstand mit RNaseA (1µl/ml von einem 10 mg/ml Stock) für 1 h bei RT oder für 30 min bei 37°C behandelt.

DNA Fällung:

Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol wird die DNA ausgefällt. Es wird für 30 min mit 14 000 rpm bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 10 mM Tris (ohne EDTA) resuspendiert. Das Volumen beträgt ca. 50- 75 µl. Man läßt über Nacht bei 4°C schütteln, um das Pellet zu lösen.

2x CTAB

100 mM Tris/ HCl pH 7.5 - 8	10 ml	1 M
2% CTAB	2 g	
1.4 M NaCl	28 ml	5 M
20 mM EDTA pH 7.5 - 8	4 ml	0.5 M
1% sodium bisulfite	1 g	
	100 ml	

CTAB: Hexadecyltrimethylammonium

Man muß leicht erwärmen, um das CTAB zu lösen. Es bildet außerdem viele kleine Luftblasen. Diese verschwinden, wenn man den Rührer 5 min abstellt.

4.5.2) RNA Isolation

Wichtig ist es stets Handschuhe zu tragen und RNase freie Reagenzien und Materialien zu benutzen. Am besten man verwendet frisches abgepacktes Plastikmaterial. Oberflächen und andere Gefäße werden mit 1% H₂O₂ RNase frei gemacht.

Zellaufschluß:Methode 1)

Das gefrorene Mycel wird in einem vorgekühlten Mörser mit etwas Sand unter flüssigem Stickstoff aufgerieben. Das Pulver fügt man in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit 450 µl RNA Extraktionspuffer und 450 µl Phenol. Man vortext und schüttelt bei RT für 30 Minuten. Danach wird für 10 min bei 14 000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 450 µl Chloroform: Isoamylalkohol versetzt, gevortext und für 5 min geschüttelt. Dann wird nochmals zentrifugiert.

Methode 2)

In ein 2 ml Eppendorfgefäß (kalt) wird folgendes eingefüllt: etwas Sand, 450 µl Phenol, 450 µl RNA Extraktionspuffer und etwas Mycel. Es sollten noch ca. 500 µl Luft vorhanden sein. Das Gefäß wird dicht verschlossen und einem Ribolyser für 20 Sekunden bei Stufe 6,5 aufgeschlossen. Eventuell wird der Vorgang wiederholt. Danach wird abzentrifugiert für 30 min bei 14 000 rpm bei 4°C. Der klare Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und mit 450 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gevortext und für 5 min geschüttelt. Dann wird nochmals zentrifugiert.

RNA Präzipitation:

Der Überstand von ungefähr 360 µl wird genommen und mit 40 µl 3M NaAc und 1 ml 100% Ethanol versetzt. Zur Präzipitation der RNA inkubiert man über Nacht bei -20°C oder 1h bei -70°C. Dann wird bei 14 000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit kaltem 70% Ethanol gewaschen und in der Speedvac getrocknet (ca. 10 bis 15 min). Das Pellet wird in 50 bis 100 µl kaltem Wasser resuspendiert und quantifiziert (1:500 verdünnt). Die Konzentration wird auf 2 µg/µl eingestellt und die RNA bei -70°C gelagert.

RNA Extraktion buffer (100 ml):

4 ml 0.25 METDA pH 8.0
 10 ml 1 M Tris/ HCl pH 8.0
 40 ml 10% SDS
 30 ml 2 M NaCl
 16 ml Wasser
 - evtl. erwärmen (SDS kann präzipitieren)

4.5.3) PCR

Bei der Polymerase Ketten Reaktion ("Polymerase Chain Reaction: PCR") wird ein DNA Probenstrang mit Hilfe von entsprechenden Primern amplifiziert. Man unterscheidet 3 Phasen der PCR. Zunächst muss der Probenstrang denaturiert werden (95°C), danach wird die entsprechende Annealingtemperatur (richtet sich nach GC Gehalt der Primer und der Salzkonzentration des Puffers, Standard ca. 50°C) eingestellt. Dabei binden die Primer an die komplementären Bereiche des Probenstrangs. Anschließend wird durch die entsprechende Polymerase das Zwischenstück amplifiziert (72°C). Dies geschieht insgesamt ca. 25 bis 30 fach. Anschließend werden in einem letzten Inkubationsschritt (72°C) die Enden der DNA komplettiert. Die PCR ist beendet und die DNA wird entweder über ein Agarose Gel oder mit Hilfe von NucleoSpin Säulchen aufgereinigt, um die nicht inkorporierten Nukleotide und den Probenstrang abzutrennen. Mit Hilfe der PCR werden DNA Sequenzen für eine Klonierung amplifiziert, Mutationen eingeführt, SWAP Mutanten oder Fusionsproteine hergestellt oder auch Sonden für Northern hergestellt.

Standard Ansatz (100 µl):	1 ng	template (1 µl einer 1:100 Verdünnung) von midi-prep)
	50 pmol	Primer (1 µl)
	1 µl	dNTP-Gemisch (je 10 mM)
	10 µl	10x Puffer
	1 µl	Polymerase (normal: Taq, sonst: Pfu-Polymerase)

Denaturieren: - zuerst 3' 95°C
 - in den Zyklen: 30 sec 95°C

Template:

Genomic DNA sollte niemals eingefroren werden. Am besten man lagert sie bei 4°C. Auch sollte sie nicht auf und ab pipettiert werden, da durch die auftretenden Scherkräfte die DNA fragmentiert wird.

Ist das gewünschte Produkt kleiner als 10 kB genügen 100 bis 200 ng als template. Sonst setzt man bis zu 1 µg ein.

DMSO:

Der Einsatz von DMSO empfiehlt sich bei GC-reichen templates. Die Menge richtet sich nach dem gewünschten Produkt und nach dem GC Gehalt des templates.

Ist das Produkt kleiner als 23 kB so genügen 0 bis 3% DMSO, für längere Produkte 3 bis 6 % DMSO. Bei sehr GC- haltigen templates verwendet man 4 bis 8% DMSO.

dNTP's:

Ist das Produkt kleiner als 10 kB genügen 200 µM pro Primer sonst 500 µM.

Enzyme:

Normalerweise genügen 2,5 U pro 50 µl Reaktion. Es kann auf 5 U erhöht werden, bei sehr langen templates z.B..

Denaturierung:

Normalerweise genügen 92°C. Bei sehr GC- reichen templates bis zu 98°C.

Kettenverlängerung:

Man rechnet mit 1 kB/min bei Taq Polymerase und 2 min pro kB bei Pfu Polymerase. Insgesamt nicht länger als 1h. Die Temperatur beträgt 72°C. Sind die templates länger als 10 kB dann 68°C mit Ausnahme von GC- reichen templates.

4.5.4) PCR aus *Neurospora* Konidien**Referenz:**

Ferreira et al.; Fungal Genetic Newsletter 43, 25 pp (1995)

Mit einer Nadel werden Sporen von einem Slant geerntet und in ein leeres Eppendorfgefäß gegeben. Zusammen mit einem Becher Wasser werden die Sporen in der Mikrowelle (700W) für 5 min erhitzt. Dann werden 30 µl TE (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) dazugegeben und gevortext. Anschließend wird 5 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Eppendorfgefäß gegeben und 5 µml davon in einer 50 µl PCR eingesetzt.

4.5.5) *In vitro* Transkription und Translation

Transkription:

5x transcription buffer	10 µl
100 mM DTT	5 µl
RNasin	1.8 µl (50 U)
10 mM ATP	2.5 µl
10 mM CTP	2.5 µl
10 mM UTP	2.5 µl
1 mM GTP	2.5 µl
5 mM m7G(5')ppp(5')G	5 µl
mid- DNA (nicht RNase behandelt)	5 (10) µl
SP6 Polymerase	0.8 µl
bidest. sterile water	12.4 (7.4) µl
	50 µl

Es wird bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Danach wird eventuell nochmals 0,8 µl SP-Polymerase hinzugefügt und nochmals für eine Stunde inkubiert. Dann wird die DNA durch Zugabe von 6 µl 10 M LiCl und 200 µl EtOH für 30 min bei -70°C präzipitiert.

Anschließend wird für 30 min bei 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert und das Pellet wird mit kaltem 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird bei 37°C für 5 min getrocknet und in 20 µl Wasser mit 1,5 µl RNasin als Inhibitor für RNasen aufgelöst.

Translation

gelöste RNA	21.5 µl
AA-mix (-Met) 1 mM	1.2 µl
35S- Met (>1000 Ci/ mmol, 10 Ci/ ml)	10 µl
Wasser	17.3 µl
Retikulozytenlysate (Promega)	50 µl

Das Lysat wird in der Hand aufgetaut und sofort in Eis gegeben. Es sollte niemals öfter als zweimal aufgetaut werden und nicht in Trockeneis gelagert werden.

Es wird für 1 h bei 30°C inkubiert. Danach gibt man 29 µl Stop Mix (21 µl 1,5 M Sucrose und 8 µl Chase) hinzu. Es wird aliquitiert und eingefroren. Für ein Testgel verwendet man 1 bis 2 µl.

4.5.6) TNT Transkription & Translation

Das Lysat wird in der Hand aufgetaut und sofort auf Eis gestellt. Es sollte nicht mehr als 2x aufgetaut werden.

DNA template 0.5 µg/ µl (no RNase !)	2 µl
bidest sterile water	16 µl
RNasin (40 U/ µl)	1 µl
TNT buffer	2 µl

AA (- Met) 1 mM	1 μ l
35S- Met (>1000 Ci/ mmol, 10 mCi/ ml)	2 μ l
TNT RNA Polymerase (SP6, T3 or T7)	1 μ l
TNT reticulocyte lysate	25 μ l
	50 μl

Dann wird für 90 min bei 30°C inkubiert. Danach wird aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für ein Testgel werden 1 oder 2 μ l verwendet.

4.5.7) RNA Gel

Als RNA Ladepuffer ist folgende Mischung vorzubereiten:

	1 Spur	10 Spuren	15 Spuren	40 Spuren
5x formaldehyde running	2 μ l	20 μ l	30 μ l	80 μ l
formaldehyde	3.5 μ l	35 μ l	52.5 μ l	140 μ l
formamide	10 μ l	100 μ l	150 μ l	400 μ l
formaldehyde loading buffer	2 μ l	20 μ l	30 μ l	80 μ l
EtBr	1 μ l	10 μ l	15 μ l	40 μ l
	18.5 μ l	185 μ l	277,5 μ l	740 μ l

Jeweils 6 μ l RNA (12 μ g) mit 24 μ l Ladepuffer mischen und für 3 min bei 70°C inkubieren. Das zerstört die Sekundärstrukturen. Danach für 2 min auf Eis inkubieren und das Gel beladen. Es läuft 4 h bei 70 V oder über Nacht bei 20 V.

20x MOPS (1 l)

92,4 g	MOPS Pufferan (Roth 6979.2)
33.3 ml	3 M NaAc
40 ml	0.5 M EDTA pH 8.0
	pH auf 7.0 mit NaOH einstellen

Gel (Northern)	1 gel, 1% (120 ml)
Agarose	1.2 g
H ₂ O (DEPC)	75 ml
5x formaldehyde running	24 ml
Formaldehyd	21.5 ml
EtBr	1 μ l

Zuerst die Agarose schmelzen und auf 65°C abkühlen. Danach das Formaldehyd zusetzen und das Gel gießen.

5x formaldehyde running buffer	300 ml
0.1 M MOPS	6.18 g
40 mM NaAc	1.63 g
	- pH auf 7.0 einstellen
5 mM EDTA	3 ml (0.5 M)

4.5.8) Northern Blot

Das Gel wird zweimal für 15 min in 20x SSC gespült und dann auf eine positiv geladene Nylon- oder Nitricellulosemembran geblottet. Der Vorgang dauert 16 bis 20 h.

20x SSC	1 l	2 l
NaCl	175.3 g	350.6 g
Na-citrate	88.2 g	176.4 g
pH 7.0		

Die Membran wird kurz in 2x SSC ab gespült und bei 80°C für 15 bis 30 min getrocknet. Danach wird ein UV Crosslink (90 sec) durchgeführt. Anschließend wird prehybridisiert für 30 min bei 60 bis 65°C.

100 ml	50x Denhardts
250 ml	formamide
25 ml	1 M Tris, pH 7.5
29.2 g	NaCl
0.5 g	Na- pyrophosphate
5 ml	10 mg/ml denaturierte Lachssperma DNA
90 ml	Wasser
500 ml	(bei -20°C gelagert)

Riboprobe:

0.2 - 1 µg	geschnittene DNA
4 µl	5x transcription buffer
2 µl	0.1 M DTT
0.6 µl	RNasin
4 µl	2.5 mM dNTP mix (ATP, CTP, GTP)
2.4 µl	0.1 mM UTP
4 µl	α- ³² P- UTP
	auf 19 µl mit Wasser auffüllen
1 µl	RNA Pol

Für 1 h bei 37°C inkubieren.

Die Riboprobe wird über ein Säulchen (Stratagene Nuc Trap Column Kat Nr. 400701) gereinigt. Dazu wird das Säulchen mit 70 µl STE gespült. Die Probe wird mit STE auf 70 µl verdünnt und auf das Säulchen gegeben und durchgedrückt. Es werden nochmals 70 µl STE durchgedrückt und mit den ersten vereinigt. Danach wird gezählt.

STE:	100 ml
100 mM NaCl	2 ml (5 M)
20 mM Tris pH 7.5	2 ml (1 M)
10 mM ETDA	2 ml (0.5 M)

Zum Hybridisieren wird die Probe mit 1 bis $2,5 \times 10^6$ cpm/ml zugefügt und über Nacht inkubiert. Danach wird die Membran zweimal für 15 min bei RT mit 2xSSC, 0,1% SDS gewaschen und zweimal bei 68°C für 15 min mit 0,2xSSC, 0,1% SDS.

Eventuell ist nochmal mit niedriger Salzkonzentration bei höheren Temperaturen zu waschen. Dann wird ein Film bei -70°C inkubiert. Der Blot wird bei -20°C gelagert.

4.6) Zellbiologische Methoden

4.6.1) Immunfluoreszenz für slime-Mutante (*Neurospora crassa*)

Anzucht der Zellen:

Die slime-Mutanten benötigen spezielles Medium. Verwendet wird Nelson's Medium B (Nelson et al., 1975). Es sind verschiedene Varianten der Aufzucht möglich:

- 1: auf Coverslip über Nacht (Medium mit 10% Gelatine versetzen)
- 2: auf Coverslip über Nacht (poly-L-Lysin beschichtet: 1 mg/ml)
- 3: auf Nitrocellulose-Membran (besser PVDF-Fluorotrans Membran)

4.6.2) Fraktionierung von *Neurospora crassa*

Referenz: Original: Baum, Giles (1985) *J. Mol. Biol.* 182, 79-89

Vorbereitung:

250 ml Minimalmedium werden mit 40 OD Einheiten angeimpft und für 3 Tage abgezogen. Unter Vakuum werden die Zellen geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wird bei -70°C gelagert. Für den Aufschluß verwendet man einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser mit Pistill. Die Puffer sind auf Eis gekühlt und mit frischen Inhibitoren versetzt.

	2 Prep's	4 Prep's	6 Prep's	10 Prep's
Buffer A	30 ml +15 µl Leu 15 µl Pep 150 µl PMSF 90 µl DTT	60 ml +30 µl Leu 30 µl Pep 300 µl PMSF 180 µl DTT	90 ml +45 µl Leu 45 µl Pep 450 µl PMSF 270 µl DTT	150 ml +75 µl Leu 75 µl Pep 750 µl PMSF 450 µl DTT
Buffer B	55 ml +28 µl Leu 28 µl Pep 280 µl PMSF	110 ml +55 µl Leu 55 µl Pep 550 µl PMSF	165 ml +83 µl Leu 83 µl Pep 830 µl PMSF	275 ml +138 µl Leu 138 µl Pep 1.38 ml PMSF
Step	10 ml + 5 µl Leu 5 µl Pep 50 µl PMSF 10 µl DTT	20 ml +10 µl Leu 10 µl Pep 100 µl PMSF 20 µl DTT	30 ml +15 µl Leu 15 µl Pep 150 µl PMSF 30 µl DTT	50 ml +25 µl Leu 25 µl Pep 250 µl PMSF 50 µl DTT
Storage	1 ml + 1 µl Leu 1 µl Pep 10 µl PMSF 3 µl DTT	2 ml +2 µl Leu 2 µl Pep 20 µl PMSF 6 µl DTT		

Für den Gradienten wird Puffer A und Puffer B im Verhältnis 1:1,7 gemischt.

	2 Prep's	4 Prep's	6 Prep's	10 Prep's
Buffer A	13 ml	26 ml	40 ml	65 ml
Buffer B	22.1 ml	44.2 ml	68 ml	110.5 ml
1 : 1.7 mix	35.1 ml	70.2 ml	108 ml	175.5 ml

Das aufgeriebene Mycelpulver wird in ein Gefäß mit 8 ml Puffer A (eisgekühlt) gegeben und resuspendiert. Es wird durch mehrere Lagen Mull filtriert. Danach wird das doppelte Volumen an Puffer B hinzugefügt. Dies geschieht sehr langsam und unter Rühren.

Danach kommt das Ganze auf 5 ml Gradient bestehend aus A:B wie 1:1,7. Es wird zentrifugiert.

				SureSpin 630	Supernatant	Pellet
Zelltrümmer	7'	4°C	3000xg	1400 rpm	= Total Homogenate	verwerfen
Fraktionierung	15'	4°C	9400xg	7000 rpm	Cytosol	Nuclei

Total Homogenat:

Es wird ein 1- 1.5 ml Aliquot sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für den Bradfordtest werden 10 µl auf 100 µl verdünnt und 5 und 10 µl eingesetzt.

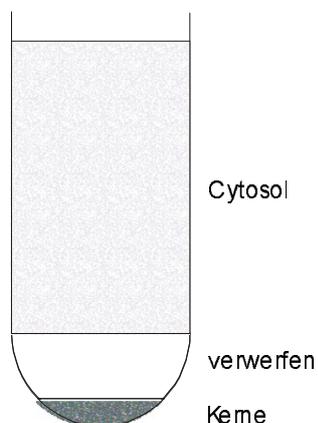
Der Rest wird auf den Stufengradienten gegeben.

Cytosol:

Es werden zwei 1.5 ml Aliquots sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für den Bradfordtest werden 20 µl auf 100 µl verdünnt und 10 µl eingesetzt.

Kerne:

Sie werden in 200 µl Kernresuspendionspuffer resuspendiert oder direkt mit bPEX extrahiert, aliquotiert und eingefroren. Für den Bradfordtest werden 5 µl auf 100 µl verdünnt und 5 und 10 µl gemessen.



Inhibitoren für die Fraktionierung:

Inhibitoren	Stock		verwenden
Leupeptin [10 µg/ml]	2 mg/ml (H ₂ O)	Lagern bei -20°C	1:2000
Pepstatin A [10 µg/ml]	2 mg/ml (EtOH)	Lagern bei -20°C	1:2000
PMSF 1 mM [MW 174,2]	34 mg/ml (EtOH)	Immer frisch!	1:200

Puffer A	100 ml	200 ml	Puffer B	100 ml	200 ml
1 M Sorbitol	18,2 g	36,4 g			
7 % (w/v) Ficoll	7 g	14 g			
20 % (v/v) Glycerol	20 ml	40 ml	10 % (v/v) Glycerol	10 ml	10 ml
50 mM Tris (pH 7,5)	5 ml [1 M]	10 ml [1 M]	25 mM Tris (pH 7,5)	2,5 ml [1 M]	5 ml [1 M]
5 mM MgAc	1 ml [0,5 M]	2 ml [0,5 M]	5 mM MgAc	1 ml [0,5 M]	2 ml [0,5 M]
5 mM EGTA	1 ml [0,5 M]	2 ml [0,5 M]	5 mM EGTA	1 ml [0,5 M]	2 ml [0,5 M]
3 mM CaCl ₂	300 µl [1M]	600 µl [1M]			
3 mM DTT					

Stepgradient	40 ml	Storage buffer	10 ml
1 M Sucrose	13,7 g	25 % (v/v) Glycerol	2. 5 ml
10 % (v/v) Glycerol	4 ml	25 mM Tris (pH 7,5)	250 µl [1 M]
25 mM Tris (pH 7,5)	1 ml [1 M]	5 mM MgAc	100 µl [0,5 M]
5 mM MgAc	400 µl [0,5 M]	0,1 mM EDTA	2 µl [0,5 M]
1 mM DTT		3 mM DTT	

4.6.3) Kernextrakte

Die Kernextrakte werden entweder mit dem Puffer für Totalextrakte bPEX oder aber mit folgendem Puffer gemacht. Dieser ist dem bPEX Puffer ähnlich:

	10 ml	Frisch
20 % (w/v) Glycerol	2 ml	
50 mM Hepes (pH 7,4)	500 μ l (1 M)	
137 mM NaCl	274 μ l (5 M)	
12.5 mM MgCl ₂	125 μ l (1M)	
0.1 mM EDTA	20 μ l (0.5 M)	
1.5 mM DTT		1.5 μ l/ ml (stock 1 M)
1 mM PMSF		10 μ l/ ml (stock 0.1 M: 17 mg/ml)
1 μ g/ml Leupeptin		1 μ l/ ml (stock 1 mg/ ml)
1 μ g/ ml Pepstatin A		1 μ l/ ml (stock 1 mg/ ml)

Kritisch ist die schnelle Isolation der Kerne, da sonst einige Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren während der Fraktionierung verloren gehen. In niedrig Salzbedingungen (150 mM) werden weniger Kernproteine extrahiert. Allerdings handelt es sich bei den nicht extrahierten Proteinen meist um unspezifisch an die DNA bindende Proteine.

Unter Hochsalzbedingungen (400 mM) werden sehr viel mehr Kernproteine extrahiert. Für 1 mg Kerne verwendet man 50 bis 100 μ l Kernextraktionspuffer. Die Kerne werden vorsichtig abzentrifugiert und in dem Extraktionspuffer resuspendiert, gevortext und für 30 min unter ständigem Vortexen bei 4°C inkubiert. Anschließend wird abzentrifugiert und der Extrakt wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

4.7) Proteinbiochemische Methoden

4.7.1) Verwendete Antikörper

α -FRQ	selbst hergestellter monoklonaler Antikörper 3G11 sowie für IP's selbst hergestellte Peptidantikörper gegen N- und C-Terminus
α -WC-1	kommerzieller Peptidantikörper der Firma Pineda (Kaninchen)
α -WC-2	selbst hergestellter polyklonaler Antikörper gegen GST-WC-2 (Kaninchen)
α -VVD	kommerzieller Peptidantikörper der Firma Pineda (Kaninchen)

4.7.2) Herstellung der Antikörper

4.7.2.1) Herstellung des Antigens: Reinigung von Inclusion bodies

Wachstum von *E. Coli*:

400 ml Medium werden von einer Vorkultur angeimpft. Bei einer OD von 0,5 wird induziert. Vor der Induktion werden 1 ml Zellen abgenommen und pelletiert. Es wird 2 h induziert bei 37°C. Dann werden die Zellen in einem JA 10 Rotor mit 6000 rpm für 10 min geerntet. Von nun an werden alle Schritte bei 4°C durchgeführt.

Lyse:

Die Zellen werden in 10 ml Wasser resuspendiert. Ein Aliquot von 25 µl (+185 µl Wasser +70 µl 4x Lämmli, 15 µl für das Gel) wird abgenommen. Es werden 10 ml 2x Lysepuffer und 0,1 mg/ml Lysozym zugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert.

Ultraschall:

Es wird mit Ultraschall behandelt: 12x 10 sec bei Level 4, 80% duty bei 0°C. Danach werden 2 ml 5 M NaCl hinzugefügt und 25 min im JA20 Rotor bei 15 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird aufgehoben. Das Pellet wird in 20 ml Lösung 2 resuspendiert. Ein Aliquot von 50 µl mit 160 µl Wasser und 70 µl 4x Laemmli wird genommen. Davon werden 15 µl für das Gel verwendet.

Lösung 2:

400 µl	1M Tris, pH 7,4
80 µl	0,25 M EDTA
100 µl	0,2 M PMSF
1 ml	20% Triton X-100
(1 ml	1 M DTT)
	mit Wasser auf 20 ml auffüllen

Danach wird nochmal mit Ultraschall behandelt: 3x 10 sec bei Level 5, 40% duty. Es wird 30 min im JA20 Rotor bei 15 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird aufgehoben. Das Pellet wird in 20 ml Lösung 3 resuspendiert. Ein Aliquot von 50 µl mit 160 µl Wasser und 70 µl 4x Laemmli wird genommen. Davon werden 15 µl für das Gel verwendet.

Lösung 3: wie Lösung 2, aber nur 100 µl von 20% Triton X-100 an Stelle von 1 ml

Danach wird wieder mit Ultraschall behandelt: 3x 10 sec bei Level 5 mit 40% Duty. Dann wird abzentrifugiert für 30 min im JA20 Rotor bei 15 000 rpm. Der Überstand wird aufgehoben. Das Pellet wird in 20 ml Lösung 4 resuspendiert. Es wird ein Aliquot von 50 µl mit 160 µl Wasser und 70 µl 4x Laemmli genommen. Davon kommen 15 µl auf das Gel.

Lösung 4: wie Lösung 2, aber ohne Triton X-100

Danach wird nochmals mit Ultraschall behandelt: 3x 10 sec bei Level 5 mit 40% Duty. Es wird abzentrifugiert für 30 min im JA20 Rotor bei 15 000 rpm. Der Überstand wird aufgehoben. Das Pellet wird in 1 ml Lösung 5 resuspendiert. Es wird ein Aliquot von 10 µl mit 200 µl Wasser und 70 µl 4x Laemmli genommen. Für das Gel werden 5, 10 und 40 µl eingesetzt.

Lösung 5:

7 M	Urea	4,2 g
50 mM	Tris, pH 7,4	0,5 ml 1M
(50 mM	DTT	0,5 ml 1M)
		- mit Wasser auf 10 ml auffüllen
	+ PMSF	
	+ Pepstatin A	
	+ Leupeptin	

2x lysis buffer:	20 mM	Natriumphosphat, pH 7,2	2 ml 0,2 M
	60 mM	Natriumchlorid	0,6 ml 2M
	0,5 %	Tween 20	0,1 g
	20 mM	β - mercaptoethanol	28 μ l
	20 mM	EDTA	1,6 ml 0,25 M
	20 mM	EGTA	1,6 ml 0,25 M
			- mit Wasser auf 20 ml auffüllen
			- pH auf 7,0 mit NaOH/ HCl einstellen

4.7.2.2) Injektion der Hasen

Das Antigen liegt auf Nitrocellulose vor (~600 μ g/ Spur). Der Blot ist trocken. Es werden 6 Banden ausgeschnitten und in hochqualitativen DMSO (250 μ l) durch vortexen gelöst. Es werden 250 μ l inkomplettes Freud's Adjuvans hinzugefügt. Für die erste Injektion werden 250 μ l Titermax verwendet. Der Hase wird injiziert. Nach 10 Tagen wird er aus der Ohrvene geblutet. Dazu werden die Haare vom Ohr entfernt und Xylol daraufgegeben, um die Venen zu vergrößern. Die Vene wird mit einem Skalpell angeschnitten und 25 ml Blut werden aufgefangen.

Man lässt das Blut bei RT für mindestens 2 h stehen oder aber über Nacht bei 4°C. Danach wird zentrifugiert in einem JA20 Rotor bei 5000 rpm für 5 min. Der Überstand wird nochmals 12 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird für 20 min auf 56°C erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und bei -20°C bis zur Affinitätsaufreinigung gelagert.

Der Hase wird nach 6 Wochen nochmals injiziert.

4.7.3) Peptidkopplung via Maleimide aktiviertem Carrier Protein

Verwendet wird Imject Maleimide aktiviertes Carrierprotein (Pierce Kat Nr. 77 105) mit MACP oder KLH. Wichtig ist, dass das Peptid ein freies Cys am N oder C Terminus besitzt. Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Es werden 5 mg Peptid in 200 – 500 μ l 50 mM Kaliumphosphat pH 7,2 gelöst. Die Konzentration sollte 4 bis 10 mg/ml betragen. Ein 20 μ l Aliquot wird abgenommen. Falls das Peptid nicht löslich ist werden bis zu 30% DMSO zugefügt oder es wird in 1 mM HCl gelöst und der Puffer später zugefügt.

Es werden 2 mg MCAP in 200 μ l Wasser rekonstituiert. Das kann einige Zeit dauern. Die Konzentration sollte 10 mg/ml sein. Ein 1 μ l Aliquot wird abgenommen. Beides wird gemischt und für 2 h bei 25°C inkubiert. Es wird ein 20 μ l Aliquot abgenommen. Die Kopplungseffizienz wird mit einem Ellman's Test überprüft.

Das Konjugat wird über eine PD10 Säule in 20 mM Kaliumphosphat pH 7,2 mit 100 mM NaCl gereinigt. Es werden 10 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Der Proteingehalt wird mittels Bradford (5 μ l Fraktion und 20 μ l Bradford) überprüft. Die proteinhaltigen Fraktionen werden gepoolt. Meist sind dies die Fraktionen 5 bis 7. In 400 μ l Portionen wird das Ganze bei -20°C bzw. bei -70°C gelagert.

Für die Kopplungseffizienz sollte mindestens eine 10 bis 15% Reduktion im Ellman's Test gemessen werden.

4.7.4) Peptidkopplung via Bisdiazobenzidine

Dieses koppelt an Tyr, Lys oder His.

Herstellen von Bisdiazobenzidine:

Benzidin (Sigma B 3383) wird in 0,2M HCl zu 5 mg/ml gelöst. Es werden pro ml 3,5 mg NaNO₂ zugesetzt und 2 h bei 4°C geschüttelt. Es entwickelt sich eine gelbe Farbe.

Kopplung:

2,5 mg des Carrierproteins werden in 10 ml Boratpuffer (0,16 M Borat pH 9, 0,13M NaCl) gelöst. Das Peptid wird in einem molarem Verhältnis von 1:30 oder 1:40 zugefügt.

Dann werden 100µl Bisdiazobenzidin hinzugefügt und man schüttelt 2 h. Der pH muss 9 betragen!

Eine gelbe Farbe entwickelt sich. Dann wird gegen PBS/NaCl dialysiert oder eine PD10 Säule verwendet. Die Effizienz der Kopplung sollte 45-60% betragen.

4.7.5) Affinitycolumn (Biogel/ BioRad)

Biogel koppelt an alle Proteine unabhängig von ihrem pI. Das Koppeln geht spontan in wässriger oder nicht wässriger Lösung. Die Matrix besteht aus N-Hydroxy-Succinimide Ester von gecrosslinkter Agarose.

Der Vorteil ist, dass eine kovalente Amidbindung mit dem C-Terminus des Spacers gebildet wird. Diese ist stabil in chaotropen Regenzien und im pH 2 bis 11. Das Koppeln ist sehr milde und 30 min reichen meistens aus, nach 4 h ist das Koppeln vollständig verlaufen. Die Kapazität ist sehr hoch, bis zu 35 mg Protein pro ml Gel. Die Kopplungseffizienz hängt vom pH Wert und von der Salzkonzentration im Puffer und dem pI des Proteins ab. Am besten verläuft die Kopplung, wenn der pH ungefähr dem pI entspricht. Da der Antikörper so kovalent an eine Matrix gebunden werden kann ist eine Affinitätsaufreinigung mit stärkeren Elutionsbedingungen möglich.

Affigel 10 ist neutral und besitzt einen 10 atomigen Spacerarm. Am besten werden neutrale Proteine (pI 6,5 bis 7,5) gebunden. Während der Kopplung läuft eine partielle Hydrolyse ab, so dass Affigel 10 danach leicht negativ geladen ist. Bei physiologischem pH koppelt Affigel 10 14% von BSA (20 mg/ml Gel in 1,5 ml Totalvolumen) mit einem pI von 4,9 und 90% von menschlichem IgG mit einem pI von 5,8 bis 7,3.

Affigel 15 ist kationisch und besitzt einen 15 atomigen Spacerarm. Es koppelt besser an saure Proteine bei physiologischem pH. Am besten der pI liegt unter 6,5.

Wichtig ist, dass die Bindung über eine freie Aminogruppe erfolgt. Demnach stören jegliche Art von Aminen und auch freie Sulfhydrylgruppen die Kopplung. Demnach sollte der Puffer kein Tris, Glycin oder DTT enthalten.

Affigel kann mit milden chaotropen Reagenzien wie 1M NaSCN oder 1M Harnstoff, mit Salzen wie 1 M NaCl oder mit Detergenzien wie 0,5% Triton X 100 gewaschen werden.

Für die Elutionsstrategien gelten zwei Überlegungen: 1. Die Ausbeute maximieren und dabei die partielle Denaturierung in Kauf nehmen oder 2. Die Aktivität des Proteins maximieren und dabei Verluste in der Menge in Kauf nehmen.

Zumeist wird eluiert mit Säure also Glycin/HCl pH 2,5 oder Natriumcitrat pH 2,5. Es ist jedoch auch möglich mit Basen oder chaotropen Reagenzien zu eluieren

Kopplungsprotokoll

1 ml Gelslurry wird 3 mal mit 1 ml kaltem destilliertem Wasser gewaschen und mit bis zu 30 mg Protein inkubiert. Der optimale Puffer ist 10 bis 100 mM HEPES, MOPS oder POPSO bei physiologischen pH. Die Bindung ist nach spätestens 4 h komplett. Es werden 0,1 ml 1M Ethanolin hinzugefügt und nochmals 1 h geschüttelt. Das blockiert die übrigen aktiven Estergruppen. Danach wird mit den Puffern gewaschen die auch für die Elution verwendet werden sollen. Das Waschen erfolgte mit 2 ml / min. Hier waren dies :

- | | | | |
|-----------|-----------------------|-------|---------------------|
| 1. 10 mM | Tris/ HCl, pH 7.5 | 15 ml | |
| 2. 100 mM | Citrat/ HCl, pH 4.0 | 15 ml | |
| 3. 100 mM | Glycin/ HCl, pH 2.5 | 15 ml | |
| 4. 10 mM | Tris/ HCl, pH 8.8 | 15 ml | pH des Eluats: ~7-9 |
| 5. 100 mM | Na-phosphate, pH 11.5 | 15 ml | |
| 6. 10 mM | Tris/ HCl, pH 7.5 | 15 ml | |

Danach konnte die Probe aufgetragen und eluiert werden. Dies erfolgt mit 1 ml/ min. Die Lagerung der Säule erfolgt in 10 mM Tris/ HCl, pH 7.5 + 0.02% Na-azide.

4.7.6) Affinitätsaufreinigung der Antikörper

Zunächst wird die Säule gewaschen mit 4 ml/ min.

- | | | | |
|-----------|-----------------------|-------|---------------------|
| 1. 10 mM | Tris/ HCl, pH 7.5 | 10 ml | |
| 2. 100 mM | Glycin/ HCl, pH 2.5 | 10 ml | |
| 3. 10 mM | Tris/ HCl, pH 8.8 | 10 ml | pH des Eluats: ~7-9 |
| 4. 100 mM | Na-phosphate, pH 11.5 | 10 ml | |
| 5. 10 mM | Tris/ HCl, pH 7.5 | 10 ml | |

Danach wird das Serum für den Auftrag vorbereitet. Das Gesamtvolumen ist 20 ml.

4 ml Serum

16 ml 10 mM Tris/ HCl, pH 7.5

100 µl 0.2 M PMSF (34 mg/ ml)

80 µl 0.25 M EDTA, pH 8.0

160 µl 0.25 M EGTA, pH 8.0

20 µl Leupeptin (1 mg/ ml)

20 µl Pepstatin A (1 mg/ ml)

10 µl o- Phenanthrolin (1 M)

Das Ganze wird mit 1 ml/ min dreimal über die Säule gegeben. Vorher und nachher wird ein Aliquot von 20 µl zum Testen auf Western Blot entnommen. Mit 1 ml/ min wird dann die Säule gewaschen.

- | | | |
|----------|-------------------|-------|
| 1. 10 mM | Tris/ HCl, pH 7.5 | 20 ml |
| 2. 10 mM | Tris/ HCl, pH 7.5 | 20 ml |
| | + 500 mM NaCl | |

Dann wird mit 1 ml/ min eluiert. Es werden jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt.

- 100 mM Citrat/ HCl, pH 4.0 10 ml

Den pH der Fraktionen sofort mit ungefähr 60 µl 1 M Tris base/ ml neutralisieren.

2. 100 mM Glycin/ HCl, pH 2.5 10 ml

Den pH der Fraktionen sofort mit ungefähr 60 µl 1 M Tris base/ ml neutralisieren.

3. Waschen mit 10 mM Tris/ HCl, pH 8.8 10 ml pH des Eluats: ~7-9

4. 100 mM Na-phosphate, pH 11.5 10 ml

Den pH der Fraktionen sofort mit ungefähr 100 µl 1 M Glycin, pH 2/ ml neutralisieren.

Sofort die Säule waschen mit:

5. Waschen mit 10 mM Tris/ HCl, pH 7.5 10 ml pH des Eluats: ~7-9

Die finale Lagerung der Säule erfolgt in 10 mM Tris/ HCl, pH 7.5 + 0.02% Na-azide. Es werden drei Minigele (10/0,5) für die einzelnen Fraktionen gemacht und mit Coomassie gefärbt. Die Antikörper enthaltenen Fraktionen werden separat für die Glycin, Citrat und Phosphatfraktionen gepoolt und ein Aliquot wird jeweils auf Western Blot getestet.

4.7.7) PD 10 Säule zum Pufferwechsel

Alle Antikörper enthaltenen Fraktionen werden gepoolt und mit 1 mg/ml fettfreiem BSA versetzt. Die PD10 Säule wird mit 20 ml 20 mM Hepes pH 7,4 150 mM NaCl gewaschen. Danach werden 2,5 ml Antikörperfraktion auf die Säule gegeben. Es wird mit 3,5 ml Puffer eluiert. Alles wird gesammelt. Danach wird wiederum mit 20 ml Puffer gewaschen und das Ganze wird so lange wiederholt bis die gesamte Antikörperfraktion umgepuffert ist.

4.7.8) Immunopräzipitation

Es wird 50 bis 100 mal mehr Antikörper pro ml als für einen Western Blot eingesetzt. Wir verwendeten für eine IP 50 µl affinitätsgereinigten Antikörper.

Es werden 20 µl PAS beads mit 3 mal 1 ml TBS 0,02% Triton X 100 gewaschen. Danach kommt der Antikörper auf die beads in einem Gesamtvolumen von 500 µl mit TBS. Er inkubiert 2 h bei RT oder 4 h bei 4°C auf einem Rotationsrad. Danach wird dreimal kurz mit TBS gewaschen und der Proteinextrakt (Totalextrakt oder Kernextrakt) auf die beads gegeben. Es wird mit bPEX auf 500 µl aufgefüllt und für 4 h bei 4°C bzw. über Nacht rotiert. Es wird dreimal kurz mit TBS gewaschen und mit 65 µl 2x Lämmli eluiert. Dazu wird für 5 min auf 95°C erhitzt.

Die Matrix ist Protein A Sepharose CL-4B von Pharmazia (4% gecrosslinkte Agarose mit 3 mg/ml Protein A).

4.7.9) Totale Proteinextrakte von *Neurospora crassa*

Die *Neurospora* sollten nicht länger als 2 bis 3 Tage wachsen. Sie werden über einem Filterblatt an einer Vakuumpumpe geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Aufarbeitung werden sie bei -70°C (kurzzeitig auch bei -20°C) gelagert.

Zum Puffer bPEX werden die Proteaseinhibitoren frisch zugesetzt.

bPEX	100 ml		
10 % Glycerol	10 ml	Glycerol	
50 mM Hepes (pH 7,4)	5 ml	1M Hepes (pH 7,4)	MW 238,31 1M: 47,6 g/ 200 ml
137 mM NaCl	2,74 ml	5 M NaCl	MW 58,44 5 M: 146.1 g/ 500 ml
5 mM EDTA	1 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)	

<u>Inhibitoren</u>	<u>Stock</u>		<u>einsetzen</u>
Leupeptin	1 mg/ml (H ₂ O)	-20°C	1:1000
Pepstatin A	1 mg/ml (EtOH)	-20°C	1:1000
PMSF [MW 174,2]	17 mg/ml (EtOH) 0,1M	immer frisch	1:100
Na-Vanadat 20 mM	0.5 M (H ₂ O, pH 10, kochen)	-20°C	1:25

Zum Aufbrechen der Zellen existieren zwei Methoden:

Methode 1:

Der Buffer für die Totalextrakte wird abgefüllt und auf Eis gestellt. Ein Mörser und ein Pistill werden mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Etwas Sand und die gefrorenen Mycele kommen in den vorgekühlten Mörser und werden zu einem homogenen Pulver aufgerieben. Dabei ist wichtig, dass das Ganze niemals auftaut. Gegebenfalls wird etwas flüssiger Stickstoff nachgefüllt. Das Pulver kommt in den vorgekühlten Puffer und wird auf Eis unter gelegentlichem Vortexen für 30 min inkubiert. Danach wird für 10 min bei 14 000 rpm bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand wird nochmals 20 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der zweite Überstand ist der Totalextrakt. Dieser wird fraktioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Methode 2:

In Eppendorfgefäße wird etwas Sand und 300 bis 400 µl Puffer abgefüllt. Das Ganze kühlt für 20 min bei -20°C. Dann wird ein kleiner Teil gefrorenes Mycel hinzugefügt und im Ribolyser aufgeschlossen. Verwendet wird Level 6,5 für 2 mal 20 Sekunden. Danach wird wie oben zweimal zentrifugiert, aliquotiert und eingefroren.

4.7.10) Bradford: Proteinkonzentration

Es handelt sich um einen Farbstoffbindeassay. In saurer Lösung bindet Coomassie Brilliant Blau G 250 an Proteine. Dabei schieft das Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm. Die Frabintensität ist abhängig vom Protein. Als Standard wird Immunglobulin G (1,4 mg/ml) verwendet. Es stören basische Puffer und Detergenzien. Das BioRad Reagenz wird 1:5 verdünnt und pro Ansatz wird 1 ml verwendet. Mit der Probe für 10 min bei RT inkubieren und dann messen bei 595 nm.

Standardverdünnungen

	1	2	3	4	5	6
	57 µl H ₂ O					
	57 µl IgG	57 µl of 1	57 µl of 2	57 µl of 3	57 µl of 4	
Konz. [µg/µl]	0,7	0,35	0,175	0,088	0,044	
Menge [µg]	40	20	10	5	2,5	
					57 µl weg	

4.7.11) Blue Native**Proben:**

200 bis 900 µg Protein werden auf Eis vorinkubiert:

	Stock	final	50 µl Ansatz
MgCl ₂	0,1 M	5 mM	2.5 µl
DNase I	10 mg/ml	200 µg/ml	1 µl
Distamycin	1 mM	10 µM	0.5 µl
Rnase A	10 mg/ml	100 µg/ml	0.5 µl

Danach wird 1/10 Volumen an Probenpuffer hinzugefügt und 20 min mit 45 000 rpm im TLA 45 Rotor bei 4°C abzentrifugiert. Das Ganze wird auf ein 5 bis 18% Gel geladen. Zum Start verwendet man den oberen Puffer mit Serva Blau. Das Gel läuft 1h mit 100 V. Danach mit 500 V weiterlaufen lassen. Wenn 1/3 des Gels durchgelaufen ist, wechselt man den Puffer zu Kathodenpuffer ohne Serva Blau. Insgesamt dauert der Gellauf ca. 4 h.

Zum Blotten inkubiert man das Gel für 30 min im Blottpuffer bei RT. Es wird für 2,5 h bei 200 mA geblottet.

Puffer für Blue Native:

10x Kathodenpuffer	500 ml	1x Blue	400 ml
		Kathodenpuffer	

50 mM Tricine [MW 179,18]	44,8 g	0,02% Serva Blue G	80 mg
15 mM Bistris [MW 209]	15,7 g		
pH 7,0 (4°C)			

10x Anodenpuffer 500 ml

50 mM Bistris	52,3 g
pH 7,0 (4°C)	

3x Gelpuffer	0,5 l
1,5 M 6-Aminocapronsäure [MW 131,8]	98,85 g
150 mM Bistris	15,7 g
pH 7,0 (4°C)	

Probenpuffer (10x)	100 ml
0,5 M 6-Aminocapronsäure [MW 131,8]	65,9 g
100 mM Bistris [MW 209,2] pH 7,0 (4°C)	2,1 g
	1 ml
5 % Serva Blue G zugeben	5 mg
AB-Mix	100 ml
Acrylamid	48 g
Bisacrylamid	1,5 g

4.7.12) SDS-PAGE

Referenz: Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4; Nature 227, 680

Das Trenngel sollte innerhalb von 45 min polymerisieren. Es sollte nicht länger als zwei Stunden stehen, da sonst Dehydratisierung durch das Isopropanol auftritt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert ist, entfernt man den Kamm und spült die Taschen gut mit Puffer aus, um restliches Acrylamid zu entfernen.

	<u>FRQ (~120-130 kD)</u>	<u>WC-1 (~150-170 kD)</u>	<u>WC-2 (~70 kD)</u>	<u>WC-2 langes Gel</u>
Prozent	7.5/ 1	7.5/ 1	12/ 0.2	12/ 0.2
Menge zu laden	200 – 300 µg	200 – 300 µg	100 – 200 µg	200 µg
Run ON	4 mA	4 mA	8 mA	14 mA

Die Proben werden sofort für 3 bis 5 min bei 95°C erhitzt, da endogene Proteasen auch in Lämmli Puffer noch aktiv sind. Beim Laden des Geles ist wichtig, dass in jeder Tasche das gleiche Volumen geladen wird. Leere Taschen werden mit 1x Lämmli befüllt. Ein Minigel läuft mit 25 mA, ein normales Gel mit 70 mA und ein großes Gel mit 25 mA.

Anschließend kann das Gel mit Coomassie oder Silber gefärbt und dann getrocknet werden oder es wird geblottet.

	HMW Sigma	Wide Sigma	LMW Sigma	Prestain BioRad	Prestain SeeBlueII Invitrogen
Myosin (Rabbit muscle)	205	205		217	250
β- Galactosidase (<i>E. coli</i>)	116	116		123	
Phosphorylase b (Rabbit muscle) (Tyr-P!)	97	97			148
Fructose-6-P Kinase (Rabbit muscle)	84	84			
BSA	66	66	66	71	98
Glutamic Dehydrogenase (Bovine liver)	55	55			64

Alcohol Dehydrogenase					50
Ovalbumin (Chicken egg)	45	45	45	48	
GAPDH (Rabbit Muscel)	36	36	36		
Carbonic Anhydrase (Bovine erythrocytes)		29	29		36
Trypsinogen (Bovine pancreas)		24	24		
Myoglobin Red					22
Trypsin Inhibitor (Soybean)		20	20		
Lysozyme					16
□ - Lactalbumin (Bovine milk)		14.2	14.2		
Aprotinin (Bovine lung)		6.5	6.5		6
Insulin (β- chain)					4

Puffer:	4x Lower Buffer (4°C)		4x Upper Buffer (4°C)	
		500 ml		100 ml
	1.5 M Tris/ HCl (pH 8.8)	91 g	0.5 M Tris/ HCl (pH 6.8)	6.05 g
	0.4 % SDS	2 g	0.4 % SDS	0.4 g
	6x Sample Buffer (Laemml)		10x Running Buffer	
		10 ml		1 l
	360 mM Tris/ HCl (pH 6.8)	2.4 ml (1.5 M)	50 mM Tris	30.2 g
	30% Mercaptoethanol	3 ml	1384 mM Glycin	144 g
	12% (w/v) SDS	1.2 g	0.1 % SDS	10 g
	60% (w/v) Glycerol	6 g	pH 8.3 (do not adjust!)	
	0.12 % Bromphenol Blue	12 mg		

4.7.13) Coomassie Färbung

Das Gel wird in die Färbelösung getan und für 20 min bei RT darin inkubiert. Anschließend kommt es in die Entfärbelösung, welche mehrfach gewechselt werden muss. Es wird so lange entfärbt bis der Hintergrund farblos ist.

Coomassie Färbelösung		Entfärber	
	1 l		1 l
Coomassie Brilliant Blue R-250	2.5 g		
Ethanol	250 ml	Ethanol	250 ml
Acetic acid	80 ml	Acetic acid	80 ml

4.7.14) Silberfärbung

Das Gel verbleibt 30 min im TCA Fix und wird danach 30 min in Lösung 1 inkubiert. Es folgen 20 min Reduktion in Lösung 2, 5 mal 5 min Waschen in bidest. Wasser und 15 min Inkubation in Lösung 3. Anschließend wird nochmals 5 mal 5 min in bidest Wasser gewaschen und in Lösung 4 entwickelt. Die Färbung wird durch intensives Waschen beendet.

TCA- Fix:	2.5 l	500 ml
TCA	300 g	60 g
Methanol	1.25 l	250 ml
Fill up with water		

Solution 1:	1l	
30% Ethanol	300 ml	
10% HAc	100 ml	
Fill up with water		

Solution 2:	100 ml	
Na- Thiosulfat	0.1 g	
Glutaraldehyd	2 ml	
Fill up with water		

Solution 3:	100 ml	
NaOH	21 ml (of 0.36% NaOH)	
NH ₃	1.4 ml (of 25% NH ₃)	
AgNO ₃	4 ml (of 20% AgNO ₃ : 80 mg in 4 ml)	
Fill up with water		

Solution 4:	500 ml	
Citric acid	73 µl (of 34% Citric acid)	
Formaldehyd	0.3 ml	
Fill up with water		

4.7.15) Semi Dry Western Blot

Aufbau:



FRQ/WC-1	WC-2	VVD
2 h 30: 200 mA [7.5/ 1 normales Gel]	1 h 30: 200 mA [12/0.2 normales Gel]	1 h 15 : 200 mA [16/ 0.5 normales Gel]
2 h 30: 100 mA [Minigel]	1 h 30: 100 mA [Minigel]]	1 h 15 : 100 mA [Minigel]

Es werden zwei mit Blotpuffer befeuchtete Whatmannpapiere in die Blotapparatur gegeben. Darüber kommt die mit Blotpuffer befeuchtete Nitrocellulosemembran und dann das Gel. Lufblasen werden vorsichtig entfernt. Es wird mit zwei mit Blotpuffern befeuchteten Whatmannpapieren abgeschlossen. Der Blotvorgang läuft mit unterschiedlichen Stromstärken unterschiedlich lange (siehe obere Tabelle). Das richtet sich nach der Größe des Gels und nach der Größe der zu blottenden Proteine.

Anschließend wird mit PonceauS gefärbt. Dazu wird die Nitrocellulosemembran einfach in Ponceaufärbelösung für 5 min inkubiert.

Blotting Buffer:

	2,5 l	5 l
20 mM Tris	6,06 g	12,12 g
150 mM Glycin	28,15 g	56,3 g
20% Methanol	500 ml	1 l
0,08 % SDS	2 g	4 g

Ponceau-S:

3 % (w/v) TCA 7,5 g (10,5 ml 72% TCA)
 0,2 % (w/v) Ponceau S 0,5 g
 fill up with water to 250 ml

4.7.16) Dekorieren der Blots

Der Blot wird 5 min in TBS gewaschen, um das Ponceau zu entfernen. Anschließend wird 1h in 5% Milch in TBS geblockt. Danach kommt der erste Antikörper für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C darauf. Es wird 3 mal 10 min in TBS gewaschen und der zweite Antikörper kommt für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C darauf. Beide Antikörper werden in 5% Milch in TBS angesetzt. Der zweite Antikörper ist entweder goat anti-rabbit 1:10 000 oder goat anti-mouse 1:5 000. Es wird dreimal 10 min in TBS gewaschen und mit Luminol entwickelt. Dazu kommt 3 ml Luminol I [Luminol & p-Cumarinsäure] und 3 ml Luminol II [H₂O₂] auf den Blot und wird für 2 min inkubiert.

Eventuell wird ein kommerzieller Enhancer 300 µl Enhancer 1 und 300 µl Enhancer 2 hinzugefügt und dann wird für 5 min entwickelt.

FRQ (~120-130 kD)	erkennt	einsetzen	2. AK	Enhancer
3G11	N terminales Peptid	1:10 (2 h RT)	α-mouse (ON)	(+)
WC-1 (~150-170 kD)				
145	WC-1 C200	1:30 – 1:100 (ON)	α-rabbit	+
4H 4	WC-1 C200	1: 10 (ON)	α-mouse	+
Pineda Tier 1	Peptid	1: 1000	α-rabbit	
Pineda Tier 2	Peptid	1: 1000	α-rabbit	

WC-2 (~70 kD)				
165	GST- WC-2	1:500 [mind. 1h]	α -rabbit	-
Pineda Tier 1	Peptid	1: 2000	α -rabbit	
Pineda Tier 2	Peptid	1: 2000	α -rabbit	
VVD (~22 kD)				
Pineda Tier 1	Peptid	1: 25	α -rabbit	
Pineda Tier 2	Peptid	1: 25	α -rabbit	
b - Tubulin				
		1:1000	α -mouse	-
NIT2				
	[Feng & Marzluf '98, <i>Mol. Cell. Biol.</i> 18, 3983]	1:1000	α -rabbit	-

Zum Strippen des Blots wird der Blot mit Stripping Lösung bedeckt 30 min bei 70°C inkubiert und anschließend mehrfach gründlich mit TBS gewaschen.

10x TBS (pH 7,5)

Tris	24,2 g
NaCl	180 g
	2l

Luminol

Stock: 0,44 g Luminol in 10 ml DMSO (1 ml Aliquots, store @-20°C)
0,15 g p-Cumarinsäure in 10 ml DMSO (0,44 ml Aliquots, store @-20°C)

Lösung I: - 1 ml Luminol
- 0,44 ml p-Cumarinsäure
-@ 100 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

Lösung II: - 60 μ l 30% H₂O₂
-@ 100 ml 100 mM Tris/HCl, pH 8,5

Stripping:

	50 ml	100 ml
2 % SDS	10 ml (10%)	20 ml (10%)
62,5 mM Tris pH 6,8	3,125 ml (1M)	6,25 ml (1M)
β - Mercaptoethanol	357 μ l	714 μ l

4.7.17) Gelfiltration: Superose 6

Die Proteinextrakte sollten mindestens eine Konzentration von 11 μ g/ μ l aufweisen. Zunächst werden sie vorinkubiert mit DNase und RNase, um die DNA und RNA Interaktionen mit den Proteinen zu unterbinden.

Preincubate protein extracts:

Superose 6 buffer: (1 l)

0.1 M MgCl ₂	25 µl	25 mM HEPES pH 7.4	25 ml	1M HEPES/ NaOH 7.4
1 mM Distamycin	5 µl	1% glycerol	10 ml	
200 µg/ µl DNase I	10 µl	137 mM NaCl	27.4 ml	5 M NaCl
100 µg/ µl RNase A	5 µl	1 mM EDTA	2 ml	0.5 M EDTA pH 8.0
6 mg protein				
- adjust to 600 µl with superose 6 buffer				

Die Inkubation erfolgt für 30 min auf Eis. Danach werden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert bei 45 000 rpm für 20 min bei 4°C im TLA 45 Rotor. 500 µl werden auf die Superose 6 Säule geladen. Der Rest wird als load TCA gefällt.

Die Fraktionen werden TCA gefällt und auf ein Gel aufgeladen.

4.7.18) Aufreinigung von GST Fusionsproteinen

GST bildet Dimere. GST und MBP erhöht im allgemeinen die Löslichkeit von Fusionsproteinen. Man erhält auch einen geringeren Hintergrund als bei His Tags. Aus einem großen Ansatz kann man 1 bis 3 mg (bis zu 100 mg) Protein aufreinigen.

Es wird eine über Nacht Kultur angesetzt. Von dieser wird eine 1 l Kultur 1/100 angeimpft. Sie wächst bis zu einer OD von 0,5 bis 0,8. Dann wird induziert mit 1 mM IPTG. Nach 4 h Induktion wird geerntet in einem JA 10 Rotor mit 6500 rpm für 10 min. Pro Liter Kultur wird das Pellet in 50 ml PBS aufgelöst und dann nochmals pelletiert. Das Pellet wird bei -20°C eingefroren. Das hilft beim Zellaufbruch. Schließlich wird das Pellet in 100 ml Lysepuffer resuspendiert.

Lysepuffer: PBS with 15% glycerol, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 mM DTT

Zellen mit pLYS werden kurze Zeit (5 bis 10 Sekunden) mit Power Setting 7 mit einem Mikrotip beschallt. Zellen ohne pLYS werden mit 500 µg/ml Lysozym versetzt und länger sonifiziert (dreimal 30 Sekunden) mit Power Setting 7 mit einem Mikrotip.

Das Ganze wird in eine 250 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 1% Tx-100 (alternativ 2-4% Sarkosyl), 30 bis 50 U (10 µg) DNase I/ml und 10 mM MnCl₂ versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wird abzentrifugiert und der Überstand in 2 50 ml Falcons transferiert. Es werden 2 ml 50% GSH Agarose slurry zum Überstand gegeben. Das Ganze wird 2 h bei 4°C rotiert. Dann wird abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Die beads wird in eine Prep Säule gefüllt und mit PBS 15% Glycerol 3 mal 1 ml gewaschen. Jetzt gibt es zwei Möglichkeiten. Einmal eine Elution mit GSH und einmal eine Thrombinspaltung.

Elution mit GSH:

Verwendet werden 5, 10, 15 bis zu 50 mM GSH. Es wird 1,5 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und für 2 h im Kühlraum rotiert. Dies ist die Fraktion 1. Es wird nachgewaschen mit 4 mal 500 µl Elutionspuffer. Dies sind die Fraktionen 2 bis 5. Die Konzentration wird bestimmt. Es wird gegen PBS 15% Glycerol dialysiert oder eine NAP 25 Säule verwendet. Die Proteinhaltigen Fraktionen werden eingefroren.

Thrombinspaltung:

Es wird 3 mal mit 1 ml Thrombinspaltungspuffer (TCB) gewaschen. Dann kommen 2 ml TCB und 20 U/ml Thrombin in TCB hinzu. Das Ganze rotiert 1 h bei RT oder 2 h bei 4°C. Es wird als Fraktion 1 eluiert. Es wird mit 4 mal 500 µl PBS nachgewaschen. Das sind die

Fraktionen 2 bis 5. Die Konzentration wird bestimmt. Es wird gegen PBS 15% Glycerol dialysiert oder eine NAP 25 Säule verwendet. Die Proteinhaltigen Fraktionen werden eingefroren.

Buffers & Solutions

Lysis buffer	50 ml		300 ml	
1x PBS	5 ml	10x	30 ml	10x
15% Glycerol	9.4 ml	80%	56.4 ml	80%
1 mM EDTA	100 µl	0.5 M	600 µ	0.5 M
5 mM DTT	250 µl	1 M	1.5 ml	1 M
1 mM PMSF	500 µl	100 mM	3 ml	100 mM

DNase I storage

- 1 mg in 1 ml 50% Glycerol, 20 mM Tris/ HCl pH 7.5, 1 mM MgCl₂ (store at -20°C)
- ~2000 - 3000 U/ mg , use 10 µl/ ml

TCB (Thrombin cleavage buffer)	50 ml	
50 mM Tris pH 8	2.5 ml	1 M
5 mM CaCl ₂	250 µl	1 M
250 mM KAc	12.5 ml	1 M
15% Glycerol	9.4 ml	80%
[2% Octylglucoside]	1 g	

use ~4 mg Thrombin in 1 ml TCB (Boehringer)

GST elution buffer	10 ml	
50 mM GSH (Sigma Ultra, fresh!)	153 mg	
100 mM Tris/ HCl pH 8	1 ml	1 M
120 mM NaCl	240 µl	5 M
5 mM DTT	50 µl	1 M
2% Octylglucoside	2 ml	10 %
15% Glycerol	1.9 ml	80 %
1 mM PMSF	100 µl	100 mM
1 mM EDTA	20 µl	500 mM

Storgae buffer 2

(no EDTA, no DTT, can be used for Ni- NTA)

	50 ml	
20 mM Hepes pH 6.8	1 ml	1 M
5 mM MgAc	250 µl	1 M
15% Glycerol	9.4 ml	80%
160 mM KAc	8 ml	1 M

5) Ergebnisse

5.1) Molekulare Analyse von WC-2, WC-1 und FRQ

Die zentrale Fragestellung für das Verständnis der inneren Uhr ist, wie interagieren FRQ, WC-1 und WC-2 auf molekularer Ebene um den Transkriptions-/ Translations Feedbackloop zu bilden. Der Schlüsselschritt ist die negative Rückkopplung von FRQ auf den WCC, um diesen abzuschalten. Um zu analysieren, wie die negative Rückkopplung funktioniert, wurde mit einer detaillierten molekularen Analyse von FRQ, WC-1 und WC-2 begonnen. Ziel war es mehr über die Funktionen zu erfahren. Dabei wurden die Verteilung zwischen Cytosol und Kern zu verschiedenen circadianen Zeiten, die molaren Verhältnisse zwischen den Proteinen in Totalextrakten, im Cytosol und im Kern sowie die Organisation in hochmolekulare Komplexe zu verschiedenen Zeiten analysiert. Anschließend wurden die Modifikationen der Proteine charakterisiert. Dabei wurde die Analyse auf die Phosphorylierung von WC-1 und WC-2 fokussiert, da sich diese als ein Teil des Feedbackmechanismus herausstellte.

5.1.1) Subzelluläre Lokalisierung der Uhrenproteine

Um die subzelluläre Lokalisierung zuverlässig zu analysieren musste zunächst die Fraktionierung der Zelle zuverlässig funktionieren. Das bestehende Protokoll wurde optimiert, wobei sowohl auf die quantitative Ausbeute, als auch auf die Qualität der Fraktionierung geachtet wurde.

Es wurden 6 g *Neurospora* zellen aufgebrochen. Dabei wurden 22 ml Totalhomogenat erhalten, welches etwa 5 mg/ml Protein enthielt. Das entspricht 110 mg Gesamtprotein. Davon wurden 20 ml Cytosol mit 4,5 mg/ml und 300 μ l Kerne mit 10 mg/ml erhalten. Demnach waren in unserer Fraktionierung 82% der Proteine cytosolisch und 3% Kernproteine.

Anschließend musste die Güte der Trennung zwischen Cytosol und Kern bestimmt werden. Dazu wurden spezifische Markerproteine verwendet. Der Kernmarker Nit-2 (Feng et al. 1998) war nach unserem Fraktionierungsprotokoll fast ausschließlich im Kern zu finden, während β -Tubulin fast ausschließlich cytosolisch war. Beide Kompartimente waren klar voneinander getrennt.

Damit war das Fraktionierungsprotokoll etabliert.

Die subzelluläre Verteilung der Uhrenproteine wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt (siehe Abbildung 1).

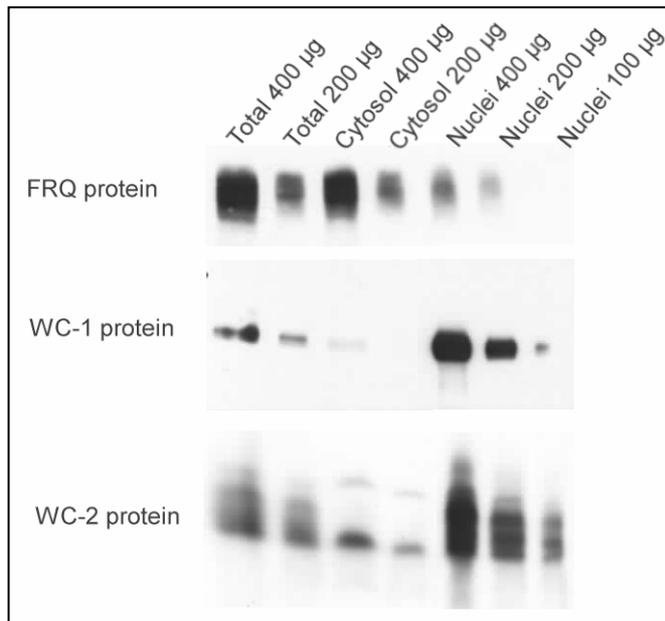


Abb. 1:

Fraktionierung eines lichtgewachsenen Wildtypstammes

Es zeigt die Verteilung von FRQ (oben), WC-1 (Mitte) und WC-2 (unten) zwischen Totalhomogenate, Cytosol und Kernfraktion.

Die angegebenen Proteinnengen wurden mittels SDS PAGE und Western Blotting analysiert.

FRQ befindet sich fast ausschließlich im Cytosol, WC-1 ist ein Kernprotein und WC-2 ist in beiden Kompartimenten.

Sehr erstaunlich für uns war die Verteilung von FRQ. Weit über 95% von FRQ befand sich im Cytosol. Lediglich ein kleiner Anteil befand sich im Kern. Dieser Anteil ist jedoch spezifisch. Es handelt sich weder um Verunreinigungen durch anhaftendes Cytosol, wie durch einen Vergleich mit β -Tubulin klar erkennbar war, noch waren die Kerne bei der Fraktionierung defekt, so dass FRQ aus dem Kern ins Cytosol transportiert wurde. Dies kann man anhand von WC-1 und auch durch die Kontrolle mit Nit-2 erkennen. Die Kerne blieben bei unseren Fraktionierungen intakt. FRQ ist ein sehr großes Protein. Es ist demnach nicht zu erwarten, dass es während der Fraktionierung aus dem Kern hinausdiffundiert. Schließlich wollten wir noch ausschließen, dass es einen aktiven Transportvorgang für FRQ gibt, der FRQ während des Protokolls aktiv aus dem Kern transportiert. Dazu wurde ein spezifischer Inhibitor des Kernexports Leptomycin B verwendet. Das Ergebnis war das gleiche. Somit ist der Großteil von FRQ tatsächlich cytosolisch, was für uns erstaunlich war, da seine Hauptaufgabe das Abschalten des WCC ist, welcher sich im Kern befindet.

WC-1 befindet sich zu über 95% im Kern. WC-2 findet sich in beiden Kompartimenten. Dabei finden sich ca. 40- 50% im Cytosol (siehe Abbildung 2). Auf die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität wird später im Detail eingegangen.

Zur besseren Vergleichbarkeit sind jeweils mehrere Mengen an Totalhomogenat, Cytosol und Kern aufgetragen.

Das gleiche Ergebnis erhält man zu verschiedenen circadianen Zeitpunkten.

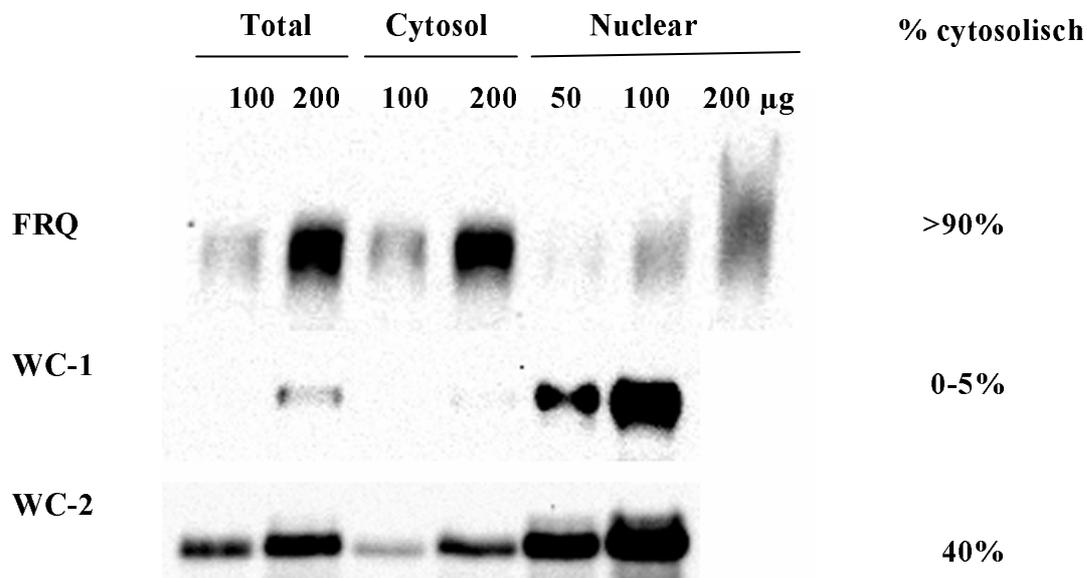


Abb. 2:

Fraktionierung eines lichtgewachsenen Wildtypstammes, 2

Es zeigt die Verteilung von FRQ (oben), WC-1 (Mitte) und WC-2 (unten) zwischen Totalhomogenate, Cytosol und Kernfraktion. Es sind jeweils verschiedene Mengen aufgetragen. Berechnet ist der prozentuale cytosolische Anteil.

5.1.2) Quantifizierung der Uhrenproteine

Nachdem die Verteilung ein so erstaunliches Ergebnis im Bezug auf FRQ aufgezeigt hat, interessierte uns die Quantifizierung der Uhrenproteine. Dabei wollten wir wissen, wie ein Protein, was sich überwiegend im Cytosol befindet, im Kern einen Transkriptionsfaktorkomplex ausschalten kann.

FRQ, WC-1 und WC-2 wurden *in vitro* in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin translatiert und als Standard in Verdünnungsserien auf die gleichen Gele aufgeladen wie die zu quantifizierenden Totalextrakte, Cytosole und Kernextrakte, die jeweils mindestens als Duplikate aufgetragen wurden (siehe Abbildung 3). Zunächst wurden mit einem Phosphoimager die relativen Proteinmengen der Standards berechnet. Dazu wurden die radioaktiven Signale quantifiziert. Die relativen Mengen an FRQ, WC-1 und WC-2 konnten berechnet werden, da bekannt war wie viele Methioninreste in den jeweiligen Proteinen vorhanden sind.

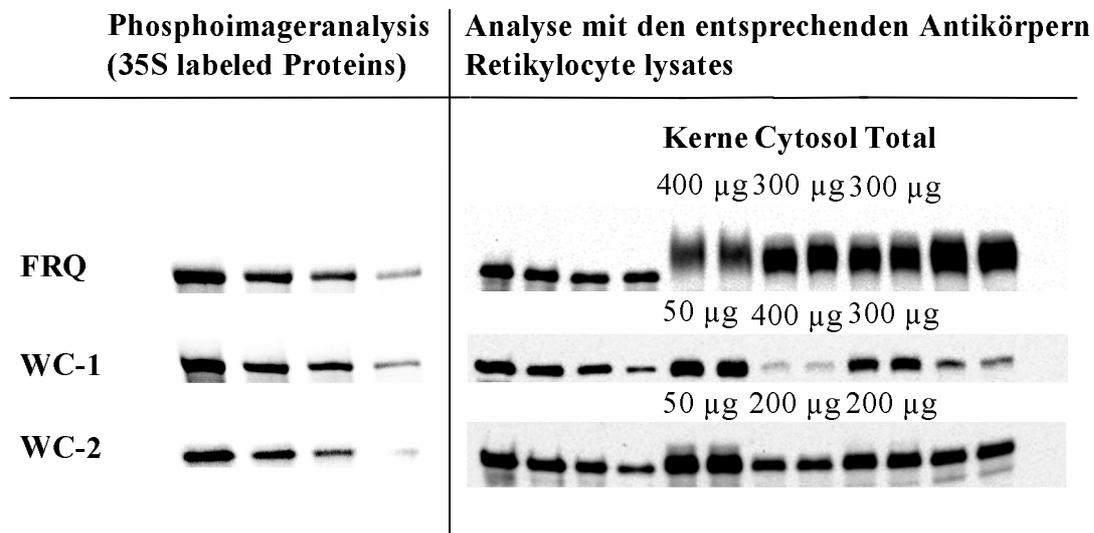


Abb. 3:

Unterschiedliche Mengen *in vitro* synthetisiertes FRQ, WC-1 und WC-2 wurden zusammen mit Kernfraktionen, cytosolischen Fraktionen sowie Totalhomogenaten und Totalextrakten (jeweils in Duplikaten) für die Quantifizierung aufgetragen. Analysiert wurde mit Phosphoimager und mit den Antikörpern.

Anschließend wurden die gleichen Blots mit den jeweiligen Antikörpern dekoriert. Mit Hilfe der Standards wurde für jeden Antikörper eine Eichgerade erstellt. Vorher wurde der lineare Bereich des Antikörpers ermittelt. Es wurde nur im linearen Bereich des Antikörpers und auch im linearen Bereich der ECL Reaktion gearbeitet. Die relativen Mengen an FRQ, WC-1 und WC-2 wurden in Totalextrakten, im Cytosol und in Kernextrakten in mehreren unabhängigen Versuchen bestimmt. Der Mittelwert wurde gebildet. In unserem Versuch erhält man ein genaues Ergebnis, da Standard und zu quantifizierende Probe immer auf einem Gel sind, da mindestens Duplikate verwendet werden und da auf den linearen Bereich geachtet wurde.

Für Totalextrakte erhält man folgendes Ergebnis für das Mengenverhältnis der Uhrenproteine: FRQ:WC-1:WC-2 wie 4:1:5. Im Cytosol verhält sich FRQ zu WC-2 wie 3:1 und in Kernextrakten ist FRQ:WC-1:WC-2 wie 1:6:18.

Damit bestätigt dieses Ergebnis zum Teil die Ergebnisse von Dennault et al. (2000) und Liu et al.(2002). Es geht aber auch darüber hinaus, da die Verteilung der Proteine berücksichtigt wird. Kombiniert man die Ergebnisse der Verteilung und die Quantifizierung der Totalextrakte so erhält man die Werte der Quantifizierung im Cytosol und in Kernextrakten. Damit bestätigt dieses Ergebnis auch die Ergebnisse der Verteilung.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass der WCC im Kern in einem 6-fachen Überschuß über FRQ vorhanden ist.

5.1.3) Die Komplexe

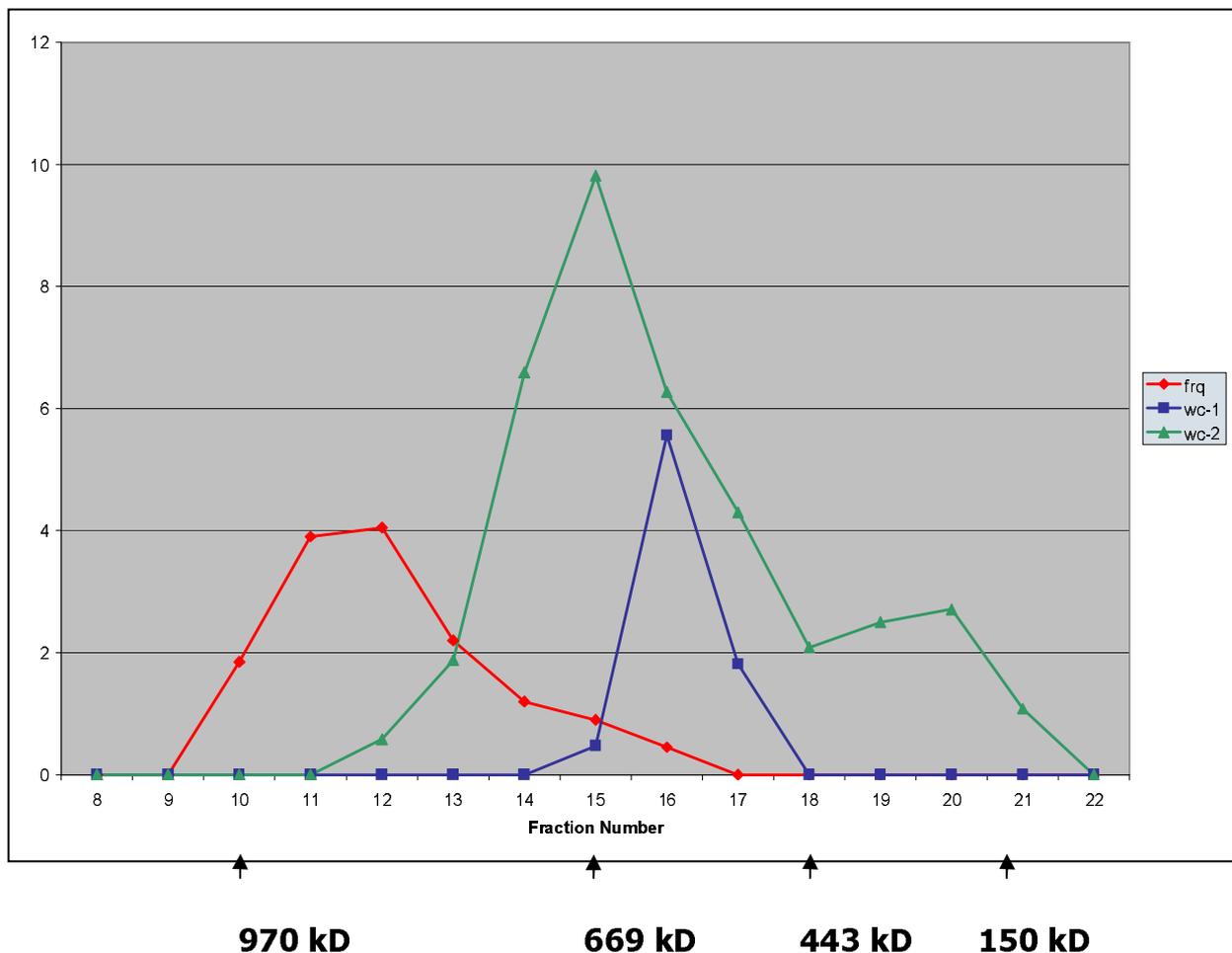


Abb. 4:

Gezeigt ist das typische Elutionsprofil einer Superose 6 Säule für einen Totalextrakt eines Wildtypstammes. FRQ ist in Rot dargestellt, WC-1 in Blau und WC-2 in Grün. Die Größen wurden mit Hilfe eines separaten Markerlaufes bestimmt.

Um die Wechselwirkungen der Uhrenproteine zu untersuchen, wurden Gelfiltrationsanalysen durchgeführt.

Die Uhrenproteine FRQ, WC-1 und WC-2 sind in großen hochmolekularen Komplexen assembliert (siehe Abbildung 4). FRQ eluiert von einer Gelfiltrationssäule (Superose 6) als sehr breiter Peak mit einem apparenten MW von 1 MDa bis 440 kDa. Der Komplex ist in so fern inhomogen, weil die unterschiedlich phosphorylierten Formen von FRQ in verschiedenen Fraktionen eluieren. Daher sieht es so aus, als ob es mehrere Komplexe von FRQ gibt, die sich in ihrem Phosphorylierungsstatus unterscheiden. Vermutlich ist FRQ ein Tetramer, d.h. ein Dimer von Dimeren. Zunächst assembliert es vermutlich über die coiled coil Region im aminoterminalen Bereich zu einem Dimer (Cheng et al. 2001). Beide Dimere assemblieren über eine weitere Region am C-Terminus. Gestützt wird diese Behauptung von der Tatsache, dass ein C-terminal deletiertes FRQ⁹ Protein, von der Superose 6 als Dimer eluiert (nicht gezeigt).

WC-1 eluiert als ein scharfer Peak mit einem apparenten MW von 440 kDa.

WC-2 hingegen eluiert in 2 Peaks von einer Superose 6 Säule. Der erste Peak ist recht breit und umfasst damit den WCC und noch einen weiteren Komplex. Beide Komplexe werden nur in Anwesenheit von WC-1 gebildet, da in einem Δ WC-1 Stamm nur der hintere kleinere Peak sichtbar ist. Gestützt wird diese Behauptung ausserdem von der Analyse von Cytosolen, die ebenfalls beide Peaks von WC-2 enthalten, jedoch kein WC-1 aufweisen.

Als nächstes wurden unterschiedliche circadiane Zeitpunkte untersucht. Wir wählten DD16 und DD28 aus. Einmal ist dies ein Zeitpunkt, wo die *frq* RNA ein Minimum aufweist und einmal ein Maximum. Zu diesen untersuchten circadianen Zeitpunkten konnten wir keine Veränderung in der Anzahl, der Zusammensetzung oder aber sonstiger Art in diesen Komplexen feststellen. Die Gelfiltrationen zeigen, dass FRQ und der WCC in getrennten Fraktionen eluieren.

Es gibt keinen stabilen Komplex zwischen FRQ und dem WCC. Die Untersuchung wurde im Dunkeln wiederholt. Kernextrakte zu verschiedenen circadianen Zeiten wurden unter Rotlicht hergestellt und unter Rotlicht auf einer Superose 6 Säule untersucht. Damit sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass ein FRQ-WCC Superkomplex existiert und nur lichtinstabil ist. Das ist nicht der Fall. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht von den in Licht gewonnenen Daten.

5.1.4) Die Komplexe im Cytosol und im Kern

Anschließend sollte untersucht werden, wie sich die Komplexe auf Cytosol und Kernfraktion verteilen. In einem Kernextrakt finden sich alle Komplexe wie auch im Totalextrakt (siehe Abbildung 5).

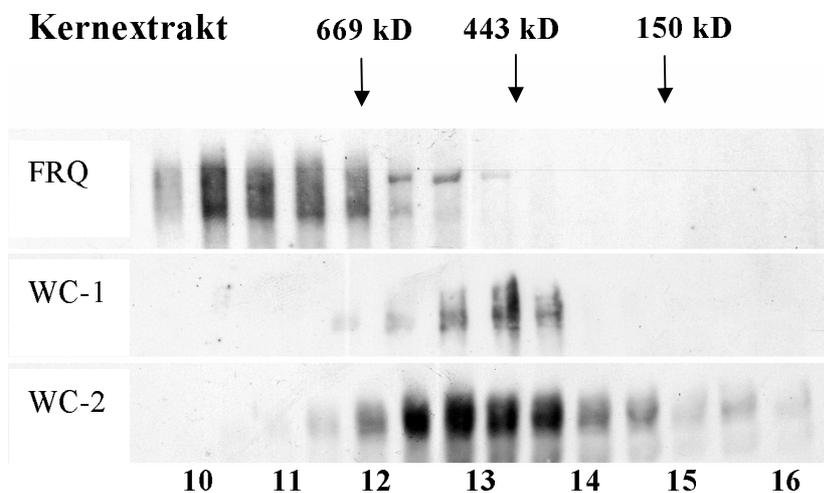


Abb 5:

Elution einer Superose 6 Säule für Wildtypkernextrakte. Gezeigt ist FRQ (oben), WC-1 (Mitte) und WC-2 (Unten). Unten ist das Elutionsvolumen aufgetragen.

Der einzige Unterschied zu Totalextrakten liegt in Elutionsverhalten von WC-2. Dieses ist jetzt primär in dem vorderen breiteren Peak zu finden. Der kleinere Peak ist fast gar nicht detektierbar. Somit ist der kleinere Komplex primär im Cytosol anzutreffen.

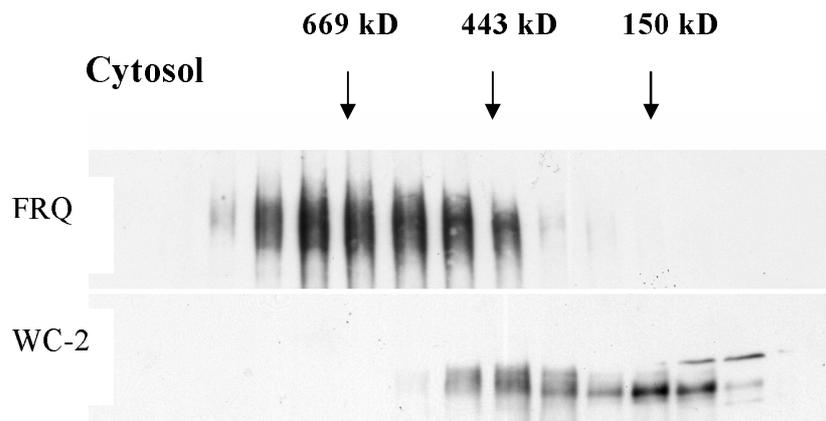


Abb. 6:
Elutionsprofil einer Superose 6 Säule für Cytosol eines Wildtypstammes. Gezeigt ist FRQ (oben) und WC-2 (unten).

Im Cytosol hingegen findet man kein WC-1 (siehe Abbildung 6). Trotzdem ist das Elutionsverhalten von WC-2 im Vergleich zu Totalextrakten nicht wesentlich verändert. Beide Komplexe existieren also auch im Cytosol. FRQ verhält sich in Totalextrakten, im Cytosol und in Kernextraktion genau gleich.

5.1.5) Die Stöchiometrie des WCC

Als nächstes sollte die genaue Stöchiometrie des WCC untersucht werden. Dazu wurde aus einem Kernextrakt WC-1 quantitativ gefällt (siehe Abbildung 7). WC-2 konnte mitgefällt werden. Jedoch verblieben ungefähr 1/3 im Überstand. Mit Hilfe der Quantifizierungsdaten lässt sich die Stöchiometrie des WCC bestimmen. Schließlich kann man auch die genaue Zusammensetzung eines Komplexes abschätzen, da die Größe des WCC bekannt ist.

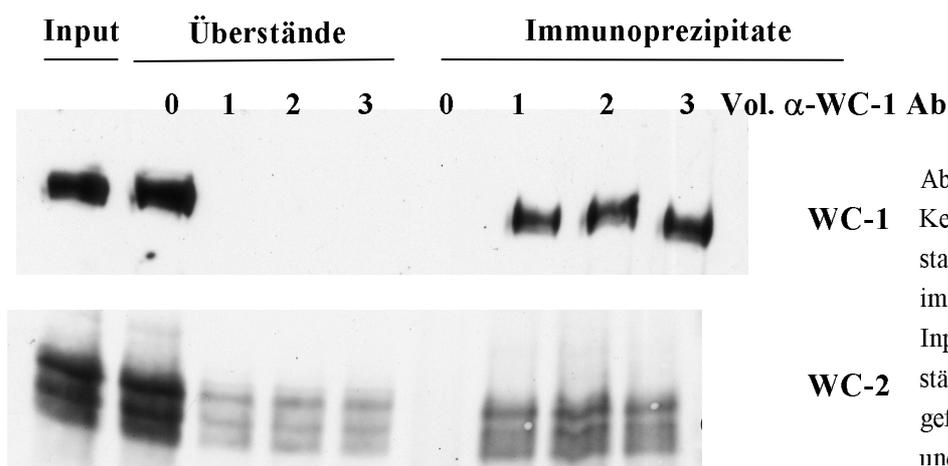


Abb. 7:
WC-1 Kernextrakte eines Wildtypstammes wurden mit α -WC-1 immungefällt. Gezeigt ist der Input der Reaktion, die Überstände der Fällung sowie das gefällte Material in α -WC-1 und α -WC-2.

Da im Kern WC-1 zu WC-2 wie 1:3 vorliegt und nur 2/3 des WC-2 mit WC-1 co-immungefällt werden können, beträgt die Stöchiometrie des WCC 1:2. Demnach kommen im Komplex auf 1 WC-1 Molekül 2 WC-2 Moleküle. Der Komplex hat eine Größe von 440 kDa. Er enthält somit wahrscheinlich 2 Moleküle WC-1 und 4 Moleküle WC-2. Das ergibt eine ungefähre Größe von 540 kDa.

Beachtet werden sollte auch die Tatsache, dass phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes WC-2 gleich verteilt ist. Es gibt im WCC keine Präferenz für eine Spezies. Auch freies nukleäres WC-2 liegt phosphoryliert und nicht phosphoryliert vor. Darauf wird später noch genauer eingegangen.

5.1.6) Die Phosphorylierung von WC-2: Im Cytosol und im Kern

Uns fiel auf, dass die elektrophoretische Mobilität von WC-2 im Kern anders ist als die im Cytosol. Dies sollte näher charakterisiert werden.

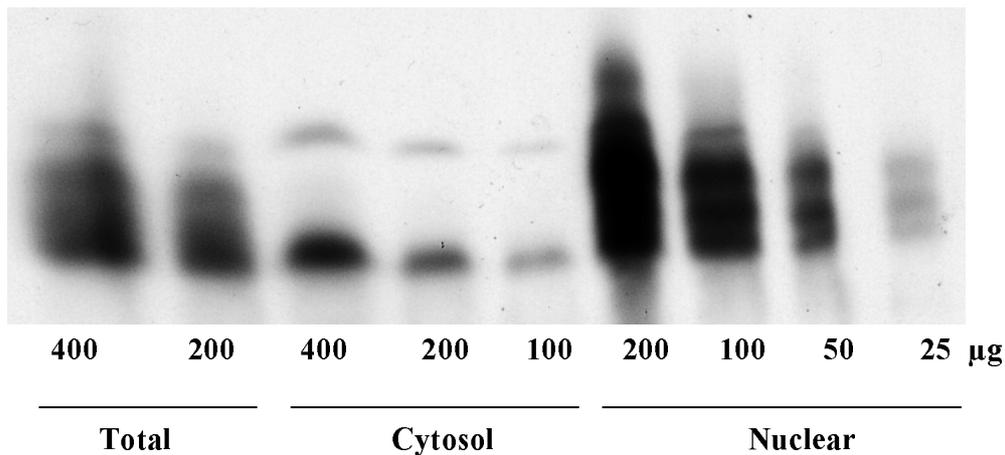


Abb. 8:

Analyse von WC-2 auf einem sehr langem Gelsystem. Gezeigt sind Totalhomogenate in 2 verschiedenen Mengen, Cytosol in 3 verschiedenen Mengen sowie 4 verschiedene Mengen an Kernfraktion. Dabei fällt deutlich die veränderte elektrophoretische Mobilität von WC-2 im Cytosol im Vergleich zum Kern auf. Das gezeigte Gel entspricht dem unteren Teil von Abbildung 1.

Es wurden Aliquots von Totalhomogenat, Cytosol und Kernextrakt auf einem sehr langem Gelsystem analysiert (siehe Abbildung 8). Es fiel auf, dass WC-2 im Cytosol als einheitliche Bande aufgelöst wurde, während in Totalhomogenaten, nicht jedoch in Totalextrakten und ebenso auch im intakten Kernen mindestens 3 höchstens jedoch 5 Banden sichtbar waren.

Dephosphorylierung von nukleärem WC-2

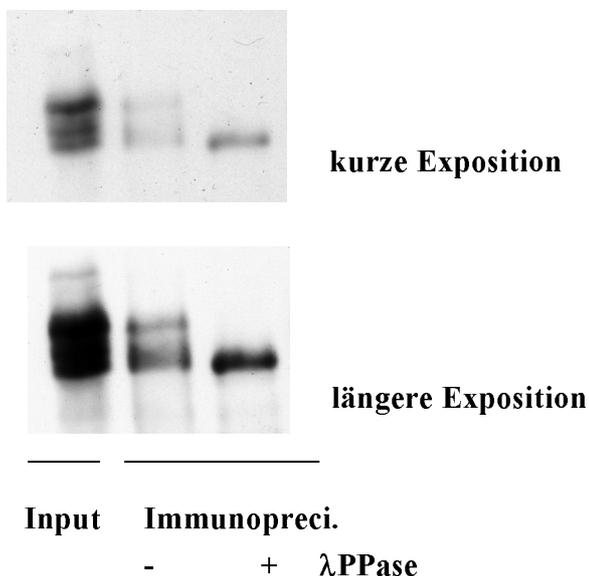


Abb. 9:

Dephosphorylierung von Kernextrakten. Wildtypkernextrakte wurden mit α -WC-2 immungefällt und anschließend mit λ -Phosphatase behandelt. Dabei sieht man, dass die veränderte elektrophoretische Mobilität auf Phosphorylierung von WC-2 zurückzuführen ist.

Es sollte untersucht werden, ob es sich dabei um Phosphorylierungen handelt. Dazu wurden mehrere Aliquots von Kernextrakt mit einem α - WC-2 Antikörper gefällt (siehe Abbildung 9). Dann wurden ein Aliquot als Negativkontrolle nur mit dem entsprechenden Puffer versetzt. Die anderen beiden wurden mit λ - Phosphatase behandelt. Eines davon enthielt noch zusätzlich 40 mM Vanadat (nicht in der Abb. enthalten) als Inhibitor. Man erkennt deutlich, dass es sich tatsächlich um Phosphorylierung handelt, da sich die elektrophoretische Mobilität durch Phosphatasebehandlung verändert.

5.1.8) Die Phosphorylierung von WC-2: Abhängigkeit von WC-1

Als nächstes sollte untersucht werden, wovon die Phosphorylierung von WC-2 abhängt. Es lag nahe zunächst die Abhängigkeit von WC-1 zu untersuchen. Dazu wurden Kernextrakte von Wildtyp und $\Delta wc-1$ untersucht (siehe Abbildung 10). Es ist klar erkennbar, dass in einem $\Delta wc-1$ Stamm, WC-2 nicht phosphoryliert vorliegt.

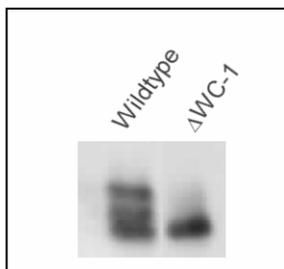


Abb. 10:
Wildtyp und $\Delta wc-1$ Kernextrakte im Vergleich von WC-2.
Im $\Delta wc-1$ Stamm ist WC-2 nicht phosphoryliert.

5.1.9) Die Phosphorylierung von WC-2: Abhängigkeit von Licht

Wichtig ist es nun zu untersuchen, ob es sich bei der Phosphorylierung von WC-2 um ein rein lichtabhängiges Phänomen handelt. Die lichtabhängige Phosphorylierung von WC-1 und WC-2 wurde bereits mehrfach beschrieben. Dazu wurde eine Lichtinduktion vorgenommen (siehe Abbildung 11). Zunächst einmal sieht man, dass beide Proteine auch in kompletter Dunkelheit teilweise phosphoryliert vorliegen. Nach einer kurzen Lichtinduktion wird WC-1 wie bereits beschrieben schnell hyperphosphoryliert und abgebaut. Nach 60 Minuten hat bereits die Neusynthese von WC-1 begonnen. WC-2 hingegen verhält sich ganz anders. Es wird nur minimal als Konsequenz der Lichtinduktion phosphoryliert. Die Kinetik der Phosphorylierung ist viel langsamer und korreliert mit der Neusynthese von FRQ. Wir schlagen daher vor, dass WC-2 nur minimal lichtabhängig phosphoryliert wird. WC-1 hingegen wird klar lichtabhängig phosphoryliert. Beide Proteine weisen eine ganz unterschiedliche Kinetik der lichtabhängigen Phosphorylierung auf. Vielmehr scheint WC-2 FRQ abhängig phosphoryliert zu werden. Daher sollte untersucht werden, ob und inwiefern die Phosphorylierung von WC-2 von FRQ abhängt.

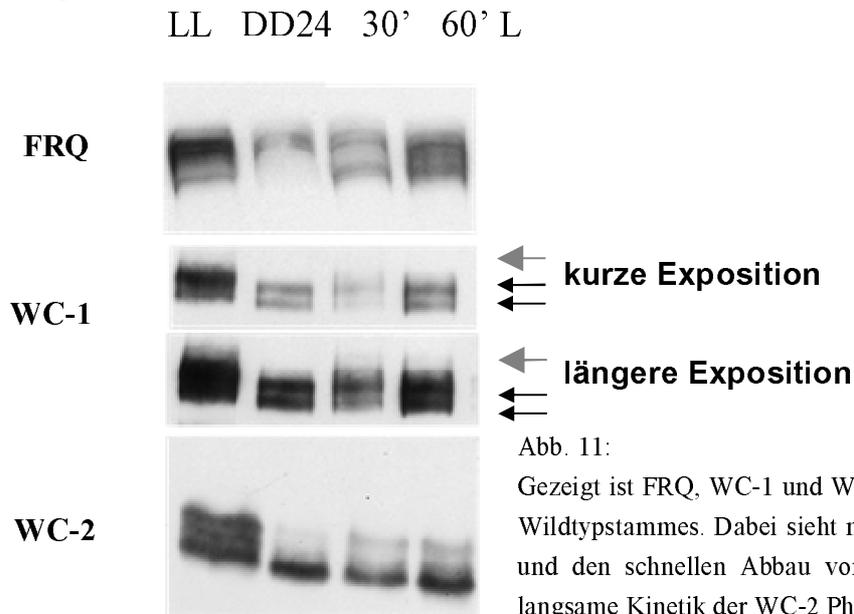


Abb. 11:

Gezeigt ist FRQ, WC-1 und WC-2 bei einer Lichtinduktion eines Wildtypstammes. Dabei sieht man die schnelle Phosphorylierung und den schnellen Abbau von WC-1. Im Vergleich dazu die langsame Kinetik der WC-2 Phosphorylierung.

5.1.10) Die Phosphorylierung von WC-2: Abhängigkeit von FRQ

Untersucht wurden Kernextrakte von Wildtyp, Δfrq , frq^o und $\Delta wc-2$ Stämmen. Die Analysen zeigen, dass sowohl WC-1 als auch WC-2 in den frq -defizienten Stämmen Δfrq und frq^o nicht in gleichem Maße phosphoryliert sind wie im Wildtyp (siehe Abbildung 12).

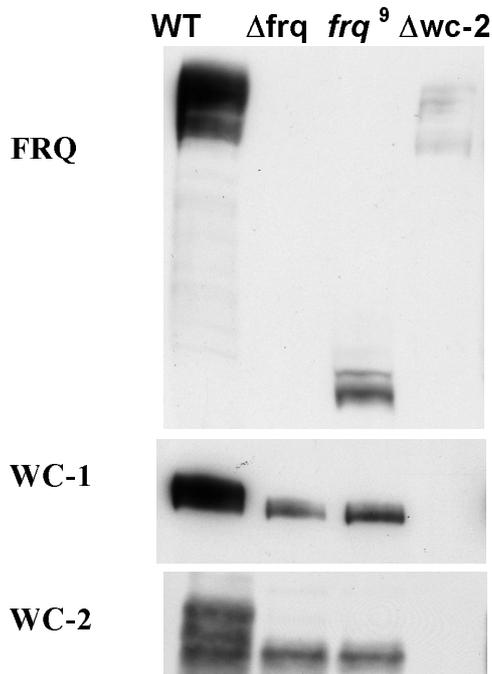
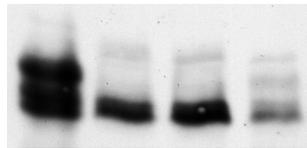


Abb. 12:

Gezeigt sind Kernextrakte von Wildtyp, Δfrq , frq^o und $\Delta wc-2$ Stämmen im Bezug auf FRQ, WC-1 und WC-2. Man erkennt, dass sowohl WC-1 als auch WC-2 in einem Δfrq und im frq^o Stamm nicht phosphoryliert sind.

Somit ist die Phosphorylierung von WC-2 und WC-1 abhängig von FRQ. Besonders interessant war die Analyse des WC-1 in einem Rip Stammes von Macino. Hier ist WC-1 durch das Einführen von Punktmutationen zerstört und fast nicht mehr funktionell. Es unterstützt im Licht jedoch noch die Synthese von FRQ, so dass in Dauerlicht gewachsene Zellen das gleiche FRQ Level wie der Wildtyp aufweisen. Hier zeigt sich ein interessantes Phosphorylierungsmuster von WC-2. Es entspricht nicht dem Wildtyp, sieht jedoch auch anders aus als im $\Delta wc-1$ oder Δfrq Stamm. Damit ist klar gezeigt, dass die Phosphorylierung

von WC-2 sowohl von WC-1 als auch von FRQ abhängt. In einem Δ WC-1 und in einem Δ FRQ Stamm addieren sich beide Effekte, wohingegen in einem WC-1 Rip Stamm nur der WC-1 Effekt zu sehen ist (siehe Abbildung 13).



WT *frq*⁹ *frq*¹⁰ wc-1 Rip

Abb. 13:

Gezeigt ist die Phosphorylierung von WC-2 im Wildtyp, *frq*⁹, *frq*¹⁰ und im wc-1 Rip Stamm.

Als nächstes wurden 2D Gel Elektrophorese Analysen durchgeführt, um die Phosphorylierung genau charakterisieren zu können. Zunächst wurden Wildtyp Kerne sowie *frq*⁹ Kerne untersucht (siehe Abbildung 14).

Bei den Wildtyp Kernen erkennt man deutlich 7 Spots. Mit Hilfe von CIP Experimenten konnte gezeigt werden, dass einer davon dem unphosphorylierten WC-2 entspricht. Somit

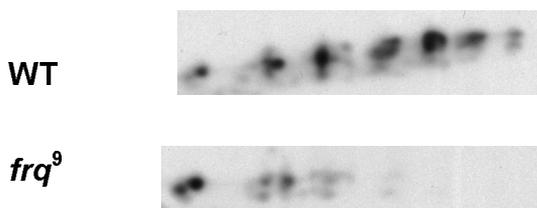


Abb. 14:

2D Gelanalyse von Wildtyp und *frq*⁹ WC-2 aus Kernextrakten. Man erkennt im Wildtyp 6 im *frq*⁹ 2 Phosphorylierungen.

weist WC-2 6 Phosphorylierungsstellen auf. In einem *frq*⁹ Stamm findet man noch 3, somit unphosphoryliertes und ein- und zweifach phosphoryliertes WC-2.

In einem *frq* defizienten Stamm findet man noch 2 Phosphorylierungen. Somit hängen vier der sechs Phosphorylierungen von WC-2 von FRQ ab.

5.1.11) Die FRQ abhängige Phosphorylierung erfolgt nur im WCC

In einem Δ wc-1 Stamm wurde FRQ mit QA induziert (siehe Abbildung 15). Es wurden dadurch Wildtyplevel an FRQ nach der Induktion erreicht. Die Phosphorylierung von WC-2 veränderte sich hingegen nicht. Somit induziert FRQ zwar die Phosphorylierung von WC-2 im WCC nicht jedoch von WC-2 allein. Somit war alles phosphorylierte WC-2 im Kern

einmal im WCC. Wird WC-1 abgebaut liegt phosphoryliertes WC-2 frei vor.

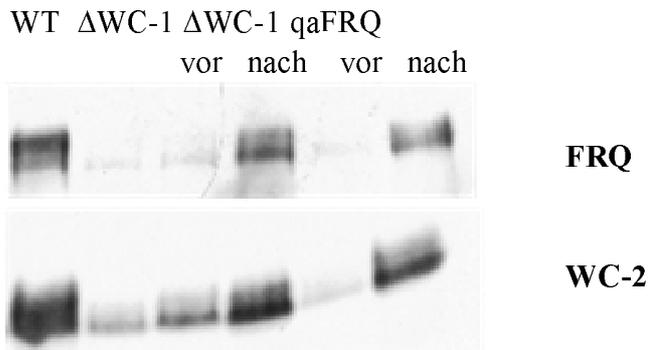


Abb. 15:

In einem Δ wc-1 Stamm wurde FRQ induziert. Man erreicht nach der Induktion Wildtyplevel (WT) an FRQ (oberer Teil der Abbildung). Die Phosphorylierung von WC-2 verändert sich dadurch nicht (unterer Teil der Abbildung).

5.2) Funktionen der Phosphorylierung

Tragen wir zunächst einmal zusammen, was wir bereits über die Phosphorylierung von WC-2 wissen. Die Phosphorylierung ist abhängig sowohl von WC-1 als auch von FRQ. Sie ist nicht unmittelbar abhängig von Licht, sondern folgt in der Kinetik eher der Anwesenheit von FRQ. Sie ist nicht notwendig für die Assemblierung mit WC-1 und sie hat nichts mit dem Transport in den Kern zu tun. Die einzig logische Schlussfolgerung wäre demnach, dass sie die Aktivität des WCC reguliert.

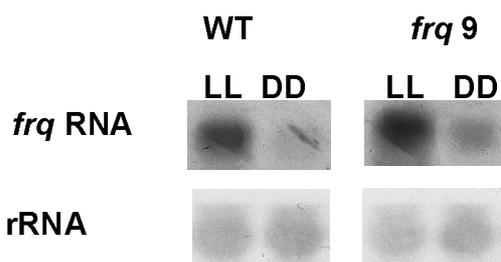


Abb. 16:

Northern Blot Analyse von *frq* RNA im Vergleich zu rRNA im Wildtyp und *frq*⁹. *frq*⁹ weist deutlich höhere *frq* RNA Level als der Wildtyp sowohl im LL als auch im DD (DD28) auf.

Als nächstes wurden daher *frq* RNA von Wildtyp und von *frq*⁹ unter Dauerlicht (LL) und Dauerdunkel (DD28) präpariert und mittels Northern Blotting analysiert (siehe Abbildung 16). Hier ist klar zu erkennen, dass in einem *frq*⁹ Stamm, der viel weniger WCC als der Wildtyp enthält, der nicht phosphoryliert vorliegt, deutlich mehr *frq* RNA im Licht und auch im Dunkel gebildet wird. Die Synthese von *frq* RNA ist strikt abhängig vom WCC, in KO Stämmen wird keine *frq* RNA gebildet. Somit sollte weniger WCC weniger *frq* RNA bedeuten. Dies ist erstaunlicherweise jedoch nicht der Fall. Im Gegenteil wird im *frq*⁹ Stamm mehr *frq* RNA gebildet. Der einzig erkennbare Unterschied ist der Phosphorylierungsstatus des WCC. Der nicht phosphorylierte WCC ist eindeutig transkriptionell aktiv. Er scheint sogar

deutlich aktiver zu sein als der phosphorylierte Komplex des Wildtyps. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung die Aktivität des WCC reguliert. Je stärker der WCC phosphoryliert ist, desto inaktiver scheint er zu sein.

Die Funktion von FRQ scheint es demnach zu sein, über die Induktion der Phosphorylierung von WC-2 und WC-1 die Aktivität des WCC zu regulieren.

5.2.1) Kinetiken

Es läge demnach auf der Hand, dass die Phosphorylierung des WCC circadian reguliert wird. Um dies zu untersuchen, wurde ein circadianer Tag fraktioniert und Kernextrakte analysiert (siehe Abbildung 17). Hier war auffällig, dass in Kernextrakten die Menge an FRQ nicht der gleichen Art von Schwankung unterliegt wie in Totalextrakten. Zwar verändert sich das Phosphorylierungsmuster circadian, die Absolutmenge bleibt jedoch relativ konstant. Damit folgt für unsere Quantifizierung, die ja unter Dauerlichtbedingungen durchgeführt wurde, dass die Werte absolute Höchstwerte sind und dass innerhalb eines circadianen Tages FRQ weitaus geringer vorliegt. Somit ist das Verhältnis von 6 WCC zu 1 FRQ, welches in Dauerlicht bestimmt wurde, deutlich niedriger liegt als die Verhältnisse während eines circadianen Tages.

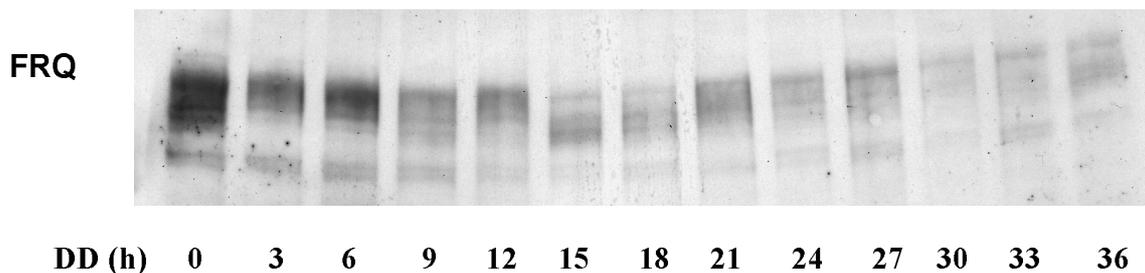


Abb. 17:

FRQ in Kernextrakten im Vergleich eines circadianen Tages. FRQ Level variieren nicht sehr stark, lediglich das Phosphorylierungsmuster verändert sich.

Die Phosphorylierung von WC-2 schwankt zwar, ist jedoch nicht eindeutig circadian reguliert (siehe Abbildung 18).



Abb. 18:

Die WC-2 Phosphorylierung verändert sich nicht circadian. Dargestellt ist ein circadianer Tag von LL, DD3, 6, 9 bis DD 48.

Betrachtet man die drei extremen Zeitpunkte eines circadianen Tages, also lichtgewachsene Zellen, DD16 (maximale Transkription) und DD28 (maximale Repression der Transkription), so sieht man jedoch, dass zu Zeiten, wenn die Transkription maximal reprimiert ist, der WCC deutlich stärker phosphoryliert ist (siehe Abbildung 19). Demnach ist die Phosphorylierung des WCC mit den hier verwendeten Methoden zwar nicht circadian auflösbar, sie korreliert aber dennoch mit der unterschiedlichen Aktivität des WCC im Verlauf eines circadianen Tages.

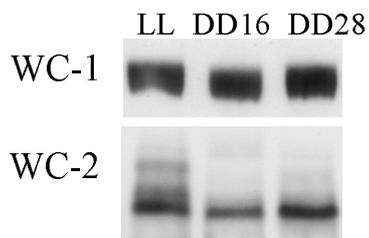


Abb. 19:

WC-1 und WC-2 an den drei extremen Zeitpunkten eines circadianen Tages: LL, DD16 (maximale Transkription) und DD28 (maximale Repression der Transkription).

Man erkennt deutlich die unterschiedliche Phosphorylierung von WC-2.

5.2.2) Induktion von FRQ in *frq*⁹

Um die Aktivität des WCC genauer zu untersuchen, wurde ein Wildtyp *frq* Allel unter Kontrolle des regulierbaren *qa-2* Promotors in einem *frq*⁹ Stamm exprimiert. Nach Induktion der FRQ Synthese mit Chinasäure wurde die Expression von FRQ (siehe Abbildung 20) und die Expression von *frq*⁹ RNA (siehe Abbildung 21) über eine Zeitdauer von 8 h im Licht und im Dunkeln verfolgt. Man sieht in den Totalextrakten deutlich die leaky Expression bei 0 h. Bei 2 h wird schon deutlich FRQ gebildet. Die Menge an FRQ steigt kontinuierlich an, während die Menge an *FRQ*⁹ konstant bleibt. Von diesen Zeitpunkten wurde ebenfalls RNA hergestellt und fraktioniert.

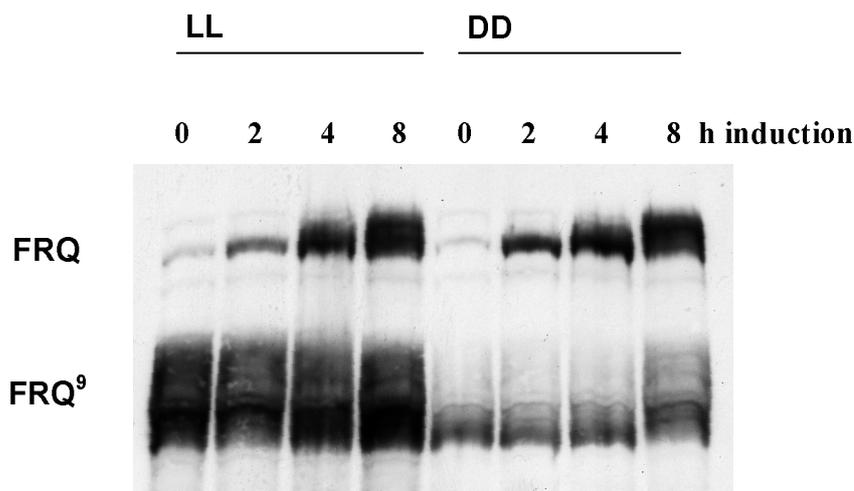


Abb. 20:

Die Induktion von FRQ in *frq*⁹. Wird zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von QA in Totalextrakten verfolgt. Man erkennt die leaky Expression zum Zeitpunkt 0 und dann die stufenweise Induktion mit zunehmender Menge an FRQ bis zum Zeitpunkt von 8 h.

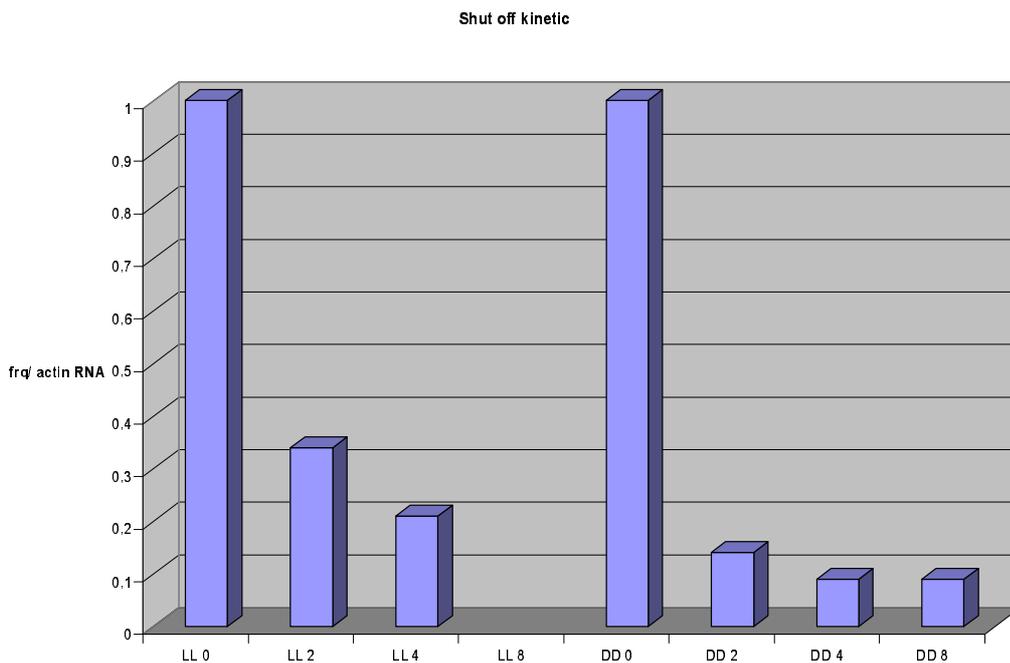


Abb. 21:

Die endogenen *frq* mRNA Level bei Induktion von FRQ in *frq*⁰ im Licht (LL0, LL2, LL4 und LL8) und im Dunkeln (DD0, DD2, DD4 und DD8).

In den RNA Proben wurde folgendes getestet. Das induzierbare wt-*frq* Allel enthält nur den FRQ ORF. Daher kann die induzierbare wt *frq* RNA nur durch Sonden innerhalb des ORF's detektiert werden. Im Gegensatz dazu wird das endogene *frq*⁰ Allel unter Kontrolle des *frq* Promotors exprimiert und ist daher abhängig vom WCC. Die *frq*⁰ RNA kann spezifisch durch Sonden im 5' UTR verfolgt werden. Um nun die Aktivität des WCC zu messen wurde eine Sonde im 5'UTR von *frq*⁰ verwendet (siehe Abbildung 21). Man erkennt, dass mit zunehmender FRQ Induktion die Menge an *frq*⁰ RNA abnimmt. Schon nach 2h Induktion ist die Menge an *frq*⁰ RNA drastisch reduziert.

In den Kernextrakten sieht man nicht den gleichen Anstieg von FRQ wie in den Totalextrakten (siehe Abbildung 22). Man sieht hier bei 0 h keine leaky Expression. Nach 4 h ist das Maximum von FRQ im Kern erreicht. Von 4 bis 8 h steigt FRQ im Kern nicht weiter an. Gleichzeitig, wenn man sich die *frq*⁰ RNA Daten betrachtet, wird der WCC auch nicht weiter inhibiert. Die Inhibition ist nach 4 h maximal, obwohl FRQ im Totalextrakt noch weiter ansteigt. Im Kern hingegen scheint es eine Maximalmenge an FRQ zu geben, die nicht überschritten wird.

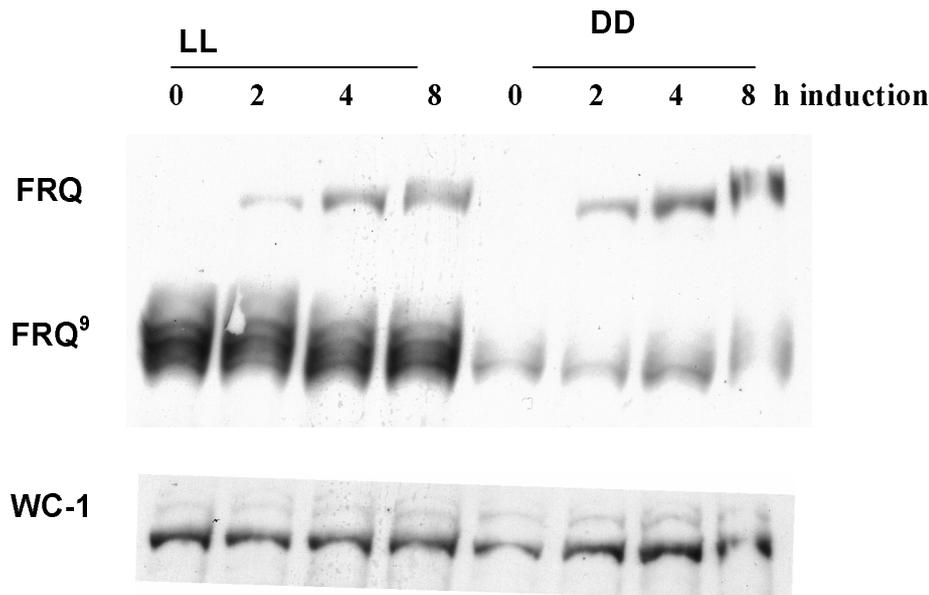


Abb. 22:

Kernextrakte der Induktion von FRQ in einem *frq*[°] Stamm. Dargestellt ist FRQ und WC-1. Während WC-1 konstant bleibt, nimmt FRQ ständig zu. Allerdings ist nach 4 Stunden im Vergleich zu 8 Stunden keine weitere Zunahme mehr zu verzeichnen.

Betrachtet man nun die Phosphorylierung des WCC, so sieht man dass mit zunehmender Inhibition auch die Phosphorylierung von WC-2 zunimmt (siehe Abbildung 23).

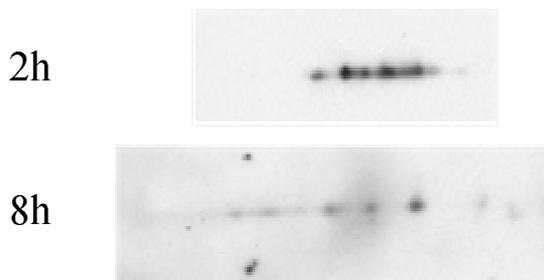


Abb. 23:

2D Gelanalyse von WC-2 während der Induktion von FRQ im *frq*[°] Stamm. Schon 2 Stunden nach der Induktion erkennt man deutlich mehr Phosphorylierungen als in einem *frq*[°] Stamm (der nur 2 Phosphorylierungen besitzt).

5.2.4) Bindung des WCC an den *frq* Promotor

Mit Hilfe von Elektrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA's) sollte die Aktivität des WCC genauer charakterisiert werden. Zunächst wurde die Technik etabliert. Als Probe wurde die distale LRE des *frq* Promotors mit γ -32 ATP markiert verwendet. Dieses wurde mit Wildtyp oder *frq*[°] Kernextrakt inkubiert. Zusätzlich wurden unterschiedliche Mengen an spezifischen oder aber unspezifischen nicht radioaktiven Oligo mitinkubiert.

Die Ansätze wurden auf einem Nativgel aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert (siehe Abbildung 24).

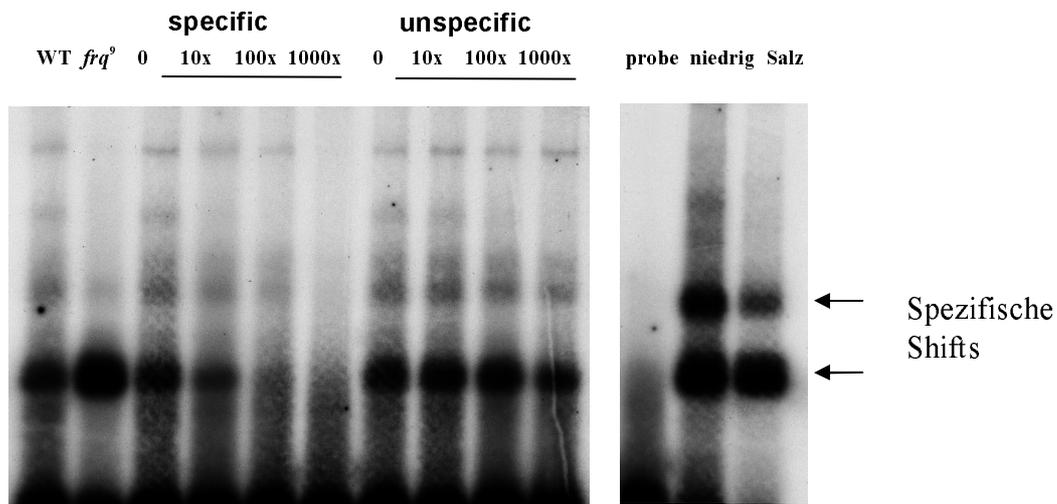


Abb. 24:

EMSA mit Probes des distalen LRE des *frq* Promotors. Der EMSA wurde mit Wildtypkernextrakten und *frq*⁹ Kernextrakt durchgeführt. Dargestellt ist die spezifische Inhibition mit dem gleichen, ungelabelten Oligo und die unspezifische Inhibition durch ein anderes Oligo.

Im unteren Bereich erkennt man die freie Probe. Darüber sind 4 Shifts zu erkennen, von der erste und der zweite Shift spezifisch sind. Im Fall der spezifischen Inhibition mit ungelabeltem Oligo verschwinden beide Shifts, während dies bei unspezifischer Inhibition durch ein anderes ungelabeltes Oligo nicht der Fall ist. Man erkennt deutlich, dass der *frq*⁹ Kernextrakt aktiver ist. Er produziert bei gleicher Menge eingesetztem Kernextrakt einen stärkeren Shift. Die letzten beiden Spuren zeigen Wildtyp und *frq*⁹ Kernextrakt mit niedrig Salz EMSA Puffer (40 mM anstelle von 100 mM KCl). Hier kommen die spezifischen Shifts deutlicher zur Geltung.

5.3) Die Phosphorylierungsstellen

Um die potentiellen 6 Phosphorylierungsstellen innerhalb von WC-2 zu identifizieren, wurde zunächst die Sequenz von WC-2 betrachtet. Es wurde Gebrauch von 2 verkürzten WC-2 Mutanten gemacht, die bereits im Labor vorhanden waren (siehe Abbildung 25) (Linden et al. 1997). Die G3 Mutante endet kurz vor der Zinkfinger Domäne von WC-2 und die T13 Mutante endet innerhalb des Zn- Fingers. Diese beiden Mutanten wurden auf ihre Phosphorylierung hin untersucht.

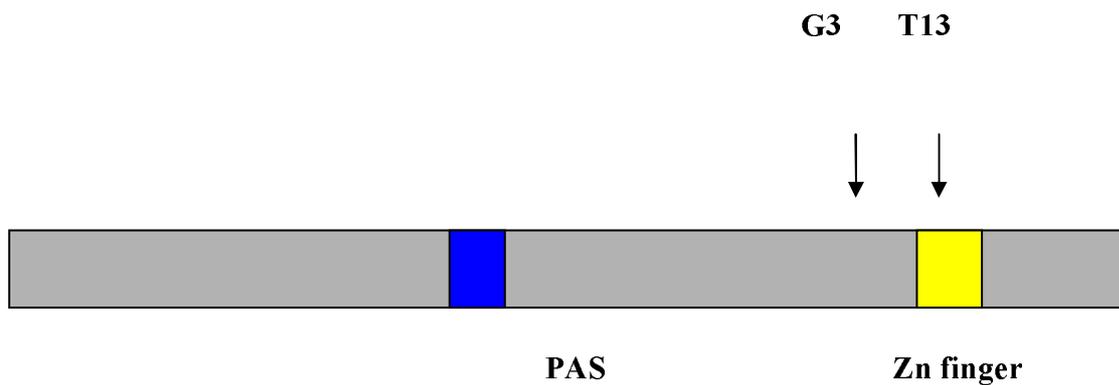


Abb. 25:

Schematische Darstellung von WC-2 mit der PAS Domäne und dem Zn-Finger Motif. Eingezeichnet sind die vorzeitigen Stops bei der G3 und der T13 Mutante.

Es stellte sich heraus, dass beide deutliche Phosphorylierungsdefekte aufwiesen (siehe Abbildung 26). Deshalb wurde die Sequenz von G3 bis zum Ende von WC-2 auf potentielle Phosphorylierungsstellen mit Hilfe eines Computerprogramms untersucht.

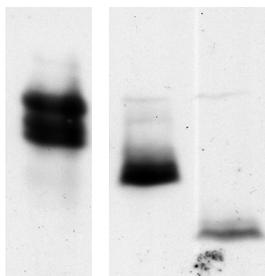


Abb. 26:

Phosphorylierungsdefekte bei der T13 und G3 Mutante. Dargestellt sind Kernextrakte vom Wildtyp im Vergleich zu T13 und G3.

WT T13 G3

In diesem Computerprogramm werden die einzelnen Stellen, aufgrund der umgebenden Sequenzen, nach Phosphorylierungswahrscheinlichkeiten untersucht. Außerdem werden die potentiellen Kinasen identifiziert. In unserem Fall handelt es sich um 8 putative Phosphorylierungssequenzen (siehe Abbildung 27). Von diesen weisen aber nur 4 eine signifikante Wahrscheinlichkeit auf, so dass nur diese Sequenzen für die nachfolgende Analyse durch Punktmutationen in Betracht gezogen wurden. An diesen Stellen wurden mit Hilfe eines Mutagenesekits Punktmutationen eingeführt, die das Ser, Thr oder Tyr zu Ala oder zu Glu verändern. Dadurch sollte die unphosphorylierte bzw. die phosphorylierte Version von WC-2 nachgeahmt werden.

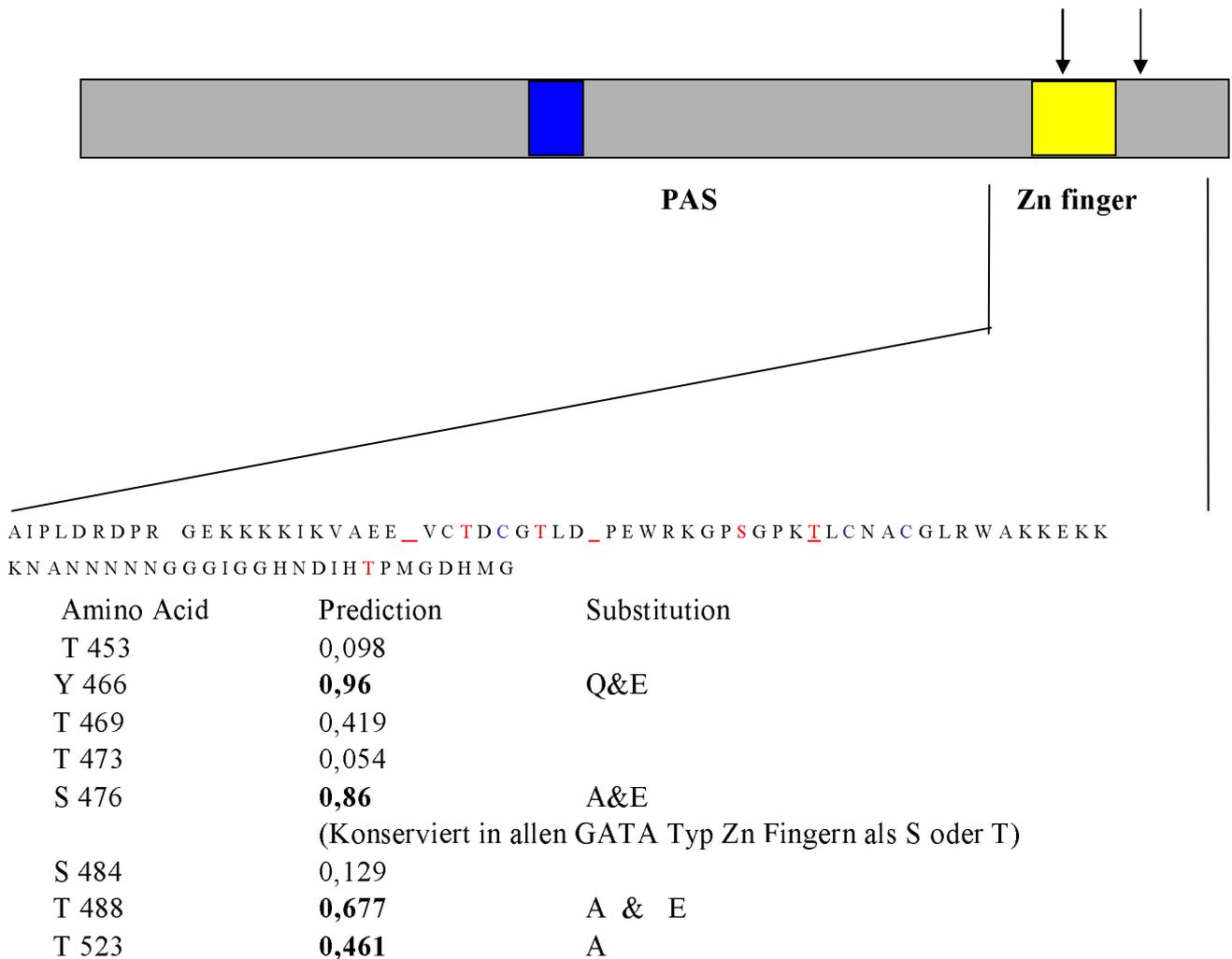


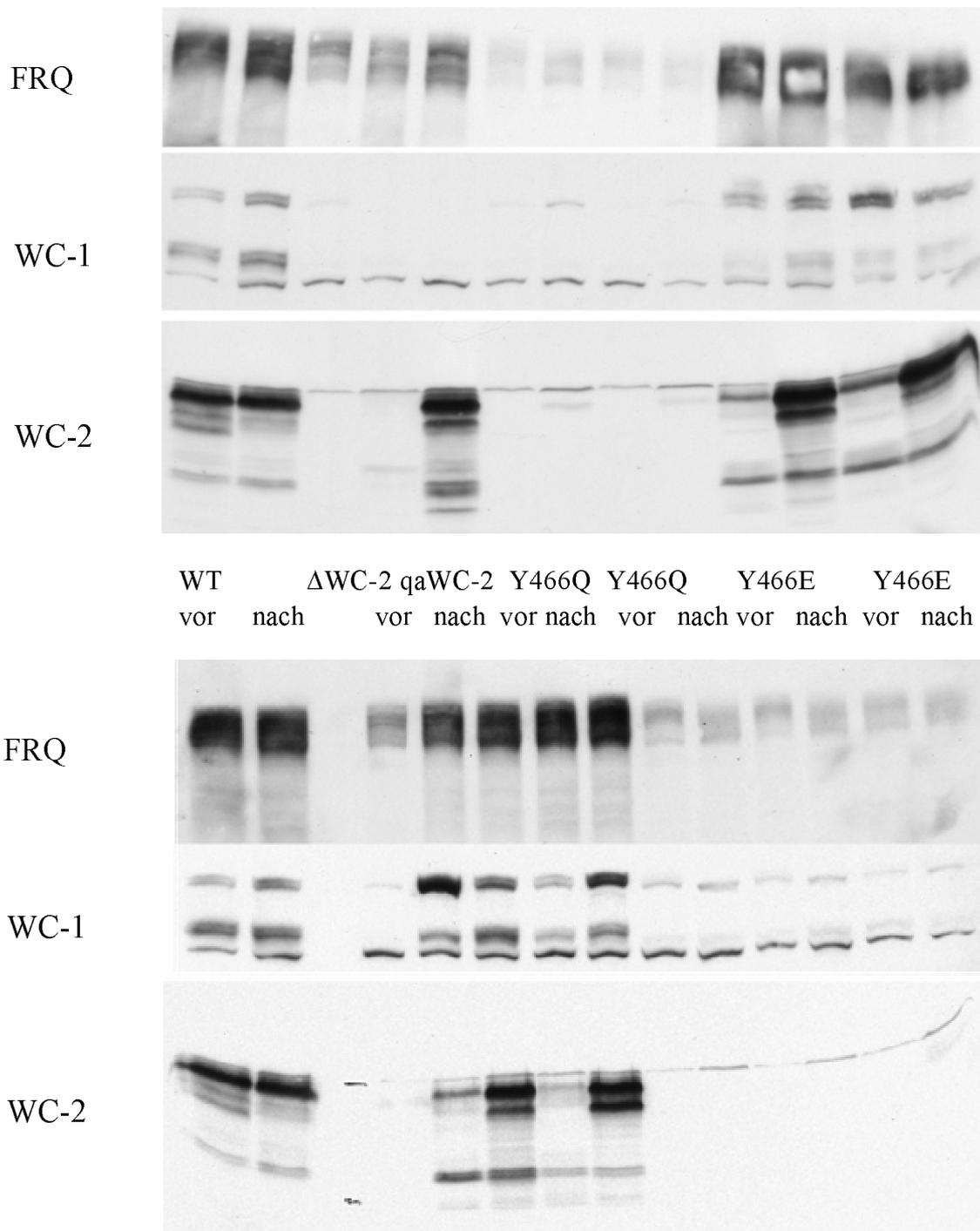
Abb. 27:

Schematische Darstellung von WC-2. Eingezeichnet sind in Rot alle potentiellen Phosphorylierungsstellen. Darunter ist eine Tabelle mit der Phosphorylierungswahrscheinlichkeit der jeweiligen Stelle berechnet mit einem Computerprogramm (NetPhos). Gekennzeichnet sind die Stellen, die ersetzt wurden.

Es wurden insgesamt 7 Punktmutanten von WC-2 hergestellt und in den Δ WC-2 Stamm QA induzierbar eingeführt. Die entsprechenden Stämme wurden homokaryotisch gemacht und analysiert. Die Analyse umfasste physiologische Parameter wie die Funktionalität mit Hilfe von Racetube Assays und proteinbiochemische Parameter wie die Expression von FRQ und WC-1 (siehe Abbildung 28) sowie die Phosphorylierung des WCC. Außerdem wurde molekularbiologisch die putative Stabilität des WC-2 untersucht, in dem auf Anwesenheit der putativen Polyadenylierungsstellen mit Hilfe von PCR getestet wurde. Dabei stellte sich heraus, dass in einem Teil unserer Mutantanten die polyA Sites nicht vorhanden waren. Das waren auch gleichzeitig die Mutantanten die nicht stabil exprimiert wurden. Diese wurden in der weiteren Analyse zunächst einmal nicht weiter berücksichtigt.

Nicht berücksichtigt werden damit die folgenden Mutantanten Y466Q, S476E und T488A.

Zunächst einmal wurde die Rhythmizität und die Expression von FRQ und WC-1 betrachtet. Die Mutante Y466E wurde deutlich stärker als der Wildtyp exprimiert. Schon die leaky Expression reichte aus, um FRQ und WC-1 zu induzieren wie im Wildtyp. Damit sind diese Stämme auch auf Racetubes ohne QA schon rhythmisch. Das gleiche gilt für S476A. Bei beiden Mutanten zeigt sich, dass weniger als die Wildtypmenge an WC-2 ausreichen für normales Physiologie. Die Mutante T488E wird signifikant exprimiert. Sie zeigt vor und nach der Induktion Wildtypmengen an FRQ und WC-1. Auf Racetubes ist sie rhythmisch. Die Mutante T523A verhält sich etwas anders. Hier sind nur nach der Induktion Wildtypmengen an WC-1, wobei FRQ schon vor der Induktion die Wildtypmenge erreicht. Auch diese Mutante ist rhythmisch. Von allen Mutanten wurden mindestens 2 unabhängige Klone betrachtet. Alle Punktmutanten von WC-2 sind rhythmisch. Untersucht man jedoch die Phasen der einzelnen Mutanten, so sieht man interessante Unterschiede zum Wildtyp.



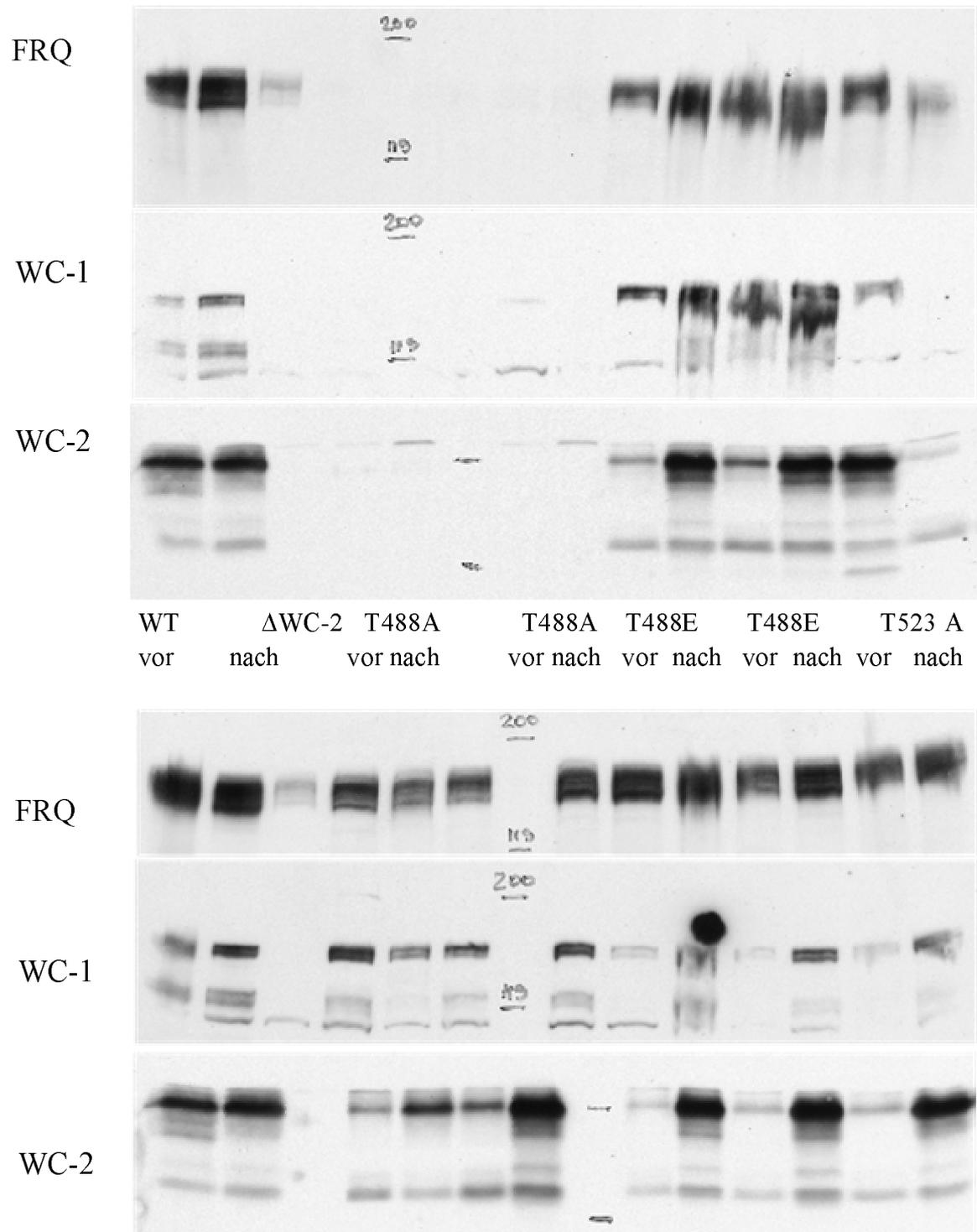


Abb. 28:

Analyse der WC-2 Punktmutanten auf FRQ, WC-1 und WC-2 Expression. Dargestellt sind die Wildtypzellen, der Δ WC-2 Stamm sowie die Mutanten vor und 6h nach der Induktion. Man erkennt, dass einige Mutanten so gut wie nicht exprimiert werden. Das sind die Mutanten denen die putativen polyA sites fehlen.

5.4. Aufreinigung von WC-2 über ein TAP Tag

Hierzu wurde das TAP Tag intern in den BstXI Schnitt in WC-2 eingesetzt (siehe Abbildung 29).

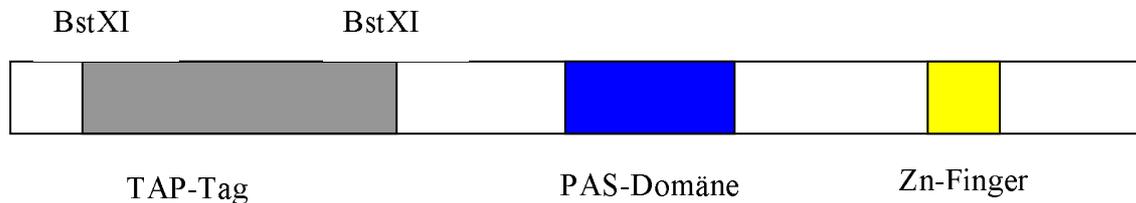


Abb. 29: Schematische Darstellung des TAP getaggen WC-2 Proteins

Der Vektor wurde in einen Δ WC-2 Stamm integriert und aus diesem wurde WC-2 nach Induktion mit QA aufgereinigt. Das TAP-Tag WC-2 band sehr gut an die IgG beads und lies sich sehr gut aufreinigen (siehe Abbildung 30).

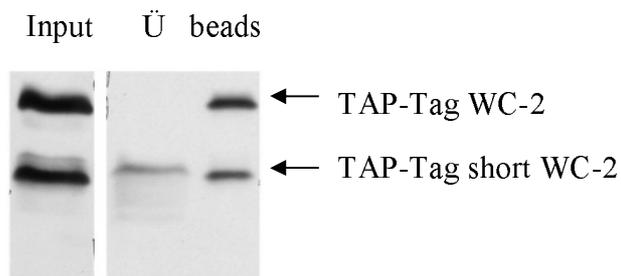


Abb. 30:
Aufreinigung von TAP-Tag WC-2
Dargestellt ist der Input, der Überstand und das gebundene Material.

5.5) Ausblick

Nachfolgend sollten noch folgende Analysen durchgeführt werden. Zunächst einmal müssen die Punktmutanten von WC-2 noch genauer charakterisiert werden. Dazu gehört auch eine 2D Gelanalyse. Dabei lässt sich erkennen, ob es sich bei den jeweiligen Aminosäuren tatsächlich um Phosphorylierungsstellen des WC-2 Proteins handelt. Die jeweils positiven Mutanten müssten dann detailliert charakterisiert werden. Dabei könnte die Stabilität des WC-2 Proteins in einem Cycloheximidexperiment gemessen werden. Die Lichtinduktion des WCC könnte gemessen werden, indem man den Anstieg der *frq* mRNA im Vergleich zu einem Wildtypstamm bestimmt. Dabei könnte auch die Retention des WCC in den Ausgangszustand der Lichtperzeption anhand der Abflachungskinetik bestimmt werden.

Das TAP-Tag WC-2 sollte in großen Mengen aufgereinigt werden. Damit könnte zum einen eine spektrale Analyse des WC-2 Proteins durchgeführt werden, um zu klären, ob WC-2 noch Co-Faktoren gebunden hat. Zum anderen könnten über Massenspektrometrie Analysen die Phosphorylierungsstellen bestimmt werden. Die entsprechenden Aminosäurereste sollten

dann, sofern noch nicht geschehen, ausgetauscht werden. Die Mutanten sollten dann umfassend charakterisiert werden.

Schließlich sollten die Komplexe genau untersucht werden. Auch das gelingt mit Hilfe des Tap-Tag WC-2. Wichtig ist die Natur des zweiten WC-2 Komplexes aufzuklären, der kein WC-1 enthält aber WC-1 abhängig gebildet wird. Dabei ist es auch wichtig zu erfahren, ob bereits Kinasen oder aber Phosphatasen an das WC-2 bzw. den WCC gebunden sind. Diese sollten dann genau charakterisiert werden. Dabei ist es essentiell zu erfahren, welche Bereiche des WCC sie phosphorylieren bzw. dephosphorylieren, wann genau und in Abhängigkeit wovon sie dies tun. Zum Schluß kann WC-2 oder aber der WCC kristallisiert werden. Damit kann die genaue Struktur und auch die Stöchiometrie des Komplexes bestimmt werden. Die genaue Struktur wäre sehr wichtig für das Verständnis der Funktionsweise des WCC.

Außerdem kann ein GFP-WC-2 Konstrukt hergestellt werden. Damit kann *in vivo* die Verteilung von WC-2 unter verschiedenen Bedingungen, wie z.B. während eines circadianen Tages, bei einem Lichtpuls o.ä. untersucht werden. Das ist sehr wichtig, da die Daten hier alles *in vitro* Daten sind und nichts über die Verhältnisse *in vivo* aussagen können.

Weiterhin wäre es interessant, die kurze Isoform von WC-2 zu untersuchen. Es ist nur bekannt, dass eine ca. 10-15 kDa kürzere Form von WC-2 existiert. Diese ist vermutlich am C-Terminus verkürzt. Es ist nicht bekannt, ob diese im WC- Komplex enthalten ist und welche Funktion sie erfüllt. Dies könnte untersucht werden. Ebenso ist nicht klar, ob es tatsächlich eine separate Form von WC-2 oder aber ein Abbauprodukt ist.

Alle diese Untersuchungen könnten sich nahtlos an die hier vorliegende Arbeit anschließen und Bestandteil oder aber Thema weiterer Doktorarbeiten oder Diplomarbeiten sein.

6) Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die molekulare Natur des negativen Feedbacks von FRQ auf den WCC aufgeklärt. Dies war bisher nicht bekannt. Publiziert war, dass FRQ einen stabilen Komplex mit dem WCC bildet und diesen so inaktiviert. Die Daten dafür waren, eine Co-Immundefällung und eine Hemmung des EMSA mit *in vitro* translatiertem WC-1 und WC-2 durch *in vitro* translatiertes FRQ (Froehlich, 2003). Es wurde nie gezeigt, dass eine solche Bindung von FRQ an den WCC zu einer Inaktivierung des WCC *in vivo* führt. Die Tatsache, dass FRQ nie in signifikantem Ausmaß mit dem WCC co-immungefällt werden konnte widersprachen hingegen diesem Modell. Das wurde jedoch nicht entsprechend diskutiert.

Hier wurde qualitativ und quantitativ gezeigt, dass FRQ keinen stabilen Komplex mit dem WCC bilden kann. Ein FRQ-WCC Superkomplex konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl verschiedene Methoden wie z.B. Gelfiltration, (Sedimentationsanalyse und Nativgelanalyse) sowie Co-Immundefällung verwendet wurden. Anhand der Quantifizierung ist klar ersichtlich, dass zu jedem circadianen Zeitpunkt der WCC in großem Überschuss zu nukleärem FRQ vorliegt. Auch daher kann keine Hemmung des WCC durch einen stabilen Komplex mit FRQ erfolgen. Vielmehr wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der WCC (WC-1 und auch WC-2) FRQ abhängig phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung ist in ihrer Kinetik klar von der lichtabhängigen Phosphorylierung zu trennen. Wir konnten weiterhin zeigen, dass es insgesamt 6 Phosphorylierungsstellen im WC-2 gibt, von denen 4 von FRQ abhängen.

Die hier gemachte Quantifizierung von FRQ, WC-1 und WC-2 ist zum einen genauer als die bisherigen und geht zum anderen über die bisher publizierten Quantifizierungen hinaus. Bisher hatte man die Uhrenproteine lediglich in Totalextrakten quantifiziert und ihre Verteilung zwischen Kern und Cytosol nicht beachtet. Hier wurde in Totalextrakten, im Kern und im Cytosol quantifiziert. Zudem ist die hier gemachte Quantifizierung genau, da Standards und zu quantifizierende Proben immer auf einem Gel analysiert wurden.

Eine weitere Studie von Liu et al quantifiziert WC-1 und WC-2 zueinander und kommt zu einem molaren Verhältnis von 1:5 und bestätigt somit das erste Ergebnis von Dennault et al.

In Totalextrakten haben wir FRQ:WC-1:WC-2 wie 4:1:5 bestimmt. Dies wurde 6fach verifiziert und kann als sehr genaues Ergebnis angesehen werden.

Da FRQ zu über 90% im Cytosol vorliegt, sind im Kern zu jedem Zeitpunkt eines circadianen Tages weit weniger FRQ vorhanden als WCC. Es ist also ausgeschlossen, dass ein 1:1 Komplex aus FRQ und WCC den WCC inhibiert. Zusätzlich lässt sich sagen, dass ein solcher Komplex mit keiner der verwendeten Methoden nachweisbar war. Mit einer Co-Immundefällung konnte eine kleine Menge des nukleären FRQ spezifisch mit dem WCC gefällt werden, jedoch reicht die Menge nicht aus, um die Hemmung des WCC durch FRQ zu erklären. Mit einer Gelfiltration, mit Sedimentationsanalyse oder aber mit Nativgelen war ein solcher Superkomplex nicht detektierbar.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es eine FRQ abhängige Phosphorylierung des WCC gibt. Dies betrifft die Phosphorylierung von WC-1 und von WC-2. In beiden Fällen war die FRQ abhängige Phosphorylierung klar von der lichtabhängigen Phosphorylierung getrennt. Bisher war lediglich eine lichtabhängige Phosphorylierung des WCC publiziert. Eine FRQ abhängige Phosphorylierung wurde noch nie untersucht, so dass unsere Daten einen völlig neuen Aspekt der Regulation aufzeigen. Vergleicht man eine lichtabhängige Phosphorylierung mit der FRQ abhängigen Phosphorylierung so sieht man völlig unterschiedliche Kinetiken. Die lichtabhängige Phosphorylierung von WC-1 erfolgt sehr

schnell und führt zu einem Abbau von WC-1. WC-2 wird akut nicht lichtabhängig phosphoryliert. FRQ wird jedoch auch lichtabhängig induziert. Als nächstes beobachtet man daher eine FRQ induzierte Phosphorylierung von WC-2. Die FRQ induzierte Phosphorylierung von WC-1 erfolgt noch später. Somit lassen sich innerhalb einer Lichtinduktion 3 Phosphorylierungskinetiken auflösen: die unmittelbare lichtinduzierte Phosphorylierung des WCC, die Phosphorylierung von WC-2 (FRQ induziert) und die sehr späte Phosphorylierung von WC-1 (FRQ induziert). Der Phosphorylierungsstatus des WCC korreliert mit dessen Aktivität. Der lichtabhängig phosphorylierte WCC ist transkriptionell aktiv. Der FRQ abhängig phosphorylierte Komplex ist nicht aktiv. Dies wurde mit mehreren unabhängigen Experimenten untersucht. In einem *frq*⁰ Stamm liegt sehr viel weniger, allerdings niedrig phosphorylierter WCC vor. Dieser ist viel aktiver als der hoch phosphorylierte WCC in einem Wildtypstamm, der dort in größerer Menge vorkommt. Die Menge an *frq* mRNA in einem *frq*⁰ Stamm ist sehr viel höher als im Wildtyp. Induziert man Wildtyp FRQ in einem *frq*⁰ Stamm, so wird der WCC abgeschaltet und parallel dazu wird er phosphoryliert. Die Abschaltung korreliert mit einer Phosphorylierung und die Aktivierung korreliert mit einer Dephosphorylierung. Auch im Verlauf eines circadianen Tages schwankt die Phosphorylierung des WCC. Zu DD28 ist der Komplex relativ stark phosphoryliert, während er bei DD16 kaum phosphoryliert vorliegt. Dabei handelt es sich um die zwei Extrempunkte der maximalen Repression (DD28) und der maximalen Transkription (DD16). WC-2 weist insgesamt 6 Phosphorylierungsstellen auf. Von diesen hängen 4 von FRQ ab. Es wurde versucht die FRQ abhängigen Phosphorylierungen näher zu charakterisieren. Dafür wurden zwei verkürzte WC-2 Mutanten benutzt. Die G3 Mutante kodiert für ein verkürztes WC-2 Protein, welches kurz vor dem Zinkfinger endet und ist nicht phosphoryliert. In dem fehlenden C-terminalen Teil von WC-2 liegen 8 Phosphorylierungsstellen, von denen 4 eine einigermaßen hohe Vorhersage mit einem Computerprogramm hatten. Diese 4 wurden ausgetauscht. Eine abschließende Einschätzung kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vorgenommen werden.

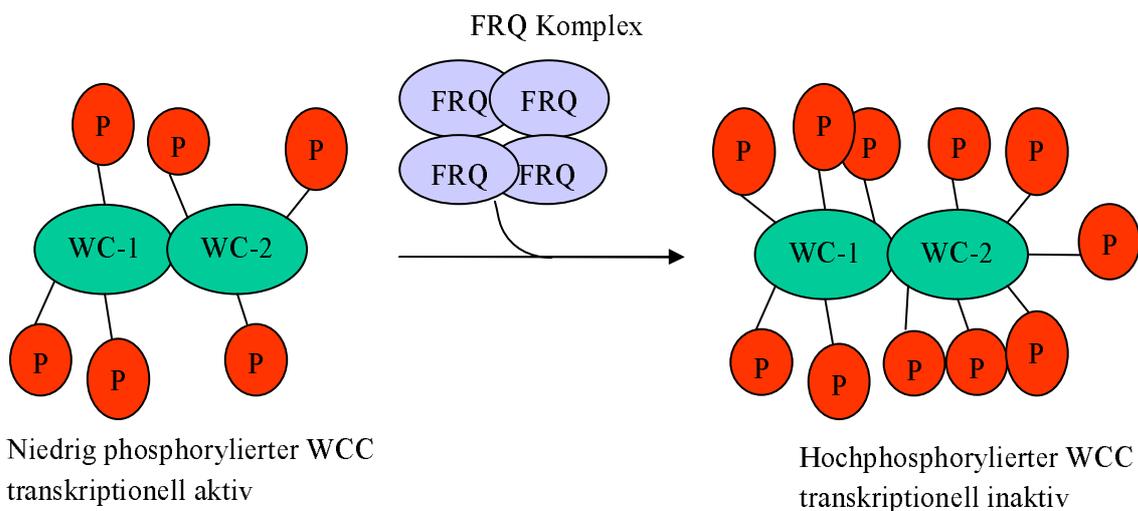
Zusätzlich wurde WC-2 mit Hilfe eines TAP Tags aufgereinigt. Mit dem aufgereinigten WC-2 können nun viele *in vitro* Charakterisierungen vorgenommen werden und auch die Phosphorylierungsstellen können mit Hilfe von massenspektrometrischen Charakterisierungen bestimmt werden.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Funktion von FRQ nicht darin besteht im Kern an den WCC zu binden und diesen so zu inaktivieren, sondern dass FRQ die Phosphorylierung des WCC vermittelt und diesen so inaktiviert. Diese FRQ abhängige Phosphorylierung ist der Abschaltmechanismus.

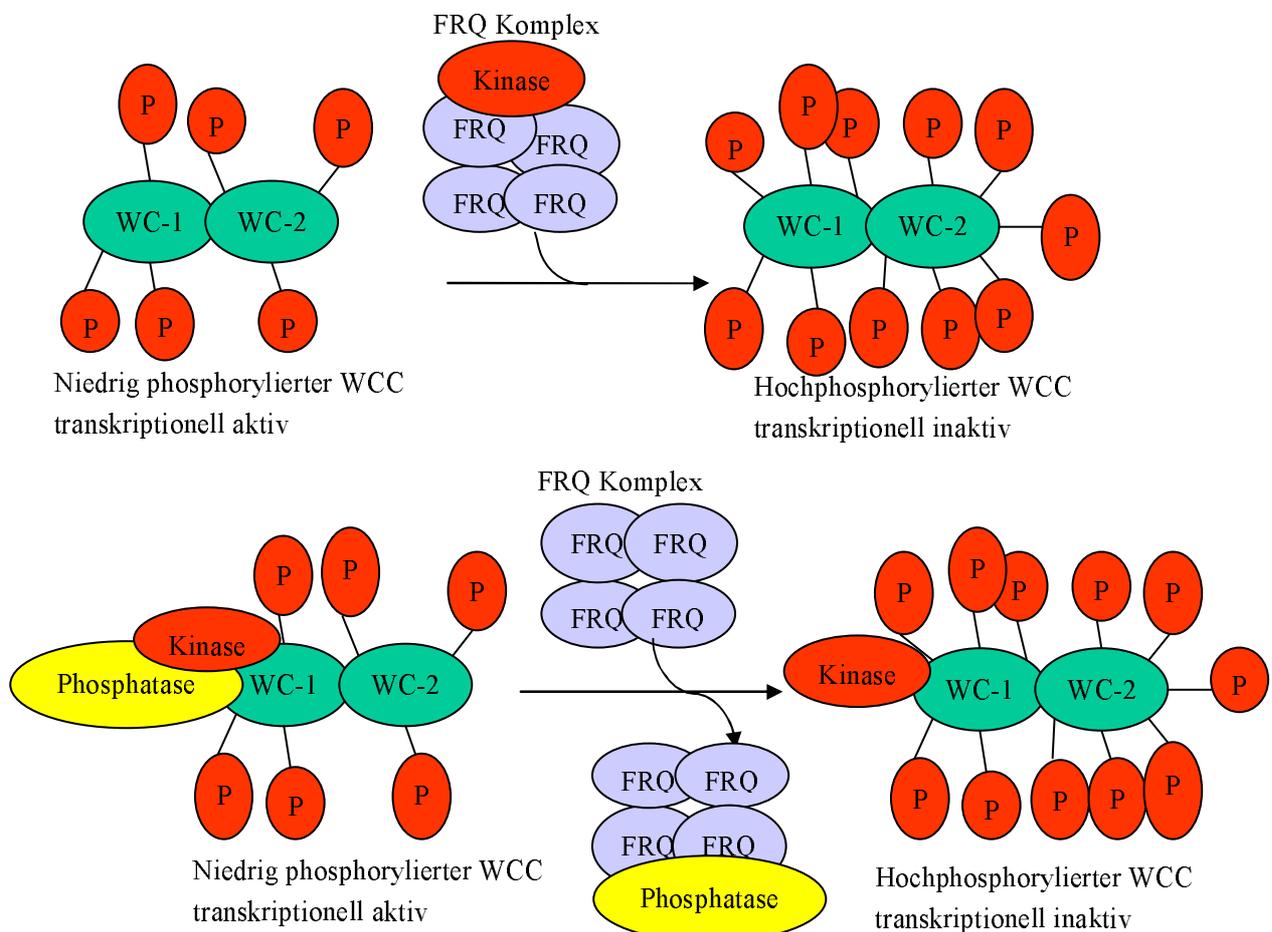
Wie erfolgt dies molekular? Dafür gibt es mehrere Möglichkeiten.

Zum einen kann FRQ eine Kinase in den Kern rekrutieren. FRQ hätte damit eine Cyclin ähnliche Funktion, indem es eine Kinase rekrutiert ähnlich den Cyclin abhängigen Kinasen im Zellzyklus (CDK- cyclin dependent Kinase). Für diesen Mechanismus muss FRQ nicht notwendigerweise mit dem WCC interagieren. Möglich ist auch, dass FRQ eine Phosphatase im Cytosol festhält bzw. ins Cytosol transportiert und so die Phosphorylierung des WCC indirekt beeinflusst. Dies ist möglich, da FRQ stets zu einem großen Teil im Cytosol vorliegt. Möglich ist auch, dass Kinasen und/ oder Phosphatasen ein stabiler Bestandteil des WCC sind und FRQ transient an den WCC bindet und so eine Konformationsänderung auslöst, die zu einer Aktivierung der Kinasen oder aber zu einem Ablösen und damit Inaktivieren der Phosphatasen führt.

Die FRQ abhängige Phosphorylierung führt nicht zu einer Veränderung des Molekulargewichtes. Sie führt demnach nicht zu einer Dissoziation des WCC. Außerdem führt sie nicht zu einem Export des WCC aus dem Kern. Möglich ist eine Konformationsveränderung oder aber eine geringfügige Veränderung in der Zusammensetzung des WCC, die so klein ist, dass sie nicht durch Gelfiltration nachgewiesen werden kann. Die Phosphorylierung führt dazu, dass der WCC nicht mehr an den *frq* Promotor bindet. Wahrscheinlich führt sie also zu einem Ablösen des WCC von der DNA. Eine Phosphorylierung im Bereich des Zn-Fingers könnte solche Auswirkungen haben und mit der DNA Bindung interferieren.



Mögliche Mechanismen



Ein solches Modell der FRQ abhängigen Phosphorylierung, das zu einer sequentiellen Abschaltung der WCC führt, stellt einen neuartigen Aspekt in der Regulation für circadiane Uhren dar. Bisher ist in keinem Modellsystem diskutiert wie das negative Feedback funktionieren soll. Unsere Daten weisen dafür mehrere Möglichkeiten aus. Klar ist dass FRQ nicht stabil mit dem WCC interagiert und dass FRQ abhängig mehrere Phosphorylierungen induziert werden. Die zunehmende Phosphorylierung korreliert mit einem Abschalten des WCC.

7) Literaturverzeichnis

a) Aronson BD, Johnson KA, Dunlap JC. 1994

Circadian clock locus frequency: protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91, 7683-7687.

b) Aronson BD, Johnson KA, Loros JJ, Dunlap JC. 1994

Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency.

Science 263, 1578-1584.

Arpaia G, Cerri F, Baima S, Macino G. 1999

Involvement of protein kinase C in the response of *Neurospora crassa* to blue light.

Mol Gen Genet. 262, 314-322.

Ballario P, Talora C, Galli D, Linden H, Macino G. 1998

Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins.

Mol Microbiol. 29, 719-729.

Ballario P, Vittorioso P, Magrelli A, Talora C, Cabibbo A, Macino G. 1996

White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein.

EMBO J. 15, 1650-1657.

a) Bell-Pedersen D, Dunlap JC, Loros JJ. 1996

Distinct cis-acting elements mediate clock, light, and developmental regulation of the *Neurospora crassa* eas (ccg-2) gene.

Mol Cell Biol. 16, 513-521.

Bell-Pedersen D, Lewis ZA, Loros JJ, Dunlap JC. 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.

b) Bell-Pedersen D, Shinohara ML, Loros JJ, Dunlap JC. 1996

Circadian clock-controlled genes isolated from *Neurospora crassa* are late night- to early morning-specific.

Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 13096-13101.

Cashmore AR. 2003

Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time.

Cell 114, 537-543.

Cheng P, He Q, Yang Y, Wang L, Liu Y. 2003

Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing.

Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 5938-5943.

Cheng P, Yang Y, Gardner KH, 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.

a) Cheng P, Yang Y, Heintzen C, Liu Y. 2001

Coiled-coil domain-mediated FRQ-FRQ interaction is essential for its circadian clock function in *Neurospora*.

EMBO J. 20, 101-108.

b) Cheng P, Yang Y, Liu Y. 2001

Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock.

Proc Natl Acad Sci U S A. 98, 7408-7413.

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

Collett MA, Dunlap JC, Loros JJ. 2001

Circadian clock-specific roles for the light response protein WHITE COLLAR-2.

Mol. Cell. Biol. 21, 2619-2628.

Collett MA, Garceau N, Dunlap JC, Loros JJ. 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.

Correa A, Bell-Pedersen D. 2002

Distinct signaling pathways from the circadian clock participate in regulation of rhythmic conidiospore development in *Neurospora crassa*.

Eukaryot Cell. 1, 273-280.

Crosthwaite SK, Dunlap JC, Loros JJ. 1997

Neurospora wc-1 and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity.

Science 276, 763-769.

Crosthwaite SK, Loros JJ, Dunlap JC. 1995

Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript.

Cell 81, 1003-1012.

Denault DL, Loros JJ, Dunlap JC. 2001

WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*.

EMBO J. 20, 109-117.

Devlin PF, Kay SA 2001 Circadian photoperception Annu. Rev. Physiol. 63, 677-94

Dunlap JC, Loros JJ, Liu Y, Crosthwaite SK.

Eukaryotic circadian systems: cycles in common.

Genes Cells. 1999 Jan;4(1):1-10. Review.

Dunlap JC.

Molecular bases for circadian clocks.

Cell. 1999 Jan 22;96(2):271-90. Review.

Dunlap JC.

Common threads in eukaryotic circadian systems.

Curr Opin Genet Dev. 1998 Aug;8(4):400-6. Review.

Feng B, Marzluf GA 1998 Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression in *Neurospora crassa*. Mol. Cell. Biol. 18, 3983-90

Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC. 2002

White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. Science 297, 815-819.

Froehlich AC, Loros JJ, Dunlap JC. 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.

Galagan JE, Calvo SE, Borkovich KA, Seler EU, Read ND, Jaffe D, FitzHugh W, Ma LJ, Smirnov S, Purcell S, Rehman B, Elkins T, Engels R, Wang S, Nielsen CB, Butler J, Endrizzi M, Qui D, Ianakiev P, Bell-Pedersen D, Nelson MA, Werner-Washburne M, Selitrennikoff CP, Kinsey JA, Braun EL, Zelter A, Schulte U, Kothe GO, Jedd G, Mewes W, Staben C, Marcotte E, Greenberg D, Roy A, Foley K, Naylor J, Stange-Thomann N, Barret R, Gnerre S, Kamal M, Kamvysselis M, Mauceli E, Bielke C, Rudd S, Frishman D, Krystofova S, Rasmussen C, Metzzenberg RL, Perkins DD, Kroken S, Cogoni C, Macino G, Catcheside D, Li W, Pratt RJ, Osmani SA, DeSouza CP, Glass L, Orbach MJ, Berglund JA, Voelker R, Yarden O, Plamann M, Seiler S, Dunlap J, Radford A, Aramayo R, Natvig DO, Alex LA, Mannhaupt G, Ebbole DJ, Freitag M, Paulsen I, Sachs MS, Lander ES, Nusbaum C, Birren B. 2003

The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Nature 422, 859-868.

Garceau NY, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC. 1997

Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein FREQUENCY.

Cell 89, 469-476.

Gorl M, Merrow M, Huttner B, Johnson J, Roenneberg T, Brunner M 2001 A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in *Neurospora*. *EMBO J.* 20, 7074-84

Harmer SL, Panda S, Kay SA. 2001
Molecular bases of circadian rhythms.
Annu Rev Cell Dev Biol 17, 215-253.

He Q, Cheng P, Yang Y, He Q, Yu H, Liu Y. 2003
FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation.
EMBO J. 22, 4421-4430.

He Q, Cheng P, Yang Y, Wang L, Gardner KH, Liu Y. 2002
White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor.
Science 297, 840-843.

Heintzen C, Loros JJ, Dunlap JC. 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.

Johnson CH, Golden SS. 1999
Circadian programs in cyanobacteria: adaptiveness and mechanism.
Annu Rev Microbiol 53, 389-409.

Johnson CH. 2001 Endogenous timekeepers in photosynthetic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 695-728.

Johnson CH. 2004
As time glows by in bacteria
Nature 430, 23-24.

- Kramer C, Loros JJ, Dunlap JC, Crosthwaite SK. 2003
Role for antisense RNA in regulating circadian clock function in *Neurospora crassa*.
Nature 421, 948-952.
- Lee K, Dunlap JC, Loros JJ. 2003
Roles for WHITE COLLAR-1 in circadian and general photoperception in *Neurospora crassa*.
Genetics 163, 103-114.
- Lee K, Loros JJ, Dunlap JC. 2000
Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system.
Science 289, 107-110.
- Lewis ZA, Correa A, Schwerdtfeger C, Link KL, Xie X, Gomer RH, Thomas T, Ebbole DJ, 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.
- Linden H, 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, Rodriguez-Franco M, Macino G 1997 Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception. Mol. Gen. Genet. 111-118
- Linden H, Rodriguez-Franco M, Macino G. 1997
Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception.
Mol Gen Genet. 254, 111-118.
- Liu Y, Garceau NY, Loros JJ, Dunlap JC. 1997
Thermally regulated translational control of FRQ mediates aspects of temperature responses in the *Neurospora* circadian clock.
Cell 89, 477-486.

Liu Y, Loros J, Dunlap JC. 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, Merrow M, Loros JJ, Dunlap JC. 1998

How temperature changes reset a circadian oscillator.

Science 281, 825-829.

Liu Y. 2003

Molecular mechanisms of entrainment in the *Neurospora* circadian clock.

J Biol Rhythms 18, 195-205.

Loros JJ, Dunlap JC. 2001

Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*.

Annu. Rev. Physiol. 63, 757-794.

Luo C, Loros JJ, Dunlap JC. 1998

Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ.

EMBO J. 17, 1228-1235.

Merrow MW EMBO 20 2001

Merrow MW, Garceau NY, Dunlap JC. 1997

Dissection of a circadian oscillation into discrete domains.

Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 3877-3882.

Millar AJ. 2004

Input signals to the plant circadian clock.

J Exp Botany 55, 277-283.

Nowrousian M, Duffield GE, Loros JJ, Dunlap JC. 2003

The frequency gene is required for temperature-dependent regulation of many clock-controlled genes in *Neurospora crassa*.

Genetics 164, 923-933.

Panda S, Hogenesch JB, Kay SA. 2002

Circadian rhythms from flies to human.

Nature 417, 329-335.

Putterill J, Laurie R, Macknight R. 2004

It's time to flower: the genetic control of flowering time.

BioEssays 26, 363-373.

Reppert SM, Weaver DR. 2001

Molecular analysis of mammalian circadian rhythms.

Annu Rev Physiol 63, 647-676.

Schwerdtfeger C, Linden H. 2001

Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*.

Mol Microbiol. 39, 1080-1087.

Schwerdtfeger C, Linden H. 2003

VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation.

EMBO J. 22, 4846-4855.

Schwerdtfeger C, 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.

Shrode LB, Lewis ZA, White LD, Bell-Pedersen D, Ebbole DJ. 2001

vvd is required for light adaptation of conidiation-specific genes of *Neurospora crassa*, but not circadian conidiation.

Fungal Genet Biol. 32, 169-181.

Talora C, Franchi L, Linden H, Ballario P, Macino G. 1999

Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction.

EMBO J. 18, 4961-4968.

Williams JA, Sehgal A. 2001

Molecular components of the circadian system in *Drosophila*.

Annu Rev Physiol 63, 729-755.

Yang Y, Cheng P, He Q, Wang L, 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, Cheng P, Liu Y. 2002

Regulation of the *Neurospora* circadian clock by casein kinase II.

Genes Dev. 16, 994-1006.

Yang Y, Cheng P, Zhi G, 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.

Young, MW. 1998

The molecular control of circadian behavioral rhythms and their entrainment in *Drosophila*.

Annu Rev Biochem 67, 135-152.

Zhu H, Nowrousian M, Kupfer D, Colot HV, Berrocal-Tito G, Lai H, Bell-Pedersen D, Roe BA, Loros JJ, Dunlap JC. 2001

Analysis of expressed sequence tags from two starvation, time-of-day-specific libraries of *Neurospora crassa* reveals novel clock-controlled genes.

Genetics 157, 1057-1065.

8) Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
AA-mix	Aminosäurenmix
AK	Antikörper
α-FRQ	anti-FRQ
α-WC-1	anti-WC-1
α-WC-2	anti-WC-2
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
CRY	Cryptochrom
CT	Circadian Time, circadiane Zeit
D	Tage
DD	Dauerdunkel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäurenukleotide
DTT	Dithiothreonid
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen- bis- glykol-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FAD	Flavinadenindinukleotid
FGCS	Fungal Genetic Stock Centre
Frq	frequency
FRQ	Frequency
g	Gramm
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S Transferase
HMW	High Molecular Weight
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LD	Licht Dunkel
IFRQ	long Frequency
LL	Dauerlicht
LMW	Low Molecular Weight
LOV	Light Oxygen Voltage
LRE	light responsive elements
M	Molar
MBP	Maltosebindeprotein
Min	Minuten
ml	Milliliter
OD	Optische Dichte
PAS	Per Arnt Sim
PBS	Phosphate buffered Saline

Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.

Seite 99

PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sFRQ	short Frequency
TAP	Tandem Affinity Purification
TCA	Trichloressigsäure
TCB	Thrombinspaltungspuffer
Tris	Trihydroxymethylsulfonsäure
VVD	Vivid
WC-1	White Collar 1
WC-2	White Collar 2
WCC	White Collar Komplex