

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut für physiologische Chemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Walter Neupert

**Klonierung und Charakterisierung der Caseinkinase-1a
aus *Neurospora crassa***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Benedikt David Huttner

aus
München

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. M. Brunner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Aepfelbacher

Priv. Doz. Dr. M. Merrow

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2002

„Mei, a Arzt is halt a Arzt.“
(Gerhard Polt)

In Dankbarkeit:
meiner Tante Sissy und
meinem Onkel Hans
sowie meiner Schwester Dörthe

Abkürzungen

A	Ampère
A-	Amino-
α	Antikörper
aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
C-	Carboxy-
ccg	uhrenkontrolliertes Gen
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CK1	Caseinkinase 1
CRY	Cryptochrome-Protein
CT	Circadiane Zeit
cyc	Cycle-Gen
CYC	Cycle-Protein
DBT	Doubletime-Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dClk	Clock-Gen aus <i>Drosophila melanogaster</i>
dCLK	Clock-Protein aus <i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D.m.</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dNTP	Desoxyribonucleotid-5'-Triphosphat
dPer	Period-Gen aus <i>Drosophila melanogaster</i>
dPER	Period-Protein aus <i>Drosophila melanogaster</i>
dTim	Timeless-Gen aus <i>Drosophila melanogaster</i>
dTIM	Timeless-Protein aus <i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
F	Farad
frq	Frequency-Gen
FRQ	Frequency-Protein
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazino-N'-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
hPER	menschliches Period-Protein
<i>H.s.</i>	<i>Homo sapiens</i>

<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
<i>M. auratus</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>
MBS	Methacrylsäureester/1,3-Butadien/Styrol-Copolymere
mClk	Clock-Gen aus Säugetieren
mCLK	Clock-Protein aus Säugetieren
mCry	Cryptochrom-Gen aus Säugetieren
mCRY	Cryptochrom-Protein aus Säugetieren
min	Minuten
mM	millimolar
mPer	Period-Gen aus Säugetieren
mPER	Period-Protein aus Säugetieren
M _r	Molekularmasse
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
mTim	Timeless-Gen aus Säugetieren
mTIM	Timeless-Protein aus Säugetieren
<i>N.c.</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Ni-NTA	Nickelnitritoltriacetat
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNasin	Ribonuclease-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
<i>S.c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SDS	Natrium-dodecylsulfat
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymatische Einheiten (units)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vvd	Vivid-Gen
VVD	Vivid-Protein

W	Watt
wc-1	White-Collar-1-Gen
WC-1	White-Collar-1-Protein
wc-2	White-Collar-2-Gen
WC-2	White-Collar-2-Protein
w/v	Gewicht pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1-22
1.1. Biologische Uhren	1-4
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Allgemeines Uhrenmodell	2
1.1.3. Effekte der circadianen Uhr im Menschen	3
1.2. Die biologische Uhr von <i>Neurospora crassa</i>	5-15
1.2.1. <i>N. crassa</i> als Modellorganismus	5
1.2.2. Rhythmische Sporulation von <i>N. crassa</i>	5
1.2.3. Molekulare Grundlagen der circadianen Uhr von <i>N. crassa</i>	6
1.2.4. Einfluß von Licht auf die Uhr von <i>N. crassa</i>	11
1.2.5. Einfluß von Temperaturänderungen auf die Uhr von <i>N. crassa</i>	13
1.2.6. Auswirkungen der Uhr in <i>N. crassa</i>	15
1.3. Kinasen in circadianen Systemen	15-21
1.3.1. Problem der Verzögerung der Rückkopplung	15
1.3.2. Die Familie der Caseinkinasen 1 (CK1)	16
1.3.3. Funktion von Doubletime in <i>Drosophila melanogaster</i>	17
1.3.4. Die tau-Mutante in <i>Mesocricetus auratus</i>	19
1.4. Zielsetzung der Arbeit	22
2. Ergebnisse	23-36
2.1. Identifizierung, Klonierung, Überexpression und Reinigung des Doubletime Homologen CK-1a in <i>N. crassa</i>	23-29
2.1.1. Identifizierung des Doubletime Homologen in <i>N. crassa</i>	23
2.1.2. Subklonierung der CK-1a cDNA in den <i>E. coli</i> Vektor pGEM4	26
2.1.3. Expression von His ₆ -CK-1a in <i>E. coli</i>	27
2.1.4. Aufreinigung der exprimierten His ₆ -CK-1a über Nickel-NTA Agarose	28
2.2. Identifizierung verschiedener <i>in vitro</i> Substrate für CK-1a	30-36
2.2.1. Phosphorylierung von β-Casein durch CK-1a <i>in vitro</i>	30
2.2.2. Autophosphorylierung von CK-1a <i>in vitro</i>	31

2.2.3.	Phosphorylierung von Frequency durch CK-1a <i>in vitro</i>	32
2.2.4.	Phosphorylierung der PEST-Sequenzen von Frequency durch CK-1a <i>in vitro</i>	34
3.	Diskussion	37-41
3.1.	CK-1a ist homolog zu DBT und zur humanen CK1ϵ	39
3.2.	CK-1a ist <i>in vitro</i> aktiv und phosphoryliert β-Casein und sich selbst	39
3.3.	Frequency ist <i>in vitro</i> ein Substrat für CK-1a	40
3.4.	Weiterführende Experimente	40
4.	Zusammenfassung	42
5.	Material und Methoden	43-59
5.1.	Molekularbiologische Methoden	43-50
5.1.1.	Verwendete Plasmide	43
5.1.2.	Amplifikation von DNA mittels PCR	43
5.1.3.	Isolierung von Plasmid-DNA	45
5.1.3.1.	Minipräparation von DNA	45
5.1.3.2.	Midipräparation von DNA	45
5.1.4.	DNA-Konzentrationsbestimmung	46
5.1.5.	Phenolextraktion und Ethanolfällung	46
5.1.6.	Gelelektrophorese von DNA	47
5.1.7.	Präparative Gelelektrophorese	47
5.1.8.	Enzymatische Modifikation von DNA	48
5.1.8.1.	Restriktionsverdau von DNA	48
5.1.8.2.	Ligation von DNA-Fragmenten	48
5.1.9.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	48
5.1.10.	Sequenzierung von DNA	49
5.1.11.	Klonierungsstrategien	50
5.1.11.1.	pGEM4-CK-1a	50
5.1.11.2.	pQE-30-CK-1a	50

5.2.	Proteinchemische Methoden	50-55
5.2.1.	TCA-Fällung von Proteinen	50
5.2.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	51
5.2.3.	Synthese von Proteinen <i>in vitro</i>	51
5.2.3.1.	<i>In vitro</i> -Transkription	51
5.2.3.2.	<i>In vitro</i> -Translation	52
5.2.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
5.2.5.	Coomassie-Färbung von Gelen	53
5.2.6.	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen	53
5.2.7.	Autoradiographie	54
5.2.8.	<i>In vitro</i> Phosphorylierung mit [γ - ³² P]ATP	54
5.2.9.	Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	55
5.2.9.1.	Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i>	55
5.2.9.2.	Reinigung von Histidinhexapeptid-Fusionsproteinen aus <i>E.coli</i>	55
5.3.	Immunologische Methoden	56
5.3.1.	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen	56
5.4.	Chemikalien und Geräte	57-59
5.4.1.	Chemikalien und Enzyme	57
5.4.2.	Geräte und sonstige Materialien	58
6.	Literaturverzeichnis	60-70

1. Einleitung

1.1. Biologische Uhren

1.1.1. Definition

Lebende Organismen sind darauf angewiesen, eine Vielzahl verschiedener biochemischer und physiologischer Vorgänge zeitlich miteinander zu koordinieren, um sich den im Laufe eines Tages periodisch ändernden Umweltbedingungen optimal anpassen zu können. Zu diesem Zweck entstanden im Laufe der Evolution bei sehr vielen Spezies, vom Bakterium bis zum Menschen, komplexe zelluläre Systeme, die mit einer Periode von ungefähr 24 Stunden ("circadian") schwingen und so die astronomische Zeit messen. Diese Systeme nennt man biologische oder circadiane Uhren.

Die Licht- und Temperaturwahrnehmungen eines Organismus sind eng mit der biologischen Uhr verbunden und ermöglichen es, die subjektiv gemessene, innere, circadiane Zeit mit der objektiven, äußeren, astronomischen Zeit abzustimmen. Den Vorgang der Verstellung der inneren Uhr durch äußere Reize nennt man im Englischen "Entrainment". Die beiden wichtigsten dieser Reize, auch "Zeitgeber" genannt, sind Lichtreize und Temperaturänderungen. Eine fundamentale Eigenschaft der biologischen Uhren ist ihre Fähigkeit, einen Rhythmus auch unter konstanten Bedingungen endogen zu generieren und aufrechtzuerhalten. Die periodische Änderung der Umweltbedingungen durch die Erdrotation ist für die Entstehung und Aufrechterhaltung des Rhythmus in einem Lebewesen nicht entscheidend.

Ein weiteres wesentliches Merkmal dieser circadianen Systeme ist ihre Fähigkeit, über einen weiten Temperaturbereich konstante Rhythmen zu erzeugen (Hastings und Sweeney, 1957). Diese Eigenschaft bezeichnet man als Temperaturkompensation (engl. „temperature compensation“).

1.1.2. Allgemeines Uhrenmodell

Bei allen Organismen, deren circadiane Uhren bisher näher untersucht wurden, sind diese in ähnlicher Weise konstruiert. Das Zentrum der Uhr ist ein circadianer Oszillator, der auf einer Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife basiert.

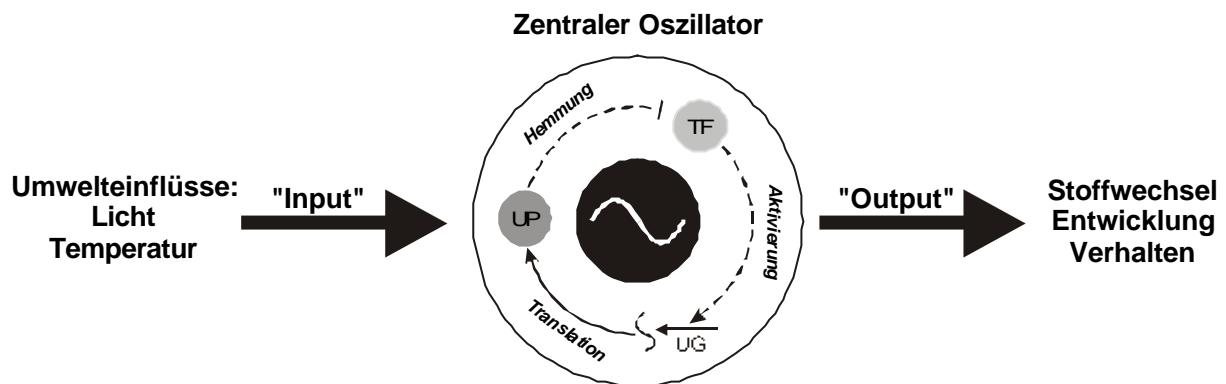


Abb. 1: Vereinfachtes Drei-Komponenten-Modell der biologischen Uhr
UP = Uhrenprotein (negativer Faktor), TF = Transkriptionsfaktor (positiver Faktor), UG = Uhrenprotein

Wesentlicher Bestandteil des Oszillators ist das sogenannte Uhrenprotein (engl. „clock protein“). Die Menge dieses Uhrenproteins und seiner Boten-RNA (mRNA) unterliegt unter konstanten Bedingungen im Lauf eines circadianen Tages einer charakteristischen rhythmischen Schwankung, etwa in Form einer Sinusfunktion. Jeder Punkt dieses Zyklus entspricht einer bestimmten, inneren Zeit.

Definitionsgemäß beginnt der circadiane Tag mit Sonnenaufgang, der als circadiane Zeit Null (CT 0 für "circadian time" 0) bezeichnet wird. Entsprechend gilt CT 6 als Mittag, CT 12 als Sonnenuntergang und CT 18 als Mitternacht.

Transkriptionsfaktoren aktivieren die Transkription des Uhrentagens. Sie werden deshalb als "positive Faktoren" bezeichnet. Licht- und Temperaturänderungen wirken sich auch auf die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren aus. Das Uhrenprotein selbst, wenn es in ausreichender Menge in den Zellkern gelangt, schaltet seine eigene Transkription ab und ist somit ein "negativer Faktor". Die einzelnen Komponenten des Oszillators bauen also eine negative Rückkopplungsschleife (engl. "negative feedback loop") auf.

Das Zustandekommen der Oszillation kann man sich vereinfacht folgendermaßen vorstellen: Das Uhrenprotein wird transkribiert und translatiert, bis sich eine immer größere Menge an Uhrenprotein in der Zelle ansammelt. Hat diese einen kritischen Schwellenwert überschritten, gelangen genug Moleküle des Uhrenproteins in den Zellkern, um dort die eigene Transkription zu inhibieren. Das Unterdrücken der Neusynthese und der gleichzeitige Abbau des Uhrenproteins bewirken eine Abnahme der Proteinmenge, bis ein Schwellenwert unterschritten wird ab dem die Transkriptionshemmung nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Der Zyklus beginnt dann wieder von vorne.

Die Wirkung der biologischen Uhr auf Stoffwechsel, Entwicklung und Verhalten wird über Gene vermittelt, deren Transkription zu bestimmten, von der biologischen Uhr vorgegebenen Zeitpunkten an- bzw. abgeschaltet wird. Man hat diesen Genen, deren Transkription rhythmisch erfolgt, deren Inaktivierung dabei aber ohne Einfluß auf das Funktionieren der biologischen Uhr bleibt, den Namen Uhren-kontrollierte-Gene (engl. „clock-controlled-genes“ = „ccg's“) gegeben (Loros et al., 1989).

Alle beschriebenen molekularen Bestandteile eines circadianen Oszillators sind innerhalb einer einzelnen Zelle vorhanden und funktionsfähig, unabhängig von der Komplexität eines Organismus.

Biologische Uhren sind nicht zum unmittelbaren Überleben eines Organismus notwendig. Eine biologische Uhr, deren Periode in etwa mit der des Licht-Dunkel-Zyklus übereinstimmt, verschafft aber dem Organismus, der sich ihrer bedient, einen evolutionären Vorteil (Ouyang et al., 1998), da er mit ihrer Hilfe Ereignisse in der Umwelt antizipieren kann.

1.1.3. Effekte der circadianen Uhr im Menschen

Viele physiologische, aber auch zahlreiche pathologische Vorgänge im menschlichen Körper weisen eine circadiane Rhythmisik auf (Abb. 2).

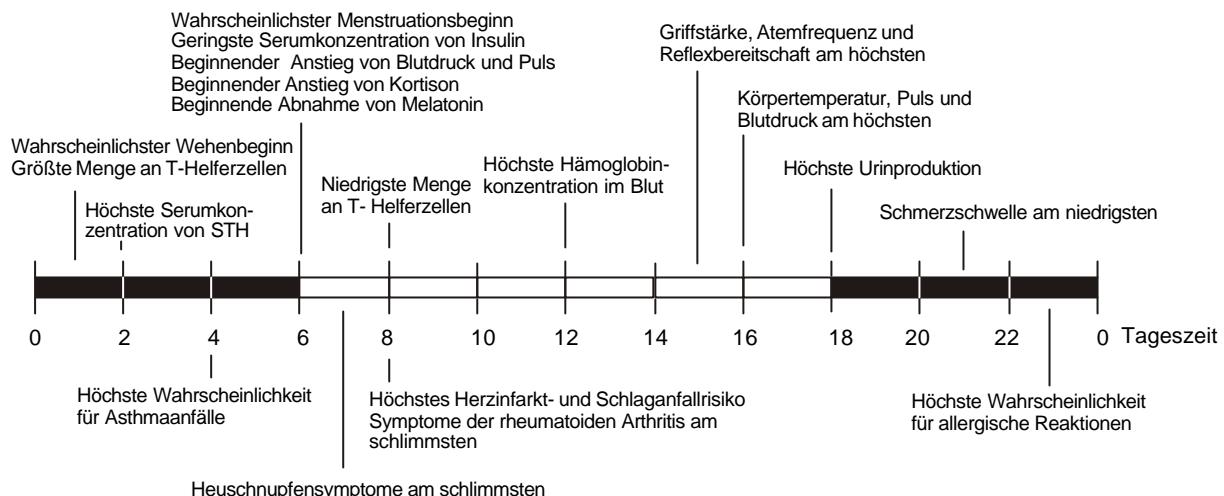


Abb. 2: Einige Auswirkungen der biologischen Uhr im Menschen (nach Young, 2000a)

Das auffälligste circadiane Phänomen ist der Schlaf-Wach-Rhythmus, aber es gibt wohl kaum einen Bereich unseres Stoffwechsels, unserer Immunabwehr oder unseres Verhaltens, der keinen circadianen Schwankungen unterliegt. Jeder der schon einmal unter dem „jet-lag“ nach einem Transatlantikflug gelitten hat, weiß was es bedeutet, wenn die innere Uhr nicht mit den äußeren Gegebenheiten übereinstimmt. Es gibt Erkrankungen, die direkt die circadiane Uhr betreffen und zu einer Störung des normalen Schlaf-Wach-Rhythmus führen (z.B. das „Familial Advanced Sleep Phase Syndrome“, siehe unten). Bei vielen anderen Erkrankungen ist ein gestörter circadianer Rhythmus Teil der Symptomatik. Patienten mit Depressionen leiden unter Einschlaf- und Durchschlafstörungen und eine kurzzeitige Besserung der depressiven Symptomatik kann durch Schlafentzug, der sicher nicht ohne Einfluß auf die innere Uhr bleibt, erreicht werden. Demente Patienten zeigen häufig eine Verschiebung des Schlaf-Wach-Rhythmus, mit vermehrter nächtlicher Aktivität, was für pflegende Angehörige sehr belastend sein kann.

Wenn man die Grundlage dieser Phänomene versteht, wird man diesen Patienten besser helfen können. Ein besseres Verständnis der circadianen Phänomene wird auch eine Arzneimitteltherapie ermöglichen, die sich an der tageszeitabhängigen Wirksamkeit von Medikamenten auf bestimmte pathologische Prozesse orientiert und so unerwünschte Nebenwirkungen reduziert.

1.2. Die biologische Uhr von *Neurospora crassa*

1.2.1. *Neurospora crassa* als Modellorganismus

Der heterothallische, d.h. mehr als einen Paarungstyp bei der sexuellen Fortpflanzung aufweisende, filamentöse Pilz *Neurospora crassa* (*N. crassa*) ist einer der Modellorganismen der Forschung über biologische Uhren. Seine Apathogenität, leichte Kultivierbarkeit und die Möglichkeiten zur genetischen Manipulation haben ihn schon in den frühen fünfziger Jahren für die Molekularbiologie interessant gemacht. So wurde etwa die „ein-Gen-ein-Protein-Hypothese“ aufgrund früher genetischer Beobachtungen an *N. crassa* aufgestellt (Beadle und Tatum, 1945). 1953 wurde festgestellt, daß die Sporulation von *N. crassa* in Abständen erfolgt, die etwa der Länge eines Tages entsprechen (Brandt, 1953) und sechs Jahre später konnte Colin Pittendrigh, einer der Väter der circadianen Forschung, zeigen, daß dieses Phänomen auch unter konstanten Temperaturbedingungen und andauernder Dunkelheit beobachtet werden kann (Pittendrigh et al., 1959). Außerdem erkannte man, daß die Periodizität von ungefähr 22 Stunden über einen Temperaturbereich von 18°C bis 31°C erhalten bleibt.

Mit dieser Entdeckung wurde *N. crassa* zum Modellorganismus für die Erforschung der molekularen Grundlagen der biologischen Uhr.

1.2.2. Rhythmische Sporulation von *N. crassa*

Die auffälligste und für Beobachtungen am leichtesten zugängliche Auswirkung der Uhr in *N. crassa* ist ihr Einfluß auf den asexuellen Fortpflanzungszyklus des Pilzes. Läßt man die Pilzhyphen auf einer Agaroberfläche wachsen, so setzt die biologische Uhr einmal am Tag die Bildung von Konidien in Gang. Zur wissenschaftlichen Beobachtung werden Stämme verwendet, die die sogenannte band (bd) Mutation tragen, die den Sporulationsrhythmus klarer zum Vorschein bringt, sonst aber keinen Einfluß auf die Funktion der Uhr besitzt.

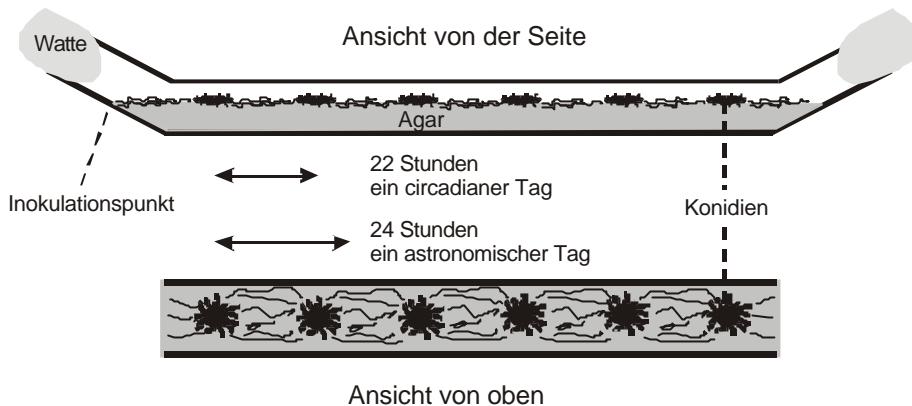


Abb. 3 : Periodische Konidienbildung von *N. crassa* in einem "race tube"

Konidien werden an einem Ende eines "race tube" ("race tubes" sind 30 bis 40 cm lange Glasröhren mit nach oben gebogenen Enden, die einen Agarnährboden enthalten) angeimpft und bei konstantem Licht und 25°C einen Tag lang angezogen (Abb. 3). Anschließend werden die "race tubes" in konstante Dunkelheit bei 25°C transferiert, wodurch die innere Uhr in allen Zellen synchronisiert und auf Sonnenuntergang (CT 12) gestellt wird. Zu einem Zeitpunkt am späten Abend wird der asexuelle Fortpflanzungsweg eingeschlagen, beginnend mit der Bildung von aufstrebenden Hyphen und schließlich von Makrokonidien. Einige Zeit später wird die Konidienentwicklung eingestellt und das Wachstum findet wieder in Form undifferenzierter Hyphen statt. Da *N. crassa* mit konstanter Geschwindigkeit wächst, kann man aus dem Abstand der Konidien und den alle 24 Stunden angebrachten Markierungen auf die Periodenlänge schließen.

1.2.3. Molekulare Grundlagen der circadianen Uhr von *N. crassa*

Wie oben beschrieben war man auf das Phänomen der periodischen Sporulation von *N. crassa* schon vor 40 Jahren aufmerksam geworden. In den frühen Siebzigern wurden dann erste Mutanten mit verändertem circadianem Phänotyp der Sporulation identifiziert. Sie wiesen Mutationen in einem Gen auf, das Frequency (frq) genannt wurde. Dieses Gen wurde 1989 kloniert und charakterisiert (McClung et al., 1989). Heute sind mehr als 30 verschiedene Mutationen in 14 Genen bekannt, welche den circadianen Rhythmus von *N. crassa* beeinflussen.

Das Frequency-Protein (FRQ) ist das zentrale Uhrenprotein, das den circadianen Oszillator in *N. crassa* aufbaut.

Die biochemische Funktion von Frequency ist bisher noch unbekannt. Es enthält jedoch ein Kernlokalisierungssignal (engl. „nuclear localization signal“, „NLS“), was auf eine Beteiligung an der Genregulation hinweist (Lewis und Feldman, 1996; Aronson et al., 1994a; Luo et al., 1998). Außerdem besitzt Frequency zwei Bereiche, die reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind, sogenannte PEST-Sequenzen, die vermutlich Signale für den proteolytischen Abbau von Proteinen darstellen (Rogers et al., 1986).

Frequency existiert in der Zelle in zwei Formen. Eine aus 989 Aminosäureresten bestehende lange Form (als lFRQ für "long" FRQ) und eine aus 890 Aminosäureresten bestehende kurze Form (als sFRQ für "small" FRQ), die durch alternativen Translationsbeginn an einem internem ATG-Kodon (ATG#3) entsteht (Garceau et al., 1997). Beide Translationsprodukte von FRQ sind für einen stabilen Rhythmus notwendig.

Um Mitternacht sind nur sehr wenig frq mRNA und FRQ in der Zelle vorhanden. Nun beginnt die Menge an frq mRNA in der Zelle anzusteigen, bis sie 10-12 Stunden später ihr Maximum erreicht. Dieser Anstieg ist vermutlich Folge der Aktivierung der Transkription durch einen heterodimeren Komplex von zwei Transkriptionsfaktoren, genannt White Collar 1 (WC-1) und White Collar 2 (WC-2) (Crosthwite et al., 1997).

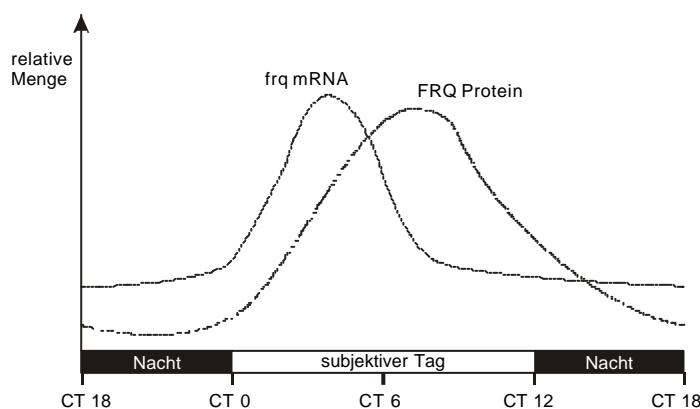
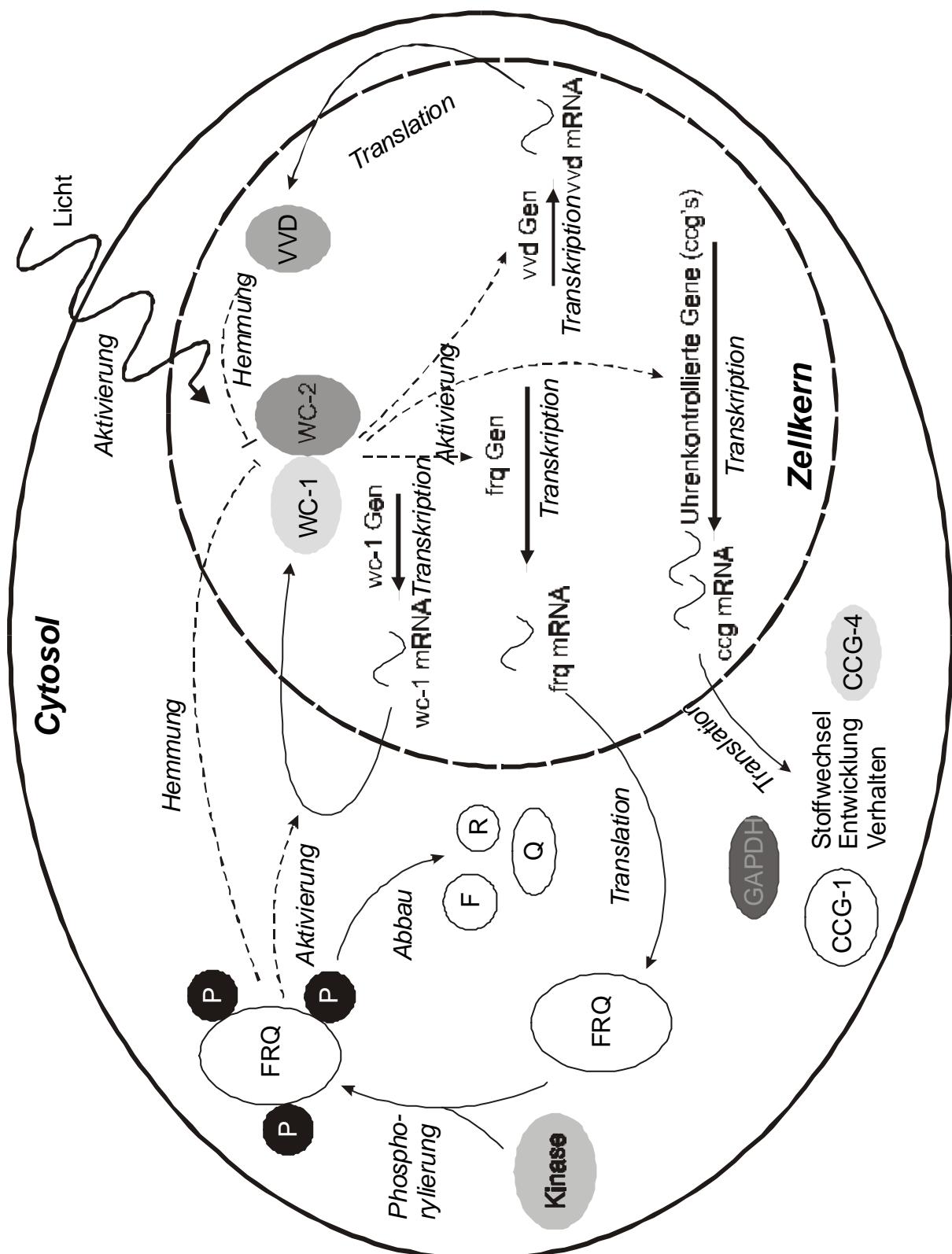


Abb. 4 : Circadiane Oszillation von Frequency mRNA und Protein

Abb. 5 : Schematische Darstellung der biologischen Uhr von *N. crassa*

WC-1 und WC-2 enthalten beide sogenannte PAS-Domänen, die für die Dimerisierung verantwortlich sind (Ballario et al., 1998). PAS steht für die Anfangsbuchstaben der Transkriptionsfaktoren PER, ARNT und SIM, in denen sie zuerst beschrieben wurden (Huang et al. 1993; Reisz-Porszsz et al., 1994). Die PAS-Domänen bestehen aus ungefähr 100 Aminosäuren und vermitteln Protein-Protein-Interaktionen zwischen PAS-enthaltenden Proteinen. WC-1 besitzt drei solche Domänen (PAS A, PAS B und LOV (siehe unten)), WC-2 dagegen nur eine.

PAS-Domänen wurden in vielen Transkriptionsfaktoren entdeckt, die am Aufbau biologischer Uhren in höheren Eukaryonten beteiligt sind (z.B. dCLOCK und CYCLE in *Drosophila melanogaster*, mCLOCK und BMAL1 in der Maus). Sowohl WC-1 als auch WC-2 weisen ein Zink-Finger-Motiv auf, über das die Interaktion mit DNA vermittelt wird (Ballario et al., 1996; Linden und Macino, 1997).

Das Frequency-Protein erreicht seine maximale Konzentration kurz nach Mittag, vier bis sechs Stunden später als die mRNA, deren Menge zu diesem Zeitpunkt schon wieder abnimmt (Abb. 4). Schon bald nach der Synthese ist Frequency im Kern zu finden (Luo et al., 1998), wo es seine eigene Transkription für den Rest des Tages inhibiert, wahrscheinlich, indem es die Aktivierung der Transkription durch WC-1 und WC-2 unterdrückt (Dunlap, 1999).

Das WC-1 Protein wird im Gegensatz zur *wc-1* mRNA rhythmisch exprimiert und erreicht sein Maximum um Mitternacht, ungefähr acht circadiane Stunden nach FRQ (Lee et al., 2000) (Abb. 6). Wahrscheinlich stimuliert FRQ die Translation der WC-1 mRNA, wodurch eine weitere negative Rückkopplungsschleife aufgebaut wird (Lee et al., 2000).

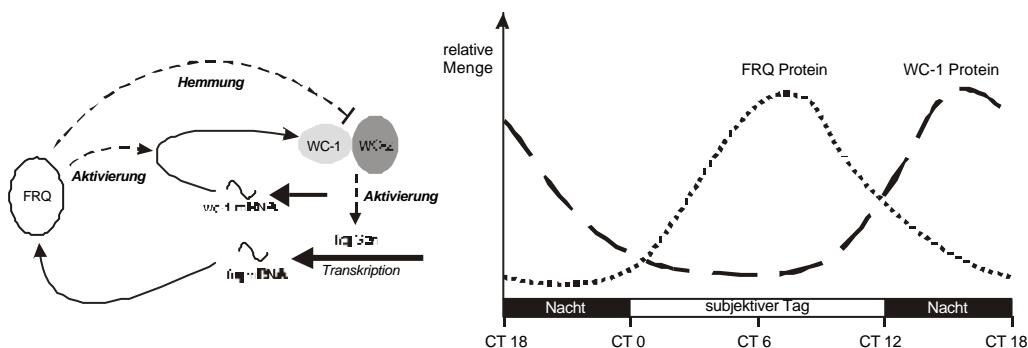


Abb. 6: Die FRQ-WC1-Oszillation

Die Menge an wc-2 mRNA und an WC-2 Protein unterliegt keinen dedektierbaren circadianen Schwankungen (Dunlap, 1999). Das WC-2 Protein liegt zu jedem Zeitpunkt des Zyklus in wesentlich höherer Menge (5-30 fach) vor als FRQ und WC-1 (Denault et al., 2001). Es vermittelt die Interaktion zwischen FRQ und WC-1 (Denault et al., 2001).

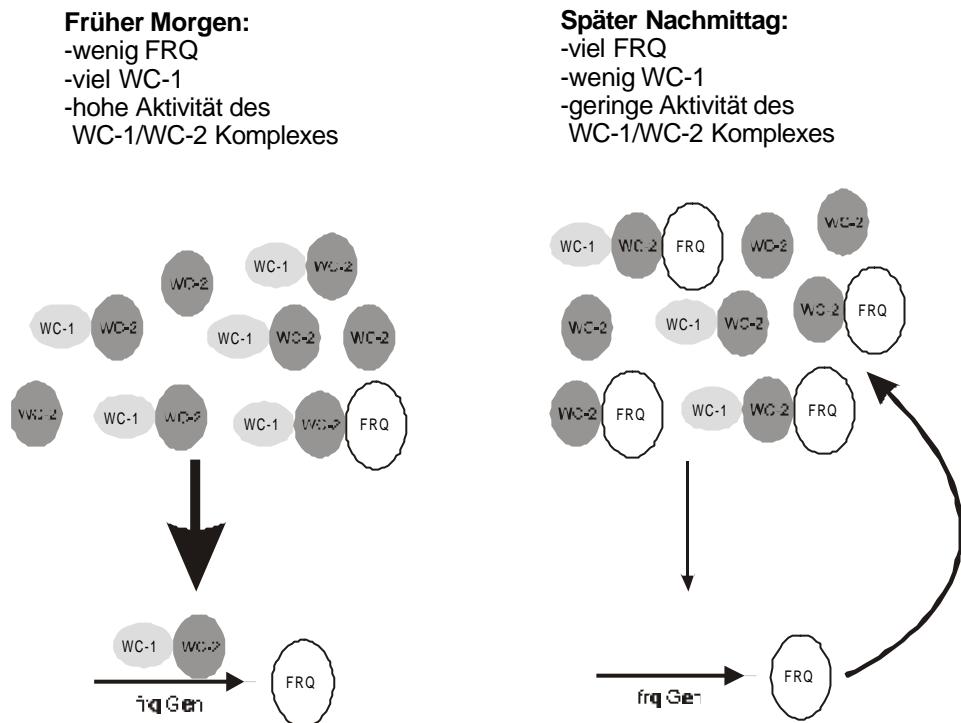


Abb. 7: Modell der Interaktion zwischen WC-2, WC-1 und FRQ (nach Denault et al., 2001)

Nach diesem Modell bilden sich am frühen subjektiven Morgen, zu einem Zeitpunkt, da in der Zelle viel WC-1 und wenig FRQ vorliegt, vor allem Komplexe aus WC-1 und WC-2, die die Transkription des *frq* Gens aktivieren. Im Laufe des circadianen Tages nimmt die Menge an WC-1 ab, während die Menge an FRQ zunimmt. FRQ könnte durch die vermehrte Interaktion mit WC-2 die Bildung aktiver WC-1/WC-2 Komplexe vermindern, was zu einer Abnahme der Transkription des *frq*-Gens führen würde.

FRQ wird sofort nach seiner Synthese zunehmend phosphoryliert. Der Abbau von FRQ scheint mit dieser Phosphorylierung einherzugehen (Garceau et al., 1997). Auf die mögliche Bedeutung dieses Vorgangs wird später in dieser Arbeit näher eingegangen. Hat die Menge an FRQ einen bestimmten Wert unterschritten, kann die Inhibition der *frq*-Transkription nicht länger aufrechterhalten werden, und der Zyklus beginnt aufs Neue.

Gen	frq	WC-1	WC-2
Funktion*	negativer Faktor	positive Faktoren aktivieren frq-Transkription	
Protein	rhythmische Expression lange und kurze Form (ein ORF) Verhältnis abhängig von Temperatur	rhythmische Express- sion	Konstitutive Express- sion Interagiert mit FRQ und WC-1
		Transkriptionsfaktoren Zn-Finger PAS-Domäne (Dimerisation von WC-1 und WC-2)	
Regulation	lichtinduzierbar	lichtinduzierbar	nicht lichtinduzierbar
Nullmutanten	arrhythmisch	lichtblind, arrhythmisch, geringe frq Expression	

*Die genaue biochemische Funktion ist von keinem der zentralen Uhrentogene bekannt

Tabelle 1: Zentrale Uhrentogene in *N. crassa*

1.2.4. Einfluß von Licht auf die biologische Uhr von *N. crassa*

Licht ist ein wichtiges Signal für die Abstimmung der inneren Uhr mit der astronomischen Zeit. Nach einem Lichtreiz steigt die Menge an frq mRNA und FRQ innerhalb kurzer Zeit an, unabhängig vom Zeitpunkt des circadianen Zyklus, an dem dies geschieht (Crosthwaite et al., 1995). WC-1 und WC-2 sind für diesen Effekt notwendig (Crosthwaite et al., 1997). Es wird vermutet, daß Licht die Dimerisierung von WC-1 und WC-2 begünstigt (Ballario et al., 1998), und daß das Heterodimer dann die Transkription von Frequency aktiviert (Ballario et al., 1998).

Der eigentliche Photorezeptor von *N. crassa* ist trotz intensiver Suche bisher noch nicht identifiziert. WC-1 ist ein Kandidat für den Photorezeptor von *N. crassa*, da es eine sogenannte LOV Domäne (engl. „Light, Oxygen, Voltage“; Ballario et al., 1998) enthält. Die LOV-Domäne ist strukturell mit der PAS-Domäne verwandt und kommt in Blaulichtrezeptoren anderer Organismen vor. WC-1 wird bei einem Lichtreiz zunehmend phosphoryliert (Talora et al., 1999).

Ein Lichtimpuls und die damit verbundene Induktion der frq Transkription und Translation haben unterschiedliche Auswirkungen, je nachdem an welchem Punkt des Zyklus sich

die biologische Uhr befindet. Gibt man spät nachts einen Lichtreiz, wenn die Menge an frq mRNA und FRQ gering sind, führt deren Anstieg zu einem Verschieben der Phase auf Mittag (engl. „phase advance“) (Abb. 8).

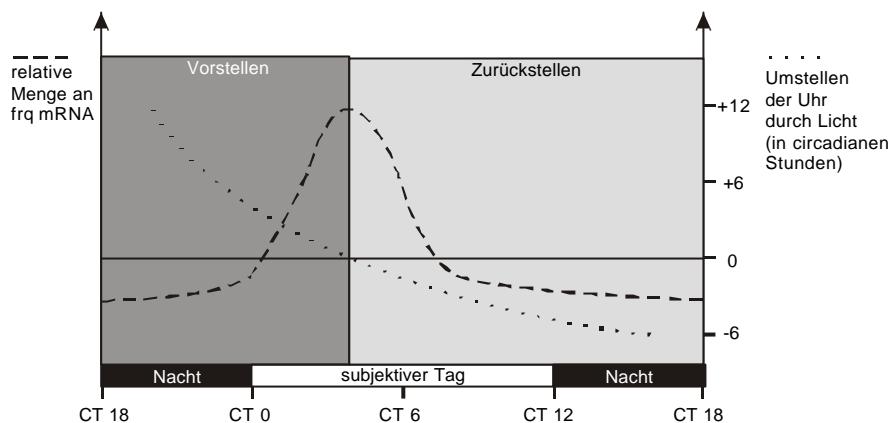


Abb. 8: Auswirkung eines Lichtreizes auf die Menge an frq mRNA (nach Dunlap, 1999)

Ein Lichtreiz am späten Abend hingegen, wenn frq mRNA und FRQ in der Zelle abnehmen, führt zu einem Rückstellen der Uhr auf Mittag (engl. „phase delay“). Ein Lichtreiz am subjektiven Mittag hat keine Verstellung der Uhr zur Folge, da frq mRNA und FRQ zu diesem Zeitpunkt bereits ihr Maximum erreicht haben. Umgekehrt führt ein Übergang von Licht ins Dunkel zu einer Abnahme von frq mRNA und FRQ (Merrow et al., 1997). Dieses Modell ist jedoch stark vereinfacht. So wird Frequency nicht zu jeder circadianen Zeit gleich stark durch einen Lichtreiz induziert (Heintzen et al., 2001). Diese Eigenschaft circadianer Uhren, gewisse Antworten und Verhaltensweisen auf einen äußeren Reiz auf bestimmte circadiane Zeiten zu reduzieren, bezeichnet man als „gating“ (Edmunds, 1988) (Abb.9).

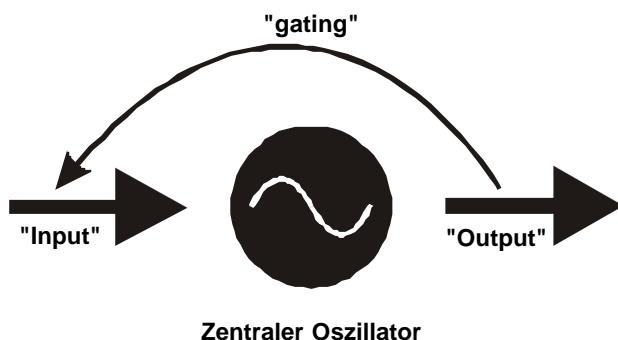


Abb. 9: Modell des „gating“: der „Output“ der Uhr reguliert die Empfindlichkeit der Uhr für „Input“ von außen

Das erst kürzlich klonierte und charakterisierte Protein VIVID (Heintzen et al., 2001) scheint ein wichtiges Element bei der Erklärung dieses Phänomens in *N. crassa* in Bezug auf Lichtreize zu sein. Das vivid-Gen und das VIVID-Protein, das wie WC-1 und WC-2 eine PAS-Domäne enthält, bauen außerhalb des zentralen Oszillators eine negative Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife auf (Abb. 10), die jedoch nicht für das Funktionieren der Uhr notwendig ist.

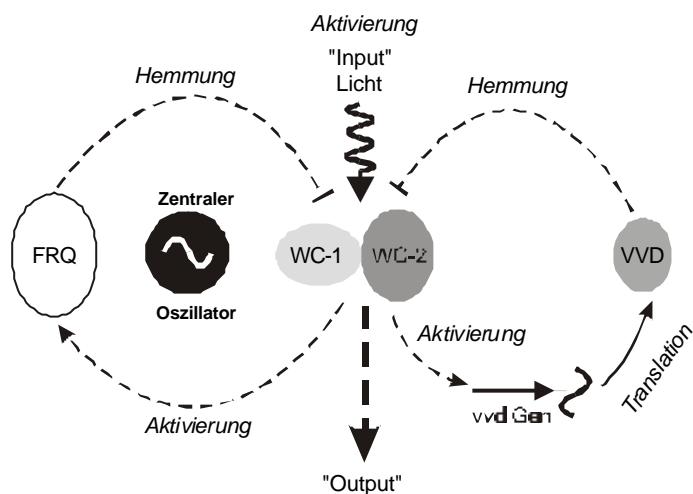


Abb. 10: Modell der Funktion von VVD

Die Transkription des vvd-Gens wird sowohl durch die circadiane Uhr periodisch gesteuert als auch durch Lichtreize induziert. Vermutlich interagiert VIVID über seine PAS-Domäne mit dem WC-1/WC-2 Komplex und vermindert dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor. Auf diese Weise schwächt VIVID in *N. crassa* die Reaktion auf einen Lichtreiz ab. Das Ausmaß dieser Dämpfung hängt von der circadianen Zeit ab, zu der der Lichtreiz gegeben wird.

1.2.5. Einfluß von Temperaturänderungen auf die Uhr von *N. crassa*

Die Rotation der Erde um ihre Achse bewirkt nicht nur rhythmische Änderungen von Licht und Dunkel, sondern geht auch mit erheblichen Temperaturunterschieden zwis-

schen Tag und Nacht einher. Diese Temperaturveränderungen sind ein zweiter Reiz, über den ein Organismus seine innere Uhr auf die astronomische Zeit abstimmen kann. Bemerkenswerterweise können Temperaturänderungen die circadiane Zeit in *Neurospora* sogar stärker beeinflussen als Lichtreize (Liu et al., 1998).

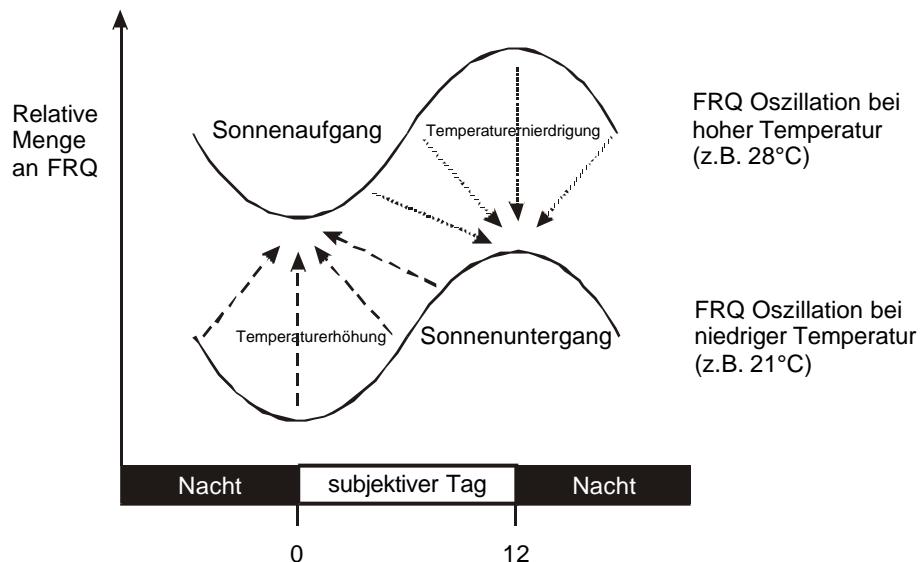


Abb. 11: Effekt von Temperaturänderungen auf die FRQ-Oszillation (nach Dunlap, 1999)

Wie bereits erwähnt, sind biologische Uhren in der Lage, über einen weiten Temperaturbereich eine konstante Periode aufrechtzuerhalten. In *N. crassa* scheinen bei dieser Kompensation die zwei unterschiedlichen Translationsprodukte von Frequency (sFRQ und IFRQ) eine Rolle zu spielen. Bei niedrigen Temperaturen macht sFRQ einen signifikanten Anteil des gesamten FRQ aus, während hohe Temperaturen die Expression der langen Form (IFRQ) begünstigen (Liu et al., 1997). Nicht nur das Verhältnis der beiden Formen zueinander wird von der Temperatur beeinflusst, auch die absolute Menge von FRQ ist von ihr abhängig. Je höher die Temperatur, desto mehr Frequency wird gebildet. Bringt man nun Zellen, die bei 21°C gewachsen sind, in eine Umgebung von 28°C, so wird die Menge an FRQ neu interpretiert. Bei 28°C ist während eines Zyklus das Minimum an FRQ größer als das Maximum bei 21°C. Nach dem Temperaturwechsel wird die Menge an FRQ, die unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt des Zyklus der Temperaturwechsel stattgefunden hat, geringer ist als bei einem normalen Zyklus bei 28°C, als Minimum und somit ungefähr als Sonnenaufgang interpretiert. Umgekehrt führt ein

Temperaturwechsel von 28°C auf 21°C zum Verstellen der Uhr auf Sonnenuntergang (Abb. 11).

1.2.6. Auswirkungen der Uhr in *N. crassa*

Der Einfluß der Uhr auf den Organismus wird über rhythmisch transkribierte "uhrenkontrollierte Gene" (ccgs) vermittelt, von denen mehr als ein Dutzend in *N. crassa* bekannt sind (Loros et al. 1989; Lauter und Yanofsky, 1993; Bell-Pedersen et al., 1996a). Per Definition sind sie für das Funktionieren der Uhr nicht notwendig (Loros et al., 1989). In Mutanten mit geändertem circadianen Rhythmus ändert sich auch die Periode der Transkription der ccgs. Viele dieser Gene erreichen ihre maximale Transkription zu einem Zeitpunkt, an dem die Konidienbildung einsetzt (ungefähr CT4), was auf ihre Beteiligung an diesem Vorgang hinweisen könnte (Bell-Pedersen et al., 1996a).

Andere ccg's, deren Funktion bekannt ist, kodieren für Enzyme des Kohlenhydratmetabolismus. Das Gen ccg-7 zum Beispiel kodiert für das Protein Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein zentrales Enzym der Glykolyse (Shinohara et al., 1998) und das Gen ccg-1 für die Trehalose-Synthase. Ccg's sind auch bei der Antwort auf Stress (Kupfer Metallothionen (ccg 12)) beteiligt.

1.3. Kinasen in circadianen Systemen

1.3.1. Problem der Verzögerung der Rückkopplung

Ein Problem des Modells der Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife ist die Frage nach dem Zustandekommen einer Periode von ungefähr 24 Stunden, wenn die daran beteiligten Vorgänge in der Zelle auch wesentlich schneller ablaufen könnten. Aus Rekonstruktionsexperimenten in einer frq-Nullmutante mit einem induzierbarem transgenen frq-Gen ist bekannt, daß die Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife schon innerhalb von sechs Stunden ablaufen kann, und daß dazu weniger als 25 FRQ-Moleküle im Zellkern benötigt werden (Merrow et al., 1997). FRQ ist schon wenige Stunden nach seiner Synthese im Zellkern nachzuweisen (Luo et al., 1998). Würde die

Inhibition der Transkription durch das Translationsprodukt sofort einsetzen, käme keine Oszillation zustande.

Vermutlich sind posttranskriptionale Prozesse daran beteiligt, die frühzeitige Rückkopplung zu verhindern. Die im Laufe des circadianen Tages zunehmende Phosphorylierung von FRQ (Garceau et al., 1997) könnte Bestandteil einer solchen Regulation sein.

1.3.2. Familie der Caseinkinasen 1 (CK1)

Eine Gruppe von Kinasen, die für die Phosphorylierung der Uhrenproteine in Frage kommt, sind Caseinkinasen 1 (CK1). Caseinkinasen stellen eine Gruppe konservierter, monomerer Serin/Threonin Proteinkinasen dar, die in fast allen eukaryontischen Spezies vorkommen. Sie sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie DNA-Reparatur (Hoekstra et al., 1991; Dhillon und Hoekstra, 1994), Zellzykluskontrolle (Gross et al., 1997) und Vesikeltransport (Panek et al. 1997) beteiligt. In Säugetieren können sieben CK1-Untergruppen unterschieden werden.

Alle Mitglieder der CK1 Familie besitzen eine ungefähr 300 Aminosäurereste lange, hoch konservierte N-terminale katalytische Domäne (Rowles et al., 1991). Die C-terminalen Domänen sind hingegen variabel und an der subzellulären Zielsteuerung (Vancura et al., 1994) und der Aktivitätsregulierung (Carmel et al., 1994; Graves und Roach, 1995) beteiligt.

Die Substratspezifität dieser Kinasen ist sehr weit, wobei die verschiedenen Isoformen wahrscheinlich eine unterschiedliche Substratspezifität aufweisen.

Die postulierte Konsensussequenz für die Phosphorylierung von Substraten, die bereits einen Phosphatrest tragen (engl. „phosphate directed phosphorylation“), lautet S/T/Y(P)X₁₋₂S/T, wobei S/T/Y(P) für einen beliebigen phosphorylierten Serin-, Threonin- oder Tyrosinrest und X für einen beliebigen Aminosäurerest steht (Flotow et al., 1990; Flotow und Roach, 1991; Meggio et al., 1991, 1992; Songyang et al., 1996). Es ist jedoch auch eine Phosphorylierung von unphosphorylierten Proteinen möglich und zwar bevorzugt in sauren Bereichen einer Polypeptidkette an Serinen und/oder Threoninen (Tuazon und Traugh, 1991; Pulgar et al., 1999).

Was die Regulation der CK1 angeht, so ist von der Isoform CK1 ϵ bekannt, daß sie einer Autophosphorylierung im C-terminalen Bereich unterliegt, die zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität führt (Cegielska et al., 1998). Unter physiologischen Bedingungen wird CK1 ϵ jedoch im dephosphorylierten, aktiven Zustand gehalten (Rivers et al., 1998).

1.3.3. Funktion von Doubletime in *Drosophila melanogaster*

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, einem anderen Modellorganismus der Uhrenforschung, ist mehr über die Rolle der Phosphorylierung der Uhrenproteine bekannt. Der für das circadiane Verhalten entscheidende, zentrale Oszillator von *D. melanogaster* befindet sich in zwei Gruppen von lateralen Neuronen im Gehirn der Fliege (Hall, 1995, 1998). Er bewirkt unter anderem eine periodische Änderung der lokomotorischen Aktivität der Tiere, an der Mutanten erkannt werden können.

Die molekularen Vorgänge, die in *D. melanogaster* den Oszillator aufbauen, entsprechen weitgehend denen in *N. crassa*. Abbildung 12 gibt einen schematischen Überblick über die biologische Uhr von *D. melanogaster*.

Die Rolle von FRQ als negatives Element übernehmen in *D. melanogaster* zwei Proteine, genannt Period (dPER) und Timeless (dTIM). dPER und dTIM dimerisieren miteinander und nur als Dimere gelangen sie in den Zellkern (Saez und Young, 1996). Dort dissoziieren sie wieder und vor allem dPER inhibiert die Transkription der dPER- und dTIM-Gene durch die positiven Faktoren CLOCK (dCLK; Allada et al., 1998) und CYCLE (CYC; Darlington et al., 1998; Rutila et al.; 1998). dCLK und CYC entsprechen formal WC-1 und WC-2 in *N. crassa* und besitzen ebenfalls PAS Domänen, über die sie dimerisieren können.

Anders als in *N. crassa* erreicht die Menge der Uhrenproteine dTIM und dPER etwa um Mitternacht (CT 18) ihr Maximum (Max. FRQ ~CT 8-12). Ein Lichtreiz führt zu einer Destabilisierung und verstärktem Abbau der negativen dTIM/dPER-Elemente und nicht

zu ihrer Induktion (Hunter-Ensor et al., 1996). Dieser Effekt wird über den Photorezeptor Cryptochrom (dCRY) (Emery et al., 1998) vermittelt, der dTIM in lichtabhängiger Weise bindet und zum Abbau freigibt (Ceriani et al., 1999).

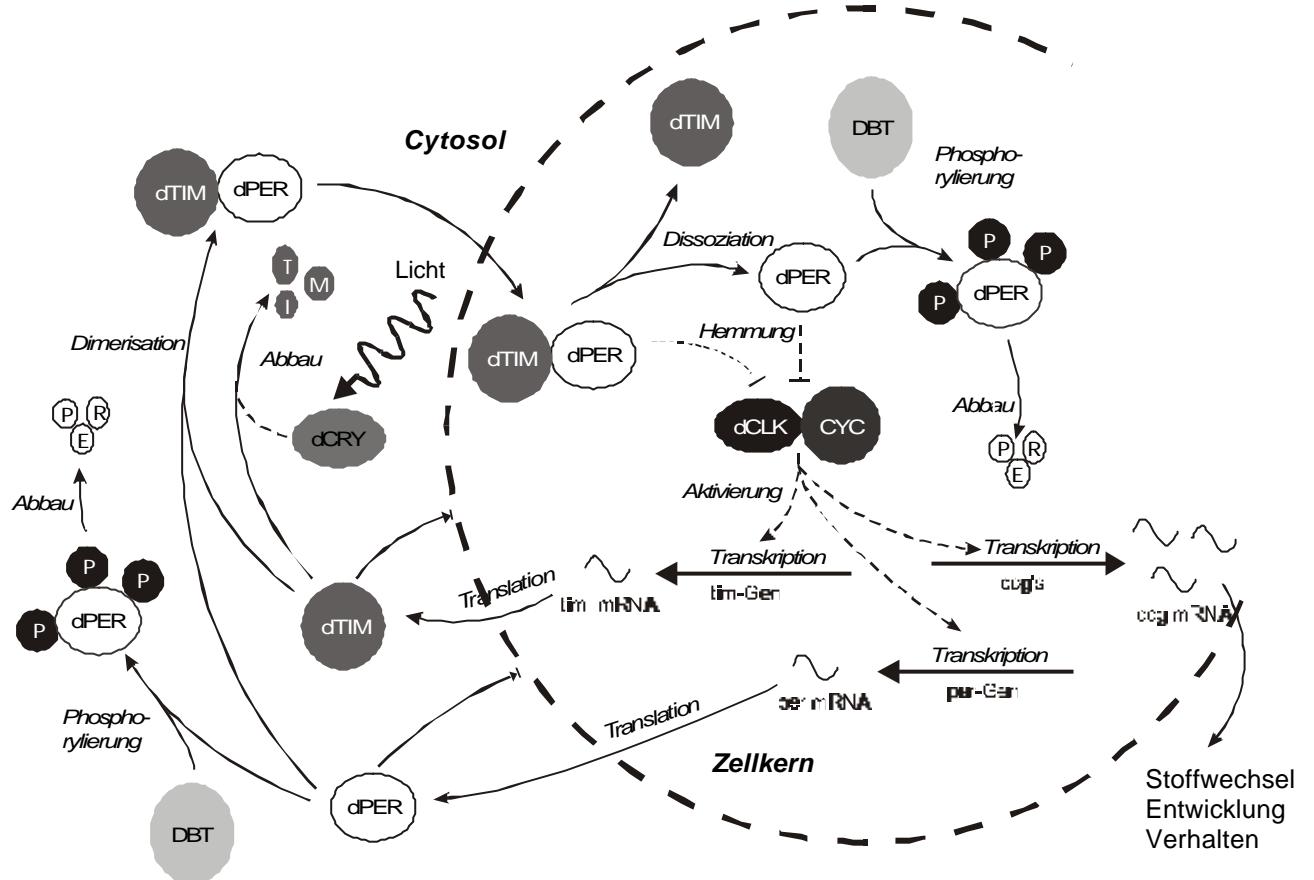


Abb. 12: Schematische Darstellung der biologischen Uhr von *Drosophila melanogaster*

Bei der Suche nach Genen in *D. melanogaster*, deren Mutation zu einem veränderten circadianen Phänotyp führt, wurde das Gen Doubletime (dbt) identifiziert, das für eine zur humanen Caseinkinase 1ε homologen Kinase kodiert (Kloss et al., 1998; Price et al., 1998). Das Genprodukt Doubletime (DBT) phosphoryliert dPER. Dies geschieht sowohl im Cytosol als auch im Zellkern, allerdings nur wenn dPER sich nicht in einem Komplex mit dTIM befindet (Price et al., 1998). Phosphoryliertes dPER wird verstärkt abgebaut. In Mutanten mit teilweisem Verlust der Doubletimefunktion führt die Hypophosphorylierung von dPER zu seiner Akkumulation in der Zelle. Mutationen im Double-

time-Gen können sowohl zu einer Verlängerung als auch zu einer Verkürzung der circadianen Periode führen (Price et al., 1998).

1.3.4. Die tau-Mutante in *Mesocricetus auratus*

Auch in Säugetieren gibt es Hinweise für die Bedeutung postranslationaler Prozesse bei der Regulation der biologischen Uhr.

Obwohl Säugetiere phylogenetisch weit von Pilzen und Insekten entfernt sind, unterscheidet sich das Prinzip ihres circadianen Oszillators nicht wesentlich von dem in *D. melanogaster* und *N. crassa*. Es sind allerdings deutlich mehr Faktoren am Aufbau der molekularen Uhr beteiligt.

	Neurospora	Drosophila	Maus (Säugetiere)
negative Faktoren	frq	dPer, dTm	mPer1, mPer2, mPer3, mCry1, mCry2
positive Faktoren	wc-1, wc-2	dClk, cyc	mClk, bmal1

Tabelle 2: Übersicht über die wesentlichen circadianen Gene der verschiedenen Modellorganismen

Die beiden Nuclei suprachiasmatici (SCN) im Bereich des Hypothalamus, bestehend aus jeweils etwa 10000 Zellen, bilden das übergeordnete circadiane Zentrum bei Säugetieren (Klein et al., 1991). Dabei sind einzelne Neurone in der Lage eine circadiane Oszillation aufzubauen (Welsh et al., 1995). Durch interzelluläre Kommunikation wird die Aktivität dieser Neurone synchronisiert (Shirakawa et al., 2000). In Säugetieren wurden Homologe für die meisten Uhrentypen aus Drosophila identifiziert. Im Laufe der Evolution haben jedoch Genduplikationen zu einer Zunahme der am Aufbau der Uhr beteiligten Faktoren geführt, so daß die meisten Uhrentypen aus Drosophila durch zwei oder mehr Homologe in Säugetieren repräsentiert sind (Reppert und Weaver, 2001). Außerdem hat eine teilweise Verschiebung der Aufgaben strukturell homologer Proteine stattgefunden. Das Prinzip der negativen Translations-Transkriptions-Rückkopplungsschleife als Basis des Oszillators bleibt aber auch in Säugetieren erhalten.

Es sind bisher fünf negative Faktoren, mPER1 (Tei et al., 1997), mPER2 (Takumi et al., 1998), mPER3 (Zylka et al., 1998), mCRY1 und mCRY2 (Kume et al., 1999) und zwei positive Faktoren, mCLK (King et al., 1997) und BMAL1 (Ikeda und Nomura, 1997), bekannt, die diese Rückkopplungsschleife aufbauen. Die genaue Funktion der jeweiligen Proteine ist allerdings noch nicht im Detail erforscht und die Interaktion der einzelnen Faktoren ist bisher nur unvollständig verstanden. Im Gegensatz zu Drosophila sind die Cryptochromes in Säugetieren nicht nur Photorezeptoren, sondern wesentliche Elemente der Uhr, wohingegen das Homolog zu Timeless (mTIM) (Koike et al., 1998) in Säugetieren keine Rolle zu spielen scheint.

Beim Goldhamster *Mesocricetus auratus* weisen Tiere, die die sogenannte tau-Mutation tragen, eine verringerte circadiane Periode auf. Die tau-Mutation wurde als Punktmutation in einem zu DBT und zur humanen Caseinkinase 1 ϵ homologen Gen identifiziert (Lowrey et al., 2000). Diese Mutation führt zu einer verminderten Aktivität der Kinasefunktion des Genprodukts und zur Verkürzung der circadianen Periode von 24 auf 20 Stunden in homozygoten Tieren.

Auch bei der Maus, dem Säugetier dessen circadianes System am besten untersucht ist, scheint ein Homolog der humanen CK1 ϵ an der Regulation des circadianen Rhythmus beteiligt zu sein. Das Uhrenprotein mPER1 wird von CK1 ϵ *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert, wodurch wahrscheinlich der Transfer von mPER1 in den Zellkern reguliert wird (Vielhaber et al., 2000).

Die menschlichen Caseinkinasen 1 ϵ und 1 δ phosphorylieren die menschlichen Uhrenproteine hPER1 und hPER2 *in vitro* und *in vivo* und führen zu deren verstärkten Abbau *in vivo* (Keesler et al., 2000, Camacho et al., 2001).

Kürzlich wurde bei einer Familie, deren Mitglieder unter dem seltenen, autosomal dominant vererbten „Familial Advanced Sleep Phase Syndrome“ leiden, eine Mutation in dem menschlichen Uhrenprotein hPer2 festgestellt (Toh et al., 2001). Bei diesem Syndrom ist der Schlaf-Wach-Rhythmus um durchschnittlich vier Stunden nach vorne verschoben, so daß die betroffenen Patienten schon am frühen Abend das Bedürfnis zum Schlafen verspüren, dann aber bereits früh morgens aufwachen. Die Mutation im hPer2-Gen liegt

im Bindungsbereich von hPER2 mit der Caseinkinase 1 ϵ und führt in vitro zu einer Hypophosphorylierung von hPER2 durch CK1 ϵ (Toh et al., 2001).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß selbst bei Spezies, deren evolutionäre Entwicklung sich schon vor Jahrmillionen getrennt hat, dieselben postranslationalen Prozesse am Zustandekommen der circadianen Periode beteiligt sind. Insbesondere die Phosphorylierung der Uhrenproteine einhergehend mit deren verstärktem Abbau scheint dabei einen wesentlichen Anteil zu haben.

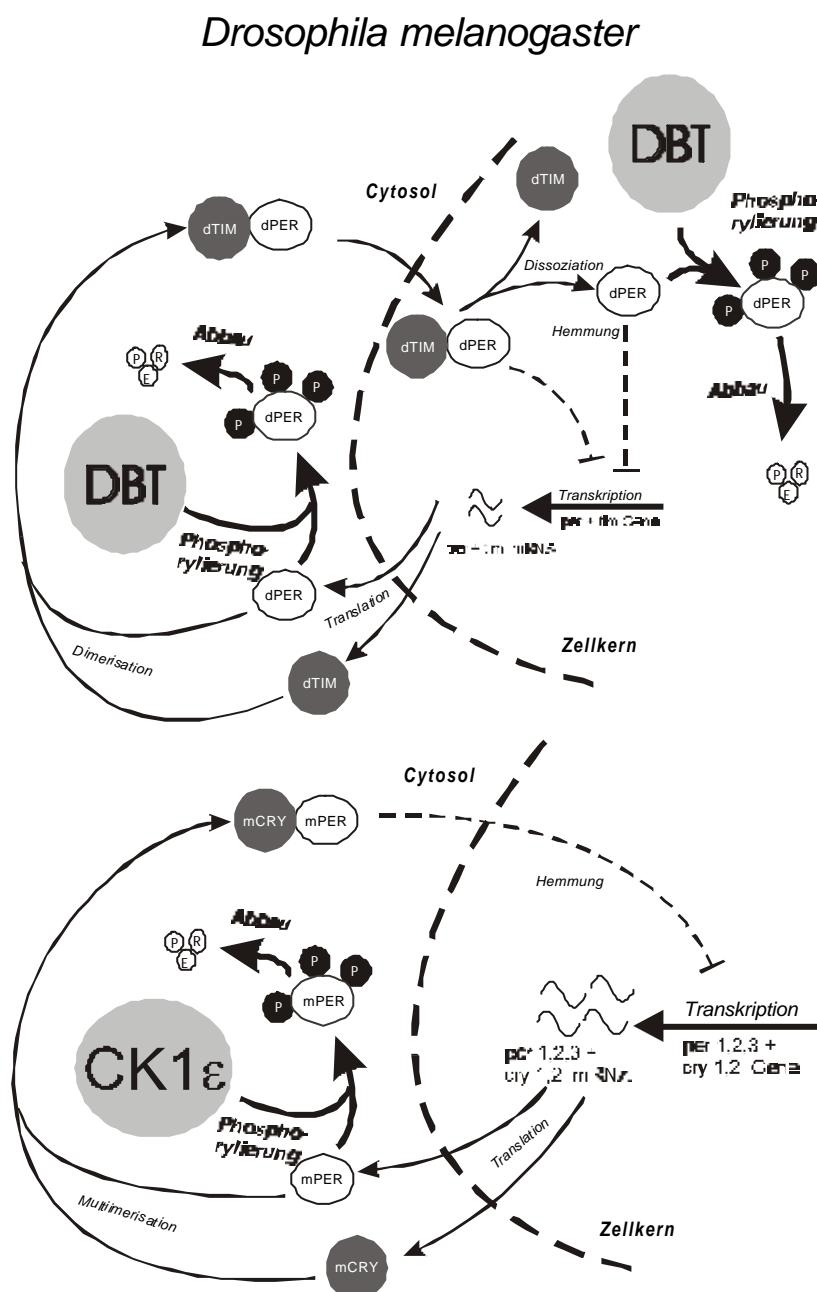


Abb. 13: Die Rolle von CK1 ϵ -Homologen in *D. melanogaster* und *M. auratus*.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle von Caseinkinasen bei der Regulation der biologischen Uhr von Fruchtfliege und Hamster legt die Vermutung nahe, daß auch in *N. crassa* ein Mitglied dieser Kinasefamilie an der Regulation der circadianen Oszillation beteiligt sein könnte.

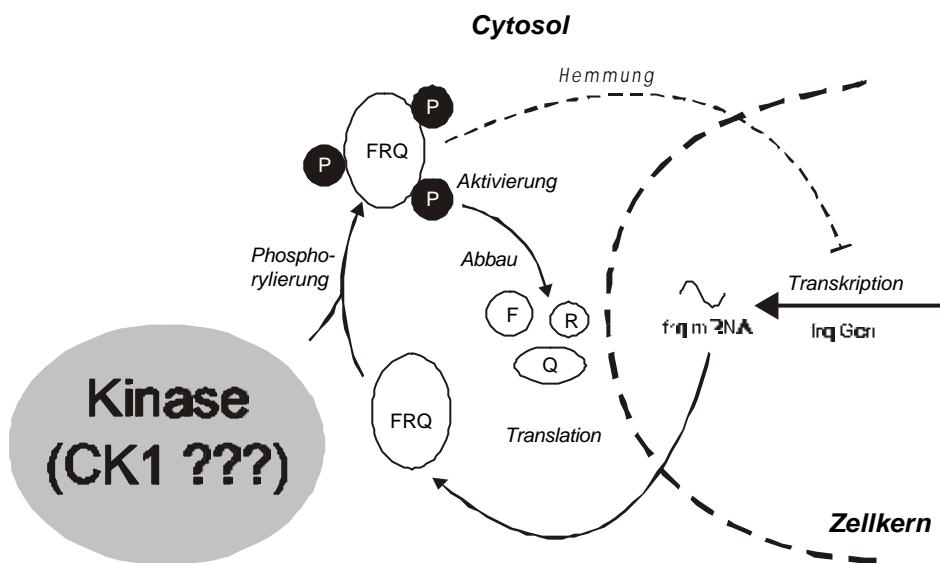


Abb. 14 : Modell der möglichen Funktion eines DBT-Homologen in *N. crassa*

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine zu Doubletime homologe Caseinkinase 1 in *N. crassa* zu identifizieren. Diese sollte kloniert und überexprimiert werden. Die Aktivität und Spezifität dieser Kinase für verschiedene Substrate könnte anschließend *in vitro* getestet werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob Komponenten der Uhr in *N. crassa* Substrate für diese Kinase darstellen. Damit wären die Grundlagen geschaffen für eine weitergehende Untersuchung der Bedeutung dieser Kinase für die biologische Uhr *in vivo*.

2. Ergebnisse

2.1. Identifizierung, Klonierung, Überexpression und Reinigung des Doubletime Homologen CK-1a in *N. crassa*

2.1.1. Identifizierung des Doubletime Homologen in *N. crassa*

Um ein zu Doubletime (DBT) homologes Protein in *Neurospora crassa* (*N. crassa*) zu identifizieren, wurde in der *Neurospora crassa* cDNA Datenbank der University of New Mexico und der Datenbank des deutschen *Neurospora crassa* Genomprojekts nach homologen Proteinsequenzen gesucht. Die Suche ergab zwei in Frage kommende Sequenzen, die Ähnlichkeit mit kodierenden Sequenzabschnitten von DBT hatten. Die entsprechenden Gene wurden CK-1a und CK-1b genannt. Die genomische DNA von CK-1b war im Rahmen des *N. crassa* Genomprojekts sequenziert worden und als Contig 3L13 in der Datenbank abgelegt. Das Contig 3L13 hat eine Länge von 21 kb und kodiert vermutlich für vier Gene. Das Gen für CK-1b enthält drei Introns (Abb. 15). Das vorhergesagte Protein weist Ähnlichkeit zu Caseinkinase 1 auf.

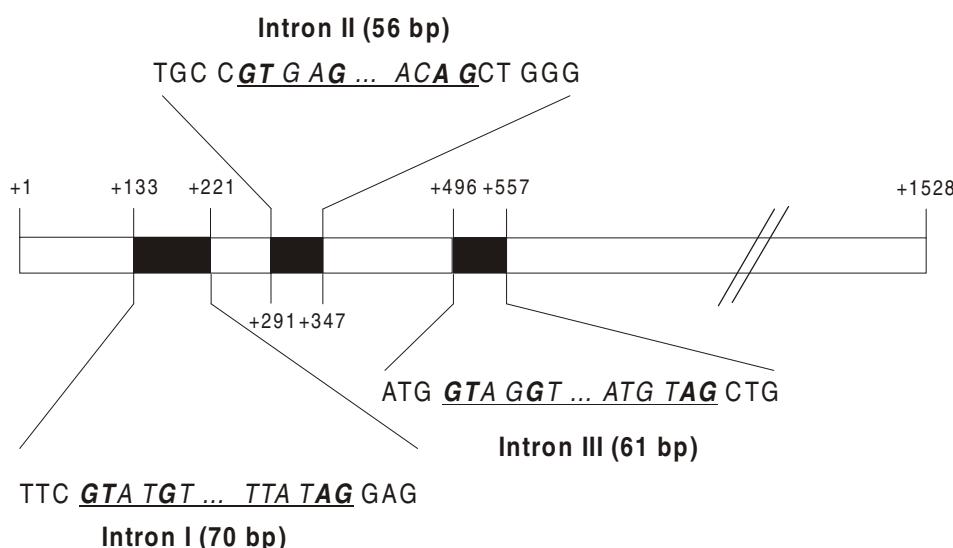


Abb. 15: Schematische Darstellung der genomischen DNA von CK-1b

Das Gen kodiert für eine Kinase mit 441 Aminosäureresten. Es enthält drei Introns (schwarze Bereiche) von 56, 61 bzw. 70 bp Länge an den angegebenen Stellen und vier Exons (weiße Bereiche). Die Exon-Intron-Übergänge sind jeweils als Sequenz angegeben. Die zum Intron gehörende Sequenz ist kursiv und unterstrichen dargestellt. Die konservierten Basen der Donorstelle (NGTNNGN) und Akzeptorstelle (NNNAGN) der Introns sind fett markiert.

Die Sequenz von CK-1a wurde in einer cDNA Datenbank gefunden. Da die Sequenz von CK-1a unvollständig war, wurde der entsprechende Klon bei der University of New Mexico bestellt und vollständig sequenziert. Der offene Leserahmen von CK-1a kodiert für ein Protein mit 363 Aminosäureresten, das signifikante Ähnlichkeit zu Caseinkinase 1 aufweist. Abb. 16 A zeigt ein Dendrogramm von Caseinkinase 1 Sequenzen aus verschiedenen Organismen. Abb. 16 B zeigt einen Sequenzvergleich von CK-1a und CK-1b mit Doubletime und Caseinkinasen 1 aus dem Menschen und Hefe. Neurospora CK-1a scheint näher mit Doubletime verwandt zu sein als CK-1b. Daher sollte CK-1a exprimiert und näher charakterisiert werden.

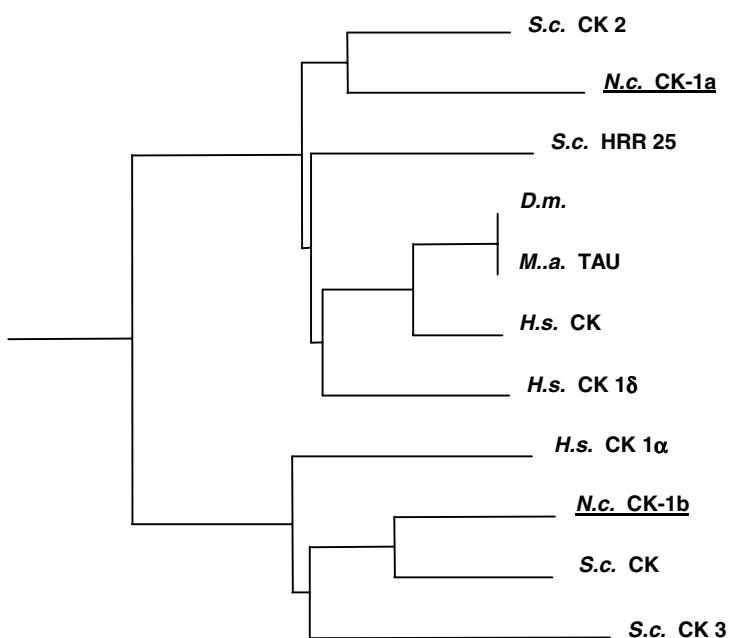


Abb. 16 A: Dendrogramm von Sequenzen verschiedener Caseinkinasen aus unterschiedlichen Organismen (aus Görsl et al., 2001)

CK-1a und CK-1b aus *Neurospora crassa* sind unterstrichen dargestellt

H.s. = *Homo sapiens*, D.m. = *Drosophila melanogaster*, N.c. = *Neurospora crassa*, S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*, M.a. = *Mesocricetus auratus*

N.c. CK-1a	MTTMDLRVGNKYRIGRKIGSGSGDIYLGTNIISGEEIAIKLESVKAKHPQLEYEARVYKSLAGGVGIPFV	71
S.c. HRR25R.....H..L.....IRSR....D..S...RY.S.....I	68
H.s. CK-1ε	.E.....A.A.....C..T....HI.SK.F..MMQ.....SI	68
H.s. CK-1δ	.E.....D.AA.....C..T....HI.SKI..MMQ.....TI	68
D.m. DBT	.E.....L.....T.NT.....CIRT....HI.SK.F..TMQ.....RI	68
H.s. CK-1α	MASSSSGSKAIFI..G..KLV.....AI..TN.....Q..R....L..SKL..I.Q.....HI	77
N.c. CK-1b	MASS.SSNV..VH..V.K..E....V.FE...LLNNQQV...F.PR.SDA...RD.Y.T..I.V.CP...N.	73
N.c. CK-1a	RWFGTECDYDYNAMVL DLLGPSLEDLFNFCNRKFSLKTVLLLADQLISRIEYIHAKSF <small>I</small> HRS <small>I</small> HRDIKPDNFLMGIGKRG <small>N</small> QV	148
S.c. HRR25	..F.R.G...AM.ID.....Y.H.R..F...IM..L.MFC..Q...GR.....V.R..ST.	145
H.s. CK-1ε	K.C.A.G...VM.ME.....F.S.K.....M.....S.N.....V.....L..K..L.	145
H.s. CK-1δ	..C.A.G...VM.ME.....F.S.....M.....S.N.....V.....L..K..L.	145
D.m. DBT	I.C.S.G...VM.ME.....F.S.R.....M....D..SRD.....L..K..L.	145
H.s. CK-1α	..Y.Q.K...VL.MD.....F.S.R.TM...M....M.....V.T.N.....RHC.KL	151
N.c. CK-1b	YY..Q.GLH.IL.ID.....DH...R.....VMV.K.ML..VQT..E.NL.Y.....I.RQGTTKTA <small>N</small>	150
N.c. CK-1a	--NVIDFGLAKKYRDPKTHFHIPYRENKNLTGTARYASINTLGVQSRRDDMESLG <small>V</small> YMLFCRGSLPWQGLKAAT	221
S.c. HRR25	--H.....S.....FN..R.....S.....V.....L.....LI...K.....TT	218
H.s. CK-1ε	--YI.....AR..Q.....V.....L.....LM..NL.....	218
H.s. CK-1δ	--YI.....AR..Q.....V.....L.....LM..NL.....	218
D.m. DBT	--YI.....ARSLK.....V.....L.....LM..NL.A.....N	218
H.s. CK-1α	--FL.....NR.RQ.....V.A.....LM..N.T.....	224
N.c. CK-1b	VIH.V...M..Q.....KQ.....R.S.S....M.....R.....L.A..H.FM..L..G.....	225
N.c. CK-1a	ATKKQKYDRIMEKKMTPTEVLCRGFPNEFAIYLNYTRSLRFDDKPDYSYL <small>R</small> KIFRDLFVREGFQYDYVFDWTVYKY	298
S.c. HRR25	TT.....LNVSvet..S.L.L..QE.MA.CKNLK..E....LF.ARL.KD.SIKLEYHN.HL....MLRY	295
H.s. CK-1ε	...R...E..S....S..I....K.Y.S..ST..NFC.....QL..N..H.Q..S..YV...NML.F	295
H.s. CK-1δ	...R...E..S....S..I....K.Y.S..T..NFC.....QL..N..H.Q..S..YV...NML.F	295
D.m. DBT	.N.R...E..S...LS.SIV...K...S..VN..NFC.QMH..QR...CH...L..N..H.L..T..YV...NLL.F	295
H.s. CK-1α	...R...E..S....S.PV....K...A...M..N.C.G...EEA...M...QL..I..RTLN.HQ.YT...TML.Q	301
N.c. CK-1b	..N....EK.G...Q..AIKD..E...EQ..Q..T.V.N.G.E.Q...D...EL.SQALKDA.GVE.GEY..MKVNK	302

Abb. 16 B: Sequenzvergleich der N-terminalen Bereiche verschiedener Caseinkinasen aus unterschiedlichen Organismen mit CK-1a aus *N. crassa* (aus Gör et al., 2001)

N.c. = *Neurospora crassa*, S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*, H.s. = *Homo sapiens*, D.m. = *Drosophila melanogaster*
Identische Aminosäurenreste sind durch einen Punkt dargestellt.

2.1.2. Subklonierung der CK-1a cDNA in den *E. coli* Vektor pGEM4

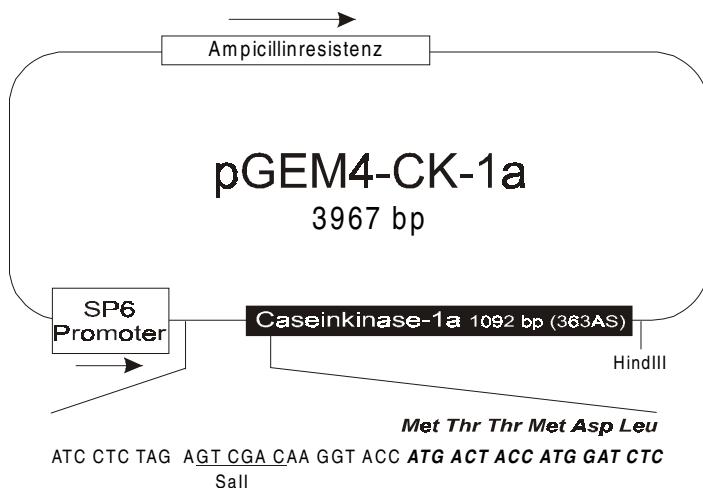


Abb. 17 : Schematische Darstellung des Vektors pGEM4-CK-1a

Die CK-1a cDNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *HindIII* in den Vektor pGEM4 kloniert.

Die CK-1a cDNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Primer hierzu wurden so gestaltet, daß am 5' Ende Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sall* und *KpnI* und am 3' Ende für *NotI* und *HindIII* eingeführt wurden. Die CK-1a cDNA wurde mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *HindIII* geschnitten und in den Vektor pGEM4 kloniert (Abb. 17).

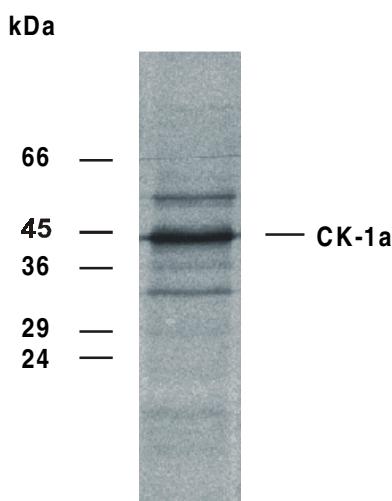


Abb. 18: *In vitro* Transkription und Translation von pGEM4-CK-1a

pGEM4 CK-1a wurde *in vitro* mit SP6 Polymerase transkribiert. Nach Fällen der RNA wurde diese *in vitro* in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von [³⁵S] Methionin translatiert. 2µl Lysat wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Translationsprodukte wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. CK-1a (39,6 kD) ist gekennzeichnet. Die Molekulargewichtsmarker sind angegeben.

Positive Klone wurden über PCR identifiziert. Durch *in vitro* Transkription und Translation wurde überprüft, ob ein durchgängiger, offener Leserahmen vorhanden ist, und ob ein Protein von der erwarteten Größe von 39,6 kD translatiert wird (Abb. 18).

2.1.3. Expression von His₆-CK-1a in *E. coli*

Ziel der Klonierung war es, die CK-1a in *E.coli* XL1-Blue zu exprimieren und anschließend aufzureinigen. Dazu wurde die CK-1a cDNA aus dem pGEM4-CK-1a Vektor mit den Restriktionsenzymen *Asp718* und *HindIII* in den Expressionsvektor pQE30 umkloniert (Abb. 19). Der pQE30-Vektor führt N-terminal einen „Hexahistidin-Schwanz“(His-tag) ein, über welchen das Protein an Nickel-NTA Agarose (Ni-NTA Agarose) gebunden werden kann.

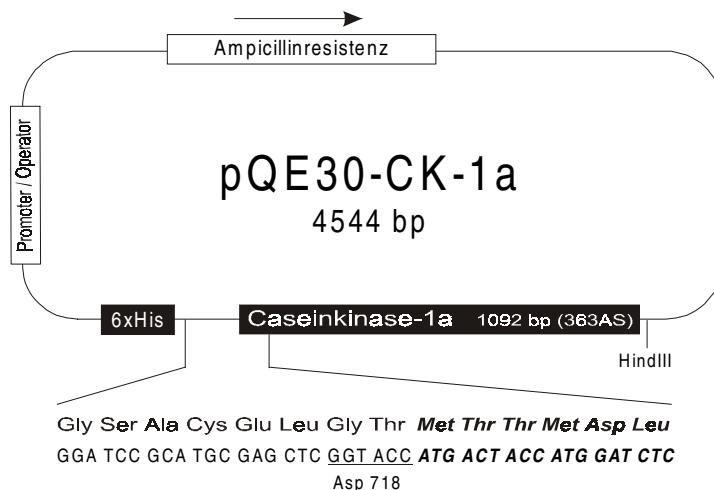


Abb. 19: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pQE30-CK-1a

Die CK-1a cDNA wurde aus dem Vektor pGEM4-CK-1a mit den Restriktionsenzymen *Asp718* und *HindIII* in den Expressionsvektor pQE30 subkloniert, der N-terminal einen Schwanz aus sechs Histidinen einführt.

Positive Klone wurden über PCR identifiziert. Zum Testen der Expression wurde die CK-1a Synthese bei OD 0,6 mit 1mM IPTG induziert und je ein Aliquot vor und nach Induktion abgenommen. Diese Aliquots (0,125 OD Einheiten) wurden über SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulosemembran analysiert. Schon der mit Ponceau S gefärbte Nitrozellulosefilter zeigte einen deutlichen Unterschied zwischen

nicht induzierten und induzierten Zellen (Abb. 20, links). Die Gelspur der induzierten Probe enthielt große Mengen eines Proteins mit einer apparenten Masse von 45 kDa. Dieses Protein wurde von einem monoklonalen Antikörper erkannt, der gegen den His-tag gerichtet war (Abb. 20, rechts). Dies weist darauf hin, daß es sich bei dem Protein um die CK-1a mit dem N-terminalen His-tag handelte.

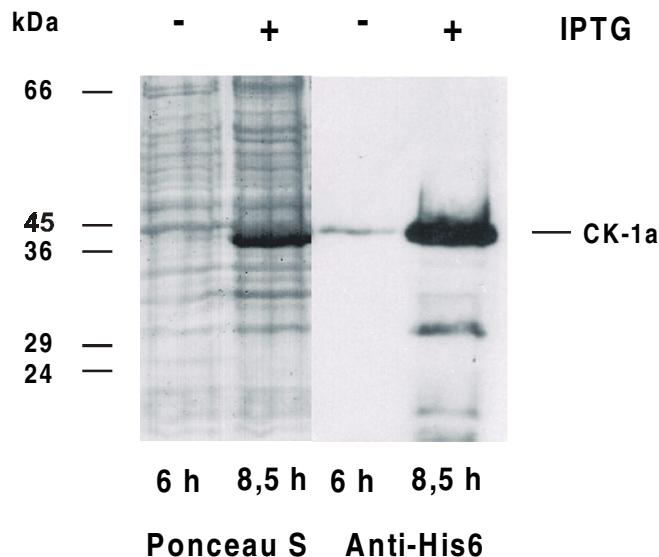


Abb. 20: Induktion von pQE30-CK-1a

E. coli XL1 blue Zellen, die mit pQE30-CK-1a transformiert worden waren, wurden in LB Medium bei 37 °C inkubiert. Zur Induktion der CK-1a Synthese wurde bei OD 0,6 1 mM IPTG zugegeben. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Pro Spur wurden 0,125 OD-Äquivalente aufgetragen. Die zwei linken Spuren zeigen die mit Ponceau S gefärbte Nitrozellulosemembran, die beiden rechten Spuren dieselbe Membran nach Immunodetektion mit monoklonalem Antikörper gegen den Hexahistidinschwanz.

2.1.4. Aufreinigung der exprimierten His₆-CK-1a über Nickel-NTA Agarose

Um zu bestimmen, welcher Anteil der überexprimierten CK-1a löslich war und über Ni-NTA Agarose gereinigt werden konnte, wurden die den Expressionsvektor pQE30-CK-1a enthaltenden *E. coli* Zellen in LB-Medium kultiviert und bei einer optischen Dichte von 0,6 mit IPTG induziert. Nach Isolierung der Zellen durch Zentrifugation wurden diese in 6% des ursprünglichen Volumens resuspendiert, mit Lysozym behandelt und durch Ultraschall aufgebrochen. Zelltrümmer und unlösliche Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde mit Ni-NTA

Agarose inkubiert, um die lösliche CK-1a zu isolieren. Anschließend wurden die an die Ni-NTA Agarose gebundenen Proteine mit Imidazol eluiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Abb. 21 zeigt das Ergebnis der Aufreinigung. Nach Aufschluß der Zellen und Zentrifugation befand sich etwa ein Drittel der exprimierten CK-1a im Überstand und konnte mit Ni-NTA Agarose inkubiert werden. Das lösliche Protein konnte effizient über Ni-NTA Agarose gereinigt werden.

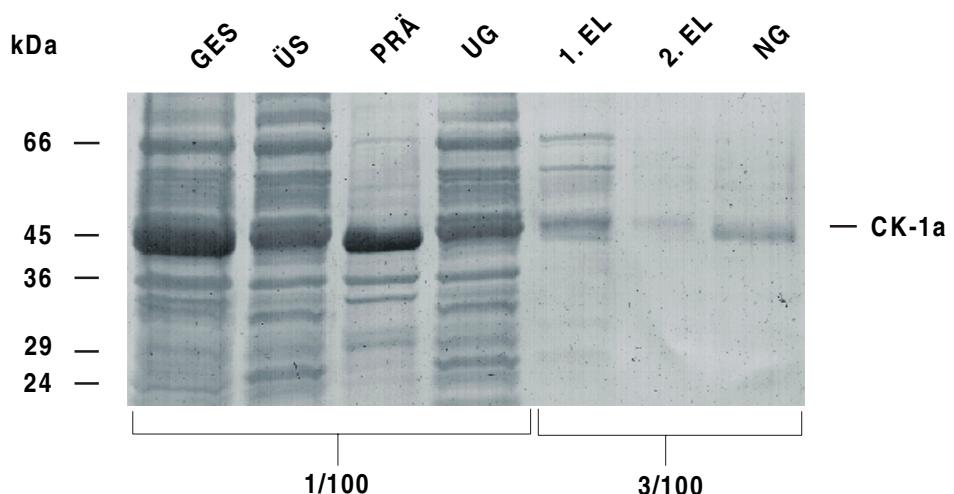


Abb. 21: Reinigung von His-CK-1a über Nickel-NTA-beads

E. coli XL1 blue Zellen, die mit pQE30-CK-1a transformiert worden waren, wurden in LB Medium bei 37 °C angezogen. Zur Induktion der CK-1a Synthese wurde bei OD 0,6 1mM IPTG zugegeben und 2 ½ Stunden induziert.

Die Zellen wurden mittels Lysozym (1 mg/ml) und Ultraschall aufgebrochen (GES). Anschließend wurde durch Zentrifugation Präzipitat (PRÄ) und Überstand (ÜS) aufgetrennt. Der Überstand wurde mit 1/15 des Gesamtvolumens Ni-NTA-Agarose 2h bei 4°C inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde vom Überstand abgetrennt, der die ungebundene CK-1a enthielt (UG). Nach Waschen der Ni-NTA-Agarose wurde die gebundene CK-1a zwei mal mit dem 2,5-fachen Ni-NTA-Agarose-Volumen an 200 mM Imidazol in zwei Fraktionen (1. EL und 2. EL) 30 Minuten bei 4°C eluiert. Die noch gebundene CK-1a (NG) wurde durch Kochen in Lämmli von der Ni-NTA-Agarose abgelöst.

Nach jedem Schritt wurden 1% (GES, ÜS, PRÄ, UG) bzw. 3% (1. EL, 2. EL, NG) des jeweiligen Volumens entnommen und über SDS-PAGE, Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Färben mit Ponceau S analysiert. CK-1a (39,6 kD) ist gekennzeichnet.

GES = Gesamtansatz nach Aufbruch der Zellen, ÜS = Überstand, PRÄ = Präzipitat, UG = ungebundene CK-1a nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose, 1. EL = 1. Elution von Ni-NTA-Agarose, 2. EL = 2. Elution von Ni-NTA-Agarose, NG = nach Elution noch gebundene CK-1a

2.2. Identifizierung verschiedener *in vitro* Substrate für CK-1a

2.2.1. Phosphorylierung von β -Casein durch CK-1a *in vitro*

Da β -Casein, eine elektrophoretisch auftrennbare Unterfraktion des Milchproteins Casein, ein bekanntes Substrat für Casein-Kinasen darstellt, sollte die Aktivität der gereinigten CK-1a *in vitro* an diesem Protein untersucht werden. Dazu wurde β -Casein für 60 min bei 37°C mit [γ^{32} P]ATP und CK-1a inkubiert. Zur Kontrolle der Spezifität wurde gereinigte Glutathion-S-Transferase (GST) verwendet. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE, Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Autoradiographie analysiert.

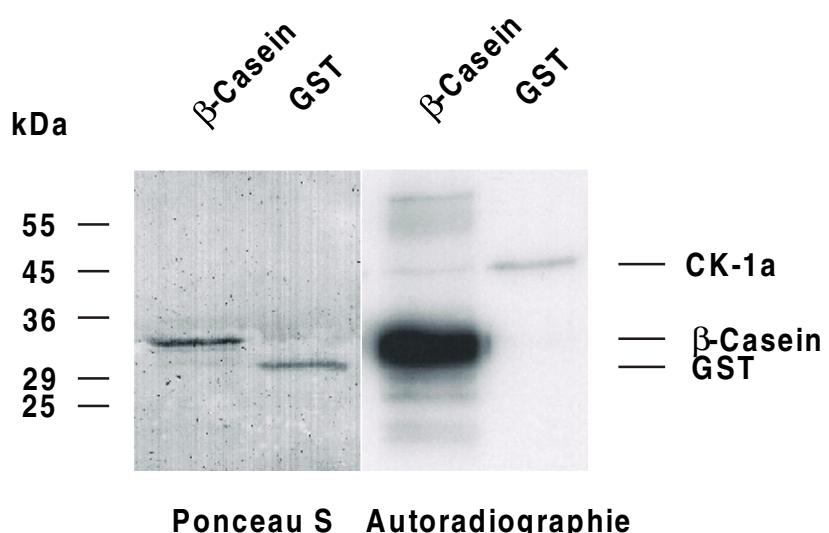


Abb. 22: Phosphorylierung von Beta-Casein

1,5 µg β -Casein wurde in einem 50 µl Volumen 1h bei 37°C mit CK-1a und [γ^{32} P]ATP (5 µCi) inkubiert. Als Kontrolle wurden GST in gleicher Weise behandelt. 30µl dieses Ansatzes wurden über SDS-PAGE, Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Autoradiographie analysiert. Die linke Hälfte der Abbildung zeigt die mit Ponceau S gefärbte Nitrozellulosemembran, die rechte das Autoradiogramm derselben Membran. β -Casein und GST sind gekennzeichnet.

Wie in Abb. 22 (Spur 3) zu erkennen ist, wird β -Casein *in vitro* durch die gereinigte CK-1a phosphoryliert, während GST kein Substrat für die CK-1a darstellt. Somit scheint der N-terminal angefügte 'His-tag' keinen erkennbaren Einfluß auf die Aktivität der CK-1a zu besitzen. Die Autoradiographie wies in beiden Spuren eine

Banden auf, die der apparenten Masse der CK-1a entspricht (Abb. 22, Spur 3 und 4). Dies könnte einer Autophosphorylierung der CK-1a entsprechen, wie sie für Caseinkinasen in der Literatur beschrieben ist. Die Autophosphorylierung der menschlichen Caseinkinase 1 ϵ führt zu einer Abnahme der Aktivität *in vitro* (Cegielska et al., 1998). Außerdem ist bekannt, daß diese Kinase *in vivo* im dephosphoryliertem, vermutlich aktivem Zustand gehalten wird (Rivers et al., 1998).

2.2.2. Autophosphorylierung von CK-1a *in vitro*

Um die Vermutung der Autophosphorylierung aus Abbildung 22 zu bestätigen, wurde die gereinigte CK-1a mit [γ -³²P]ATP inkubiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Es war eindeutig eine Autophosphorylierung der CK-1a nachweisbar (Abb. 23). Somit verhält sich die CK-1a aus *N. crassa* wie Casein-Kinasen aus anderen Organismen (Cegielska et al., 1998; Rivers et al., 1998; Gietzen et al., 1999).

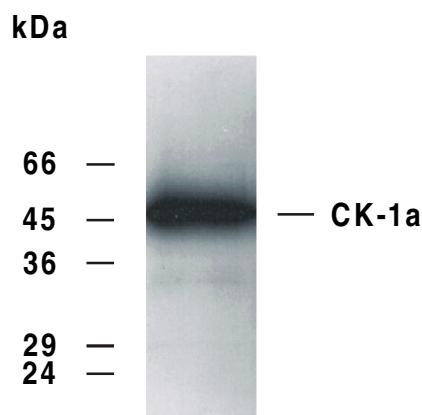


Abb. 23: Autophosphorylierung der Kinase

5 μ l der gereinigten CK-1a Fraktion wurden in einem Volumen von 20 μ l 1 h bei 30 °C mit [γ -³²P]ATP (5 μ Ci) inkubiert und über SDS-PAGE, Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Autoradiographie analysiert. CK-1a (39,6 kDa) ist gekennzeichnet.

2.2.3. Phosphorylierung von Frequency durch CK-1a *in vitro*

In *Drosophila melanogaster* wird das Uhrenprotein Period durch die Kinase Doubletime (DBT) phosphoryliert (Kloss et al., 1998). Mutationen, welche die Aktivität von DBT beeinträchtigen, führen in *Drosophila melanogaster* zu einer Verkürzung der circadianen Periode. Es wird vermutet, daß die Phosphorylierung von PER den Abbau und den Transport des PER/TIM Heterodimers in den Kern reguliert. Auch im Hamster *Mesocricetus auratus* wurde ein Gen gefunden, das für eine Caseinkinase 1ε kodiert und dessen Mutation (tau Mutante) die Periodenlänge des circadianen Tages der Hamster verkürzt (Lowrey et al., 2000).

In *N. crassa* ist bekannt, daß das zu Period funktionell analoge Uhrenprotein Frequency (FRQ) im Laufe des circadianen Tages zunehmend phosphoryliert wird, und daß diese Phosphorylierung mit einem zunehmenden Abbau von FRQ einhergeht (Garceau et al., 1997). Da CK-1a Sequenzähnlichkeiten zu Doubletime aufweist, sollte überprüft werden, ob Frequency ein Substrat von CK-1a darstellt. Dazu wurden verschiedene Sequenzen von Frequency an GST fusioniert. Die rekombinannten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und mittels Glutathion-Sepharose (GSH-Sepharose) aufgereinigt (Donzeau et al., unveröffentlicht). sFRQ9 ist eine C-terminal verkürzte Form des kleinen FRQ (sFRQ), das an Aminosäurerest 100 (ATG #3) beginnt und an Aminosäurerest 661 durch ein vorzeitiges Stopkodon endet (GST-sFRQ9).

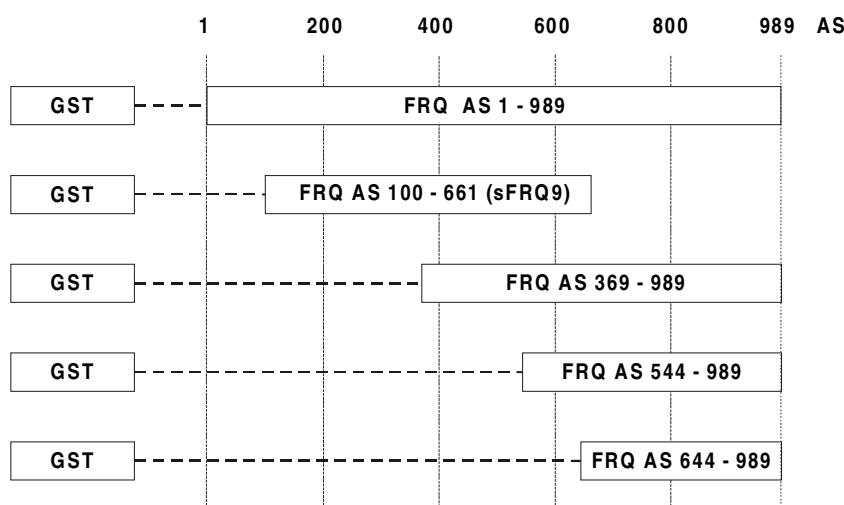


Abb. 24 : Schema der exprimierten und gereinigten Fusionsproteine von Frequency mit GST

Außerdem wurden drei N-terminal verkürzte Konstrukte von Frequency verwendet, die jeweils bei Aminosäurerest 369 (GST-FRQ-CT621), 544 (GST-FRQ-CT446) und 645 (GST-FRQ-CT346) beginnen und am authentischen Stopkodon von Frequency enden. Die drei Konstrukte enthalten somit 621, 446 und 345 C-terminale Aminosäuren von Frequency (Abb. 24)

Um zu testen, ob GST-sFRQ9 ein Substrat für die gereinigte CK-1a darstellt, wurde GST-sFRQ9 an GSH-Sepharose gebunden und mit [γ -³²P]ATP und CK-1a inkubiert. Anschließend wurde das Fusionsprotein reisoliert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. GST-FRQ9 wurde durch die gereinigte CK-1a phosphoryliert (Abb. 25).

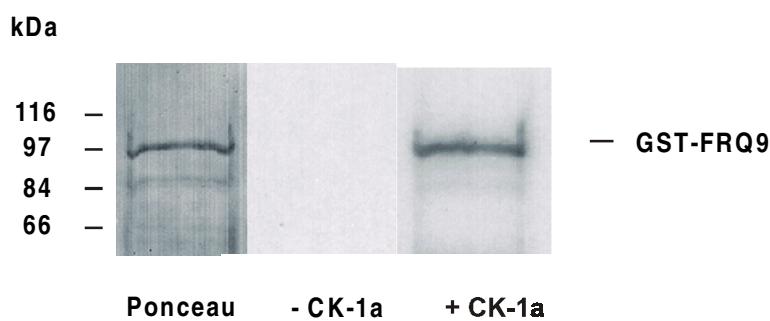


Abb. 25: Phosphorylierung von GST-FRQ9

100 μ l Ni-NTA-Agarose, an die GST-FRQ9 gebunden war, wurden in einem Volumen von 100 μ l 1 h bei 30 °C mit [γ -³²P]ATP (5 μ Ci) einmal mit und einmal ohne CK-1a geschüttelt. 30 μ l dieses Ansatzes wurden mittels SDS-PAGE, Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Autoradiographie analysiert. GST-FRQ9 ist gekennzeichnet.

Die verschiedenen Konstrukte mit N-terminal verkürzten FRQ (GST-FRQ-CT621, GST-FRQ-CT446 und GST-FRQ-CT346) wurden ebenfalls mit [γ -³²P]ATP und CK-1a inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Jedes dieser Proteine wurde durch die CK-1a phosphoryliert (Abb. 26). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß CK-1a über die Phosphorylierung von FRQ an der Regulation der biologischen Uhr von *N. crassa* beteiligt sein könnte.

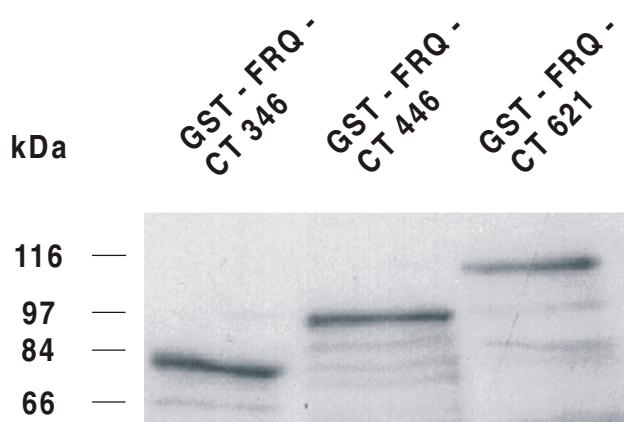


Abb. 26: Phosphorylierung der C-terminalen Frequency Konstrukte

In etwa gleiche Mengen an GST-FRQ-CT346, GST-FRQ-CT446 und GST-FRQ621 wurden in 50 μ l Ansätzen 1h bei 37°C mit CK-1a und [γ -³²P]ATP (5 μ Ci) inkubiert. Je 30 μ l wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch Autoradiographie analysiert. GST-FRQ-CT346, GST-FRQ-CT446 und GST-FRQ621 sind gekennzeichnet.

2.2.4. Phosphorylierung der PEST-Sequenzen von Frequency durch CK-1a *in vitro*

PEST-Sequenzen sind Bereiche innerhalb einer Polypeptidkette, die reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind (Rogers et al., 1986). In vielen Fällen stellen solche Bereiche Signale für den regulierten, proteolytischen Abbau von Proteinen dar (Rechsteiner und Rogers, 1996). Es wird vermutet, daß unter anderem die Phosphorylierung eines Serin- oder Threoninrestes innerhalb einer PEST-Sequenz das Protein zum Abbau markiert. Frequency enthält zwei PEST-Sequenzen, PEST1 (AS 544-559) und PEST2 (AS 844-892) (Merrow und Dunlap, 1994).

In Hefe scheint die Phosphorylierung von PEST-Sequenzen membranständiger Proteine durch CK1 an der Regulation der Endozytose beteiligt zu sein (Feng und Davis, 2000). So wird zum Beispiel das Enzym Uracil-Permease in Hefe von CK1 innerhalb einer PEST-Sequenz phosphoryliert (Marchal et al., 2000). Um zu überprüfen, ob CK-1a die PEST-Sequenzen von FRQ phosphoryliert, wurden

verschiedene PEST-Konstrukte in *E. coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert und gereinigt (GST-PEST1 (AS 544-559) (Görl et al., 2001), GST-PEST2 (AS 844-892) (Görl et al., 2001), GST-PEST2-CT (AS 844-989) (Donzeau et al., unveröffentlicht)) (Abb. 27).

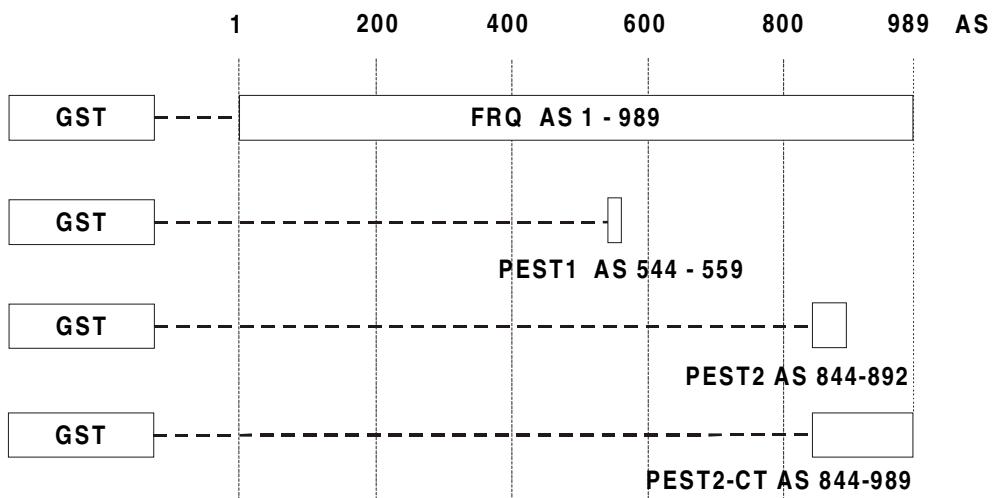


Abb. 27: Schema der Fusionsproteine von GST mit den PEST-Sequenzen von FRQ

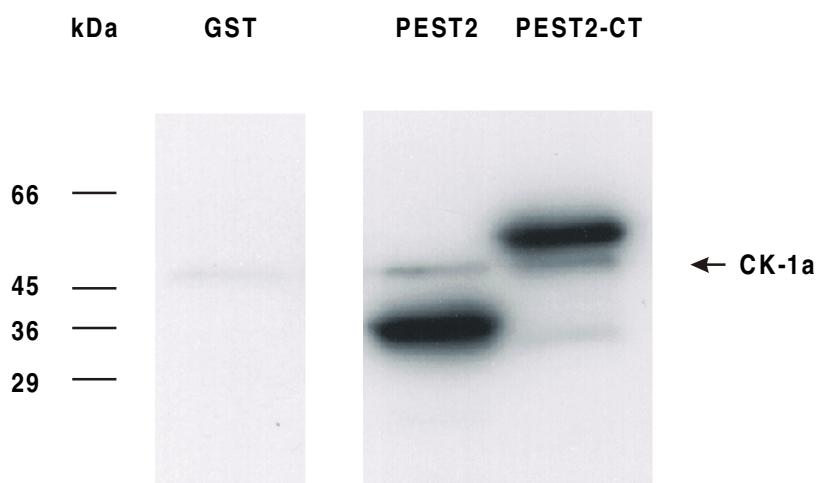


Abb. 28: Phosphorylierung der PEST2-Region von Frequency

In etwa gleiche Mengen an GST, GST-PEST2 und GST-PEST2-CT wurden in einem Volumen von 50µl 1 h bei 37 °C mit CK-1a und [γ -³²P]ATP (5 µCi) inkubiert. Je 30µl wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch Autoradiographie analysiert. GST, GST-PEST2 und GST-PEST2-CT sind gekennzeichnet.

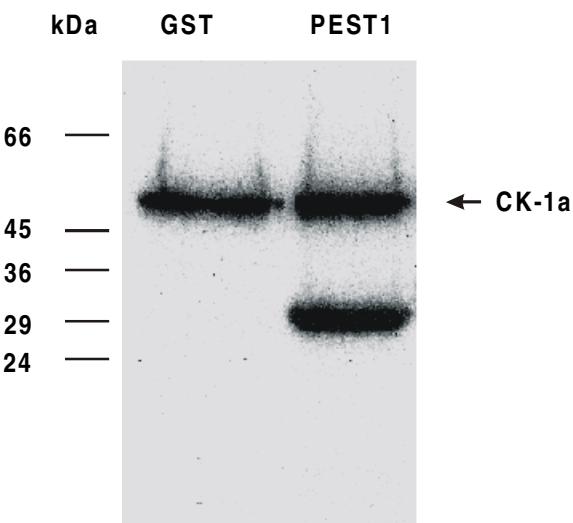


Abb. 29: Phosphorylierung der PEST1-Region von Frequency

In etwa gleiche Mengen an GST und GST-PEST1 wurden in einem Volumen von 50 μ l 1 h bei 37 °C mit CK-1a und [γ -³²P]ATP (5 μ Ci) inkubiert. Je 30 μ l wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und durch Autoradiographie analysiert (längere Exposition als in Abb. 28). GST und GST-PEST1 sind gekennzeichnet.

Die gereinigten PEST-Konstrukte wurden mit [γ -³²P]ATP und CK-1a inkubiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die PEST2-enthaltenden Konstrukte GST-PEST2 und GST-PEST2-CT wurden beide effizient von CK-1a phosphoryliert., während GST-PEST1 mit geringerer Effizienz als Substrat erkannt wurde (Abb. 29). Das als Kontrolle verwendete gereinigte GST wurde nicht phosphoryliert.

In dieser Arbeit konnte die zu Doubletime homologe Caseinkinase -1a in *N. crassa* identifiziert werden. CK-1a wurde kloniert und aufgereinigt. Die gereinigte CK-1a ist *in vitro* aktiv. Sie phosphoryliert β -Casein und sich selbst. Das zentrale Uhrenprotein Frequency aus *N. crassa* wird an mindestens zwei Stellen von CK-1a phosphoryliert, da sowohl GST-sFRQ9 als auch GST-PEST2, die keine überlappenden Aminosäurenbereiche besitzen, radioaktiv markiert werden. CK-1a könnte demnach über die Phosphorylierung der PEST-Regionen von Frequency dessen Abbau regulieren und somit den circadianen Rhythmus von *N. crassa* beeinflussen.

3. Diskussion

Die meisten höheren Lebewesen haben im Laufe der Evolution molekulare Systeme entwickelt, die sie in die Lage versetzen, Zeit zu messen. Biologische Uhren ermöglichen eine optimale Anpassung von Stoffwechsel und Verhalten an die periodisch wechselnden Umweltbedingungen.

Die molekularen Mechanismen, die diesen circadianen Systemen zugrunde liegen, sind bei den bisher untersuchten Spezies sehr ähnlich. Ein Oszillator, der auf einer Transkriptions-Translations-Rückkopplungsschleife eines sogenannten Uhrenproteins basiert und mit einer Periode von ungefähr 24 Stunden schwingt, steht im Zentrum der Uhr.

Die Menge an Uhrenprotein unterliegt einer charakteristischen circadianen Schwankung. Wenn sie einen kritischen Wert überschreitet, wird die Transkription des Uhrengens unterdrückt. Das Uhrenprotein wird dann abgebaut, bis die Menge an Uhrenprotein in der Zelle nicht mehr ausreicht, die Inhibition aufrechtzuerhalten. Dann beginnt der Zyklus aufs Neue.

Im Ascomyceten (Schlauchpilz) *N. crassa* ist Frequency das zentrale Uhrenprotein. Es ist ein Element der oben beschriebenen negativen Rückkopplungsschleife. Die Länge einer Periode beträgt in *N. crassa* ungefähr 22 Stunden und äußert sich unter konstanten Bedingungen unter anderem in der periodischen Bildung von Konidien zur asexuellen Fortpflanzung.

Das Modell der negativen Rückkopplungsschleife als Basis der circadianen Uhren ist stark vereinfacht, denn zahlreiche weitere Faktoren und Vorgänge in- und außerhalb der Zelle beeinflussen den Ablauf der Oszillation des Uhrenproteins. An der Regulation des frq-Gens sind in *N. crassa* die Transkriptionsfaktoren WC-1 und WC-2 beteiligt. Lichtreize und Temperaturänderungen beeinflussen den Ablauf der FRQ-Oszillation und synchronisieren die subjektive mit der astronomischen Zeit.

Damit überhaupt eine periodische Schwingung zustande kommen kann, darf die Rückkopplung nicht zu früh in Kraft treten. Diese Verzögerung scheint unter anderem durch die Phosphorylierung der Uhrenproteine durch Kinasen zustande zu kommen.

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist eine zur menschlichen Caseinkinase 1ε homologe Kinase namens Doubletime (DBT) identifiziert worden, die über die Phosphorylierung des Uhrenproteins Period (dPER), den Abbau des Heterodimers der Uhrenproteine Period und Timeless (dTIM) reguliert (Kloss et al., 1998; Price et al., 1998). Mutationen, die die Aktivität der Kinase verändern, wirken sich auf die Dauer der circadianen Periode aus. Dabei gibt es sowohl Mutationen, die die Periodendauer verlängern, als auch solche die sie verkürzen (Price et al., 1998). Im Goldhamster *Mesocricetus aureus* besitzt das tau-Genprodukt, das ebenfalls zur menschlichen Caseinkinase 1ε homolog ist, eine ähnliche Funktion wie DBT in *D. melanogaster*. Auch bei der Maus und beim Menschen gibt es Hinweise für eine Beteiligung der Caseinkinase 1ε an der Regulation der biologischen Uhr.

In *N. crassa* unterliegt Frequency nach seiner Synthese einer zunehmenden Phosphorylierung. Die *in vivo* dafür verantwortlichen Kinasen sind bisher noch nicht vollständig identifiziert. Eine Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase, CAMK-1, phosphoryliert FRQ *in vitro* im Bereich der Aminosäurereste 501-519, scheint aber *in vivo* keine wesentlichen Rolle bei der Regulation der circadianen Uhr zu spielen (Yang et al., 2001).

Es ist jedoch wahrscheinlich, daß auch in Neurospora der Abbau des Uhrenproteins über Phosphorylierungen reguliert wird, da die Zugabe eines Kinaseinhibitors oder die Mutation einer Phosphorylierungsstelle von FRQ (Ser-513) den Abbau von FRQ *in vivo* vermindern und die Periode der Uhr verlängern (Liu et al., 2000).

Die große Ähnlichkeit der circadianen Systeme in allen Organismen und das ubiquitäre Vorkommen von konservierten Caseinkinasen bei höheren Eukaryonten lassen es möglich erscheinen, daß auch in *N. crassa* eine Kinase dieser Familie an der Phosphorylierung des Uhrenproteins beteiligt ist.

3.1. CK-1a ist homolog zu DBT und zur humanen CK-1e

Die Suche nach einer zu Doubletime Homologen Kinase in *N. crassa* ergab zwei in Frage kommende Gene, die mit CK-1a und CK-1b bezeichnet wurden. Die Sequenzen beider Kinasen zeigen einen hohen Verwandtschaftsgrad mit der humanen Caseinkinase 1ε und Doubletime. Im Sequenzvergleich weist CK-1a eine höhere Homologie zu beiden Kinasen auf als CK-1b, so daß für CK-1a eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, eine zu DBT ähnliche Funktion zu erfüllen.

Das Genom von *N. crassa* ist zwar vollständig sequenziert, jedoch sind die offenen Leserahmen noch nicht für alle Abschnitte des Genoms vorhergesagt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß in *N. crassa* möglicherweise noch andere Gene, deren Sequenzen Homologie zu Caseinkinase 1ε aufweisen, existieren. Ein Vergleich mit Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), in der vier Caseinkinasen 1 existieren, läßt die Zahl weiterer für Caseinkinasen 1 kodierende Gene in *N. crassa* auf ein bis zwei weitere begrenzt erscheinen.

3.2. CK-1a ist *in vitro* aktiv und phosphoryliert β-Casein und sich selbst

CK-1a wurde als Fusionsprotein mit einem Hexahistidinschwanz kloniert, exprimiert und gereinigt. Durch Inkubation von β-Casein mit gereinigter CK-1a und [γ -³²P]ATP konnte gezeigt werden, daß β-Casein *in vitro* ein Substrat für CK-1a darstellt. Andere Proteine, mit denen in derselben Weise verfahren wurde, wiesen keine detektierbare Phosphorylierung auf. Dies beweist, daß das CK-1a-Gen tatsächlich für eine Caseinkinase kodiert, die auch *in vitro* aktiv ist. Die hohe Effizienz, mit der β-Casein phosphoryliert wird, weist zusätzlich zur Sequenzhomologie darauf hin, daß CK-1a tatsächlich zur Gruppe der Caseinkinasen zu rechnen ist. Die relativ spezifische Phosphorylierung des Milchproteins Casein hat dieser Kinasenfamilie den Namen gegeben.

Außerdem war *in vitro* eine Autophosphorylierung von CK-1a nachzuweisen, wie sie auch von Caseinkinasen anderer Organismen bekannt ist (Cegielska et al., 1998; Rivers et al., 1998; Gietzen et al., 1999).

3.3. Frequency ist *in vitro* ein Substrat für CK-1a

Um zu untersuchen, ob CK-1a möglicherweise über die Phosphorylierung von FRQ an der Regulation der circadianen Oszillation beteiligt sein könnte, wurden verschiedene Fragmente von FRQ als Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert, gereinigt und *in vitro* mit gereinigter CK-1a und [γ -³²P]ATP inkubiert. Es konnte gezeigt werden, daß FRQ an mindestens zwei Stellen innerhalb der 889 C-terminalen Aminosäurereste von CK-1a phosphoryliert wird.

FRQ besitzt zwei sogenannte PEST Sequenzen (Bereiche innerhalb einer Polypeptidkette, die reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind), die als Akzeptorstellen für die Phosphorylierung durch CK-1a besonders interessant erscheinen. So wird beispielsweise in Hefe das Protein Uracil-Permease durch eine Caseinkinase 1 innerhalb einer PEST-Sequenz phosphoryliert (Marchal et al., 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß FRQ durch CK-1a *in vitro* innerhalb der PEST-Sequenzen phosphoryliert wird.

3.4. Weiterführende Experimente

Die oben diskutierten Ergebnisse legen nahe, daß Frequency auch *in vivo* ein Substrat für CK-1a darstellen könnte. Darüber hinaus ist, wie oben beschrieben, in anderen Organismen eine Beteiligung von Caseinkinasen an der Phosphorylierung der Uhrenproteine bekannt.

CK-1a trägt keine Signalsequenzen für die subzelluläre Zielsteuerung (Endoplasmatisches Reticulum, Mitochondrien). Inzwischen ist bekannt, daß CK-1a sowohl im Zytosol als auch im Zellkern vorkommt, und daß CK-1a *in vivo* einen Komplex mit Frequency bildet (Görl et al., 2001).

Allein durch *in vitro* Experimente wird man die physiologische Rolle von CK-1a auf die circadiane Uhr in *N. crassa* nicht bestimmen können.

Eine knock-out-Mutante von CK-1a ist nicht möglich, da *N. crassa* ohne CK-1a, ebenso wie *D. melanogaster* ohne DBT (Price et al., 1998) nicht lebensfähig ist (Görl et al., 2001).

Inzwischen konnte gezeigt werden, daß eine Deletion der PEST-1 Sequenz zu einer Hypophosphorylierung von Frequency *in vivo* führt und dessen Stabilität erhöht (Görl et al., 2001). In Mutanten mit der PEST-1 Deletion läuft die negative Rückkopplungsschleife langsamer - mit einer Periode von ungefähr 28 Stunden - ab als im Wildtyp (Görl et al., 2001). Vermutlich ist dies durch den langsameren Abbau von Frequency bedingt. Interessanterweise zeigen diese Mutanten trotz der aufrechterhaltenen Oszillation von Frequency in konstanter Dunkelheit keine periodische Konidienbildung mehr (Görl et al., 2001), was die Vermutung nahe legt, daß die Konidienbildung vom circadianen Oszillatator entkoppelt ist.

Es konnte auch gezeigt werden, daß CK-1b die PEST-2 Sequenz, nicht aber die PEST-1 Sequenz *in vitro* phosphoryliert (Görl et al., 2001). Die Untersuchung des Einflusses einer Deletion der PEST-2 Sequenz auf die biologische Uhr in *N. crassa* steht noch aus. Auch Mutanten, die eine in ihrer Aktivität veränderte Kinase besitzen, könnten über die Veränderung der circadianen Periode Aufschluß über die Rolle von CK-1a und CK-1b an der Regulation des circadianen Rhythmus *in vivo* geben.

4. Zusammenfassung

Das Uhrenprotein Frequency (FRQ) wird in *Neurospora crassa* nach seiner Synthese phosphoryliert. Die dafür verantwortliche(n) Kinase(n) ist (sind) nicht identifiziert. In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und im Goldhamster *Mesocricetus auratus* werden Uhrenproteine durch Enzyme aus der Familie der Caseinkinasen 1 phosphoryliert (Doubletime, tau-Genprodukt).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die zur humanen Caseinkinase 1 ϵ und zu Doubletime (DBT) aus *D. melanogaster* homologe CK-1a aus *N. crassa* kloniert und charakterisiert werden. Es wurde auch eine zweite zur humanen Caseinkinase 1 ϵ homologe Kinase - CK-1b - in *N. crassa* identifiziert. Das für CK-1a kodierende Gen ist näher mit DBT verwandt. Daher wurde CK-1a in *E. coli* als Hexahistidinfusionsprotein kloniert, exprimiert und gereinigt.

Die gereinigte CK-1a ist *in vitro* aktiv. Sie phosphoryliert β -Casein und unterliegt einer Autophosphorylierung. FRQ wird *in vitro* an mindestens zwei Stellen von CK-1a phosphoryliert. Diese Phosphorylierungsstellen liegen wahrscheinlich innerhalb der PEST-Sequenzen von FRQ.

5. Material und Methoden

5.1. Molekularbiologische Methoden

5.1.1. Verwendete Plasmide

Für die *in vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen wurden Derivate des Plasmids pGEM4 (Promega) verwendet, in die die jeweilige komplementäre DNA (cDNA) unter Kontrolle des SP6-Promotors kloniert war. Die ligierten Plasmide wurden entweder in den *E. coli* Stamm DH5 α (supE44, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*; Hanahan, 1983) oder XL1-blue (supE44, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* lac [F'::Tn10 proA⁺B⁺ lacIq Δ (lacZ)M15]; Stratagene) transformiert (s. Kap. 5.1.9.).

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten bzw. hergestellten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Klonierungstechniken sind unter Kapitel 5.1.11. beschrieben.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Referenz
pGEM4-CK-1a	Diese Arbeit
pQE30-CK-1a	Diese Arbeit
pETGEX-CT-FRQ9	Donzeau et al., unveröffentlicht
pGEX-4T-1-FRQ-CT346	Donzeau et al., unveröffentlicht
pGEX-4T-1-FRQ-CT446	Donzeau et al., unveröffentlicht
pGEX-4T-1-FRQ-CT621	Donzeau et al., unveröffentlicht
pGEX-4T-1-FRQ-Pest1	Görl et al., 2001
pGEX-4T-1-FRQ-Pest2	Görl et al., 2001
pGEX-4T-1-FRQ-Pest2CT	Donzeau et al., unveröffentlicht

5.1.2. Amplifikation von DNA mittels PCR

Die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988) ermöglicht es, DNA-Fragmente spezifisch exponentiell zu amplifizieren. Als sogenannte "Primer" werden zwei kurze Oligonukleotide verwendet, die zu den entsprechenden Sequenzen einer DNA-Matrize komplementär sind. Durch eine

thermostabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* oder *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* mit "Proofreading"-Aktivität) werden die freien 3'-Enden der Primer zu zwei neuen, komplementären DNA-Strängen verlängert. Jeder Reaktionszyklus führt so zu einer Verdopplung des vorhandenen DNA-Fragments.

Das Reaktionsgemisch (100 µl) enthielt 2,5 U *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega), 50 µM dNTPs sowie 50 pmol Primer 1 und Primer 2 (Länge ca. 20-30 Nukleotide; ARK Scientific) in dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA). Als Matrize wurde entweder 100 ng Plasmid-DNA oder zu testende *E. coli*-Klone verwendet. Eine typische PCR bestand aus folgenden Reaktionsschritten:

- **3 min bei 94°C** Inaktivierung von Nukleasen und vollständige Denaturierung
- **30-35 Zyklen:**
 - **45 sec bei 94°C** Denaturierung der DNA
 - **45 sec bei (T_m - 5)°C** Annealing
 - **1-4 min bei 72°C** Polymerasereaktion
- **5 min bei 72°C**
- **Abkühlen auf 4°C**

Die Annealingtemperatur T_m wurde nach der Regel (G/C x4 + A/T x2) für jeden Primer bestimmt. Zur Kontrolle der Reaktion wurde 5 µl des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert (s. Kap. 5.1.6.). Das PCR-Produkt wurde anschließend durch präparative Agarosegelektrophorese (s. Kap. 5.1.7.) oder mittels des "QIAquick PCR Purification Kits" der Firma Quiagen von den Primern und den Nebenprodukten gereinigt. Dazu wurden 5 Volumen des Puffers PB zum dem PCR-Ansatz gegeben und auf die mitgelieferten Silicagel-Säulen gegeben. Nach Zentrifugation (1 min, 13.000 Upm, RT, Tischzentrifuge) wurde das Eluat verworfen und die gebundene DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 30 µl H₂O eluiert. Zur Kontrolle wurden 2 µl der DNA-Lösung auf einem Agarosegel analysiert (s. Kap. 5.1.6.).

5.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA

5.1.3.1. Minipräparation von DNA

Für die Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde der "QIAprep Miniprep Kit" der Firma Quiagen verwendet. Dazu wurde der entsprechende Klon in 2 ml LB_{Amp}-Medium (Luria Bertani-Medium, 10 g/l Bacto-Trypton, 5 mg/ml Bacto-Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,4; supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht aerob bei 37°C geschüttelt (160 Upm). 1,5 ml der Über-Nacht-Kultur wurden für 1 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 250 µl Resuspensionspuffer P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert, mit 250 µl Lysepuffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und maximal 5 min bei RT inkubiert. Das Zell-Lysat wurde mit 350 µl Neutralisationspuffer N3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei RT (13.000 Upm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand auf die mitgelieferten Silicagel-Säulen gegeben und für 1 min bei RT zentrifugiert (13.000 Upm, Tischzentrifuge). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene Plasmid-DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl H₂O eluiert. Zur Kontrolle wurden 2 µl der DNA-Lösung auf einem Agarosegel analysiert (s. Kap. 5.1.6.).

5.1.3.2. Midipräparation von DNA

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (bis ca. 0,2 mg) wurde der "Jetstar-Kit" der Firma Genomed (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) verwendet. Eine Anionentauscher-Säule wurde mit 10 ml Lösung E4 (0,6 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0, 0,15% Triton X-100) äquilibriert. Währenddessen wurden die Bakterien aus 50 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB_{amp}-Medium durch Zentrifugation (5 min, 4400xg, RT, Beckman JA10-Rotor) sedimentiert. Die Zellen wurden in 4 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 (200 mM NaOH, 1% SDS) durch Inkubation für maximal 5 min bei RT lysiert. Das Zell-Lysat wurde durch Zugabe von 4 ml Lösung E3 (3,2 M Kaliumacetat, pH 5,5) neutralisiert. Nach

Zentrifugation (10 min, 15.000xg, RT, Beckman JA20-Rotor) wurde der Überstand auf die äquilierte Säule gegeben. Die Säule wurde dann zweimal mit 10 ml Lösung E5 (0,8 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5,0) gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 5 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert, durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 15.000xg, 4°C, Beckman JA20-Rotor) sedimentiert. Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C für 10 min getrocknet und in 200 µl H₂O resuspendiert. 1 µl des isolierten Plasmids wurde auf einem Agarosegel analysiert (s. Kap. 5.1.6.). Die erhaltene Menge an Plasmid-DNA betrug 80-160 µg.

5.1.4. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine Einheit optischer Dichte (OD) 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNA (linearer Bereich OD 0,1-1; Sambrook et al., 1989).

5.1.5. Phenolextraktion und Ethanolfällung

Durch Phenolextraktion werden Proteinverunreinigungen, die sich an der Grenzschicht zwischen wässriger und phenolischer Phase ansammeln, aus DNA-haltigen Lösungen entfernt (Sambrook et al., 1989). Das Phenol wurde mit 1/20 Volumen Tris/HCl pH 8,0 äquilibriert. Die DNA-Lösung wurde mit demselben Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (1 min, 14.000 Upm, RT, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und erneut abzentrifugiert. Die DNA wurde anschließend durch Ethanolfällung konzentriert und von unerwünschten Salzen befreit. Dazu wurde die DNA-Lösung durch Zugabe von 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung pH 6,0 und dem 2,5 fachen Volumen Ethanol gefällt (30 min, -70 °C), durch Zentrifugation (20 min, 15.000xg, 4 °C) isoliert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in H₂O resuspendiert.

5.1.6. Gelelektrophorese von DNA

Zur Trennung, Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Dabei werden die DNA-Fragmente in horizontalen Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Detektion der DNA-Banden wurde der DNA-Interkalator Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) verwendet, der unter UV-Licht (366 bzw. 254 nm) fluoresziert. Als Längenstandard wurde eine DNA-Präparation mit bekanntem Restriktionsmuster verwendet. Die DNA wurde vor dem Auftragen mit ¼ Volumen 5x Auftragspuffer (30% (v/v) Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente und betrug 1-2% in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, pH 7,5, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA). Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer Spannung bis zu 13 V/cm, je nach Größe des Gels bei 60-120 V.

5.1.7. Präparative Gelelektrophorese

Zur präparativen Isolierung von DNA aus einem Agarosegel, wurde unter UV-Licht (366 nm) ein Gelfragment herausgeschnitten, das die entsprechende DNA enthielt. Die Reinigung der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kits" der Firma Quiagen. Dazu wurde das Gelfragment gewogen und mit dem 3 fachen Volumen des Puffers QG versetzt und für 10 min bei 50°C inkubiert, bis das Gel geschmolzen war. Die Lösung wurde auf die mitgelieferten Silicagel-Säulen gegeben und zentrifugiert (1 min, 13.000 Upm, RT, Tischzentrifuge). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene Plasmid-DNA erst mit 500 µl Puffer QG, dann mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 30 µl H₂O eluiert.

5.1.8. Enzymatische Modifikation von DNA

5.1.8.1. Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen in doppelsträngigen DNA-Molekülen spezifische Basensequenzen und spalten die DNA entsprechend ihrer Erkennungssequenz (Sambrook et al., 1989). Die DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firmen Gibco/BRL und Boehringer Mannheim gemäß den Angaben der Hersteller in den entsprechenden, mitgelieferten Puffern verdaut. Die jeweilige Enzymkonzentration entsprach ca. 2-3 U pro µg DNA. Der Restriktionsansatz wurde für 2-24 h bei der für das entsprechende Enzym angegebenen Temperatur inkubiert. Zur Beendigung des Restriktionsverdaus wurde der Reaktionsansatz für 10 min je nach Enzym bei 65° oder 72°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel (s. Kap. 5.1.7.) gereinigt.

5.1.8.2. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung von DNA-Enden wurde die Bakteriophagen T4 DNA-Ligase (Gibco/BRL) verwendet. Maximal 1 µg DNA wurde im mitgelieferten 5x Ligationspuffer (250 mM Tris/HCl, pH 7,6, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 50 mM MgCl₂, 25% (w/v) PEG-8000) mit 1 U Enzym in einem Volumen von 20 µl über Nacht bei 16°C inkubiert. Sollte in einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor ein DNA-Fragment inseriert werden, so lag dieses in einem 2-4 fachen molaren Überschuß vor. 1 µl des Ligationsansatzes wurde anschließend in den gewünschten Bakterienstamm transformiert (s. Kap. 5.1.9.).

5.1.9. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Zur Transformation von *E. coli* wurde die Methode der Elektroporation angewendet. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach einem modifiziertem Protokoll nach Dower et al. (1988) hergestellt. Eine *E. coli* Über-Nacht-Kultur wurde 1:100 in 500 ml LB_{amp}-Medium verdünnt und auf eine OD₅₇₈ von 0,5-0,8 angezogen. Anschließend wurden

die Zellen 30 min auf Eis gekühlt, in einen sterilen JA10-Zentrifugationsbecher überführt und sedimentiert (15 min, 4400xg, 4°C, Beckman JA10-Rotor). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit kaltem 10% Glycerin (500 ml, 250 ml, 50ml) wurden die Zellen in 500 µl 10% Glycerin aufgenommen und in 40 µl Portionen bei -80°C eingefroren.

Die Transformation wurde mit einem Elektroporationsgerät der Firma Bio-Rad durchgeführt. Dazu wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 µl eines Ligationsansatzes oder 1 µg Plasmid-DNA versetzt und in auf Eis vorgekühlte Elektroporations-Küvetten (0,2 cm Elektrodenabstand) überführt. Anschließend wurde die Elektroporation bei Standardeinstellung (2,5 kV, 400 W, 25 µF, Zeitkonstante 8-9 ms) vorgenommen. Nach dem elektrischen Puls wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium (0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,2% (w/v) Trypton, 20 mM Glucose, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 10 mM NaCl) verdünnt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 30-60 min bei 37°C geschüttelt und kurz zentrifugiert (1 min, RT, Tischzentrifuge). 80% des Überstandes wurden verworfen und die Zellen im verbleibenden SOC-Medium resuspendiert. Die Zell-Suspension wurde auf einer LB_{amp}-Platte (LB_{amp} mit 15 g/l Bacto-Agar, s. Kap. 5.1.3.) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden ca. 20 Transformanten der Platte ausgewählt, um positive Klone über Restriktionsverdau (s. Kap. 5.1.8.1.) oder direkt mittels PCR (s. Kap. 5.1.2.) zu identifizieren.

5.1.10. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden wurde von der Firma TopLab (Martinsried) auf einem Perkin Elmer Cylce Sequencer (ABI377) durchgeführt. Dafür wurde ein pGEM4-Plasmid verwendet, das die zu sequenzierende DNA enthielt. Als Sequenzierungsprimer wurden Sp6- (CGA TTT AGG TGA CAC TAT AG) und T7-Primer (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) benutzt, die zu den entsprechenden Promotoren komplementär sind.

5.1.11. Klonierungsstrategien

Um eine bessere Ausbeute bei der *in vitro*-Translation zu erhalten, wurde, falls nötig, vor das Start-AUG-Codon ein Basentriplett eingeführt (ACC oder GCC), um eine der Kozak-Sequenz **CCRCCAUGG** entsprechende optimale Umgebung für das Initiations-Codon zu schaffen (Kozak, 1987).

Die jeweiligen Restriktionsschnittstellen sind in den Primern unterstrichen, die komplementären Bereiche der Primer zum Template sind "fett" markiert.

5.1.11.1. pGEM4-CK-1a

Die kodierende Sequenz von CK-1a wurde mittels PCR (s. Kap. 5.1.2.) mit den Primern „CK-1a-Hin3“ (5'-Primer CCC CGT CGA CAA GGT ACC **ATG ACT ACC ATG GAT CTC**) und "CK-1a-Rück3" (3'-Primer CCC CAA GCT TGC GGC CGC TTA TCG CAA AAT CCT GTC) aus dem Klon NM6F2-T3 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Sall* und *HindIII* verdaut und in einen mit denselben Enzymen geschnittenen pGEM4-Vektor subkloniert (pGEM4-CK-1a).

5.1.11.2. pQE30-CK-1a

Die kodierende Sequenz von CK-1a wurde aus dem Vektor pGEM4-CK-1a mit den Restriktionsenzymen *Asp718* und *HindIII* herausgeschnitten und in einen mit denselben Enzymen geschnittene pQE-30 Vektor subkloniert (pQE30-CK-1a).

5.2. Proteinchemische Methoden

5.2.1. TCA-Fällung von Proteinen

Um Proteine aus wässrigen Lösungen zu fällen, wurde 12% (w/v) TCA zugesetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die denaturierten Proteine durch Zentrifugation sedimentiert (20 min, 15.000 Upm, 2°C, Sigma 12154-Rotor), das

Pellet mit -20°C kaltem Aceton gewaschen, 5 min bei 56°C getrocknet und in 1x Laemmli-Puffer (s. Kap. 5.2.4.) aufgenommen.

5.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt, der die Bindung des Farbstoffes Coomassie Blau G-250 an Proteine zugrunde liegt. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. Alle Proben wurden mit je 1 ml eines 1:5 verdünnten Farbstoffkonzentrats (Bio-Rad-Proteinassay-Kit) versetzt und 5-10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe einer Eichkurve mit einem Proteinstandard (Immunglobulin G (IgG) aus Rind, Bio-Rad) vorgenommen.

5.2.3. Synthese von Proteinen *in vitro*

5.2.3.1. *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde nach der Methode von Melton et al. (1984) mit Modifikationen in Anlehnung an Stueber et al. (1984) und Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Für die *in vitro*-Transkription wurden pGEM4-Plasmide (Promega) verwendet, die die kodierende Sequenz für das entsprechende Protein unter der Kontrolle des SP6-Promotors enthielten (s. Kap. 5.1.1.). Ein typischer *in vitro*-Transkriptionsansatz bestand aus 120 µl Prämix (40 mM HEPES/KOH pH 7,4, 6 mM Magnesiumacetat, 2 mM Spermidin, 100 µg/ml BSA, 10 mM DTT, 100 µM GTP, je 500 µM ATP, CTP, UTP), 250 µM m⁷G(5')ppp(5')G, 200 U RNasin, 50 U SP6-RNA-Polymerase, 10-20 µg Plasmid und H₂O zu einem Endvolumen von 200 µl. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die synthetisierte RNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 10 M LiCl und 3 Volumen Ethanol für 30 min bei -70°C gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 36700xg, 4°C, Sigma 12154-Rotor) sedimentiert,

mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min bei 37°C getrocknet, in 100 µl Wasser mit 0.5 U/µl RNasin gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

5.2.3.2. *In vitro*-Translation

Die *in vitro*-Translation wurde nach der Methode von Pelham und Jackson (1976) durchgeführt.

Die Translation der *in vitro* synthetisierten RNA wurde in Kaninchens-Retikulozytenlysat (Promega) in Gegenwart von [³⁵S]Methionin (ICN) durchgeführt. Ein Standardtranslationsansatz enthielt 100 µl Lysat, 25 µl RNA, 3 µl Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 40 U RNasin, 12 µl [³⁵S]Methionin (10 µCi/µl). Die Translation erfolgte für 75 min bei 30°C. Der Einbau des radioaktiven Methionins wurde anschließend durch Zugabe von 5 mM Methionin gestoppt. Der Ansatz wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden in Abhängigkeit von ihrer Größe durch diskontinuierliche vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Es wurden Elektrophorese-Systeme unterschiedlicher Größe verwendet. Große Gele setzten sich aus Bodengel (0,5 x 15 x 0,8 cm), Trenngel (8 x 15 x 0,8 cm) und Sammelgel (2 x 15 x 0,8 cm) zusammen. Minigele (Mini-PROTEAN II, Bio-Rad) hatten die Abmessungen 1 x 7,2 x 0,75 cm für das Sammelgel und 7 x 7,2 x 0,75 cm für das Trenngel. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid verwendet, um Gele mit unterschiedlichen Trenneigenschaften zu erhalten.

	Bodengel	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid	7,5-16% (w/v)	7,5-16% (w/v)	5% (w/v)
Bisacrylamid	0,02%-1% (w/v)	0,02%-1% (w/v)	0,033% (w/v)
Tris/HCl	pH 8,8 / 375 mM	pH 8,8 / 375 mM	pH 6,8 / 60 mM
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
APS	0,1% (w/v)	0,05% (w/v)	0,05% (w/v)
TEMED	0,1% (v/v)	0,05% (v/v)	0,1% (v/v)

Tabelle 4: Zusammensetzung von Boden-, Trenn- und Sammelgel

Die Proben wurden in 1x Laemmli-Puffer (60 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerin, 0,02% (w/v) Bromphenolblau) gelöst und 3 min auf 95°C erhitzt. Die Vertikalelektrophorese erfolgte in Elektrophoresepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,3, 384 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei 27 mA pro Gel, bzw, für Minigels 25 mA. Als Größenstandard wurden verschiedene Proteinmarker (MMW, LMW, HMW, Boehringer) verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie Blau gefärbt (s. Kap. 5.2.5.) oder auf Nitrocellulose transferiert (s. Kap. 5.2.6.).

5.2.5. Coomassie-Färbung von Gelen

Zur Anfärbung von Proteinen wurden die Gele für 30 min in Färbelösung (0,1% (w/v) Coomassie Blau R-250, 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol) geschüttelt und anschließend der Hintergrund 0,5-2 h mit Entfärbelösung (10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol) entfärbt. Die Gele wurden für 2-3 h unter Vakuum bei 80°C getrocknet.

5.2.6. Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Nach der Auf trennung der Proteine mittels SDS-PAGE (s. Kap. 5.2.4.) wurden diese nach der Methode von Towbin et al. (1979) und Kyhse-Anderson (1984)

elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel zusammen mit einer Nitrocellulose-Membran (0,2 µm Porengröße) zwischen mehreren mit Blotpuffer (20 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,08% SDS) getränkten Whatman-3MM Filterpapieren gelegt und diese zwischen zwei Graphitelektroden angeordnet ("Semi-dry"-Methode). Die Proteine wurden für 75 min mittels eines elektrischen Feldes bei 1 mA/cm² (200 mA) auf die Nitrocellulose übertragen. Die transferierten Proteine wurden mit Ponceau S (0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA) auf der Membran angefärbt und diese unter Rotlicht getrocknet.

5.2.7. Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Dazu wurde ein Röntgenfilm (Fuji New RX, Kodak BioMax MR) auf ein getrocknetes Gel oder auf eine Nitrocellulose-Membran aufgelegt und für die entsprechende Zeit exponiert. Die Röntgenfilme wurden entwickelt (Gevamatic 60, Agfa-Gevaert).

5.2.8. *In vitro* Phosphorylierung mit [γ -³²P]ATP

Um die *in vitro* Phosphorylierung von Proteinen durch CK1 zu untersuchen, wurden die als Substrat in Frage kommenden Proteine mit [γ -³²P]ATP (10 mCi/ml) und 1 µg gereinigter His₆-CK1 1 h bei 37°C inkubiert.

Ein typischer 50 µl Phosphorylierungsansatz bestand aus Kinasepuffer (75 mM Tris/HCl; pH 7,5; 6 mM Magnesiumacetat; 1 mM EDTA; 0,4 mM EGTA; 1 mM β-Mercaptoethanol; Zhai et al., 1995), 1 µg gereinigter His₆-CK1, 0,5 µl [γ -³²P]ATP (5 µCi) und 1-5 mg des zu untersuchenden Proteins. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Laemmli-Puffer (s. Kap. 5.2.4.) und Erhitzen auf 95°C für 3 min gestoppt. Anschließend wurden die Proteine über SDS-Page (s. Kap. 5.2.4.), Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (s. Kap. 5.2.6.) und Autoradiographie (s. Kap. 5.2.7.) analysiert.

5.2.9. Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

5.2.9.1. Induktion der Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression der hier verwendeten rekombinanten Proteine stand unter der Kontrolle des lac-Promotors aus *E. coli*. Die entsprechenden pQE-Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm XL1-blue transformiert. Über Nacht wurde jeweils ein positiver Klon in LB_{amp}-Medium bei 37°C als Vorkultur angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 500 ml LB_{amp}-Medium auf eine OD von 0,05 angeimpft und bei 37°C kultiviert. Bei Erreichen einer OD von 0,5–0,8 erfolgte die Induktion des Fusionsproteins mit 1 mM IPTG bei 37°C für 2 bis 4 Stunden. Die Zellen wurden mit 5000 Upm für 10 min bei 4°C im JA-10 Rotor (Beckman) geerntet und anschließend eingefroren.

5.2.9.2. Reinigung von Histidinhexapeptid-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Crowe, J., Masone, B.S. und Ribbe, J. (1996).

Die nach der Induktion geernteten Zellen wurden in 1 ml Puffer (75 mM Tris/HCl, pH 7,5, mit Proteaseinhibitoren) pro 20 OD-Einheiten im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mg/ml Lysozym 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 1% und NaCl auf eine Endkonzentration von 150 mM zugegeben. Die Zellen wurden unter Eiskühlung mit Ultraschall (10 x 10 s, Branson Sonifier 250, Stufe 5, 80% Leistung) behandelt und zentrifugiert (45000 Upm, 30 min, Rotor Ti 70). Der Überstand wurde drei mal auf eine äquilierte Nickel-NTA-Agarose-Säule (Säulenvolumen: 10% des Auftragsvolumens) mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde mit dem gleichen Volumen Waschpuffer (75 mM Tris-Base, 10 mM Imidazol) gewaschen. Eluiert wurde mit vier Säulenvolumen 200 mM Imidazol. Die Fraktionen wurden gesammelt und mit 10% Glycerin (v/v) tiefgefroren.

5.3. Immunologische Methoden

5.3.1. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Um Proteine immunologisch nachzuweisen (Westernblotting), wurden diese per SDS-PAGE (s. Kap. 5.2.4.) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (s. Kap. 5.2.6.). Alle folgenden Inkubationen wurden unter Schütteln bei RT durchgeführt. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran durch Inkubation für 30 min mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl) abgesättigt. Dann wurden einzelne Proteine durch 1-18 h Inkubation mit spezifischen Antiseren oder gereinigten Antikörpern, die je nach Titer 1:50 bis 1:20000 in Milchpulver/TBS verdünnt worden waren, immunodekoriert. Die Membran wurde nacheinander für jeweils 10 min in TBS, TBS/0,05% (w/v) Triton X-100 und TBS gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde ein gegen Kaninchen- oder Maus-Immunglobulin G gerichteter Antikörper aus Ziege verwendet, welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war (Bio-Rad). Der zweite Antikörper wurde 1:5000 in Milchpulver/TBS verdünnt und 1 h mit der Membran inkubiert. Anschließend wurden die Waschschritte wiederholt. Die gebundene Peroxidase wurde mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham) auf einem Röntgenfilm nachgewiesen (Vacherau, 1989).

5.4. Chemikalien und Geräte

5.4.1. Chemikalien und Enzyme

Agfa-Gevaert, München: Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

Amersham-Buchler, Braunschweig: ECL-Reagenz für Western Blots

ARK Scientific, Darmstadt: PCR-Primer

Bio-Rad, München: Reagenzien zur Proteinbestimmung, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-IgG aus Ziege

Boehringer, Mannheim: dNTP, DTT, Ethidiumbromid, NTP, Restriktionsenzyme, Tris

DIFCO, Detroit, USA: Bacto-Agar, Hefeextrakt, Pepton

Fluka, Buchs, CH: Trichloressigsäure

Genomed, Bad Oeynhausen: "Jetstar"-Kit für Plasmid-DNA-Präparation

Gerbu, Gaiberg: Acrylamid, Ampicillin, DTT

GIBCO-BRL, Eggenstein: Agarose (ultra pure, low endoosmosis), Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase

ICN Pharmaceuticals, Eschwege: [γ -³²P]ATP (4000 Ci/mmol), [³⁵S]Methionin (1.1-1.4 Ci/mol)

Neosystem, Straßburg, Frankreich: Oligopeptide

Nestle-Alete, München: Magermilchpulver

New England Biolabs, Schwalbach: Restriktionsenzyme

Pharmacia, Freiburg: 7-Methyl-guanosin-triphosphat (m⁷G(5')ppp(5')G)

Pierce, Rochester, USA: MBS

Promega, Heidelberg: Aminosäuremix ohne Methionin, Kaninchen-Retikulozytenlysat, pGEM4-Vektor, *Pfu*-DNA Polymerase, RNasin, SP6-Polymerase, TNT-Kaninchen-Reticulozytenlysat

Quiagen, Hilden: "QIAquick Gel Extraction Kit", "QIAquick Nucleotide Removal Kit", "QIAquick PCR Purification Kit", "QIAprep Miniprep Kit"

Serva, Heidelberg: Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brillant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, SDS, Spermidin, TEMED, Xylenxyanol

Sigma, München: Aminosäuren, Ammoniumperoxodisulfat, Ampicillin, BSA Grade

VIII (fettsäurefrei), β -Casein, Ethidiumbromid, Glycerin, β -Mercaptoethanol, Standards für SDS-PAGE, PMSF, Triton X-100

Stratagen, Heidelberg: *E. coli* Stamm XL1-blue

United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, USA: Pepton, Trypton, Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)

Alle übrigen Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

5.4.2. Geräte und sonstige Materialien

Abimed, Düsseldorf: Kolbenhubpipetten

Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevematic 60

Appligene, Heidelberg: Agarosegel-Imaging-System "The ImagerTM"

BDK, Hamburg: Sterilbank

Beckman Instruments, München: Kühlzentrifugen J2-21, Tischultrazentrifuge TL-100, einschließlich der Rotoren und Zentrifugenrörchen, Ultrazentrifugen (L8-Serie)

Bender und Hobein, München: „Vortex“-Mixer

Bio-Rad, München: "Gene Pulser" für Elektroporation, "Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell"

Braun, Melsungen: "Certomat"-Schüttler, Schüttelwasserbäder

Eppendorf, Hamburg: Photometer, Reaktionsgefäß, Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen 5415

Fuji: "Super RX" Fuji Medical X-Ray Film 100 MF 13 x 18 cm

Genser, Rothenburg: Geltrockner Jet1

Heraeus Christ, Osterode: Bactifuge, Brutschränke, Inkubatoren

Ika, Staufen: Magnetrührer

Kodak, München: "Bio Max MR" Kodak TR-1 Film 13 x 18 cm

Kontron, USA: Spectrophotometer Uvikon 930

Memmert, Hannover: Wärmeschränke

MWG-Biotech, Ebersberg: Primus 25/96-Thermocycler

Pharmacia, Freiburg: Spannungsgeräte

Sartorius, Mainz: Feinwaagen, Sterilfilter

Schleicher & Schuell, Dassel: Protran Nitrocellulosemembran BA83 (0.2 µm Porengröße), Whatman-3MM Filterpapier

Schütt, Göttingen: "Bioclav"-Autoklav

Shimadzu, Kyoto, Japan: Photometer UV-240 und UV-120-02

Sigma, München: Tisch-Kühlzentrifugen

Werkstatt, Institut für Physiologische Chemie, München: Gelapparaturen, "Semi-dry"-Blotkammern, Überkopfschüttler

- Albrecht, U. (2001). Circadian rhythms: A fine c(l)ocktail! *Curr. Biol.* **11**, 517-519.
- Allada, R., White, N.E., So, W.V., Hall, J.C. und Rosbash, M. (1998). A mutant Drosophila homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* **93**, 791-804.
- Aronson, B.D., Johnson, K.A., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1994a). Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. *Science* **263**, 1578-1584.
- Aronson, B.D., Johnson, K.A. und Dunlap, J.C. (1994b). Circadian clock locus frequency: protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7683-7687.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. und Macino, G. (1996). White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.* **15**, 1650-1657.
- Ballario, P. und Macino, G. (1997). White collar proteins: PASsing the light signal in *Neurospora crassa*. *Trends Microbiol.* **5**, 458-462.
- Ballario, P., Talora, C., Galli, D., Linden, H. und Macino, G. (1998). Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Mol. Microbiol.* **29**, 719-729.
- Beadle, G.W. und Tatum, E.L. (1945). *Neurospora* II. Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. *Am. J. Botan.* **32**, 678-686.
- Bell-Pedersen, D., Dunlap, J.C. und Loros, J.J. (1992). The *Neurospora* circadian clock-controlled gene, *ccg-2*, is allelic to *eas* and encodes a fungal hydrophobin required for formation of the conidial rodlet layer. *Genes Dev.* **6**, 2382-2394.
- Bell-Pedersen, D., Shinohara, M., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1996a). Circadian clock-controlled genes isolated from *Neurospora crassa* are late night to early morning specific. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**, 13096-13101.
- Bell-Pedersen, D., Garceau, N. und Loros, J.J. (1996b). Circadian rhythm in fungi. *J. Genet.* **75**, 387-401.
- Bell-Pedersen, D., Lewis, Z.A., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (2001). The *Neurospora* circadian clock regulates a transcription factor that controls rhythmic expression of the output *eas(ccg-2)* gene. *Mol. Microbiol.* **41**, 897-909.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bisswanger, H. (1994). Enzymkinetik, revised second edition (Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft).

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brandt, W.H. (1953). Zonation in a prolineless strain of *Neurospora*. *Mycologia* **45**, 194-208.
- Bunning, E. (1973). The Physiological Clock, revised third edition (New York: Springer-Verlag).
- Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D.M., Patel, K., Khorkova,O., Styren S., Morse, Z., Yao, Z. und Keesler G.A. (2001). Human casein kinase 1 δ phosphorylation of human circadian clock proteins period 1 and 2. *FEBS Lett.* **489**, 159-165.
- Carmel, G., Leichus, B., Cheng, X., Patterson, S.D., Mirza, U., Chait, B.T. und Kuret, J.J. (1994). Expression, purification, crystallization, and preliminary x-ray analysis of casein kinase-1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol. Chem.* **11**, 7304-7309.
- Cegielska, A., Gietzen, K.F., Rivers, A. und Virshup, D.M. (1998). Autoinhibition of casein kinase I epsilon (CKI epsilon) is relieved by protein phosphatases and limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **273**, 1357-1364.
- Ceriani, M.F., Darlington, T.K., Staknis, D., Mas, P., Petti, A.A., Weitz, C.J. und Kay, S.A. (1999). Light-dependent sequestration of timeless by cryptochrome. *Science* **285**, 553-556.
- Christie, J.M., Salomon, M., Nozue, K., Masamitsu W. und Briggs, W.R. (1999). LOV (light, oxygen or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 8779-8783.
- Crawford, N.M. und Arst, H.N., Jr. (1993). The molecular genetics of the nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 115-146.
- Creighton T.E. (1992). Protein Folding (New York, Freeman)
- Crosthwaite, S.C., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1995). Light-Induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. *Cell* **81**, 1003-1012.
- Crosthwaite, S.C., Dunlap, J.C. und Loros, J.J. (1997). Neurospora wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science* **276**, 763-769.
- Crowe, J., Masone, B.S. und Ribbe, J. (1996). One-step purification of recombinant proteins with the 6xHis tag and Ni-NTA resin. *Methods Mol. Biol.* **58**, 491-510.
- Darlington, T.K., Wager-Smith, K., Ceriani, M.F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T.D.L., Weitz, C.J., Takahashi, J.S. und Kay, S.A. (1998). Closing the circadian loop:

- CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science* **280**, 1599-1603.
- Denault, D.L., Loros, J.J. und Dunlap J.C. (2001). WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *EMBO J.* **20**, 109-117.
- Devlin, P.F. und Kay, S.A. (2001). Circadian photoperception. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 677-694.
- Dhillon, N. und Hoekstra, M.F. (1994). Characterization of two protein kinases from *Schizosaccharomyces pombe* involved in the regulation of DNA repair. *EMBO J.* **13**, 2777-2788.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Dunlap, J.C. (1996). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu. Rev. Genetics* **30**, 579-601.
- Dunlap, J.C. (1999). Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* **96**, 271-290.
- Edmunds, L.N., Jr. (1988). Cellular and Molecular Bases of Biological Clocks. (New York: Springer-Verlag).
- Emery, P., Venus, W., Kaneko, M., Hall, J.C. und Rosbach, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* **95**, 669-679.
- Fasman, G.D. (1989). Practical handbook of biochemistry and molecular biology. (CRC Press, Boca Raton).
- Feldman, J.F. und Hoyle, M. (1973). Isolation of circadian clock mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics* **75**, 605-613.
- Feng, Y. und Davis, N.G. (2000). Akr1p and the type I casein kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5350-5359.
- Fish, K.J., Cegielska, A., Getman, M.E., Landes, G.M. und Virshup, D.M. (1995). Isolation and characterization of human casein kinase I epsilon (CKI), a novel member of the CKI gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 14875-14883.
- Flotow, H., Graves, P.R., Wang, A.Q., Fiol, C.J., Roeske, R.W. und Roach, P.J. (1990). Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. *J. Biol. Chem.* **265**, 14264-14269.
- Flotow, H. und Roach, P.J. (1991). Role of acidic residues as substrate determinants for casein kinase I. *J. Biol. Chem.* **266**, 3724-3727.
- Freifelder, D. (1982). Physical Biochemistry. (New York, Freeman).

- Garceau, N.Y., Liu, Y., Loros, J.J. und 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.
- Gietzen, K.F. und Virshup, D.M. (1999). Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. *J. Biol. Chem.* **274**, 32063-32070.
- Görl, M., Merrow, M., Huttner, B., Johnson, J., Roenneberg, T. und Brunner, M. (2001). A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* **20**, 7074-7084.
- Graves, P.R. und Roach, P.J. (1995). Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J. Biol. Chem.* **270**, 21689-21694.
- Gross, S.D., Simerly, C., Schatten, G. und Anderson, R.A. (1997). A casein kinase I isoform is required for proper cell cycle progression in the fertilized mouse oocyte. *J. Cell Sci.* **110**, 3083-3090.
- Hall, J.C. (1995). Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends Neurosci.* **18**, 230-240.
- Hall, J.C. (1998). Genetics of biological rhythms in drosophila. *Adv. Genet.* **38**, 135-184.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988). Antibodies: A laboratory manual. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory press)
- Harmer, S.L., Panda, S. und Kay, S.A. (2001). Molecular bases of circadian rhythms. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **17**, 215-253.
- Hastings, J.W. und Sweeney, B.M. (1957). On the molecular mechanism of temperature independence in a biological clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **43**, 804-811.
- Heintzen C., Loros J.J. und Dunlap J.C. (2001). The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating and regulates clock resetting. *Cell* **104**, 453-464.
- Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T. und Dixon, R. (1996). Azotobacter vinelandii NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2143-2148.
- Hoekstra, M.F., Liskay, R.M., Ou, A.C., DeMaggio, A.J., Burbee, D.G. und Heffron, F. (1991). HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science* **253**, 1031-1034.

- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.-S., Larsen, E. und Briggs, W.R. (1997). Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120-2130.
- Huang, Z.J., Edery, I. und Rosbach, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors. *Nature* **364**, 259-262.
- Hunter-Ensor, M., Ousley, A. und Sehgal, A. (1996). Regulation of the Drosophila protein timeless suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* **84**, 677-685.
- Ikeda, M. und Nomura, M. (1997). cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 258-264.
- Keesler G.A., Camacho, F., Guo, Y., Virshup, D.M., Mondadori, C. und Yao, Z. (2000). Phosphorylation and destabilization of human period 1 clock protein by human casein kinase 1 epsilon. *Neuroreport* **11**, 951-955.
- King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilzbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W. und Takahashi, J.S. (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* **89**, 641-653.
- Klein, D.C., Moore, R.Y. und Repert, S.M. (ed.) (1991). Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock. Oxford Univ. Press., New York.
- Kloss, B., Price, J.L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C.S. und Young, M.W. (1998). The Drosophila clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon. *Cell* **94**, 97-107.
- Kloss, B., Rothenfluh, A., Young, M.W. und Saez, L. (2001). Phosphorylation of period is influenced by cycling physical associations of double-time, period and timeless in the Drosophila clock. *Neuron* **30**, 699-706.
- Koike, N., Hida, A., Numano, R., Hirose, M., Sakaki, Y. und Tei H. (1998). Identification of the mammalian homologues of the Drosophila timeless gene, Timeless1. *FEBS Lett.* **441**, 427-431.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125-8148.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H. und Reppert, S.M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**, 193-205.
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Elektroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-207.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lauter, F.R. und Yanofsky, C. (1993). Day/night and circadian rhythm control of con gene expression in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8249-8253.
- Lee, K. und Ebbewe, D.J. (1998a). Analysis of the two transcriptional activation elements in the promotor of the developmentally regulated *con-10* gene of *Neurospora crassa*. *Fung. Genet. Biol.* **23**, 259-268.
- Lee, K. und Ebbewe, D.J. (1998b). Tissue-specific repression of starvation and stress responses of the *Neurospora crassa* *con-10* gene is mediated by RCO1. *Fung. Genet. Biol.* **23**, 268-278.
- Lee, K., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (2000). Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science* **289**, 107-110.
- Lewis, M.T. und Feldman, J.F. (1996). Evolution of the frequency (frq) clock locus in Ascomycete fungi. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 1233-1241.
- Linden, H. und Macino, G. (1997). White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* **16**, 98-109.
- Liu, Y., Garceau, N., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1997). Thermally regulated translational control mediates an aspect of temperature compensation in the *Neurospora* circadian clock. *Cell* **89**, 477-486.
- Liu, Y., Merrow, M., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1998). How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science* **281**, 825-829.
- Liu, Y., Loros, J. und Dunlap, J.C. (2000). Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 234-239.
- Longenecker, K.L., Roach, P.J. und Hurley, T.D. (1996). Three-dimensional structure of mammalian casein kinase I: molecular basis for phosphate recognition. *Mol. Biol.* **257**, 618-631.
- Loros, J.J., Denome, S.A. und Dunlap, J.C. (1989). Molecular cloning of genes under the control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science* **243**, 385-388.
- Loros, J.J. (1995). The molecular basis of the *Neurospora* clock. *Semin. Neurosci.* **7**, 3-13.
- Loros, J.J. (1998). Time at the end of the millenium: the *Neurospora* clock. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 698-706.
- Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (2001). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 757-794.

- Lowrey, P.L., Shimomura, K., Antoch, M.P., Yamazaki, S., Zemenides, P.D., Ralph, M.R., Menaker, M. und Takahashi, J.S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* **288**, 483-492.
- Luo, C., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1998). Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *EMBO J.* **17**, 1228-1235.
- Marchal, C., Haguener-Tsapis, R. und Urban-Grimal, D.J. (2000). Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease. *Biol. Chem.* **275**, 23608-23614.
- McClung, C.R., Fox, B.A. und Dunlap, J.C. (1989). The *Neurospora* clock gene frequency shares a sequence element with the *Drosophila* clock gene period. *Nature* **339**, 558-562.
- Meggio, F., Perich, J.W., Reynolds, E.C. und Pinna, L.A. (1991). A synthetic beta-casein phosphopeptide and analogues as model substrates for casein kinase-1, a ubiquitous, phosphate directed protein kinase. *FEBS Lett.* **283**, 303-306.
- Meggio, F., Perich, J.W., Marin, O. und Pinna, L.A. (1992). The comparative efficiencies of the Ser(P)-, Thr(P)- and Tyr(P)-residues as specificity determinants for casein kinase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 1460-1465.
- Melton, D., Krieg, P., Rebagliati, M., Maniatis, T., Zinn, K. und Green, M. (1984). Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promotor. *Nucl. Acids Res.* **12**, 7035-7056.
- Merrow, M.W. und Dunlap, J.C. (1994). Intergeneric complementation of a circadian rhythmicity defect: phylogenetic conservation of structure and function of the clock gene frequency. *EMBO J.* **13**, 2257-2266.
- Merrow, M., Garceau, N. und Dunlap, J.C. (1997). Dissection of a circadian oscillation into discrete domains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **94**, 3877-3882.
- Merrow, M., Brunner, M. und Roenneberg, T. (1999). Assignment of circadian function for the *Neurospora* clock gene frequency. *Nature* **399**, 584-586.
- Merrow, M., Franchi, L., Dragovic, Z., Goerl, M., Johnson, J., Brunner, M., Macino, G. und Roenneberg, T. (2001). Circadian regulation of the light input pathway in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* **20**, 307-315.
- Michel, S., Geusz, M., Zaritzky, J. und Block, G.D. (1993). Circadian rhythm in membrane conductance expressed in isolated neurons. *Science* **259**, 239-241.
- Nakashima, H. und Onai, K. (1996). The circadian conidiation rhythm in *Neurospora crassa*. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **7**, 765-774.

- Orkin, S.H. (1992). GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* **80**, 575-581.
- Ouyang, Y., Andersson, C.R., Kondo, T., Golden, S.S. und Johnson, C.H. (1998). Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**, 8660-8664.
- Panek, H.R., Stepp, J.D., Engle, H.M., Marks, K.M., Tan, P.K., Lemmon, S.K. und Robinson, L.C. (1997). Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *EMBO J.* **16**, 4194-4204.
- Pelham, H.R.B. und Jackson, R.J. (1976). An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**, 247-256.
- Perkins, D. (1992). *Neurospora*: the organism behind the molecular revolution. *Genetics* **130**, 687-701.
- Pittendrigh, C.S., Bruce, V.G., Rosenzweig, N.S. und Rubin, M.L. (1959). A biological clock in *Neurospora*. *Nature* **184**, 169-170.
- Price, J.L., Blau, J., Rothenfluh, A., Adodeely, M., Kloss, B. und Young, M.W. (1998). Double-time is a new *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* **94**, 83-95.
- Pulgar, V., Marin, O., Meggio, F., Allende, C.C., Allende, J.E. und Pinna, L.A. (1999). Optimal sequences for non-phosphate-directed phosphorylation by protein kinase CK1 (casein kinase-1)--a re-evaluation. *Eur. J. Biochem.* **260**, 520-526.
- Rechsteiner, M. und Rogers S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *TIBS* **21**, 267-271.
- Reisz-Porszasz, S., Probst, M.R., Fukunaga, B.N. und Hankinson, O. (1994). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT). *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6075-6086.
- Reppert, S.M. und Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 647-676.
- Rivers, A., Gietzen, K.F., Vielhaber, E. und Virshup, D.M. (1998). Regulation of casein kinase I epsilon and casein kinase I delta by an in vivo futile phosphorylation cycle. *J. Biol. Chem.* **273**, 15980-15984.
- Rivkees, S.A. (2001). Mechanisms and clinical significance of circadian rhythms in children. *Curr. Opin. Pediatr.* **13**, 352-357.
- Robinson, L.C., Menold, M.M., Garrett, S. und Culbertson, M.R. (1993). Casein kinase I-like protein kinases encoded by YCK1 and YCK2 are required for yeast morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2870-2881.

- Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Roth, A.F. und Davis N.G. (2000). Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor Receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 8143 - 8153.
- Rowles, J., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J. und Cobb, M.H. (1991). Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9548-9552.
- Ruoff, P., Mohsenzadeh, S. und Rensing, L. (1996). Circadian rhythms and protein turnover: the influence of temperature on the period length of clock mutants simulated by the Goodwin oszillator. *Naturwissenschaften* **83**, 514-517.
- Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbash, M. und Hall, J.C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of Drosophila period and timeless. *Cell* **29**, 805-814.
- Saez, L. und Young, M.W. (1996). Regulation of nuclear entry of the Drosophila clock proteins Period and Timeless. *Neuron* **17**, 911-920.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Falloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (ed.) (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sargent, M.L., Briggs, W.R. und Woodward, D.O. (1966). The circadian nature of a rhythm expressed by an invertaseless strain of Neurospora crassa. *Plant Physiol.* **41**, 1343-1349.
- Sawyer, L.A., Hennessy, J.M., Peixoto, A.A., Rosato, E., Parkinson, H., Costa, R., und Kyriacou, C.P. (1997). Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation. *Science* **278**, 2117-2120.
- Shinohara, M., Loros, J.J. und Dunlap, J.C. (1998). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by the circadian clock. *J. Biol. Chem.* **273**, 446-452.
- Shirakawa, T., Honma, S., Katsuno, Y., Oguchi, H. und Honma, K.I. (2000). Synchronization of circadian firing rhythms in cultured rat suprachiasmatic neurons. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 2833-2838.
- Söderbäck, E., Reyes-Ramirez, F., Eydmann, T., Austin, S., Hill, S. und Dixon, R. (1998). The redox- and nitrogen-responsive regulatory protein NIFL from Azotobacter

vinelandii comprises discrete flavin and nucleotide-binding domains. *Mol. Microbiol.* **28**, 179-192.

Songyang, Z., Lu, K.P., Kwon, Y.T., Tsai, L.H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D.A., Soderling, T.R., Bartleson, C., Graves, D.J., DeMaggio, A.J., Hoekstra, M.F., Blenis, J., Hunter, T. und Cantley, L.C. (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6486-6493.

Springer, M.L. (1993). Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. *Bioessays* **15**, 365-374.

Stueber, D., Ibrahim, I., Culter, D., Dobberstein, B. und Bujard, H. (1984). A novel *in vitro* transkription-translation system: accurate and efficient synthesis of single proteins from cloned DNA sequences. *EMBO J.* **3**, 3143-3148.

Takumi, T., Matsubara, C., Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yagita, K., Maebayashi, Y., Sakakida, Y., Okumura, K., Takashima, N. und Okamura, H. (1998). A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* **3**, 167-176.

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

Tei, H., Okamura, H., Shigeyoshi, Y., Fukuhara, C., Ozawa, R., Hirose und M., Sakaki, Y. (1997). Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* **389**, 512-516.

Toh, K.L., Jones, C.R., He, Y., Eide, E.J., Hinz, W.A., Virshup, D.M., Ptacek, L.J. und Fu, Y.H. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* **291**, 1040-1043.

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

Tuazon, P.T. und Traugh, J.A. (1991). Casein kinase I and II--multipotential serine protein kinases: structure, function, and regulation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **23**, 123-164.

Vacherau, A. (1989). Luminescent immunodetection of western-blotted proteins from Coomassie-stained polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **179**, 206-208.

Vancura, A., Sessler, A., Leichus, B. und Kuret, J. (1994). A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. *J. Biol. Chem.* **269**, 19271-19278.

- Vielhaber, E., Eide, E., Rivers, A., Gao, Z.H. und 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.
- Welsh, D.K., Logothetis, D.E., Meister, M. und Reppert, S.M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**, 697-706.
- Williams, J.A. und Sehgal, A. (2001). Molecular components of the circadian system in Drosophila. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 729-755.
- Xu, R.M., Carmel, G., Sweet, R.M., Kuret, J. und Cheng, X. (1995). Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase. *EMBO J.* **14**, 1015-1023.
- Yang, Y., Cheng, P., Zhi, G. und Liu, Y. (2001). Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY. *J. Biol. Chem.* **276**, 41064-41072.
- Young, M.W. (2000a). The Tick-Tock of the Biological Clock. *Sci. Am.* **282**, 64-71.
- Young, M.W. (2000b). Circadian rhythms. Marking time for a kingdom. *Science* **288**, 451-453.
- Young, M.W. (2000c). Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 601-606.
- Zhai, L., Graves, P.R., Robinson L.C., Italiano, M., Culbertson, M.R., Rowles, J., Cobb, M.H., DePaoli-Roach, A.A. und Roach, P.J. (1995). Casein kinase I gamma subfamily. Molecular cloning, expression, and characterization of three mammalian isoforms and complementation of defects in the *Saccharomyces cerevisiae* YCK genes. *J. Biol. Chem.* **270**, 12717-12724.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R. und Reppert, S.M. (1998). Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* **20**, 1103-1110.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit entstandene Veröffentlichungen:

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

Danksagung

Es ist mir ein besonderes Anliegen, mich an dieser Stelle bei all den Menschen zu bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben. Insbesondere sind dies:

Prof. Dr. Michael Brunner, der mich als Doktorvater und Betreuer durch die Höhen und Tiefen dieser Dissertation geleitet hat. Dabei hat er es stets verstanden, eine angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Der Institutsleiter Prof. Dr. Dr. Walter Neupert, der mich als Doktorand in sein Institut aufgenommen und an Prof. Michael Brunner vermittelt hat.

Margit Görl und Christiane Kotthof, die mich in die Finessen der Laborarbeit eingeführt haben und mir immer mit endloser Geduld mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Stefan Paschen, der bei allen Problemen immer hilfsbereit gewesen ist.

Die Mitglieder der Werkstatt, die Spül- und Putzfrauen, die technischen Assistenten und all die anderen Mitarbeiter des Instituts und wissenschaftlichen Kollegen, die es verzeihen mögen, daß ich sie nicht einzeln namentlich erwähne.

Dörthe, die mich nie im Stich gelassen hat und natürlich Lena und meine anderen Geschwister Wasti, Barbara und Jakob.

Tante Sissy und Onkel Hans, die immer für mich da waren und sind.

Meine Mutter, die immer großen Wert auf meine Ausbildung gelegt hat.

Mein Vater, der großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt und die „Hardware“ für das Schreiben dieser Dissertation finanziert hat und Theresa, die freundlicherweise die Arbeit Korrektur gelesen hat.

Natürlich meine Freunde, ohne die mein Leben sehr viel langweiliger und ärmer wäre. Insbesondere Matthias, dem ich besonderen Dank für das Korrekturlesen der Arbeit schulde, sowie Gerald, Igor, Susanne, Daniel, Christoph, Marion, Uli, Mitch, Claas, Florian, Eddie, ...

Chiara, die mir durch ihre Liebe immer Kraft gegeben hat.

Curriculum Vitae

Benedikt David Huttner

23.06.1974	Geburt als viertes Kind von Christina Deubzer-Huttner (geb. Deubzer) und Prof. Dr. Gottfried Huttner in München
1980-1982	Besuch der Sonnenhalden-Grundschule in Konstanz
1982-1984	Besuch der Rotbuchen-Grundschule in München
1984-1993	Besuch des Albert-Einstein-Gymnasiums in München
8/1989-11/1989	Besuch der Lindsay-Thurber-Comprehensive-High-School in Red Deer, Alberta, Kanada
1993	Abitur
8/1993-10/1994	Zivildienst beim Bayerischen Roten Kreuz in München
11/1994-11/2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
9/1996	Ärztliche Vorprüfung
8/1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1997-7/1998	Studium der Humanmedizin an der Université de Nice Sophia-Antipolis in Nizza, Frankreich
3/1999-04/2000	Experimenteller Teil der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung durch Prof. Dr. Michael Brunner am Adolf-Butenandt-Institut für physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München
9/2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2000-7/2001	Mehrmonatige Studienaufenthalte in Italien, der Schweiz und Kanada im Rahmen des „Praktischen Jahres“
11/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit 01/2002	„Arzt im Praktikum“ in der Abteilung für Innere Medizin am Ospedale Regionale Bellinzona e Valli in Bellinzona, Schweiz