CHLAMY 1, ein circadianes RNS-Bindeprotein aus *Chlamydomonas reinhardtii*: Isolierung, Klonierung der Gene und phylogenetische Analysen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Claudia Schneid
aus München

April 2002

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Maria Mittag

2. Berichterstatter: PD Dr. Axel Mithöfer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.08.2002

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Waltenberger, H., Schneid, C., Grosch, J.O., Bareiss, A. and Mittag, M. (2001). Identification of target mRNAs for the clock-controlled RNA-binding protein Chlamy 1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol. Genet. Genomics **265**, 180-188.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Rhythmische Vorgänge in der Biologie 1
1.2 Die Elemente des circadianen Systems 4
1.2.1 Die Lichtwahrnehmung 4
1.2.2 Molekulare Grundlagen des Schrittmachers 5
1.2.3 Der circadiane Ausgang 6
1.3 Das circadiane System in *C. reinhardtii* 8
1.4 Mechanismen translationaler Regulation 10
1.5 Aufgabenstellung 12

2 Material und Methoden 13
2.1 Material 13
2.1.1 Geräte 13
2.1.2 Chemikalien 14
2.1.3 Enzyme 14
2.1.4 Kits und Verbrauchsmaterialien 15
2.1.5 *Chlamydomonas reinhardtii*-Stämme 15
2.1.6 *Neurospora crassa*-Stamm 16
2.1.7 *Volvox carteri*-Stämme 16
2.1.8 *Escherichia coli*-Stämme 16
2.1.9 Vektoren 16
2.1.10 Plasmide 17
2.1.11 Degenerierte Oligonukleotide 17
2.1.12 Molekularmassen-Standards 18
2.1.13 Antiseren 19
2.1.13.1 Primäre Antiseren 19
2.1.13.2 Sekundäre Antikörper 19
2.1.14 cDNS-Bank 20
2.1.15 Kulturmedien 20
2.1.15.1 Medium zur Anzucht von *C. reinhardtii* 20
2.1.15.2 Medien zur Anzucht von Bakterien und Phagen 20
2.1.16 Puffer und Lösungen 20
2.1.16.1 Puffer für Gelelektrophorese und molekularbiologische Standardmethoden 21
2.1.16.2 Puffer für proteinchemische Experimente 21
2.1.16.3 Puffer für immunochemische Experimente 22
2.1.16.4 Puffer für Hybridisierungs-Experimente 22
2.2 Methoden 23
2.2.1 Anzucht von *C. reinhardtii* 23
2.2.2 Ernte von *C. reinhardtii* 23
2.2.3 Herstellung eines Rohextraktes aus *C. reinhardtii* 24
2.2.4 Fraktionierende Ammoniumsulfat-Fällung 24
2.2.4.1 Verwendung einer Ammoniumsulfat-Lösung 24

2.2.4.2 Verwendung von festem Ammoniumsulfat 25
2.2.5 Dialyse von Proteinlösungen 25
2.2.6 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen 26
2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration 26
2.2.8 Spezifische RNS-Affinitätschromatographie 26
2.2.9 Western Blot 27
2.2.10 Auftragen von Peptiden auf Membranen 28
2.2.11 Immunodetektion von Proteinen 28
2.2.11.1 Nachweis mit Meerrettich-Peroxidase 29
2.2.11.2 Nachweis mit Alkalischer Phosphatase 30
2.2.12 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern 30
2.2.12.1 Kopplung des Peptids an CnBr aktivierte Sepharose 4B 30
2.2.12.2 Kopplung und Elution des Antikörpers 31
2.2.13 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) 32
2.2.13.1 Native PAGE 32
2.2.13.2 Denaturierende PAGE zur Aufreinigung von Transkripten 33
2.2.13.3 Denaturierende PAGE (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen 34
2.2.14 Färbung von Proteinen nach PAGE 35
2.2.14.1 Silberfärbung 35
2.2.14.2 Coomassie-Färbung 35
2.2.15 *In vitro*-Transkription 36
2.2.15.1 Transkription mit α^{32}P-rUTP 36
2.2.15.2 Transkription mit Biotin-14-CTP 37
2.2.15.3 Herstellung eines nicht-markierten Transkriptes 38
2.2.15.4 Herstellung eines Transkriptes mit „cap“-Struktur 38
2.2.16 Radioaktive Markierung von synthetischen Oligonukleotiden 39
2.2.17 „Mobility shift assay“ 40
2.2.18 Dichtegradienten-Zentrifugation 40
2.2.19 „UV-crosslinking“ Experiment 41
2.2.20 Durchmustern einer cDNS-Bank aus *C. reinhardtii* 42
2.2.20.1 Sichtung auf DNS-Ebene 42
2.2.20.2 Sichtung auf Proteinebene 42
2.2.20.3 *In vivo*-Exzision des pBluescript Phagemids 43
2.2.21 Hybridisierung einer cDNS-Bank mit degenerierten Oligonukleotiden 44
2.2.22 Polymerasekettenreaktion (PCR) 44
2.2.22.1 Design von degenerierten Oligonukleotiden 44
2.2.22.2 PCR mit degenerierten Oligonukleotiden 45
2.2.23 *In vitro*-Translation 45
2.2.24 Aktivitätsmessung der ß-Glucuronidase 46
2.2.25 Herstellung eines Rohextraktes aus *N. crassa* 47
2.2.26 Herstellung eines Rohextraktes aus *V. carteri* 48
2.2.27 Biochemische Standardmethoden 48
2.2.27.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen 48
2.2.27.2 Transformation von *E. coli* 49
2.2.27.3 Plasmidpräparation aus *E. coli* 49
2.2.27.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren 50

2.2.27.5 Restriktionsverdau ... 50
2.2.27.5.1 Analytischer Restriktionsverdau ... 50
2.2.27.5.2 Präparativer Restriktionsverdau ... 50
2.2.27.6 Auftrennung von DNS im Agarosegel ... 51
2.2.27.7 Elution von DNS-Fragmenten aus einem Agarosegel ... 51
2.2.27.8 Glätten von DNS-Enden mit dem Klenow-Enzym ... 52
2.2.27.9 Ligation ... 52

3 Ergebnisse ... 53
3.1 Anreicherung von CHLAMY 1 durch eine Ammoniumsulfat-Fällung ... 53
3.2 Regulatorische Eigenschaften von CHLAMY 1 ... 56
3.2.1 Klonierung eines Reporterkonstruktes ... 56
3.2.2 Expression und Aktivitätsmessung der ß-Glucuronidase ... 59
3.3 Bestimmung der Molekularmasse von CHLAMY 1 ... 61
3.3.1 Molekularmasse unter nativen Bedingungen ... 62
3.3.1.1 Erstellung einer Eichgerade zur Molekularmassenbestimmung durch einen Dichtegradienten ... 62
3.3.1.2 Bestimmung der Molekularmasse von CHLAMY 1 mittels Dichtegradienten-Zentrifugation ... 63
3.3.2 Molekularmasse unter denaturierenden Bedingungen ... 64
3.4 Aufreinigung von CHLAMY 1 ... 67
3.4.1 Spezifische RNS-Affinitätschromatographie ... 68
3.4.1.1 Bindung von CHLAMY 1 an ein biotinyliertes Transkript ... 68
3.4.1.2 CHLAMY 1 kann an ein immobilisiertes Biotin-Transkript binden ... 70
3.4.1.3 Elution von CHLAMY 1 ... 72
3.4.2 Aufreinigung von CHLAMY 1 in großem Maßstab ... 74
3.5 Peptid-Sequenzierung von CHLAMY 1 ... 77
3.5.1 Peptid-Sequenzen von CHLAMY 1 ... 78
3.5.2 Auswertung der Peptid-Sequenzen von CHLAMY 1 ... 79
3.6 Versuche zur Klonierung der *chlamy 1*-Gene unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden ... 81
3.7 Synthese und Charakterisierung der Peptid-Antikörper gegen die Untereinheiten von CHLAMY 1 ... 82
3.7.1 Überprüfung der Spezifität der Antikörper ... 83
3.7.2 Versuche zur Aufreinigung der Antiseren AK1/2 und AK3 ... 86
3.8 Oszillation der CHLAMY 1-Menge in einem Tag-Nacht-Zyklus ... 88
3.8.1.1 Schwankung der Menge von CHLAMY 1-Untereinheit C1 ... 89
3.8.1.2 Circadiane Schwankung in der Menge von CHLAMY 1-Untereinheit C3 ... 91
3.9 Identifizierung und Analyse der *chlamy 1*-cDNS-Sequenzen ... 92
3.9.1 Sichtung einer Expressions-Genbank aus *C. reinhardtii* mit Peptid-Antiseren ... 92
3.9.2 Sequenzanalyse der für die CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 kodierenden cDNS-Sequenz *chlamy 1-C1/C2* und des Proteins CHLAMY 1-C1/2 ... 95

3.9.2.1 Analyse des Teilklons pCS30 ... 95
3.9.2.2 Computergestützte Analyse von *chlamy 1-C1/2* ... 97
3.9.3 Sequenzanalyse der für die CHLAMY 1-Untereinheit C3 kodierenden cDNS-Sequenz *chlamy1-C3* und des Proteins CHLAMY 1-C3 ... 102
3.9.3.1 Analyse des Klons pCS31 ... 102
3.9.3.2 Computergestützte Analyse von *chlamy 1-C3* ... 104
3.10 Suche nach „UG"-Bindeproteinen in anderen Organismen ... 108
3.10.1 Untersuchungen an *V. carteri* ... 108
3.10.1.1 Bindung von CHLAMY 1 an *regA* aus *V. carteri* ... 109
3.10.1.2 Identifizierung von RNS-Bindeproteinen in *V. carteri* ... 111
3.10.2 Untersuchungen an *N. crassa* ... 115

4 Diskussion ... 120
4.1 CHLAMY 1 als Repressor der Translation ... 120
4.2 CHLAMY 1 ist ein Multimer ... 123
4.3 Aufreinigung und Peptid-Sequenzierung von CHLAMY 1 ... 125
4.4 Peptid-Antikörper gegen die Untereinheiten von CHLAMY 1 ... 127
4.5 Abundanz der CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C3 in einem Tag-Nacht-Zyklus ... 129
4.6 Identifikation der *chlamy 1*-cDNS-Sequenzen ... 130
4.7 Protein-Domänen der CHLAMY 1-Untereinheiten ... 133
4.8 RNS-Bindeproteine in *V. carteri* und *N. crassa* ... 136
4.8.1 VOLVO 1 und VOLVO 2 in *V. carteri* ... 136
4.8.2 CRASSA 1 und CRASSA 2 in *N. crassa* ... 138
4.8.3 Phylogenetische Konservierung von „UG"-Bindeproteinen ... 140
4.9 Ausblick ... 140

5 Zusammenfassung ... 142

6 Literaturverzeichnis ... 144

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen ... 156

8 Anhang ... 158

Lebenslauf ... 167

Danksagung ... 168

Abkürzungen

Acc.No.	Zugangsnummer
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Ammoniumsulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
cps	„counts per second“ = Zerfälle pro Sekunde
CCTR	„circadian controlled translational regulator“
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CnBr	Cyanbromid
ddH_2O	doppelt-destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2’-Desoxy-Nucleosid-5’-Triphosphat
DTT	Dithiothreithol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	„expressed sequence tag“
GUS	ß-Glucuronidase
h	Stunde
HPLC	„High performance liquid chromatographie“
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactosid
KH	„K homology“
KLH	„keyhole limpet hemocyanin“ = Hämocyanin aus *Limulus polyphemus*
LBP	Luziferin-Bindeprotein
LD	Licht-Dunkel
LL	Dauerschwachlicht

min	Minute
mRNS	„messenger“-Ribonukleinsäure
MU	4-Methyl-umbelliferon
MUG	4-Methyl-umbelliferyl-ß-D-glucuronid
MWCO	Molekularmassen-Ausschlussgrenze
NBT	Nitrobluetetrazolium
Nt	Nukleotide
NTR	Nicht-translatierte Region
ORF	„open reading frame“ = offener Leserahmen
p.a.	*pro analysi* (Reinststoff)
PCR	„polymerase chain reaction“ = Polymerase-kettenreaktion
pfu	“plaque forming unit” = Plaquebildende Einheit
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
RNS	Ribonukleinsäure
RRM	“RNA recognition motif”
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
τ	Periodenlänge
TEMED	N, N, N’, N’-Tetramethylethylendiamin
uORF	stromaufwärts gelegener offener Leserahmen
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-Galactosid

1 Einleitung

1.1 Rhythmische Vorgänge in der Biologie

Unter dem Begriff Rhythmik werden in der Biologie periodische Schwankungen von Lebensvorgängen zusammengefasst, mit deren Hilfe Lebewesen im Einklang mit der Natur leben können. Die Periodenlänge τ von Rhythmen ist unterschiedlich: Es gibt ultradiane Rhythmen, die mit einer Periode von deutlich unter einem Tag schwingen. Ein Beispiel ist der Herzschlag des Menschen, der sich in Ruhe ungefähr jede Sekunde wiederholt (Silbernagl und Despopoulus, 1991). Infradiane Rhythmen haben Periodenlängen von deutlich über einem Tag, was unter anderem beim vier bis fünf Tage dauernden Östruszyklus von weiblichen Säugetieren zu beobachten ist (Freeman, 1994). Rhythmen, die von der Drehung des Mondes um die Erde abhängen, nennt man lunare Rhythmen. Sie haben eine Periodenlänge von 29 Tagen (Neumann, 1989). Zusätzlich gibt es sogenannte circannuale Rhythmen, deren Periode ungefähr ein Jahr lang ist. Der Winterschlaf einiger Tiere ist hierfür ein gutes Beispiel (Kortner und Geiser, 2000).

Weiterhin existieren Rhythmen, deren τ mit der Tageslänge korreliert. Rhythmen, die unter Einfluss eines externen Zeitgebers, z.B. einem täglichen Licht-Dunkel-Wechsel (LD-Wechsel), eine Periodenlänge von 24 h aufweisen, nennt man diurnale Rhythmen oder auch Tagesrhythmen. Viele dieser Rhythmen lassen sich auch unter konstanten Bedingungen von Licht und Temperatur, im sogenannten Freilauf, beobachten. Sie werden von einer inneren Uhr kontrolliert und circadiane Rhythmen genannt. Wenn man die Periodenlänge τ eines solchen Rhythmus im Freilauf misst, stellt man fest, dass sie von der Länge unter LD-Bedingungen etwas abweicht: Der Mensch kann sich im Dauerlicht auf eine Periode von durchschnittlich 25 h einstellen, eine Maus hingegen weist ein τ von ca. 23 h auf. Das Wort circadian stammt aus dem Lateinischen (*circa* = ungefähr; *dies* = Tag) und charakterisiert Rhythmen, die unter konstanten Bedingungen eine Periodenlänge von ca. 24 h aufweisen.

Der tägliche LD-Wechsel stellt für einen circadianen Rhythmus den wichtigsten externen Zeitgeber dar. Der Organismus wird dadurch jeden Tag aufs Neue mit seiner äußeren Umgebung synchronisiert. Man spricht dabei auch von „entrainment“. Weitere externe Zeitgeber für circadiane Rhythmen können Temperaturzyklen oder das Nährstoffangebot zu bestimmten Zeiten sein (Gooch *et al.*, 1994; Roenneberg und Rehman, 1996). Abhängig vom Zeitpunkt und der Stärke/Dauer von Licht- bzw. Dunkelpulsen kann die Phase eines circadianen Rhythmus verschoben werden. Wenn ein nachtaktives Tier zu Beginn seiner Nachtphase beispielsweise einem Lichtpuls ausgesetzt wird, so reagiert es mit einer vorübergehenden Periodenverlängerung, d.h. die Phase des circadianen Rhythmus wird in die Tagphase zurück versetzt (Daan und Pittendrigh, 1976). In einer sogenannten Phasen-Response-Kurve werden die Reaktionen eines Organismus, d.h. die Größe der Phasenverschiebung, zu bestimmten Zeiten eines Tages festgehalten. Ein weiteres Charakteristikum für circadiane Rhythmen ist die sogenannte Temperaturkompensation (Pittendrigh, 1954): Bei biochemischen Reaktionen bringt eine Erhöhung der Temperatur um 10°C eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit mit sich. Der dies bezeichnende Faktor ist der sogenannte Q_{10}-Wert, der bei biochemischen Reaktionen gleich zwei ist. Bei circadianen Rhythmen hingegen liegt er zwischen 0,8–1,3, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit ändert sich bei einer Temperaturänderung im physiologischen Rahmen kaum (Pittendrigh und Caldarola, 1973).

Der Aufbau eines circadianen Systems ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. In der Weiterleitung von Informationen zwischen den drei Elementen (Eingang, Oszillator und Ausgang) können Rückkopplungsmechanismen eine wichtig Rolle spielen, bei denen beispielsweise ein Produkt des Ausgangs auf den Oszillator rückwirkt (Williams und Sehgal, 2001). Ein solcher Mechanismus ist ebenfalls innerhalb eines Elementes möglich, wenn z.B. ein Protein auf seine eigene Transkription einwirkt (Young und Kay, 2001). Der Eingang des circadianen Systems nimmt die Umgebung z.B. mittels Photorezeptoren wahr (s. 1.2.1). Die aufgenommenen Informationen werden dann zum Herzstück des circadianen Systems, dem endogenen Schrittmacher oder Oszillator (s. 1.2.2), weitergeleitet. Dort werden sie verarbeitet und zum Ausgang übermittelt. Unter diesem Begriff

werden die Prozesse zusammengefasst, die sich als Rhythmen beobachten und messen lassen. Hierzu gehören beispielsweise die Blattbewegungen von Pflanzen, die Biolumineszenz bestimmter Dinoflagellaten oder der Schlaf-Wach-Rhythmus des Menschen (s. 1.2.3).

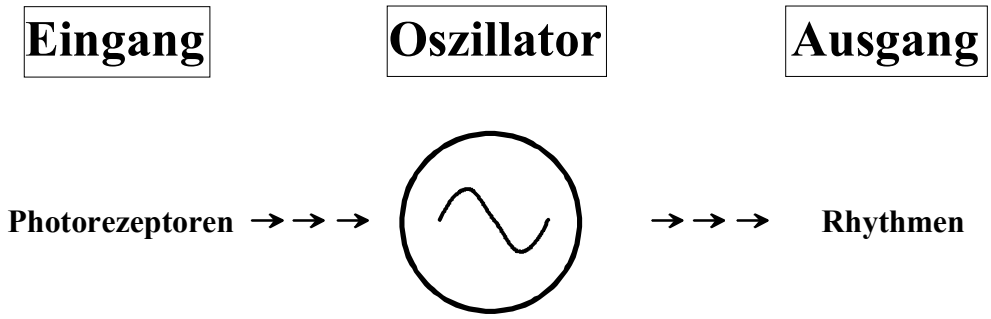


Abb. 1: Bestandteile eines circadianen Systems

Der Eingang eines circadianen Systems besteht aus Rezeptoren, welche die Umgebung wahrnehmen und die aufgenommenen Informationen an den Schrittmacher, den Oszillator, weiterleiten. Dieser ist für die Periodizität verantwortlich und steuert den Ausgang des Systems. Unter dem Ausgang versteht man die Rhythmen, die man beobachten und messen kann. Die Verbindungen zwischen den einzelnen Komponenten sind durch Pfeile angedeutet, was auf die mögliche Komplexität der Signalübertragung hinweisen soll. Rückkopplungsmechanismen, die zwischen/innerhalb der einzelnen Elemente bei der Regulation von circadianen Vorgängen eine große Rolle spielen können, wurden in diesem vereinfachten Schema nicht eingezeichnet.

Circadiane Rhythmen werden seit langem untersucht bzw. beobachtet. Eine erste Beschreibung wurde bereits 1729 gemacht: Der Franzose de Mairan beobachtete die Blattbewegungen einer Pflanze (wahrscheinlich *Mimosa pudica*) und stellte fest, dass die Blätter zu Beginn der Nacht zusammengefaltet wurden. Diesen Vorgang konnte er auch an einer Pflanze beobachten, die er für mehrere Tage in einen dunklen Kasten stellte. Somit konnte er zeigen, dass die Blattbewegungen von einer endogenen Komponente gesteuert wurden. Ungefähr ein Jahrhundert später (1832) konnte de Candolle zeigen, dass sich auch die Periode der Blattbewegungen einer Mimose unter freilaufenden Bedingungen änderte: Die Pflanzen begannen im Dauerdunkel jeden Tag ein bis zwei Stunden früher mit dem Zusammenfalten der Blätter als die Kontrollpflanzen. Die Geburtsstunde der „modernen“ Chronobiologie kann in die 50er Jahre des 20. Jahrhunderts gelegt werden. Damals begann Colin Pittendrigh mit Untersuchungen an der Fruchtfliege *Drosophila* (Pittendrigh, 1954) und Jürgen Aschoff führte „Zeitisolations-experimente“ mit Menschen durch (Aschoff, 1967). Bis zum heutigen Tag haben

sich die Untersuchungsobjekte vervielfacht. In unterschiedlichen Organismen, vom Cyanobakterium (Kondo *et al.*, 1993) bis hin zum Menschen lassen sich circadiane Rhythmen beobachten (Young und Kay, 2001). Nicht nur die Aufzeichnung eines Rhythmus, sondern vor allem auch die Aufklärung der Mechanismen im Organismus selbst sind Untersuchungsziele der Chronobiologen.

1.2 Die Elemente des circadianen Systems

1.2.1 Die Lichtwahrnehmung

Verschiedene Photorezeptoren, die nur bestimmte Wellenlängen des Lichts absorbieren können, sind Bestandteil des Eingangs (= „Input“) eines circadianen Systems (Übersicht in Devlin und Kay, 2001): Für die Blaulicht absorbierenden Cryptochrome und die sowohl Rot- als auch (zu einem geringen Anteil) Blaulicht absorbierenden Phytochrome ist in einigen Organismen eine Rolle in der circadianen Lichtwahrnehmung nachgewiesen worden.

Die Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* hat fünf Phytochrome (*phyA* bis *phyE*) und zwei Cryptochrome (*cry1* und *cry2*) (Somers *et al.*, 1998). Untersuchungen von Mutanten der verschiedenen *phy*- und *cry*-Gene haben ergeben, dass die unterschiedlichen Photorezeptoren beim „Input“ des circadianen Systems zusammenspielen (Devlin und Kay, 2000). So konnte für Cry1 sowohl eine Rolle bei der Absorption von Blaulicht als auch bei der Weiterleitung von Rotlicht-Signalen, die von PhyA aufgenommen werden, nachgewiesen werden. Bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* konnte ebenfalls eine Rolle für Cryptochrom im Eingang des circadianen Systems gezeigt werden (Emery *et al.*, 2000). Bei weiteren Untersuchungsobjekten der Chronobiologen konnten die Photorezeptoren bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden (Übersicht in Devlin und Kay, 2001).

1.2.2 Molekulare Grundlagen des Schrittmachers

Das Herzstück des circadianen Systems ist der Oszillator, der endogene Schrittmacher. Hier werden die Signale, die vom Eingang weitergeleitet werden, verarbeitet. Der Oszillator, dessen molekulare Grundlagen an verschiedenen Organismen (unter anderem an *Synechococcus elongatus*, *D. melanogaster, Neurospora crassa, A. thaliana* und der Maus) untersucht werden, ist für die Periodizität des circadianen Systems verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass es positive und negative Elemente gibt, die auf die eigene Expression rückwirken können, oder aber die Expression/Aktivität anderer Elemente beeinflussen können (Dunlap, 1999; Young und Kay, 2001). Diese Rückkopplungsmechanismen, die in allen bisher untersuchten Organismen entdeckt wurden, stellen einen in der Stammesgeschichte konservierten Mechanismus circadianer Systeme dar. Die molekularen Grundlagen eines circadianen Schrittmachers sollen anhand der Vorgänge in *D. melanogaster* (Übersicht in Williams und Sehgal, 2001) näher erörtert werden.

In der Taufliege wurden mehrere Gene identifiziert, die zu den sogenannten „clock genes“ (= Uhrengene) gezählt werden, die alle eine Rolle in circadianen Schrittmachern spielen: Die Expression von *per* (*period*) als auch von *tim* (*timeless*) ist circadian reguliert (Hardin *et al.*, 1990; Sehgal *et al.*, 1995). Die Transkription beider Gene wird durch die Bindung des Heterodimers CLOCK/CYCLE (CLK/CYC) an die sogenannten „E-Boxes“ in den Promotoren von *per* und *tim* zur Mitte des Tages ermöglicht. Am Anfang der Nacht bilden TIM und PER im Zytoplasma ein Heterodimer und werden dann in den Zellkern transportiert. Dort können sie in der Nacht an das Dimer CLK/CYC binden und dessen positiven Einfluss auf ihre eigene Transkription unterbinden (Darlington *et al.*, 1998). Am Anfang des Tages kommt es zu einem licht-induzierten Abbau von TIM (Naidoo *et al.*, 1999; Ceriani *et al.*, 1999) und einem daraus resultierenden PER-Abbau. Somit kann CLK/CYC wieder an die Promotoren von *per* und *tim* binden und der Zyklus kann von vorne beginnen. Für die Dimerisierung von CLK und CYC sind PAS-Domänen (Huang *et al.*, 1993) verantwortlich, die auch in anderen Proteinen identifiziert wurden, die eine Rolle in der circadianen Rhythmik spielen (Übersicht in Harmer *et al.*, 2001). Einen regulierenden

Einfluss auf den oben beschriebenen Zyklus haben die beiden Kinasen DOUBLETIME (DBT; Kloss *et al.*, 1998) und SHAGGY (SGG; Martinek *et al.*, 2001), die für die Phosphorylierung von PER bzw. TIM verantwortlich sind.
Bei Untersuchungen an Säugetieren (Übersicht in Reppert und Weaver, 2001) konnten Übereinstimmungen mit den Schrittmacher-Elementen von *D. melanogaster* entdeckt werden. So wurden auch hier Proteine mit PAS-Domänen (*period1* bis *period3*, *clock* und *bmal1*) und Rückkopplungsmechanismen identifiziert, die für die Periodizität verantwortlich sind. Im Pilz *N. crassa* konnten ebenfalls mehrere Gene identifiziert werden, die für die Aufrechterhaltung der Periodizität verantwortlich sind. Hierzu gehören die positiven Elemente white-collar 1 und 2 (WC-1; WC-2) und das negative Element frequency (FRQ). Das Zusammenspiel dieser Elemente ist für die Schwingung des Systems verantwortlich (Übersicht in Loros und Dunlap, 2001). In der Pflanze *A. thaliana* steht die Aufklärung der molekularen Grundlagen des Oszillators hingegen erst am Anfang (Übersicht in McClung, 2001).

1.2.3 Der circadiane Ausgang

Rhythmische Verhaltensweisen, die auch unter konstanten Bedingungen zu beobachten sind, stellen den „Output“ (= Ausgang) des circadianen Systems dar und werden in einer Vielzahl von Organismen erforscht. An dieser Stelle sollen nur einige wenige Beispiele genannt werden. So ist bei *D. melanogaster* das Schlüpfen (Übersicht in Williams und Sehgal, 2001) und in *Gonyaulax polyedra* die Biolumineszenz (Übersicht in Mittag, 2001) circadian reguliert. Bei Säugetieren ist unter anderem der Schlaf-Wach-Rhythmus von der inneren Uhr kontrolliert. Dies wurde auch bereits an Menschen gezeigt, die in isolierten Räumen lebten (Aschoff, 1994). Bei Pflanzen sind beispielsweise die Blattbewegung, die Stomataöffnung oder auch die Photosynthese circadian reguliert (Übersicht in McClung, 2001; Barak *et al*., 2000). Hierzu soll noch erwähnt werden, dass die meisten circadianen Rhythmen im Freilauf sowohl unter Dauerlicht (LL) als auch unter Dauerdunkel (DD) zu beobachten sind. Eine Ausnahme stellen hierbei photosynthetisch aktive Organismen dar, bei welchen

die meisten Rhythmen in DD nur für eine kurze Zeit zu beobachten sind (Johnson, 2001).

Untersuchungen des „Outputs“ auf molekularer Ebene beschäftigen sich vor allem mit der Expression von sogenannten *ccg*'s (= „*clock controlled genes*“). Darunter versteht man Gene, deren Expression durch die circadiane Uhr geregelt ist, die aber nicht für das Fortbestehen der Uhr notwendig sind. Die Kontrolle ihrer Expression ist sowohl auf transkriptionaler, translationaler als auch auf posttranskriptionaler/-translationaler Ebene möglich.

Ein gut untersuchtes Beispiel ist die transkriptionale Regulation der *lhc*-Gene (= Chlorophyll a/b Bindeproteine; Übersicht in Piechulla, 1999), die unter anderem in *Chlamydomonas reinhardtii* (Jacobshagen *et al.*, 1996), Tabak (Paulsen und Bogorad, 1988), Tomate (Kellmann *et al.*, 1993) und *A. thaliana* (Millar und Kay, 1991) untersucht wurde. In *A. thaliana* wurde im Promotor des *lhcb1*-Gens ein Element („evening element“ = „EE“) identifiziert, das die Bindung des circadian regulierten Transkriptionsfaktors CCA1 (= „circadian clock associated 1“) ermöglicht (Wang und Tobin, 1998). Die periodisch schwankende Bindung von CCA1 an das „EE“ im *lhcb1*-Promotor ist für die rhythmische Expression des Gens verantwortlich. Ein solches „EE“ wurde bereits in 31 bekannten rhythmisch exprimierten Genen in *A. thaliana* identifiziert (Harmer *et al.*, 2000).

Eine Kontrolle der Genexpression auf Ebene der Translation konnte beim Luziferin-Bindeprotein (LBP) aus *G. polyedra* gezeigt werden. Das gesamte biolumineszente System in *G. polyedra*, zu dem das Substrat Luziferin, das Enzym Luziferase und das LBP gehören, wird von der circadianen Uhr gesteuert (Morse *et al.*, 1990). Während der Nacht kommt es zu einer, durch Erniedrigung des pH-Wertes ausgelösten, Konformationsänderung des LBP, wodurch das daran gebundene Luziferin freigesetzt wird und mit dem Enzym reagieren kann, was in einer Aussendung von Lichtquanten resultiert (Übersicht in Mittag und Hastings, 1996). Untersuchungen an LBP und Luziferase haben ergeben, dass deren RNS-Mengen im Tag-Nacht-Verlauf auf konstant hohem Niveau sind (Morse *et al.*, 1989; Mittag *et al.*, 1998), während die Proteinmengen in der Nacht ihr Maximum erreichen (Morse *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1984). Diese und andere Befunde deuten auf eine translationale Kontrolle hin (Übersicht in Mittag, 2001). In *G.*

polyedra wurde ein Protein identifiziert, das an die 3'-NTR der *lbp*-mRNS bindet und deren Translation beeinflusst. Dieses Protein, das als CCTR (= „circadian controlled translational regulator") bezeichnet wurde, weist eine circadian regulierte Bindeaktivität zu seiner Ziel-RNS auf. Sowohl unter LD- als auch unter LL-Bedingungen konnte eine Bindung an die *lbp*-mRNS nur während des (subjektiven) Tages detektiert werden (Mittag *et al.*, 1994). Zu Beginn der Nacht, wenn das LBP zu detektieren ist, nimmt die Bindeaktivität des CCTR ab. Diese Beobachtungen lassen auf eine Funktion des CCTR als Repressor der Translation schließen. Die Bindestelle des CCTR in der *lbp*-mRNS konnte auf einen 22 Nt langen Bereich in der 3'-NTR, der sieben „U(U)G"-Wiederholungen trägt, eingeschränkt werden (Mittag *et al.*, 1994). Durch Mutagenesen einzelner/mehrerer Nukleotide in der Bindestelle konnte gezeigt werden, dass für eine maximale CCTR-Bindung alle „UG"-Wiederholungen inklusive der flankierenden Nukleotide nötig sind (Mittag und Waltenberger, 1997). Die Molekularmasse des CCTR beträgt unter nativen Bedingungen 40-45 kDa und unter denaturierenden Bedingungen 18-25 kDa (Mittag *et al.*, 1994). Somit scheint es sich beim CCTR um ein Multimer zu handeln, das aus zwei gleichen Untereinheiten aufgebaut sein könnte.

1.3 Das circadiane System in *C. reinhardtii*

Bei *C. reinhardtii* handelt es sich um eine im Süßwasser lebende einzellige Grünalge. Man nennt sie auch „photosynthetische Hefe" (Rochaix, 1995), da sie sowohl für die Zellbiologie als auch für die Molekularbiologie einen leicht zu handhabenden Organismus darstellt. So ist diese Grünalge leicht in Kultur zu halten und es können unter anderem Transformationen und Messungen von Enzymaktivitäten durchgeführt werden (Harris, 1989; Rochaix, 1995). Für die Chronobiologen ist *C. reinhardtii* ein interessantes Studienobjekt, da eine Vielzahl von circadianen Rhythmen bekannt sind (Übersicht in Johnson *et al.*, 1992). So sind beispielsweise die Zellteilung (Straley und Bruce, 1979), die Chemotaxis (Byrne *et al.*, 1992) als auch die Phototaxis (Bruce, 1970) circadian reguliert. Der letztgenannte Rhythmus wurde sogar im Weltall untersucht. Dabei

wurde festgestellt, dass der Rhythmus unter schwerelosen Bedingungen weiterbestehen kann (Mergenhagen und Mergenhagen, 1989). Die Maxima der oben genannten Rhythmen treten zu unterschiedlichen Zeiten auf. So finden Chemotaxis und Zellteilung vor allem während der Nachtphase statt, wohingegen die Phototaxis auf die Tagphase beschränkt ist. Erst vor kurzem (2000) konnten Nikaido und Johnson einen Rhythmus im Überleben nach UV-Bestrahlung in *C. reinhardtii* nachweisen. Dieses ist am (subjektiven) Tag am höchsten und nimmt zu Beginn der (subjektiven) Nacht, dem Beginn der DNS-Replikation, ab. Die Autoren konnten zusätzlich zeigen, dass Blaulicht-aktivierte DNS-Photolyasen die Überlebenschance der Zellen steigern konnten.

Auch auf Ebene der Genexpression lassen sich in *C. reinhardtii* von der inneren Uhr regulierte Rhythmen beobachten. Dabei kann die Regulation sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Stufe erfolgen. Für die meisten untersuchten Gene im Zellkern und auch im Chloroplasten konnte eine transkriptionale Kontrolle nachgewiesen werden (Jacobshagen *et al.*, 2001; Mittag, 2001). So schwanken beispielsweise die mRNS-Mengen von *lhcb-1* (Jacobshagen *et al.*, 1996) und *tufA* (= Elongationsfaktor Tu; Hwang *et al.*, 1996) im Tag-Nacht-Verlauf. Eine Regulation auf translationaler Ebene kann durch ein RNS-Bindeprotein geschehen: Die Anwesenheit von RB47, das zu den poly(A)-bindenden Proteinen gezählt wird, ist für die Translation der *psbA*-mRNS (kodiert für das D1-Protein des Photosystems II) notwendig (Yohn *et al.*, 1998). Bisher wurde die Bindeaktivität von RB47 nur unter diurnalen Bedingungen (LD-Wechsel) untersucht. Eine Aussage über eine circadiane Regulation der Bindeaktivität ist somit bisher nicht möglich.

In Kapitel 1.2.3 wurde eine translationale Kontrolle durch das RNS-Bindeprotein CCTR in *G. polyedra* beschrieben, das an eine „UG"-haltige Region bindet. Untersuchungen an *C. reinhardtii* führten zur Identifikation eines Proteins, das spezifisch an die „UG"-haltige Sequenz aus *G. polyedra* (= 3'-NTR der *lbp*-mRNS) bindet (Mittag, 1996). Die Bindeaktivität des als CHLAMY 1 bezeichneten Proteins ist von der circadianen Uhr reguliert: Unter LD- als auch unter LL-Bedingungen ist die Bindeaktivität vom Ende des (subjektiven) Tages bis zur Mitte der (subjektiven) Nacht am stärksten (Mittag, 1996). Diese

Bindeaktivität steht im Gegensatz zu der in *G. polyedra*, die während des Tages am höchsten ist. Die Bindung beider Proteine findet spezifisch an den „UG"-Wiederholungen in der 3'-NTR der *lbp*-mRNS statt, was durch Mutagenesen in diesem Bereich nachgewiesen wurde (Mittag und Waltenberger, 1997). CHLAMY 1 kann somit als CCTR-Analogon bezeichnet werden (Mittag, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass CHLAMY 1 an acht 3'-NTRen aus *C. reinhardtii*, die mindestens sieben „UG"-Wiederholungen haben, mit unterschiedlicher Stärke binden kann (Waltenberger *et al.*, 2001). Die meisten der von diesen Genen kodierten Proteine spielen eine Rolle im Stickstoff-Metabolismus oder im CO_2-Stoffwechsel. Ein Beispiel ist die plastidäre Glutamin-Synthetase 2 (= GS2), welche die Bildung von Glutamin aus Ammonium und Glutamat katalysiert (Chen und Silflow, 1996). Die spezifische Bindung von CHLAMY 1 an die sieben „UG"-Wiederholungen in der 3'-NTR der *gs2*-mRNS konnte durch eine Mutagenese der fünf zentralen „UG"-Wiederholungen nachgewiesen werden. CHLAMY 1 konnte an diese mutierte Variante ($gs2_{mut}$) nicht binden (Waltenberger *et al.*, 2001). Erste Untersuchungen von Enzymaktivitäten, deren mRNS eine Bindung von CHLAMY 1 ermöglichen, haben gezeigt, dass die Aktivitäten circadian reguliert sein könnten. So ist sowohl die maximale Aktivität als auch die maximale Proteinmenge von NII1 (= Nitritreduktase) am Tage zu detektieren (Grosch und Mittag, unveröffentlichte Daten). In diesem Zeitraum ist die Bindeaktivität von CHLAMY 1 gering, was auf eine mögliche Funktion des Proteins als Repressor der Translation hinweist.

1.4 Mechanismen translationaler Regulation

Bei der Translationskontrolle können sowohl die 5'- (Übersicht in Pain, 1996) als auch die 3'-NTR (Übersicht in Decker und Parker, 1995; Jackson, 1993) einer mRNS eine wichtige Rolle spielen. So können Sekundärstrukturen in der 5'-NTR für eine ineffiziente Translation verantwortlich sein. Darüber hinaus wurden in einigen mRNS sogenannte uORFs (= „upstream open reading frames") identifiziert, welche die Translationseffizienz des eigentlich ORFs (= „open reading frame") beeinflussen oder aber über differentielle Initiation die Synthese

von mehreren Proteinen ausgehend von einer mRNS steuern können (Kozak, 1991; Mittag *et al*., 1997). Zusätzlich wurden in einigen Organismen RNS-Bindeproteine gefunden, deren Bindung an die 5'-NTR die Translation der RNS beeinflussen können. So wird beispielsweise die Translation der Superoxid-Dismutase-RNS in der Maus durch Bindung von SOD-RBP (= „superoxide dismutase RNA-binding protein") gehemmt (Gu und Hecht, 1996). Ein weiteres Beispiel ist die Regulation der *psbA*-mRNS (kodiert für das Polypeptid D1 des Photosystems II) in *C. reinhardtii*. Hier kann eine Initiation der Translation nur dann stattfinden, wenn ein Komplex aus vier Proteinen an die 5'-NTR bindet (Danon und Mayfiel, 1994; Yohn *et al*., 1998).

Proteine, die an die 3'-NTR einer RNS binden, können ebenso die Translation beeinflussen. Durch Experimente an Hefe (Tarun und Sachs, 1996) konnte nachgewiesen werden, dass eine Interaktion zwischen dem poly(A)-Bindeprotein Pab1p und dem Initiationsfaktor eIF-4G, der am 5'-Ende der RNS bindet, möglich ist. Le *et al*. (1997) konnten kurze Zeit später eine solche Interaktion auch in Pflanzen nachweisen. In Säugern wurde ein Protein (PAIP-1) identifiziert, das sowohl mit dem poly(A)-Bindeprotein PABP als auch mit dem Initiationsfaktor eIF-4A interagieren kann (Craig *et al.*, 1998). Somit konnte in mehreren Organismen eine räumliche Nähe von 5'- und 3'-Ende der RNS während der Initiation der Translation nachgewiesen werden. Man kann sich nun vorstellen, dass Proteine, die in der 3'-NTR einer RNS binden (s. auch 1.2.3 und 1.3), die Translation regulieren können, indem sie beispielsweise die Annäherung der beiden mRNS-Enden verhindern. In *D. melanogaster* konnte das in der 3'-NTR der *nanos*-mRNS bindende Protein SMAUG für die Reprimierung der Translation dieser RNS verantwortlicht gemacht werden (Smibert *et al*., 1996; Dahanukar *et al.*, 1999). Weiterhin konnte für die beiden Proteine hnRNP K und hnRNP E1 eine spezifische Bindung an die 3'-NTR der *15-lipoxygenase*-mRNS in Erythrozyten nachgewiesen werden, die zu einer Reprimierung der Translation führt (Kuhn *et al*., 1999; Ostareck *et al*., 2001).

1.5 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war die biochemische und funktionelle Charakterisierung des circadian regulierten RNS-Bindeproteins CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii*, das mehrere 3'-NTRen über „UG"-Wiederholungen erkennen kann (Waltenberger *et al.*, 2001). Die Molekularmasse des Proteins sollte unter nativen und denaturierenden Bedingungen bestimmt werden. Weiterhin sollte ein Aufreinigungsschema für CHLAMY 1 etabliert werden. Das aufgereinigte Protein sollte durch einen tryptischen Verdau in Peptide gespalten und sequenziert werden. Ausgehend von diesen Peptid-Sequenzen war die Klonierung des Gens / der Gene mittels molekularbiologischer und immunochemischer Experimente geplant. Hierzu sollten ausgewählte Peptid-Sequenzen zur Produktion von degenerierten Oligonukleotiden und Peptid-Antikörpern verwendet werden. Der Einsatz dieser Antiseren sollte zusätzlich eine Mengenbestimmung von CHLAMY 1 im Tag-Nacht-Verlauf ermöglichen.

Zusätzlich war es geplant, die regulatorischen Eigenschaften von CHLAMY 1 mit Hilfe eines Reportergens zu bestimmen, dem die Bindestelle für das Protein in die 3'-NTR eingefügt werden sollte. Durch eine *in vitro*-Translation mit anschließendem Enzymtest sollte der Einfluss von CHLAMY 1 auf die Translation des chimären Reporterkonstruktes untersucht werden.

In einem weiteren Projekt dieser Arbeit sollte die Konservierung von „UG"-Bindeproteinen in der Stammesgeschichte untersucht werden. Aufgrund der Präsenz einer aus 16 „UG"-Wiederholungen bestehenden Region in der 3'-NTR der *regA*-mRNS in *Volvox carteri* wurde diese Kugelalge als Untersuchungsobjekt ausgewählt. Zusätzlich sollten Untersuchungen am Pilz *N. crassa* vorgenommen werden, in dem bereits Komponenten des circadianen Systems identifiziert worden waren (Loros und Dunlap, 2001).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Name und Hersteller
Aufschlussgerät	(E. Bühler Laborgerätebau)
Durchflusszentrifuge	CEPA-Laboratoriumszentrifuge LE mit Klärzylinder (Volumen 0,25 Liter) (C. Padberg GmbH)
Elektroblot	HEP-1 (Peqlab)
Elektrophoreseapparaturen	
horizontal	GNA-200 (Amersham Pharmacia Biotech)
	The *Easy-Cast*; Modell B3 (AGS)
	BlueMarine 100 (Serva)
vertikal	Mini-PROTEAN II (Bio-Rad)
	Werkstatt Eigenbau (Gelgröße 16 x 14,5 cm)
Fluorimeter	TKO 100 (Hoefer Scientific)
Geltrockner	SDG 4050 (Bachofer)
Hybridisierungsofen	30 SpecialHyb (Bachofer)
Kühlzentrifuge	Centrikon H-401 mit den Rotoren A 8.24 und A 6.14 (Kontron Hermle)
Lichtmeßgerät	Li-189 Quantum Photometer (Lambda Instruments)
Minischüttler	Vibrofix Vf1 Electronic (Bachofer)
PCR-Gerät	PTC-100 (MJ Research)
Peristaltikpumpe	minipuls 2 (Gilson)
Phosphoimager	Image plate reader Fujifilm Bas 1500 (Raytest)
Photometer	Ultrospec® 3000 (Amersham Pharmacia Biotech)
Tischzentrifugen	Zentrifuge 5415C (Eppendorf)
	Universal-Zentrifuge (Hettich)
Ultrazentrifuge	TGA-55 mit Rotor TST28.38 (Kontron Hermle)
Vakuumkonzentrator	speed vac SC 110 (Bachofer)

2.1.2 Chemikalien

Alle gängigen Chemikalien waren von p.a.-Qualität und wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), ICN (Eschwege), Applichem (Darmstadt) und Bio-Rad (München) bezogen.

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen NEB (Frankfurt), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Roche (Mannheim) und Gibco BRL (Karlsruhe) bezogen.

- **RNase A** (0,9 Einheiten/µl; Roth, Karlsruhe): 100 mg wurden in 10 ml 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4,8) gelöst. Vor Verwendung wurde die Lösung zur Inaktivierung von DNase-Aktivität für 15 min aufgekocht und danach auf Eis gestellt.
- **RNase T1** (1986 Einheiten/µl; Gibco BRL, Karlsruhe)
- **T7 RNS-Polymerase** (20 Einheiten/µl; Roche, Mannheim)
- **Ribonuklease Inhibitor** (35 Einheiten/µl; MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- **Taq DNS Polymerase** in „storage buffer A“ (5 Einheiten/µl; Promega, Mannheim)
- **T4 Polynukleotidkinase** (= PNK; 10 Einheiten/µl; MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
- **T4 Ligase** (1 Einheit/µl; Roche, Mannheim)
- **DNS Polymerase I, Large (Klenow) Fragment** (5 Einheiten/µl; NEB, Frankfurt)
- **Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets** (Roche; Mannheim): Eine Tablette wurde in 2 ml Aufschlusspuffer für *C. reinhardtii* (s. 2.1.16) gelöst. Diese Stocklösung ist ausreichend für insgesamt 50 ml Puffer.
- **PMSF** (Applichem, Darmstadt): 1mM in Ethanol
- **Lysozym** (Applichem, Darmstadt): 1 µg/µl in Ethanol
- **Pepstatin A** (Applichem, Darmstadt): 1 µg/µl in ddH_2O

2.1.4 Kits und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
4 x Roti-Load 1	Roth (Karlsruhe)
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad (München)
Biotin-14-CTP	Gibco BRL (Karlsruhe)
CnBr activated Sepharose 4B	Sigma (Deisenhofen)
GenElute™ Agarose Spin Column	Sigma (Deisenhofen)
Hybond-N	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
MF-Millipore Membranfilter	Millipore (Eschborn)
Microsep™ Mikrokonzentratoren	Pall GmbH (Dreieich)
mMessage mMachine™	Ambion (Austin)
Nanosep™ Mikrokonzentratoren	Pall GmbH (Dreieich)
Polyguanylic acid [poly(G)]	Sigma (Deisenhofen)
Protran BA 85 Nitrocellulose	Schleicher & Schüll (Dassel)
QIAquick™ Nucleotide Removal Kit	Qiagen (Hilden)
Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega (Mannheim)
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes	Pierce (Rockford)
Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles	Promega (Mannheim)
T7-MEGAshortscript	Ambion (Austin)
Wizard® Plus Midiprep DNA Purification System	Promega (Mannheim)

2.1.5 *Chlamydomonas reinhardtii*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
137c	wt	Harris (1989)
SAG73.72	wt	Sammlung von Algen-kulturen an der Universität Göttingen

2.1.6 *Neurospora crassa*-Stamm

Stamm	Genotyp	Referenz
frq^{+}	*bd*	Merrow *et al.* (2001)

2.1.7 *Volvox carteri*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
V. carteri f. *nagariensis* HK10	wt	Starr (1969)
V. carteri f. *nagariensis* 153-68	*nitA*$^{-}$ / *regA*$^{-}$	Kirk *et al*. (1999)

2.1.8 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	*recA, endA,1 gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lacI*^{q}*ZΔM15, Tn10 (Tet*^{r}*)]*	Bullock *et al.* (1987)
XL1-Blue MRF‘	*Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA,1 supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F‘ proAB, lacI*^{q}*ZΔM15, Tn10(Tet*^{r}*)]*	Jerpseth *et al.* (1992)
SOLR^{TM}	e14^{-}(McrA^{-}), Δ*(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171, sbcC, recB, recJ, uvrC, umuC*::Tn5, (Kan^{r}) *lac, gyrA96, relA1, thi-1, endA1,* λ^{R} [F‘ *proAB, lacI*^{q}*ZΔM15*] Su^{-}	Stratagene (La Jolla)

2.1.9 Vektoren

Name	Referenz
pBluescript II KS(+)	Stratagene (La Jolla)
pBluescript II SK(-)	Stratagene (La Jolla)
pBR322	Watson (1988); Acc.No. J01749

2.1.10 Plasmide

Name	Referenz
pMM3	Mittag *et al.* (1994)
pHW2	Mittag und Waltenberger (1997)
pAB1	Waltenberger *et al.* (2001)
pHW26	Waltenberger *et al.* (2001)
pRAJ275	Clontech (Heidelberg); Acc.No. U02456
pUG3a	Stark (1999)
pUG5	Stark (1999)

2.1.11 Degenerierte Oligonukleotide

Bezeichnung	**Sequenz** [I= Inosin] **5'** $\longrightarrow$ **3'**	**Gerichtet gegen Peptid**
OMM101	tt(ct)ggIgcIgtIga(ag)gg(agct)gc	C3-16
OMM102	gcIcc(ct)tcIacIgc(agct)cc(ag)aa	C3-16
OMM103	gc(ag)ccctc(agc)ac(agc)gc(ag)cc(ag)aa	C3-16
OMM104	gcIggIccIggIggIaa(ct)aa	C3-16
OMM105	tt(ag)ttIccIccIgg(agct)cc(agct)gc	C3-16
OMM106	ttgtt(ag)cc(ag)cc(agc)gg(ag)cc(agc)gc	C3-16
OMM107	ca(ag)ca(ct)acIacIga(ag)ca(ag)ca	C3-13
OMM108	tg(ct)tg(ct)tcIgtIgt(ag)tg(ct)tg	C3-13
OMM109	tg(ct)tgctc(agc)gt(agc)gt(ag)tg(ct)tg	C3-13
OMM110	aa(ct)ca(ag)ga(ct)tt(ct)ccIga(ag)gg	C2-8
OMM111	cc(ct)tcIgg(ag)aa(ag)tc(ct)tg(ag)tt	C2-8
OMM112	ccctc(agc)gg(ag)aa(ag)tc(ct)tggtt	C2-8
OMM113	atItt(ct)gcIgcIca(ag)gc(agct)gg	C1-26
OMM114	ccIgc(ct)tgIgcIgc(ag)aa(agt)at	C1-26
OMM115	cc(agc)gc(ct)tg(agc)gc(agc)gc(ag)aa(ag)at	C1-26
OMM119	ca(ag)ca(ag)gcI(at)(gc)IggIgc(agct)ca	C2-8
OMM120	tgIgcIccI(gc)(at)Igc(ct)tg(ct)tg	C2-8

2.1.12 Molekularmassen-Standards

DNS-Standards

- Lambda DNS/ *Bst*EII-Verdau (NEB, Frankfurt):
  Fragmente: 8454 Bp, 7242 Bp, 6369 Bp, 5686 Bp, 4822 Bp, 4324 Bp, 3675 Bp, 2323 Bp, 1929 Bp, 1371 Bp, 1264 Bp, 702 Bp, 224 Bp, 117 Bp.
- pBR322/ *Hae*III-Verdau (selbst hergestellt):
  Fragmente: 578 Bp, 540 Bp, 504 Bp, 458 Bp, 434 Bp, 267 Bp, 234 Bp, 213 Bp, 192 Bp, 184 Bp, 124 Bp, 123 Bp, 104 Bp, 89 Bp, 80 Bp, 64 Bp, 57 Bp, 51 Bp, 21 Bp, 18 Bp, 11 Bp, 7 Bp.

Protein-Standards

- Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range (Bio-Rad, München)

Phosphorylase B	103	kDa
Bovine serum albumin	77	kDa
Ovalbumin	50	kDa
Carbonic anhydrase	34,3	kDa
Soybean trypsin inhibitor	28,8	kDa
Lysozyme	20,7	kDa

  (Die genauen Größen der einzelnen Proteine sind abhängig von der Charge des Standards und werden bei den jeweiligen Experimenten gesondert angegeben).
- SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range (Bio-Rad, München)

Myosin	200	kDa
ß-galactosidase	116,25	kDa
Phosphorylase B	97,4	kDa
Serum albumin	66,2	kDa
Ovalbumin	45	kDa
Carbonic anhydrase	31	kDa
Trypsin inhibitor	21,5	kDa
Lysozyme	14,4	kDa
Aprotinin	6,5	kDa.

- Gelfiltrationsstandard (Bio-Rad, München):

Thyroglobulin	670	kDa
Gammaglobulin	158	kDa
Ovalbumin	44	kDa
Myoglobin	17	kDa
Vitamin B-12	1,35	kDa.

2.1.13 Antiseren

2.1.13.1 Primäre Antiseren

In dieser Arbeit wurden Peptid-Antiseren verwendet, die gegen die Untereinheiten des Proteins CHLAMY 1 (Untereinheiten C1/2 und C3) gerichtet sind. Diese Antikörper wurden von der Firma Eurogentec (Herstal, Belgien) hergestellt. Als Wirt für die Antikörperproduktion dienten Kaninchen. Um eine Immunantwort im Kaninchen auslösen zu können, war es nötig, die Peptide vor Verabreichung an KLH (= „keyhole limpet hemocyanin“ = Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*) zu koppeln. Folgende Peptide wurden zur Immunisierung verwendet:

Name des Peptids	Sequenz des Peptids	CHLAMY 1-Untereinheit	Bezeich-nung
EP001314	H_2N-ASGAHILVNQDFPEGA-$CONH_2$	C1/2	AK1/2
EP001315	H_2N-CQIPQHTTEQHIR-$CONH_2$	C3	AK3

2.1.13.2 Sekundäre Antikörper

Gekoppeltes Enzym	Antikörper	Hersteller
Meerrettich-Peroxidase	Monoclonal Anti-Rabbit IgG; Peroxidase Conjugate	Sigma (Deisenhofen)
Alkalische Phosphatase	Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphate Conjugate	Sigma (Deisenhofen)

2.1.14 cDNS-Bank

C. reinhardtii-Zellen (Stamm 137c) wurden zum Zeitpunkt LD 10 geerntet. Nach Isolierung von poly(A)$^+$ mRNS wurde mit Hilfe des „ZAP-cDNA® Synthesis Kit" (Stratagene, La Jolla) eine cDNS-Bank hergestellt, nach Fragmentgrößen fraktioniert und in Phagen verpackt (Waltenberger *et al.*, 2001). Für die Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben werden, wurde die Verpackung der cDNS-Bank ausgewählt, welche Fragmente im Größenbereich von 500 Bp bis 5000 Bp enthielt.

2.1.15 Kulturmedien

Alle Medien wurden mit ddH_2O angesetzt und zur Sterilisation für 25 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde zusätzlich 15 g Agar pro Liter eingewogen.

2.1.15.1 Medium zur Anzucht von *C. reinhardtii*

HSA-Medium (Sueoka, 1960):
1 x HSA-Puffer, 0,081 mM $MgSO_4$, 0,1 mM $CaCl_2$, 0,1 % (v/v) Trace (Hutner *et al.*, 1950), 0,3 % (w/v) Hefeextrakt

10 x HSA-Puffer: 62 mM K_2HPO_4, 68 mM KH_2PO_4, 93 mM NH_4Cl, 150 mM $C_2H_3NaO_2$

2.1.15.2 Medien zur Anzucht von Bakterien und Phagen

NZY-Medium: 8,6 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NZ Amin (Casein Hydrolysat); pH 7,5

NZY Top Agar: 1 l NZY-Medium, 0,7 % (w/v) Agarose

SM-Puffer: 100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4$, 50 mM Tris, 0,01 % (w/v) Gelatine; pH 7,5

2.1.16 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit ddH_2O angesetzt und, wenn nötig, zur Sterilisation für 25 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert.

2.1.16.1 Puffer für Gelelektrophorese und molekularbiologische Standardmethoden

10/1 TE:	10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8,0
50/10 TE:	50 mM Tris, 10 mM EDTA; pH 8,0
Lysepuffer:	0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS
5 x TBE:	445 mM Tris, 445 mM Borsäure, 16 mM EDTA.
40 x TA:	1,6 M Tris, 4,56 % (v/v) Essigsäure, 2,5 mM EDTA; pH 8,1
5 x Laemmli-Puffer:	125 mM Tris, 1,25 M Glycin, 0,5 % (w/v) SDS
Lower Tris (pH 8,8):	1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS
Upper Tris (pH 6,8):	0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS
DNS-Probenpuffer:	0,03 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin; pH 8,1
RNS-Probenpuffer I:	20 mM EDTA (pH 8,0), 95 % (v/v) Formamid, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol
RNS-Probenpuffer II:	97 % (v/v) Glycerin, 1 % (w/v) Bromphenolblau, 1 % (w/v) Xylencyanol
RNS-Elutionspuffer:	195 mM $C_2H_7NO_2$, 0,1 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA (pH 8,0)
Transferpuffer (pH 8,3):	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol.
Coomassie-Lösung:	0,05 % (w/v) Brillant Blau R250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärber-Lösung:	7 % (v/v) Essigsäure, 5 % (v/v) Methanol
Ponceau S-Lösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure

2.1.16.2 Puffer für proteinchemische Experimente

Aufschlusspuffer für *C. reinhardtii*:
80 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0), 5 % (v/v) Glycerin, 0,2 mM DTT, (+ complete™ protease inhibitor cocktail; s. 2.1.3)

Aufschlusspuffer für *N. crassa*:
50 mM Hepes (pH 7,4), 10 % (v/v) Glycerin, 137 mM NaCl, 10 µM PMSF, 0,1 % (w/v) Leupeptin, 0,1 % (w/v) Pepstatin A

Aufschlusspuffer für *V. carteri*:
800 mM NaCl, 100 mM Tris (pH 7,5), 10 mM EDTA (pH 8,0), 5 % (v/v) Glycerin, 0,2 mM DTT, 10 µM PMSF, 0,1 % (w/v) Leupeptin, 0,1 % (w/v) Pepstatin A

V. carteri-Puffer: 400 mM NaCl, 50 mMTris (pH 7,5), 5 mM EDTA (pH 8,0), 5 % (v/v) Glycerin, 0,2 mM DTT, 10 µM PMSF, 0,1 % (w/v) Leupeptin, 0,1 % (w/v) Pepstatin A

AS-Lösung:	3 M $H_8N_2O_4S$, 80 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0)
Dialysepuffer:	80 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0), 5 % (v/v) Glycerin
Gradientenpuffer:	10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH8,0)
Puffer B:	5 mM Tris (pH 7,5), 0,5 mM EDTA (pH 8,0), 1 M NaCl
Puffer E+:	80 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0), 5% (v/v) Glycerin, 0,2 mM DTT, 0,5 % (v/v) Igepal CA-630, 25 µg/ml Hefe RNS
Puffer E-:	Puffer E+ ohne Zusatz von Hefe RNS
Elutionspuffer:	3 M NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0), 5 % (v/v) Glycerin
MUG-Puffer:	1 mM MUG, 50 mM $NaHPO_4$, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 % (w/v) N-Lauroylsarcosin, 10 mM ß-Mercaptoethanol

2.1.16.3 Puffer für immunochemische Experimente

TBS:	20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl
TBST:	TBS mit Zusatz von 0,05 % (v/v) Tween 20.
PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,76 mM KH_2PO_4; pH 7,4
PBST:	PBS mit Zusatz von 0,05 % (v/v) Tween 20
Blockierungspuffer I:	5 % (w/v) Milchpulver, 0,2 % (v/v) Tween 20, gelöst in TBS oder PBS
Blockierungspuffer II:	1 % (w/v) Slimfast Schoko, gelöst in TBST oder PBST
Luminol:	0,44 g in 10 ml DMSO, vor Licht geschützt aufbewahren
p-Cumarinsäure:	0,15 g in 10 ml DMSO
Luminol-Lösung I:	100 mM Tris (pH 8,5), 1 % (v/v) Luminol, 2,2 % (v/v) p-Cumarinsäure
Luminol-Lösung II:	100 mM Tris (pH 8,5), 0,02 % (v/v) H_2O_2
AP-Puffer:	100 mM Tris (pH 9,5), 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$
NBT:	50 mg/ml in 70 % DMF
BCIP:	50 mg/ml in DMF
Entwicklerlösung:	10 ml AP-Puffer, 66 µl NBT, 33 µl BCIP
Kopplungspuffer:	0,1 M $NaHCO_3$ (pH 8,3), 0,5 M NaCl
Acetatpuffer:	0,1 M $C_2H_3NaO_2$ (pH 4,0), 0,5 M NaCl

2.1.16.4 Puffer für Hybridisierungs-Experimente

Denaturierungspuffer:	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Neutralisierungspuffer:	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris (pH 8,0)
20 x SSC (pH 7,0):	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat
Tris/SSC:	0,2 M Tris (pH 7,5), 2 x SSC

100 x Denhardt:	2 %(w/v) Ficoll, 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 2 % (w/v) BSA
Prähybridisierungspuffer:	6 x SSC, 20 mM NaH_2PO_4, 0,4 % SDS, 5 x Denhardt, 500 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNS
Hybridisierungspuffer:	Prähybridisierungspuffer ohne Zusatz von Denhardt
Waschpuffer:	6 x SSC, 0,1 % SDS

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von *C. reinhardtii*

C. reinhardtii-Kulturen wurden bei 24°C in einem 12 h Licht/12 h Dunkel-Zyklus (LD 12:12) angezogen. Der Beginn der Lichtphase wurde als LD 0 definiert, der Beginn der Dunkelphase als LD 12. Die Lichtstärke war vom Ort der Anzucht abhängig und betrug 60 µE/m^2/sec bzw. 65 µE/m^2/sec. Für einige Versuche war es nötig, die Zellen unter Dauerschwachlicht (LL) zu ernten. Hierzu wurden die Kulturen unter einem LD 12:12-Zyklus synchronisiert und dann zu Beginn der Lichtphase unter Dauerschwachlicht (9 µE/m^2/sec) gestellt. Dieser Zeitpunkt wurde als LL 0 definiert. Die Kultivierung erfolgte unter kontinuierlichem Rühren in Glaskolben. Als Kulturmedium diente HSA-Medium (= „High Salt Acetate"-Medium; s. 2.1.15.1).

2.2.2 Ernte von *C. reinhardtii*

Flüssigkulturen von *C. reinhardtii* wurden bei einer Zelldichte von 2–3 x 10^6 Zellen/ml geerntet. Hierzu wurde die Kultur abzentrifugiert (6000 x g, 5 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

Sollten mehr als sechs Liter *C. reinhardtii*-Kultur geerntet werden, wurde zur Ernte eine Durchflusszentrifuge verwendet (5 % Leistung, RT; s. 2.1.1). Nach der Zentrifugation befanden sich die Zellen auf einer Folie im Rotor. Von dieser Folie wurden sie abgeschabt, in 15 ml Plastikröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

2.2.3 Herstellung eines Rohextraktes aus *C. reinhardtii*

Der Aufschluss von *C. reinhardtii*-Zellen erfolgte mit Hilfe von Glaskugeln (Ø 0,25–0,3 mm). Reaktionsgefäße wurden zur Hälfte mit Glaskugeln gefüllt, zweimal mit kaltem Aufschlusspuffer für *C. reinhardtii* (s. 2.1.16.2) gespült und auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden nach Entnahme aus der –80°C-Truhe mit kaltem Aufschlusspuffer für *C. reinhardtii* versetzt und auf Eis aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension den Glaskugeln zugesetzt. Der Aufschluss erfolgte durch zweimaliges starkes Schütteln mit einer Dauer von 1 x 45 sec und 1 x 30 sec. Dazwischen wurden die Reaktionsgefäße für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde dann in gekühlte Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (12000 x g, 20 min, 4°C). Der Rohextrakt wurde als klarer Überstand abgenommen und auf Eis gekühlt.

Bei Herstellung von größeren Mengen Rohextrakt wurde ein Aufschlussgerät verwendet (s. 2.1.1), bei dem die Glaskugeln und die Zellsuspension in einen Metallzylinder eingefüllt wurden. Die Vorgehensweise unterschied sich dabei von der oben angegebenen nur im Zentrifugationsschritt: 30000 x g, 30 min, 4°C.

2.2.4 Fraktionierende Ammoniumsulfat-Fällung

2.2.4.1 Verwendung einer Ammoniumsulfat-Lösung

Die Proteine eines *C. reinhardtii*-Rohextraktes wurden mit Hilfe einer Ammoniumsulfat (AS)-Lösung fraktionierend gefällt. Dem Rohextrakt (s. 2.2.3) wurde bei 4°C unter Rühren langsam die AS-Lösung (s. 2.1.16.2) zugegeben, bis die gewünschte Konzentration an AS erreicht war. Danach wurde die Lösung für weitere 30 min bei 4°C gerührt. Die ausgefällten Proteine wurden in einem Zentrifugationsschritt (30000 x g, 30 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand konnte für weitere AS-Fällungsschritte eingesetzt werden, wobei die Durchführung nicht geändert wurde. Für die Aufreinigung von CHLAMY 1(s. 2.2.8) wurden die zwischen 0,5-1 M AS gefällten Proteine eingesetzt.

Die gefällten Proteine wurden nach der Zentrifugation in Aufschlusspuffer für *C. reinhardtii* (s. 2.1.16.2) resuspendiert und mit Hilfe eines Hand-Homogenisators

vollständig gelöst. Eventuell unlösliche Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4°C) abgetrennt.

2.2.4.2 Verwendung von festem Ammoniumsulfat

Die Proteine eines *V. carteri*-Rohextraktes (s. 2.2.26) wurden mit Hilfe von festem Ammoniumsulfat (AS) fraktionierend gefällt. Die Berechnung der benötigten Menge an AS erfolgte unter Zuhilfenahme einer AS-Fällungstabelle (Deutscher, 1990). Dem Rohextrakt wurde unter Rühren bei 4°C langsam fein pulverisiertes AS zugegeben, bis die gewünschte Konzentration erreicht war. Die Lösung wurde für weitere 30 min gerührt. Eine anschließende Zentrifugation (30000 x g, 30 min, 4°C) sedimentierte die ausgefällten Proteine. Der Überstand wurde einer weiteren AS-Fällung unterzogen. Die Durchführung wurde dabei nicht verändert.

Die gefällten Proteine wurden in *V. carteri*-Puffer (s. 2.1.16.2) resuspendiert, mit einem Hand-Homogenisator gelöst und zur Abtrennung von eventuell nicht löslichen Bestandteilen zentrifugiert (12000 x g; 10 min; 4°C).

2.2.5 Dialyse von Proteinlösungen

Zum Entsalzen von resuspendierten Proteingemischen nach AS-Fällungen (s. 2.2.4) wurden MF-Millipore Membranfilter (Porengröße 0,025 µm, Durchmesser 25 mm) oder „Slide-A-Lyzer Dialysis“ Kassetten (MWCO 10,000) benützt.

Millipore-Membranfilter wurden bis zu einem Probenvolumen von 200 µl verwendet. Eine kleine Petrischale wurde mit Puffer (s. unten) gefüllt, die Membran aufgelegt und die Probe vorsichtig aufgetragen. Die Dauer der Dialyse betrug pro 50 µl Probe 30 min bei 4°C.

„Slide-A-Lyzer Dialysis“ Kassetten wurden zur Dialyse von größeren Volumina verwendet. Das Minimalvolumen betrug 3 ml, das Maximalvolumen 15 ml. Die Dialyse wurde bei 4°C unter ständigem Rühren durchgeführt. Die Dauer betrug 2,5-3 h, nach jeweils 60 min wurde ein Pufferwechsel durchgeführt.

Bei Dialyse von *C. reinhardtii*-Proteinlösungen wurde der Dialysepuffer (s. 2.1.16.2) verwendet. Sollten Proteinlösungen aus *V. carteri* dialysiert werden,

wurde der Aufschlusspuffer für *V. carteri* verwendet (s. 2.1.16.2; ohne Zusatz von DTT, PMSF, Leupeptin und Pepstatin A).

2.2.6 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Zum Einengen von Proteinlösungen wurden Mikrokonzentratoren (Pall GmbH, Dreieich) mit einer Omega Membran verwendet. Die Ausschlussgrenze der verwendeten Mikrokonzentratoren lag bei 10 kDa. Bis zu einem Probevolumen von 500 µl wurden Nanosep^{TM}-Konzentratoren verwendet, die einer maximalen Zentrifugalkraft von 500 x g ausgesetzt werden durften. Für größere Volumina (bis zu 3,5 ml) wurden Microsep^{TM}-Konzentratoren eingesetzt. Die maximale Zentrifugalkraft für diese betrug 7500 x g.
Nach dem Beladen der Konzentratoren mit der Probe, wurden diese so lange bei 4°C und der maximalen Zentrifugalkraft rotiert, bis die Probe auf der Membran auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert worden war. Währenddessen war es möglich, oben neue Probe nachzuladen.

2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung wurde der „Bio-Rad Protein Assay“ (Bio-Rad, München) benützt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers für die Standardprozedur: Für die Bestimmung des Proteingehalts wurden 2–10 µl Probe eingesetzt und mit ddH_2O auf 100 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Nach Zugabe von 5 ml „Bio-Rad Protein Assay“-Lösung (1 : 5 mit ddH_2O verdünnt) wurde der Ansatz gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Der Proteingehalt der Probe konnte mit Hilfe dieses Wertes anhand einer Eichkurve bestimmt werden. Für die Erstellung der Eichkurve wurde BSA (5–80 µg) verwendet.

2.2.8 Spezifische RNS-Affinitätschromatographie

Diese Chromatographie wurde gemäß Mehta und Driscoll (1998) mit Veränderungen durchgeführt: 1 ml Streptavidinkugeln (Promega, Mannheim)

wurden 4 x mit je 500 µl Puffer B (s. 2.1.16.2) gewaschen. Die Bindung von 20 µg biotinylierten Transkripts (s. 2.2.15.2) erfolgte in einem Volumen von 200 µl Puffer B für 1 h bei RT, wobei der Ansatz in Abständen von ca. 10 min gemischt wurde. Zur Entfernung von nicht-gebundenem Transkript wurden die Streptavidinkugeln danach 10 x mit je 500 µl Puffer B gewaschen. Die Äquilibrierung der Streptavidinkugeln erfolgte durch achtmaliges Spülen mit je 500 µl Puffer E+ (s. 2.1.16.2).

Währendessen wurden die zwischen 0,5-1 M AS gefällten *C. reinhardtii*-Proteine in Lösung gebracht und dialysiert (s. 2.2.3, 2.2.4.1, 2.2.5). 1 mg dieses Proteingemisches wurden mit 1 mg poly(G) für 20 min auf Eis inkubiert. Diese Mischung wurde mit den äquilibrierten Streptavidinkugeln (s. oben) vereinigt. Die Bindung der spezifischen Proteine an das biotinylierte Transkript erfolgte während einer Dauer von 2 h bei 4°C unter mehrmaligem vorsichtigen Mischen des Ansatzes. Nach dieser Zeit wurde der Überstand abgenommen und bei –20°C gelagert.

Die Streptavidinkugeln mit den daran gebundenen Proteinen wurden zuerst mit Puffer E+ (1 x 200 µl; 4 x 500 µl; s. 2.1.16) und dann mit Puffer E- (6 x 500 µl; s. 2.1.16.2) gewaschen. Die Elution der gebunden Proteine wurde mit Elutionspuffer (s. 2.1.16.2) durchgeführt. Hierzu wurden 200 µl des Elutionspuffers den Kugeln zugesetzt und diese für 45 min bei RT unter mehrmaligem Mischen inkubiert. Die eluierten Proteine wurden danach abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

Die Streptavidinkugeln konnten für eine weitere RNS-Affinitätschromatographie eingesetzt werden. Hierzu wurden sie zuerst 1 x mit 500 µl Puffer B gespült; die Äquilibrierung und der weitere Versuchsablauf erfolgte wie bereits oben beschrieben.

2.2.9 Western Blot

Nach beendeter denaturierender Elektrophorese von Proteingemischen (s. 2.2.13.2) wurde das Trenngel in Transferpuffer (s. 2.1.16.2) für 10 min unter Schütteln inkubiert. Die Proteine wurden dann auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Harlow und Lane, 1988). Hierzu wurde eine „semidry"-Elektroblot-

Einheit (Peqlab, Erlangen) verwendet. Der Proteintransfer erfolgte bei 1,5 mA/cm^2 Membran für die Dauer von 1,5 h.

Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde die Membran für 30 sec in ddH_2O gewaschen und dann für 2 min in Ponceau S-Lösung (s. 2.1.16.2) geschwenkt. Die Entfärbung des Hintergrunds erfolgte mit ddH_2O, bis die Proteinbanden sichtbar waren.

2.2.10 Auftragen von Peptiden auf Membranen

Auf eine Nitrocellulose-Membran (Größe ca. 0,4 x 5 cm) wurde eine Peptid-Lösung aufgetropft. Insgesamt wurden vier Punkte mit je 1,5 µl Volumen aufgebracht, wobei die Peptid-Lösung jeweils 1 : 10 verdünnt wurde. Nachdem die Peptide auf der Membran getrocknet waren, wurde diese für eine Immunodetektion eingesetzt (s. 2.2.11). Die maximal aufgetropfte Peptidmenge betrug ca. 1 µg.

2.2.11 Immunodetektion von Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte durch sekundäre Antikörper, deren Bindung an einen primären Antikörper durch enzymatische Reaktionen gezeigt werden konnte. Die zu untersuchenden Proteine wurden für die Durchführung der Experimente auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Dies geschah entweder durch einen Western Blot (s. 2.2.9), durch Auftrag von Peptiden auf die Membran (s. 2.2.10) oder durch Übertragung von ausplattierten Phagen, deren cDNS-Fragmente aus *C. reinhardtii* durch IPTG-Stimulierung exprimiert wurden (s. 2.2.20.2).

Zur Absättigung unspezifischer Antikörperbindungsstellen wurde die Nitrocellulose-Membran für mindestens 1 h bei RT in Blockierungspuffer (s. 2.1.16.3) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einer Antiserum-Lösung (Verdünnung in Blockierungspuffer) unter Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit Waschpuffer (TBST bzw. PBST; s. 2.1.16.3) erfolgte eine Inkubation mit sekundärem Antikörper (s. 2.1.13.2; Verdünnung in Blockierungspuffer) für 1 h bei RT. An diesen

sekundären Antikörper war ein Enzym gekoppelt, welches den Nachweis der Bindung des primären Antikörpers an ein Protein ermöglichte. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran mit Waschpuffer (TBST bzw. PBST) wurde der immunologische Nachweis der Antikörper-Bindung durchgeführt (s. 2.2.11.1 und 2.2.11.2).

Für die durchgeführten Immunodetektionen wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Blockierungspuffer verwendet. Für Blockierungspuffer I (s. 2.1.16.3) wurden Milchpulver und Tween 20 verwendet, die je nach Nachweisreaktion in TBS oder PBS gelöst wurden. Für den Blockierungspuffer II (s. 2.1.16.3) wurde „Slimfast Schoko“ verwendet, das, im Gegensatz zu Milchpulver, vor allem Sojaproteine enthält. Dieses wurde, je nach Nachweisreaktion, in TBST oder PBST gelöst. Als Waschpuffer wurde jeweils der Puffer verwendet, der auch für das Lösen der Blockierungssubstanzen verwendet wurde. Die Verwendung der unterschiedlichen Blockierungs- und Waschpuffer war abhängig vom immunologischen Nachweis und vom verwendeten Antiserum. Die jeweiligen Puffer werden bei den beschriebenen Experimenten im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben.

2.2.11.1 Nachweis mit Meerrettich-Peroxidase

Bei dieser Enzymreaktion (Harlow und Lane, 1988) konnten beide Blockierungs- bzw. Waschpuffer verwendet werden. Das Enzym Peroxidase wurde für die chemilumineszente Immunodetektion von Proteinen eingesetzt. Es katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Luminol, bei der ein lumineszierendes Produkt entsteht. Der sekundäre Antikörper (s. 2.1.13.2) wurde in einer Verdünnung von 1 : 6666 eingesetzt.

Nach Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper und den Waschschritten (3 x 15 min) wurde die Enzymreaktion gestartet. Die Durchführung geschah im Dunkelraum bei Rotlicht: Die hierzu verwendeten Lösungen (Luminol-Lösungen I + II; s. 2.1.16.3) wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und auf die Membran gegeben. Es folgte eine fünfminütige Inkubation unter Schwenken. Danach wurde die überschüssige Lösung entfernt, die Membran in

Folie verpackt und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Dauer der Exposition hing von der Signalstärke ab und betrug zwischen 15 sec und über Nacht.

2.2.11.2 Nachweis mit Alkalischer Phosphatase

Bei dieser Nachweismethode (Harlow und Lane, 1988) wurden die Blockierungssubstanzen in TBST gelöst und als Waschpuffer wurde TBST verwendet (s. 2.1.16.3). Der Nachweis erfolgte mit Hilfe der Substrate NBT und BCIP, die durch das Enzym alkalische Phosphatase zu einem auf der Membran sichtbaren blau-lila Produkt umgesetzt wurden.

Der sekundäre Antikörper (s. 2.1.13.2) wurde in einer 1 : 20000-Verdünnung eingesetzt. Nach den Waschschritten (3 x 10 min) wurde die Membran zur Entfernung des Detergenz Tween 20 kurz in TBS (s. 2.1.16.3) geschwenkt, da dieses den Nachweis stören kann. Danach wurde die Membran so lange in Entwicklerlösung (s. 2.1.16.3) inkubiert, bis die gewünschte Färbungsintensität erreicht war. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch Inkubation der Membran in ddH_2O. Danach wurde die Membran getrocknet und vor Licht geschützt aufbewahrt.

2.2.12 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Zur Abtrennung von spezifischen Antikörpern aus Kaninchen-Serum wurde das Peptid, gegen welches der Antikörper gerichtet war, an CnBr aktivierte Sepharose 4B gebunden. Nach Inkubation der so bepackten Sepharose mit dem Kaninchen-Serum wurde der an das Peptid gebundene Antikörper eluiert.

2.2.12.1 Kopplung des Peptids an CnBr aktivierte Sepharose 4B

Die Kopplung des Peptids an das Säulenmaterial wurde gemäß der Anleitung im Handbuch „Affinity Chromatography – Principles and Methods“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Aus 1 g gefriergetrockneter CnBr aktivierter Sepharose 4B (Sigma, Deisenhofen) werden nach Quellung des Materials ca. 3,5 ml Gel. In einem ersten Schritt wurde die Sepharose mit Hilfe

eines Glasfiltertiegels (Porosität 3) gewaschen. Pro 1 g Sepharose wurden hierzu 200 ml 1 mM HCl verwendet. Am Schluss wurde die gequollene Sepharose (= Gel) so lange durch Anlegen eines Vakuums getrocknet, bis Risse an der Oberfläche auftraten.

Pro 1 ml Gel konnten ca. 5 mg Peptid gekoppelt werden. Das Verhältnis von Gelvolumen : Peptidlösung betrug 1 : 2. Das zu koppelnde Peptid wurde in Kopplungspuffer (s. 2.1.16.3) verdünnt, die Absorption bei 280 nm bestimmt und mit dem Gel vereinigt. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei RT unter kontinuierlichem Drehen. Die Peptidlösung wurde danach abgenommen und die Absorption bei 280 nm bestimmt, um abschätzen zu können, wie viel Peptid an die Sepharose gebunden werden konnte. Zum Blocken der nicht besetzten Gruppen wurde das Gel mit 10 Vol. 0,2 M Glycin (pH 8) versetzt und 2 h bei RT gedreht. Danach wurde es in eine kleine Plastiksäule überführt und fünf Waschzyklen unterzogen. Diese Zyklen sahen zuerst einen Schritt mit 10 Vol. Kopplungspuffer (s. 2.1.16.3) und dann einen Schritt mit 10 Vol. Acetatpuffer (s. 2.1.16) vor. Am Ende wurde die Säule mit 20 Vol. PBS (s. 2.1.16.3) gewaschen, mit 0,02 % (w/v) Natriumazid versetzt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.12.2 Kopplung und Elution des Antikörpers

Die Kopplung und Elution des an die Säule bindenden Antikörpers wurde gemäß Harlow und Lane (1988) durchgeführt. Für 0,5 ml Säule wurden 600 µl Kaninchen-Serum eingesetzt. Vor Verwendung des Serums wurde dieses zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen für 30 min bei 6000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde 1 : 10 in PBS (s. 2.1.16.3) verdünnt und die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm abgeschätzt. Die Chromatographie wurde bei RT durchgeführt. Die Säule wurde vor dem Beladen mit allen Puffern gespült, die während der Chromatographie verwendet wurden (Präelutions- und Elutionspuffer in der Reihenfolge von Tab. 1). Hierzu wurden jeweils 10 Säulenvolumen Puffer verwendet. Am Ende wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen PBS gespült.

Um eine effiziente Bindung des Antikörpers an die Säule zu gewährleisten, passierte das Antiserum drei Mal die Säule. Von diesem Durchfluss wurde die

Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm abgeschätzt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen wurde die Säule anschließend mit 20 Säulenvolumen PBS gewaschen. Die Antikörper-Elution wurde mit verschiedenen Puffern durchgeführt, wobei teilweise eine Präelution nötig war (s. Tab. 1). Bei Elution unter sauren bzw. basischen Bedingungen wurden die Eluate sofort neutralisiert, um die Aktivität des Antikörpers erhalten zu können. Die Elution erfolgte schrittweise durch Zugabe von 10 x 250 µl Elutionspuffer.

Tab. 1: Puffer zur Elution von Antikörpern von einer Peptidsäule

Elutions-bedingungen	Präelution	Elutionspuffer	Eluat neutralisieren mit
Sauer	10 mM Phosphat pH 6,8	100 mM Glycin pH 2,5	1 M Phosphat pH 8
Basisch	10 mM Phosphat pH 8	100 mM Ethanol-amin pH 11,5	1 M Phosphat pH 6,8
Hochsalz	nicht nötig	3,5 M $MgCl_2$	nicht nötig

2.2.13 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.2.13.1 Native PAGE

Diese Form der PAGE (Sambrook *et al*., 1989) wurde zur Auftrennung von Protein-RNS-Komplexen (s. 2.2.17) verwendet. Das Gel hatte ein Größe von 16 x 14,5 cm und war 1,5 mm dick. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE (s. 2.1.16.1) verwendet.

Zusammensetzung des Geles für die native PAGE

4	% (v/v)	Acrylamidlösung (Acrylamid : Bisacrylamid = 39:1)
5	% (v/v)	Glycerin
0,5	x	TBE
0,1	% (v/v)	APS
0,04	% (v/v)	TEMED.

Das Gel wurde vor der Auftrennung der Proben für ca. 1 h bei 150 V elektrophoretisiert. Den Proben wurde vor dem Beladen 1 µl RNS-Probenpuffer II (s. 2.1.16.1) zugesetzt. Der Gellauf erfolgte bei 150 V, bis die Xylencyanol-Bande des Probenpuffers ungefähr die Hälfte der Gellänge passiert hatte. Das Gel wurde anschließend auf Filterpapier getrocknet (1 h bei 80°C unter Vakuum).

2.2.13.2 Denaturierende PAGE zur Aufreinigung von Transkripten

Vor dem Einsatz eines radioaktiv markierten Transkriptes (Herstellung s. 2.2.15.1) in Experimente (s. 2.2.17 und 2.2.19), war es nötig, dieses über ein denaturierendes Harnstoffgel (Sambrook *et al*., 1989) aufzureinigen. Das Gel hatte eine Größe von 16 x 14,5 cm und war 0,8 mm dick. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE (s. 2.1.16.1) verwendet. Vor dem Beladen des Gels wurde dieses für ca. 1 h bei 150 V elektrophoretisiert.

Zusammensetzung eines denaturierenden Harnstoffgels

10,5	g	Harnstoff
4,175	ml	Acrylamidlösung (30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid)
5	ml	5 x TBE

ad 25 ml mit ddH_2O. Diese Lösung wurde über Nitrocellulose filtriert und entgast. Zur Polymerisation wurden 0,06 % (v/v) APS und 0,02 % (v/v) TEMED zugegeben. Die Polymerisationsdauer betrug mindestens 1 h.

Die Proben (s. 2.2.15.1) wurden vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min auf 75°C erhitzt und kurz auf Eis gestellt. Der Gellauf wurde bei 150 V durchgeführt bis die Bromphenolblau-Farbbande ca. 2/3 der Gellänge passiert hatte. Zur Lokalisation des radioaktiv markierten Transkriptes im Gel wurde für 5 min ein Röntgenfilm auf das Gel gelegt und entwickelt. Das Transkript mit der gewünschten Größe wurde als Gelfragment ausgeschnitten. Die Elution der RNS aus dem Gelstück erfolgte in 500 µl RNS-Elutionspuffer (s. 2.1.16.1) für mindestens 3 h bei 42°C. Danach wurde der RNS-haltige Überstand abgenommen, die RNS durch Zugabe von 1 ml Ethanol über Nacht bei –20°C gefällt und abzentrifugiert (12000 x g; 30 min; 4°C). Nach dem Trocknen des

Sedimentes im Vakuumkonzentrator für ca. 15 min wurde das aufgereinigte Transkript in 50–100 µl DEPC-H_2O resuspendiert.

2.2.13.3 Denaturierende PAGE (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen

Bei dieser Form der PAGE werden die denaturierten Proteine in einem vertikalen Gel entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das Gel ist jeweils aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammengesetzt (s. Tab. 2). Bei Verwendung von großen Gelen (16 x 14,5 cm) wurde zusätzlich ein Fußkleber zum Abdichten des Gelsystems benötigt. Als Laufpuffer diente 1 x Laemmli-Puffer (s. 2.1.16.1).

Tab. 2: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

Fußkleber		
Acrylamidlösung (30 % Acrylamid + 0,8 % Bisacrylamid)	2 ml	
Lower Tris	1,25 ml	
ddH_2O	1,75 ml	
Polymerisation mit 0,28 % (w/v) APS + 0,3 % (v/v) TEMED		
Trenngel		
Konzentration Acrylamid	**9 %**	**12,5 %**
Acrylamidlösung	15 ml	21 ml
Lower Tris	10 ml	10 ml
ddH_2O	24,75 ml	18,5 ml
Polymerisation mit 0,1 % (w/v) APS + 0,04 % (v/v) TEMED		
Sammelgel		
Acrylamidlösung	1 ml	
Upper Tris	2,5 ml	
ddH_2O	6,34 ml	
Polymerisation mit 0,3 % (w/v) APS + 0,1 % (v/v) TEMED		

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteine mit „4 x Roti-Load 1“ (Roth, Karlsruhe; Verwendung nach Angaben des Herstellers) versetzt und für 5 min in kochendem H_2O denaturiert, abzentrifugiert und auf das Gel geladen. Im Sammelgel wurden die Proteine bei 100 V transportiert. Nach dem Passieren der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel wurde die Spannung auf 150-200 V erhöht.

2.2.14 Färbung von Proteinen nach PAGE

2.2.14.1 Silberfärbung

Für Proteinmengen unter 50 ng wurde die Silberfärbung nach Heukeshoven und Derrnick (1988) durchgeführt (s. Tab. 3). Nach Beendigung der Färbung wurde das Gel getrocknet (ca. 1 h bei 80°C unter Vakuum).

Tab. 3: Protokoll zur Durchführung einer Silberfärbung

	Zusammensetzung der Puffer	**Inkubation (Zeit in min)**
Fixieren	30 % Ethanol + 10 % Essigsäure	180
Inkubieren	0,5 M $C_2H_3NaO_2$ + 0,2 % $Na_2S_2O_3$ + 0,5 % Glutaraldehyd + 30 % Ethanol	120
Waschen	ddH_2O	6 x 10
Tränken	0,1 % $AgNO_3$ + 0,02 % Formaldehyd	60
Waschen	ddH_2O	< 2
Entwickeln	2,5 % Na_2CO_3 + 0,01 % Formaldehyd	bis gewünschte Banden zu sehen sind
Stoppen	50 mM EDTA	10

2.2.14.2 Coomassie-Färbung

Die Färbung erfolgte gemäß Deutscher (1990) mit Veränderungen. Zur Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden die Gele in Coomassie–Lösung (s. 2.1.16.1) für ca. 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Zur Entfärbung des

Hintergrundes wurden die Gele in Entfärber-Lösung (s. 2.1.16.1) geschüttelt. Diese Lösung wurde so oft gewechselt, bis der Hintergrund vollständig entfärbt war. Das Gel konnte anschließend getrocknet (1 h bei 80°C unter Vakuum) oder für weitere Versuche eingesetzt werden.

2.2.15 *In vitro*-Transkription

Als Ausgangsmaterial wurden Plasmide verwendet, die das zu transkribierende DNS-Fragment enthielten. Um ein Transkript mit einer definierten Länge herzustellen, wurden die Plasmide mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten (s. Tab. 4). Die Schnittstelle hierfür befand sich am 3'-Ende des DNS-Fragments in der „multiple cloning site" des Plasmids. Die Transkription wurde am 5'-Ende des Fragments, am T7-Promotor, gestartet.

Tab. 4: Verzeichnis der verwendeten Transkripte

Plasmid	Geschnitten mit	Länge des Transkripts (Nt)	Bezeichnung des Transkripts
pMM3	*Bgl*I	145	lbp_{wt}
pHW2	*Bgl*I	145	lbp_{mut}
pHW26	*Eco*RI	188	$gs2_{wt}$
pAB1	*Eco*RI	190	$gs2_{mut}$
pCS13	*Xba*I	2124	*gusA*-$gs2_{wt}$
pCS14	*Xba*I	2124	*gusA*-$gs2_{mut}$
pUG3a	*Eco*RI	264	$regA_{wt}$
pUG5	*Eco*RI	176	$regA_{mut}$

2.2.15.1 Transkription mit α^{32}P-rUTP

Der Reaktionsansatz (s. unten) wurde in der angegebenen Reihenfolge bei RT pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die RNS wurde durch Zugabe von 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Vol. Ethanol über Nacht bei –20°C gefällt und durch Zentrifugation (12000 x g; 30 min; 4°C) präzipitiert. Das Sediment

wurde im Vakuumkonzentrator für ca. 15 min getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 10 µl DEPC-H_2O und 10 µl RNS-Probenpuffer I (s. 2.1.16.1). Zur Abtrennung von nicht-eingebauten Nukleotiden und von Transkripten, die nicht die richtige Länge hatten, wurde eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt (s. 2.2.13.2).

Reaktionsansatz

4	µl	5 x Transkriptionspuffer (Promega, Mannheim)
2	µl	100 mM DTT
0,5	µl	Ribonuklease Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
4	µl	rNTP-Mix (rATP, rCTP, rGTP je 2,5 mM)
1	µl	rUTP (25 µM)
0,7	µl	linearisierte Plasmid-DNS (ca. 1 µg)
6,8	µl	α^{32}P-rUTP (3000 Ci/mmol)
1	µl	T7 RNS-Polymerase (Roche, Mannheim).

2.2.15.2 Transkription mit Biotin-14-CTP

Die Transkription erfolgte mit dem „T7-MEGAshortscript *in vitro* Transcription Kit“ (Ambion, Austin). Das Verhältnis von CTP : Biotin-14-CTP betrug 2 : 1.

Reaktionsansatz

	4	µl	10 x Transkriptionspuffer
je	4	µl	75 mM rUTP/rGTP/rATP
	2	µl	75 mM rCTP
	7,6	µl	Biotin-14-CTP
	~ 1	µg	linearisierte Plasmid-DNS
	4	µl	Enzym Mix

ad 40 µl mit RNase freiem H_2O.

Die Dauer der Transkription betrug 5–6 h bei 37°C. Die Aufreinigung des Transkriptes wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Zur Konzentrierung des

Transkriptes wurde die RNS mit 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 2 Vol. Ethanol bei –20°C gefällt und nach Zentrifugation (12000 x g; 30 min; 4°C), Waschen des Sedimentes mit 70 % Ethanol und Trocknen bei 50°C in 50–100 µl Nuklease-freiem H_2O resuspendiert.

2.2.15.3 Herstellung eines nicht-markierten Transkriptes

Die Transkription erfolgte mit dem „T7-MEGAshortscript *in vitro* Transcription Kit“ (Ambion, Austin).

Reaktionsansatz

	2	µl	10 x Transkriptionspuffer
je	2	µl	75 mM rUTP/rGTP/rATP/rCTP
	~ 0,5	µg	linearisierte Plasmid-DNS
	2	µl	Enzym Mix

ad 20 µl mit RNase freiem H_2O.

Die Transkriptions-Dauer betrug 5 h bei 37°C. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 115 µl RNase-freies H_2O und 15 µl „Ammonium Acetate Stop Solution“ (vom Hersteller zur Verfügung gestellt) zugegeben. Die Aufreinigung der Reaktion erfolgte durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (Verhältnis 25 : 24 : 1) und eine nachfolgende Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (Verhältnis 24 : 1) (Sambrook *et al*., 1989). Die RNS wurde über Nacht bei –20°C mit 1 Vol. Isopropanol ausgefällt. Zur Sedimentierung der RNS wurde zentrifugiert (12000 x g; 30 min; 4°C), das Sediment mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 50°C getrocknet. Die RNS wurde in ca. 30 µl RNase-freiem H_2O resuspendiert.

2.2.15.4 Herstellung eines Transkriptes mit „cap“-Struktur

Zur Synthese eines „cap“-Transkriptes wurde der „mMessage mMachine Kit™“ (Ambion, Austin) verwendet.

Reaktionsansatz

4	µl	10 x Transkriptionspuffer
20	µl	2 x Ribonukleotid Mix
2	µg	linearisierte Plasmid-DNS
4	µl	10 x Enzym Mix

ad 40 µl mit RNase-freiem H_2O.

Der Reaktionsansatz wurde bei RT pipettiert und für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 230 µl RNase-freiem H_2O und 30 µl „Ammonium Acetate Stop Solution“ (vom Hersteller zur Verfügung gestellt). Zum Abtrennen des Enzyms und nicht-eingebauter Nukleotide erfolgte eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (Verhältnis 25 : 24 : 1) und eine Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (Verhältnis 24 : 1) des Ansatzes (Sambrook *et al*., 1989). Danach wurde die RNS mit 1 Vol. Isopropanol bei –20°C gefällt. Die RNS wurde durch eine Zentrifugation (12000 x g; 30 min; 4°C) präzipitiert. Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und bei 50°C getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 40 µl RNase-freiem H_2O. Bis zur Verwendung wurde das Transkript bei –80°C aufbewahrt.

2.2.16 Radioaktive Markierung von synthetischen Oligonukleotiden

Das Enzym Polynukleotidkinase (= PNK) katalysiert den Übergang einer γ-Phosphatgruppe von ATP an das 5‘-Hydroxylende einer DNS. Mit diesem Enzym kann unter Zuhilfenahme von γ^{32}P-ATP eine DNS oder, wie in diesem Falle, ein synthetisches Oligonukleotid radioaktiv markiert werden.

Reaktionsansatz

10	pmol	synthetisches Oligonukleotid
2	µl	10 x PNK-Puffer A
4	µl	γ^{32}P-ATP (5000 Ci/mmol)
1	µl	PNK

ad 20 µl mit ddH_2O.

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 2 µl 0,25 M EDTA (pH 8,0). Zum Abtrennen des Enzyms und nicht eingebautem γ^{32}P-ATPs wurde der Ansatz mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das aufgereinigte, radioaktiv markierte Oligonukleotid wurde bis zur Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

2.2.17 „Mobility shift assay“

Zum Nachweis der Bindung eines Proteins an eine radioaktiv markierte RNS wurden „mobility shift assays“ durchgeführt (Giordano *et al.*, 1990). Hierzu wurden bei Standardansätzen (15 µl Reaktionsvolumen) 28 µg eines Proteingemisches (Rohextrakt oder Proteine nach einer AS-Fällung) mit 28 µg poly(G) als nicht-spezifischen Kompetitor für 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von ca. 200 cps radioaktiv markierter RNS wurde für weitere 20 min bei RT inkubiert. Die Protein-RNS-Komplexe wurden in einer nativen PAGE (s. 2.2.13.1) aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der Komplexe wurde entweder ein Röntgenfilm auf das trockene Gel aufgelegt oder es wurde eine „Image plate“ (Fuji Bas-MP 2025P) verwendet.

Bei Überprüfung von Fraktionen nach Dichtegradienten-Zentrifugationen (s. 2.2.18) wurde das Reaktionsvolumen erhöht: Pro Fraktion wurden 30 µl für die Bindestudie eingesetzt, die mit 28 µg poly(G) versetzt wurden.

Bei Durchführung von Kompetitions-Experimenten wurde 1 min vor Zugabe der radioaktiv markierten RNS die nicht-markierte RNS zur Kompetition zugegeben. Der weitere Versuchsablauf änderte sich nicht.

2.2.18 Dichtegradienten-Zentrifugation

Proteine können durch Dichtegradienten-Zentrifugation nach ihrer Größe unter nativen Bedingungen aufgetrennt werden. Die linearen Gradienten von 8–14 % Glycerin in Gradientenpuffer (s. 2.1.16.2) wurden mit Hilfe eines

Gradientenmischers (Werkstatt Eigenbau) und einer Peristaltikpumpe (Pumpgeschwindigkeit 1 ml/min) gegossen.
Nach Überschichten des Gradienten mit der Probe (Volumen 300 µl) wurde diese mittels Ultrazentrifugation (74100 x g; 16 h; 4°C) getrennt. Danach wurde der Gradient von unten nach oben in 1,2 ml Fraktionen aufgeteilt und für weitere Versuche verwendet.
Zur Kalibrierung der Dichtegradienten wurden Standardproteine mit bekannter Größe geladen (Gelfiltrationsstandard; s. 2.1.12). Die Proteine in den Fraktionen wurden dann über SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt (s. 2.2.13.2 und 2.2.14.1). Die Lage der einzelnen Standardproteine wurde, zur Erstellung einer Eichgeraden, in einem halblogarithmischen Koordinatensystem gegen die entsprechende Fraktionsnummer aufgetragen.

2.2.19 „UV-crosslinking“ Experiment

Mit Hilfe von „UV-crosslinking“ Experimenten (Waltenberger *et al*., 2001) kann die molekulare Masse von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen bestimmt werden. 28 µg eines Proteingemisches (Rohextrakt bzw. Proteine nach einer AS-Fällung) wurden in einem Reaktionsvolumen von 15 µl zusammen mit 28 µg poly(G) für 20 min bei RT inkubiert. Bei Verwendung von schwach konzentrierten Proteinlösungen wurde das Reaktionsvolumen auf maximal 30 µl erhöht, wobei nicht immer 28 µg Protein für den Versuch eingesetzt werden konnten. In diesen Fällen wurde die poly(G)-Menge ebenfalls verringert. Nach Zugabe von ca. 400 cps radioaktiv markierter RNS wurde für weitere 20 min bei RT inkubiert. Zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Protein und RNS wurde die Probe nun in eine Mikrotiterplatte überführt und für 30 min auf Eis einer UV-Bestrahlung (2000 µW/cm^2) ausgesetzt. Die Kontrollansätze wurden in dieser Zeit auf Eis ohne UV-Bestrahlung gestellt. Zum Abbau der ungeschützten RNS wurden die Proben mit 2 µl RNase A und 1 µl RNase T1 (s. 2.1.3) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung der kovalenten Protein-RNS-Komplexe erfolgte in einem 12,5 % denaturierenden SDS-Gel (s. 2.2.13.2). Zur Bestimmung der Molekularmassen wurden 15 µl Standard („Prestained SDS-PAGE Standard Low Range“; s. 2.1.12) geladen. Nachdem die

Farbbande des Standards das untere Ende des Gels erreicht hatte, konnte das Gel auf Filterpapier getrocknet werden (80°C unter Vakuum für ca. 1 h). Zur Sichtbarmachung der Komplexe wurde ein Röntgenfilm aufgelegt.

2.2.20 Durchmustern einer cDNS-Bank aus *C. reinhardtii*

2.2.20.1 Sichtung auf DNS-Ebene

Die Ausführung erfolgte gemäß des „ZAP-cDNA® Synthesis Kit“ (Stratagene, La Jolla). Zur primären Sichtung wurden ca. 50000 pfu der cDNS-Bank (s. 2.1.14) auf einer NZY-Agarplatte (Ø 15 cm; s. 2.1.15.2) zusammen mit 600 µl XL1-Blue MRF’ (OD_{600}= 0,5; in 10 mM $MgSO_4$) ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C für ca. 6 h wurden die Plaques auf eine Nylonmembran (Hybond-N) übertragen. Eine erste Membran wurde hierfür für 1,5 min auf die Platte gelegt, eine zweite Membran für 4 min. Anschließend erfolgte jeweils ein fünfminütiges Auflegen der Membranen auf ein mit Denaturierungspuffer (s. 2.1.16.4) getränktes Filterpapier und eine zweimal dreiminütige Inkubation auf einem mit Neutralisierungspuffer (s. 2.1.16.4) getränktem Filterpapier. Nach einem kurzen Schwenken in Tris/SSC (s. 2.1.16.4) wurde die DNS durch eine zweistündige Inkubation bei 80°C auf der Membran fixiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit degenerierten Oligonukleotiden (s. 2.2.21). Bereiche die ein Hybridisierungssignal aufwiesen, wurden aus der Agarplatte ausgestochen, in 1 ml SM-Puffer (s. 2.1.15.2) + 20 µl Chloroform überführt und für ein sekundäres Durchmustern eingesetzt. Beim sekundären Durchmustern wurden pro Platte (Ø 9 cm) 300-400 pfu ausplattiert.

2.2.20.2 Sichtung auf Proteinebene

Die Durchführung erfolgte gemäß des „*pico*Blue™ Immunoscreening Kit“ (Stratagene, La Jolla). Zur primären Durchmusterung wurden ca. 9000 pfu der verpackten cDNS-Bank (s. 2.1.14) zusammen mit 200 µl XL1-Blue MRF’ (OD_{600}= 0,5; in 10 mM $MgSO_4$) auf einer NZY-Agarplatte (Ø 9 cm) ausplattiert. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 42°C wurde eine IPTG-Stimulierung der

cDNS-Fragmente durchgeführt. Hierzu wurde eine Nitrocellulose-Membran in 10 mM IPTG angefeuchtet, auf Filterpapier getrocknet und auf die Platte aufgebracht. Es folgte eine Inkubation von 3,5 h bei 37°C. Danach wurde die Membran, welche die exprimierten Proteine trug, in TBST (3 x 15 min; s. 2.1.16.3) gewaschen. Die nachfolgende Immunodetektion wurde bereits in 2.2.11 beschrieben. Für das Antiserum AK1/2 wurde Blockierungspuffer II (in TBST), für AK3 Blockierungspuffer I (in TBS) verwendet. Der Nachweis der Antikörper-Bindung wurde mit dem Enzym Alkalische Phosphatase durchgeführt (s. 2.2.11.2). Positive Bereiche wurden aus der Platte ausgestochen, in 0,5 ml SM-Puffer (s. 2.1.15.2) + 20 µl Chloroform überführt und für eine weitere Sichtung eingesetzt.

Für die sekundäre und tertiäre Sichtung wurden 200-300 pfu pro Platte (Ø 9 cm) ausplattiert. Von diesen Platten wurden jeweils zwei IPTG-getränkte Membranen abgezogen. Bei der zweiten Membran wurde die Inkubation bei 37°C von 3,5 h auf 4 h erhöht.

2.2.20.3 *In vivo*-Exzision des pBluescript Phagemids

Die Durchführung erfolgte gemäß des „ZAP-cDNA® Synthesis Kit“ (Stratagene, La Jolla). Positive Plaques wurden aus der NZY-Platte (s. 2.1.15.2) ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer (s. 2.1.15.2) + 20 µl Chloroform überführt. Durch heftiges Schütteln und Inkubation bei 4°C wurden die Phagenpartikel in den Puffer freigesetzt.

In einem 15 ml Plastikröhrchen wurden 200 µl XL1-Blue MRF' (OD_{600}= 1; in 10 mM $MgSO_4$) zusammen mit 250 µl der freigesetzten Phagenpartikel und 1 µl ExAssist™ Helferphage (Stratagene, La Jolla) für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium wurde für 3 h bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Nach einer Erwärmung der Kultur auf 65°C für 20 min erfolgte eine Zentrifugation (4000 x g; 15 min; RT). Der Überstand, der die filamentösen Phagenpartikel mit dem pBluescript Phagemid enthielt, wurde in ein steriles Plastikröhrchen überführt. 100 µl dieses Überstandes wurden zusammen mit 200 µl SOLR™-Zellen (OD_{600}= 1; in 10 mM $MgSO_4$) für 15 min bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf LB-Platten (mit Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin)

ausgebracht und über Nacht bei 37°C kultiviert. Einzelne Kolonien wurden am nächsten Tag separat in LB-Medium (mit Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin) angezogen und die Plasmid-DNS isoliert (s. 2.2.27.3).

2.2.21 Hybridisierung einer cDNS-Bank mit degenerierten Oligonukleotiden

Die Hybridisierung der cDNS-Bank erfolgte gemäß des „ZAP-cDNA® Synthesis Kit“ (Stratagene; La Jolla). Die Membranen (s. 2.2.20.1) wurden zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 2 h in Prähybridisierungspuffer (s. 2.1.16.4) vorhybridisiert. Dies erfolgte unter kontinuierlichem Drehen bei 40°C. Die Lösung wurde gegen den Hybridisierungspuffer (s. 2.1.16.4) mit radioaktiv markiertem Oligonukleotid (s. 2.2.16) ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 40°C unter Drehen. Am nächsten Tag wurde solange mit Waschpuffer (s. 2.1.16.4) gewaschen (ca. 1 h mit mehrmaligem Pufferwechsel), bis der Hintergrund ein Minimum erreicht hatte. Dies wurde mit Hilfe eines Handmonitors überprüft. Zur Sichtbarmachung der radioaktiv markierten Plaques wurde ein Röntgenfilm für 2 bis 3 Tage exponiert.

2.2.22 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.22.1 Design von degenerierten Oligonukleotiden

Unter Berücksichtigung des genetischen Codes können Peptid-Sequenzen in DNS übersetzt werden. Hierdurch entstehen Sequenzen, bei denen an mehreren Stellen bis zu vier unterschiedliche Nukleotide möglich sind. Diese Degeneriertheit wurde bei der Produktion der synthetischen Oligonukleotide mit einbezogen. Teilweise wurde anstelle der vier möglichen Nukleotide die Base Inosin eingebaut, die mit allen vier Nukleotiden paaren kann. Auch wurde beim Design einiger Oligonukleotide die Häufigkeit des verwendeten Codons in *C. reinhardtii* in Betracht gezogen, um die Degeneriertheit des Oligonukleotides zu reduzieren (www.kazusa.or.jp/codon/). Die Berechnung der Degeneriertheit eines

Oligonukleotides ist mit folgender Formel möglich: Multiplikation der verwendeten Anzahl an Codons = Anzahl an unterschiedlichen Oligonukleotiden.

2.2.22.2 PCR mit degenerierten Oligonukleotiden

Bei Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden als Primer für die PCR kann kein Standardprotokoll angegeben werden. Zur Einführung sei jedoch Innis *et al*. (1989) erwähnt. Die PCR-Bedingungen für die unterschiedlichen Oligonukleotid-Kombinationen wurden experimentell bestimmt. Im Folgenden ist ein variables Protokoll (s. Tab. 5) für die Durchführung einer PCR mit degenerierten Oligonukleotiden dargestellt:

Tab. 5: Variables Protokoll für die Durchführung einer PCR mit degenerierten Oligonukleotiden

		Temperatur	**Zeit**
Denaturierung		95°C	5 min
Amplifikation	30 bis 40 Zyklen		
	Denaturierung	95°C	30 sec
	Anlagerung	49°C – 64°C	1 min
	Verlängerung	72°C	2 sec – 2,5 min
Verlängerung		72°C	5 min

Ein Ansatz von 40 µl enthielt 100 pmol je Primer, 100-200 µM je dNTP, 1,5-3 mM $MgCl_2$ und 1-2,5 Einheiten Taq DNS Polymerase (s. 2.1.3). Als Matrizen wurde sowohl genomische DNS als auch cDNS aus *C. reinhardtii* eingesetzt. In einigen Ansätzen wurde, zur Verringerung von Sekundärstrukturen, ein 7-deaza-dGTP/dNTP-Mix (200 µM dATP, dCTP, dTTP; 50 µM 7-deaza-dGTP; 150 µM dGTP) mit einem Zusatz von 2,5 % (v/v) DMSO eingesetzt.

2.2.23 *In vitro*-Translation

Die nicht radioaktive *in vitro*-Translation wurde mit Hilfe des „Rabbit Reticulocyte Lysate"-Systems (Promega, Mannheim) durchgeführt.

In vitro-Translationsansatz

17,5	µl	„Rabbit Reticulocyte Lysate“
0,5	µl	„Amino Acid Mixture, Minus Leucine“
0,5	µl	„Amino Acid Mixture, Minus Methionine“
0,5	µl	Ribonuklease Inhibitor
0,5	µg	„cap“-Transkript
x	µg	0,5–1 M AS-gefällte Proteine (optional)

ad 25 µl mit RNase-freiem H_2O.

Pro 25 µl-Reaktion wurden 0,5 µg „cap“-Transkript (s. 2.2.15.3) als Matrize eingesetzt. Dieses Transkript wurde vor Verwendung für 3 min bei 65°C inkubiert, um eventuell vorhandene Sekundärstrukturen aufzulösen. Zusätzlich wurden einigen Reaktionsansätzen *C. reinhardtii*-Proteine zugesetzt, die durch eine AS-Fällung fraktioniert (0,5–1 M AS; s. 2.2.4 und 2.2.5) und danach resuspendiert und dialysiert worden waren. Es wurden Proteinmengen von 50 µg, 200 µg oder 400 µg eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 90 min. Nach Ablauf der Reaktion wurde der Ansatz auf Eis gestellt und sofort für weitere Versuche verwendet (s. 2.2.24).

2.2.24 Aktivitätsmessung der ß-Glucuronidase

Die fluorimetrische Messung der ß-Glucuronidase (GUS)-Aktivität wurde gemäß Gallagher (1992) durchgeführt. Der Nachweis beruht auf der enzymatischen Hydrolyse des Substrates MUG zu 4-MU und Glucuronat durch GUS (s. Abb. 2).

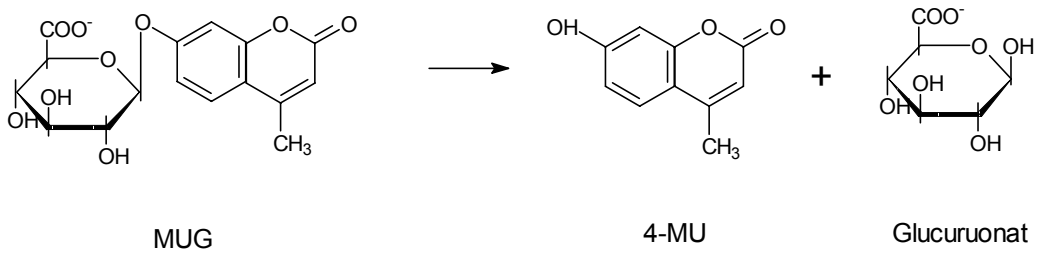


Abb. 2: Hydrolyse von MUG

4-MU besitzt in Ionenform jenseits von pH 8 starke Fluoreszenz (im Gegensatz zu MUG) und emittiert bei Anregung im Ultravioletten (mit dem hier verwendeten Fluorimeter TKO-100 bei 365 nm) Photonen der Wellenlänge 460 nm, welche quantifiziert werden können. Die Eichung des Fluorimeters wurde mit Stop-Puffer als Nullwert, 10 nM und 100 nM 4-MU in Stop-Puffer als Eichwerte vorgenommen.

Zur Messung der GUS-Aktivität wurde 1 ml MUG-Puffer (s. 2.1.16.2) auf 37°C vorgewärmt und anschließend mit 25 µl *in vitro*-Translationsansatz (s. 2.2.23) versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (in 45 min Abständen von 0 bis 315 min) wurden jeweils 100 µl entnommen, mit 900 µl Stop-Puffer (0,2 M Na_2CO_3) versetzt und im Fluorimeter gemessen.

2.2.25 Herstellung eines Rohextraktes aus *N. crassa*

Das Zellmaterial zur Herstellung eines Rohextraktes aus *N. crassa* wurde freundlicherweise von Z. Dragović (Labor Prof. T. Roenneberg, München) zur Verfügung gestellt.

Die Zellwand wurde durch Reiben aufgebrochen. Hierzu wurde ein Mörser in flüssigem Stickstoff gekühlt und mit einigen Spatelspitzen Seesand und der aufzuschließenden Probe gefüllt. Es wurde so lange gemörsert, bis ein feines Pulver entstanden war. Dieses wurde in ein halb mit Seesand gefülltes kaltes Mikrozentrifugengefäß überführt und mit Aufschlusspuffer für *N. crassa* (s. 2.1.16.2) aufgefüllt. Mit Hilfe eines Zahnstochers wurde vorsichtig umgerührt und die Probe für ca. 5 min auf Eis inkubiert. Durch starkes Schütteln (2 x 20 sec; dazwischen für 2 min auf Eis) wurden die Zellen vollständig aufgebrochen. Um den Seesand abzutrennen wurde kurz zentrifugiert (12000 x g; 30 sec; 4°C) und der Überstand in ein neues Mikrozentrifugengefäß überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation (12000 x g; 4°C; 20 min) konnte im Überstand die Proteinkonzentration (s. 2.2.6) bestimmt werden und der Rohextrakt für Versuche eingesetzt werden.

2.2.26 Herstellung eines Rohextraktes aus *V. carteri*

Das Zellmaterial zur Herstellung eines Rohextraktes aus *V. carteri* wurde freundlicherweise von P. Pickl (Labor Prof. R. Schmidt, Regensburg) zur Verfügung gestellt.

Zum Aufbrechen der Zellwand wurde die Probe in einem gekühlten Mörser mit etwas Seesand gerieben. Nach Zugabe von ca. 10 ml Aufschlusspuffer für *V. carteri* (s. 2.1.16.2) wurde so lange gemörsert, bis ein feines Pulver entstanden war. Dieses wurde in Zentrifugenbecher überführt und auf Eis langsam aufgetaut. Zur Abtrennung des Seesandes wurde zentrifugiert (4500 x g; 10 min; 4°C). Der Überstand wurde in Ultrazentrifugations-Röhrchen gefüllt und einem Ultrazentrifugationsschritt unterzogen (152000 x g; 90 min; 4°C). Der Überstand wurde als Rohextrakt bezeichnet und sofort für weitere Versuche eingesetzt.

2.2.27 Biochemische Standardmethoden

Alle in diesem Kapitel verzeichneten Methoden wurden gemäß Sambrook *et al*. (1989) mit Veränderungen durchgeführt.

2.2.27.1 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

100 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer Übernachtkultur des Bakterienstammes XL1-Blue (s. 2.1.8) angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis dichte Schlieren zu sehen waren (OD_{600}= 0,4-0,6). Die Zellen wurden auf Eis gestellt, in einen sterilen Zentrifugenbecher abgefüllt und zentrifugiert (4000 x g; 5 min; 4°C). Das Sediment wurde in 10 ml eisgekühltem 0,1 M $CaCl_2$ durch vorsichtiges Antippen des Gefäßes gelöst und anschließend für 30 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (4000 x g; 5 min; 4°C) wurde das Zellsediment in 2 ml kalter 0,1 M $CaCl_2$ / 10 % (v/v) Glycerin-Lösung vorsichtig resuspendiert. 100 µl-Portionen dieser Zellsuspension wurden in Mikrozentrifugengefäße abgefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

2.2.27.2 Transformation von *E. coli*

Eine 100 µl-Portion kompetenter *E. coli*-Zellen (s. 2.2.27.1) wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µl der jeweiligen Plasmid-Lösung oder 5 µl eines Ligationsansatzes (s. 2.2.27.9) versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 45 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz für 90 sec im Wasserbad einem 42°C-Hitzeschock ausgesetzt. Anschließend wurde 1 ml steriles LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde auf LB-Platten (mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt) eine Lösung aus 40 µl IPTG (23,8 mg/ml), 40 µl X-Gal (20 mg/ml in DMF) und 40 µl ddH_2O verteilt und getrocknet. Nach Ausstreichen der Bakteriensuspension auf den vorbehandelten LB-Platten wurden diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterienkolonien, die ein Plasmid aufgenommen hatten, waren am nächsten Tag weiß, während Kolonien, die kein Plasmid enthielten, blau angefärbt waren.

2.2.27.3 Plasmidpräparation aus *E. coli*

2,5 ml LB-Medium (mit Zusatz von 50 µg/ml Ampicillin) wurden mit einem plasmidhaltigen *E. coli*-Klon inokuliert und über Nacht bei 37°C unter Drehen inkubiert. Von der dichten Zellsuspension wurden 1,5 ml in ein Mikrozentrifugengefäß überführt und für 1 min abzentrifugiert (12000 x g; RT). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 100 µl 50/10 TE (s. 2.1.16.1) resuspendiert. Zugabe von 150 µl Lysepuffer (s. 2.1.16.1) und vorsichtiges Schwenken führten zur Lyse der Zellen. Das klare Lysat wurde daraufhin mit 200 µl 3 M Kaliumacetat (pH 4,8) versetzt und erneut vorsichtig geschwenkt, wodurch Proteine und die genomische DNS ausgefällt wurden. Nach 10 min Zentrifugation in der Tischzentrifuge konnte der klare Überstand abgenommen werden und die darin enthaltene Plasmid-DNS wurde mit 1 Vol. Isopropanol für mindestens 30 min bei –20°C gefällt. Durch Zentrifugation (12000 x g; 30 min; 4°C) wurde die DNS sedimentiert und mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde im Vakuumkonzentrator getrocknet und in 30 µl ddH_2O resuspendiert.

Sollte eine DNS-Sequenzierung des Plasmids durchgeführt werden, wurde die DNS mit Hilfe des „Wizard® Plus Midiprep DNA Purification Systems“

(Promega, Mannheim) aus 100 ml Zellsuspension isoliert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.27.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Je nach erwarteter Konzentration wurden zwischen 1 und 10 µl der Nukleinsäure-haltigen Lösung mit ddH_2O auf ein Volumen von 500 µl verdünnt. In einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) wurde daraufhin die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gegen ddH_2O als Referenz gemessen. Eine reine Nukleinsäure-Lösung ergibt ein Verhältnis OD_{260}/OD_{280} von 1,7–2,0; ein niedrigerer Wert deutet auf eine Kontamination (meist mit Protein) hin. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml bei DNS und 40 µg/ml bei RNS.

2.2.27.5 Restriktionsverdau

2.2.27.5.1 Analytischer Restriktionsverdau

In einem 20 µl-Ansatz wurden 0,1-1,0 µg DNS mit 3 Einheiten des Restriktions-enzyms in Restriktionspuffer (1 x konzentriert) für 3 h beim jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms verdaut. Die entstandenen DNS-Fragmente wurden über eine Gelelektrophorese (s. 2.2.27.6) aufgetrennt.

2.2.27.5.2 Präparativer Restriktionsverdau

In einem Endvolumen von 500 µl wurden 50-100 µg DNS mit 2 Einheiten Restriktionsenzym pro µg DNS in Restriktionspuffer (1 x konzentriert) für 6 h bis über Nacht beim jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms verdaut. Im Anschluss wurde das Enzym durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (Verhältnis 25 : 24 : 1) und mit Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 24 : 1) entfernt (Sambrook *et al*., 1989). Die Plasmid-DNS wurde mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M; pH 7,0) und 2 Vol. Ethanol bei –20°C gefällt. Durch Zentrifugation (12000 x g; 30 min; 4°C) wurde die DNS präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 5-10 µl ddH_2O resuspendiert.

2.2.27.6 Auftrennung von DNS im Agarosegel

Zur Auftrennung von DNS in Agarosegelen wurden horizontale Gelkammern verwendet. Die Gel-Konzentration wurde je nach Größe der zu analysierenden DNS zwischen 0,7 und 1,3 % (w/v) gewählt. Als Puffer diente für analytische Gele 1 x TBE und für präparative Gele, d.h. zur Elution eines DNS-Fragmentes aus dem Gel, 1 x TA (s. 2.1.16.1). Die Agarose wurde im jeweiligen Puffer aufgekocht und anschließend wieder auf ca. 50°C abgekühlt, ehe Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,1 µg/ml) zugegeben wurde. Nach dem Erstarren der Agarose auf dem Gelträger wurde das Gel in die mit 1 x Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Der Kamm wurde entfernt und die mit DNS-Probenpuffer (s. 2.1.16.1) versetzten Proben konnten in die Taschen geladen werden. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden zusätzlich 1-2 µg eines Molekular-gewichts-Standards (s. 2.1.12) in eine Spur aufgetragen. In Abhängigkeit von der gewählten Gelkammer und der Größe der zu trennenden Fragmente erfolgte die Elektrophorese bei 60-120 V. Zur Analyse wurde die DNS auf einem UV-Transilluminator bei 256 nm sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.27.7 Elution von DNS-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die DNS-Fragmente eines Restriktionsansatzes (s. 2.2.27.5) wurden über ein Agarosegel in 1 x TA (s. 2.1.16.1) elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.27.6). Das Gelstück mit der relevanten Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und auf eine „GenElute™ Agarose Spin Column“ (Sigma, Deisenhofen) gegeben, die zuvor mit 100 µl 10/1 TE-Puffer (s. 2.1.16.1) äquilibriert worden war. Durch eine Zentrifugation (12000 x g; 10 min; RT) konnte der TA-Puffer mit der gelösten DNS im Mikrozentrifugengefäß aufgefangen werden. Zur Aufkonzentrierung der DNS erfolgte im Anschluss eine Fällung mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M; pH 7,0) und 2 Vol. Ethanol bei –20°C. Die DNS wurde durch eine Zentrifugation (12000 x g; 30 min; 4°C) sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5-10 µl ddH_2O aufgenommen.

2.2.27.8 Glätten von DNS-Enden mit dem Klenow-Enzym

Zu 16,5 µl DNS (100-500 ng) wurden 2 µl Klenow-Puffer (10x), 1 µl dNTPs (jeweils 1 mM) und 0,5 µl Klenow-Enzym (s. 2.1.3) gegeben. Die Reaktion wurde 30 min bei RT inkubiert und dann durch eine Fällung mit 1/10 Vol. Natriumacetat (3 M; pH 7,0) und 2 Vol. Ethanol bei –20°C abgestoppt. Die DNS wurde durch eine Zentrifugation (12000 x g; 30 min; 4°C) sedimentiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 5-10 µl ddH_2O aufgenommen.

2.2.27.9 Ligation

Für einen Ligationsansatz wurde ein molares Verhältnis von Vektor : DNS-Fragment von 1 : 3 bis 1 : 10 gewählt. 150 ng des mit dem jeweiligen Enzym geschnittenen Vektors wurden mit der entsprechenden Menge eines DNS-Fragments, Ligase-Puffer (1 x konzentriert) und 1 Einheit T4-Ligase (s. 2.1.3) in einem Endvolumen von 10 µl über Nacht bei RT ligiert. Nach erfolgter Reaktion konnte der Ansatz direkt für die Transformation nach *E. coli* (s. 2.2.27.2) verwendet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Anreicherung von CHLAMY 1 durch eine Ammoniumsulfat-Fällung

Zur Aufreinigung des circadianen RNS-Bindeproteins CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* sollte ein Aufreinigungsschema ausgearbeitet werden. Hierzu wurden als Ausgangsmaterial *C. reinhardtii*-Kulturen (Stamm 137c) zum Zeitpunkt LD 12-13 geerntet, da zu dieser Zeit die Bindeaktivität von CHLAMY 1 hoch ist (Mittag, 1996). Die Zellen wurden zur Herstellung eines Rohextraktes verwendet (s. 2.2.3), der für die weiteren Versuche eingesetzt wurde. In einem ersten Schritt sollten die Proteine des Rohextraktes fraktioniert gefällt werden. Proteine können durch Zugabe von Salzen (z.B. Ammoniumsulfat) oder nicht-ionischen Polymeren (z.B. Polyethylenglykol) aus einer Lösung ausgefällt werden. Durch Zugabe von Ammoniumsulfat (AS) werden die hydrophoben Effekte in einer Lösung vergrößert und somit Proteinaggregationen über hydrophobe Wechselwirkungen gefördert. Je nach Stärke der Effekte fallen Proteine bei unterschiedlichen AS-Konzentrationen aus. Nach Resuspendieren und Dialysieren der ausgefällten Proteine kann deren Aktivität meist wieder bestimmt werden.

Für die erfolgreiche Aufreinigung eines Proteins ist es wichtig, dieses während der Prozedur vor Abbau durch Proteasen zu schützen. Um dies zu gewährleisten, wurden bei Herstellung des Rohextraktes aus *C. reinhardtii* und darauffolgender AS-Fällung (s. 2.2.3 und 2.2.4.1) Protease-Inhibitoren eingesetzt. Es wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail (complete^{TM}; Roche, Mannheim; s. 2.1.3) verwendet, der eine Breitbandwirkung gegen viele Proteasen besitzt. Durch Zugabe dieses Cocktails konnten *C. reinhardtii*-Proteingemische ohne Verlust der CHLAMY 1-Bindeaktivität bei –20°C gelagert und wiederverwendet werden.

In Vorversuchen wurde bereits gezeigt, dass nach einer 0-30 %igen AS-Fällung (entspricht 0-1,26 M AS) nur minimale, und bei einer Fällung über 30 % AS keine CHLAMY 1-Bindeaktivität im resuspendierten und dialysierten Proteingemisch vorhanden war (Müller und Mittag, persönliche Mitteilung). Es wurde nun untersucht, ob diese nach einer fraktionierenden AS-Fällung (0-0,5 M; 0,5-1 M; 1-

1,5 M; 1,5-2 M AS; s. 2.2.4.1) zu detektieren ist. Nach dem Fällungsschritt von 0,5-1 M AS konnte die stärkste CHLAMY 1-Bindeaktivität im resuspendierten und dialysierten Proteingemisch nachgewiesen werden (s. Abb. 3). Bei einer Erhöhung der AS-Konzentration über diesen Wert hinaus nahm die CHLAMY 1-Bindeaktivität zuerst ab (1-1,5 M AS; s. Abb. 3) und war dann nicht mehr zu detektieren (1,5-2 M AS; s. Abb. 3).

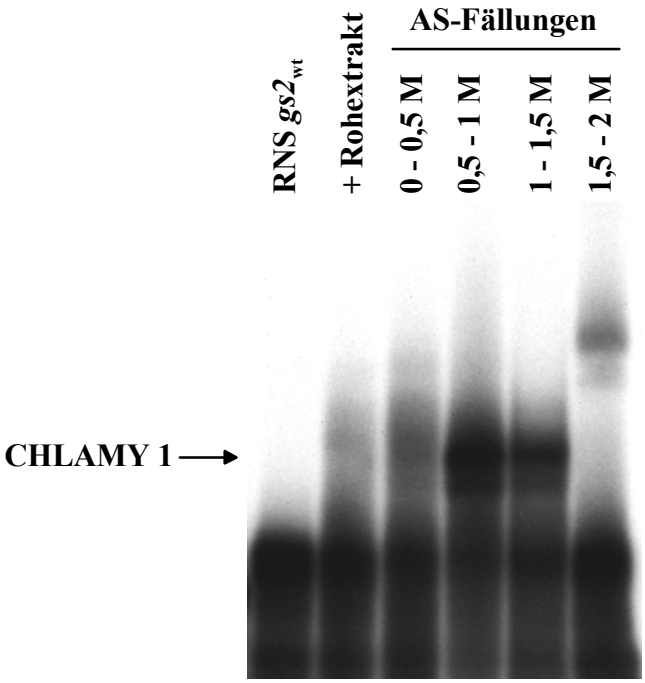


Abb. 3: Fraktionierende Fällung von CHLAMY 1 mit Ammoniumsulfat

Ca. 7,5 Liter *C. reinhardtii*-Kultur (Stamm 137c) wurden zum Zeitpunkt LD 12-13 geerntet und für die Herstellung eines Rohextraktes verwendet. Dieser wurde für eine fraktionierende AS-Fällung in vier Schritten verwendet. Von den resuspendierten, dialysierten Proteinsedimenten wurden jeweils 28 µg Gesamtprotein für einen „mobility shift assay" eingesetzt. Als Vergleich wurde ein Ansatz mit 28 µg Rohextrakt durchgeführt. Allen Ansätzen wurden 28 µg poly(G) als nicht-spezifischer Kompetitor zugesetzt. Als radioaktiv markiertes Transkript wurde die 3'-NTR der Glutamin-Synthetase 2 (*gs2*) aus *C. reinhardtii* verwendet. Die Spur RNS $gs2_{wt}$ zeigt die Mobilität des Transkriptes ohne Zusatz von Proteinen. Aufgrund der kurzen Exposition des Röntgenfilms ist die Signalstärke des CHLAMY 1-RNS-Komplexes bei Verwendung des Rohextraktes schwach.

Ein Vergleich der CHLAMY 1-Bindeaktivität zwischen Rohextrakt und resuspendiertem, entsalztem AS-Niederschlag (0,5–1 M AS) sollte den Anreicherungsfaktor des Proteins zeigen. Bei Einsetzen der gleichen Gesamtproteinmengen für einen „mobility shift assay" (s. 2.2.17) konnte festgestellt werden, dass die Signalstärke des CHLAMY 1-RNS-Komplexes nach der AS-Fällung stärker ist (s. Abb. 4). Die densidometrische Auswertung ergab eine

Verstärkung des Protein-RNS-Komplexes um 56 %. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das angereicherte Protein spezifisch an die sieben „UG"-Wiederholungen in der 3'-NTR der Glutamin-Sythetase 2 ($gs2_{wt}$) aus *C. reinhardtii* bindet, da eine Bindung an die mutierte Variante dieser Region ($gs2_{mut}$) nicht möglich war (s. Abb. 4). Bei diesem Kontrolltranskript waren fünf von sieben „UG"-Wiederholungen mutiert worden (Waltenberger *et al*., 2001).

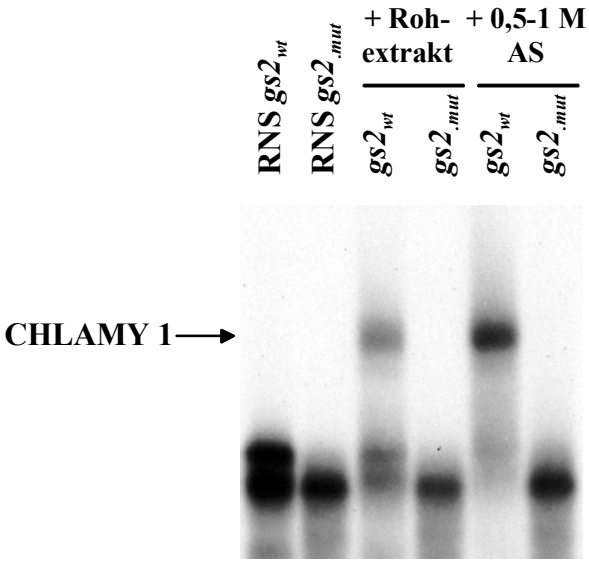


Abb. 4: Anreicherung von CHLAMY 1 durch eine 0,5–1 M Ammoniumsulfat-Fällung

Zellen des *C. reinhardtii*-Stammes 137c wurden zu LD 12-13 geerntet. Es wurde ein Rohextrakt hergestellt, der einer fraktionierenden AS-Fällung unterzogen wurde. Das Proteinsediment der 0,5–1 M Fällung wurde in Aufschlusspuffer für *C. reinhardtii* resuspendiert und entsalzt. Je 28 µg Gesamtprotein wurden zusammen mit 28 µg poly(G) als nicht-spezifischen Kompetitor in einen „mobility shift assay" eingesetzt. Als radioaktiv markierte Transkripte wurde *gs2* aus *C. reinhardtii* in der Wildtyp- (wt) und mutierten (mut) Variante eingesetzt. Die Spuren RNS $gs2_{wt}$ und RNS $gs2_{mut}$ zeigen die Mobilität der Transkripte ohne Zusatz von Proteinen

Es konnte gezeigt werden, dass sich CHLAMY 1 durch eine fraktionierende AS-Fällung anreichern ließ. Der Hauptanteil von CHLAMY 1 fiel in einem Bereich von 0,5–1 M AS aus. Dies entspricht einer 12–24 %igen AS-Fällung. Aus 1 mg *C. reinhardtii*-Rohextrakt konnten durch eine 0,5–1 M AS-Fällung durchschnittlich 1,94 % der Gesamtproteinmenge ausgefällt und resuspendiert werden. Nach einer Dialyse wurde dieses Proteingemisch für weitere Experimente eingesetzt. Hierzu gehörten sowohl Versuche zu den regulatorischen Eigenschaften von CHLAMY 1 (s. 3.2), die Aufreinigung dieses RNS-Bindeproteins (s. 3.4) als auch immunochemische Experimente (s. 3.7).

3.2 Regulatorische Eigenschaften von CHLAMY 1

RNS-Bindeproteine können als Translationsfaktoren die Translation ihrer Ziel-RNS entweder aktivieren oder reprimieren (Gray und Wickens, 1998). Ein Beispiel für Aktivierung ist das poly(A)-Bindeprotein RB47 aus *C. reinhardtii* (Yohn *et al.*, 1998). Ein 18 kDa-Protein der Maus hingegen hemmt die Translation von *protamin 2* (Kwon und Hecht, 1993).

Die regulatorischen Eigenschaften von CHLAMY 1 sollten mit Hilfe eines Reportergens untersucht werden, dessen Genprodukt leicht nachzuweisen war. Hierzu wurde das Enzym ß-Glucuronidase (GUS), das ursprünglich aus *E. coli* isoliert worden war, ausgewählt. Es katalysiert die Spaltung von ß-Glucuroniden und wird oft als Reportergen für Expressionsstudien in Pflanzengenomen eingesetzt. Das Enzym liegt als Tetramer vor und hat eine monomere Molekularmasse von 68 kDa. GUS wird durch das *gusA*-Gen (früher *uidA*) kodiert, dessen ORF eine Länge von 1809 Bp hat (Jefferson *et al.*, 1986). Die Expression von GUS kann durch eine fluorimetrische Bestimmung leicht nachgewiesen werden: Das eingesetzte künstliche Substrat MUG (=4-Methyl-umbelliferyl-ß-D-glucuronid) ergibt nach Hydrolyse durch das Enzym GUS das fluoreszierende Reaktionsprodukt MU (=4-Methyl-umbelliferon), das spektrophotometrisch gemessen werden kann.

Die Aktivität von GUS wurde in *in vitro*-Translationsexperimenten mit darauffolgendem Enzymtest überprüft. Um den Einfluss von CHLAMY 1 auf die Translation untersuchen zu können, wurde ein Konstrukt hergestellt, das die Bindestelle für CHLAMY 1 in der 3'-NTR der *gusA*-mRNS trug. Durch Hinzufügen von *C. reinhardtii*-Proteinen zu den Translationsexperimenten konnte die Expression von GUS im Vergleich zu Ansätzen ohne *C. reinhardtii*-Proteine kontrolliert werden.

3.2.1 Klonierung eines Reporterkonstruktes

Für die Durchführung der Expressionsstudien war es nötig, am 3'-Ende des Reportergens *gusA* die Bindestelle für CHLAMY 1 einzufügen. Zusätzlich wurde

am 3'-Ende des Konstruktes ein poly(A)-Schwanz angehängt, der eine effiziente Translation ermöglichen sollte (Wakiyama *et al*., 1997).

Die Klonierung des chimären Reporterkonstruktes erfolgte in drei Schritten (s. Abb. 5): Als Klonierungsvektor wurde pBluescript II SK(-) verwendet (s. 2.1.9), der durch die Restriktionsenzyme *Eco*RI + *Sal*I linearisiert worden war. Das *gusA*-Gen lag kloniert in pRAJ275 (s. 2.1.10) vor. Durch einen Restriktionsverdau mit *Eco*RI + *Sal*I + *Nde*I entstanden Fragmente mit den Größen 2440 Bp, 1866 Bp und 213 Bp. Das 1866 Bp lange *Eco*RI-*Sal*I-Fragment, das die *gusA*-Sequenz trug, wurde in den Vektor pBluescript II SK(-) ligiert. Das dadurch entstandene rekombinante Plasmid wurde als pCS11 bezeichnet und hatte eine Länge von 4800 Bp (s. Abb. 5). In einem zweiten Klonierungsschritt wurde an das 3'-Ende des *gusA*-Inserts aus pCS11 ein poly(A)-Schwanz mit einer Länge von 60 Adeninen angehängt. Dieser wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Eco*RI + *Xba*I + *Bst*NI aus pMM3 (s. 2.1.10), das die 3'-NTR des *lbp* aus *G. polyedra* inklusive einem poly(A)-Schwanz trägt, ausgeschnitten. Dieses insgesamt 81 Bp lange Fragment wurde in das mit *Sma*I + *Xba*I linearisierte Plasmid pCS11 kloniert. Dadurch entstand ein Plasmid der Länge 4865 Bp, das mit dem Namen pCS12 bezeichnet wurde (s. Abb. 5). In einem dritten Schritt wurde die Bindestelle für CHLAMY 1 in pCS12 eingefügt. Hierfür wurde die sieben „UG"-Wiederholungen tragende 3'-NTR von *gs2* ausgewählt, die in Form von pHW26 (s. 2.1.10) vorlag. Für die späteren Expressionsstudien sollte ferner eine Negativkontrolle konstruiert werden, an die CHLAMY 1 nicht binden konnte. Wie bereits in Kapitel 3.1 gezeigt, ist eine Bindung an die mutierte Variante von *gs2*, der fünf „UG"-Wiederholungen fehlen, nicht möglich. Aus diesem Grund wurde pAB1 (s. 2.1.10), das diese Variante ($gs2_{mut}$) trug, zur Klonierung ausgewählt. Durch einen Restriktionsverdau mit *Bam*HI + *PstI* war es möglich, aus beiden Plasmiden das *gs2*-Fragment herauszuschneiden. Diese Fragmente wurden mit pCS12 ligiert, dass zuvor mit *Eco*RI und *Pst*I linearisiert worden war.

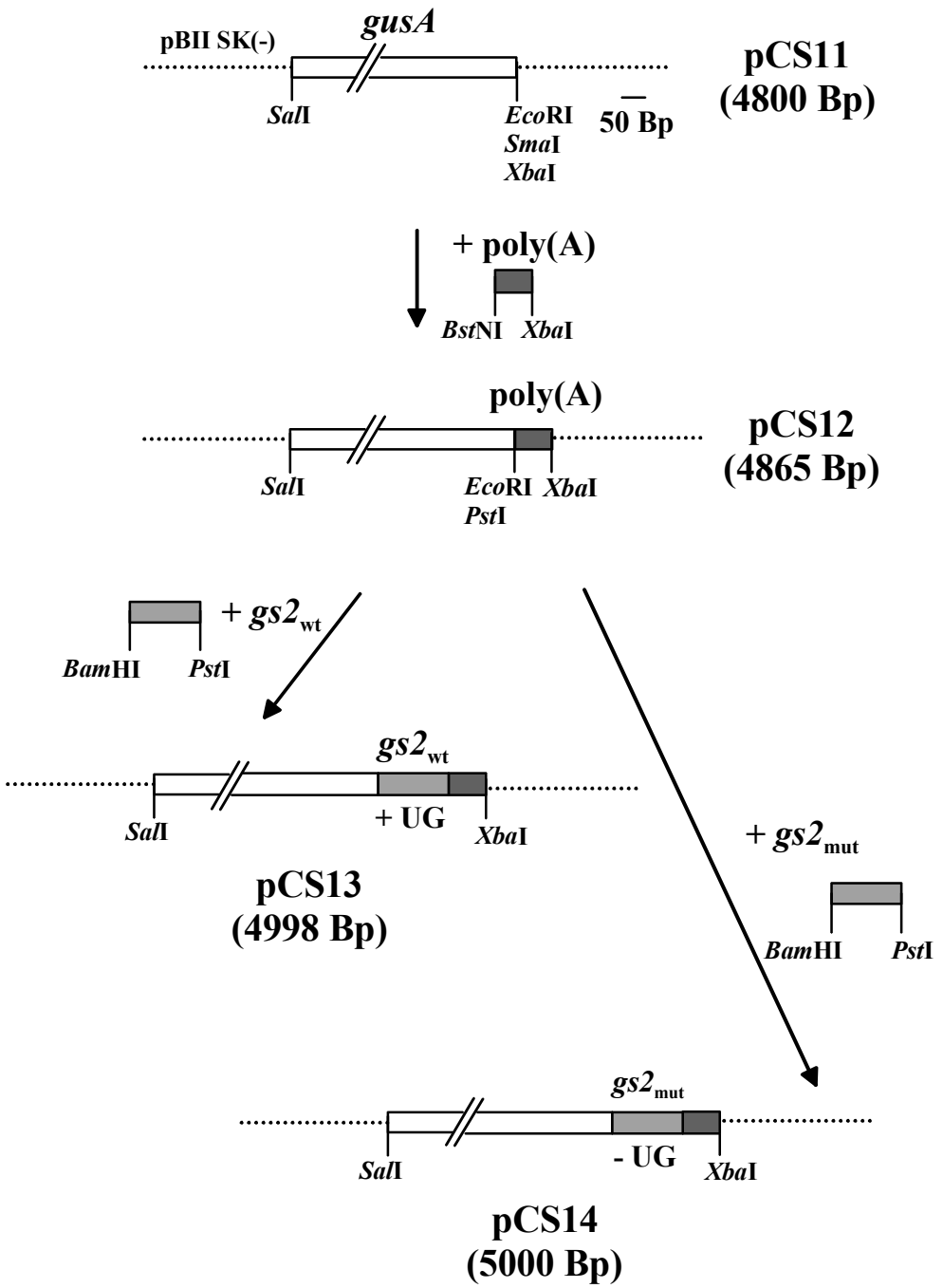


Abb. 5: Klonierung der chimären GUS-Reporterkonstrukte

Zwischen die Restriktionsschnittstellen *Sal*I und *Xba*I des Vektors pBluescript II SK(-) wurden. folgende Fragmente eingefügt: *Eco*RI-*Sal*I-Fragment aus pRAJ275 (1866 Bp; trägt *gusA*), ein *Bam*HI-*Pst*I-Fragment mit einer Länge von 143 Bp bzw. 145 Bp (trägt die 3'-NTR der *gs2* aus pHW26 bzw. pAB1) und ein 81 Bp langes Fragment aus pMM3, das einen poly(A)-Schwanz trägt (*Bst*NI-*Xba*I-Fragment). Das Plasmid pCS13 trägt die Wildtyp-Variante der 3'-NTR der *gs2* ($gs2_{wt}$) und das Plasmid pCS14 die mutierte Variante $gs2_{mut}$.

Die durch die Klonierung entstandenen Plasmide hatten eine Länge von 4998 Bp bzw. 5000 Bp. Das Plasmid, welches die *gs2*$_{wt}$ 3'-NTR trug, wurde mit dem Namen pCS13 bezeichnet, während pCS14 die *gs2*$_{mut}$-Variante der 3'-NTR beinhaltete (s. Abb. 5). Diese chimären Reporterkonstrukte wurden für die Expressionsstudien eingesetzt.

3.2.2 Expression und Aktivitätsmessung der ß-Glucuronidase

Für die Expression der Reporterkonstrukte in einem *in vitro*-Translationssystem war es nötig, die Konstrukte zuvor zu transkribieren. Um ein Transkript mit definierter Länge zu erhalten, wurden beide Plasmide (pCS13 und pCS14) mit dem Restriktionsenzym *Xba*I linearisiert, welches am 3'-Ende des zu transkribierenden Fragments schnitt (s. Abb. 5). Eine Transkription mit der T7 RNS-Polymerase lieferte somit eine RNS der Länge 2124 Nt (Transkript *gusA-gs2*$_{wt}$) bzw. 2126 Nt (Transkript *gusA-gs2*$_{mut}$). Für die Transkription wurde der „mMessage mMachine^{TM}"-Kit (Ambion, Austin) eingesetzt (s. 2.2.15.4). Mit Hilfe dieses Kits war es möglich ein „cap"-Transkript herzustellen. Darunter versteht man ein Transkript, welches am 5'-Ende eine sogenannte „cap"-Struktur trägt, die ein wichtiges Signal bei der Initiation der Translation darstellt (Kozak, 1991). Es wurde bereits gezeigt, dass Transkripte ohne diese Struktur in zellfreien Systemen nicht effizient translatiert werden (Song *et al.*, 1995). Durch die Transkription mit dem oben erwähnten Kit wurde der entstehenden RNS am 5'-Ende das „cap"-Analoge m^{7}G(5')ppp(5')G angehängt.

Für die Durchführung der Expressionsstudien wurden die beiden Transkripte in einem zellfreien System translatiert. Hierfür wurde das Kaninchen Reticulocyten-System („Rabbit Reticulocyte Lysate System"; Promega, Mannheim) ausgewählt, welches für die Translation eukaryotischer RNS verwendet werden kann (s. 2.2.23). Um den Einfluss von CHLAMY 1 auf die Translation der Reporterkonstrukte untersuchen zu können, wurden folgende *in vitro*-Translationen durchgeführt: einerseits Ansätze mit den beiden Transkripten (*gusA-gs2*$_{wt}$ bzw. *gusA-gs2*$_{mut}$) allein und andererseits jedes Transkript zusammen mit einem *C. reinhardtii*-Proteingemisch nach einer 0,5-1 M AS-Fällung (s. 3.1). Der gesamte Translationsansatz wurde nach Ablauf der Reaktion für den

Nachweis der GUS-Aktivität (s. 2.2.24) eingesetzt. In definierten Zeitabständen (jeweils 45 min) über einen Zeitraum von insgesamt 315 min wurde den Ansätzen jeweils ein Teil entnommen und die Menge des entstandenen Reaktionsproduktes anhand der Fluoreszenz-Daten bestimmt (s. 2.2.24).

Die Expressionsstudien ohne Zusatz von *C. reinhardtii*-Proteinen sollten zeigen, ob eine Translation der Reporterkonstrukte möglich war und ob die Translationsrate der beiden Transkripte gleich war. Ein Vergleich von vier unabhängigen Experimenten ergab, dass das Transkript *gusA-gs2*$_{wt}$ besser translatiert wurde als *gusA-gs2*$_{mut}$. Die Stärke der Translation, gemessen in GUS-Aktivität, war abhängig von der Länge der Inkubation des GUS-Nachweises. Die GUS-Aktivität von *gusA-gs2*$_{wt}$ war zwischen 1,2 % und 9 % höher als die von *gusA-gs2*$_{mut}$.

Durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen (50, 200 bzw. 400 µg) an resuspendierten, dialysierten *C. reinhardtii*-Proteinen nach einer AS-Fällung (s. 2.2.4.1) zu den *in vitro*-Translationen sollte der Einfluss des darin enthaltenen RNS-Bindeproteins CHLAMY 1 auf die Translation der Reporterkonstrukte untersucht werden. Für die Auswertungen wurden jeweils vier Experimente miteinander verglichen.

Die GUS-Aktivität nach Translation des Transkriptes *gusA-gs2*$_{mut}$ zusammen mit *C. reinhardtii*-Proteinen nahm, im Gegensatz zu Translationen mit dem Transkript allein, zu. Diese Zunahme war abhängig von der Dauer des GUS-Nachweises und lag zwischen 4,69 % und 13,49 % (s. Abb. 6; Säule 1). Das Transkript *gusA-gs2*$_{mut}$ trug die mutierte Version der *gs2*, an die CHLAMY 1 nicht binden kann. Somit konnte durch diese Experimente der Einfluss von Proteinen aus *C. reinhardtii* auf die Translation einer RNS überprüft werden, die von einer CHLAMY 1-Bindung unabhängig war. Es zeigte sich, dass *C. reinhardtii*-Proteine die Translationsrate in dem hier verwendeten zellfreien System erhöhen konnten. Bei Zugabe von *C. reinhardtii*-Proteinen zu Translationen mit *gusA-gs2*$_{wt}$ ergab sich ein anderes Bild (s. Abb. 6; Säule 2): Bei einer Inkubation des GUS-Nachweises bis zu 180 min nahm die GUS-Aktivität durch Zugabe eines in CHLAMY 1-angereichertem Proteingemisches ab (0,16 bis 12,72 %), während ab einer Inkubationsdauer von 270 min die Aktivität anstieg (2,81 bis 4,82 %).

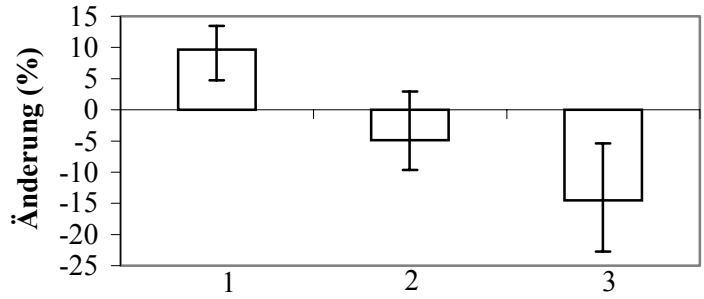


Abb. 6: Regulatorische Eigenschaften von CHLAMY 1

Nach Durchführung von *in vitro*-Translationen mit zwei chimären Reporterkonstrukten wurde die GUS-Aktivität als Maß für die Translationsrate bestimmt. Pro Säule wurden vier Experimente mit je sieben Messpunkten miteinander verglichen. Die positiven %-Angaben stehen für eine Aktivierung der Translation, die negativen für eine Reprimierung. Die vertikalen Balken stellen jeweils den maximalen und minimalen Wert dar. Säule **1** zeigt die Aktivierung der Translation durch Zugabe von *C. reinhardtii*-Proteinen im Vergleich zur Translation des Transkriptes *gusA-gs2*$_{mut}$, an das CHLAMY 1 nicht binden kann, allein. Säule **2** zeigt eine Reprimierung der Translation von *gusA-gs2*$_{wt}$ bei Zusatz von *C. reinhardtii*-Proteinen. Für Säule **3** wurden die Daten der Säulen 1 und 2 zusammengefasst.

Für eine endgültige Aussage zu den regulatorischen Eigenschaften von CHLAMY 1 war es nötig, die oben dargestellten Ergebnisse miteinander zu kombinieren. Es wurde der Tatsache Rechnung getragen, dass *C. reinhardtii*-Proteine die Translationsrate beim Kontroll-Transkript (*gusA-gs2*$_{mut}$) erhöhen konnten. Durch Verrechnung der Mittelwerte eines jeden Zeitpunktes aus den Säulen 1 und 2 der Abb. 6 ergab sich eine Reprimierung der Translation von *gusA-gs2*$_{wt}$ durch CHLAMY 1 zwischen 6,37 % und 23,69 % (s. Abb. 6; Säule 3). Durch die während dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien konnte somit gezeigt werden, dass angereichertes CHLAMY 1 die Expression eines chimären Reporterkonstruktes reprimieren kann.

3.3 Bestimmung der Molekularmasse von CHLAMY 1

Die Molekularmasse eines Proteins kann unter nativen und denaturierenden Bedingungen bestimmt werden. Durch einen Vergleich der Ergebnisse können Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob es sich beim untersuchten Protein um ein Monomer oder ein Multimer handelt.

In Vorversuchen zur Bestimmung der Molekularmasse von CHLAMY 1 unter nativen Bedingungen wurden bereits eine Gelfiltration und eine Dichtegradienten-

Zentrifugation durchgeführt. Bei der Gelfiltration ergab sich eine unerwartet hohe Molekularmasse von ca. 560 kDa für CHLAMY 1 (Müller und Mittag, unveröffentlichte Daten). Nach Durchführung von Dichtegradienten-Zentrifugationen (Schmid und Mittag, persönliche Mitteilung) wurde hingegen eine Größe von ca. 170 kDa ermittelt. In beiden Fällen wurde die Bindeaktivität von CHLAMY 1 nach den durchgeführten Auftrennungen in „mobility shift assays“ untersucht. Diese wurden mit dem *lbp*-Transkript aus *G. polyedra* (Mittag *et al*., 1994) durchgeführt, das sieben „UG“-Wiederholungen trägt.

In Versuchen zur Bestimmung der Molekularmasse von CHLAMY 1 sollte nun die Molekularmasse unter denaturierenden Bedingungen bestimmt werden. Zusätzlich sollte die native Molekularmasse mittels Dichtegradienten-Zentrifugation nochmals überprüft werden. In den Experimenten wurde die Bindeaktivität von CHLAMY 1 nach den durchgeführten Auftrennungen mit dem *gs2*-Transkript aus *C. reinhardtii* überprüft, um eventuelle Veränderungen durch ein Transkript aus einem anderen Organismus ausschließen zu können.

3.3.1 Molekularmasse unter nativen Bedingungen

3.3.1.1 Erstellung einer Eichgerade zur Molekularmassenbestimmung durch einen Dichtegradienten

Bei einer Dichtegradienten-Zentrifugation werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten getrennt. Als Medien zur Gradientenbildung eignen sich inerte Materialien wie z.B. Percoll, Glycerin oder Saccharose.

Um eine Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine zu ermöglichen, wurden 8–14 %ige Glycerin-Gradienten (s. 2.2.18) mit Proteinen bekannter Größe beladen. Die einzelnen Standardproteine konnten jeweils in mehreren Fraktionen detektiert werden. Durch densidometrische Auswertung der Coomassie-gefärbten Proteine nach einer SDS-PAGE (s. 2.2.13.3 und 2.2.14.1) konnten die Maxima in der Proteinverteilung bestimmt werden (s. Abb. 7). Damit war die Voraussetzung zur Bestimmung der Molekularmasse zwischen 670 und 17 kDa geschaffen.

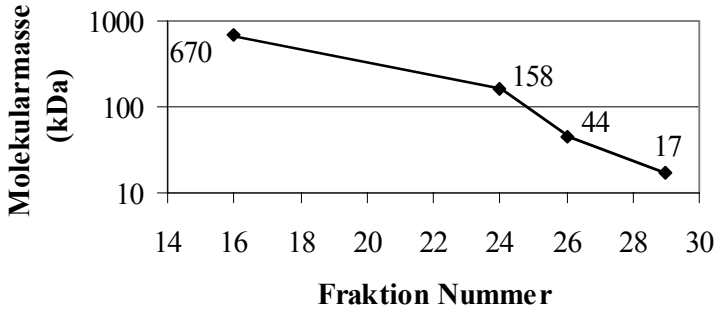


Abb. 7: Verteilung der Standardproteine in einem linearen Glycerin-Gradienten

Die Bestimmung der Molekularmassen erfolgte durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation (8–14 % Glycerin; Zentrifugation bei 74100 x g, 16 h, 4°C) von Proteinen mit bekannter Größe. Es wurden 6 mg Gelfiltrationsstandard aufgetragen. Nach Fraktionierung des Gradienten von unten nach oben wurden je 30 µl der Fraktionen 16–29 über eine SDS-PAGE (12,5 %iges Gel) aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Nach Trocknen und digitalisieren der Gele wurden die Signalstärken mit Hilfe der Software „Tina 2.09g“ ausgewertet und in ein Koordinatensystem eingetragen. Die Größen der einzelnen Standardproteine wurden in der Abbildung verzeichnet. Die Skalierung der y-Achse (Molekularmasse) ist logarithmisch; die x-Achse bezeichnet die Fraktionssnummern.

3.3.1.2 Bestimmung der Molekularmasse von CHLAMY 1 mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Größenbestimmung von CHLAMY 1 wurden 8–14 %ige Glycerin-Gradienten mit 3 mg *C. reinhardtii*-Rohextrakt (s. 2.2.3) beladen. Hierfür wurden Zellen des Stammes 137c verwendet, die zum Zeitpunkt LD 12-13 geerntet worden waren. Nach Ultrazentrifugation und Fraktionierung des Gradienten wurden die Fraktionen in „mobility shift assays“ (s. 2.2.17) auf CHLAMY 1-Bindeaktivität hin überprüft. Diese konnte in den Fraktionen 23 bis 27 detektiert werden (s. Abb. 8). Zur Bestimmung der Signalstärken der Protein-RNS-Komplexe wurde das Autoradiogramm digitalisiert und mit Hilfe der Software „Tina 2.09g“ ausgewertet. Durch Vergleich mit der erstellten Eichgerade (s. Abb. 7) für einen 8–14 %igen Glycerin-Gradienten konnten den einzelnen Fraktionen Molekularmassen zugeordnet werden. In Fraktion 24, in der die maximale Bindeaktivität detektiert wurde (s. Abb. 8), befand sich im Standardgradienten das 158 kDa-Protein. Somit liegt die native Molekularmasse von CHLAMY 1, bestimmt durch Dichtegradienten-Zentrifugation, bei ca. 160 kDa.

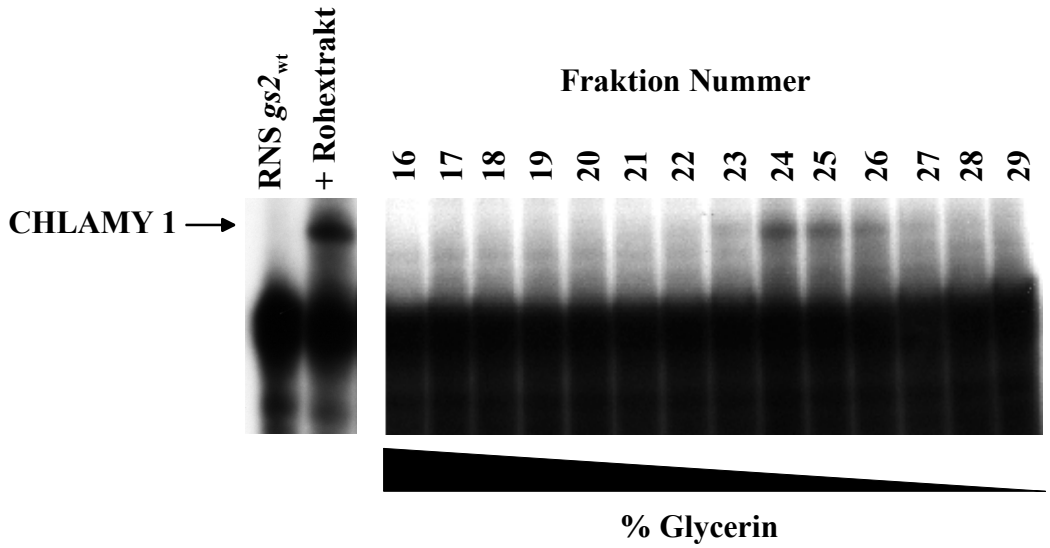


Abb. 8: Bestimmung der nativen Molekularmasse von CHLAMY 1 mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Ein 8–14 %iger Glycerin-Gradient wurde mit 3 mg *C. reinhardtii*-Rohextrakt (Stamm 137c; Ernte zu LD 12-13) beladen. Nach Zentrifugation (74100 x g; 16 h; 4°C) wurde der Gradient von unten nach oben in 1,2 ml Fraktionen aufgeteilt. Je 30 µl einer Fraktion wurden in einem „mobility shift assay" auf CHLAMY 1-Bindeaktivität hin untersucht. Zusätzlich wurden 28 µg Rohextrakt in einem Ansatz überprüft. Die Spur RNS $gs2_{wt}$ zeigt die Mobilität des eingesetzten radioaktiv markierten Transkriptes allein.

3.3.2 Molekularmasse unter denaturierenden Bedingungen

Zur Bestimmung der Molekularmasse von CHLAMY 1 unter denaturierenden Bedingungen wurden „UV-crosslinking" Experimente (s. 2.2.19) durchgeführt. Bei dieser Art von Experimenten wird ein Protein oder ein Proteinkomplex durch UV-Bestrahlung kovalent an eine RNS gebunden. Die an der Protein-RNS-Bindung beteiligten Nukleotide werden durch das sie umgebende Protein weitgehend vor RNase-Abbau geschützt. Zur Bestimmung der Molekularmasse werden die Protein-RNS-Komplexe nach einem RNase-Verdau mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt. Dadurch kann die Größe des Proteins inklusive der geschützten RNS-Nukleotide bestimmt werden. Um die Effizienz der RNase-Behandlung überprüfen zu können, wurden zusätzlich Ansätze ohne UV-Bestrahlung durchgeführt.

Durch Inkubation von *C. reinhardtii*-Rohextrakten und resuspendierten, dialysierten Proteinen nach einer 0,5–1 M AS-Fällung (s. 2.2.3 und 2.2.4.1) mit verschiedenen radioaktiv markierten Transkripten sollte die Molekularmasse von CHLAMY 1 unter denaturierenden Bedingungen bestimmt werden. Es wurden

zwei Transkripte verwendet, an die CHLAMY 1 binden kann (lbp_{wt} und $gs2_{wt}$) und als Kontrolle zwei Transkripte, an die CHLAMY 1 nicht binden kann (lbp_{mut} und $gs2_{mut}$).

Bei Durchführung der Experimente mit einem *C. reinhardtii*-Rohextrakt konnte bei den Kontrollansätzen (ohne UV-Bestrahlung) kein Protein-RNS-Komplex detektiert werden, was auf vollständigen RNS-Abbau schließen ließ. Bei Verwendung der Wildtyp-Transkripte (lbp_{wt} und $gs2_{wt}$) konnte ein Protein-RNS-Komplex erkannt werden (s. Abb. 9A). Durch halblogarithmische Auswertung wurde die Molekularmasse dieses Komplexes auf ca. 45 kDa festgelegt. Bei Verwendung der mutierten Transkripte (lbp_{mut} und $gs2_{mut}$) traten keine Protein-RNS-Komplexe auf (s. Abb. 9A). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten aus „mobility shift assays“, bei welchen gezeigt wurde, dass CHLAMY 1 nicht an diese mutieren Transkripte binden kann (s. Abb. 4; Mittag und Waltenberger, 1997).

Bei Einsetzen eines resuspendierten, dialysierten Proteingemisches nach einer 0,5–1 M AS-Fällung konnte ein prominenter Protein-RNS-Komplex von 45 kDa Größe bei Verwendung des $gs2_{wt}$-Transkriptes detektiert werden (s. Abb. 9B). Die Signalstärke dieses Komplexes war, bei Vergleich mehrerer unabhängiger Experimente, um 9–35 % stärker als der gleichgroße Komplex bei Einsatz von Rohextrakt als Probe. Zusätzlich zu diesem Protein-RNS-Komplex traten weitere Komplexe auf (s. Abb. 9B). Nach halblogarithmischer Auswertung konnten ihnen folgende Größen zugeordnet werden: 62; 50; 37 und 30,5 kDa. Alle fünf identifizierten Protein-RNS-Komplexe sind CHLAMY 1 zuzuordnen, da sie nicht bei Benutzung des mutierten Transkriptes ($gs2_{mut}$) auftraten (s. Abb. 9B).

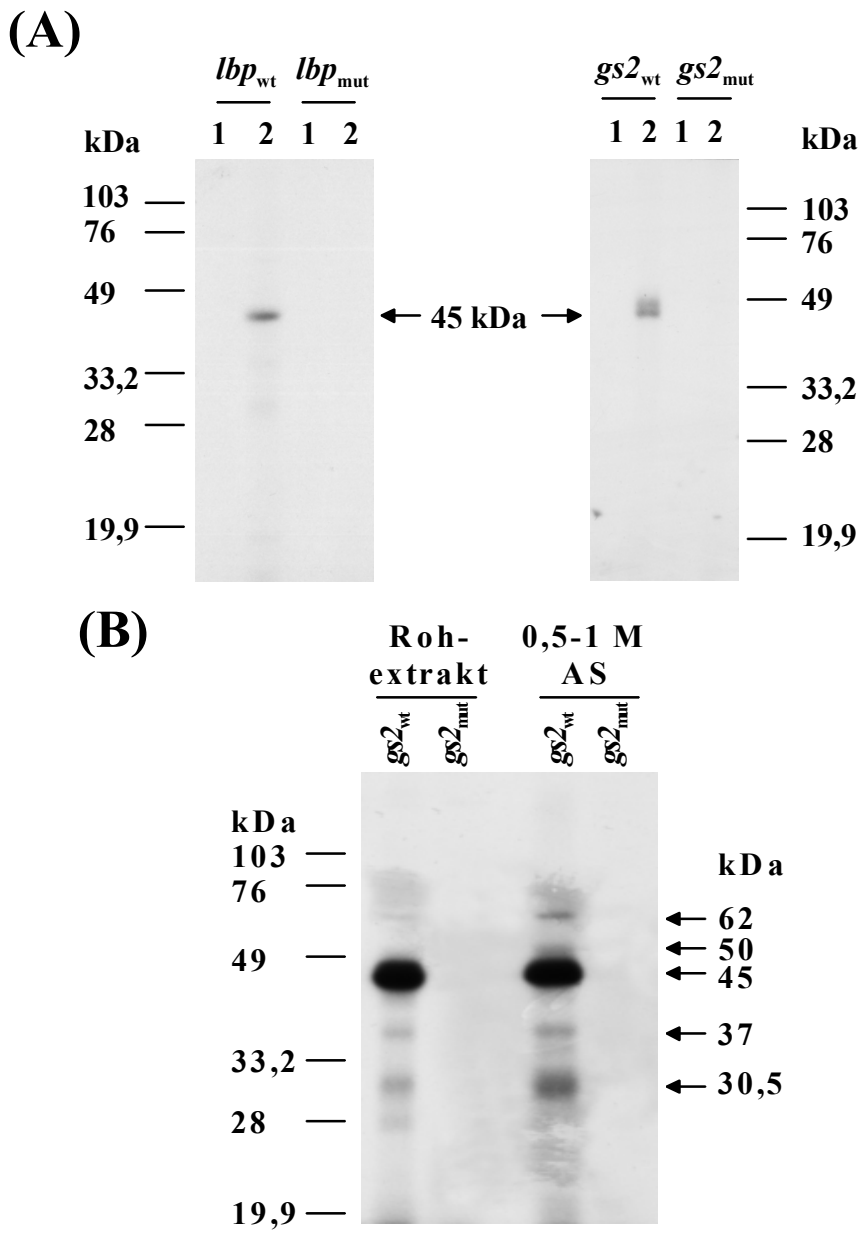


Abb. 9: Molekularmasse von CHLAMY 1 unter denaturierenden Bedingungen

C. reinhardtii-Zellen (Stamm 137c) wurden zu LD 12-13 geerntet und zur Herstellung eines Rohextraktes mit einer darauffolgenden 0,5–1 M AS-Fällung verwendet. Je 28 µg Gesamtprotein wurden mit 28 µg poly(G) als nicht-spezifischen Kompetitor inkubiert, mit radioaktiv markiertem Transkript versetzt und, mit Ausnahme der Kontrollansätze, für 30 min einer UV-Bestrahlung ausgesetzt. Nach RNase-Behandlung der Ansätze wurden diese denaturiert und über eine SDS-PAGE (Gel 12,5 %) aufgetrennt. Zur Bestimmung der Molekularmassen wurde ein bereits angefärbter Proteinstandard geladen, dessen Proteingrößen auf der linken bzw. rechten Seite der einzelnen Teilabbildungen angegeben sind. Die Größenbestimmung der radioaktiv markierten Banden erfolgte durch eine halblogarithmische Auswertung. Als radioaktiv markierte Transkripte wurde die 3'-NTR des *lbp* aus *G. polyedra* und die 3'-NTR der *gs2* aus *C. reinhardtii* verwendet. Die Transkripte wurden in ihrer Wildtyp- (wt) und mutierten (mut) Variante eingesetzt. **(A)** „UV-crosslinking" Experimente wurden mit Rohextrakt als Probe durchgeführt. Die Ansätze der Spuren „2" wurden einer UV-Bestrahlung ausgesetzt, während die Spuren „1" die Kontrollansätze ohne UV-Bestrahlung darstellen. **(B)** Sowohl Rohextrakt als auch resuspendierte, dialysierte Proteine nach einer 0,5–1 M AS-Fällung wurden als Proben eingesetzt. Es sind nur die Ansätze dargestellt, die einer UV-Bestrahlung ausgesetzt wurden.

Durch den RNase-Verdau bei Durchführung eines „UV-crosslinking“ Experiments (s. 2.2.19) wird der durch das gebundene Protein geschützte Anteil der RNS nicht abgebaut. Die nach SDS-PAGE erhaltenen Signale repräsentieren somit die Größe des gebundenen Proteins inklusive des geschützten RNS-Anteils. Dieser Anteil muss von der halblogarithmisch bestimmten Größe des Komplexes abgezogen werden, um auf die Molekularmasse des Proteins rückschließen zu können.

Zusammenfassend sollen die Ergebnisse der Molekularmassenbestimmung von CHLAMY 1 unter nativen und denaturierenden Bedingungen miteinander verglichen werden (s. Tab. 6): Die Molekularmasse unter nativen Bedingungen konnte auf ca. 160 kDa festgelegt werden, wohingegen unter denaturierenden Bedingungen mehrere Proteine detektiert wurden. Die spricht dafür, dass es sich bei CHLAMY 1 um ein Multimer handelt, das aus mehreren verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt ist.

Tab. 6: Vergleich der Molekularmassen von CHLAMY 1 unter nativen und denaturierenden Bedingungen

Experiment	Molekularmasse (kDa)	Molekularmasse inkl. RNS-Anteil (kDa)
Native Bedingungen Dichtegradient	ca. 160	
Denaturierende Bedingungen: „UV-crosslink“		62; 50; 45; 37 und 30,5

3.4 Aufreinigung von CHLAMY 1

Für die Isolierung des RNS-Bindeproteins CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* wurde eine Reinigungsstrategie, bestehend aus drei Schritten, entwickelt: Hierfür wurden Kulturen des *C. reinhardtii*-Stammes 137c zu LD 12-13, in einer Zeit von hoher CHLAMY 1-Bindeaktivität (Mittag, 1996), geerntet. In einem ersten Schritt wurde das Protein durch Herstellung eines Rohextraktes in Lösung gebracht und von unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt (s. 3.1 und 2.2.3). In einem zweiten

Schritt wurde CHLAMY 1 durch eine fraktionierende AS-Fällung (s. 2.2.4.1) von 0,5–1 M AS angereichert (s. 3.1). Die Bindeaktivität von CHLAMY 1 konnte nach beiden Schritten in „mobility shift assays“ (s. 2.2.17) überprüft werden (s. Abb. 4).

Zur weiteren Aufreinigung wurden verschiedene Chromatographie-Methoden getestet: Ionenaustausch-Chromatographie, Hydrophobe Interaktionschromatographie und Affinitätschromatographie. Hierbei wurden verschiedene Kriterien zur Trennung von Proteingemischen ausgenützt. CHLAMY 1 konnte an alle für die Versuche eingesetzten Matrizen binden, jedoch war es nicht möglich das Protein unter Beibehaltung seiner Bindeaktivität und unter Erreichen einer weiteren Anreicherung von den Liganden zu lösen (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde eine spezifische Chromatographie-Methode entwickelt.

3.4.1 Spezifische RNS-Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung von CHLAMY 1 sollte die spezifische Bindung des Proteins an eine (biotinylierte) RNS ausgenützt werden, die das Bindemotiv mit den „UG“-Wiederholungen trug. Als Matrize für die Chromatographie wurden paramagnetische Streptavidinkugeln gewählt. Ein Grund hierfür war die Affinität von Biotin zu Streptavidin, die eine der stärksten und der stabilsten bekannten Interaktionen von Molekülen ist. Die erfolgreiche Aufreinigung eines RNS-Bindeproteins mit Streptavidinkugeln und einem biotinyliertem Transkript wurde u.a. von Mehta und Driscoll (1998) gezeigt. Ausgehend von deren Methode sollte eine spezifische RNS-Affinitätschromatographie für die Aufreinigung von CHLAMY 1 etabliert werden (Schema s. Abb. 13). Im Folgenden soll nun die Ausarbeitung der Bedingungen für die spezifische RNS-Affinitäts-chromatographie dargestellt werden.

3.4.1.1 Bindung von CHLAMY 1 an ein biotinyliertes Transkript

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass CHLAMY 1 nicht an ein biotinyliertes Transkript binden kann, welches mit Biotin-16-UTP hergestellt worden war (Mittag, persönliche Mitteilung). Dies ist wahrscheinlich auf die Tatsache

zurückzuführen, dass die Bindestelle für CHLAMY 1 mehrere Uracile beinhaltet und deswegen ein daran gekoppeltes Biotin die Bindung des Proteins verhindert. Es wurde nun überprüft, ob der Einbau von Biotin-14-CTP in ein Transkript eine Bindung von CHLAMY 1 ermöglichte. Hierfür wurde Biotin-markiertes *gs2*-Transkript (s. 2.2.15.2) in einem 200 fachen molaren Überschuss für Verdrängungs-Experimente (s. 2.2.17) eingesetzt (s. Abb. 10).

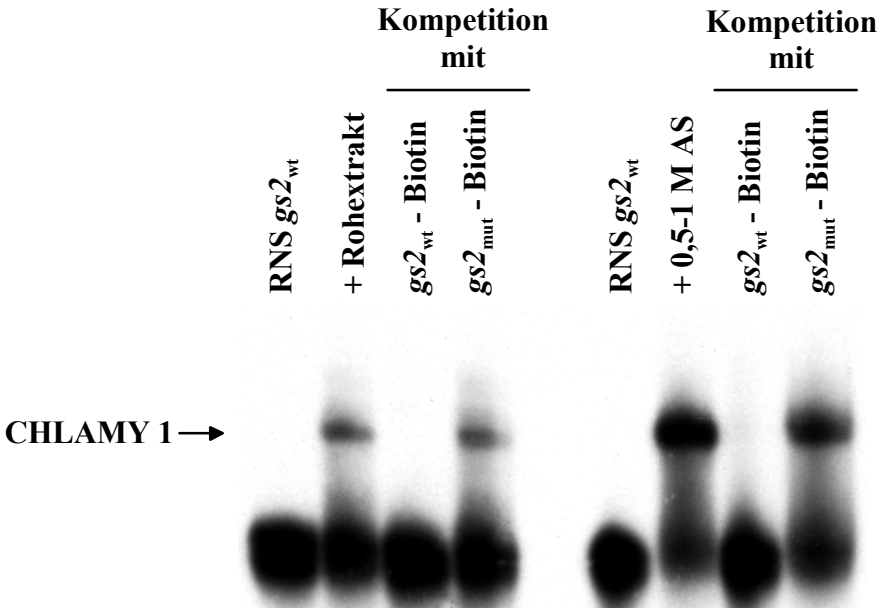


Abb. 10: Bindung von CHLAMY 1 an ein biotinyliertes Transkript

C. reinhardtii-Zellen des Stammes 137c wurden zu LD 12-13 geerntet und zur Herstellung eines Rohextraktes mit darauffolgender AS-Fällung verwendet. Für den „mobilty shift assay" wurden je 28 µg Gesamtprotein mit 28 µg poly(G) inkubiert. Eine Minute vor Zugabe des radioaktiv markierten Transkriptes ($gs2_{wt}$) wurde den Ansätzen teilweise biotinyliertes Transkript ($gs2_{wt}$-Biotin bzw. $gs2_{mut}$-Biotin) zugesetzt. Diese Transkripte wurden in einem 200 fachen molaren Überschuss im Vergleich zum radioaktiv markierten Transkript eingesetzt. Die Spuren RNS $gs2_{wt}$ zeigen die Mobilität des radioaktiven Transkriptes ohne Zusatz von Proteinen.

Die Kompetitions-Experimente wurden sowohl mit Rohextrakt als auch mit Proteinen nach einer 0,5-1 M AS-Fällung durchgeführt. Für die Kompetitionen wurde biotinyliertes *gs2*-Transkript in seiner Wildtyp (wt) und mutierten (mut) Variante eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kompetition nur beim Einsatz des $gs2_{wt}$-Biotintranskriptes möglich war (s. Abb. 10). Bei Verwendung des Kontrolltranskriptes ($gs2_{mut}$-Biotintranskript) war eine solche Verdrängung nicht möglich. Somit konnte gezeigt werden, dass CHLAMY 1 an ein „UG"-haltiges biotinyliertes Transkript binden konnte, welches unter Verwendung von

Biotin-14-CTP hergestellt worden war. Damit war eine Voraussetzung für die Etablierung einer spezifischen RNS-Affinitätschromatographie gegeben.

3.4.1.2 CHLAMY 1 kann an ein immobilisiertes Biotin-Transkript binden

Für die erfolgreiche Durchführung der spezifischen RNS-Affinitäts-chromatographie war es nötig, nachzuweisen, dass CHLAMY 1 an ein biotinyliertes Transkript binden kann, welches bereits an Streptavidinkugeln gebunden worden war. Hierzu wurden 20 µg des aufgereinigten, biotinylierten Transkripts ($gs2_{wt}$ bzw. $gs2_{mut}$ als Negativkontrolle) an 1 ml Streptavidinkugeln gebunden. Diese so beladenen Kugeln wurden äquilibriert (s. 2.2.8) und mit einer Mischung aus resuspendierten, dialysierten Proteinen nach einer AS-Fällung (750 µg; s. 2.2.3; 2.2.4.1 und 2.2.5) und poly(G) (750 µg) als nicht-spezifischem Kompetitor gemischt. Nach Ablauf der zweistündigen Inkubation bei 4°C wurde der Überstand (s. 2.2.8), der die nicht-gebundenen Proteine enthielt, abgenommen und auf CHLAMY 1-Bindeaktivität in „mobility shift assays“ getestet (s. 2.2.17 und Abb. 11). Zum Vergleich wurde die Bindeaktivität der eingesetzten Proteine überprüft.

Bei Verwendung des biotinylierten $gs2_{wt}$-Transkriptes für die Bindestudie konnte im Protein-Überstand nur eine geringe Menge des CHLAMY 1–RNS-Komplexes detektiert werden (s. Abb. 11). Dieser Komplex konnte nicht beim Einsatz des Kontrolltranskriptes ($gs2_{mut}$) identifiziert werden. Dies zeigt, dass ein Teil der eingesetzten CHLAMY 1-Menge an das biotinylierte $gs2_{wt}$-Transkript binden konnte. Die Bindestudie unter Verwendung des $gs2_{mut}$-Biotintranskriptes zeigte wie erwartet, dass CHLAMY 1 an dieses Transkript nicht binden konnte (s. Abb. 11).

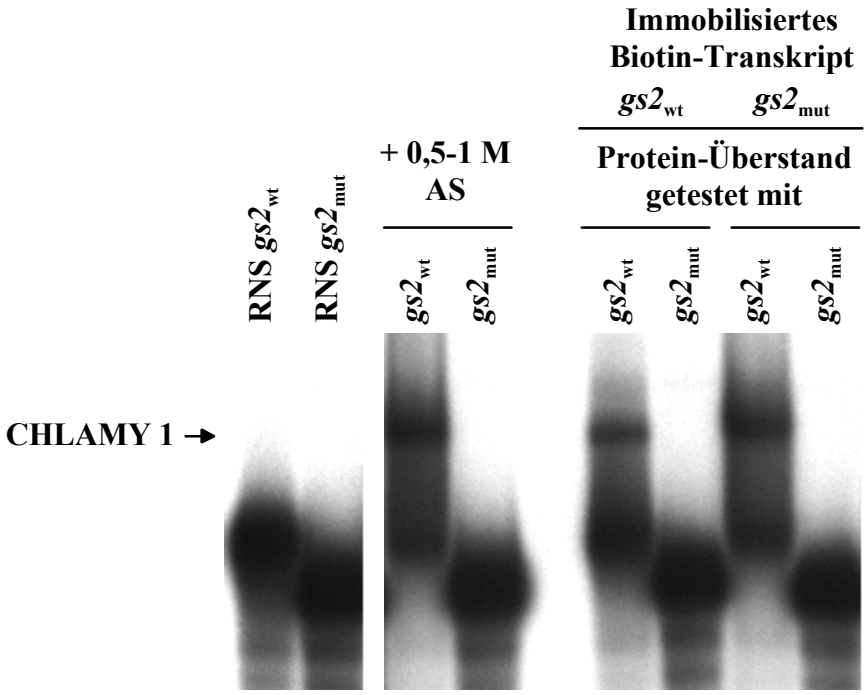


Abb. 11: Bindung von CHLAMY 1 an ein immobilisiertes Biotin-Transkript

Die aufgereinigten biotinylierten Transkripte ($gs2_{wt}$ bzw. $gs2_{mut}$; je 20 µg) wurden an je 1 ml Streptavidinkugeln gebunden. Nach Äquilibrierung der ummantelten Kugeln wurden 750 µg dialysiertes Proteingemisch nach einer 0,5–1 M AS-Fällung und 750 µg poly(G) als nicht-spezifischer Kompetitor zugesetzt. Nach der zweistündigen Inkubation bei 4°C wurde der Überstand, der die nicht-gebundenen Proteine enthielt, abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. In einem „mobility shift assay" wurde die CHLAMY 1-Bindeaktivität der Protein-Überstände im Vergleich zu den eingesetzten Proteinen bestimmt. Die Spuren RNS $gs2_{wt}$ und RNS $gs2_{mut}$ zeigen die Mobilität der radioaktiv markierten Transkripte allein.

Um möglichst alle CHLAMY 1-Bindestellen auf der RNS besetzen zu können, sollten die nach der AS-Fällung resuspendierten und dialysierten Proteine den Kugeln im Überschuss zugesetzt werden. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass dies bei Einsatz von 1 mg des Proteingemisches nach einer AS-Fällung pro 1 ml Streptavidinkugeln mit gekoppeltem Biotin-Transkript der Fall war. Dieses Verhältnis von Proteinen : Kugelmenge wurde für die weiteren Versuche beibehalten. Nach Angaben des Herstellers der Streptavidinkugeln können diese nur einmal benützt werden. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass eine Bindung von CHLAMY 1 an das immobilisierte Biotin-Transkript auch bei einer zweiten Benützung der Kugeln möglich war, weshalb diese bei der Aufreinigung von CHLAMY 1 zweimal verwendet wurden.

3.4.1.3 Elution von CHLAMY 1

Nach Bindung des biotinylierten Transkriptes an die Streptavidinkugeln und der Inkubation mit einem dialysierten Proteingemisch nach einer AS-Fällung inklusive poly(G) sollten die an das Transkript gebundenen Proteine eluiert werden. Das Loslösen eines Proteins von einer Nukleinsäure ist unter verschiedenen Bedingungen möglich. Hierzu gehören unter anderem Erhöhung oder Erniedrigung des pH-Wertes, Temperaturerhöhung, Erhöhung der Salzkonzentration oder auch Verdrängung des gebundenen Proteins durch hochaffine Substanzen.

Bei der Ausarbeitung der spezifischen RNS-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von CHLAMY 1 wurde ein Hochsalz-Puffer (3 M NaCl; s. 2.2.8) zur Elution der gebundenen Proteine getestet. Eine Überprüfung des dialysierten Eluats auf CHLAMY 1-Bindeaktivität in einem „mobility shift assay“ erbrachte keine Aktivität (nicht gezeigt). Nach Dialyse, Aufkonzentrierung und einer SDS-PAGE (s. 2.2.5, 2.2.6 und 2.2.13.3) der eluierten Proteine mit anschließender Silberfärbung (s. 2.2.14.1) konnten mehrere Proteine detektiert werden (s. Abb. 12): Bei Verwendung von *gs2*$_{wt}$ konnten Proteine von 68, 60, 50 und 44 kDa identifiziert werden. Bei einigen Versuchen konnte auch ein mit Silbernitrat schwach anzufärbendes Protein von 88 kDa detektiert werden (nicht dargestellt). Bei den zusätzlich auftretenden Signalen im Gel handelte es sich um Verunreinigungen, die wahrscheinlich durch den Probenpuffer in das Gelsystem eingebracht wurden (Heukeshoven und Dernick, 1988), da sie auch in Spuren zu sehen waren, die nur mit Probenpuffer beladen wurden (s. Abb. 12; Bereich zwischen den zwei beschrifteten Spuren). Bei Durchführung der Affinitätschromatographie mit dem Kontrolltranskript *gs2*$_{mut}$ konnte ein Protein von 68 kDa Größe und teilweise ein Protein von 88 kDa detektiert werden. Daraus konnte gefolgert werden, dass diese beide Proteine unspezifisch bindende Proteine sind, da sie bei beiden Transkripten auftraten. Die anderen drei Proteine konnten jedoch spezifisch an die „UG“-Wiederholungen binden, da sie nur bei Verwendung des *gs2*$_{wt}$-Transkriptes zu sehen waren. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Elution von CHLAMY 1 vom biotinylierten *gs2*$_{wt}$-Transkript möglich war. Die Bindeaktivität des Proteins konnte dabei jedoch nicht erhalten werden.

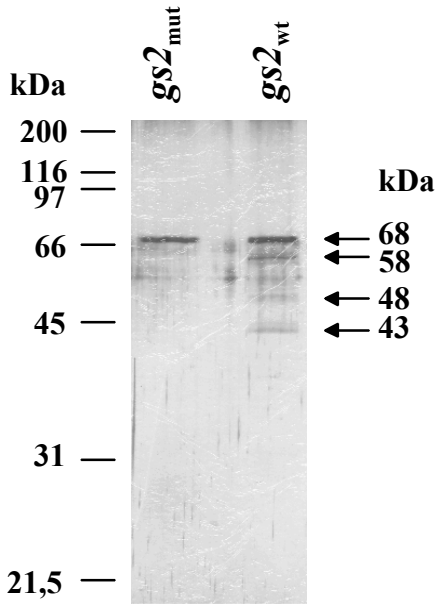


Abb. 12: SDS-PAGE von Eluaten nach einer spezifischen RNS-Affinitätschromatographie

Für die Durchführung der spezifischen RNS-Affinitätschromatographie wurden die biotinylierten Transkripte von *gs2* in der Wildtyp- (wt) und mutierten (mut) Variante verwendet. Je 20 µg Transkript wurden an 1 ml Streptavidinkugeln gebunden. Dieser Komplex wurde nach Äquilibrierung mit 1 mg AS-gefällten, resuspendierten, dialysierten Proteinen aus *C. reinhardtii* und 1 mg poly(G) versetzt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Kugeln wurden die gebundenen Proteine mit einem Elutionspuffer, der 3 M NaCl enthielt, von den Kugeln losgelöst. Die eluierten Proteine wurden nach Dialyse und Aufkonzentrierung in einer SDS-PAGE (Gel 12,5 %) nach ihrer Größe aufgetrennt und silbergefärbt. Zur Bestimmung der Molekularmassen wurde ein Proteinstandard geladen („SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range"). Die Bestimmung der Molekularmassen erfolgte in einem halblogarithmischen Koordinatensystem.

Ein Vergleich der Größen der eluierten Proteine mit den Molekularmassen aus der Größenbestimmung von CHLAMY 1 unter denaturierenden Bedingungen („UV-crosslinking" Experimente) ist in Tab. 7 dargestellt. Der Größenunterschied von bis zu zwei kDa zwischen „UV-crosslinking" Experimenten und RNS-Affinitätschromatographie erklärt sich dadurch, dass die bestimmten Komplexgrößen des ersten Experimentes jeweils die Molekularmasse des Proteins inklusive des geschützten RNS-Anteils darstellen. Die Protein-RNS-Komplexe mit den Größen 37 und 30,5 kDa traten nur bei „UV-crosslinking" Experimenten auf, nicht jedoch bei Durchführung der spezifischen RNS-Affinitäts-chromatographie. Dies deutet auf einen partiellen Abbau der Proteine während eines „UV-crosslinking" Experimentes hin. Die Addition der drei Proteine, die in beiden Experimenten bestimmt werden konnten, ergibt eine Komplexgröße von 154 kDa. Diese Größe steht in etwa im Einklang mit den Bestimmungen der nativen Molekularmasse von CHLAMY 1 (s. 3.3.1). Somit kann man davon

ausgehen, dass CHLAMY 1 aus drei verschiedenen Untereinheiten besteht, die folgendermaßen benannt wurden (s. Tab. 7): C1 für das 60 kDa-Protein, C2 für das 50 kDa-Protein und C3 für die 44 kDa-Untereinheit.

Tab. 7: Vergleich der Größenbestimmung von CHLAMY 1 unter denaturierenden Bedingungen („UV-crosslinking" Experimente und spezifische RNS-Affinitäts-chromatographie)

„UV-crosslinking" (kDa)	RNS-Affinitätschromatographie (kDa)	Name der Untereinheit
	88	
62	60	C1
50	50	C2
45	44	C3
37		
30,5		

3.4.2 Aufreinigung von CHLAMY 1 in großem Maßstab

In den bereits beschriebenen Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen für die Durchführung einer spezifischen RNS-Affinitätschromatographie ausgearbeitet (s. 3.4.1). Ein Schema für den Ablauf des Experimentes ist in Abb. 13 dargestellt. Für die Aufreinigung von CHLAMY 1 sollte das Experiment in großem Maßstab durchgeführt werden. Es wurden 30 ml Streptavidinkugeln vereinigt und für den Versuch eingesetzt. Nach Ablauf eines solchen Großansatzes und Überprüfung der eluierten Proteine durch eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung stellte sich jedoch heraus, dass zusätzlich zu den erwarteten Banden auch kleinere Proteine zu detektieren waren (nicht dargestellt). Diese Proteine, die wahrscheinlich auf Abbau zurückzuführen waren, konnten bei Durchführung von kleinen Ansätzen (1 ml Streptavidinkugeln) nicht identifiziert werden. Zur Aufreinigung wurden deswegen 1 ml-Ansätze in mehreren Parallelen ausgeführt.

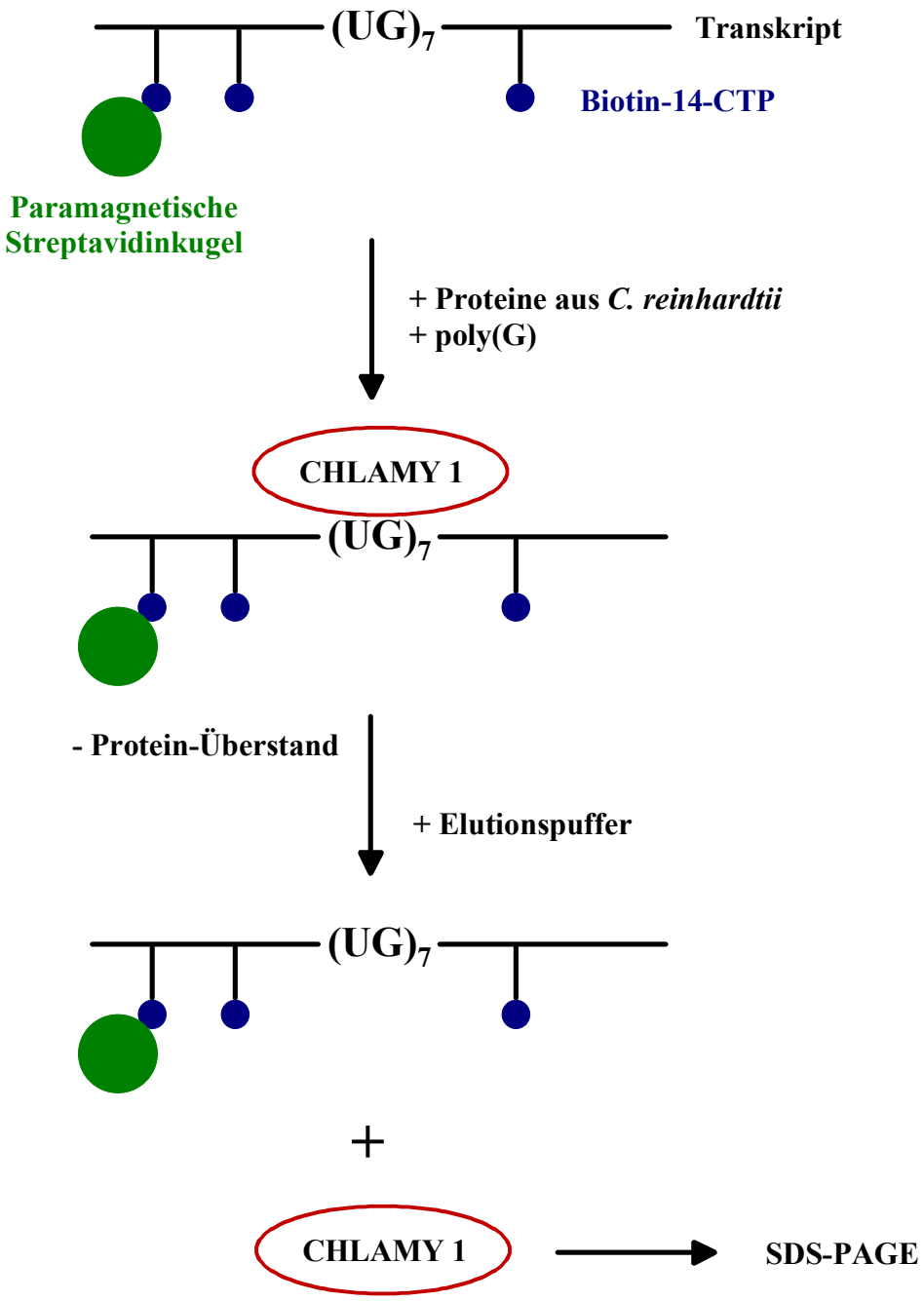


Abb. 13: Schema zur spezifischen RNS-Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung des RNS-Bindeproteins CHLAMY 1 wurde eine spezifische RNS-Affinitätschromatographie entwickelt: Durch eine *in vitro*-Transkription wurde das $gs2_{wt}$-Transkript hergestellt, dass Biotin-14-CTP enthielt. Für die Durchführung von Kontrollexperimenten wurde die mutierte Variante dieses Transkriptes ($gs2_{mut}$) verwendet. Nach Aufreinigung des jeweiligen biotinylierten Transkriptes wurde dieses an paramagnetische Streptavidinkugeln gebunden (20 µg RNS pro 1 ml Kugeln). Nach Waschen und Äquilibrieren der ummantelten Kugeln wurden AS-gefällte (0,5–1 M AS), resuspendierte und dialysierte Proteine aus *C. reinhardtii* und poly(G) als nicht-spezifischer Kompetitor (je 1 mg) zugesetzt. Während einer Inkubation von 2 h bei 4°C konnten die spezifischen Proteine an das biotinylierte Transkript binden. Danach wurde der Überstand, der die nicht-gebundenen Proteine enthielt, abgenommen. Nach Waschen der Kugeln wurden die gebundenen Proteine mi Hilfe eines Elutionspuffers von den Kugeln losgelöst. Die eluierten Proteine wurden in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung überprüft.

Für die Durchführung einer Peptid-Sequenzierung war es nötig, pro CHLAMY 1-Untereinheit mindestens 100 pmol zur Verfügung zu stellen. Das entspricht beispielsweise bei der Untereinheit C3 (44 kDa) einer Menge von 4,4 µg. Durch Auswertung von 22 durchgeführten Experimenten konnte eine durchschnittliche Elution von 28 ng C3-Untereinheit pro 1 ml Streptavidinkugeln berechnet werden, was einer Ausbeute von ca. 0,000027 % entspricht. Um eine Menge von 100 pmol zu erhalten, war es somit nötig, 154 ml Streptavidinkugeln zur Aufreinigung einzusetzen. Da es sich beim oben angegebenen Wert jedoch nur um einen Mittelwert handelte, wurden insgesamt 199,6 ml Streptavidinkugeln verwendet. Für diese Menge Kugeln wurden 399 mg eines in CHLAMY 1-angereicherten Proteingemisches benötigt. Bei einer durchschnittlichen Ausbeute von 0,404 mg AS-gefällten Proteinen (0,5–1 M AS) pro Liter *C. reinhardtii*-Kultur, wurden somit insgesamt ca. 988 Liter *C. reinhardtii*-Kultur aufgearbeitet.

Nach Durchführung der spezifischen RNS-Affinitätschromatographien wurden alle Elutionen vereinigt und für eine abschließende SDS-PAGE vorbereitet. Hierzu wurde die Proteinlösung mit „Slide-A-Lyzer Dialysis“ Kassetten entsalzt und danach aufkonzentriert (s. 2.2.5 und 2.2.6). Die Probe wurde geteilt und für mehrere SDS-PAGEs mit anschließender Coomassie-Färbung eingesetzt (s. 2.2.13.3, 2.2.14.1 und Abb. 14).

Durch die unter 3.4.1.3 beschriebenen Versuche war bekannt, dass fünf Proteine mit den Molekularmassen 88, 68, 60, 50 und 44 kDa durch die spezifische RNS-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten. Die drei kleineren Proteine repräsentierten dabei die Untereinheiten von CHLAMY 1, während es sich bei den 88 und 68 kDa-Proteinen um unspezifisch bindende Proteine handelte. Nach Coomassie-Färbung der durchgeführten Gelläufe (s. Abb. 14) konnten mehr als fünf Proteine detektiert werden. Die drei Untereinheiten von CHLAMY 1 (C1, C2 und C3) konnten jedoch anhand ihrer Größe und der Färbungsintensität eindeutig identifiziert werden. Von jeder der drei CHLAMY 1-Untereinheiten konnte eine Menge von ca. 170 pmol aufgereinigt werden. Diese Mengen wurden zur Durchführung einer Peptid-Sequenzierung verwendet.

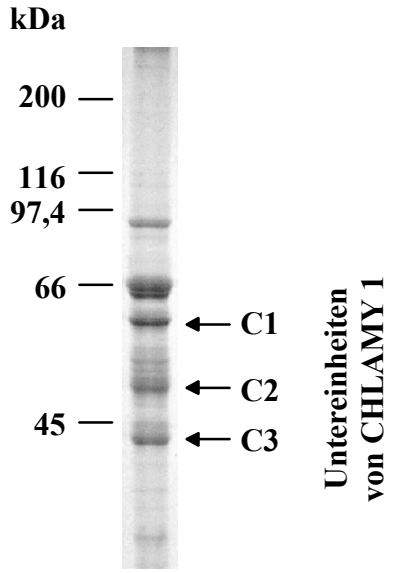


Abb. 14: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der eluierten Proteine nach der spezifischen RNS-Affinitätschromatographie

Die Elutionen der spezifischen RNS-Affinitätschromatographien wurden vereinigt, dialysiert und mit Hilfe von Mikrokonzentratoren eingeengt. Die Probe wurde aufgeteilt und für mehrere SDS-PAGEs eingesetzt: Ca. 22 % der Probe wurden für die gezeigte SDS-PAGE (Gel 10 %) verwendet und nach der Elektrophorese Coomassie-gefärbt. Zur Bestimmung der Molekularmassen wurde ein Proteinstandard geladen und angefärbt („SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Broad Range"). Die drei Untereinheiten von CHLAMY 1 sind mit C1 bis C3 bezeichnet.

3.5 Peptid-Sequenzierung von CHLAMY 1

Ca. 50 % aller natürlich vorkommenden Proteine weisen N-terminale Modifikationen auf (Kellner *et al*., 1994), wodurch eine Sequenzierung vom N-Terminus aus nicht möglich ist. Dabei handelt es sich beispielsweise um Acetylierungen oder Formylierungen. Auch kann eine N-terminale Blockierung unbeabsichtigt während einer Proteinreinigung oder Probenvorbereitung eingeführt werden. Meist ist es nicht möglich, die Blockierung chemisch oder enzymatisch vor der Sequenzanalyse zu entfernen. Deswegen werden solche Proteine zuerst in mehrere Stücke gespalten, die dann sequenziert werden. Für CHLAMY 1 war nicht bekannt, ob es sich um ein N-terminal blockiertes Protein handelt. Wie bereits dargestellt wurde, liegt CHLAMY 1 nur in sehr geringer Menge in der Zelle vor (s. 3.4.2). Die nochmalige Aufreinigung des Proteins bei einer fehlgeschlagenen Sequenzierung wäre im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht möglich gewesen. Um etwaige Probleme bei der Sequenzierung so weit als möglich ausschließen zu können, wurden die CHLAMY 1-Untereinheiten zuvor enzymatisch gespalten.

3.5.1 Peptid-Sequenzen von CHLAMY 1

Die Peptid-Sequenzierung wurde bei PD Dr. Rainer Deutzmann (Universität Regensburg) in Auftrag gegeben. Dort wurde die Spaltung der Proteine, die Auftrennung der Peptide über HPLC und ihre Sequenzierung ausgeführt. Als Ausgangsmaterial wurden die über SDS-PAGE aufgetrennten und Coomassie-gefärbten CHLAMY 1-Untereinheiten nach der RNS-Affinitätschromatographie verwendet (s. 3.4.2 und Abb. 14). Die Fragmentierung der drei Untereinheiten von CHLAMY 1 wurde mit der Serinprotease Trypsin durchgeführt. Diese Endoprotease spaltet C-terminal von Arginin und Lysin.

Von einem Teil der entstandenen Peptide wurde durch Edman-Abbau die Aminosäure-Sequenz bestimmt (s. Tab. 8): Das Symbol „X“ steht dafür, dass eine Vielzahl von Aminosäuren während der Sequenzierung auftraten. Dies war meistens im ersten Zyklus der Fall, da hier noch mögliche Verunreinigungen herausgewaschen wurden. Eine Aminosäure in Klammern bedeutet eine nicht eindeutige Zuordnung. Untereinander stehende Aminosäuren geben die verschiedenen möglichen Aminosäuren an dieser Stelle im Peptid an.

Bei allen drei Untereinheiten von CHLAMY 1 wurden drei Peptide mit unterschiedlichen Längen sequenziert (s. Tab. 8): Bei der 60 kDa großen Untereinheit C1 wurden Peptide mit den Längen 12, 19 und 15 Aminosäuren sequenziert. Bei der Untereinheit C2 mit einer Größe von 50 kDa konnten Peptide sequenziert werden, die 13, 19 und 7 Aminosäuren lang waren. Bei der kleinsten Untereinheit (C3; 44 kDa groß) wurden Peptide analysiert, die 13, 16 bzw. 24 Aminosäuren lang waren. Besonders hervorgehoben werden muss die Tatsache, dass die Peptide C1-16 und C2-8 über eine Länge von 13 Aminosäuren 100 % homolog sind, obwohl sie aus zwei verschiedenen Untereinheiten stammen (s. Tab. 8).

Tab. 8: Peptid-Sequenzen der CHLAMY 1-Untereinheiten

Untereinheit C1
Peptid C1-13
X P V V E T G N S H L P P E M Q I I E L L
Peptid C1-16
T I Q Q A S G A H I L V N Q D F P E G Q V E D L I
Peptid C1-26
X X A E M L A (T) I F A A Q A G A N I G P
Untereinheit C2
Peptid C2-7
X V L D L I S G H H D D A A G G S S
Peptid C2-8
X L Q Q A S G A H I L V N Q D F P E G A
Peptid C2-2
X I T I S G S Q
Untereinheit C3
Peptid C3-1
T L (L) V K D S Q V S V P S D P R
Peptid C3-13
X L F V X Q I P Q H T T E Q H I R
Peptid C3-16
X F G A V E G A P P G V F P G A A A G P G G N K R

3.5.2 Auswertung der Peptid-Sequenzen von CHLAMY 1

Eine Genbank-Suche sollte zunächst zeigen, ob die Sequenzen der CHLAMY 1-Peptide (s. Tab. 8) bereits bekannt waren. Die hierzu verwendeten Programme sind im Anhang dieser Arbeit aufgelistet. Es konnten zu dieser Zeit keine signifikanten Homologien zu bereits bekannten Proteinen oder, nach Übersetzung der Peptide in die möglichen DNS-Sequenzen, zu bekannten Genen entdeckt werden.

Weiterhin sollten alle Peptide auf konservierte Protein-Domänen hin untersucht werden. Hierzu wurde das Suchprogramm „CD Search“ (= „Conserved Domain Search“) verwendet. Für das Peptid C3-13 (Sequenz s. Tab. 8) konnte eine Homologie zum „RNA Recognition Motif“ (= RRM; Burd und Dreyfuss, 1994) gefunden werden. Bei keinem anderen Peptid konnten signifikanten Homologien zu konservierten Protein-Domänen aufgedeckt werden. RRM’s sind an der Bindung zur RNS beteiligt (Birney *et al.*, 1993). Die Konsensus-Sequenz des RRM hat eine Länge von 73 Aminosäuren mit zwei hochkonservierten Domänen (RNP-1 und RNP-2; Burd und Dreyfuss, 1994). Die Ausrichtung des Peptids C3-13 mit der RRM Konsensus-Sequenz (s. Abb. 15) zeigte, dass der überlappende Bereich (16 Aminosäuren lang) acht gleiche Aminosäuren und drei in ihren Funktionen ähnliche Aminosäuren beinhaltete. Die Homologie zwischen den beiden Sequenzen befand sich im N-terminalen Bereich der Konsensus-Sequenz, in der auch die hochkonservierte Domäne RNP-2 zu finden war.

```
C3-13   1   -LFVXQIPQHTTEQHIR-------------   16
RRM     1   TLFVGNLPPDTTEEDLRELFSKFGKVVSVR   30
             RNP-2

C3-13   16  ------------------------------   16
RRM     31  IVRDKDTRSKGFAFVEFEDEEDAEKAIEAL   60
                    RNP-1

C3-13   16  ------------- 16
RRM     61  NGKELDGRPLRVK 73
```

Abb. 15: Ausrichtung des Peptids C3-13 mit der RRM Konsensus-Sequenz

In der 73 Aminosäuren langen Konsensus-Sequenz des „RNA Recognition Motifs“ (RRM) sind die zwei hochkonservierten Domänen (RNP-1 und RNP-2) eingezeichnet. Rot hervorgehobene Bereiche kennzeichnen gleiche Aminosäuren, während blaue Bereiche auf funktionell ähnliche Aminosäuren hindeuten.

3.6 Versuche zur Klonierung der *chlamy 1*-Gene unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden

Ausgehend von den Peptid-Sequenzen der CHLAMY 1-Untereinheiten (s. Tab. 8) sollten die *chlamy 1*-Gene kloniert werden. Dies wurde sowohl auf molekularbiologischem (dieses Kapitel) als auch auf immunologischem Wege (s. 3.9.1) durchgeführt.

Für die molekularbiologischen Versuche wurden degenerierte Oligonukleotide erstellt (s. 2.1.11). Darunter versteht man synthetische Oligonukleotide, deren Sequenzen von Aminosäure-Sequenzen abgeleitet werden. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes ist es dabei nicht möglich, jeder Stelle des Oligonukleotids nur eine einzige Base zuzuordnen. Diese Degeneriertheit wurde beim Planen und der Produktion der synthetischen Oligonukleotide miteinbezogen (s. 2.2.22.1). Bei einigen Oligonukleotiden wurde die Häufigkeit der Codon-Benützung in *C. reinhardtii* beachtet, um die Degeneriertheit zu verringern. Die degenerierten Oligonukleotide wurden für die Sichtung einer cDNS-Bank und für PCR-Experimente eingesetzt.

Degenerierte Oligonukleotide wurden bereits erfolgreich in Hybridisierungs-Experimenten zur Isolierung von cDNS-Klonen eingesetzt, die für Nukleotid-bindende Proteine kodieren (Beispiel in Park *et al.*, 1994). Mit der Sichtung einer cDNS-Bank aus *C. reinhardtii* (Waltenberger *et al*., 2001; s. 2.1.14 und 2.2.20.1) sollten cDNS-Klone für alle drei Untereinheiten von CHLAMY 1 isoliert werden. Die RNS zur Herstellung dieser cDNS-Bank wurde aus *C. reinhartii*-Zellen gewonnen, die zum Zeitpunkt LD 10 geerntet worden waren. Zu dieser Zeit ist die Bindeaktivität von CHLAMY 1 hoch (Mittag, 1996) und man kann somit erwarten, dass auch die *chlamy 1*-RNS in erhöhter Menge vorhanden sein sollte. Zur Hybridisierung wurden Gemische aus degenerierten Oligonukleotiden (s. 2.1.11) verwendet. Insgesamt wurden ca. 2 Millionen Phagen überprüft. Nach drei Sichtungsrunden wurden neun potentiell positive cDNS-Klone näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass keiner dieser Klone für eine CHLAMY 1-Untereinheit kodierte, da keines der bekannten CHLAMY 1-Peptide nach Übersetzung der cDNS-Fragmente in Aminosäuren gefunden werden konnte.

Zur Klonierung der *chlamy 1*-Gene wurde weiterhin ein PCR-gestützter Ansatz unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden (s. 2.2.22) gewählt. Als Matrizen für die PCR standen cDNS und genomische DNS zur Verfügung. Bei der Planung der PCR-Zyklen wurden mehrere die PCR beeinflussende Parameter berücksichtigt. So wurde bei Innis *et al.* (1989) beispielsweise auf eine langsame Temperaturerhöhung zwischen Anlagerung und Verlängerung hingewiesen. Es war nicht möglich, ein gemeinsames PCR-Profil für alle Primer zu erstellen. Insgesamt wurden 44 spezifisch durch zwei Primer entstandene Fragmente kloniert, sequenziert und auf Homologie zu den CHLAMY 1-Peptiden hin überprüft. Dabei konnte kein DNS-Sequenz identifiziert werden, die nach Übersetzung in Aminosäuren ein bzw. mehrere vollständige CHLAMY 1-Peptide enthielt. Wie sich später herausstellte, lagen die durch die Sequenzierung bekannten CHLAMY 1-Peptide teilweise in enger Nachbarschaft zueinander, wodurch eine Klonierung durch PCR sehr erschwert war (s. Anhang).

3.7 Synthese und Charakterisierung der Peptid-Antikörper gegen die Untereinheiten von CHLAMY 1

Die Produktion von Peptid-Antikörpern wurde bei Eurogentec (Belgien) in Auftrag gegeben. Sie sollten für die Überprüfung der Abundanz von CHLAMY 1 in einem Tag-Nacht-Verlauf und für die Durchführung einer Expressions-Genbank-Sichtung eingesetzt werden. Für die Synthese wurden Teilstücke aus zwei CHLAMY 1-Peptiden von unterschiedlichen Untereinheiten ausgewählt, die für die Auslösung einer Immunantwort bei Kaninchen am besten geeignet erschienen: Für die Produktion eines Antikörpers gegen die Untereinheit C3 wurden 12 Aminosäuren des Peptids C3-13 ausgewählt (s. 2.1.13.1). Weiterhin sollte ein Antikörper gegen das konservierte Peptid der CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 hergestellt werden. Hierzu wurden 16 Aminosäuren des Peptids C1-16 bzw. C2-8 ausgewählt (s. 2.1.13.1). Die Peptide wurden synthetisch hergestellt (Eurogentec, Belgien) und vor der Immunisierung an KLH (= „keyhole limpet hemocyanin“ = Hämocyanin des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus*) gekoppelt. Beim verwendeten Teilstück des Peptids C3-13 war es

für die Kopplung an KLH nötig, am N-Terminus ein Cystein anzuhängen. Das Antiserum gegen die CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 wurde als „AK1/2“ bezeichnet und das gegen die Untereinheit C3 als „AK3“.

3.7.1 Überprüfung der Spezifität der Antikörper

Während der insgesamt fünf Monate dauernden Immunisierungen wurden vier Antiseren aus Zwischenblutungen auf Anwesenheit der spezifischen Antikörper hin überprüft. Hierzu wurden die zur Immunisierung eingesetzten Peptide (s. 2.1.13.1) in verschiedenen Mengen auf Membranen aufgebracht und für eine Immunodetektion mit den Antiseren der Blutungen eingesetzt (s. 2.2.10 und 2.2.11). Die in Abb. 16 (Spuren a) getestete Zwischenblutung wurde nach 8,5 Wochen Immunisierung entnommen, die andere (Spuren b) nach weiteren acht Wochen. Beide Peptide konnten nach dieser Zeit in geringerer Menge von den Antiseren erkannt werden, d.h. es lag eine erhöhte Menge spezifischer Antikörper in den Antiseren vor. Dies zeigt, dass die Kaninchen in der Lage waren, spezifische Antikörper gegen die zur Immunisierung verwendeten Peptide zu produzieren.

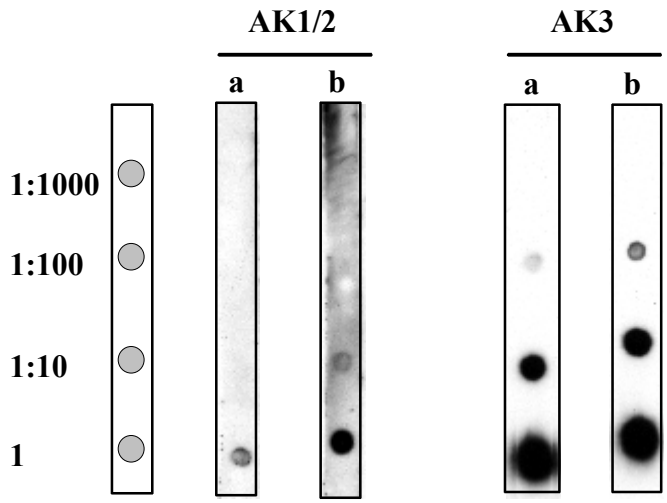


Abb. 16: Spezifität der CHLAMY 1-Antikörper

Die Peptide EP001314 (AK1/2) und EP001315 (AK3) wurden in Verdünnungen auf Nitrocellulose-Membranen aufgetropft und für Immunodetektionen verwendet. Die maximale Menge der Peptide betrug je ca. 1 µg. Als Antiseren (Verdünnung je 1 : 100) wurden Zwischenblutungen während der Immunisierungen verwendet. Die Antiseren „a“ wurden den Tieren 8,5 Wochen nach der ersten Injektion entnommen, die Antiseren „b“ nach weiteren acht Wochen. Zum Abdecken der unspezifischen Bindungsstellen wurde Blockierungspuffer I (in PBS) verwendet. Der Nachweis erfolgte durch eine Merrettich-Peroxidase-Reaktion.

Nachdem die Spezifität der Antikörper gegen die eingesetzten Peptide nachgewiesen worden war, wurden die Antiseren nach Abschluss der Immunisierungen in Western Blots (s. 2.2.9) mit Proteinen aus *C. reinhardtii* getestet (s. Abb. 17). Hierzu wurden sowohl Rohextrakt als auch ein Proteingemisch nach einer AS-Fällung (0,5–1 M AS) als Proben eingesetzt (s. 2.2.3 und 2.2.4.1). Des weiteren wurden zwei unterschiedliche Blockierungspuffer getestet.

Bei Verwendung des Antikörpers AK1/2, der gegen die Untereinheiten C1 und C2 gerichtet war, konnten mehrere Signale detektiert werden (s. Abb. 17 A und B). Bei Verwendung von Blockierungspuffer I (s. 2.1.16.3 und Abb. 17A), der zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen Milchpulver enthielt, konnten sowohl im Rohextrakt als auch im Proteingemisch nach der AS-Fällung Signale auf den Höhen von 60 und 50 kDa identifiziert werden, die den Größen der CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 entsprechen. Bei den Proteinen nach der AS-Fällung sollten sich beide Signale im Vergleich zum Rohextrakt verstärken, da CHLAMY 1 in dieser Probe angereichert vorliegt. Aus Abb. 17A ist jedoch ersichtlich, dass nur das 60 kDa-Protein besser erkannt wurde. Bei Verwendung des Blockierungspuffers II (s. 2.1.16.3 und Abb. 17B), der zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen „Slimfast Schoko“ mit den darin vorkommenden Sojaproteinen enthielt (Müller, 2000), konnten ebenfalls mehrere Signale detektiert werden, wobei die Signalstärken beider Proteine (60 und 50 kDa) durch eine AS-Fällung verstärkt wurden. Es fiel auf, dass sich bei Verwendung des Blockierungspuffers I das Verhältnis von 60 kDa : 50 kDa durch die AS-Fällung änderte (s. Abb. 17A): Das Signal bei 60 kDa nahm um ca. 130 % zu, während das 50 kDa-Signal kaum eine Änderung zeigte. Das Verhältnis änderte sich von 1 : 3,6 auf 1 : 1,4. Bei Verwendung von Blockierungspuffer II nahmen die Signalstärken beider Banden zu (s. Abb. 17B). Die Signalstärke des 60 kDa-Proteins war nach der AS-Fällung um ca. 215 % stärker als beim Rohextrakt. Das 50 kDa-Protein war beim Rohextrakt nur sehr schwach zu detektieren, nach Durchführung der AS-Fällung konnte es hingegen eindeutig identifiziert werden. Das Verhältnis der Signalstärken von 60 kDa : 50 kDa betrug bei den AS-gefällten Proteinen 1,2 : 1, bei Verwendung des Rohextraktes betrug sie ungefähr 1,1 : 1.

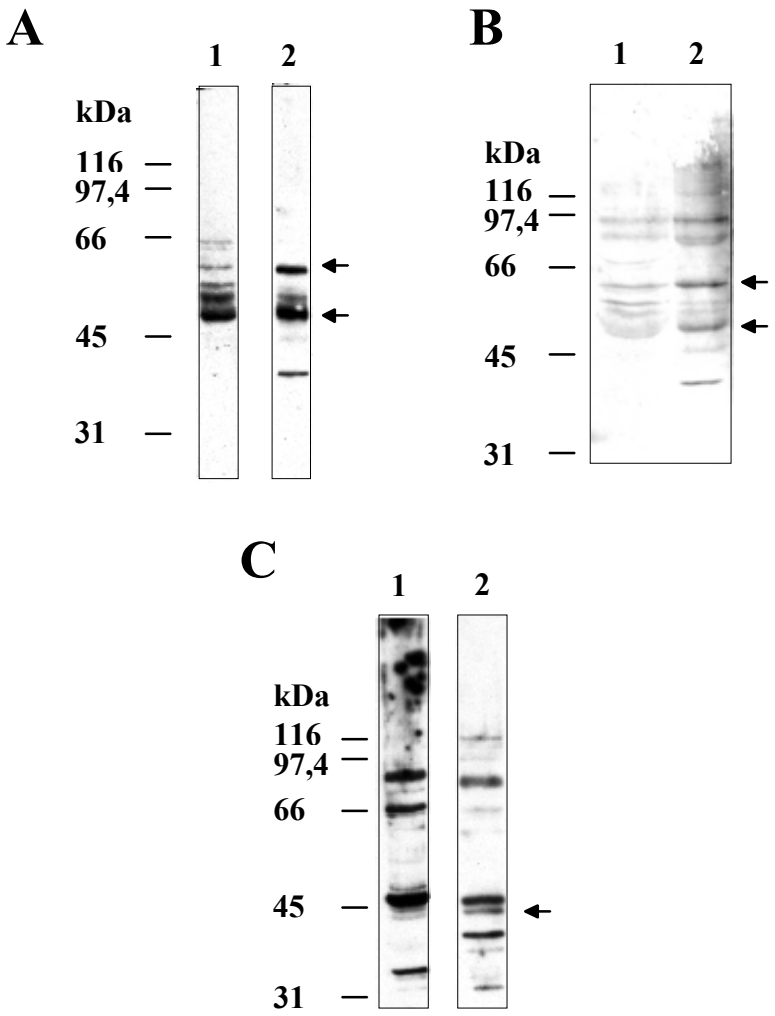


Abb. 17: Überprüfung der Antiseren AK1/2 und AK3 in Western Blots

Proteingemische aus *C. reinhardtii* (Stamm 137c; Ernte zu LD 12-13) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Gel 9 %). In den Spuren „1" wurden je 50 µg Rohextrakt aufgetrennt, in den Spuren „2" je 25 µg eines Proteingemisches nach einer 0,5-1 M AS-Fällung. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose übertragen und einer Immunodetektion unterzogen. **(A)** Es wurde Antiserum AK1/2 mit Blockierungspuffer I (in PBS) verwendet. **(B)** Es wurde Antiserum AK1/2 mit Blockierungspuffer II (in TBST) verwendet. **(C)** Blockierungspuffer I (in PBS) wurde zusammen mit dem Antiserum AK3 eingesetzt. Alle verwendeten Antiseren wurden 1 : 100 im jeweiligen Blockierungspuffer verdünnt. In den Teilen (A) und (C) wurde die Bindung der Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase nachgewiesen, in Teil (B) wurde Alkalische Phosphatase eingesetzt. Die Pfeile weisen auf die Größen der CHLAMY 1-Untereinheiten C1 bis C3 hin.

Für die Überprüfung des Antikörpers AK3 (s. Abb. 17C), der gegen die CHLAMY 1-Untereinheit C3 gerichtet war, wurden ebenfalls Western Blots mit Rohextrakt aus *C. reinhardtii* als auch mit einem Proteingemisch nach einer 0,5-1 M AS-Fällung (s. 2.2.4.1) angefertigt. In beiden Proben konnten mehrere Proteine bei Verwendung von Blockierungspuffer I detektiert werden. Das Signal auf Höhe von 44 kDa, das der Größe der CHLAMY 1-Untereinheit C3 entspricht, konnte durch Anreicherung von CHLAMY 1 mittels einer AS-Fällung um ca. 48,4 %

verstärkt werden. Die Verwendung des Blockierungspuffers II erbrachte im Gegensatz zu den bereits dargestellten Versuchen mit AK1/2 keine Verbesserung der Signalstärke und keine Abnahme der unspezifischen Hintergrundsignale (Daten nicht dargestellt).

Die hier dargestellten Experimente zeigen, dass die Produktion von Antikörpern gegen die Untereinheiten von CHLAMY 1 möglich war. Die eingesetzten Antiseren konnten in Western Blots außer den CHLAMY 1-Untereinheiten noch andere Proteine erkennen. Die Präsenz der für die Antikörper-Produktion verwendeten Peptide in konservierten RNS-Bindedomänen könnte hierfür der Grund sein (s. 3.9 und 4.4). Die spezifisch gegen CHLAMY 1 gerichteten Antikörper sollten in einem nächsten Schritt aus dem Kaninchen-Serum isoliert und für weitere Experimente eingesetzt werden.

3.7.2 Versuche zur Aufreinigung der Antiseren AK1/2 und AK3

Um die Hintergrundsignale in Experimenten mit Immunofärbung zu reduzieren und um die spezifischen Antikörper von den unspezifischen abzutrennen, sollten die verwendeten Antiseren AK1/2 und AK3 aufgereinigt werden. Hierzu wurden die für die Immunisierung verwendeten Peptide (s. 2.1.13.1) an ein Säulenmaterial gebunden (s. 2.2.12.1). Nachdem das Kaninchen-Serum die Säule passiert hatte, wurden die gebundenen Antikörper unter verschiedenen Bedingungen eluiert (hoher oder niedriger pH-Wert bzw. Hochsalz-Bedingungen im Puffer; s. 2.2.12.2). Um die Aktivität der Antikörper zu überprüfen, wurden sowohl Western Blots als auch Immunofärbungen der aufgetropften Peptide durchgeführt (s. 2.2.9; 2.2.10 und 2.2.11).

Das Antiserum AK1/2 konnte vor der Aufreinigung das zur Immunisierung verwendete Peptid und Proteine der Größen 60 und 50 kDa erkennen, die den Größen der CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 entsprechen (s. Abb. 18A links). Um die Bindung der Antikörper an die Säule zu kontrollieren, wurde der Durchfluss nach der Säule (Benennung AK1/2^{-}), der nur unspezifische Antikörper enthalten sollte, auf Aktivität getestet: Das eingesetzte Serum AK1/2^{-} konnte weder das zur Immunisierung verwendete Peptid noch Proteine mit den Größen 60 und 50 kDa erkennen (s. Abb. 18A rechts), was auf eine vollständige

Bindung der spezifischen Antikörper an die Säule schließen ließ. Für den Antikörper AK1/2 wurden folgende Elutionsbedingungen getestet: saurer bzw. basischer pH-Wert und Hochsalz-Bedingungen im Elutionspuffer (s. 2.2.12). Unter keiner dieser Bedingungen konnten Antikörper eluiert werden, die nach Dialyse aktiv waren.

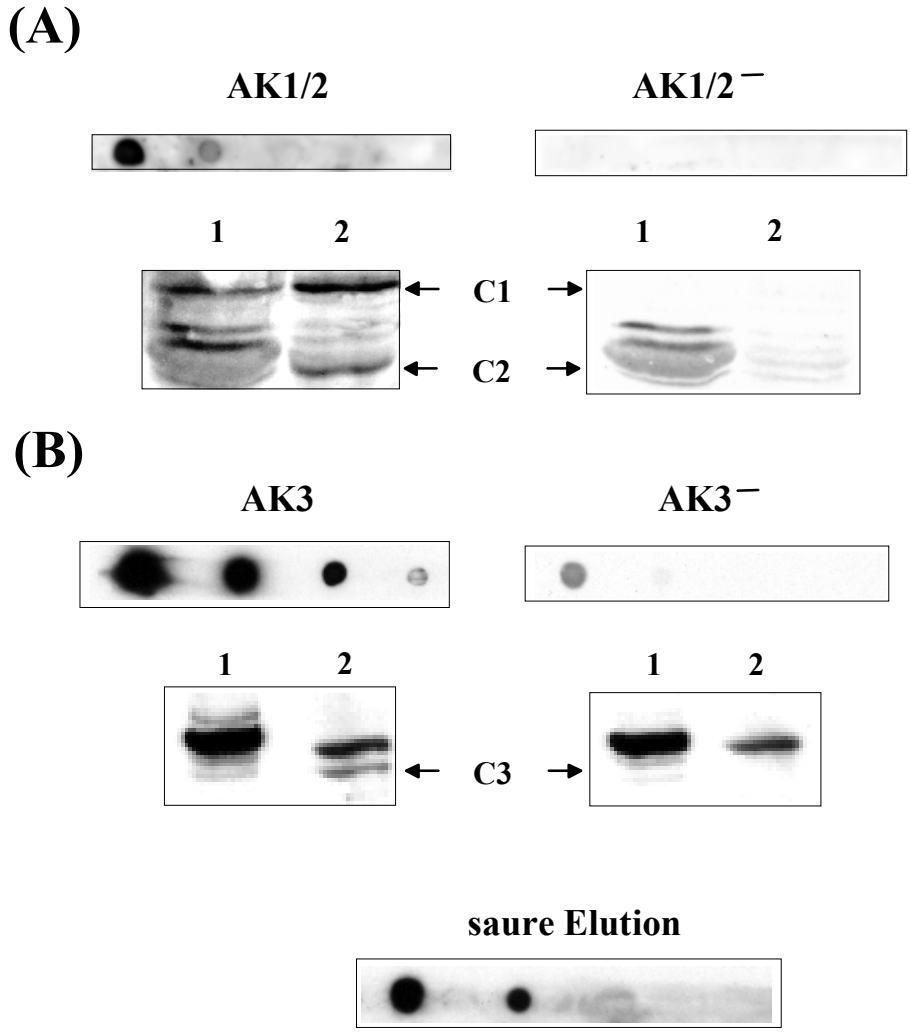


Abb. 18: Versuche zur Aufreinigung der Antiseren AK1/2 und AK3

(A) Aktivität des Antiserums AK1/2, das gegen die CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 gerichtet war (Peptid EP001314), vor (AK1/2) und nach Aufreinigung (AK1/2⁻) über eine Säule. **(B)** Aufreinigung des gegen die CHLAMY 1-Untereinheit C3 (Peptid EP001315) gerichteten Antiserums AK3. Die Bezeichnung AK3⁻ weist auf das Antiserum nach Passieren der Säule hin. Die mit einem saurem Puffer eluierten Antikörper wurden vor Verwendung auf ein kleineres Volumen eingeengt und entsalzt. Die Endverdünnung der Antiseren AK1/2, AK3, AK1/2⁻ und AK3⁻ betrug je 1 : 100, die eluierten Antikörper wurden 1 : 3 verdünnt. Die Ziffern „1“ und „2“ stehen für die durch einen Western Blot (Gel 9 %) aufgetrennten *C. reinhardtii*-Proteine (Stamm 137c, Ernte zu LD 12-13) eines Rohextraktes bzw. einer AS-Fällung. Die Bezeichnungen C1 bis C3 weisen auf die Untereinheiten von CHLAMY 1 hin. Für die Western Blots unter Teilabbildung (A) wurde Blockierungspuffer I verwendet; der Nachweis wurde mit Meerrettich-Peroxidase durchgeführt. Für alle anderen dargestellten Immunofärbungen wurde Blockierungspuffer II eingesetzt; die Detektion wurde mit Alkalischer Phosphatase durchgeführt.

Bei der Aufreinigung des Antiserums AK3, das gegen die CHLAMY 1-Untereinheit C3 gerichtet war, zeigte sich ein etwas anderes Bild: Der Durchfluss der Säule (= AK3^{-}), der keine spezifischen Antikörper enthalten sollte, konnte das aufgetropfte Peptid noch zu einem kleinen Prozentsatz erkennen (s. Abb. 18B rechts). In einem Western Blot war jedoch eine Immunofärbung der C3-Untereinheit nicht mehr möglich, was auf eine fast vollständige Bindung des spezifischen Antikörpers an die Säule schließen ließ. Für eine Elution der gebundenen Antikörper wurden Puffer mit saurem und basischem pH-Wert eingesetzt (s. 2.2.12). Die eluierten Antikörper wurden vor ihrem Einsatz in immunochemische Experimente dialysiert. Nach Elution mit einem basischem Puffer konnte das Eluat das aufgetropfte Peptid nicht erkennen (nicht gezeigt). Bei Verwendung des sauren Puffer hingegen war eine Immunofärbung des Peptids möglich, was auf eine Elution des gebundenen Antikörper in seiner aktiven Form hinwies (s. Abb. 18B unten). Die Kontrolle dieser aufgereinigten Antikörper in einem Western Blot zeigte ein anderes Ergebnis: So war es nicht möglich, ein Signal auf der Höhe von 44 kDa zu detektieren (nicht dargestellt).

Die Spezifität der Antiseren wurde bereits in Abb. 17 dargestellt: In den durch die Aufreinigung von CHLAMY 1 bekannten Größenbereichen von 60, 50 und 44 kDa konnten Signale durch Immunofärbungen identifiziert werden. Durch die versuchte Aufreinigung der Antiseren konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Signalen um die Untereinheiten von CHLAMY 1 handeln muss, da diese in Antiseren ohne die spezifischen Antikörper (AK1/2^{-} und AK3^{-}) nicht mehr bzw. nur noch sehr schwach zu detektieren waren. Es war jedoch nicht möglich, die spezifischen Antikörper von den unspezifischen abzutrennen und dabei ihre Aktivität in Western Blots zu erhalten.

3.8 Oszillation der CHLAMY 1-Menge in einem Tag-Nacht-Zyklus

Die Bindeaktivität von CHLAMY 1 schwankt circadian, d.h. sie zeigt sowohl unter Licht-Dunkel- (LD) als auch unter Dauerschwachlicht-Bedingungen (LL) den gleichen Rhythmus. Sie steigt am späten (subjektiven) Tag an und ist in der

(subjektiven) Nacht am Stärksten (Mittag, 1996). Diese Ergebnisse lassen jedoch keine Rückschlüsse auf die Abundanz des Proteins zu. So kann die Proteinmenge im Tag-Nacht-Verlauf schwanken oder aber sie ist gleichbleibend und es wird nur die Aktivität des Proteins durch posttranslationale Modifikationen geregelt. Die Menge an CHLAMY 1 sollte nun im Tag-Nacht-Verlauf untersucht werden. Hierfür wurden *C. reinhardtii*-Kulturen (Stamm SAG73.72) im Verlauf eines LD- und LL-Zyklus alle vier Stunden geerntet, für die Herstellung von Rohextrakten verwendet und dann für Western Blots mit anschließender Immunodetektion eingesetzt (s. 2.2.3; 2.2.9 und 2.2.11). Wie bereits erwähnt, konnte die Untereinheit C2 in einer Rohextrakt-Probe nur sehr schwach nachgewiesen werden (s. 3.7.1). Für diese Untereinheit wurde deswegen keine Mengenbestimmung in einem Tag-Nacht-Verlauf durchgeführt.

3.8.1.1 Schwankung der Menge von CHLAMY 1-Untereinheit C1

Rohextrakte aus *C. reinhardtii*-Kulturen, die unter LD-Bedingungen geerntet worden waren, wurden für drei unabhängige Experimente eingesetzt. In Abb. 19A (obere Hälfte) ist ein Beispiel für einen immunogefärbten Western Blot dargestellt. Die densidometrische Auswertung der Signalstärken der CHLAMY 1-Untereinheit C1 ergab im LD-Zyklus (s. Abb. 19A untere Hälfte) einen leichten Anstieg (durchschnittlich 20 %) der Proteinmenge vom Ende des Tages bis zur Mitte der Nacht (LD 10 bis LD 18).

Um einen Einfluss des LD-Wechsels auf die Präsenz des untersuchten Proteins ausschließen zu können, wurden Zellen unter Dauerschwachlicht geerntet und für drei unabhängige Experimente eingesetzt (s. Abb. 19B). In der oberen Hälte dieser Teilabbildung ist ein immunogefärbter Western Blot dargestellt. Die densidometrische Auswertung der Signalstärken der C1-Untereinheit (s. Abb. 19B, untere Hälfte) ergab eine etwas größere Menge des Proteins in der subjektiven Nacht (LL 38 bis LL 46) als am subjektiven Tag. Die durchschnittlichen Signalstärken unterschieden sich um bis zu 14 %.

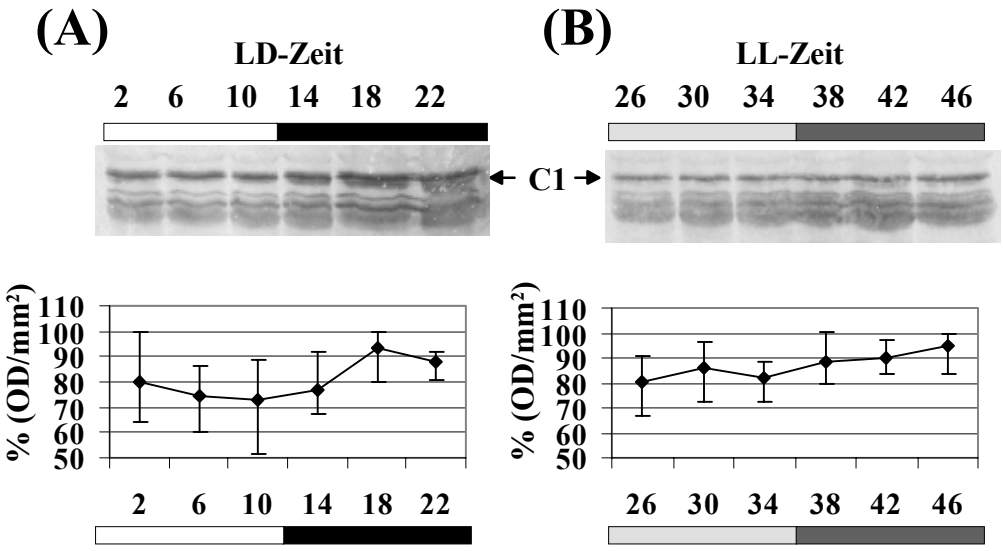


Abb. 19: Menge an CHLAMY 1-Untereinheit C1 im Tag-Nacht-Verlauf

(A) Kulturen des *C. reinhardtii*-Stammes SAG73.72 wurden unter LD-Bedingungen angezogen und alle vier Stunden (LD 2 bis LD 22) geerntet. Es wurden drei unabhängige Western Blots mit darauffolgender Immunodetektion durchgeführt. **(B)** Kulturen des *C. reinhardtii*-Stammes SAG73.72 wurden unter LD-Bedingungen angezogen, zu Beginn der Lichtphase unter Dauerschwachlicht gestellt und von LL 26 bis LL 46 geerntet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. In den oberen Hälften der Teilabbildungen ist jeweils ein exemplarischer Western Blot dargestellt. Für die unteren Darstellungen wurden die Ergebnisse aus den unabhängigen Experimenten zusammengefasst: Die Signalstärken der immunodetektierten CHLAMY 1-Untereinheit C1 wurden hierfür densidometrisch ausgewertet (Software „Tina 2.09g“) und als % optische Dichte pro mm^2 (% OD/mm^2) dargestellt. Die Fehlerbalken geben jeweils den Minimal- bzw. Maximalwert an. Bei den durchgeführten Western Blots (Gele 9 %) wurden pro Spur 50 µg Rohextrakt aufgetrennt. Für alle Experimente wurde zum Abdecken der unspezifischen Bindungsstellen Blockierungspuffer II (in PBS) verwendet. Der Nachweis der Antikörper-Bindung wurde mit Alkalischer Phosphatase durchgeführt. Das Antiserum AK1/2 wurde jeweils 1 : 100 verdünnt. Die Balken ober- und unterhalb der Zeichnungen spiegeln die Lichtverhältnisse während der Anzucht der Zellen wider: weiß steht für Licht (= Tag), schwarz für Dunkel (= Nacht), hellgrau für subjektiven Tag und dunkelgrau für subjektive Nacht.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Abundanz der CHLAMY 1-Untereinheit C1 in einem Tag-Nacht-Verlauf deuten darauf hin, dass die Menge dieses Proteins in der (subjektiven) Nacht höher zu sein scheint als am (subjektiven) Tag. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass sich die durchschnittlichen Signalstärken zwischen Minima und Maxima nur gering unterscheiden. Dies dürfte innerhalb der Fehlertoleranz einer densidometrischen Auswertung liegen. Somit kann keine eindeutige Aussage über die Abundanz der Untereinheit C1 getroffen werden.

3.8.1.2 Circadiane Schwankung in der Menge von CHLAMY 1-Untereinheit C3

Um eine Oszillation der Proteinmenge der C3-Untereinheit während eines Tages untersuchen zu können, wurden Rohextrakte aus *C. reinhardtii* (s. 2.2.3), die zu unterschiedlichen Zeiten geerntet worden waren, untersucht. Unter LD-Bedingungen wurden die Rohextrakte für vier unabhängige Experimente eingesetzt (s. Abb. 20A). In der oberen Hälfte ist das Beispiel eines Western Blots mit anschließender Immunofärbung (s. 2.2.9 und 2.2.11) dargestellt. Die restlichen drei Experimente wiesen den gleichen Rhythmus in der Proteinmenge der C3-Untereinheit auf, d.h. am Ende der Licht- und in der Dunkelphase konnte mehr Protein detektiert werden als während der restlichen Zeit. In der unteren Hälfte der Abb. 20A ist die Zusammenfassung der vier durchgeführten Versuche dargestellt. Aus der Kurve kann ersehen werden, dass die Proteinmenge vom Zeitpunkt LD 2 bis zu LD 14 ansteigt und danach wieder abnimmt. Dies steht in Korrelation mit der Bindeaktivität von CHLAMY 1, die zwischen LD 10 und LD 18 am höchsten ist (Mittag, 1996).

Untersuchungen unter Dauerschwachlicht (s. Abb. 20B) erbrachten das gleiche Ergebnis, wobei die Amplitude der Signalstärken etwas herabgesetzt war: Die Proteinmenge stieg während des subjektiven Tages und am Anfang der subjektiven Nacht an (zwischen LL 26 und LL 38), um danach wieder abzunehmen. Der dargestellte Ausschnitt eines immunogefärbten Western Blots (s. Abb. 20B oben; s. 2.2.9 und 2.2.11) soll exemplarisch für die durchgeführten drei unabhängigen Experimente stehen. Nach Bildung von Mittelwerten (s. Abb. 20B unten) der einzelnen Zeitpunkte konnte der Kurvenlauf bei allen Versuchen bestätigt werden. Der Zeitpunkt LL 46 stellt hierbei eine Ausnahme dar, da bei einem der drei Experimente die Proteinmenge stark abnahm, während bei den beiden anderen Versuchen die Menge etwas anstieg.

Die Oszillation der Proteinmenge der CHLAMY 1-Untereinheit C3 ist sowohl unter LD- als auch LL-Bedingungen die gleiche (s. Abb. 20). Die Abundanz scheint somit unabhängig vom Licht-Dunkel-Wechsel zu sein.

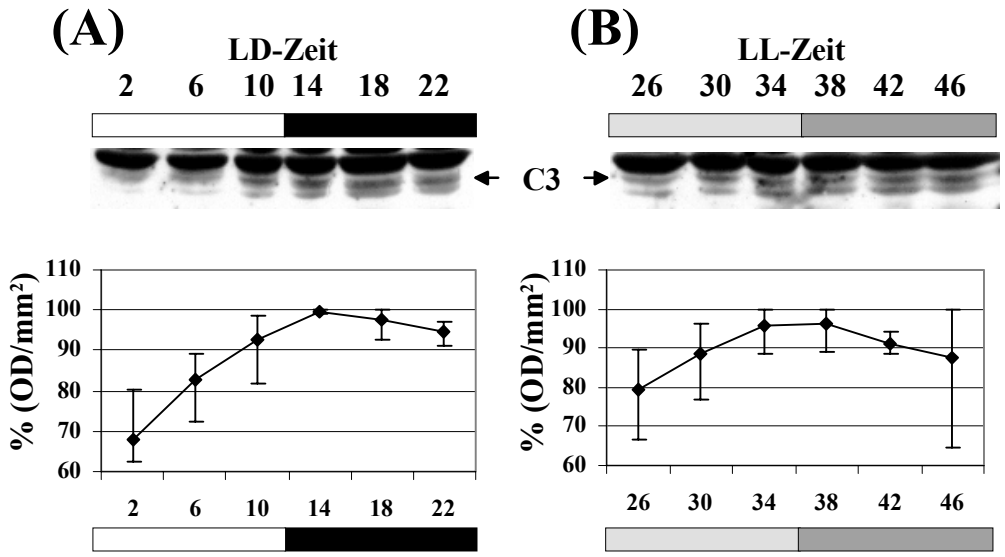


Abb. 20: Menge an CHLAMY 1-Untereinheit C3 im Tag-Nacht-Verlauf

(A) *C. reinhardtti*-Kulturen des Stammes SAG73.72 wurden unter LD-Bedingungen angezogen und alle vier Stunden geerntet (LD 2 bis LD 22). In der oberen Hälfte ist ein exemplarischer Western Blot dargestellt. Die untere Hälfte zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. **(B)** *C. reinhardtti*-Kulturen des Stammes SAG73.72 wurden unter LD-Bedingungen angezogen, zu Beginn der Lichtphase unter Dauerschwachlicht gestellt und von LL 26 bis LL 46 geerntet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die obere Hälfte zeigt einen der durchgeführten Western Blots nach Immunofärbung. Für die unteren Darstellungen wurden die Ergebnisse der immunogefärbten CHLAMY 1-Untereinheit C3 aus den unterschiedlichen Versuchen zusammengefasst. Hierfür wurden pro Zeitpunkt die optischen Dichten pro mm^2 (% OD/mm^2) bestimmt und die Mittelwerte gebildet, die dann in einer Kurve verbunden wurden. Die Fehlerbalken geben die Maximal- und Minimalwerte an. Für einen Western Blot (Gel 9 %) wurden pro Spur 50 µg Rohextrakt elektrophoretisch aufgetrennt. Das Abdecken der unspezifischen Bindungsstellen wurde mit Blockierungspuffer I (in PBS) durchgeführt. Das Antiserum AK3 wurde jeweils 1 : 100 verdünnt. Der Nachweis der Antikörper-Bindung wurde mit Meerrettich-Peroxidase durchgeführt. Der weiße Balken stellt die Lichtphase (= Tag) dar und der schwarze Balken die Dunkelphase (= Nacht). Die hell- und dunkelgrauen Balken stehen für subjektiven Tag und subjektive Nacht.

3.9 Identifizierung und Analyse der *chlamy 1*-cDNS-Sequenzen

3.9.1 Sichtung einer Expressions-Genbank aus *C. reinhardtii* mit Peptid-Antiseren

Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben (s. 3.5) wurde, war es nicht möglich, die *chlamy 1*-Gene durch Sichtung einer *C. reinhardtii*-Genbank mit degenerierten Oligonukleotiden zu identifizieren. Durch die Produktion von Antikörpern, die gegen Peptide aus verschiedenen CHLAMY 1-Untereinheiten gerichtet waren (s. 2.1.13.1), war die Sichtung einer Expressions-Genbank aus *C. reinhardtii* mit diesen Antiseren möglich.

Für eine Durchmusterung der Genbank mit Antiseren (s. 2.2.20.2) war es für die Bindung der Antikörper nötig, die cDNS-Fragmente zu exprimieren. Dies wurde durch eine IPTG-Stimulierung der cDNS-Fragmente in den Phagen erreicht (s. 2.2.20.2), wodurch in jedem Phagen eine hohe Kopienzahl des exprimierten Proteins vorlag. Um die Gene für alle Untereinheiten von CHLAMY 1 isolieren zu können, wurde die Sichtung mit beiden Antiseren (AK1/2 und AK3) in jeweils drei Sichtungsrunden durchgeführt. Für die primäre Sichtung wurden die nicht-gereinigten Antiseren verwendet, um Phagen-Bereiche zu identifizieren, die eine positive Reaktion aufwiesen. In der sekundären Runde wurden diese positiven Bereiche einerseits mit den nicht-gereinigten Antiseren und andererseits mit den Antiseren, die keine spezifischen Antikörper enthielten (AK1/2^{-} und AK3^{-}; s. 3.7.2), überprüft. Für die tertiäre Runde der Sichtung wurde jeweils ein positiver und ein negativer Plaque der zweiten Runde mit beiden Antiseren (AK1/2 und AK1/2^{-} bzw. AK3 und AK3^{-}) getestet. Die Phagen, die nach der dritten Runde ein positives Signal zeigten, wurden einzeln kontrolliert: Durch eine *in vivo*-Exzision (s. 2.2.20.3) wurde aus dem Phagengenom das Plasmid inklusive des cDNS-Fragments ausgeschnitten. Die isolierten Plasmide wurden sequenziert und nach Translation in die jeweilige Aminosäure-Sequenz auf die Anwesenheit der CHLAMY 1-Peptide hin untersucht.

Die Ergebnisse der drei Sichtungsrunden sind in Tab. 9 zusammengefasst: Für die primäre Sichtung der Expressions-Genbank wurden mit beiden Antiseren jeweils ca. 1 Million Phagen getestet. Hierunter konnten 0,009 % (81 Phagen bei AK1/2) bzw. 0,004 % (43 Phagen bei AK3) als (teilweise schwach) positiv identifiziert werden. In der zweiten Runde wurde über die Hälfte dieser Phagen jedoch als negativ erkannt. Somit wurden für die tertiäre Sichtung noch je 25 bzw. 21 (AK1/2 bzw. AK3) positive und negative Phagen aus der zweiten Runde eingesetzt. Am Ende konnten mit dem Antiserum AK1/2 18 Phagen und mit dem Antiserum AK3 16 Phagen identifiziert werden, die als wahrscheinlich Positiv anzusehen waren. Von acht bzw. neun (AK1/2 bzw. AK3) Phagen wurden die Plasmide, die ein cDNS-Fragment aus *C. reinhardtii* trugen, durch *in vivo*-Exzision isoliert (s. 2.2.20.3).

Tab. 9: Durchmusterung einer Expressions-Genbank mit Antiseren gegen CHLAMY 1

Sichtung mit Antiserum gegen CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2		
	Anzahl überprüfter Phagen	davon positiv
primär	ca. 933.000	81
sekundär	81	25
tertiär	je 25 Positive und Negative	18
Sichtung mit Antiserum gegen CHLAMY 1-Untereinheit C3		
	Anzahl überprüfter Phagen	davon positiv
primär	ca. 1.041.000	43
sekundär	43	21
tertiär	je 21 Positive und Negative	16

Um die Größen der cDNS-Fragmente zu bestimmen, wurden die Plasmide mit Restriktionsenzymen geschnitten und die Fragmente auf einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt (s. Abb. 21; s. 2.2.27.5.1 und 2.2.27.6). Die halblogarithmische Auswertung ergab cDNS-Fragmente zwischen 1900 und 3800 Bp bei den Klonen für die CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2. Für die Untereinheit C3 wurden Klone mit cDNS-Fragmenten von 1300 bis 4200 Bp isoliert.

Durch Sequenzierungen von fünf bzw. acht (AK1/2 bzw. AK3) cDNS-Fragmenten konnten zwei Plasmide identifiziert werden, die, nach Übersetzung in Aminosäuren, mehrere Peptide der CHLAMY 1-Untereinheiten im gleichen Leserahmen trugen. Der Klon, der für die Untereinheiten C1 und C2 kodiert (Gen *chlamy 1-C1/2)*, trägt ein cDNS-Fragment mit einer Länge von 2069 Bp (s. Abb. 21 und Abb. 22) und wurde mit dem Namen pCS30 bezeichnet. Für den Klon der Untereinheit C3 (Gen *chlamy 1-C3*; s. Abb. 21 und Abb. 24), der ein cDNS-Stück von mindestens 2642 Bp trägt, wurde der Name pCS31 gewählt. Die Sequenzen der cDNS-Fragmente und der daraus resultierenden Proteine sind im Anhang dieser Arbeit verzeichnet.

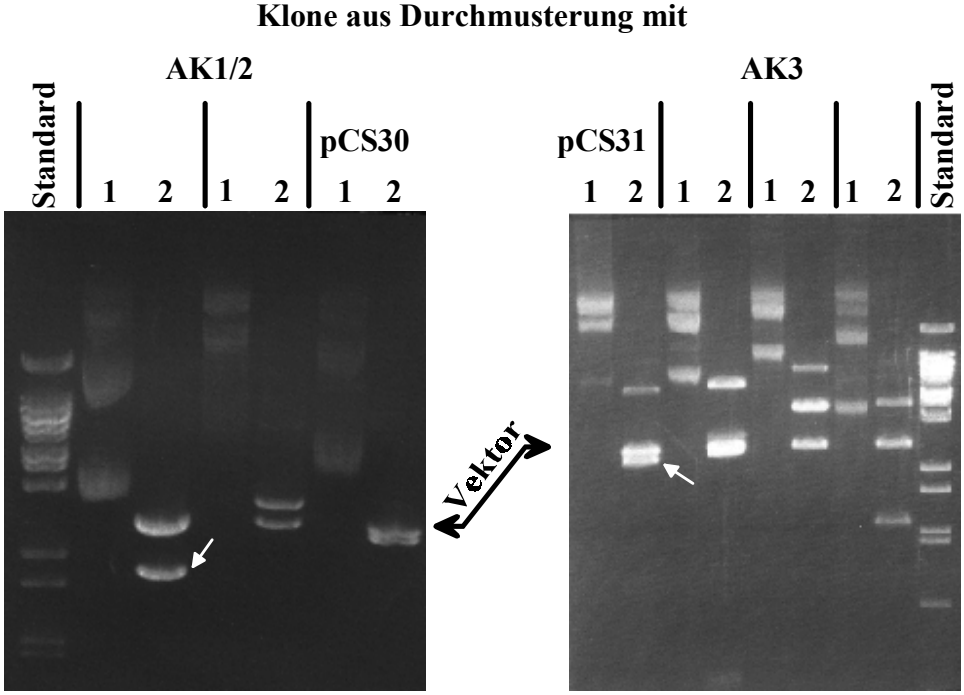


Abb. 21: Positive Klone der Expressions-Genbank-Sichtung

Die positiven Klone aus der tertiären Sichtung der Expressions-Genbank aus *C. reinhardtii* mit den Antiseren AK1/2 und AK3 wurden durch *in vivo*-Exzisionen aus dem Phagengenom isoliert. Die Plasmid-DNS (1 µg) wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Xho*I (je 3 Einheiten) geschnitten, auf einem 0,8 %igem Agarosegel aufgetrennt, die DNS durch Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert. Die weißen Pfeile weisen auf die cDNS-Fragmente der Klone pCS30 und pCS31 hin, die für die CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 bzw. C3 kodieren. Die Bezeichnung „Vektor" über dem Pfeil deutet auf die Laufhöhe des Vektoranteils des Plasmids nach dem Restriktionsverdau hin. Als Standard wurden 1,5 µg Lambda DNS/*Bst*EII verwendet. Die Beschriftung „1" steht für die nicht-verdauten Plasmide, „2" steht für die mit *Eco*RI + *Xho*I verdauten Plasmide.

3.9.2 Sequenzanalyse der für die CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 kodierenden cDNS-Sequenz *chlamy 1-C1/C2* und des Proteins CHLAMY 1-C1/2

3.9.2.1 Analyse des Teilklons pCS30

Nach Translation des cDNS-Fragments von pCS30 in den Leserahmen +3 konnten die Sequenzen der CHLAMY 1-Peptide C1-13, C1-26, C2-7, C2-8/C1-16 und C2-2 identifiziert werden (s. Abb. 22B). An dieser Stelle soll noch nochmals darauf hingewiesen werden, dass die beiden Peptide C1-16 und C2-8 einen Bereich mit 100 %iger Aminosäure-Übereinstimmung aufwiesen (s. Tab. 8). Bei der Sequenzierung der CHLAMY 1-Peptide aus den Untereinheiten C1 und C2 waren an einigen Positionen zwei oder drei mögliche Aminosäuren angegeben worden (s. Tab. 8):

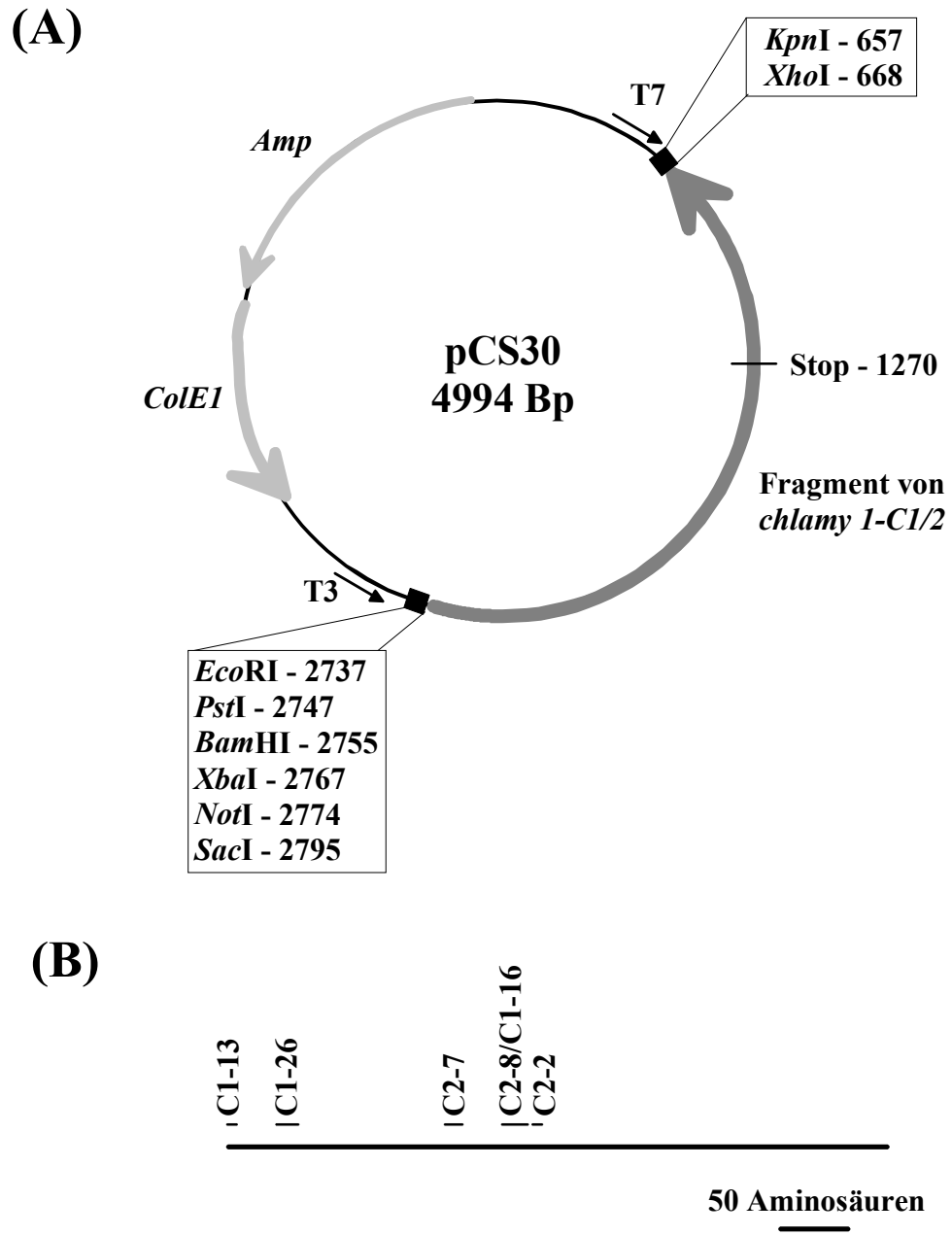


Abb. 22: Darstellung von pCS30

pCS30 trägt ein 2069 Bp langes cDNS-Fragment als Insert, das für die CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 (*chlamy 1-C1/*2) kodiert. Es handelt sich dabei nicht um einen Volllängenklon. **(A)** Restriktionskarte des Plasmids pCS30. Es sind nur die Schnittstellen in der „multiple cloning site" des Vektors angegeben. *Amp* = Gen für Ampicillin-Resistenz; *Col*E1 = Ursprung der Plasmidreplikation. **(B)** Translation des cDNS-Fragments in den Leserahmen +3. Die Positionen der einzelnen CHLAMY 1-Peptide sind maßstabsgetreu über der als Strich dargestellten Sequenz angegeben.

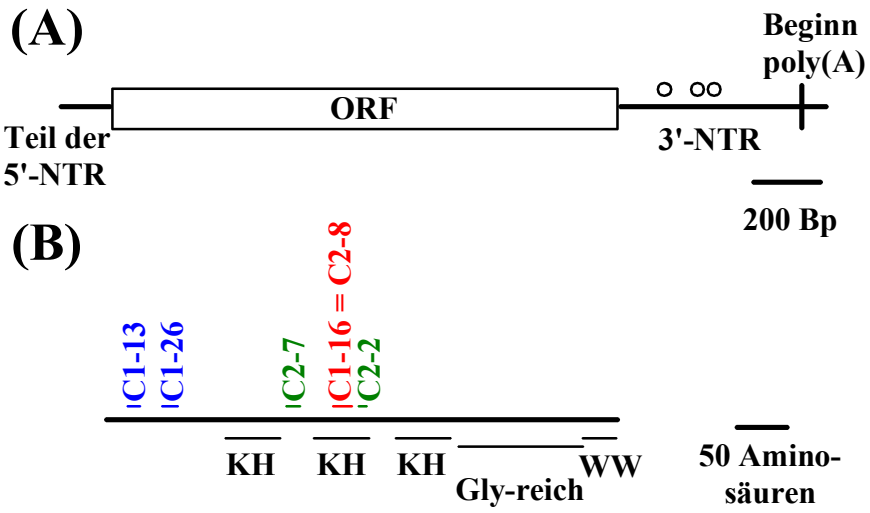
Peptid C1-13 liegt am N-Terminus der Proteinsequenz in pCS30, nur die sieben C-terminalen Aminosäuren sind Bestandteil des isolierten Klons. Die zweite Aminosäure des Peptids C1-16 wurde in der Peptid-Sequenzierung als Isoleucin oder Valin angegeben. Im Peptid C2-8 wurde an dieser Position ein Leucin sequenziert. Nach der Analyse des Klons wurde die Aminosäure Leucin an dieser Position bestätigt. Beim Peptid C1-26 konnte in der Peptid-Sequenzierung die Aminosäure an Position sechs (Threonin) nicht eindeutig identifiziert werden; durch die Analyse des Klons wurde sie in ein Alanin berichtigt. Die restlichen Aminosäuren dieses Peptids als auch die Sequenzen der restlichen Peptide (s. Tab. 8) konnten ebenfalls im translatierten cDNS-Fragment von pCS30 gefunden werden (s. Abb. 22B).

Bei pCS30 handelte es sich nicht um einen Volllängenklon für *chlamy 1-C1/2*, da das N-terminale Ende des bekannten Peptids C1-13 fehlte. Das 3'-Ende der cDNS-Sequenz ist hingegen vollständig vorhanden: Im richtigen Leserahmen (+3) wurde ein Stop-Codon (Basen 1467-1469 des cDNS-Fragmentes) gefunden, der Klon trug einen poly(A)-Schwanz und es konnten Polyadenylierungssignale identifiziert werden (s. nächstes Kapitel). Die 3'-NTR, vom Stop-Codon bis zum Beginn des poly(A)-Schwanzes, hat eine Länge von 580 Bp.

3.9.2.2 Computergestützte Analyse von *chlamy 1-C1/2*

Im Rahmen der Sequenzierung des *C. reinhardtii*-Genoms wurden bereits 112489 EST-Sequenzen („Expressed Sequence Tag"; Asamizu *et al*., 1999 und 2000) veröffentlicht (Stand 01.03.2002). Mit der cDNS-Sequenz des Klons pCS30 wurde eine Homologie-Suche gegen die EST-Datenbank von *C. reinhardtii* durchgeführt. Hierbei konnten zwei Klone identifiziert werden (Acc.No. BI998329 und AV644422), die eine 98 bzw. 96 %ige Homologie zur 3'-NTR von *chlamy 1-C1/2* aufwiesen. Ferner wurden 98 bzw. 92 %ige Homologien zu den EST-Klonen BI721495 und BG860365 identifiziert, die sich am 3'Ende des ORF und in der 3'-NTR von *chlamy 1-C1/2* befanden. Ein Abgleich dieser vier EST-Klone mit der cDNS-Sequenz aus pCS30 zeigte, dass sich die Homologien auf den nicht-kodierenden Strängen der EST-Klone und dem kodierenden Strang von pCS30 befanden. Zusätzlich konnte ein *C. reinhardtii* EST-Klon (Acc.No.

BI721496) gefunden werden, der im kodierenden Strang eine Homologie zum 5'-Ende des Fragments aus pCS30 aufwies. Dieser Klon hatte eine Länge von 579 Bp. Die Homologie zu pCS30 erstreckte sich von Base 198 bis zum Ende des EST-Klons, wobei eine Lücke in der Ausrichtung der beiden Sequenzen zu finden war: Zwischen Base 523 und 524 des EST-Klons befand sich in der Sequenz von pCS30 ein Adenin. Dieses konnte als richtig erachtet werden, da es in vier unabhängigen Sequenzierungen von pCS30 als solches identifiziert wurde. Einen weiteren Hinweis auf die Richtigkeit des Adenins an dieser Stelle gab eine Auswertung der Sequenz, wenn man dieses Nukleotid streicht: Es würde 12 Basen später zu einem Stop der Translation kommen, was in einem zu kurzen Protein (nur 13,97 kDa) resultieren würde. Die Sequenz von *chlamy 1-C1/2* konnte durch den identifizierten EST-Klon somit um 197 Basen in Richtung 5' erweitert werden. Die zusammengesetzten Klone ergaben eine 2266 Bp lange Sequenz, die im Anhang dieser Arbeit verzeichnet ist. Eine Translation in den Leserahmen +2 ermöglichte die Identifikation aller bekannten CHLAMY 1-Peptide (s. Abb. 23B und C). Wie bereits erwähnt, waren die fünf N-terminalen Aminosäuren des CHLAMY 1-Peptids C1-13 nicht Bestandteil des durch Genbank-Sichtung erhaltenen Klons pCS30 (s. 3.9.2.1). Nach Zusammensetzen der beiden Sequenzen konnten die fehlenden Aminosäuren identifiziert werden (s. Abb. 23C und Anhang). Die zweite Aminosäure von C1-13 wurde in der Peptid-Sequenzierung als Valin oder Glutamat angegeben, sie wurde jedoch nach Translation des EST-Klons in ein Aspartat abgeändert. Die Analyse des Klons zeigte, dass im Leserahmen +2 ein Stop-Codon (Basen 128–130) liegt, das sich 5' von allen bekannten CHLAMY 1-Peptiden befindet. Direkt dahinter (Basen 131–133) liegt ein Start-Codon, was für den Beginn des ORF an dieser Stelle spricht (Kozak, 1991; Joshi *et al.*, 1997). Somit konnte der gesamte ORF von *chlamy 1-C1/2* identifiziert werden. Er hat eine Länge von 1533 Basen und einen G/C-Gehalt von 70,64 %. Dies steht im Einklang mit der Analyse von 372 kodierenden Regionen aus *C. reinhardtii*, bei der ein durchschnittlicher G/C-Gehalt von 65,73 % errechnet wurde (www.kazusa.or.jp/codon/).



(C)

```
1   MADHEEPPPGTYDGEERAPDVETGNSHLPPPPELHAAPQE 40
41  HGADQGAVLDAGRSRAEMLAAIFAAQAGANVVPSDPTGHK 80
81  RKLDDDEYHDAPDSKRPASMAFGDGSGALPPPPPLGADAP 120
121 VAMETIMCPPDKVGRVIGRAGATIRDLEASTGTRIQVDHK 160
161 APGDKPVTISGRADEVERAKRQVLDLISGHGSDAAPAPGE 200
201 AQKTLECPQGIVGRVIGRGGETIRTLQQASGAHILVNQDF 240
241 PEGAARQITISGSQDAVDRAASMVQELIGGEHANTSQVVQ 280
281 RFGVGSTEVLECPKTMVGRIIGKGGETIKDLQKRFNASIQ 320
321 IDQSAMPCKVTITGPSHTIASARRAIEDLIRSTGPPPGGM 360
361 GMGGGSRPPYGAPYGQQYPGGAGGYGGGYGGYGAPGGYGA 400
401 PGGYPGYGGYGGYPGGAPYGGYNAGGYGAPGAQSSDPYGA 440
441 GSSSYNYGGAGGGSSSAAPGAPGSTPAAPGTNGSGSGGSS 480
481 PWQALQDDQGRTYYYNSTTGVSQWERPADMP          511
```

Abb. 23: Analyse von *chlamy 1-C1/2* und CHLAMY 1-C1/2

(A) Darstellung von *chlamy 1-C1/2*. Der ORF beginnt bei Base 131 und hat eine Länge von 1533 Basen. In der 580 Basen langen 3'-NTR konnte drei Polyadenylierungssignale für *C. reinhardtii* identifiziert werden (dargestellt durch ○). Der poly(A)-Schwanz beginnt bei Base 2244 und hat eine Länge von 23 Adeninen in pCS30. **(B)** Übersichtszeichnung von CHLAMY 1-C1/2. Die Positionen der einzelnen CHLAMY 1-Peptide sind maßstabsgetreu über der als Strich dargestellten Sequenz angegeben. Unterhalb sind die Stellen im Protein angegeben, die Homologien zu Protein-Domänen aufweisen. KH = Domäne für RNS-Bindung; WW = Domäne für Protein-Protein-Interaktion, Gly-reich = Glycin-reiche Region. **(C)** Aminosäure-Sequenz von CHLAMY 1-C1/2. Die farbig unterlegten Aminosäuren deuten auf die Positionen der bekannten Peptide hin.

Das Stop-Signal des ORF liegt bei den Basen 1664-1666, der poly(A)-Schwanz beginnt bei Base 2244 und hat eine Länge von 23 Nt in pCS30 (s. Abb. 23A). In der 580 Bp langen 3'-NTR, konnten drei Polyadenylierungssignale für *C. reinhardtii* mit der Sequenz tgtga identifiziert werden (Basen 1824-1828, 1919-1923 und 1928-1932; s. Abb. 23A und Anhang; Silflow *et al.*, 1985; Mayfield *et al.*, 1989). Die bisher identifizierten 130 Bp vor dem Start-Codon stellen wahrscheinlich nicht die ganze Länge der 5'-NTR dar (Pesole *et al*., 2001).

Die Translation der Sequenz ab dem Start-Codon bei Base 131 bis zum Stop-Codon bei Base 1664 ergibt ein Protein mit einer Länge von 511 Aminosäuren (s. Abb. 23Bund C), das eine errechnete Molekularmasse von 51,73 kDa hat. Bei Betrachtung der Anordnung der sequenzierten Peptide in CHLAMY 1-C1/2 fällt auf, dass sowohl die für die C1- als auch die für die C2-Untereinheit spezifischen Peptide in enger Nachbarschaft zueinander liegen (s. Abb. 23B und C).

Unter Verwendung verschiedener Suchprogramme wurde CHLAMY 1-C1/2 auf das Vorhandensein von konservierten Protein-Domänen hin untersucht. Die hierzu verwendeten Programme sind im Anhang dieser Arbeit verzeichnet. Dabei konnte von Aminosäure 354-478 ein Bereich mit einer hohen Anzahl an Glycin (insgesamt 51 Stück) identifiziert werden (s. Abb. 23B).

Ferner konnte am C-terminalen Ende des Proteins (Aminosäuren 477–509) eine Homologie zur WW-Domäne (= WWP- oder rsp5-Domäne; André und Springael, 1994; Sudol *et al.*, 1995; www.bork.embl-heidelberg.de/Modules/ww-gif.html) entdeckt werden (s. Abb. 23B). Die Konsensus-Sequenz dieser Domäne hat eine Länge von 33 Aminosäuren (smart Acc.No. SM0456): Die am höchsten konservierten Aminosäuren sind zwei Tryptophane, die 20–22 Aminosäuren auseinanderliegen, zusätzlich dazu eine Wiederholung von drei aromatischen Aminosäuren zwischen den beiden erwähnten Tryptophanen und ein Prolin, das drei Aminosäuren nach dem weiter am C-Terminus gelegenen Tryptophan liegt. Diese hochkonservierten Aminosäuren konnten im Protein CHLAMY 1-C1/2 identifiziert werden: Die beiden Aminosäuren 482 und 504 sind Tryptophane, Aminosäure 507 ist ein Prolin und zwischen den Tryptophanen befindet sich ein Bereich (Aminosäuren 493-495) mit drei Tyrosinen in Folge (s. Anhang). WW-Domänen sind für Protein-Protein-Interaktionen zuständig und binden an Prolin-

haltige Sequenzen (Sudol *et al*., 2001). Zur Gruppe der WW-Domänen tragenden Proteine gehören Proteine mit verschiedenen Funktionen (Hofmann und Bucher, 1995). Beispiele sind FCAgamma aus *A. thaliana* (= „flowering time control protein"; Acc.No. CAB05391), NEDD-4 in der Maus (= „NPC-expressed, developmentally down-regulated gene 4"; Acc.No. P46935) und RSP5 in der Hefe (= „ubiquitin-protein ligase RSP5"; Acc.No. P39940).

Weiterhin konnten an drei Stellen des Proteins (Aminosäuren 120–187; 200–268 und 284–350) Homologien zur KH-Domäne identifiziert werden (s. Abb. 23B). Dies ist eine Domäne, die in der Bindung an RNS oder einzelsträngige DNS eine Rolle spielt und mehrmals in einem Protein vorkommen kann (Burd und Dreyfuss, 1994; Lewis *et al.*, 2000). Die Konsensus-Sequenz (smart Acc.No. SM0322) umfaßt 67 Aminosäuren. Ein Abgleich dieser Konsensus-Sequenz mit den drei Regionen in CHLAMY 1-C1/2 (KH-1 bis KH-3) zeigte Homologien von 62,7 %; 52,2 % und 49,3 % (s. Anhang). Beispiele für Proteine mit KH-Domänen sind das PBP2 aus Hefe (= „Pab1p-binding protein 2"; Acc.No. P38151), das humane FMRP (= „fragile X mental retardation protein"; Acc.No. Q06787) oder Vigilin aus dem Huhn (Acc.No. P81021).

Die Sequenz des Proteins CHLAMY 1-C1/2 wies weiterhin einige Bereiche auf, die auf eine mögliche Glykosylierung (Prosite Acc.No. PS00001) oder Phosphorylierung von einzelnen Aminosäuren hinweisen (genaue Positionen s. Anhang). Es konnten Erkennungsstellen für folgende Kinasen identifiziert werden: Protein-Kinase C (Prosite Acc.No. PS00005), Casein-Kinase II (Prosite Acc.No. PS00006) und Tyrosin-Kinase (Prosite Acc.No. PS00007).

Sowohl mit der 2266 Bp langen Sequenz von *chlamy 1-C1/2* als auch mit dem 511 Aminosäure langem Protein CHLAMY 1-C1/2 wurden Homologie-Suchen in *C. reinhardtii* und anderen Organismen (Stand 14.02.02) durchgeführt. Eine Auflistung der hierzu verwendeten Programme kann im Anhang dieser Arbeit nachgelesen werden. Auf DNS-Ebene konnten in keinem Organismus signifikante Homologien identifiziert werden. Die Suche auf Protein-Ebene zeigte in *C. reinhardtii* ebenfalls keine signifikante Übereinstimmung zu Proteinen mit bekannter Funktion. In anderen Organismen konnten Homologien zu Proteinen gefunden werden, die an Nukleinsäuren binden können. Dabei handelt es sich um

sogenannte FUSE-Bindeproteine (= „far upstream element“-Bindeproteine = FBP; Duncan *et al*., 1994). Die mit 43 % höchste Homologie, die sich über 333 Aminosäuren erstreckte, konnte zu einem FBP in der Maus entdeckt werden (Acc.No. NP_476513). Hierbei soll darauf hingewiesen werden, dass sich die Homologien zu verschiedenen FBPs auf die Bereiche der KH-Domänen beschränkten. Eine solche Einschränkung von Homologien auf Bereiche von Protein-Domänen wurde vor kurzem auch bei 26 KH-Domänen tragenden Proteinen aus *A. thaliana* gezeigt (Lorković und Barta, 2002).
Im Anhang dieser Arbeit sind sowohl die Sequenzen von *chlamy 1-C1/2* und CHLAMY 1-C1/2, als auch Abgleiche mit den untersuchten Protein-Domänen und den Erkennungsstellen für die oben erwähnten Enzyme dargestellt.

3.9.3 Sequenzanalyse der für die CHLAMY 1-Untereinheit C3 kodierenden cDNS-Sequenz *chlamy1-C3* und des Proteins CHLAMY 1-C3

3.9.3.1 Analyse des Klons pCS31

Nach Übersetzung des cDNS-Fragments von Klon pCS31 in den Leserahmen +3 war es möglich, alle bereits bekannten Peptide (s. Tab. 8) der CHLAMY 1-Untereinheit C3 zu identifizieren. Die Positionen der einzelnen Peptide im Protein von Klon pCS31 können aus Abb. 24B ersehen werden. Das cDNS-Fragment des Klons pCS31 hat eine Länge von mindestens 2642 Bp (s. Abb. 24A). Die genaue Länge konnte nicht bestimmt werden, da die Polymerase bei der Sequenzierung im poly(A)-Schwanz nach 73 Adeninen abbrach. Bei den Basen 1125-1127 des cDNS-Fragments (s. Abb. 24A) konnte ein Stop-Codon identifiziert werden. In der darauffolgenden 3’-NTR konnten zwei Polyadenylierungssignale für *C. reinhardtii* gefunden werden (s. nächstes Kapitel). N-terminal von den bekannten CHLAMY 1-Peptiden konnte ein mögliches Start-Codon (Aminosäure 38; s. Abb. 24B) für CHLAMY 1-C3 identifiziert werden. Ausgehend von diesem Start hätte das Protein eine errechnetes Molekularmasse von 33,96 kDa. Diese stimmt nicht der früher (s. 3.3 und 3.4) bestimmten Größe von 44 kDa überein, was dafür sprach, dass es sich bei pCS31 nicht um einen Volllängenklon handelte.

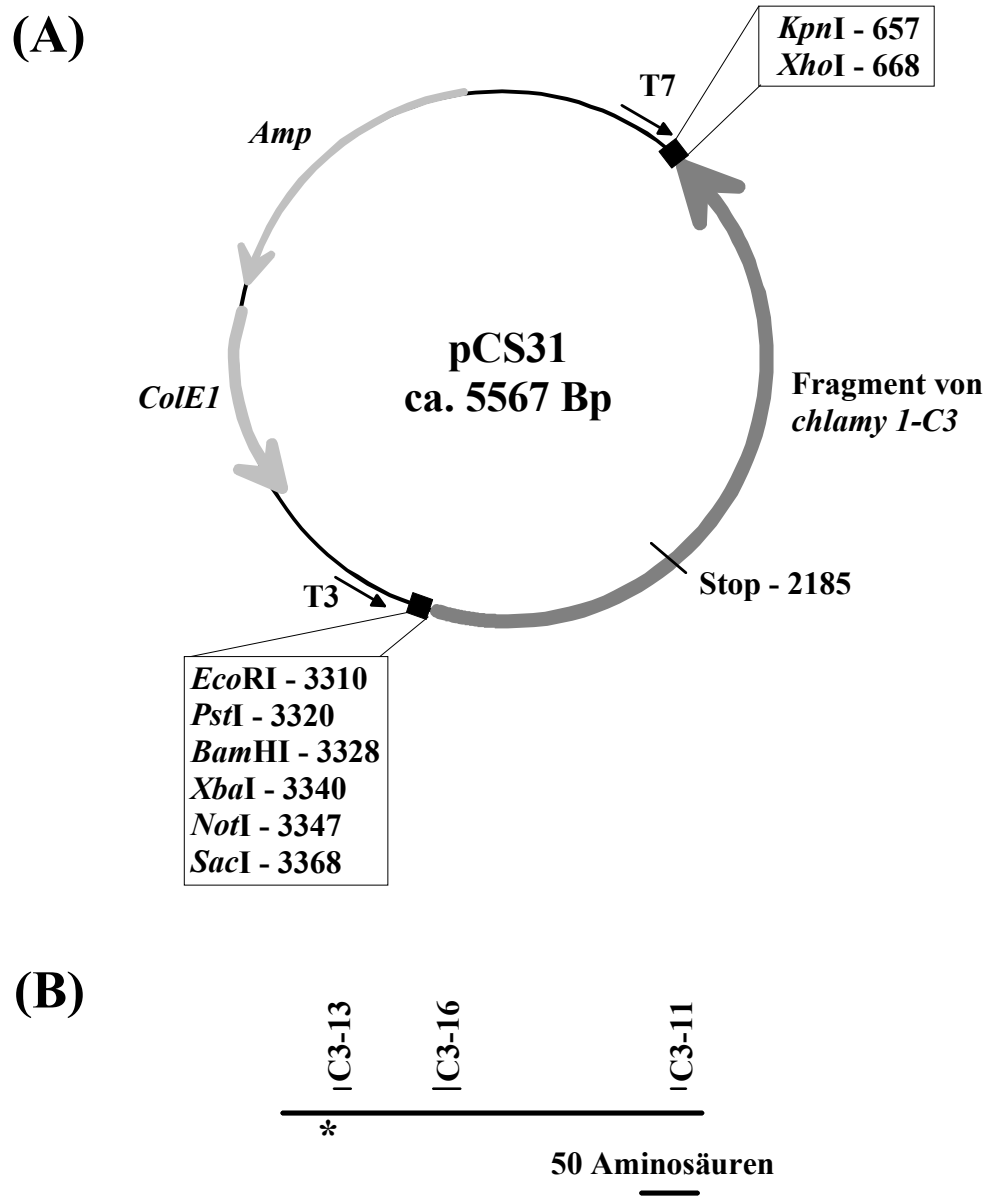
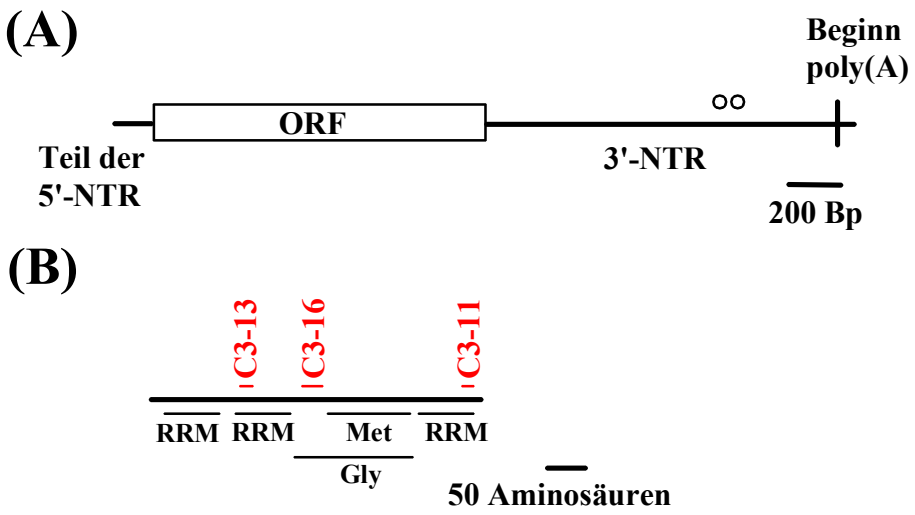


Abb. 24: Darstellung des Plasmids pCS31

pCS31 trägt ein cDNS-Fragment aus *C. reinhardtii* von mindestens 2642 Bp. Die genaue Länge konnte nicht bestimmt werden, da die Polymerase während der Sequenzierung des poly(A)-Schwanzes abbrach. Das Fragment repräsentiert einen Teil des Gens, das für die CHLAMY 1-Untereinheit C3 kodiert (*chlamy 1-C3*). **(A)** Restriktionskarte des Plasmids pCS31. Es sind nur die Restriktionsschnittstellen in der „multiple cloning site" des Vektors angegeben. *Amp* = Gen für Ampicillin-Resistenz; *Col*E1 = Ursprung der Plasmidreplikation. **(B)** Das cDNS-Fragment wurde in den Leserahmen +3 übersetzt. Die identifizierten CHLAMY 1-Peptide sind maßstabsgetreu über der als Strich dargestellten Proteinsequenz angegeben. Das Symbol * kennzeichnet ein mögliches Start-Codon für das Protein.

3.9.3.2 Computergestützte Analyse von *chlamy 1-C3*

Mit der cDNS-Sequenz des Klons pCS31 wurde eine Homologie-Suche gegen die EST-Datenbank von *C. reinhardtii* durchgeführt. Hierdurch wurden drei Klone identifiziert (Acc.No. AV386912; BI873525 und BE351729), deren nicht-kodierende Stränge Homologien (100 % und zweimal 99 %) zur 3'-NTR des cDNS-Fragments aus pCS31 aufwiesen. Zusätzlich konnte in der 3'-NTR eine 99 %ige Übereinstimmung zum kodierenden Strang des EST-Klons mit der Acc.No. BI874105 erkannt werden. Weiterhin konnten vier EST-Klone (Acc.No. AV641734; AV643792; AV395676 und AV394474) aus *C. reinhardtii* identitiziert werden, deren kodierende Stränge eine Homologie zum 5'-Ende der cDNS-Sequenz aus pCS31 aufwiesen. Diese Klone hatten unterschiedliche Längen (453-506 Bp). In ihren überlappenden Bereichen wiesen sie eine 99,76 %ige Homologie auf. Klon AV641734 hatte eine Länge von 506 Bp und zeigte nach Zusammensetzen mit der pCS31-Sequenz die größte Verlängerung der Sequenz in 5'-Richtung. Diese betrug 337 Basen, wodurch die Gesamtsequenz eine Länge von 2979 Bp erreichte. Die Auflistung der vier EST-Klone mit der cDNS-Sequenz aus pCS31 zeigte in ihrem Homologie-Bereich, der 170 Bp lang ist, zwei Fehler: Base 479 der Gesamtsequenz ist im EST-Klon AV641734 ein Guanin, in pCS31 und den EST-Klonen AV643792 und AV395676 jedoch ein Thymin. Durch ein Guanin an dieser Stelle würde sich die im Peptid C3-13 befindende Aminosäure von einem Valin in ein Glycin ändern. Zusätzlich ist Base 494 in pCS31 ein Guanin, im EST-Klon AV641734 ist an dieser Stelle jedoch eine Lücke. Durch diese würde sich der Leserahmen des Proteins verändern und es käme nach 34 Aminosäuren zu einem Stop. Das daraus resultierende Protein hätte eine Molekularmasse von 16,16 kDa und wäre somit zu klein. Auch bei dieser Sequenz ist davon auszugehen, dass die Nukleotide von pCS31 die richtigen sind, da sie dreimal in dieser Form sequenziert wurde. Die Gesamtsequenz von *chlamy 1-C3* ist im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.



(C)

```
1   MVMGMQKPEAVCAEPKVFVGQVPHEVTQDQIFALFSKYGT 40
41  IKKCALITGPDGRSKGCAMVTYDRWAEAELAIEHENGTAN 80
81  LGGGRTLLVKFADPPRGRGDGPVMGVAPKKLFVGQIPQHT 120
121 TEQHIRSLFAPFGNITDVHVLNKGNAPGCAFVTYERWAHA 160
161 EAAMLSLNGQTLIEGATTPMVVKFADAKVQDMGGQKRGFG 200
201 AVEGAPPGVFPGAAAGPGGNKRTFTGAGAPGAMGMAGMAA 240
241 AGYNPYAAAAAMGYDMSTMAAMGYGNMGMMAGMAGMQQGI 280
281 PGQGGQQGMGGGAMGGAGAMGGAQGLGAGGMGGMGGMGGM 320
321 GGGLMAGMNMMGLGMGGGMGMNKPGLQEGPKAWKLFIGQV 360
361 PFEANETDLWPIFSPLGNILELVILRHQGKSKGCAFLTYE 400
401 NRTDAEKAIRTLDSQVSVPSDPRGRLLTVKYANSAAAAAM 440
```

Abb. 25: Analyse von *chlamy 1-C3* und CHLAMY 1-C3

(A) Darstellung von *chlamy 1-C3*. Die 5'-NTR hat eine Länge von mindestens 141 Bp. In der 1445 Bp langen 3'-NTR konnten zwei Polyadenylierungssignale für *C. reinhardtii* (dargestellt durch ○) identifiziert werden. Der poly(A)-Schwanz hat durch die Sequenzierung von pCS31 eine Länge von mindestens 73 Basen. **(B)** Übersichtszeichnung von CHLAMY 1-C3. Die Positionen der einzelnen CHLAMY 1-Peptide sind über der Sequenz maßstabsgetreu angegeben. Unterhalb sind die Regionen markiert, die Homologien zu Protein-Domänen aufweisen. RRM = RNS-Bindedomäne; Gly = Glycin-reiche Region; Met = Methionin-reiche Region. **(C)** Aminosäure-Sequenz von CHLAMY 1-C3. Die farbig unterlegten Aminosäuren deuten auf die Positionen der bekannten Peptide hin

Durch Translation von *chlamy 1-C3* in den Leserahmen +1 konnten die bereits bekannten CHLAMY 1-Peptide (s. Abb. 25B und C) identifiziert werden. N-terminal von diesen Peptiden konnte im Leserahmen ein mögliches Start-Codon (Basen 142-144; s. Anhang) identifiziert werden, das in gutem Kozak-Kontext für die Translation vorliegt (Kozak, 1991; Joshi *et al*., 1997). Ein Translationsstart für CHLAMY 1-C3 vor diesem Start-Codon ist nicht möglich, da nur sechs Nukleotide in 5'-Richtung entfernt ein Stop-Codon liegt. Das nächste Stop-Codon im Leserahmen liegt bei Base 1462. Somit hat der ORF eine Länge von 1320 Bp mit einem G/C-Gehalt von 68,18 %, welcher mit dem durchschnittlichen G/C-Gehalt in *C. reinhardtii* (s. 3.9.2.2) in Einklang steht. In der 1445 Bp langen 3'-NTR konnten zwei Polyadenylierungssignale für *C. reinhardtii* mit der Sequenz tgtga identifiziert werden (Basen 2352–2356 und 2420–2424; s. Abb. 25A und Anhang; Silflow *et al.*, 1985; Mayfield *et al*., 1989). Der poly(A)-Schwanz beginnt bei Base 2906 und hat eine Länge von mindestens 73 Adeninen (s. Abb. 25A). Die bisher identifizierten 141 Bp vor dem Start-Codon stellen wahrscheinlich nicht die gesamte Länge der 5'-NTR dar (Pesole *et al*., 2001).

Die Translation des ORF von *chlamy 1-C3* ergibt ein Protein mit einer Länge von 440 Aminosäuren und einer errechneten Molekularmasse von 45,00 kDa (s. Abb. 25B und C). Unter Verwendung verschiedener Such-Programme (Verzeichnis s. Anhang) wurde CHLAMY 1-C3 auf das Vorhandensein von Protein-Domänen hin untersucht. Dabei konnten Regionen identifiziert werden, die reich an den Aminosäuren Glycin bzw. Methionin sind (s. Abb. 25B). In der Glycin-reichen Region, die zwischen den Aminosäuren 193–349 liegt, befinden sich insgesamt 57 Glycine. Im Bereich von Aminosäure 233–341 konnten 26 Methionine entdeckt werden. Für die Methionin-reiche Domäne im Protein SRP54 (= „signal recognition particle 54 kDa"; 24 Methionine zwischen Aminosäuren 296-504; Bernstein *et al*., 1989) wurde bereits eine Aufgabe in der RNS-Bindung und in der Bindung an Signalsequenzen von anderen Proteinen nachgewiesen (Lütcke, 1995).

Weiterhin konnten an drei Stellen des Proteins (Aminosäuren 16–90; 110–183 und 354–430; s. Abb. 25B) Homologien zum „RNA Recognition Motif" (= RRM) identifiziert werden, das eine Rolle in der RNS-Bindung spielt. In der zweiten

Homologie-Region (Aminosäuren 110–183) liegt das durch die Peptid-Sequenzierung bekannte Peptid C3-13, bei dem bereits früher eine Homologie zum RRM entdeckt werden konnte (s. 3.5.2). Das RRM (Dreyfuss *et al.*, 1988; Bandziulis *et al.*, 1989; Burd und Dreyfuss, 1994) hat eine Konsensus-Sequenz von 73 Aminosäuren (smart Acc.No. SM0360), die zwei hoch konservierte Regionen (RNP-1 und RNP-2) enthält. Eine Auflistung der Konsensus-Sequenz mit den drei Regionen in CHLAMY 1-C3 (RRM-1 bis RRM-3) zeigte Homologien von 58,9 %; 57,5 % und 61,6 % (s. Anhang). Beispiele für Proteine, die eine oder mehrere RRM-Domänen enthalten sind GRP1 aus *Sorghum vulgare* (= „glycin-rich RNA-binding protein 1“; Acc.No. Q99069), PABP aus Hefe (= „polyadenylate-binding protein“; Acc.No. P31209) und das menschliche ELV3 (= „ELAV-like protein 3“; Acc.No. Q14576).

In CHLAMY 1-C3 konnten ebenfalls Regionen entdeckt werden, die mögliche Stellen für Phosphorylierungen oder Glykosylierungen (Prosite Acc.No. PS00001) darstellen (genaue Positionen s. Anhang). Es konnten Erkennungs-Stellen für folgende Kinasen identifiziert werden: Casein-Kinase II (Prosite Acc.No. PS00006) und Protein-Kinase C (Prosite Acc.No. PS00005). Weiterhin wurde eine RGD-Region (Prosite Acc.No. PS00016; s. Anhang) identifiziert, die in anderen Proteinen bei der Bindung an Zelloberflächen eine Rolle spielen kann (Ruoslahti und Pierschbacher, 1986).

Die 2979 Bp lange Sequenz wurde für eine Homologie-Suche in *C. reinhardtii* und anderen Organismen (Stand: 15.02.02) eingesetzt. Die hierzu verwendeten Programme sind im Anhang dieser Arbeit verzeichnet. Es konnten keine signifikanten Übereinstimmungen zu bekannten Genen gefunden werden. Eine Homologie-Suche mit dem Protein CHLAMY 1-C3 (440 Aminosäuren) erbrachte Übereinstimmungen zu Proteinen aus verschiedenen Organismen. Diese befanden sich innerhalb der bereits oben genannten RRM-Domänen: So konnte beispielsweise in *C. reinhardtii* eine Homologie zum Protein Gbp1p (= „G-strand binding protein 1p“; Acc.No. S46234; Homologie 48-56 % in den RRM-Domänen) und in *A. thaliana* eine Übereinstimmung zum „ribonucloeprotein homolog F21B7.26“ (Acc.No. T00912; Homologie 28-41 % in den RRM-Domänen) aufgedeckt werden.

Die Sequenzen von *chlamy 1-C3* und CHLAMY 1-C3 sind im Anhang dieser Arbeit verzeichnet. Zusätzlich sind Abgleiche mit den Protein-Domänen und den Erkennungsstellen für mehrere Enzyme angegeben.

3.10 Suche nach „UG“-Bindeproteinen in anderen Organismen

Die beiden analogen RNS-Bindeproteine CCTR aus *G. polyedra* und CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* binden beide an „UG“-haltige Regionen in den 3’-NTRen verschiedener RNS. Die Identifizierung von analogen Proteinen in anderen Organismen wäre ein Hinweis darauf, dass das „UG“-Bindemotiv in der Stammesgeschichte konserviert worden wäre. In Zusammenarbeit mit Frau Prof. F. Wollnik (Universität Stuttgart) wurden bereits Rattengewebe auf Vorhandensein eines Proteins hin untersucht, welches an die gleiche „UG“-haltige Zielsequenz wie CHLAMY 1 binden kann. In fast allen Geweben wurden ein bzw. teilweise sogar zwei spezifisch bindende Proteine entdeckt, die als (UG)-repeat Bindeproteine (UR-BP) bezeichnet wurden (Bareiß, Wollnik und Mittag, nicht veröffentlicht). In Vorversuchen mit Geweben der Maus, die in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. H.-W. Korf und Herrn PD J. Stehle (Universität Frankfurt) durchgeführt wurden, konnten ebenfalls RNS-Bindeproteine identifiziert werden, die spezifisch an „UG“-Wiederholungen binden können (Mittag, persönliche Mitteilung).

In einem Nebenprojekt im Rahmen dieser Arbeit sollten Untersuchungen an den Organismen *V. carteri* und *N. crassa* vorgenommen werden. Das Ziel war die Identifizierung von RNS-Bindeproteinen, die an „UG“-Wiederholungen binden können.

3.10.1 Untersuchungen an *V. carteri*

Die *regA*-mRNS (Kirk, 1997) aus *V. carteri* weist in ihrer 3’-NTR einen Bereich mit 16 „UG“-Wiederholungen in Folge auf. Aufgrund dieser Tatsache sollte nach einem CHLAMY 1 analogen Protein in dieser Alge gesucht werden, das ebenso wie CHLAMY 1 spezifisch an „UG“-Wiederholungen binden kann. Durch das

Einsetzen des „UG“-haltigen Bereiches der *regA* 3’-NTR für Bindestudien sollte zusätzlich überprüft werden, ob CHLAMY 1 an diese Region binden kann.
Die Experimente an *V. carteri* wurden in Zusammenarbeit mit P. Pickl und K. Stark (Arbeitsgruppe Prof. R. Schmitt; Universität Regensburg) durchgeführt. Die Anzucht und Ernte der *V. carteri*-Kulturen wurde freundlicherweise dort durchgeführt. Für die Bindestudien wurden zwei Transkripte (Stark, 1999) eingesetzt: Das $regA_{wt}$-Transkript war 264 Nt lang und beinhaltete 232 Nt der 3’-NTR der *regA*-mRNS. In dieser Region befanden sich 16 „UG“-Wiederholungen in Reihe, die als Bindungsstelle für ein RNS-bindendes Protein fungieren sollten. Das zweite Transkript ($regA_{mut}$) hatte eine Länge von 176 Nt. Es entstand durch Deletion der *regA*-Region, die 16 „UG“-Wiederholungen trug und stellte somit die Negativkontrolle dar.

3.10.1.1 Bindung von CHLAMY 1 an *regA* aus *V. carteri*

In Bindestudien (s. 2.2.17) sollte untersucht werden, ob CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* an eine Zielsequenz (*regA*) aus *V. carteri* binden konnte. Hierfür wurde Rohextrakt aus *C. reinhardtii* (s. 2.2.3) eingesetzt. Durch Auswertung der Autoradiogramme von „mobility shift assays“ wurde festgestellt, dass ein Protein aus *C. reinhardtii* an die „UG“-haltige Region von $regA_{wt}$ binden konnte (s. Abb. 26A). Dieser Protein-RNS-Komplex trat nicht bei Einsatz des $regA_{mut}$–Transkriptes auf, was auf eine spezifische Bindung des Proteins schließen ließ. Um die Stärke der Bindung zu kontrollieren, wurden Verdrängungs-Experimente (s. 2.2.17) ausgeführt: In einem „mobility shift assay“ wurde ein *C. reinhardtii*-Rohextrakt zusätzlich zum radioaktiv markierten Transkript $gs2_{wt}$ aus *C. reinhardtii* mit dem nicht markierten Transkript $regA_{wt}$ aus *V. carteri* versetzt. (s. Abb. 26B). Ab einem zweifachen molaren Überschuss des spezifischen Kompetitors konnte der Protein-RNS-Komplex nicht mehr detektiert werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass ein RNS-Bindeprotein aus *C. reinhardtii* spezifisch an die $regA_{wt}$-RNS aus *V. carteri* binden konnte.

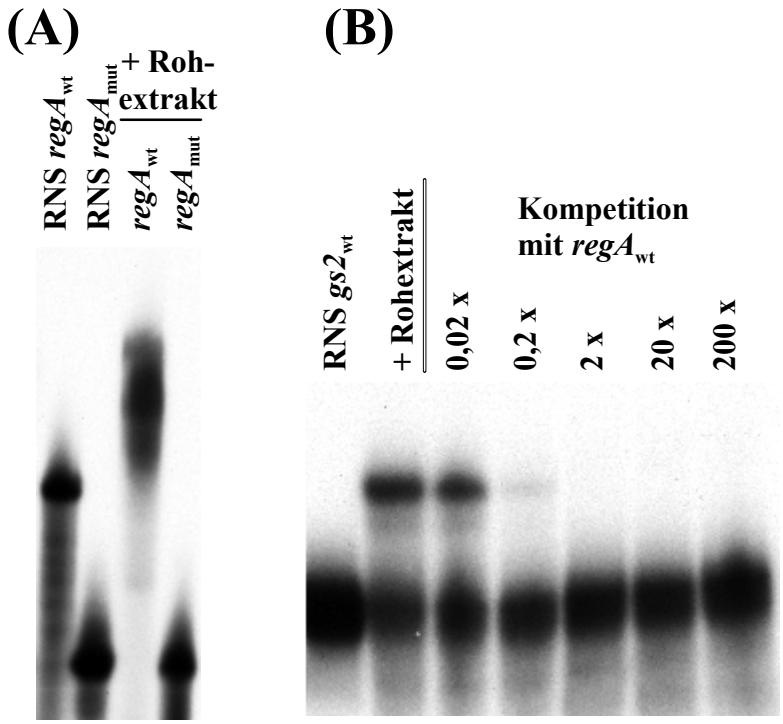


Abb. 26: Spezifische Bindung eines Proteins aus *C. reinhardtii* an die *regA*-RNS aus *V. carteri*

(A) Ein Rohextrakt aus *C. reinhardtii* (Stamm 137c, Ernte zu LD 12-13) wurde in einem „mobility shift assay" auf Bindeaktivität zu zwei radioaktiv markierten Transkripten aus *V. carteri* untersucht. Es wurde die 3'-NTR des *regA*-Gens in der Wildtyp (wt)- und Deletions-Variante (mut) eingesetzt. Die Spuren RNS $regA_{wt}$ und RNS $regA_{mut}$ zeigen die Mobilität der Transkripte allein. **(B)** In einem Verdrängungs-Experiment wurde die Bindungsstärke des RNS-Bindeproteins zu *regA* überprüft. Den Ansätzen wurde nicht markiertes $regA_{wt}$-Transkript als spezifischer Kompetitor (molarer Überschuss von 0,02 bis 200 x) zugesetzt. Als radioaktiv markiertes Transkript wurde $gs2_{wt}$ aus *C. reinhardtii* verwendet. Die Spur RNS $gs2_{wt}$ zeigt die Mobilität des Transkriptes allein, die Spur + Rohextrakt zeigt die Signalstärke des Protein-RNS-Komplexes ohne Zusatz des spezifischen Kompetitors.

Zur Bestimmung der Identität des spezifisch an $regA_{wt}$ bindenden Proteins wurden „UV-crosslinking" Experimente (s. 2.2.19) mit den *gs2*- und den *regA*-Transkripten in ihren Wildtyp- (wt) und mutierten Varianten (mut) durchgeführt (s. Abb. 27). Die Größen der entstandenen Protein-RNS-Komplexe wurden bestimmt und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung beider Wildtyp-Transkripte Protein-RNS-Komplexe der gleichen Molekularmasse detektiert werden konnten. Die Signalstärken waren bei Verwendung von $regA_{wt}$ stärker als bei Einsatz von $gs2_{wt}$. Bei Durchführung von „UV-crosslinking" Experimenten mit den mutierten Varianten der Transkripte ($gs2_{mut}$ und $regA_{mut}$) konnten keine Signale identifiziert werden (für $gs2_{mut}$ s. Abb. 9; für $regA_{mut}$ s. Abb. 27), was auf die spezifische Entstehung der Komplexe mit den Wildtyp-Transkripten schließen ließ. Es wurde bereits gezeigt, dass es sich bei den

Komplexen mit den Größen 62, 50 und 45 kDa um Untereinheiten von CHLAMY 1 handelt (s. Tab. 6). Diese Molekularmassen traten auch bei Verwendung von *regA*$_{wt}$ auf, was ein starker Hinweis darauf ist, dass CHLAMY 1 spezifisch an das „UG"-haltige Transkript *regA*$_{wt}$ aus *V. carteri* binden kann.

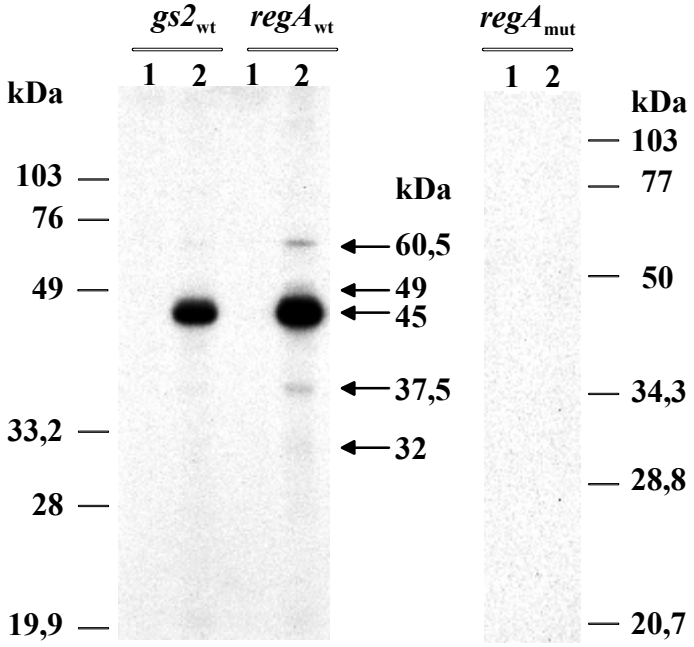


Abb. 27: CHLAMY 1 kann an die *regA*-RNS aus *V. carteri* binden

In „UV-crosslinking" Experimenten wurde die Molekularmasse des Bindeproteins (inklusiver des geschützten RNS-Anteils) unter denaturierenden Bedingungen bestimmt. Ein *C. reinhardtii*-Rohextrakt wurde zusammen mit drei radioaktiv markierten Transkripten (*gs2*$_{wt}$; *regA*$_{wt}$ und *regA*$_{mut}$) eingesetzt. Die Spuren „2" bezeichnen die Experimente mit UV-Bestrahlung, wohingegen die Spuren „1" auf die Kontrollexperimente ohne UV-Bestrahlung hinweisen. Die Ansätze wurden nach einem RNase-Verdau mittels einer SDS-PAGE (Gel 12,5 %) aufgetrennt und zur Sichtbarmachung der Protein-RNS-Komplexe wurde das getrocknete Gel gegen einen Röntgenfilm exponiert. Zur Bestimmung der Molekularmassen wurde ein gefärbter Standard, dessen Größen der einzelnen Proteine links bzw. rechts angegeben sind, auf das Gel mit aufgetragen. Die Größenbestimmung der Komplexe erfolgte in einem halblogarithmischen Koordinatensystem.

3.10.1.2 Identifizierung von RNS-Bindeproteinen in *V. carteri*

Nachdem die spezifische Bindung eines RNS-Bindeproteins aus *C. reinhardtii*, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um CHLAMY 1 handelt, an das *regA*$_{wt}$-Transkript aus *V. carteri* nachgewiesen worden war (s. 3.10.1.1), sollte dieses Transkript für die Suche nach einem CHLAMY 1 analogen Protein in *V. carteri* eingesetzt werden.

In Vorversuchen wurde festgestellt, dass *V. carteri* eine hohe RNase-Aktivität besitzt. Es war nicht möglich, in „mobility shift assays“ Signale zu erhalten, da die gesamte RNS abgebaut wurde (Daten nicht gezeigt). In Zusammenarbeit mit P. Pickl (Universität Regensburg) wurde ein Protokoll zur Abtrennung der RNasen ausgearbeitet, das zwei Schritte umfasste: In einem ersten Schritt wurde ein Rohextrakt aus *V. carteri* (s. 2.2.26) hergestellt. Dieser wurde in einem zweiten Schritt einer fraktionierenden AS-Fällung (s. 2.2.4.2) unterzogen. Für die Ausarbeitung der Methode wurde der *V. carteri* Wildtypstamm HK10 verwendet. Die resuspendierten, entsalzten Proteine der AS-Fällung (0-25 % und 25-50 %) wurden in „mobility shift assays“ (s. 2.2.17) zusammen mit den radioaktiv markierten Transkripten $regA_{wt}$ und $regA_{mut}$ eingesetzt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Mehrheit der RNasen durch eine Fällung von 0-25 % AS ausgefällt werden konnten (nicht dargestellt). In einem Bereich von 25-50 % AS konnte je ein verzögert laufender Protein-RNS-Komplex bei Einsatz der beiden Transkripte $regA_{wt}$ und $regA_{mut}$ detektiert werden (s. Abb. 28A). Ob es sich dabei um die Bindung des gleichen Proteins handelte, konnte aufgrund der unterschiedlichen Längen der Transkripte (s. Tab. 4) nicht bestimmt werden. Die Entstehung des Protein-RNS-Komplexes bei Einsatz von $regA_{mut}$ lässt sich auf die Bindung eines nicht an die 16 „UG“-Wiederholungen bindenden Proteins zurückführen, da diese in $regA_{mut}$ deletiert wurden. Bei Einsatz von $regA_{wt}$ für die Bindestudie konnte zusätzlich ein diffuses Signal unterhalb des Protein-RNS-Komplexes detektiert werden (s. Abb. 28A). Es konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass sich in diesem Bereich ein weiterer Protein-RNS-Komplex befand.

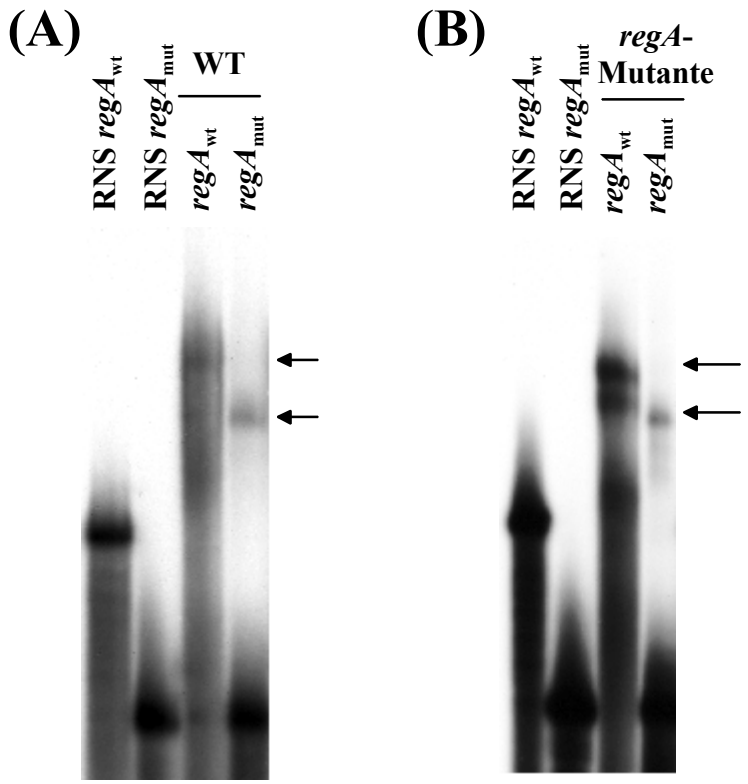


Abb. 28: Bindung von zwei Proteinen aus *V. carteri* an die 3'-NTR der *regA*-mRNS

Zellen von verschiedenen *V. carteri*-Stämmen wurden zur Herstellung eines Rohextraktes mit darauffolgender AS-Fällung verwendet. Die resuspendierten, dialysierten Proteine wurden für „mobility shift assays" eingesetzt. Die 3'-NTR der *regA*-mRNS aus *V. carteri* wurde bei allen Versuchen als radioaktiv markiertes Transkript eingesetzt. Bei $regA_{mut}$ war die 16 „UG"-lange Region, die bei $regA_{wt}$ vorhanden war, deletiert worden. Die Spuren RNS $regA_{wt}$ und RNS $regA_{mut}$ zeigen die Mobilität der radioaktiv markierten Transkripte ohne Zusatz von Proteinen. Die Pfeile weisen auf die entstandenen Protein-RNS-Komplexe hin. **(A)** „Mobility shift assay" mit *V. carteri*-Proteinen des Wildtypstammes HK10 (Abkürzung WT), die durch eine AS-Fällung von 25-50 % ausgefällt worden sind. **(B)** Proteine der *V. carteri*-Mutante 153-68 (*regA*-Mutante), die von 35-45 % AS ausgefällt werden konnten, wurden in einen „mobility shift assay" eingesetzt.

Für weitere Bindungsstudien wurde die *V. carteri*-Mutante 153-68 eingesetzt. Bei dieser Mutante ist ein Teil des offenen Leserahmens des *regA*-Gens deletiert (Kirk *et al.*, 1999). Sie zeichnet sich durch das Fehlen eines funktionellen RegA-Proteins aus. Durch Verwendung von Proteinextrakten aus dieser Mutante sollte überprüft werden, ob sich das Fehlen von RegA auf die im Wildtypstamm HK10 identifizierten RNS-Bindeproteine auswirkt. Nach Durchführung einer fraktionierenden AS-Fällung (s. 2.2.4.2) wurden die zwischen 35-45 % AS gefällten Proteine resuspendiert, entsalzt und für „mobility shift assays" (s. 2.2.17) eingesetzt. Bei Einsatz von $regA_{wt}$ konnten zwei Protein-RNS-Komplexe, bei $regA_{mut}$ nur ein Komplex detektiert werden (s. Abb. 28B). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass zwei Proteine aus *V. carteri* an die 3'-NTR von

regA binden können, wobei aber nur eines der Proteine spezifisch an die „UG"-haltige Region bindet. Das spezifisch bindende Protein wurde als VOLVO 1 bezeichnet, das unspezifisch bindende als VOLVO 2. Bei Vergleich der Experimente mit den beiden *V. carteri*-Stämmen fiel auf, dass bei Einsetzen der gleichen Proteinmengen die Signalstärke bei Stamm 153-68 signifikant stärker war als bei HK10 (s. Abb. 28).

Um zu überprüfen, ob es sich bei den RNS-Bindeproteinen aus den zwei *V. carteri*-Stämmen (HK10 und 153-68) um die gleichen Proteine handelte, wurden „UV-crosslinking" Experimente (s. 2.2.19) durchgeführt. Dafür wurden Proteine aus beiden *V. carteri*-Stämmen einer fraktionierenden AS-Fällung (s. 2.2.4.2) unterzogen. Die zwischen 35-45 % AS ausgefällten Proteine wurden, nach Resuspendierung und Dialyse (s. 2.2.5), für die Durchführung der Experimente zusammen mit den Transkripten $regA_{wt}$ und $regA_{mut}$ eingesetzt (s. Abb. 29). Bei allen Ansätzen die einer UV-Bestrahlung ausgesetzt wurden, konnte ein Protein-RNS-Komplex von ca. 36 kDa identifiziert werden, der somit die Größe des unspezifisch bindenden Proteins VOLVO 2 inklusive des geschützten RNS-Anteils darstellte. Die Ansätze mit dem Transkript $regA_{wt}$ zeigten zusätzlich hierzu einen bzw. zwei Komplexe mit den Größen 27 und 25,5 kDa, die auf spezifisch bindende Proteine zurückzuführen waren. Dies spricht dafür, dass es im *V. carteri*-Stamm HK10 zusätzlich zum unspezifisch bindenden Protein auch ein spezifisch an die „UG"-Wiederholungen bindendes Protein gibt. Somit ist es als wahrscheinlich anzusehen, dass sich im diffusen Signal von Abb. 28A ein Protein-RNS-Komplex befindet. Bei den „UV-crosslinking" Experimenten konnte der kleinere Protein-RNS-Komplex (25,5 kDa) bei beiden Stämmen detektiert werden, wohingegen der 27 kDa große Protein-RNS-Komplex nur beim Stamm 153-68 zu erkennen war. Die Signalstärke des 25,5 kDa großen Komplexes ist bei Stamm 153-68 um ca. 700 % stärker als bei Stamm HK10. Dies deutet auf eine größere Menge des RNS-Bindeproteins in der *regA*-Mutante hin.

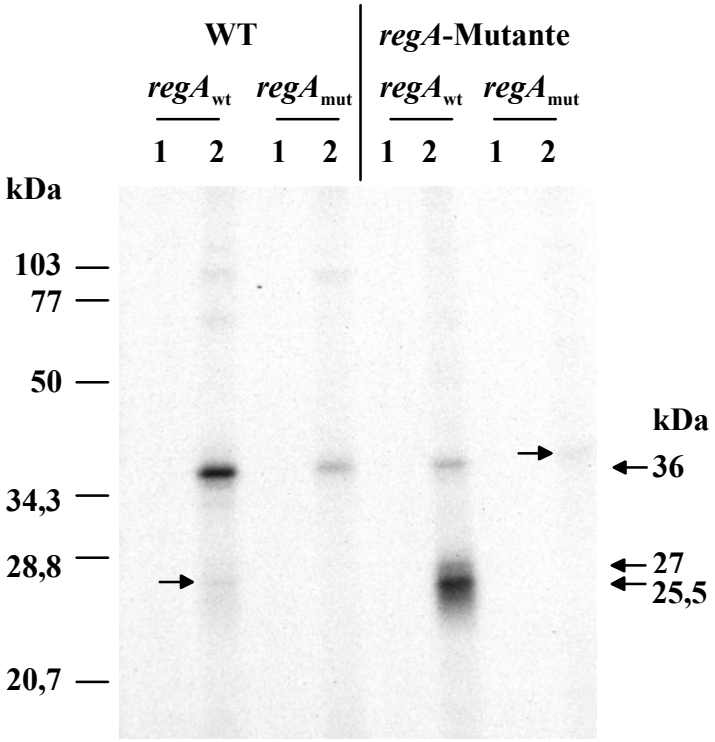


Abb. 29: Molekularmassen der RNS-Bindeproteine VOLVO 1 und VOLVO 2 aus *V. carteri*

Zellen der beiden *V. carteri*-Stämme HK10 (= WT) und 153-68 (= *regA*-Mutante) wurden zur Herstellung von Rohextrakten mit darauffolgender AS-Fällung eingesetzt. Die zwischen 35-45 % AS gefällten Proteine wurden resuspendiert, dialysiert und für „UV-crosslinking" Experimente eingesetzt. Als radioaktiv markierte Transkripte wurde die *regA* 3'-NTR in der Wildtyp- (wt) und Deletions-Variante (mut) eingesetzt. In den Spuren 1 wurden die Kontrollexperimente aufgetrennt, die, im Gegensatz zu den Ansätzen der Spuren 2, keiner UV-Bestrahlung ausgesetzt wurden. Die Auftrennung der Protein-RNS-Komplexe erfolgte ein einem 12,5 %igen SDS-Gel.

Durch die dargestellten Experimente konnte gezeigt werden, dass es in *V. carteri* ein RNS-Bindeprotein (VOLVO 1) gibt, das spezifisch an die „UG"-haltige Region in der 3'-NTR der *regA*-mRNS binden kann. Ob es sich dabei, wie im Fall von CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii*, um ein circadian reguliertes Protein handelt, wurde in Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

3.10.2 Untersuchungen an *N. crassa*

Als zweiter Organismus, in dem ein an „UG"-Wiederholungen bindenden RNS-Bindeprotein identifiziert werden sollte, wurde der Pilz *N. crassa* ausgewählt. Zur Identifizierung eines solchen Proteins wurde die „UG"-haltige Region in der 3'-NTR der *gs2* aus *C. reinhardtii* als Zielsequenz eingesetzt. Um die Spezifität eines identifizierten Bindeproteins zu überprüfen, wurden Bindestudien mit der Wildtyp- (wt) und der mutierten (mut) Variante von *gs2* durchgeführt. Die

Kultivierung und Ernte von *N. crassa*-Kulturen wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. T. Roenneberg (LMU München) durchgeführt. Die Anzucht von *N. crassa* erfolgte unter Dauerlicht (LL). Für die Ernten wurden die Kulturen in das jeweilige Licht-Regime überführt (z.B. RR oder RL). Hierbei steht „R" für Rotlicht, dass bei *N. crassa*-Kulturen oft für die Nachtphase, anstatt vollkommener Dunkelheit, eingesetzt wird.

Für die Suche nach einem RNS-Bindeprotein wurden *N. crassa*-Kulturen verwendet, die zum Zeitpunkt RL 12 geerntet worden waren. Zu dieser Zeit geschieht der Wechsel von Rotlicht (= Nachtphase) zu Licht (= Tagphase). Die Zellen wurden für die Herstellung eines Rohextraktes (s. 2.2.25) verwendet, der für „mobility shift assays" (s. 2.2.17) eingesetzt wurde (s. Abb. 30A). Bei Verwendung des Transkripts $gs2_{wt}$ konnten zwei verzögert laufende Protein-RNS-Komplexe (CRASSA 1 und CRASSA 2) detektiert werden, wobei der obere Komplex sehr schwach war. Beide Komplexe waren bei Benützung des mutierten Transkripts ($gs2_{mut}$) nicht mehr sichtbar.

In Verdrängungs-Experimenten (s. 2.2.17) sollte die Spezifität der RNS-Bindeproteine untersucht werden (s. Abb. 30B). Hierfür wurden *N. crassa*-Kulturen zum Zeitpunkt RR 28 geerntet und für die Herstellung eines Rohextraktes verwendet. Die spezifische Kompetition erfolgte durch Zugabe von nicht markiertem Transkript $gs2_{wt}$ bzw. $gs2_{mut}$. Eine densidometrische Auswertung der Signalstärken zeigte, dass die Signalstärke des CRASSA 1-RNS-Komplexes bei 1600fachem Überschuss von $gs2_{wt}$ um 94 % schwächer war als die Kontrolle ohne spezifischen Kompetitor. Bei Kompetition mit $gs2_{mut}$ konnte eine Abnahme der Signalstärke (1600facher Überschuss) um 56 % detektiert werden. Die Auswertung des CRASSA 2-RNS- Komplexes zeigte, dass bei Einsatz beider Transkripte eine Abnahme der Signalstärke um ca. 77 % zu beobachten war. Dies deutet darauf hin, dass der CRASSA 2-Komplex auf ein unspezifisch bindendes Protein zurückzuführen ist. Der untere Komplex (CRASSA 1) scheint hingegen auf ein Protein hinzuweisen, das zumindest teilweise spezifisch an die „UG"-haltige Region binden konnte. In diesem Zusammenhang soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass das Transkript $gs2_{mut}$ noch zwei der ursprünglich sieben „UG"-Wiederholungen trägt (Waltenberger *et al*., 2001).

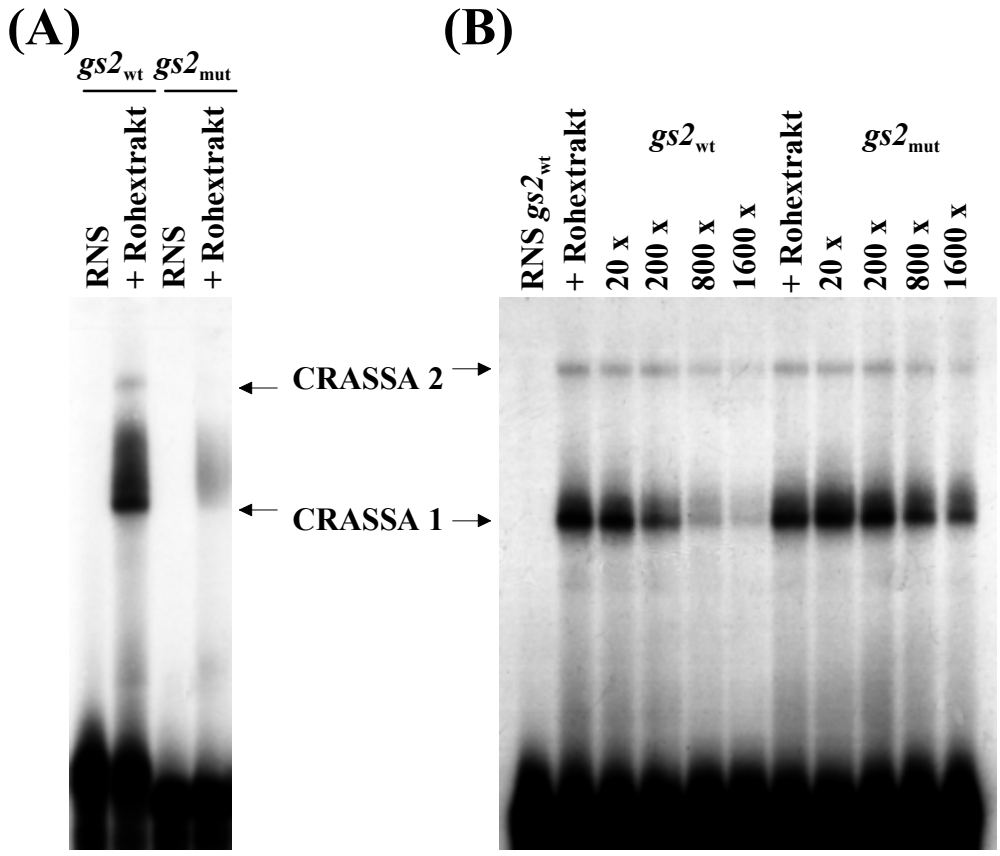


Abb. 30: Identifizierung von RNS-Bindeproteinen in *N. crassa*

N. crassa-Kulturen wurden zum Zeitpunkt RL 12 (Teil A) bzw. RR 28 (Teil B) geerntet und zur Herstellung von Rohextrakten verwendet. Diese wurden in „mobility shift assays" auf das Vorhandensein eines RNS-Bindeproteins überprüft, das an „UG"-Wiederholungen binden kann. **(A)** Die Bindestudien wurden mit *gs2* aus *C. reinhardtii* in der Wildtyp- (wt) und mutierten (mut) Variante durchgeführt. Die Spuren RNS zeigen die Mobilität der Transkripte ohne Zusatz von Rohextrakt. **(B)** Verdrängungs-Experiment mit einem *N. crassa*-Rohextrakt. Den Ansätzen wurden spezifischer Kompetitor (nicht markiertes Transkript $gs2_{wt}$ oder $gs2_{mut}$) in einem molaren Überschuss von 20 bis 1600fach zugesetzt. Die Spur RNS $gs2_{wt}$ zeigt die Mobilität des radioaktiv markierten Transkriptes allein. In den Spuren „+ Rohextrakt" wurde kein spezifischer Kompetitor zugesetzt.

In weiteren Untersuchungen sollte aufgeklärt werden, ob das spezifisch bindende Protein CRASSA 1 in einer circadianen Weise an die RNS bindet. Hierzu wurden *N. crassa*-Kulturen in Dauerlicht (LL) angezogen und dann in ein Dunkel-Licht-Regime (DL 12:12) gestellt. Über einen Zeitraum von 24 h wurden alle 3 h Proben entnommen und für Bindestudien (s. 2.2.25 und 2.2.17) eingesetzt. Die Signalstärken der Protein-RNS-Komplexe wurden am Computer mit Hilfe der Software „Tina 2.09g" ausgewertet und in ein Diagramm übertragen (s. Abb. 31). Die rote Linie stellt den Rhythmus der Proteinbindung an die RNS über einen Zeitraum von 24 h dar. Zum Zeitpunkt DL 9 konnte das Minimum der Bindeaktivität ausgemacht werden. Zu DL 6 und DL 21 konnten zwei Maxima

mit der gleichen Bindeaktivität detektiert werden. Um zu zeigen, ob es sich beim untersuchten Protein um ein circadian bindendes Protein handelte, war es nötig, die *N. crassa*-Kulturen unter konstanten Bedingungen zu ernten. Hierfür wurden die Kulturen unter LL angezogen und für die Ernte unter Dauerdunkel (DD) gestellt. Im Abstand von je 4 h wurden über einen Zeitraum von 24 h Proben entnommen und in einem „mobility shift assay“ auf Bindeaktivität von CRASSA 1 hin untersucht. Die Signalstärken der Protein-RNS-Komplexe wurden ausgewertet und in ein Diagramm übertragen (s. Abb. 31; blaue Linie). Das Minimum der Bindeaktivität konnte zu DD 8 detektiert werden. Es konnten zwei Maxima zu DD 4 und DD20 entdeckt werden, wobei das zweite Maximum in seiner Stärke um ca. 40 % schwächer war als das erste.

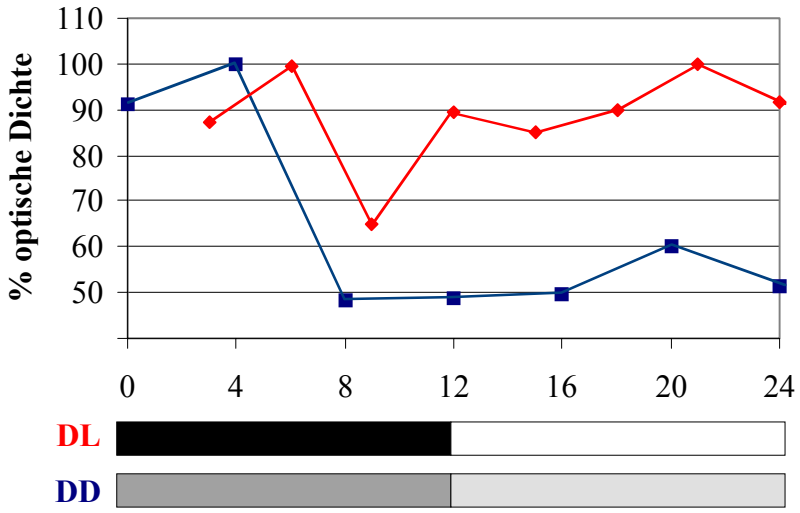


Abb. 31: Bindeaktivität von CRASSA 1 aus *N. crassa*

N. crassa-Kulturen wurden unter Dauerlicht angezogen und dann unter Dauerdunkel (DD) oder einem Dunkel-Licht-Regime (DL 12:12) geerntet. Unter DD wurden alle 4 h Proben entnommen, unter DL alle 3 h. Die Proben wurden für die Herstellung von Rohextrakten verwendet und in „mobility shift assays“ zusammen mit dem radioaktiv markierten Transkript $gs2_{wt}$ aus *C. reinhardtii* auf Bindeaktivität von CRASSA 1 hin überprüft. Die Sichtbarmachung der radioaktiv markierten Bereiche erfolgte mit Hilfe einer „Image plate“. Die densidometrische Auswertung wurde mit der Software „Tina 2.09g“ durchgeführt. Die Daten der optischen Dichten wurden in % berechnet und in ein Diagramm übertragen. Auf der x-Achse sind die Zeiten unter DL bzw. DD angegeben. Der schwarze Balken weist auf die Dunkelphase hin, der weiße Balken auf die Lichtphase. Die dunkel- und hellgrauen Balken zeigen die Zeiten der subjektiven Nacht bzw. des subjektiven Tages bei der DD-Ernte an. Auf der y-Achse ist die optische Dichte der detektierten Protein-RNS-Komplexe in Prozent angegeben. Das Maximum wurde für jede Kurve gleich 100 % gesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass es in *N. crassa* ein RNS-Bindeprotein (CRASSA 1) gibt, das spezifisch an die sieben „UG“-Wiederholungen in der 3’-NTR von *gs2* aus *C. reinhardtii* binden kann. Die Bindeaktivität dieses Proteins scheint von der inneren Uhr kontrolliert zu sein, wobei die Amplitude unter Dauerdunkel herabgesetzt ist. Die Ergebnisse dieser Bindestudien über einen Tag-Nacht-Verlauf können nur als vorläufig angesehen werden, da für eine statistische Auswertung mehrere unabhängige Experimente nötig sind, deren Durchführung im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das als Multimer vorliegende, an „UG“-Wiederholungen bindende RNS-Bindeprotein CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* biochemisch charakterisiert, in drei Schritten aufgereinigt und mehrere Peptide sequenziert. Durch eine Expressions-Genbank-Sichtung konnten cDNS-Klone isoliert werden, die für die CHLAMY 1-Untereinheiten kodieren. In einem weiteren Aspekt dieser Arbeit wurden RNS-Bindeproteine in *V. carteri* und *N. crassa* identifiziert, die spezifisch an „UG“-Wiederholungen binden können.

4.1 CHLAMY 1 als Repressor der Translation

Zur Überprüfung der regulatorischen Eigenschaften von CHLAMY 1 wurde dessen Einfluss auf die Translation zweier Reporterkonstrukte mit darauffolgendem Enzymtest untersucht (s. 3.2). Dabei handelte es sich um das Gen für das Enzym ß-Glucuronidase (= GUS), in dessen 3’-NTR die Bindestelle für CHLAMY 1 in der Wildtyp- bzw. mutierten Variante eingefügt wurde. Es war bereits bekannt, dass der Zusatz von regulatorischen RNS-Bindeproteinen die Translation eines Reporterkonstruktes in einem zellfreien System beeinflussen kann (Ostareck-Lederer *et al*., 1994). Durch die Translation von *gusA-gs2*$_{wt}$ sollte der Einfluss von CHLAMY 1 auf ein Transkript bestimmt werden, das die Bindestelle für das Protein enthielt. Falls CHLAMY 1 die Translation des chimären Reporterkonstruktes aktivieren würde, dann wäre im nachfolgenden Enzymtest eine Erhöhung der Fluoreszenz im Gegensatz zu einer Translation ohne zusätzliche *C. reinhardtii*-Proteine zu beobachten. Bei einer Reprimierung der Translation hingegen, sollte die Fluoreszenz geringer sein.

In Kontrollversuchen wurde festgestellt, dass die beiden eingesetzten Transkripte in verschiedener Stärke translatiert wurden. Eine unterschiedliche Translations-effizienz zwischen einem mutierten und einem nicht-mutierten Transkript in einem zellfreien System wurde bereits 1996 bei einer Säuger-RNS gezeigt (Shama und Meyuhas), bei der die mutierte Variante 2-3 mal besser translatiert wurde als die Wildtyp-Form. In dieser Arbeit wurde hingegen das verwendete Wildtyp-

Transkript *gusA-gs2*$_{wt}$ um durchschnittlich 5,1 % besser translatiert als die mutierte Variante *gusA-gs2*$_{mut}$. Dies könnte auf unterschiedliche Sekundärstrukturen zurückzuführen sein. Der Unterschied in der Translatierbarkeit der beiden verwendeten Transkripte wurde in die Auswertungen der nachfolgenden Experimente mit einbezogen.

Bei Vergleich der Enzymmessungen nach den Translationen von *gusA-gs2*$_{mut}$ ohne und mit zugesetzten *C. reinhardtii*-Proteinen wurde festgestellt, dass dessen Translation durch Zugabe des in CHLAMY 1-angereicherten Proteingemisches nach einer 0,5-1 M AS-Fällung aktiviert wurde (s. Abb. 6). Da das Transkript *gusA-gs2*$_{mut}$ keine Bindung von CHLAMY 1 ermöglichte, konnte somit gezeigt werden, dass andere *C. reinhardtii*-Proteine die Translation des Reporterkonstruktes aktivieren konnten. Theoretisch würde man erwarten, dass sich der prozentuale Unterschied der bestimmten Enzymaktivitäten zwischen den Ansätzen mit und ohne *C. reinhardtii*-Proteinen im Laufe der Nachweisreaktion nicht ändert. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Werte immer mehr voneinander abwichen, je länger der Enzymtest inkubiert wurde. Eine Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass für den Enzymtest der nicht-aufgereinigte Translationsansatz eingesetzt wurde (s. 2.2.24). Somit ist es möglich, dass auch während des Nachweises eine Neusynthese von GUS stattfindet und/oder dass andere *C. reinhardtii*-Proteine die GUS-Aktivität beeinflussen können. Gegen Ende der Nachweisdauer konnte eine Abnahme der durchschnittlichen Fluoreszenzsteigerung gemessen werden. Ein Abbau von GUS während des Nachweises erscheint unwahrscheinlich, da dieses Enzym eine hohe Stabilität aufweist (Jefferson *et al.*, 1986). Der Verbrauch des Substrates MUG (Gallagher, 1992) könnte für den Abfall der Fluoreszenzsteigerung ab 270 min Inkubation verantwortlich sein.

Bei Vergleich der durchgeführten Nachweisreaktionen nach Translation von *gusA-gs2*$_{wt}$ konnte eine Reprimierung der Translation durch Zusatz von *C. reinhardtii*-Proteinen nach einer 0,5-1 M AS-Fällung gezeigt werden (s. Abb. 6). Die Messwerte nahmen, wie bereits bei *gusA-gs2*$_{mut}$ dargelegt, in unterschiedlichen Maße zwischen den Messpunkten zu. So konnte bis zu einer Nachweisdauer von 180 min eine immer stärkere Reprimierung in den Ansätzen

mit *C. reinhardtii*-Proteinen nachgewiesen werden. Danach wurde die Reprimierung schwächer und ab 270 min Inkubation konnte sogar eine schwache Aktivierung der GUS-Aktivität festgestellt werden (s. 3.2.2). Dies lässt sich wiederum durch die Anwesenheit des Proteingemisches in der Nachweisreaktion erklären (s. auch oben). Im Laufe des Enzymtests scheint die allgemeine Aktivierung der GUS-Aktivität durch die eingesetzten *C. reinhardtii*-Proteine überhand zu nehmen, wodurch die Reprimierung verringert und sogar positive Werte, d.h. Aktivierung gemessen werden können. Die allgemeine Aktivierung der Translation der beiden eingesetzten Reporterkonstrukte in einem zellfreien System durch *C. reinhardtii*-Proteine wurde in die Auswertung der *gusA-gs2*$_{wt}$-Experimente mit aufgenommen. Dadurch wurde die durchschnittliche Reprimierung der Translation des chimären Reporterkonstruktes mit „UG"-Bindestelle durch CHLAMY 1 auf 14,56 % festgelegt (s. Abb. 6).

Die in dieser Arbeit bestimmte Reprimierung der Translation durch CHLAMY 1 wurde auch durch Untersuchungen an der Nitritreduktase (= NII1) aus *C. reinhardtii* gezeigt (Grosch und Mittag, unveröffentlichte Daten). Das *nii1*-Gen hat in seiner 3'-NTR neun „UG"-Wiederholungen in Folge und stellt eine Zielsequenz für die Bindung von CHLAMY 1 dar (Waltenberger *et al.*, 2001). In Enzymtests wurde, sowohl unter LD- als auch unter LL-Bedingungen, eine hohe NII1-Aktivität zu Zeiten gemessen, in denen die CHLAMY 1-Bindeaktivität gering war, was ebenfalls auf eine reprimierende Funktion von CHLAMY 1 schließen lässt.

Die hier dargestellte regulatorische Eigenschaft von CHLAMY 1 kann nur als vorläufiger Hinweis auf die tatsächliche Aufgabe *in vivo* angesehen werden, da für die Experimente kein reines CHLAMY 1, sondern nur ein in CHLAMY 1-angereichertes Proteingemisch eingesetzt wurde. Wie bereits dargelegt wurde (s. oben), scheinen auch andere Proteine dieses Gemisches die Translation in einem zellfreien System zu beeinflussen. Erst die Durchführung des Versuches mit aufgereinigtem CHLAMY 1 kann seine regulatorischen Fähigkeiten endgültig nachweisen.

Der regulierende Einfluss eines in der 3'-NTR bindenden Proteins auf die Translation seiner Ziel-RNS konnte bereits in mehreren Fällen nachgewiesen

werden: Das Protein GLD-1 (= „germline development 1“) bindet im Komplex mit FOG-2 (= „feminization of the germ line“) an die 3’-NTR der an der Geschlechtsdifferenzierung beteiligten *tra-2*-mRNS in *Caenorhabditis elegans* und reprimiert deren Translation (Jan *et al*., 1999; Clifford *et al*., 2000). Ebenso wird die *cathepsin B*-RNS der Fliege *Sarcophaga peregrina* durch die Bindung des Repressors CBBP gesteuert (= „cathepsin B mRNA 3’-UTR-binding protein“; Yano *et al*., 1997). Das zu Poly(A)-Bindeproteinen zählende RB47 aus *C. reinhardtii* hingegen stimuliert die Translation seiner Ziel-RNS (Yohn *et al*., 1998).

4.2 CHLAMY 1 ist ein Multimer

Die Molekularmasse von CHLAMY 1 wurde sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen bestimmt. Unter ersteren wurden Dichtegradienten-Zentrifugationen durchgeführt. Hierdurch konnte die Molekularmasse von CHLAMY 1, durch Einsatz einer Zielsequenz aus *C. reinhardtii* ($gs2_{wt}$), auf ca. 160 kDa festgelegt werden (s. 3.3.1). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von H. Schmid (persönliche Mitteilung), die die CHLAMY 1-Molekularmasse unter Zuhilfenahme der 3’-NTR der *lbp*-mRNS aus *G. polyedra* bestimmt hatte.

Bei der Molekularmassenbestimmung unter denaturierenden Bedingungen („UV-crosslinking“ Experimente) waren die Signalstärken der identifizierten Protein-RNS-Komplexe mit den beiden eingesetzten Proteingemischen unterschiedlich: Beim Rohextrakt waren sie schwächer als bei Proteinen nach einer 0,5-1 M AS-Fällung, durch die CHLAMY 1 angereichert worden war. Es konnten fünf Protein-RNS-Komplexe detektiert werden (62; 50; 45; 37 und 30,5 kDa; s. 3.3.2), die auf spezifische Bindung eines Proteins an die sieben „UG“-Wiederholungen der RNS zurückzuführen waren. Der durch die Proteinbindung geschützte RNS-Anteil muss von der halblogarithmisch bestimmten Größe des Komplexes abgezogen werden um die Molekularmasse des Proteins bestimmen zu können. Bei Untersuchungen an der 3’-NTR des *lbp* aus *G. polyedra* konnte die Bindestelle für das CHLAMY 1 analoge Protein CCTR einer Region zugeordnet werden, welche eine Größe von ca. 7 kDa hat (Mittag *et al.*, 1994). Der vom

CCTR geschützte RNS-Anteil kann jedoch auch kleiner als 7 kDa sein; seine exakte Größe ist nicht bekannt. Auch die Größe des von CHLAMY 1 geschützten RNS-Anteils in den CHLAMY 1-RNS-Komplexen wurde bisher nicht bestimmt. Somit können keine exakten Größenangaben für die CHLAMY 1-Untereinheiten (ohne RNS-Anteil) nach „UV-crosslinking“ Experimenten gemacht werden.

Aus dem Vergleich der Ergebnisse unter nativen und denaturierenden Bedingungen (s. Tab. 6) konnte geschlossen werden, dass es sich bei CHLAMY 1 um ein Multimer handelt. Dies konnte auch durch die Aufreinigung des Proteins bestätigt werden: Durch Ausführung der spezifischen RNS-Affinitäts-chromatographie (s. 4.3) konnten drei spezifische Proteine aufgereinigt werden. Deren Größen stimmen mit den Molekularmassen der drei größten Komplexe aus den „UV-crosslinking“ Experimenten überein, wenn man bei diesen den zusätzlichen RNS-Anteil berücksichtigt (s. Tab. 7). Ein möglicher Abbau von CHLAMY 1 könnte das Auftreten der zwei kleinsten Protein-RNS-Komplexe in „UV-crosslinking“ Experimenten erklären (s. Abb. 9). Somit scheint CHLAMY 1 aus drei Untereinheiten zu bestehen, die folgende, durch denaturierende Gelelektrophorese bestimmte, Molekularmassen aufweisen: 60, 50 und 44 kDa. Eine Addition der drei Proteine führt zu einem Komplex mit einer Größe von 154 kDa. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus den Dichtegradienten-Zentrifugationen, in welche die stärkste Bindeaktivität von CHLAMY 1 in der Fraktion detektiert wurde, in der sich auch das 158 kDa-Standardprotein befand (s. 3.3.1). Durch die Identifikation von *chlamy 1*-cDNS-Sequenzen können weitere Aussagen über die Größen der CHLAMY 1-Untereinheiten gemacht werden (s. 4.6).

Auch in anderen Organismen wurden RNS-Bindeproteine identifiziert, die als Multimer vorliegen und die Translation ihrer Ziel-RNS regulieren. Hierbei ist es möglich, dass jede Untereinheit des Multimers eine andere Aufgabe übernimmt und nur deren Zusammenspiel für die Translationskontrolle verantwortlich ist. Im Spinat bindet beispielsweise ein Komplex aus drei Proteinen an die 3’-NTR der *petD precursor*-mRNS (kodiert für die Untereinheit IV des Cytochrom b6/f-Komplexes) und stabilisiert diese (Yang und Stern, 1997; Baker *et al*., 1998). Eine Initiation der Translation durch die Bindung eines aus vier Proteinen bestehenden

Komplexes an die 5'-NTR der *psbA*-mRNS (kodiert für das Polypeptid D1 des Photosystems II) wurde in *C. reinhardtii* gezeigt (Danon und Mayfield, 1994; Yohn *et al*., 1998). Diese Beispiele zeigen, dass RNS-Bindeproteine die Translation auf vielfältige Weise beeinflussen können.

4.3 Aufreinigung und Peptid-Sequenzierung von CHLAMY 1

Eine erste Anreicherung von CHLAMY 1 konnte durch eine 0,5–1 M AS-Fällung erzielt werden (s. Abb. 4). Der Anreicherungsfaktor für CHLAMY 1 betrug ungefähr 1,57 fach. Dies konnte sowohl in „mobility shift assays" als auch in „UV-crosslinking" Experimenten gezeigt werden: Im ersten Versuch wurde eine Verstärkung des CHLAMY 1-Signals um 56 % bestimmt (s. Abb. 4). Im zweiten Experiment wurde bei Auswertung der Protein-RNS-Komplexe mit den Größen 62, 50 und 45 kDa eine durchschnittliche Signalverstärkung von 58 % errechnet (s. Abb. 9).

Zur weiteren Aufreinigung von CHLAMY 1 wurde eine spezifische RNS-Affinitätschromatographie ausgearbeitet (s. 3.4.1), in der die spezifische Bindung des Proteins an „UG"-Wiederholungen in einer RNS ausgenützt wurde. Es wurden drei spezifisch bindende Proteine aufgereinigt, die Molekularmassen von 60, 50 und 44 kDa aufwiesen. Zusätzlich wurden zwei unspezifische Proteine (Größen 88 und 68 kDa) isoliert, die sowohl an die Wildtyp- als auch an die mutierte Variante von *gs2* binden konnten (s. 3.4). Eine Bindung dieser Proteine an eine Stelle außerhalb der „UG"-Wiederholungen in *gs2* erscheint unwahrscheinlich, da diese Bindung auch durch „UV-crosslinking" Experimente und „mobility shift assays" zu detektieren gewesen sein sollte. Nachdem dies nicht der Fall war, ist anzunehmen, dass die 88 und 68 kDa großen Proteine entweder an Biotin oder Streptavidin binden konnten. Bei der abschließenden Auftrennung der eluierten Proteine für die Peptid-Sequenzierung konnten zusätzlich zu den oben erwähnten Proteinen auch kleinere Proteine detektiert werden (s. Abb. 14). Dies könnte mit der Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE zu tun haben: Vor dem Beladen der Gele war es nötig das Proteingemisch auf ein geringeres Volumen einzuengen und zu dialysieren. Ein teilweiser Abbau

der Proteine während dieser Vorgänge ist möglich. Die Untereinheiten von CHLAMY 1 konnten aufgrund ihrer Größe und der stärkeren Färbungsintensität nach der Coomassie-Färbung der SDS-Gele dennoch leicht erkannt werden. Die Ausbeute an CHLAMY 1 durch die Aufreinigung war sehr gering (nur ca. 0,000027 %). Dies war erwartet worden, da es sich bei CHLAMY 1 um ein regulatorisches Protein handelt, die meist nicht in großer Menge in einer Zelle vorhanden sind. So lag beispielsweise die Ausbeute eines aus der Pavianniere isolierten RNS-Bindeproteins bei 0,000026 % (Mehta und Driscoll, 1998).

Zur Sequenzierung von CHLAMY 1 wurden die drei Untereinheiten durch Trypsin in Peptide gespalten und einem Edman-Abbau unterzogen. Es konnten neun Peptide mit bis zu 24 Aminosäuren sequenziert werden (s. Tab. 8). Teilweise konnten einigen Stellen in den Peptiden keine Aminosäuren eindeutig zugewiesen werden. Dies kann auf modifizierte oder auf schwer zu sequenzierende Aminosäuren (z.B. Serin) zurückzuführen sein, die Signalartefakte liefern und deswegen nur schwer zu interpretieren sind (Kellner *et al.*, 1994). Die Sequenzen der, aus unterschiedlichen Untereinheiten stammenden, Peptide C1-16 und C2-8 waren fast identisch (s. Tab. 8): C2-8 hatte eine weitere Aminosäure am C-terminalen Ende und bei C1-16 waren an den Stellen der sechs N-terminalen Aminosäuren jeweils zwei mögliche Aminosäuren angegeben (s. Tab. 8). Eine von diesen stimmte jedoch, mit nur einer Ausnahme, mit der Aminosäure aus C2-8 überein. Das Auftreten desselben Peptids in zwei Untereinheiten von CHLAMY 1 kann in mehrfacher Weise erklärt werden. Zunächst wäre es denkbar, dass die kleinere Untereinheit C2 ein Abbauprodukt der größeren (C1) darstellt oder aber durch posttranslationale Veränderungen aus dieser hervorgeht. Weiterhin könnten die Untereinheiten eine gleiche Domäne beinhalten, die zufällig bei beiden sequenziert wurde. Diese Möglichkeit konnte durch die Identifikation der *chlamy 1*-Gene mehr oder weniger ausgeschlossen werden, da eine cDNS-Sequenz bestimmt werden konnte, die für alle C1- und C2-Peptide kodiert (s. 4.6).

4.4 Peptid-Antikörper gegen die Untereinheiten von CHLAMY 1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Produktion von Peptid-Antikörpern gegen die Untereinheiten von CHLAMY 1 in Auftrag gegeben: AK1/2 war gegen das konservierte Peptid aus den Untereinheiten C1 und C2 gerichtet und AK3 gegen die Untereinheit C3. In immunochemischen Experimenten wurde festgestellt, dass der Titer der CHLAMY 1-spezifischen Antikörper gering war, da nur eine 1 : 100 Verdünnung der Antiseren ein einigermaßen deutliches Immunosignal lieferte. Die Spezifität der Antiseren konnte durch Immunofärbungen der zur Immunisierung verwendeten Peptide nachgewiesen werden (s. Abb. 16). Ferner wurden denaturierte Proteinextrakte aus *C. reinhardtii* aufgetrennt und für den Immunonachweis eingesetzt. Die Antiseren konnten zusätzlich zu den CHLAMY 1-Untereinheiten noch andere *C. reinhardtii*-Proteine erkennen (s. Abb. 17). Dies lässt sich durch die Analyse der identifizierten Proteinsequenzen der CHLAMY 1-Untereinheiten erklären (s. 3.9): AK1/2 wurde gegen ein Peptid (Aminosäuren 229-244; s. Anhang) produziert, welches in einer KH-Domäne liegt und das Peptid, gegen das AK3 gerichtet war (Aminosäuren 115-126; s. Anhang), liegt innerhalb einer RRM-Domäne. Somit können beide Antiseren theoretisch alle *C. reinhardtii*-Proteine erkennen, die solche Domänen tragen. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die Kaninchen-eigenen Antikörper *C. reinhardtii*-Proteine erkennen können (nicht dargestellt) und dadurch zu einer zusätzlichen Erhöhung des Hintergrundsignals beitrugen. Zur Reduzierung dieser Signale wurde versucht, die spezifischen CHLAMY 1-Antikörper aus den Antiseren abzutrennen (s. 3.7.2). Es konnte gezeigt werden, dass die Antiseren nach Passieren einer Peptidsäule nicht/kaum mehr in der Lage waren, die zur Immunisierung eingesetzten Peptide zu erkennen (s. Abb. 18). Eine Elution der spezifischen CHLAMY 1-Antikörper in aktiver Form war jedoch meist nicht möglich. Nur bei Aufreinigung des Serums AK3 konnten die eluierten Antikörper das zur Immunisierung eingesetzte Peptid, jedoch nicht die C3-Untereinheit in einem Western Blot, erkennen (s. Abb. 18B). Ein Grund hierfür lag wahrscheinlich in der geringen Konzentration des Proteins C3 im Rohextrakt oder aber es war ein Problem der Antikörper-Konzentration. Durch die Chromatographie wurde das eingesetzte Serum weit verdünnt und es wäre möglich, dass die Antikörper danach

in zu hoher Verdünnung vorlagen. Diese Überlegung wurde in einige Experimente mit einbezogen und es wurde eine Aufkonzentrierung der eluierten Antikörper durchgeführt. Danach konnten jedoch ebenfalls keine Signale in Western Blots detektiert werden (nicht gezeigt). Somit scheint der Verdünnungsfaktor nicht der ausschlaggebende Punkt zu sein. Eine Erklärung für die Inaktivität der Antikörper nach Elution könnte in den verwendeten Elutionspuffern zu suchen sein, die entweder die Antikörper nicht von der Säule lösen konnten oder aber deren Aktivität verminderten (Harlow und Lane, 1988). Ein weiterer Grund könnte eine mögliche Konformationsänderung des Antikörpers während der Elution sein (Harlow und Lane, 1988).

Im Laufe der Tests auf Spezifität der beiden Antiseren wurden zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen zwei Puffer überprüft: Blockierungspuffer I enthielt Milchpulver und Blockierungspuffer II „Slimfast Schoko“. Der Unterschied liegt in den darin enthaltenen Proteinen: beim ersten handelt es sich um Milcheiweiß, beim zweiten um Sojaeiweiß. Beide Puffer wurden in Western Blots zusammen mit Rohextrakt aus *C. reinhardtii* oder einer in CHLAMY 1-angereicherten Proteinfraktion mit den beiden Antiseren getestet (s. Abb. 17). Dabei fiel auf, dass sich beim Serum AK1/2, das gegen die 60 kDa und die 50 kDa Untereinheit gerichtet war, das Verhältnis der Signalstärken bei Verwendung von Blockierungspuffer I änderte. So war beim Rohextrakt ein Verhältnis von 1 : 3,6 für 60 kDa : 50 kDa zu detektieren. Durch eine 0,5-1 M AS-Fällung änderte sich dieses Verhältnis auf 1 : 1,4 (s. Abb. 17A). Bei Anreicherung von allen CHLAMY 1-Untereinheiten im gleichen Maße durch eine 0,5-1 M AS-Fällung würde man jedoch erwarten, dass sich das Verhältnis der beiden Untereinheiten zueinander nicht ändert. Dies war bei Verwendung von Blockierungspuffer II der Fall. Das Verhältnis der Untereinheiten C1 : C2 betrug jeweils ungefähr 1,2 : 1 (s. Abb. 17B). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das AK1/2-Antiserum bei Verwendung von Blockierungspuffer I zusätzlich ein Protein von 50 kDa erkennt, das keine Untereinheit von CHLAMY 1 darstellt. Mit Antiserum AK3, das gegen die 44 kDa große Untereinheit gerichtet war, konnten keine unterschiedlichen Ergebnisse ermittelt werden, die in Zusammenhang mit den beiden Blockierungspuffern standen.

4.5 Abundanz der CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C3 in einem Tag-Nacht-Zyklus

C. reinhardtii-Zellen, die über einen LD- und LL-Zyklus geerntet worden waren, wurden für die Überprüfung der Abundanz der CHLAMY 1-Untereinheiten in Western Blots eingesetzt (s. 3.8). Hierbei soll darauf hingewiesen werden, dass die Immunodetektion der Untereinheiten im Rohextrakt nicht sehr stark war, was auf die geringe Menge dieses regulatorischen Proteins in der Zelle und auf den niedrigen Titer der Antikörper zurückzuführen war. Die hier dargestellten Ergebnisse sind deswegen nur als vorläufige Hinweise auf die Abundanz der Proteine anzusehen.

Mit Antiserum AK3 konnten identische Ergebnisse unter LD und LL erzielt werden (s. Abb. 20). Die Menge an Untereinheit C3 (Größe 44 kDa) war zu den Zeiten am höchsten, in denen auch die Bindeaktivität von CHLAMY 1 am höchsten ist. Dies ist vom Ende des (subjektiven) Tages bis zur Mitte der (subjektiven) Nacht der Fall (Mittag, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Oszillation der Proteinmenge unabhängig vom LD-Wechsel ist und somit circadian gesteuert wird. Ob es sich dabei um eine Expressionskontrolle auf transkriptionaler und/oder translationaler Ebene handelt, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht gesagt werden.

Die CHLAMY 1-Untereinheit C2 (Größe 50 kDa) konnte durch das Antiserum AK1/2 in einem *C. reinhardtii*-Rohextrakt nur sehr schwach detektiert werden (s. Abb. 17B). Aus diesem Grund wurden nur die Signalstärken der Untereinheit C1 (Größe 60 kDa) in einem Tag-Nacht-Verlauf ausgewertet (s. Abb. 19). Hierbei wurde festgestellt, dass die Proteinmenge vom Ende des (subjektiven) Tages bis zur Mitte der (subjektiven) Nacht leicht anstieg. Dies korreliert mit der Bindeaktivität von CHLAMY 1 (Mittag, 1996). Die durchschnittlichen Signalstärken der immunodetektieren Untereinheit C1, die für die Menge des Proteins stehen, schwanken in einem Bereich von 14-20 % (unter LL bzw. LD) zwischen Minimum und Maximum. Dies dürfte sich innerhalb der Fehlertoleranz einer densidometrischen Auswertung bewegen, weshalb angenommen werden kann, dass die Untereinheit C2 konstitutiv exprimiert wird. Bei der Untereinheit C3 beträgt der Unterschied zwischen Minimum und Maximum bis zu 29,5 % (s.

Abb. 20), was wahrscheinlich nicht mehr innerhalb der Fehlertoleranz liegen dürfte.

Somit kann, aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, ausgesagt werden, dass die CHLAMY 1-Untereinheit C1 wahrscheinlich konstitutiv exprimiert wird, wohingegen die Expression von C3 aller Voraussicht nach circadian reguliert sein dürfte. Für eine genauere Aussage über die Abundanz aller drei CHLAMY 1-Untereinheiten sollen diese Experimente in Zukunft mit polyklonalen Antiseren wiederholt werden, die gegen größere Teilbereiche der Proteine gemacht werden (s. 4.9).

4.6 Identifikation der *chlamy 1*-cDNS-Sequenzen

Bei CHLAMY 1 handelt es sich um ein regulatorisches Protein, das in geringer Menge in einer Zelle vorkommt. Dies wurde auch durch die Aufreinigung bestätigt, für die eine sehr große Menge an Zellen nötig war (s. 3.4.2). Somit könnte auch die Menge der *chlamy 1*-RNS gering sein, was eine Schwierigkeit für die Isolierung der *chlamy 1*-Gene darstellte. Ausgehend von den Peptid-Sequenzen der einzelnen CHLAMY 1-Untereinheiten wurden degenerierte Oligonukleotide kreiert. Diese wurden für die Sichtung einer cDNS-Bank aus *C. reinhardtii* und für PCR-Experimente eingesetzt (s. 3.6). Durch beide Ansätze war es nicht möglich die *chlamy 1*-Gene zu isolieren. Dies ist auf die eingesetzten Oligonukleotide zurückzuführen, die bis zu 2048 fach degeneriert waren und allem Anschein nach unspezifisch an *C. reinhardtii*-Sequenzen binden konnten. Nach Auswertung aller CHLAMY 1-Proteine (s. 3.9.2 und 3.9.3) wurde weiterhin festgestellt, dass die Positionen der durch die Peptid-Sequenzierung bekannten Peptide teilweise nah beieinander liegen, was eine Amplifikation durch PCR zusätzlich erschwerte.

Durch die Produktion von Peptid-Antikörpern war es möglich, die Sichtung einer Expressions-Genbank aus *C. reinhardtii* durchzuführen (s. 3.9.1). Die RNS, die für die Herstellung dieser Genbank verwendet wurde, war aus Zellen isoliert worden, die zu LD 10 geerntet worden waren. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die CHLAMY 1-Bindeaktivität anzusteigen (Mittag, 1996) und man kann erwarten,

dass auch die RNS für die einzelnen Untereinheiten vorhanden sein sollte. Zur Sichtung wurden die zwei Antiseren AK1/2 und AK3 eingesetzt. Diese konnten zusätzlich zu *C. reinhardtii*-Proteinen auch Proteine aus *E. coli* erkennen (nicht gezeigt). Dadurch waren die Hintergrundsignale zu erklären, die während der Genbank-Sichtung auftraten. Durch die IPTG-Stimulierung wurde die Expression der cDNS-Fragmente angeregt, wodurch jeder überprüfte Phage eine große Menge an einem *C. reinhardtii*-Protein enthielt. Die Erkennung eines solch exprimierten Proteins durch einen Antikörper rief eine Verstärkung des Immunosignals gegenüber dem Hintergrund hervor. Die so identifizierten Phagen wurden zusätzlich mit Antiseren getestet, die keine CHLAMY 1-spezifischen Antikörper enthielten (AK1/2^{-} und AK3^{-}; s. 3.7.2). Dadurch konnte überprüft werden, ob der untersuchte Phage CHLAMY 1 oder ein anderes *C. reinhardtii*-Protein exprimierte. Durch Sequenzierungen von isolierten cDNS-Fragmenten konnten zwei Klone identifiziert werden, die jeweils einen Großteil eines *chlamy 1*-Gens trugen. Der Klon pCS30 trug einen Teil von *chlamy 1-C1/2* und pCS31 einen Teil von *chlamy 1-C3* (s. Abb. 22 und Abb. 24).

Zur Identifizierung von 5'-Enden der beiden Klone wurden deren cDNS-Sequenzen auf Homologie zu den EST-Klonen aus *C. reinhardtii* überprüft. Hierdurch konnten Sequenzen identifiziert werden, die eine Verlängerung der bisher bekannten *chlamy 1*-Teilklone Richtung 5' ermöglichten (s. 3.9.2.2 und 3.9.3.2). Somit konnten für alle Untereinheiten die vollständigen ORFs identifiziert werden.

Es wurde eine cDNS-Sequenz identifiziert, die für die zwei Untereinheiten C1 und C2 kodiert (Sequenz s. Anhang). Dabei liegen sowohl die zwei nur bei C1 als auch die zwei nur bei C2 sequenzierten Peptide in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander (s. Abb. 23B). Das in beiden Untereinheiten identifizierte Peptid liegt zwischen den zwei C2-Peptiden. Der ORF hat eine Länge von 1533 Bp und kodiert für ein Protein mit einer errechneten Molekularmasse von 51,73 kDa. Aufgrund der Aufreinigung und der denaturierenden Molekularmassen-bestimmung von CHLAMY 1 wurde für die Untereinheit C1 eine Größe von 60 kDa und für C2 eine Größe von 50 kDa erwartet. Die durch die ORF-Analyse bestimmte Molekularmasse stimmt damit nicht überein. Es wurden jedoch

Regionen für mögliche posttranslationale Modifikationen identifiziert. Wenn man bedenkt, dass es dadurch zu einer Vergrößerung der Molekularmasse kommen kann, dann kann man davon ausgehen, dass 51,73 kDa die Größe der Untereinheit C1 ohne Modifikationen darstellen kann. Es ist denkbar, dass die kleinere Untereinheit C2 ein Abbauprodukt der größeren darstellt, was auf Spaltung durch Proteasen zurückzuführen sein könnte. Es könnte sich aber auch um das gleiche Protein handeln, welches in unterschiedlichem Maße posttranslational modifiziert wird. In *N. crassa* wurde z.B. gezeigt, dass das Protein FRQ im Tag-Nacht-Verlauf mehr oder weniger stark phosphoryliert wird und sich somit seine Molekularmasse ändert (Garceau *et al*., 1997). Es ist jedoch auch möglich, dass die beiden Proteine ausgehend von einer DNS durch differentielles „splicing" entstehen. Ein solcher Mechanismus wurde beispielsweise für die beiden RNS-Bindeproteine How(L) und How(S) aus *D. melanogaster* gezeigt (Nabel-Rosen *et al*., 1999): Ausgehend von einem Gen werden hier zwei RNS gebildet, die für die zwei Proteine kodieren. Ein solcher Mechanismus wäre auch für die CHLAMY 1-Untereinheiten C1 und C2 denkbar: Durch differentielles „splicing" (Übersicht in White, 2001) könnten zwei RNS entstehen, deren Translation in zwei Proteinen resultieren könnte. Bei der Analyse der bisher identifizierten cDNS-Sequenz konnte festgestellt werden, dass N-terminal von den bekannten C2-Peptiden ein Methionin liegt, dessen Nukleotid-Sequenz (Basen 428-430; s. Anhang) in optimalem Kozak-Kontext (Kozak, 1991; Joshi *et al*., 1997) vorliegt. Somit wäre es denkbar, dass eine durch „splicing" entstandene, am 5'Ende verkürzte RNS, für ein Protein kodiert, das an diesem potentiellen Start-Codon beginnen könnte. Dieses Protein hätte eine Länge von 412 Aminosäuren und eine errechnete Molekularmasse von 41,3 kDa. Dieses entspricht zwar nicht der durch die durchgeführten Experimente bestimmten Größe von 50 kDa für die Untereinheit C2, jedoch sind auch hier posttranslationale Modifikationen möglich.

Die für CHLAMY 1-C3 kodierende cDNS-Sequenz konnte ebenfalls identifiziert werden (Sequenz s. Anhang). N-terminal von den durch die Sequenzierung bekannten C3-Peptiden konnten ein Stop-Codon und ein direkt dahinterliegendes Start-Codon gefunden werden (s. Anhang). Dieses ist für die Initiation der Translation geeignet, da es in gutem Kozak-Kontext vorliegt (Kozak, 1991; Joshi

et al., 1997). Durch die Aufreinigung von CHLAMY 1 und die denaturierende Molekularmassenbestimmung wurde eine Größe von 44 kDa für diese Untereinheit bestimmt (s. Tab. 7). Die errechnete Molekularmasse, ausgehend von der Nukleotid-Sequenz, liegt hingegen bei 45 kDa. Hierbei soll darauf hingewiesen werden, dass die Molekularmassenbestimmung eines Proteins im SDS-Gel nicht 100 % exakt ist und es somit zu dem hier bestimmten Unterschied von 1 kDa kommen kann. Des weiteren haben einige Proteine in SDS-Gelen ein verändertes Laufverhalten, d.h. ihre durch Elektrophorese bestimmte Molekularmasse stimmt nicht mit der tatsächlichen überein (Daxberger, persönliche Mitteilung). Weiterhin könnte der Größenunterschied auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein. So könnte z.B. zuerst ein Vorläuferprotein abgespalten werden, wodurch das Protein verkürzt wird und dann könnte es durch zusätzliche posttranslationale Modifikationen in seine aktive Form überführt werden.

4.7 Protein-Domänen der CHLAMY 1-Untereinheiten

In allen Untereinheiten von CHLAMY 1 konnten Homologien zu Protein-Domänen festgestellt werden, die bei der RNS-Bindung eine Rolle spielen. Bei den Untereinheiten C1/2 wurden in drei Regionen Ähnlichkeiten zur KH-Domäne entdeckt (s. Abb. 23B) und bei C3 konnten in drei Abschnitten des Proteins Homologien zum RRM aufgefunden werden (s. Abb. 25B). Diese zwei hochkonservierten RNS-Bindedomänen können in Proteinen von Bakterien bis hin zum Menschen gefunden werden (Burd und Dreyfuss, 1994). So wurde vor kurzem das gesamte *A. thaliana*-Genom auf das Vorhandensein von Proteinen durchsucht, die eine dieser zwei Domänen tragen (Lorković und Barta, 2002): Es konnten 196 RRM-tragende Proteine und 26 Proteine mit KH-Domänen identifiziert werden. Das Auftreten von mehreren gleichen Protein-Domänen in einem Protein ist weit verbreitet (Burd und Dreyfuss, 1994). So trägt das Vigilin aus dem Huhn 14 KH-Domänen (Schmidt *et al*., 1992) und Nucleolin aus der Maus insgesamt vier RRM-Domänen (Bourbon *et al*., 1988).

Es wurde während dieser Arbeit gezeigt, dass es sich bei CHLAMY 1 um ein Multimer handelt, das wahrscheinlich aus drei Untereinheiten aufgebaut ist (s. 4.2). Einen Hinweis auf eine mögliche Bindung der Proteine untereinander gibt die identifizierte Homologie zur WW-Domäne in C1/2 (s. Abb. 23B). Diese spielt eine Rolle in der Protein-Protein-Interaktion indem die Aminosäuren der WW-Domäne an eine Prolin-reiche Region in einem anderen oder aber dem gleichen Protein binden können (Sudol *et al*., 1995; Sudol und Hunter, 2000). Sowohl in C1/2 (Aminosäuren 367-369) als auch in C3 (Aminosäuren 94-96) konnten Konsensus-Sequenzen (RPP bzw. PPR; s. Anhang) identifiziert werden, die eine Bindung von WW-Domänen ermöglichen. Es wurde bereits gezeigt, dass die WW-Domäne des Proteins Npw38 mit einer Region des Proteins NpwBP interagieren kann, die einen Prolin-reichen Bereich mit einem Arginin trägt (Komuro *et al*., 1999). Somit wäre es möglich, dass die Untereinheiten von CHLAMY 1 durch eine Interaktion der WW-Domäne in C1/2 mit den Bindungssstellen in C1/2 und C3 aneinander binden könnten.

Im Protein C3 konnte eine Methionin-reiche Domäne identifiziert werden (s. Abb. 25). Eine solche Region ist beispielsweise im Protein SRP54 vorhanden, das Bestandteil des SRP-Komplexes (= „signal recognition particle“) ist und in der Translokation der Ribosomen zum Endoplasmatischen Retikulum eine Rolle spielt (Übersicht in Lütcke, 1995). Die am C-Terminus liegende Methionin-reiche Domäne in SRP54 kann sowohl an die Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette im Ribosom (Lütcke *et al*., 1992) als auch an den RNS-Anteil im SRP binden (Zopf *et al*., 1990). Für die erfolgreiche Bindung an die RNS benötigt SRP54 die Mitwirkung einen zweiten Proteins (Zopf *et al*., 1990). Eine solche Situation wäre auch für CHLAMY 1 denkbar: Die Untereinheit C3 kann eventuell nur dann an die „UG“-Wiederholungen in der 3’-NTR verschiedener RNS binden, wenn zuvor bereits die Bindung von C1 und/oder C2 stattgefunden hat. Experimentelle Hinweise für einen solchen Mechanismus existieren bisher noch nicht.

In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits auf die Regulation der Proteinaktivität oder –stabilität durch Phosphorylierung eingegangen (s. 1.2.2). So ist beispielsweise die Lokalisation und Stabilität von PER in Säugern abhängig

vom Phosphorylierungsstatus (Vielhaber *et al*., 2000; Keesler *et al*., 2000). Die Regulation durch Phosphorylierung scheint ein konservierter Mechanismus in der circadianen Rhythmik zu sein (Übersicht in Young und Kay, 2001): Die Casein-Kinasen 1 und 2, als auch die Protein-Kinase C und die Glykogen-Synthase-Kinase 3 spielen dabei eine Rolle in verschiedenen Organismen. In allen CHLAMY 1-Untereinheiten konnten mögliche Erkennungsstellen für Protein-Kinasen (s. Anhang) identifiziert werden. Die Erkennungsstelle für die Serin/Threonin Casein-Kinase 2 (= CK2; Allende und Allende, 1995) wurde in der Untereinheit C1/2 viermal und in C3 dreimal gefunden. In *A. thaliana* phosphoryliert CK2 beispielsweise die beiden Proteine CCA1 und LHY (Sugano *et al*., 1998 und 1999), die Bestandteil des circadianen Oszillators und wahrscheinlich auch des Ausgangs sind (Übersicht in McClung, 2001). Die Serin/Threonin Protein-Kinase C (= PKC; Newton, 1995) spielt bei der Phosphorylierung von hPER1 im circadianen Schrittmacher beim Menschen eine Rolle (Motzkus *et al*., 2000). Für PKC konnten ebenfalls Erkennungsstellen in den CHLAMY 1-Untereinheiten identifiziert werden (in C1/2 dreimal und in C3 zweimal). Aufgrund der Aufgaben für phosphorylierte Proteine im circadianen System anderer Organismen ist es wahrscheinlich, dass auch bei CHLAMY 1 Phosphorylierungsmechanismen eine Aufgabe, z.B. in der Regulation der Bindeaktivität oder der Proteinstabilität, haben könnten. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass nicht jede identifizierte Phosphorylierungsstelle *in vivo* auch tatsächlich phosphoryliert wird.

Zusätzlich wurden in allen drei Untereinheiten Stellen für eine mögliche Glykosylierung identifiziert (s. Anhang). Das Vorkommen einer solchen Erkennungsstelle zieht jedoch nicht automatisch eine Glykosylierung nach sich (Gavel und von Heijne, 1990). Für CHLAMY 1 existieren bisher noch keine Hinweise darauf, ob eine Glykosylierung stattfindet.

In der Untereinheit C3 konnte ein Tripeptid mit der Sequenz RGD (Aminosäuren 98-100; s. Anhang) identifiziert werden. Dieses ist z.B. bei Fibronectin entscheidend für die erfolgreiche Bindung an einen Zelloberflächenrezeptor (D'Souza *et al*., 1991). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass RGD-Domänen auch

andere Funktionen ausüben oder aber sogar funktionslos sein können (Ruoslahti und Pierschbacher, 1986).

4.8 RNS-Bindeproteine in *V. carteri* und *N. crassa*

4.8.1 VOLVO 1 und VOLVO 2 in *V. carteri*

Das nur in Somazellen von *V. carteri* exprimierte Protein RegA (Kirk *et al*., 1999) spielt bei der Differenzierung dieses klonalen Vielzellers eine wichtige Rolle (Übersicht in Kirk, 1997). Zusätzlich zur transkriptionalen Regulation seiner Genexpression (Stark *et al*., 2001) konnten durch Untersuchungen zur Abundanz der RNS (Kirk *et al*., 1999) Hinweise auf eine translationale Regulation gefunden werden. In der 3'-NTR der *regA*-mRNS konnte ein Bereich mit 16 „UG"-Wiederholungen in Folge identifiziert werden, der die spezifische Bindung eines Proteins ermöglichte. Eine Beeinflussung der Translation durch „UG"-Bindeproteine wurde bereits gezeigt (s. 1.2.3 und diese Arbeit).

Durch Einsatz der *regA*-mRNS in Bindestudien konnte gezeigt werden, dass CHLAMY 1 spezifisch an die 16 „UG"-Wiederholungen in der 3'-NTR dieser RNS binden kann (s. 3.10.1.1). In Kompetitions-Experimenten wurde die Bindestärke des Proteins untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Bindeaktivität von CHLAMY 1 zu *regA* bereits bei einem 0,1x molarem Überschuss an spezifischem Kompetitor auf 50 % gesunken war (Auswertung von Abb. 26B). Experimente mit der Zielsequenz *gs2* aus *C. reinhardtii* zeigten, dass mit diesem Transkript die CHLAMY 1-Bindeaktivität bei einem 1x molarem Überschuss an Kompetitor auf 50 % reduziert war (Waltenberger *et al*., 2001). CHLAMY 1 kann somit ungefähr zehnmal stärker an *regA* als an *gs2* binden.

In Bindestudien mit Proteinextrakten aus *V. carteri* konnten zwei Proteine nachgewiesen werden, die an die 3'-NTR der *regA*-mRNS binden können (s. 3.10.1.2). Ein Protein bindet dabei spezifisch an die 16 „UG"-Wiederholungen und wurde als VOLVO 1 bezeichnet. Das andere Protein (VOLVO 2) bindet an eine Region außerhalb dieses Bindemotivs. Beim *V. carteri* Stamm HK10 konnte die Bindung von zwei Proteinen an *regA* erst nach Durchführung von „UV-crosslinking" Experimenten bestätigt werden (s. Abb. 29), da bei den zuvor

durchgeführten Bindestudien mit *regA*$_{wt}$ nur ein eindeutiger Protein-RNS-Komplex und ein diffuses Signal detektiert werden konnten (s. Abb. 28A). In „UV-crosslinking“ Experimenten konnten dagegen zwei Protein-RNS-Komplexe detektiert werden, wovon einer mit beiden eingesetzten Transkripten (*regA*$_{wt}$ und *regA*$_{mut}$) zu identifizieren war. Dabei handelt es sich um den unspezifischen VOLVO 2-RNS-Komplex mit einer Größe von 36 kDa. Das spezifisch bindende Protein VOLVO 1 ergibt mit der kovalent gebundenen *regA*$_{wt}$-RNS einen Komplex von 25,5 kDa. Das Vorhandensein von zwei an die *regA*-mRNS bindenden Proteinen konnte auch durch Bindestudien mit der *V. carteri*-Mutante 153-68 bestätigt (s. Abb. 28B und Abb. 29) werden, der ein funktionelles RegA-Protein fehlt. Sowohl VOLVO 1 als auch VOLVO 2 konnten in diesem Stamm nachgewiesen werden. Bei den durchgeführten „UV-crosslinking“ Experimenten zur Bestimmung der Molekularmassen der RNS-Bindeproteine, konnten im Stamm 153-68 zwei spezifische Protein-RNS-Komplexe mit den Größen 25,5 und 27 kDa detektiert werden. Der kleinere Komplex trat dabei stärker hervor als der größere. Mit den Proteinextrakten des Stammes HK10 konnte nur der 25 kDa große spezifische Protein-RNS-Komplex detektiert werden (s. Abb. 29). Aufgrund seiner schwachen Färbungsintensität kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der 27 kDa-Komplex nur aufgrund seiner noch schwächeren Intensität nicht zu detektieren war.

Die Auswertung der Bindestudien zeigte, dass die Signalstärken der Protein-RNS-Komplexe in der Mutante 153-68 intensiver waren als im Wildtypstamm HK10. Dies lässt auf eine größere Menge an beiden Proteinen in diesem Stamm schließen. Diese Beobachtung könnte mit einer möglichen Funktion des RegA-Proteins erklärt werden. Die beiden Stämme unterscheiden sich in der An- bzw. Abwesenheit eines funktionellen RegA-Proteins (Kirk *et al*., 1999). Ein mögliches Szenario wäre ein Rückkopplungsmechanismus: RegA verhindert die Transkription von *volvo 1*, welches wiederum die Translation der *regA*-RNS hemmt. Somit könnte RegA im Wildtypstamm seine eigene Translation über den beschriebenen Mechanismus positiv beeinflussen, da der Repressor VOLVO 1 nicht synthetisiert wird. Bei der RegA-Mutante 153-68 jedoch kann der Rückkopplungsmechanismus nicht in Kraft treten, da hier kein funktionelles

RegA gebildet wird, welches die *volvo 1*-Transkription reprimieren könnte. Somit könnte VOLVO 1 konstitutiv exprimiert werden und durch Bindung an die 3'-NTR der *regA*-RNS deren Translation verhindern. Durch dieses Modell können auch die stärkeren Intensitäten der Protein-RNS-Komplexe im Stamm 153-68 erklärt werden, da hier mehr VOLVO 1 vorliegt und somit eine größere Anzahl der Komplexe gebildet werden kann.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche kann VOLVO 1 jedoch noch nicht als CHLAMY 1 analoges Protein bezeichnet werden, da Untersuchungen seiner Bindeaktivität im Laufe eines Lebenszyklus unter LD- und LL-Bedingungen nicht ausgeführt wurden. Erst durch den Nachweis einer circadian regulierten Bindeaktivität kann von einem CHLAMY 1-Analogen gesprochen werden.

4.8.2 CRASSA 1 und CRASSA 2 in *N. crassa*

Proteinextrakte aus dem Pilz *N. crassa* wurden im Rahmen dieser Arbeit auf das Vorhandensein eines RNS-Bindeproteins hin untersucht, das an die 3'-NTR der *gs2* aus *C. reinhardtii* binden kann. Es konnten zwei Bindeproteine (CRASSA 1 und CRASSA 2) identifiziert werden (s. 3.10.2). Der CRASSA 1-RNS-Komplex konnte durch den Einsatz von zwei spezifischen Kompetitoren in unterschiedlichem Maße verdrängt werden (s. Abb. 30B). Die Kompetition war bei Einsatz von $gs2_{wt}$ stärker als bei $gs2_{mut}$, was darauf schließen ließ, dass CRASSA 1 (zumindest teilweise) spezifisch an die „UG"-Wiederholungen binden kann. Die schwächere Bindung an $gs2_{mut}$ könnte auf das Vorhandensein von zwei der ursprünglich sieben „UG"-Wiederholungen in diesem Transkript (Waltenberger *et al*., 2001) zurückführen sein. In *C. reinhardtii* und *G. polyedra* wurde gezeigt, dass eine Bindung von CHLAMY 1 bzw. dem CCTR an eine RNS mit nur zwei „UG"-Wiederholungen nicht mehr möglich ist (Mittag und Waltenberger, 1997). Dies muss jedoch nicht auch für ein Protein aus *N. crassa* zutreffen. Die Bindung von CRASSA 1 an *gs2* ist im allgemeinen als schwach anzusehen, da sogar bei einem 1600 fachem molarem Überschuss an spezifischem Kompetitor eine vollständige Verdrängung des radioaktiven CRASSA 1-RNS-Komplexes nicht möglich war.

Die Verdrängung des schwächeren CRASSA 2-RNS-Komplexes in Kompetitions-Experimenten war mit beiden spezifischen Kompetitoren ($gs2_{wt}$ und $gs2_{mut}$) in gleichem Maße möglich (s. Abb. 30B). Dies zeigte, dass CRASSA 2 unspezifisch an *gs2* aus *C. reinhardtii* bindet. Die Detektion dieses unspezifischen Protein-RNS-Komplexes war jedoch in Bindestudien ohne Kompetition mit dem radioaktiv markiertem $gs2_{mut}$-Transkript nicht möglich (s. Abb. 30A). Dies könnte auf die sehr schwache Bindeaktivität des Proteins zurückzuführen sein.

Um die Bindeaktivität von CRASSA 1 in einem Tagesverlauf untersuchen zu können, wurden *N. crassa*-Kulturen sowohl unter DL- als auch unter DD-Bedingungen geerntet und die Proteinextrakte für Bindestudien eingesetzt (s. 3.10.2). Hierzu wurde, wie bei allen anderen durchgeführten Experimenten auch, der *N. crassa*-Stamm frq^{+} verwendet, der unter freilaufenden Bedingungen eine Periode von 22 h zeigt (Merrow *et al*., 2001). Unter DL konnte eine Oszillation der Bindeaktivität mit zwei Maxima (zu DL 6 und DL 21) gezeigt werden. Unter DD wurden ebenfalls zwei Maxima (zu DD 4 und DD 20) identifiziert, wobei jedoch die Amplitude reduziert war. Wenn man die 22 h lange Periode des Stammes unter konstanten Bedingungen mit einbezieht, stellt man fest, dass sich die Zeiten der Bindemaxima unter DL und DD gleichen. Folglich scheint die Bindeaktivität des Proteins unabhängig vom Dunkel-Licht-Wechsel zu sein und von der inneren Uhr kontrolliert zu werden. Das RNS-Bindeprotein CRASSA 1 scheint somit ein analoges Protein zu CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* und zum CCTR aus *G. polyedra* darzustellen. In Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich, die oben erwähnten Bindestudien in einem Tag-Nacht-Verlauf in unabhängigen Experimenten zu überprüfen. Somit handelt es sich hierbei nur um vorläufige Ergebnisse.

In einer Genbank-Suche konnten unzählige Klone (BAC-Klone = „Bacterial Artificial Chromosom“) aus dem Sequenzierungsprojekt von *N. crassa* identifiziert werden, die mindestens sieben „UG“-Wiederholungen tragen. Da die Funktionen dieser DNS-Fragmente bisher meistens noch nicht bekannt ist, können bis zu diesem Zeitpunkt keine möglichen Zielgene mit bekannter Funktion für die CRASSA 1-Bindung angegeben werden.

4.8.3 Phylogenetische Konservierung von „UG“-Bindeproteinen

Proteine, die an „UG“-Wiederholungen in den 3’-NTRen verschiedener RNS binden können, scheinen in der Stammesgeschichte konserviert zu sein. So wurden die beiden analogen Proteine CCTR und CHLAMY 1 in zwei Algen identifiziert, die phylogenetisch weit auseinander stehen: *G. polyedra* gehört zu den Dinoflagellaten und *C. reinhardtii* zu den Grünalgen (Mittag, 1996). *V. carteri* steht am Ende einer aufsteigenden Reihe vom Einzeller *C. reinhardtii* über die klonalen Vielzeller *Gonium*, *Pandorina, Eudorina* und *Pleodorina* (Kirk, 1998). Die Identifikation von VOLVO 1 (s. 3.10.1.2) weist darauf hin, dass das „UG“-Bindemotiv in dieser phylogenetischen Entwicklung konserviert wurde. Die Organismen *N. crassa* und Ratte sind hingegen phylogenetisch weiter entfernt von *C. reinhardtii* und die Identifikation von CRASSA 1 (s. 3.10.2) bzw. den UR-BPs (Bareiß, Wollnik und Mittag, nicht veröffentlicht) zeigt, dass „UG“-Bindeproteine in mehreren Klassen von Organismen vorkommen und somit phylogenetisch konserviert sein könnten.

4.9 Ausblick

Durch die Identifikation der ORFs für alle CHLAMY 1-Untereinheiten wird es in Zukunft möglich sein, die jeweiligen Proteine überzuexprimieren. Diese können dann für die Produktion polyklonaler Antikörper eingesetzt werden, die, im Gegensatz zu den Peptid-Antikörpern, eine höhere Spezifität zeigen sollten. Hierdurch kann die Abundanz der CHLAMY 1-Untereinheiten in einem Western Blot einfacher untersucht werden, da die Antikörper wahrscheinlich auch einen höheren Titer haben und somit geringere Proteinmengen erkennen können. Zusätzlich könnten die Antikörper zur Isolierung von CHLAMY 1 analogen Proteinen in anderen Organismen (z.B. *V. carteri, N. crassa*, Ratte und Maus) eingesetzt werden. Hierzu muss in Vorversuchen zuerst überprüft werden, ob Antikörper, die gegen ein *C. reinhardtii*-Protein gerichtet sind, in der Lage sind Proteine aus diesen Organismen zu erkennen.

Beim analogen Protein CCTR aus *G. polyedra* existieren Anzeichen dafür, dass dessen Bindeaktivität durch Phosphorylierung geregelt sein könnte (Mittag,

unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit wurde auf eine mögliche Phosphorylierung von CHLAMY 1 hingewiesen (s. 4.7). Durch Einsatz von verschiedener Phosphatasen und einer darauffolgenden Untersuchung der CHLAMY 1-Bindeaktivität und/oder -Abundanz sollte es möglich sein, diese Aussage zu überprüfen.

Die Identifikation der *chlamy 1*-cDNS-Sequenzen eröffnet zusätzliche Möglichkeiten für deren Untersuchung auf DNS/RNS-Ebene. So können Northern Blots mit Proben über einen Tag-Nacht-Verlauf mit Sonden gegen die verschiedenen Untereinheiten hybridisiert werden. Hierdurch kann auf die Expressionskontrolle der *chlamy 1*-Gene rückgeschlossen werden. Eine konstante RNS-Menge über einen Tag-Nacht-Verlauf würde auf eine translationale und eine Oszillation auf eine transkriptionale Kontrolle hindeuten. Posttranslationale Modifikationen der Proteine sind dadurch jedoch nicht auszuschließen. Von den cDNS-Sequenzen können zusätzlich synthetische Oligonukleotide abgeleitet werden, die dann für PCR-gestützte Ansätze verwendet werden können. Dadurch kann das (noch nicht bekannte) 5'-Ende der Sequenzen ampliziert werden und es wird zusätzlich möglich sein, die genomische Sequenz der *chlamy 1*-Gene zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Die regulatorischen Fähigkeiten des RNS-Bindeproteins CHLAMY 1 aus *C. reinhardtii* wurden unter Verwendung eines chimären Reporterkonstruktes überprüft. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass ein in CHLAMY 1-angereichertes Proteingemisch die Translation dieses Reporterkonstruktes in einem zellfreien System um durchschnittlich 14,56 % reprimieren konnte.

Durch eine Molekularmassenbestimmung unter nativen und denaturierenden Bedingungen wurde der Aufbau von CHLAMY 1 aus mehreren Untereinheiten gezeigt. Der native Komplex hat eine Größe von ca. 160 kDa und besteht, ausgehend von den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten unter denaturierenden Bedingungen, aus den drei Untereinheiten C1 bis C3.

Die Aufreinigung von CHLAMY 1 wurde in drei Schritten ausgeführt: (a) Herstellung eines Rohextraktes, (b) Durchführung einer 0,5-1 M AS-Fällung und (c) Ausführung einer spezifischen RNS-Affinitätschromatographie. Es konnten dadurch drei für CHLAMY 1 spezifische Proteine mit den Molekularmassen 60, 50 und 44 kDa aufgereinigt werden. Durch eine Peptid-Sequenzierung wurden insgesamt neun Peptide mit einer Länge von bis zu 24 Aminosäuren sequenziert. Hierbei wurde ein Peptid identifiziert, das Bestandteil der zwei Untereinheiten C1 und C2 ist.

In Western Blot-Analysen mit *C. reinhardtii*-Rohextrakten und Peptid-Antikörpern wurde die Abundanz der CHLAMY 1-Untereinheiten über einen Tag-Nacht-Verlauf bestimmt. Die Untereinheit C1 (60 kDa) scheint konstitutiv exprimiert zu werden, wohingegen die Expression von C3 (44 kDa) von der inneren Uhr kontrolliert zu sein scheint.

Durch die Sichtung einer Expressions-Genbank aus *C. reinhardtii* mit Peptid-Antikörpern wurden zwei für CHLAMY 1 kodierende cDNS-Fragmente isoliert und durch EST-Klone aus dem Sequenzierungsprojekt von *C. reinhardtii* Richtung 5'-Ende verlängert. Alle Peptide der Untereinheiten C1 und C2 konnten in einer cDNS identifiziert werden, deren ORF für ein Protein von 51,73 kDa kodiert. Für die Untereinheit C3 wurde ein ORF identifiziert, der für ein Protein

der Molekularmasse 45,00 kDa kodiert. In allen Proteinen wurden Regionen für mögliche posttranslationale Modifikationen identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass „UG"-Bindeproteine auch in anderen Organismen vorkommen. CHLAMY 1 kann spezifisch an die 16 „UG"-Wiederholungen in der 3'-NTR der *regA*-mRNS aus *V. carteri* binden. In dieser Kugelalge wurde außerdem ein RNS-Bindeprotein (VOLVO 1) identifiziert, das spezifisch an diese „UG"-haltige Region bindet. Im Pilz *N. crassa* konnte ein CHLAMY 1 analoges Protein identifiziert werden (CRASSA 1), das an die sieben „UG"-Wiederholungen in der 3'-NTR von $gs2_{wt}$ aus *C. reinhardtii* binden kann. Die Bindeaktivität in einem Tag-Nacht-Verlauf scheint von der circadianen Uhr gesteuert zu werden.

6 Literaturverzeichnis

Allende, J.E. and Allende, C.C. (1995). Protein kinases. 4. Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and a puzzling regulation. FASEB J. **9**, 313-323.

André, B. and Springael, J.-Y. (1994). WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-Associated Protein YAP65. Biochem. Biophys. Res. Commun. **205**, 1201-1205.

Asamizu, E., Miura, K., Kucho, K., Inoue, Y., Fukuzawa, H., Ohyama, K., Nakamura, Y. and Tabata, S. (2000). Generation of expressed sequence tags from low-CO_2 and high-CO_2 adapted cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. DNA Res. **7**, 305-307.

Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Fukuzawa, H. and Tabata, S. (1999). A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. I. generation of 3433 non-redundant expressed sequence tags. DNA Res. **6**, 369-373.

Aschoff, J. (1967). Circadian rhythm in man isolation. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. **73**, 941-942.

Aschoff, J. (1994). The timing of defecation within the sleep-wake cycle of humans during temporal isolation. J. Biol. Rhythms **9**, 43-50.

Baker, M.E., Grundy, W.N. and Elkan, C.P. (1998). Spinach CSP41, an mRNA-binding protein and ribonuclease, is homologous to nucleotide-sugar epimerases and hydroxysteroid dehydrogenases. Biochem. Biophys. Res. Comm. **248**, 250-254.

Bandziulis, R.J., Swanson, M.S. and Dreyfuss, G. (1989). RNA-binding proteins as developmental regulators. Genes Dev. **3**, 431-437.

Barak, S., Tobin, E.M., Andronis, C., Sugano, S. and Green, R.M. (2000). All in good time: the *Arabidopsis* circadian clock. Trends Plant Sci. **5**, 517-522.

Bernstein, H.D., Poritz, M.A., Strub, K., Hoben, P.J., Brenner, S. and Walter, P. (1989). Model for signal sequence recognition particle. Nature **340**, 482-486.

Birney, E., Kumar, S. and Krainer, A.R. (1993). Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. Nucleic Acids Res. **21**, 5803-5816.

Bourbon, H.M., Lapeyre, B. and Amalric, F. (1988). Structure of the mouse nucleolin gene. The complete sequence reveals that each RNA binding domain is encoded by two independent exons. J. Mol. Biol. **200**, 627-638.

Bruce, V.G. (1970). The biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Protozool. **17**, 328-334.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. Biotechniques **5**, 376-379.

Burd, C.G. and Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. Science **265**, 615-621.

Byrne, T.E., Wells, M.R. and Johnson, C.H. (1992). Circadian rhythms of chemotaxis to ammonium and methylammonium uptake in *Chlamydomonas.* Plant Physiol. **98**, 879-886.

Ceriani, M.F., Darlington, T.K., Staknis, D., Más, P., Petti, A.A., Weitz, C.J. and Kay, S.A. (1999). Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. Science **285**, 553-556.

Chen, Z.-Y. and Silflow, C.D. (1996). Isolation and characterization of glutamine synthetase genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. **112**, 987-996.

Clifford, R., Lee, M-H., Nayak, S., Ohmachi, M., Giorgini, F. and Schedl, T. (2000). FOG-2, a novel F-box containing protein, associates with the GLD-1 RNA binding protein and directs male sex determination in *C. elegans* hermaphrodite germline. Development **127**, 5265-5276.

Craig, A.W.B., Haghighat, A., Yu, A.T.K. and Sonenberg, N. (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. Nature **392**, 520-523.

Daan, S. and Pittendrigh, C.S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. J. Comp. Physiol. A **106**, 253-266.

Dahanukar, A., Walker, J.A. and Wharton, R.P. (1999). Smaug, a novel RNA-binding protein that operates a translational switch in *Drosophila*. Mol. Cell **4**, 209-218.

Danon, A. and Mayfield, S.P. (1994). ADP-dependent phosphorylation regulates RNA-binding *in vitro*: implications in light-modulated translation. EMBO J. **13**, 2227-2235.

Darlington, T.K., Wager-Smith, K., Ceriani, M.F., Stankis, D., Gekakis, N., Steeves, T., Weitz, C.J., Takahashi, J. and Kay, S.M. (1998). Closing the circadian loop: CLOCK induced transcription of its own inhibitors, *per* and *tim*. Science **280**, 1599-1603.

de Candolle, A.P. (1832). Physiologie Vegetale, Vol. 2. Bechet Jeune, Paris.

Decker, C.J. and Parker, R. (1995). Diversity of cytoplasmic functions for the 3'untranslated region of eukaryotic transcripts. Curr. Opin. Cell Biol. **7**, 386-392.

Deutscher, M.P. (Ed.) (1990). Guide to protein purification. Methods Enzymol., Vol. 182.

Devlin, P.F. and Kay, S.A. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. Plant Cell **12**, 2499-2509.

Devlin, P.F. and Kay, S.A. (2001). Circadian Photoperception. Annu. Rev. Physiol. **63**, 677-694.

de Mairan, J. (1729). Observation botanique. Histoire de l'Academie Royale des Sciences, 35-36.

Dreyfuss, G., Swanson, M.S. and Piñol-Roma, S. (1988). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. TIBS **13**, 86-91.

D'Souza, S.E., Ginsberg, M. and Plow, E.F. (1991). Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. Trends Biochem. Sci. **(16)**, 246-250.

Duncan, R., Bazar, L., Michelotti, G., Tomonaga, T., Krutzsch, H., Avigan, M. and Levens, D. (1994). A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of *c-myc* and defines a new DNA-binding motif. Genes Dev. **8**, 465-480.

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

Emery, P., Stanewsky, R., Hall, J.C. and Rosbash, M. (2000). A unique circadian rhythm photoreceptor. Nature **404**, 456-457.

Freeman, M.E. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: The physiology of reproduction. 2nd edition (Eds.: Knobil, E. and Neill, J.D.), Raven Press New York.

Gallagher, S.R. (1992). GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression. Academic Press, Inc.

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

Gavel, Y. and von Heijne, G. (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. Protein Eng. **3**, 433-442.

Giordano, T., Sakamoto, K. and Howard, B.H. (1990). Detection of protein/RNA interactions in nuclear extracts is facilitated by poly r(G). Nucleic Acids Res. **18**, 4627.

Gooch, V.D., Wehseler, R.A. and Gross, C.G. (1994). Temperature effects on the resetting of the phase of the *Neurospora* circadian rhythm. J. Biol. Rhythms **9**, 83-94.

Gray, N.K. and Wickens, M. (1998). Control of translation initiation in animals. Annu. Rev. Cell Dev. **14**, 399-458.

Gu, W. and Hecht, N.B. (1996). Translation of a testis-specific Cu/Zn superoxide dismutase (SOD-1) mRNA is regulated by a 65-kilodalton protein which binds to its 5' untranslated region. Mol. Cell. Biol. **16**, 4535-4543.

Hardin, P.E., Hall, J.C. and Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila period* gene on circadian cycling of its messenger RNA levels. Nature **343**, 536-540.

Harlow, E. and Lane, D.P. (1988). Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A. and Kay, S.A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. Science **290**, 2110-2113.

Harmer, S.L., Panda, S. and Kay, S.A. (2001). Molecular bases of circadian rhythms. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **17**, 215-253.

Harris, E.H. (1989). The *Chlamydomonas* sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, Inc.

Heukeshoven, J. and Derrnick, R. (1988). Improved silver staining for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. Electrophoresis **9**, 28-32.

Hofmann, K. and Bucher, P. (1995). The rsp5-domain is shared by proteins of diverse functions. FEBS Lett. **358**, 153-157.

Huang, Z.J., Edery, I. and Rosbash, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. Nature **364**, 259-62.

Hutner, S.H., Provasoli, L., Schatz, A. and Haskins, C.P. (1950). Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. Proc. Am. Philos. Soc. **94**, 152-170.

Hwang, S., Kawazoe, R. and Herrin, D.L. (1996). Transcription of *tufA* and other chloroplast-encoded genes ist controlled by a circadian clock in *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 996-1000.

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J. (1989). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, Inc.

Jackson, R.J. (1993). Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3'untranslated region. Cell **74**, 9-14.

Jacobshagen, S., Kindle, K.L. and Johnson. C.H. (1996). Transcription of *CABII* is regulated by the biological clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol. Biol. **31**, 1173-1184.

Jacobshagen, S., Whetstine, J.R. and Boling, J.M. (2001). Many but not all genes in *Chlamydomonas reinhardtii* are regulated by the circadian clock. Plant Biol. **3**, 592-597.

Jan, E., Motzny, C.K., Graves, L.E. and Goodwin, E.B. (1999). The STAR protein, GLD-1, is a translational regulator of sexual identity in *Caenorhabditis elegans*. EMBO J. **18**, 258-269.

Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D. (1986). ß-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 8447-8451.

Jerpseth, B., Greener, A., Short, J.M., Viola, J. and Kretz, P.L. (1992). XL1-Blue MRF' *E. coli* cells: *mcrA-, mcrCB-, mcrS-, mrr-, hsdR*- derivate of XL1-Blue cells. Strategies **5**, 81-83.

Johnson, C.H. (2001). Endogenous timekeepers in photosynthetic organisms. Annu. Rev. Physiol. **63**, 695-728.

Johnson, C.H., Kondo, T. and Goto, K. (1992). Circadian rhythms in *Chlamydomonas*. In "Circadian Clocks from Cell to Human" (Eds.: T. Hiroshige and K. Honna), Hokkaido Press Sapporo, 139-155.

Johnson, C.H., Roeber, J. and Hastings, J.W. (1984). Circadian changes in enzyme concentration account for rhythm of enzyme activity. Science **223**, 1428-1430.

Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X. and Chiang, V.L. (1997). Context sequences of translation initiation codon in plants. Plant Mol. Biol. **35**, 993-1001.

Keesler, G.A., Camacho, F., Guo, Y., Virshup, D., Mondadori, C. and Yao, Z. (2000). Phosphorylation and destabilization of human period 1 clock protein by human casein kinase I epsilon. NeuroReport **11**, 951-955.

Kellmann, J.W., Merforth, N., Wiese, M., Pichersky, E. and Piechulla, B. (1993). Concerted circadian oscillations in transcript levels of 19 *Lha/b (cab)* genes in *Lycopersium esculentum* (tomato). Mol. Gen. Genet. **237**, 439-448.

Kellner, R., Lottspeich, F. and Meyer, H. (1994). Microcharacterization of proteins. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

Kirk, D.L. (1997). The genetic program for germ-soma differentiation in *Volvox*. Annu. Rev. Genet. **31**, 359-380.

Kirk, D.L. (1998). Volvox: The molecular genetic origins of multicellularity and cellulas differentiation. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Kirk, M. M., K. Stark, S. M. Miller, W. Müller, B. E. Taillon, H. Gruber, R. Schmitt, and D. L. Kirk. (1999). *regA*, a *Volvox* gene that plays a central role in germ-soma differentiation, encodes a novel regulatory protein. Development **126**, 639-647.

Kloss, B., Price, J.P., Saez, L., Blau, J., Rothenflug, A., Wesley, C.S. and Young, M.W. (1998). The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human casein kinase I. Cell **94**, 97-107.

Komuro, A., Saeki, M. and Kato, S. (1999). Association of two nuclear proteins, Npw38 and NpwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine. J. Biol. Chem. **274**, 36513-36519.

Kondo, T., Strayer, C.A., Kulkarni, R.D., Taylor, W., Ishiura, M., Golden, S.S. and Johnson, C.H. (1993). Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter of circadian gene expression in cyanobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 5672-5676.

Kortner, G. and Geiser, F. (2000). The temporal organization of daily torpor and hibernation: circadian and circannual rhythms. Chronobiol. Int. **17**, 103-128.

Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryontic mRNAs that modulate the initiation of translation. J. Biol. Chem. **166**, 19867-19870.

Kuhn, H., Heydeck, D., Brinckman, R. and Trebus, F. (1999). Regulation of cellular 15-lipoxygenase activity on pretranslational, translational, and posttranslational levels. Lipids **34**, S 273-279.

Kwon, Y.K. and Hecht, N.B. (1993). Binding of a phosphoprotein to the 3'untranslated region of the mouse protamine 2 mRNA temporally represses its translation. Mol. Cell. Biol. **13**, 6547-6557.

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

Le, H., Tanguay, R.L., Balasta, M.L., Wei, C.-C., Browning, K.S., Metz, A.M., Goss, D.J. and Gallie, D.R. (1997). Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding acitivity. J. Biol. Chem. **272**, 16247-16255.

Lewis, H.A., Musunuru, K., Jensen, K.B., Edo, C., Chen, H., Darnell, R.B. and Burley, S.K. (2000). Sequence-specific RNA binding by a nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. Cell **100**, 323-332.

Lorković, Z.J. and Barta, A. (2002). Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res. **30**, 623-635.

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

Lütcke, H. (1995). Signal recognition particle (SRP), a ubiquitous initiator of protein translocation. Eur. J. Biochem. **228**, 531-550.

Lütcke, H., High, S., Romisch, K., Ashford, A.J. and Dobberstein, B. (1992). The methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of signal recognition particle is sufficient for the interaction with signal sequences. EMBO J. **11**, 1543-1551.

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

Mayfield, S.P., Schirmer-Rahire, M., Frank, G., Zuber, H. and Rochaix, J.-D. (1989). Analysis of the genes of the OEE1 and OEE3 proteins of the photosystem II complex from *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol. Biol. **12**, 683-693.

McClung, C.R. (2001). Circadian rhythms in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **52**, 139-162.

Mehta, A. and Driscoll, D.M. (1998). A sequence-specific RNA-binding protein complements apobec-1 to edit apolipoprotein B mRNA. Mol. Cell. Biol. **18,** 4426-4432.

Mergenhagen, D. and Mergenhagen, E. (1989). The expression of a circadian rhythm in two strains of *Chlamydomonas reinhardtii* in space. Adv. Space Res. **9**, 261-270.

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

Millar, A.J. and Kay, S.A. (1991). Circadian control of *cab* gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. Plant Cell **3**, 541-550.

Mittag, M. (1996). Conserved circadian elements in phylogenetically diverse algae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 14401-14404.

Mittag, M. (2001). Circadian rhythms in microalgae. Int. Rev. Cytol. **206**, 213-247.

Mittag, M., Eckerskorn, C., Strupat, K. and Hastings, J.W. (1997). Differential translational initiation of *lbp* mRNA is caused by a 5' upstream open reading frame. FEBS Lett. **411**, 245-250.

Mittag, M. and Hastings, J.W. (1996). Exploring the signalling pathway of circadian bioluminescence. Physiol. Plant. **96**, 727-732.

Mittag, M., Lee, D.-H. and Hastings, J.W. (1994). Circadian expression of the luciferin-binding protein correlates with the binding of a protein to the 3'untranslated region of its mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 5257-5261.

Mittag, M., Li, L and Hastings, J.W. (1998). The mRNA level of the circadian regulated *Gonyaulax* luciferase remains constant over the cycle. Chronobiol. Int. **15**, 93-98.

Mittag, M. and Waltenberger, H. (1997). *In vitro* mutagenesis of binding site elements for the clock-controlled proteins CCTR and Chlamy 1. Biol. Chem. **378**, 1167-1170.

Morse, D., Fritz, L. and Hastings, J.W. (1990). What is the clock? Translational regulation of circadian bioluminescence. TIBS **15**, 262-265.

Morse, D., Milos, P.M., Roux, E. and Hastings, J.W. (1989). Circadian regulation of the synthesis of substrate binding protein in the *Gonyaulax* bioluminescent system involves translational control. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 172-176.

Motzkus, D., Maronde, E., Grunenberg, U., Lee, C.C., Forssmann, W.-G. and Albrecht, U. (2000). The human *PER1* gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. FEBS Lett. **486**, 315-319.

Müller, U. (2000). Western Blots mit Schokogeschmack. Laborjournal **5**, 60.

Nabel-Rosen, H., Dorevitch, N., Reuveny, A. and Volk, T. (1999). The balance between two isoforms of the *Drosophila* RNA-binding protein How controls tendon cell differentiation. Mol. Cell **4**, 573-584.

Naidoo, N., Song, W., Hunter-Ensor, M. and Sehgal, A. (1999). A role for the proteasome in the light response of the timeless clock protein. Science **285**, 1737-1741.

Neumann, D. (1989). Circadian components of similunar and lunar timing mechanisms. J. Biol. Rhythms **4**, 285-294.

Newton, A.C. (1995). Protein kinase C: Structure, function and regulation. J. Biol. Chem. **270**, 28495-28498.

Nikaido, S.S. and Johnson, C.H. (2000). Daily and circadian variation in survival from ultraviolet radiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Photochem. Photobiol. **71**, 758-765.

Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N. and Hentze, M.W. (2001). *Lipoxygenase* mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. Cell **104**, 281-290.

Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Standart, N. and Thiele, B.J. (1994). Translation of *15-lipoxygenase* mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3'untranslated region. EMBO J. **13**, 1476-1481.

Pain, V.M. (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. Eur. J. Biochem. **236**, 747-771.

Park, Y.S., Song, O., Kwak, J.M., Hong, S.W., Lee, H.H. and Nam, H.G. (1994). Functional complementation of a yeast vesicular transport mutation yot1-1 by a *Brassica napus* cDNA clone encoding a small GTP-binding protein. Plant Mol. Biol. **16**, 1725-1735.

Paulsen, H. and Bogorad, L. (1988). Diurnal and circadian rhythms in the accumulation and synthesis of mRNA for the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein in tobacco. Plant Physiol. **88**, 1104-1109.

Pesole, G., Mignone, F., Gissi, C., Grillo, G., Licciulli, F. and Liuni, S. (2001). Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. Gene **276**, 73-81.

Piechulla, B. (1999). Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants. Chronobiol. Internat. **16**, 115-128.

Pittendrigh, C.S. (1954). On temperature independence in the clock system controlling emergence time in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **40**, 1018-1029.

Pittendrigh, C.S. and Caldarola, P.C. (1973). General homeostasis of the frequency of circadian oscillators. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2697-2701.

Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. Annu. Rev. Physiol. **63**, 647-676.

Rochaix, J.D. (1995). *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. Ann. Rev. Gen. **29**, 209-230.

Roenneberg, T. and Rehman, J. (1996). Nitrate, a nonphotic signal for the circadian system. FASEB J. **10**, 1443-1447.

Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D. (1986). Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal. Cell **44**, 517-518.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition.

Schmidt, C., Henkel, B., Poschl, E., Zorbas, H., Purschke, W.G., Gloe, T.R. and Müller, P.K. (1992). Complete cDNA sequence of chicken vigilin, a novel protein with amplified and evolutionary conserved domains. Eur. J. Biochem. **206**, 625-634.

Sehgal, A., Rothenflug-Hilfiker, A., Hunter-Ensor, M., Chen, Y., Myers, M.P. and Young, M.W. (1995). Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in *period* gene autoregulation. Science **270**, 808-810.

Shama, S. and Meyuhas, O. (1996). The translational *cis*-regulatory element of mammalian ribosomal protein mRNAs is recognized by the plant translational apparatus. Eur. J. Biochem. **236**, 383-388.

Silbernagl, S. und Despopoulus, A. (1991). Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Silflow, C.D., Chisholm, R.L., Conner, T.W. and Ranum, P.W. (1985). The two alpha-tubulin genes of *Chlamydomonas reinhardtii* code for slightly different proteins. Mol. Cell. Biol. **5**, 2389-2398.

Smibert, C.A., Wilson, J.E., Kerr, K. and Macdonald, P.M. (1996). smaug protein represses translation of unlocalized *nanos* mRNA in the *Drosophila* embryo. Genes Dev. **10**, 2600-2609.

Somers, D.E., Devlin, P.F. and Kay, S.A. (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. Science **282**, 1488-1490.

Song, H.J., Gallie, D.R. and Duncan, R.F. (1995). m7GpppG cap dependence for efficient translation of *Drosophila* 70-kDa heat-shock-protein (Hsp70) mRNA. Eur. J. Biochem. **232**, 778-788.

Stark, K. (1999). Das *regA*-Gen von *Volvox carteri*: Elemente der Genregulation und Zielgene der RegA-kontrollierten Differenzierung. Dissertation an der Universität Regensburg.

Stark, K., Kirk, D.L. and Schmitt, R. (2001). Two enhancers and one silencer located in the introns of *regA* control somatic cell differentiation in *Volvox carteri*. Genes Dev. **15,**1449-60.

Starr, R. C. (1969). Structure, reproduction and differentiation in *Volvox carteri* f. *nagariensis* IYENGAR, strains HK 9 & 10. Arch. Protistenk **111**, 204-222.

Straley, S.C. and Bruce, V.G. (1979). Stickiness to glass: circadian changes in the cell surface of *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. **63**, 1175-1181.

Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A. and Bork, P. (1995). Characterization of a novel protein-binding module – the WW domain. FEBS Lett. **369**, 67-71.

Sudol, M. and Hunter, T. (2000). NeW Wrinkles for an old domain. Cell **103**, 1001-1004.

Sudol, M., Sliwa, K. and Russo, T. (2001). Functions of WW domains in the nucleus. FEBS Lett. **490**, 190-195.

Sueoka, N. (1960). Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **46**, 83-91.

Sugano, S., Andronis, C., Green, R.M., Wang, Z.-Y. and Tobin, E.M. (1998). Protein kinase CK2 interacts with and phosporylates the *Arabidopsis* circadian clock-associated 1 protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 11020-11025.

Sugano, S., Andronis, C., Ong, M.S., Green, R.M. and Tobin, E.M. (1999). The protein kinase CK2 I is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 12362-12366.

Tarun, S.Z. and Sachs, A.B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. EMBO J. **15**, 7168-7177.

Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.H. and Virshup, D.M. (2000). Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. Mol. Cell. Biol. **20**, 4888-4899.

Wakiyama, M., Futami, T. and Miura, K. (1997). Poly(A) dependent translation in rabbit reticulocyte lysate. Biochimie **79**, 781-785.

Waltenberger, H., Schneid, C., Grosch, J.O., Bareiss, A. and Mittag, M. (2001). Identification of target mRNAs for the clock-controlled RNA-binding protein Chlamy 1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol. Genet. Genomics **265**, 180-188.

Wang, Z.Y. and Tobin, E.M. (1998). Constitutive expression of the *circadian clock associated 1 (cca1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression. Cell **93**, 1027-1217.

Watson, N. (1988). A new revision of the sequence of plasmid pBR322. Gene **70**, 399-403.

White, R.J. (2001). Gene transcription – mechanisms and control. Blackwell Science Ltd., Oxford.

Williams, J.A. and Sehgal, A. (2001). Molecular components of the circadian system in *Drosophila*. Annu. Rev. Physiol. **63**, 729-756.

Yang, J. and Stern, D.B. (1997). The spinach chloroplast endoribonuclease CSP41 cleaves the 3'-untranslated region of *petD* mRNA primarily within its terminal stem-loop structure. J. Biol. Chem. **272**, 12874-12880.

Yano, T., Kobayashi, A., Kurata, S. and Natori, S. (1997). Purification and characterisation of cathepsin B mRNA 3'-untranslated-region-binding protein (CBBP), a protein that represses cathepsin B mRNA translation. Eur. J. Biochem. **245**, 260-265.

Yohn, C.B., Cohen, A., Rosch, C., Kuchka, M.R. and Mayfield, S.P. (1998). Translation of the chloroplast *psbA* mRNA requires the nuclear-encoded Poly(A)-binding protein , RB47. J. Cell Biol. **142**, 435-442.

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

Zopf, D., Bernstein, H.D., Johnson, A.E. and Walter, P. (1990). The methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. EMBO J. **9**, 4511-4517.

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1: Bestandteile eines circadianen Systems 3
Abb. 2: Hydrolyse von MUG 46
Abb. 3: Fraktionierende Fällung von CHLAMY 1 mit Ammoniumsulfat 54
Abb. 4: Anreicherung von CHLAMY 1 durch eine 0,5–1 M Ammoniumsulfat-Fällung 55
Abb. 5: Klonierung der chimären GUS-Reporterkonstrukte 58
Abb. 6: Regulatorische Eigenschaften von CHLAMY 1 61
Abb. 7: Verteilung der Standardproteine in einem linearen Glycerin-Gradienten 63
Abb. 8: Bestimmung der nativen Molekularmasse von CHLAMY 1 mittels Dichtegradienten-Zentrifugation 64
Abb. 9: Molekularmasse von CHLAMY 1 unter denaturierenden Bedingungen 66
Abb. 10: Bindung von CHLAMY 1 an ein biotinyliertes Transkript 69
Abb. 11: Bindung von CHLAMY 1 an ein immobilisiertes Biotin-Transkript 71
Abb. 12: SDS-PAGE von Eluaten nach einer spezifischen RNS-Affinitätschromatographie 73
Abb. 13: Schema zur spezifischen RNS-Affinitätschromatographie 75
Abb. 14: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der eluierten Proteine nach der spezifischen RNS-Affinitätschromatographie 77
Abb. 15: Ausrichtung des Peptids C3-13 mit der RRM Konsensus-Sequenz 80
Abb. 16: Spezifität der CHLAMY 1-Antikörper 83
Abb. 17: Überprüfung der Antiseren AK1/2 und AK3 in Western Blots 85
Abb. 18: Versuche zur Aufreinigung der Antiseren AK1/2 und AK3 87
Abb. 19: Menge an CHLAMY 1-Untereinheit C1 im Tag-Nacht-Verlauf 90
Abb. 20: Menge an CHLAMY 1-Untereinheit C3 im Tag-Nacht-Verlauf 92
Abb. 21: Positive Klone der Expressions-Genbank-Sichtung 95
Abb. 22: Darstellung von pCS30 96
Abb. 23: Analyse von *chlamy 1-C1/2* und CHLAMY 1-C1/2 99
Abb. 24: Darstellung des Plasmids pCS31 103
Abb. 25: Analyse von *chlamy 1-C3* und CHLAMY 1-C3 105
Abb. 26: Spezifische Bindung eines Proteins aus *C. reinhardtii* an die *regA*-RNS aus *V. carteri* 110
Abb. 27: CHLAMY 1 kann an die *regA*-RNS aus *V. carteri* binden 111
Abb. 28: Bindung von zwei Proteinen aus *V. carteri* an die 3'-NTR der *regA*-mRNS 113
Abb. 29: Molekularmassen der RNS-Bindeproteine VOLVO 1 und VOLVO 2 aus *V. carteri* 115
Abb. 30: Identifizierung von RNS-Bindeproteinen in *N. crassa* 117
Abb. 31: Bindeaktivität von CRASSA 1 aus *N. crassa* 118

Tabellen

Tab. 1: Puffer zur Elution von Antikörpern von einer Peptidsäule 32
Tab. 2: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE 34
Tab. 3: Protokoll zur Durchführung einer Silberfärbung 35
Tab. 4: Verzeichnis der verwendeten Transkripte 36
Tab. 5: Variables Protokoll für die Durchführung einer PCR mit degenerierten Oligonukleotiden 45
Tab. 6: Vergleich der Molekularmassen von CHLAMY 1 unter nativen und denaturierenden Bedingungen 67
Tab. 7: Vergleich der Größenbestimmung von CHLAMY 1 unter denaturierenden Bedingungen („UV-crosslinking“ Experimente und spezifische RNS-Affinitäts-chromatographie) 74
Tab. 8: Peptid-Sequenzen der CHLAMY 1-Untereinheiten 79
Tab. 9: Durchmusterung einer Expressions-Genbank mit Antiseren gegen CHLAMY 1 94

8 Anhang

Kleine Buchstaben stehen für Nukleotide. Große Buchstaben stehen für Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code (* = Stop-Codon).
Rot unterlegte Aminosäuren stehen für identische Aminosäuren, blau unterlegte für ähnliche.

Internet-Adressen für Homologie-Suchen mit Proteinen und DNS

- NCBI (= „National Center for Biotechnology Information“)
  www.ncbi.nlm.nih.gov/
  verwendete Suchprogramme: blastp, blastn und tblastn
- *C. reinhardtii* EST-Datenbank
  www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/

Internet-Adressen für Protein-Domänen

- CD („Conserved Domain“)
  www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/
- PROSITE („Database of protein families and domains“)
  www.expasy.ch/prosite/
  (Suche nach Erkennungsstellen für Enzyme)
- SMART („simple modular architecture research tool“)
  smart-embl-heidelberg.de/
- Pfam („Protein families database of alignments and HMMs“)
  www.sanger.uc.uk/Software/Pfam/index.shtml
- INTERPRO
  www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html

cDNS-Sequenz von *chlamy1-C1/2* inklusive Translation in Aminosäure-Sequenz

Die unterstrichenen Aminosäuren bezeichnen die Peptide des Proteins CHLAMY 1-C1/2, die durch die Peptid-Sequenzierung bereits bekannt waren. Die Reihenfolge der Peptide lautet: C1-13, C1-26, C2-7, C2-8/C1-16 und C2-2. Das grün unterlegte Nukleotid (Base 198) weist auf den Start der Sequenz in Klon pCS30 hin, das pink unterlegte Nukleotid (Base 580) auf die letzte Base des EST-Klons (Acc.No. BI721496).

```
1       g cac gag gga cat agc acg tct tta ctt tga gcg tac ttc cac     43
44    gcc cca ccg ccg agt aga caa aag gta gtc aaa tca gac gtg ccg     88
89    aca cca cag cgt agc aaa gcc ttg cat aca cgc tca aca tag atg    133
                                                        M       1

134   gct gac cac gag gag cca ccg ccc ggc act tat gac ggc gag gag    178
2      A   D   H   E   E   P   P   P   G   T   Y   D   G   E   E     16

179   cgc gcg ccg gac gtc gag agc ggc aac tcg cat ctc cct ccg ccg    223
17     R   A   P   D   V   E   T   G   N   S   H   L   P   P   P     31

224   ccg gag ctc cac gcc gca ccg cag gag cat ggg gca gat caa ggc    268
32     P   E   L   H   A   A   P   Q   E   H   G   A   D   Q   G     46

269   gcg gtg ctg gac gca ggt cgc tcg cgg gcg gaa atg ctg gcg gct    313
47     A   V   L   D   A   G   R   S   R   A   E   M   L   A   A     61

314   ata ttt gca gcg caa gcg ggc gcg aat gtt gtc cca tct gac ccg    358
62     I   F   A   A   Q   A   G   A   N   V   V   P   S   D   P     76

359   act ggc cac aag cgg aaa ctt gat gac gat gaa tac cat gac gcg    403
77     T   G   H   K   R   K   L   D   D   D   E   Y   H   D   A     91

404   cct gat agc aag cgc cct gcc agc atg gca ttc ggg gac ggc tcc    448
92     P   D   S   K   R   P   A   S   M   A   F   G   D   G   S    106

449   ggg gcg ctg cct cct ccg cca cct ctg gga gct gat gcg cca gtg    493
107    G   A   L   P   P   P   P   P   L   G   A   D   A   P   V    121

494   gcc atg gag aca att atg tgc cct ccc gac aag gtt ggc cgc gtg    538
122    A   M   E   T   I   M   C   P   P   D   K   V   G   R   V    136

539   att ggc cgc gcg gga gcg acg atc cgg gac ctt gaa gcc agc acc    583
137    I   G   R   A   G   A   T   I   R   D   L   E   A   S   T    151

584   ggc acg cgg att cag gtg gac cac aag gcg ccg ggt gac aag ccc    628
152    G   T   R   I   Q   V   D   H   K   A   P   G   D   K   P    166

629   gtc acc atc tcg ggc cgg gcg gac gag gta gag cgt gcc aaa cgg    673
167    V   T   I   S   G   R   A   D   E   V   E   R   A   K   R    181

674   cag gtg ctg gac ctc atc tcg ggg cac ggc tca gac gcc gcc ccg    718
182    Q   V   L   D   L   I   S   G   H   G   S   D   A   A   P    196


719   gcg cct ggc gag gcg cag aag acg ctg gag tgc ccg cag ggc att    763
197    A   P   G   E   A   Q   K   T   L   E   C   P   Q   G   I    211
```

```
764   gtt ggg cgc gtg att ggg cgc ggc ggc gag acc atc cgc acg ctg    808
212    V   G   R   V   I   G   R   G   G   E   T   I   R   T   L    226

809   cag cag gcc agc ggc gcg cac atc ctg gtc aac cag gac ttc ccg    853
227    Q   Q   A   S   G   A   H   I   L   V   N   Q   D   F   P    241

854   gag ggc gcg gcg cgc cag atc acc atc tcg ggc agc cag gac gcg    898
242    E   G   A   A   R   Q   I   T   I   S   G   S   Q   D   A    256

899   gtg gac cgc gcc gcc agc atg gtg cag gag ctc atc ggc ggc gag    943
257    V   D   R   A   A   S   M   V   Q   E   L   I   G   G   E    271

944   cac gcc aac acg tcg cag gtg gtc cag cgg ttt ggc gtg ggt tcg    988
272    H   A   N   T   S   Q   V   V   Q   R   F   G   V   G   S    286

989   act gag gtg ttg gag tgc ccc aag acc atg gtt ggg cgc atc atc   1033
287    T   E   V   L   E   C   P   K   T   M   V   G   R   I   I    301

1034  ggc aag ggc ggc gag acc att aag gac ctc cag aag cgc ttc aac   1078
302    G   K   G   G   E   T   I   K   D   L   Q   K   R   F   N    316

1079  gcc agc atc cag atc gac cag agc gcc atg ccc tgc aag gtc acc   1123
317    A   S   I   Q   I   D   Q   S   A   M   P   C   K   V   T    331

1124  atc acc ggg ccc agc cac acc atc gcc tca gcg cgg cgc gcc att   1168
332    I   T   G   P   S   H   T   I   A   S   A   R   R   A   I    346

1169  gag gac ctc atc cgc tcc acc ggg ccc ccg cca ggc ggc atg ggc   1213
347    E   D   L   I   R   S   T   G   P   P   P   G   G   M   G    361

1214  atg ggc ggc ggc tcg cgg cca ccc tac ggc gct ccc tac ggg cag   1258
362    M   G   G   G   S   R   P   P   Y   G   A   P   Y   G   Q    376

1259  cag tac ccg ggc ggg gcg ggg ggc tac ggc ggc ggc tat ggc ggg   1303
377    Q   Y   P   G   G   A   G   G   Y   G   G   G   Y   G   G    391

1304  tac ggg gcg ccg ggt ggg tac ggg gcg ccg ggc ggc tac ccc ggc   1348
392    Y   G   A   P   G   G   Y   G   A   P   G   G   Y   P   G    406

1349  tac ggc ggc tat ggc ggc tac ccg ggt ggc gcg ccc tac ggc ggc   1393
407    Y   G   G   Y   G   G   Y   P   G   G   A   P   Y   G   G    421

1394  tac aac gcg ggt ggc tac ggg gcg ccc ggt gcg cag tcg tcc gac   1438
422    Y   N   A   G   G   Y   G   A   P   G   A   Q   S   S   D    436

1439  ccc tac ggc gcc ggc tcc agc agc tac aac tac ggc gga gcc ggc   1483
437    P   Y   G   A   G   S   S   S   Y   N   Y   G   G   A   G    451

1484  ggc ggc tcc tca tct gcg gcg ccc ggc gcc ccc ggc tcc acg ccc   1528
452    G   G   S   S   S   A   A   P   G   A   P   G   S   T   P    466

1529  gct gcg ccg ggc acg aac ggg tct ggc tcg ggc ggc agc agc ccc   1573
467    A   A   P   G   T   N   G   S   G   S   G   G   S   S   P    481

1574  tgg cag gcg ctg cag gat gac cag ggc cgc acc tac tac tac aac   1618
482    W   Q   A   L   Q   D   D   Q   G   R   T   Y   Y   Y   N    496

1619  agc acc acc ggc gtc agc cag tgg gag cgg cca gcg gac atg ccg   1663
497    S   T   T   G   V   S   Q   W   E   R   P   A   D   M   P    511

1664  taa gcg gta gcg gcg gga aca ggc gga tga gga ggc gga tgg cag   1708
       *

1709  gga gga ggt gca gat ttc tga cag att gac ttg cat tgc acg ttg   1753
1754  cag gaa atg ttg acc tta aca aga cat ttg cca tgt tag tgc gct   1798
```

```
1799  ggc atg ctt ttt gtg ttt ggt gtc atg tga aag ggg acg gac agc   1843
1844  cgg aga gga ccg gca gca ccc tcc ccc tca act tgg cgt agg ggt   1888
1889  ggc ttt gct gag gca ttc cgg tgt gtg tgg tgt gag agg tgt gag   1933
1934  gac gag acg cat gca gag cag ccg gtg ggc agg ctg ctg cat gtt   1978
1979  ggc ggt gtt gtg ttc ggg cgc tcg gga agc ctg tgg tcc aag ata   2023
2024  acg cag acg cac tgg gcg gcg gca ttc aac tgc ctg cgt atc agg   2068
2069  tgg aga tgc gcg ggg caa aag cag gag cca gta gcg acg ggt gct   2113
2114  gac cgg gtg cac gcc tgc acg gca cgg act gga aga ctg tag ctg   2158
2159  ggg agt cgg gct ccg gcg gat gcg att gcg cga tcg tcc taa ttg   2203
2204  ccc cac gca ttg ggg gca cac ggt gaa ggt aca gtg atg caa aaa   2248
2249  aaa aaa aaa aaa aaa aaa                                     2266
```

„Alignment“ des Proteins CHLAMY 1-C1/2 mit Konsensus-Sequenzen verschiedener Protein-Domänen

„Alignment“ mit WW-Domäne (smart Acc.No. SM0456)

(Aminosäuren 477 - 509 des Proteins)

```
CHLAMY 1-C1/2   477 GGSSPWQALQDDQGRTYYYNSTTGVSQWER 506
WW-Domäne         1   PLPPGWEERKDPDGRPYYYNHETKETQWEK  30

CHLAMY 1-C1/2   507 PAD 509
WW-Domäne        31 PRE  33
```

„Alignment“ mit drei KH-Domänen (smart Acc.No. SM0322)

KH-1

```
CHLAMY 1-C1/2   120 PVAMETIMCPPDKVGRVIGRAGATIRDLEA 149
KH-Domäne         1   PVTIE-VLIPADKVGLIIGKGGSTIKKIEE  29

CHLAMY 1-C1/2   150 STGTRIQVDHKAPGDKPVTISGRADEVERA 179
KH-Domäne        30  ETGVKIDIPGEGSEERVVEIRGPPENVELA  59

CHLAMY 1-C1/2   180 KRQVLDLI 187
KH-Domäne        60  AELILEIL  67
```

KH-2

```
CHLAMY 1-C1/2   200 EAQKTLECPQGIVGRVIGRGGETIRTLQQA 229
KH-Domäne         1   PVTIEVLIPADKVGLIIGKGGSTIKKIEEE 30

CHLAMY 1-C1/2   230 SGAHILVNQDFPEGAARQITISGSQDAVDR 259
KH-Domäne        31  TGVKIDIPGE--GSEERVVEIRGPPENVEL 58

CHLAMY 1-C1/2   260 AASMVQELI 268
KH-Domäne        59  AAELVQELI  67
```

KH-3

```
CHLAMY 1-C1/2   284 VGSTEVLECPKTMVGRIIGKGGETIKDLQK 313
KH-Domäne         1   PVTIEVL-IPADKVGLIIGKGGSTIKKIEE  29

CHLAMY 1-C1/2   314 RFNASIQI-DQSAMPCKVTITGPSHTIASA 342
KH-Domäne        30  ETGVKIDIPGEGSEERVVEIRGPPENVELA  59

CHLAMY 1-C1/2   343 RRAIEDLI 350
KH-Domäne        60  AELILEIL  67
```

Regionen für mögliche posttranslationale Modifikationen im Protein CHLAMY 1-C1/2

gelb = Erkennungsstelle für Casein-Kinase II

grün = Erkennungsstelle für Protein-Kinase C

grau = Erkennungsstelle für Tyrosin-Kinase

pink = N-Glykosylierungsstelle

```
1   MADHEEPPPG TYDGEERAPD VETGNSHLPP PPELHAAPQE  40
41  HGADQGAVLD AGRSRAEMLA AIFAAQAGAN VVPSDPTGHK  80
81  RKLDDDEYHD APDSKRPASM AFGDGSGALP PPPPLGADAP  120
121 VAMETIMCPP DKVGRVIGRA GATIRDLEAS TGTRIQVDHK  160
161 APGDKPVTIS GRADEVERAK RQVLDLISGH GSDAAPAPGE  200
201 AQKTLECPQG IVGRVIGRGG ETIRTLQQAS GAHILVNQDF  240
241 PEGAARQITI SGSQDAVDRA ASMVQELIGG EHANTSQVVQ  280
281 RFGVGSTEVL ECPKTMVGRI IGKGGETIKD LQKRFNASIQ  320
321 IDQSAMPCKV TITGPSHTIA SARRAIEDLI RSTGPPPGGM  360
361 GMGGGSRPPY GAPYGQQYPG GAGGYGGGYG GYGAPGGYGA  400
401 PGGYPGYGGY GGYPGGAPYG GYNAGGYGAP GAQSSDPYGA  440
441 GSSSYNYGGA GGGSSSAAPG APGSTPAAPG TNGSGSGGSS  480
481 PWQALQDDQG RTYYYNSTTG VSQWERPADM P           511
```

cDNS-Sequenz von *chlamy 1-C3* inklusive Translation in Aminosäuren

Die unterstrichenen Aminosäuren bezeichnen die Peptide des Proteins CHLAMY 1-C3, die durch die Peptid-Sequenzierung bereits bekannt waren. Die Reihenfolge der Peptide lautet: C3-13, C3-16 und C3-11. Das grün unterlegte Nukleotid (Base 338) weist auf den Start der Sequenz in Klon pCS31 hin, das pink unterlegte Nukleotid (Base 507) auf die letzte Base des EST-Klons (Acc.No. AV641734).

```
1     ggt acc tac gtg tac act agg tac agc tcc acg cct act ggg gcc     45
46    cag aag ctc cac tcg tcc tct caa ttt gtc ggc tcg aac cgt ttc     90
91    cac acg cac agc ccc cac cta cca cca cgt tag act gct ctt agc    135

136   tga gct atg gtt atg gga atg cag aag cca gag gca gtc tgc gct    180
1              M   V   M   G   M   Q   K   P   E   A   V   C   A     13

181   gag ccg aag gtg ttc gtg ggc caa gtg cct cac gag gtc acc cag    225
14     E   P   K   V   F   V   G   Q   V   P   H   E   V   T   Q     28

226   gac cag att ttt gct ctg ttc tcc aag tat ggc acc atc aag aag    270
29     D   Q   I   F   A   L   F   S   K   Y   G   T   I   K   K     43

271   tgc gcc ctg atc acc ggt ccc gac ggc cgc agc aaa ggc tgc gct    315
44     C   A   L   I   T   G   P   D   G   R   S   K   G   C   A     58

316   atg gtg acc tac gac cga tgg gcg gag gct gag ctt gcc atc gag    360
59     M   V   T   Y   D   R   W   A   E   A   E   L   A   I   E     73

361   cac gaa aat gga aca gcc aac ctg ggc ggt ggc cgg act ctg ctt    405
74     H   E   N   G   T   A   N   L   G   G   G   R   T   L   L     88

406   gtc aag ttt gct gac cct cct cgc ggg cgt ggc gat ggg ccg gtg    450
89     V   K   F   A   D   P   P   R   G   R   G   D   G   P   V    103

451   atg ggc gtg gcg ccc aag aag ctg ttt gtc ggc cag atc ccc cag    495
104    M   G   V   A   P   K   K   L   F   V   G   Q   I   P   Q    118

496   cac acc acg gag cag cac atc cgc tcg ctg ttc gcg ccc ttc ggc    540
119    H   T   T   E   Q   H   I   R   S   L   F   A   P   F   G    133

541   aac atc acg gac gtg cac gta ctc aac aag ggc aac gcc cct ggc    585
134    N   I   T   D   V   H   V   L   N   K   G   N   A   P   G    148

586   tgc gcg ttt gtg acc tac gag cgc tgg gcg cac gcc gag gcg gcc    630
149    C   A   F   V   T   Y   E   R   W   A   H   A   E   A   A    163

631   atg ctg tcg ctg aac ggc cag acc ctg atc gag ggc gcc acc acg    675
164    M   L   S   L   N   G   Q   T   L   I   E   G   A   T   T    178

676   ccc atg gtc gtc aag ttt gcg gac gcc aag gtg cag gac atg ggc    720
179    P   M   V   V   K   F   A   D   A   K   V   Q   D   M   G    193

721   ggc cag aag cgc ggc ttc ggc gcc gtt gag ggc gcg ccg ccg ggc    765
194    G   Q   K   R   G   F   G   A   V   E   G   A   P   P   G    208

766   gtc ttc ccc ggc gcc gcc gcc ggc ccc ggc ggc aac aag cgc acc    810
209    V   F   P   G   A   A   A   G   P   G   G   N   K   R   T    223

811   ttc acg ggc gcg ggc gcg ccg ggc gcc atg ggc atg gcc ggc atg    855
224    F   T   G   A   G   A   P   G   A   M   G   M   A   G   M    238
```

```
856   gcg gct gcg ggc tac aac cct tac gct gcg gct gcg gcc atg ggc    900
239    A   A   A   G   Y   N   P   Y   A   A   A   A   A   M   G     253

901   tac gac atg agc acc atg gcg gcc atg ggc tac ggc aac atg ggc    945
254    Y   D   M   S   T   M   A   A   M   G   Y   G   N   M   G     268

946   atg atg gcg ggc atg gcg ggc atg cag cag ggc att cct ggg caa    990
296    M   M   A   G   M   A   G   M   Q   Q   G   I   P   G   Q     283

991   ggc ggc cag cag ggc atg ggc ggc ggc gcc atg ggc gga gca ggc   1035
284    G   G   Q   Q   G   M   G   G   G   A   M   G   G   A   G     298

1036  gcc atg ggc ggt gcg cag ggc ctg ggc gct ggc ggc atg ggc ggc   1080
299    A   M   G   G   A   Q   G   L   G   A   G   G   M   G   G     313

1081  atg ggt ggc atg ggc ggc atg ggc ggc ggc ctc atg gcc ggc atg   1125
314    M   G   G   M   G   G   M   G   G   G   L   M   A   G   M     328

1126  aac atg atg ggc ctg ggc atg ggc ggc ggc atg ggc atg aac aag   1170
329    N   M   M   G   L   G   M   G   G   G   M   G   M   N   K     343

1171  ccc ggg cta cag gag ggc ccc aag gcc tgg aag ctg ttc att ggc   1215
344    P   G   L   Q   E   G   P   K   A   W   K   L   F   I   G     358

1216  cag gtg ccg ttc gag gcc aac gag acg gac ctg tgg ccc atc ttc   1260
359    Q   V   P   F   E   A   N   E   T   D   L   W   P   I   F     373

1261  agc ccg ctg ggc aac atc ctg gag ctg gtc atc ctg cgc cac cag   1305
374    S   P   L   G   N   I   L   E   L   V   I   L   R   H   Q     388

1306  ggc aag tcc aag ggc tgc gcc ttc ctc acc tac gag aac cgc acc   1350
389    G   K   S   K   G   C   A   F   L   T   Y   E   N   R   T     403

1351  gac gcc gag aag gcg atc cgc acc ctg gac agc cag gtg tcg gtg   1395
404    D   A   E   K   A   I   R   T   L   D   S   Q   V   S   V     418

1396  ccc tcc gac ccc cgc ggg cga ctg ctg acc gtc aag tac gcc aac   1440
419    P   S   D   P   R   G   R   L   L   T   V   K   Y   A   N     433

1441  agc gcc gcc gcc gcc gcc atg taa ata gct aca tta tag cta cac   1485
434    S   A   A   A   A   A   M   *                               440

1486  aga tga tag cgc tgt ggc ctc cag ctt gtg gag tcg gcg tcg gcc   1530
1531  gtc gtg cgc cgg cgg ctg agg cgg tgg cgg gcc ggg gcc gcg gcg   1575
1576  ctt gcc gct gtc gcg gtc cgc tgg ctg cgc ggc cgt ctg gtt cgt   1620
1621  tga ttg cgg cgg cgc tgc tgg cag cag tgg cgc gcg cgc gcg gct   1665
1666  gga gag agg atg cag ggg tga ggc ggt agc gtt tgc gcg gct gtt   1710
1711  tgt gct cct cgt gtg tgc tcg ttt gag cgg agc ctg tac tgg cgt   1755
1756  ctg gcg cgg cca ttg ccg cgc cgt gcc agt gcg ggg ccg atg tgc   1800
1801  gct gtg gtg gag agg cag cag cga atg agc ggg gcc tga tat tac   1845
1846  ggg tgt ggg aag cga agg gct agg tag gag gct tgg agg gtt ggg   1890
1891  atg gcg att acg tgg gcg agt aga gtt ctt tca cgc gct tga ttg   1935
1936  gtc agg gag gcc gga acg cga aag agg aac gtt gac atc gac agg   1980
1981  gtc gcg tgt gca gga ctg gag gcg cag ccg ggt ggg cgc gag gcc   2025
2026  tta aag gcc tgt gcg ggt ccc cac tgg cgg gtg ctt cgt ccc acg   2070
2071  acc ttt cct aag gat ttg gtt tcg gtt ggg cct ggc cgt gag tcg   2115
2116  tag gtt tgg agg gat tgc ttc agg ctg gtc atc aga cac gat ctc   2160
2161  acg gcg tgg gtc gca ctg gtt tgt gtg tgc cgc agt gca agt gca   2205
2206  ggc gcg ggc gcc aaa gcg cct cat ggc ggc ggg ctc cct tgc gcc   2250
2251  act ccg acc gca ccc tgc gag gtg tgc gtt tgc tgc ggt ttt ctc   2295
2296  gcc ggc tcg tgc tgt atg tag cgt gcg tgg tgc gcc aag gct gac   2340
2341  cgc agt tcc ttt gtg agc atg tgg ttt ttt ctc tgg ttc aca gca   2385
2386  aca aac ggc ttc ata cag cgt ttc gat acg gtg gtg tga gca gtg   2430
2431  ccg ccg gtt gcg ggt gtc gag agt gga agg gtg gaa ggg gtt cac   2475
2476  gtg cac gag tgc gcc gtg gcg tga cca aga cgt ggt ggc ggg gca   2520
```

```
2521  gag cgg gca tca gtc aat aga cat aga gct cgc ctg gga acc cgc   2565
2566  ccc act gcg ggg acg gcc aag ccg ttc cgg tgt gtc aat gtg cct   2610
2611  tgc tcc gca tgg gtt gcg cga gtg tgg ttt gtg cgc tgt ttg cat   2655
2656  ggg cgc aca act gtg gct cga aga agg caa gat ctc gat tca agt   2700
2701  gct cac gtg ctt aag gac cta atg aca agt tca gcg ctc ttg cgc   2745
2746  aac ggc agg gca gtt gct ggg gtt ggt gga ggg ggc agg aat ggc   2790
2791  gtc aag gca acg cgg cgt gac acg cgg gtg tac gct tgc ggt gct   2835
2836  gta gct gac act tgc gtt gga gcg tgg cca cgt gca cat gca tcg   2880
2881  tcg tcg tcg tgc aac gcg tca gtg cca aaa aaa aaa aaa aaa aaa   2925
2926  aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa   2970
2971  aaa aaa aaa                                               2979
```

„Alignment“ des Proteins CHLAMY 1-C3 mit der Konsensus-Sequenz einer Protein-Domäne

„Alignment“ mit drei RRM-Domänen (smart Acc.No. SM0360)

RRM-1

```
CHLAMY 1-C3   16 KVFVGQVPHEVTQDQIFALFSKYGTIKKCA  45
RRM-Domäne     1 TLFVGNLPPDTTEEDLRELFSKFGKVVSVR  30
                   RNP-2

CHLAMY 1-C3   46 LITGPDGRSKGCAMVTYDRWAEAELAIEHE  75
RRM-Domäne    31 IVRDKDTRSKGFAFVEFEDEEDAEKAIEAL  60
                            RNP-1

CHLAMY 1-C3   76 NGTANLGGGRTLLVK 90
RRM-Domäne    61 NGK-EL-DGRPLRVK 73
```

RRM-2

```
CHLAMY 1-C3  110 KLFVGQIPQHTTEQHIRSLFAPFGNITDVH 139
RRM-Domäne     1 TLFVGNLPPDTTEEDLRELFSKFGKVVSVR 30
                   RNP-2

CHLAMY 1-C3  140 VL--NKGNAPGCAFVTYERWAHAEAAMLSL 167
RRM-Domäne    31 IVRDKDTRSKGFAFVEFEDEEDAEKAIEAL 60
                            RNP-1

CHLAMY 1-C3  168 NGQTLIEGATTPMVVK 183
RRM-Domäne    61 NGKEL---DGRPLRVK 73
```

RRM-3

```
CHLAMY 1-C3 354 KLFIGQVPFEANETDLWPIFSPLGNILELV 383
RRM-Domäne  1   TLFVGNLPPDTTEEDLRELFSKFGKVVSVR 30
                  RNP-2

CHLAMY 1-C3 384 ILRH-QGKSKGCAFLTYENRTDAEKAIRTL 413
RRM-Domäne  31  IVRDKDTRSKGFAFVEFEDEEDAEKAIEAL 60
                          RNP-1

CHLAMY 1-C3 414 DSQVSVPSDPRGRLLTVK 430
RRM-Domäne  61  NGK-----ELDGRPLRVK 73
```

Regionen für mögliche posttranslationale Modifikationen im Protein CHLAMY 1-C3

gelb = Erkennungsstelle für Casein-Kinase II

grün = Erkennungsstelle für Protein-Kinase C

violett = Sequenz für Zell-Adhäsion

pink = N-Glykosylierungsstelle

```
1   MVMGMQKPEA VCAEPKVFVG QVPHEVTQDQ IFALFSKYGT  40
41  IKKCALITGP DGRSKGCAMV TYDRWAEAEL AIEHENGTAN  80
81  LGGGRTLLVK FADPPRGRGD GPVMGVAPKK LFVGQIPQHT 120
121 TEQHIRSLFA PFGNITDVHV LNKGNAPGCA FVTYERWAHA 160
161 EAAMLSLNGQ TLIEGATTPM VVKFADAKVQ DMGGQKRGFG 200
201 AVEGAPPGVF PGAAAGPGGN KRTFTGAGAP GAMGMAGMAA 240
241 AGYNPYAAAA AMGYDMSTMA AMGYGNMGMM AGMAGMQQGI 280
281 PGQGGQQGMG GGAMGGAGAM GGAQGLGAGG MGGMGGMGGM 320
321 GGGLMAGMNM MGLGMGGGMG MNKPGLQEGP KAWKLFIGQV 360
361 PFEANETDLW PIFSPLGNIL ELVILRHQGK SKGCAFLTYE 400
401 NRTDAEKAIR TLDSQVSVPS DPRGRLLTVK YANSAAAAAM 440
```

Lebenslauf

Name:	Claudia Schneid
Geburtsdatum:	02.05.1972
Geburtsort:	München
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1978 – 1982	Grundschule Am Hedernfeld, München
1982 – 1991	Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1991 – 1997	Studium der Diplom-Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München Abschluss: Diplom im Fach Biologie
1996 – 1997	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts an der Ludwig-Maximilians-Universität München Thema: „Untersuchungen am RNA-Bindeprotein Chlamy 1 aus *Chlamydomonas reinhardtii*“
seit 1998	Promotion unter Leitung von Prof. Dr. Maria Mittag am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Phytochemie am Botanischen Institut der LMU München. Sie haben für ein angenehmes Arbeitsklima gesorgt und mich immer wieder aus „Notsituationen“ befreit, indem sie mir mit Chemikalien u.ä. ausgeholfen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Maria Mittag bedanken, die sich stets für die Fortschritte meiner Arbeit interessiert hat. Ihre immerwährende Diskussions-bereitschaft hat auch die verborgensten Gedanken zum Vorschein gebracht.

Mein besonderer Dank gilt außerdem:

- Harald Waltenberger, der über die längste Zeit mein Mitstreiter im Labor war. Ich danke ihm u.a. für die Abende, an denen wir mit einem Bier zusammensaßen und uns Gedanken über die verschiedensten Methoden gemacht haben.
- „Meinem“ TA Jens Grosch, dem das „Häffä“-Abwiegen und *Chlamy*-Ernten bereits nach kurzer Zeit in Fleisch und Blut übergegangen ist. Seine Geschichten in den Kaffeepausen haben mich immer wieder zum Schmunzeln gebracht.
- Allen Diplomanden und „meinen“ studentischen Hilfskräften, die mir oft bei Routinearbeiten geholfen und für gute Laune gesorgt haben.
- Andrea Daxberger, Elke Knieb und Heidi Schmid für die moralische Unterstützung und die diversen gemeinsamen Freizeitaktivitäten.
- Petra Pickl aus Regensburg, deren Motivase-Lieferungen den Laboralltag versüßt haben.
- All den „Nicht-Biologen“. Vor allem Birgit Müller, die sich meine Laborgeschichten immer mit einer stoischen Ruhe angehört hat, obwohl sie nur einen Teil davon nachvollziehen konnte.

Last, but not least möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mich während meines gesamten Studiums immer unterstützt haben.