

Philipps



Universität
Marburg

Einfluss von ATP
auf die biologische Aktivität von
Cryptochrom 2 aus *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Maike Eckel

aus Frankenberg/Eder

Marburg/Lahn, 2017

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von Januar 2015 bis Dezember 2017 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Claus Schwechheimer

Tag der Disputation: _____

Die Publikation von Teilen dieser Arbeit ist in Vorbereitung:

Eckel, M., Steinchen, W.M., Batschauer, A.: Nucleotide binding boosts the Activity of Arabidopsis Cryptochrome 2. *Plant J.*

Sonstige Publikationen:

Tagua, V.G., Pausch, M., Eckel, M., Gutiérrez, G., Miralles-Durán, A., Sanz, C., Eslava, A.P., Pokorny, R., Corrochano, L.M., Batschauer, A. (2015). Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, 15130–15135.

Summary

Cryptochromes (cry) are blue light receptors that together with photolyases form the so-called cryptochrome/photolyase family with members occurring in all three domains of life. All family members show high structural similarities within the N-terminal photosensory (PHR, *photolyase homologous region*) domain that non-covalently bind the FAD cofactor, but show differences regarding their biological functions. Photolyases are DNA repair enzymes that remove UV-B lesions in damaged DNA. Cryptochromes lack DNA repair activity but gained important roles in regulating manifold biological responses. The model plant *Arabidopsis thaliana* encodes two classical cryptochromes, cry1 and cry2, with main functions in regulating photomorphogenesis and photoperiodic flowering. Prerequisite for active crys is electron transfer towards the excited flavin cofactor allowing the formation of the protein's signalling state. In the case of plant crys the signalling state contains the semireduced radical form of the flavin, FADH[•]. The reduction of the resting state in the dark to the flavin's lit state is called "photoreduction".

For cry1, Bouly et al. (Bouly et al., 2003) demonstrated for the first time that plant cryptochromes bind ATP. Subsequently, cry1's metabolite binding site was determined in crystals of the PHR domain soaked with the non-hydrolyzable ATP analog AMP-PNP (Brautigam et al., 2004): The nucleotide is associated within the FAD cavity by a central tyrosine. However, still not much is known about the biochemical effects of ATP-binding to crys and consequences on their biological activity.

The central topic of this work is the role of ATP binding to cry2. The residues in cry2 necessary for ATP-binding have not been ultimately identified by mutant studies. This is addressed in this PhD thesis by analyzing cry2 mutants with a replacement within the predicted ATP-binding site. Moreover, this work addresses, which effects ATP-binding has on cry2 *in vitro*. In addition, it was investigated how ATP-binding may affect the biological function of cry2 *in planta*.

The recent results confirm that the among plant cryptochromes conserved Tyr residue 399 is essential in cry2 for ATP binding. By using *in vitro* assays with non-binding mutants, it could also been shown that ATP binding induces structural changes, especially in the C-terminal helix that connects the PHR domain with the C-terminal extension of the protein. Moreover, photoreduction in the cry2 wild-type protein is enhanced and FADH[•] is stabilized, when ATP is present.

Complementation studies with transgenic *Arabidopsis* lines expressing the non-binding cry2 mutants in a cry2-deficient background showed that these proteins still retained biological

activity. However, this remaining biological activity is reduced compared to lines that express the wild-type protein. Consequently, ATP binding is not essential for cry2 but boosts the activity of cry2 by stabilizing the protein's signalling state likely through conformational changes.

Inhaltsverzeichnis

SUMMARY.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGEN DER PROTEINOGENEN AMINOSÄUREN	VII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 LICHTPERZEPTION IN HÖHEREN PFLANZEN	1
1.1.1 ROTLICHTREZEPTOREN.....	2
1.1.2 UV- UND BLAULICHTREZEPTOREN.....	4
1.2 CRYPTOCHROM/PHOTOLYASE-FAMILIE	7
1.2.1 DER FLAVIN-KOFAKTOR	8
1.2.2 PHOTOLYASEN.....	10
1.2.3 DASH-CRYPTOCHROME	13
1.2.4 TIERISCHE CRYPTOCHROME	14
1.3 A. THALIANA CRYPTOCHROM 2	16
1.3.1 BIOLOGISCHE FUNKTION UND SIGNALTRANSDUKTION	16
1.3.2 STRUKTUR	20
1.3.3 AKTIVIERUNGS- UND SIGNALMECHANISMUS.....	22
1.3.4 CRYPTOCHROM 2 UND ATP.....	29
1.4 ZIELSETZUNG	34
2. MATERIAL.....	35
2.1 GERÄTE	35
2.2 VERBRAUCHSMATERIAL	37
2.3 ANTIKÖRPER.....	37
2.4 CHEMIKALIEN.....	37
2.5 OLIGONUKLEOTIDE.....	38
2.6 PLASMIDE	39
2.7 ESCHERICHIA COLI-STÄMME	39
2.8 AGROBACTERIUM TUMEFACIENS-STÄMME	40
2.9 ARABIDOPSIS THALIANA-LINIEN	40
2.10 SACCHAROMYCES CEREVISIAE-STÄMME	40

3. METHODEN	41
3.1 ANZUCHT UND KULTIVIERUNG DER ORGANISMEN	41
3.1.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	41
3.1.2 <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	42
3.1.3 <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	42
3.1.4 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	43
3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	44
3.2.1 HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN.....	44
3.2.2 TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	45
3.2.3 MINI-PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	45
3.2.4 STANDARD-POLYMERASE-KETTENREAKTION.....	46
3.2.5 KLONIERUNG.....	47
3.2.6 ÜBERPRÜFUNG VON KONSTRUKTEN.....	51
3.2.7 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	53
3.2.8 TRANSKRIPTIONSANALYSE	54
3.3 HERSTELLUNG TRANSGENER PFLANZEN	58
3.3.1 HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER <i>A. TUMEFACIENS</i>	58
3.3.2 TRANSFORMATION VON <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	59
3.3.3 TRANSIENTE TRANSFORMATION VON <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	60
3.3.4 STABILE TRANSFORMATION VON <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	61
3.3.5 SELEKTION UND ZUCHT VON TRANSGENEN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	62
3.4 PROTEININTERAKTIONSTUDIEN MITTELS HEFE-2-HYBRID-SYSTEM	63
3.4.1 HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER HEFE	63
3.4.2 TRANSFORMATION VON <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	64
3.4.3 INTERAKTIONSANALYSE MITTELS MINIMALMEDIUM	65
3.5 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	66
3.5.1 HETEROLOGE PROTEINEXPRESSION IN <i>E. COLI</i>	66
3.5.2 PROTEINEXTRAKTION.....	67
3.5.3 PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG	70
3.5.4 ELEKTROPHORESE VON PROTEINEN	71
3.5.5 <i>WESTERN BLOT</i>	73
3.5.6 AUFREINIGUNG REKOMBINANTER PROTEINE AUS <i>E. COLI</i> UND Sf21-ZELLEN.....	77
3.6 SPEKTROSKOPISCHE METHODEN.....	81
3.6.1 UV-VIS SPEKTROSKOPIE.....	81

3.6.2	FLUORESZENZ-SPEKTROSKOPIE.....	82
3.6.3	ELEKTRONENSPIN-RESONANZ-SPEKTROSKOPIE	83
3.7	PROTEIN-LIGAND-STUDIEN	83
3.7.1	THERMOFAD.....	83
3.7.2	ISOTHERME TITRATIONS-KALORIMETRIE.....	84
3.7.3	PARTIELLE PROTEOLYSE MIT TRYPSIN	86
3.7.4	CROSS-LINKING	87
3.7.5	HDX-MS.....	88
3.8	UNTERSTÜTZER DER PRAKTISCHEN ARBEIT	89
4.	ERGEBNISSE.....	90
4.1	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN.....	90
4.1.1	AUFREINIGUNG DER PHR-DOMÄNEN.....	91
4.1.2	AUFREINIGUNG DES CRY2 VOLLLÄNGENPROTEINS	95
4.2	NACHWEIS DER ATP-BINDUNG AN CRY2 IN VITRO.....	96
4.2.1	THERMOFAD.....	96
4.2.2	ISOTHERME TITRATIONS-KALORIMETRIE.....	99
4.3	ANALYSE DER ATP-BINDUNG IN PLANTA.....	101
4.3.1	INHIBIERUNG DES HYPOKOTYLLÄNGENWACHSTUMS.....	102
4.3.2	BLAULICHTINDUZIERTER ABBAU	104
4.3.3	PHOTOPERIODISCHE BLÜHINDUKTION	106
4.4	CHARAKTERISIERUNG DER AUSWIRKUNG VON ATP-BINDUNG IN VITRO.....	108
4.4.1	SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	108
4.4.2	PARTIELLE PROTEOLYSE VON CRY2 ZUM NACHWEIS VON ATP-INDUZIERTEN STRUKTURELLEN ÄNDERUNGEN	116
4.4.3	HDX-MS VON CRY2 PHR ZUM NACHWEIS VON ATP-INDUZIERTEN STRUKTURELLEN ÄNDERUNGEN.....	117
4.5	ANALYSEN ZUR CRY2-CRY2-INTERAKTION	120
4.5.1	HEFE-2-HYBRIDANALYSEN ZUR DIMERISIERUNG VON CRY2.....	120
4.5.2	CROSS-LINKING ZUM NACHWEIS EINER MÖGLICHEN CRY2-DIMERSIERUNG.....	122
4.6.	ANALYSEN ZUR WIRKUNGSWEISE VON 3-BROMO-7-NITROINDAZOL	123
4.6.1	WIRKUNG VON 3-BROMO-7-NITROINDAZOL IN PLANTA	123
4.6.2	WIRKUNG VON 3-BROMO-7-NITROINDAZOL AUF CRY2 IN VITRO	127
5.	DISKUSSION.....	129
5.1	HETEROLOGE EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DER CRY2-PROTEINE.....	129

5.2	Y399 ALS TEIL DER METABOLIT-BINDUNGSSTELLE VON A. T. CRYPTOCHROM 2.....	130
5.3	ATP-BINDUNG VON A. T. CRYPTOCHROM 2 VERSTÄRKT DESSEN BIOLOGISCHE AKTIVITÄT.....	134
5.3.1	ATP-BINDUNG AN CRY2 STIMULIERT DESSEN ROLLE BEI DER PHOTOMORPHOGENESE	136
5.3.2	ATP-BINDUNG FÖRDERT DEN ABBAU VON CRYPTOCHROM 2	137
5.4	IN PLANTA-ROLLE DER TRYPTOPHAN-TRIADE IN CRYPTOCHROM 2 AM BEISPIEL VON W321.....	137
5.5	EINFLUSS VON ATP AUF CRYPTOCHROM 2 IN VITRO	138
5.5.1	EINFLUSS VON ATP AUF DEN PHOTOZYKLUS VON CRYPTOCHROM 2	138
5.5.2	ATP INDUZIERT STRUKTURELLE ÄNDERUNGEN IN CRY2.....	141
5.5.3	ATP HAT KEINEN NACHWEISBAREN EFFEKT AUF DIE CRY2-CRY2-INTERAKTION	144
5.6	3-BROMO-7-NITROINDAZOL BINDET EBENFALLS AN Y399.....	145
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>		<u>147</u>
<u>7. LITERATUR.....</u>		<u>148</u>
<u>ANHANG</u>		<u>166</u>
ANHANG A1		166
ANHANG A2		168
ANHANG A3		169
ANHANG A4		170
ANHANG A5		171
ANHANG A6		172
ANHANG A7		173
<u>LEBENS LAUF</u>		<u>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</u>
<u>DANKSAGUNG.....</u>		<u>177</u>
<u>ERKLÄRUNG</u>		<u>178</u>

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere	FAD	Flavinadenindinukleotid
aa	Aminosäuren	FMN	Flavinadeninmononukleotid
APS	Ammoniumpersulfat	g	Gramm
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser	GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
A.t.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GUS	β-Glucuronidase
ATP	Adenosintriphosphat	h	Stunde
bp	Basenpaare	HRP	Meerrettich-Peroxidase
BSA	Rinderserumalbumin	IgG	Immunglobulin G
CCT	C-Terminus von Cryptochrom	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
cm	Zentimeter	K	Kelvin
cry	Cryptochrom	Kan	Kanamycin
CV	Säulenvolumen (engl. <i>Column volume</i>)	kDa	Kilodalton
DMSO	Dimethylsulfoxid	L	Liter
DNA	Desoxyribonukleinsäure	M	mol/L
dNTP	Desoxyribonukleotid	MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
DTT	Dithiotreitol	MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	m	Milli-
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	min	Minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	MS	Massenspektrometrie
EPR	Elektronenspinresonanz	MTHF	N ⁵ N ¹⁰ -Methenyl-5,6,7,8-tetrahydrofolat
et al.	et alii	NLS	<i>Nuclear Localization Sequence</i>
NTA	<i>Nitriloacetic acid</i>	x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

OD	Optische Dichte	ZT	Zeitgeber-Zeit
PEG	Polyethylenglycol	α	Antikörper
phot	Phototropin	Δ	Differenz
phy	Phytochrom	μ	Mikro
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	λ	Wellenlänge
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	Umdrehungen pro Minute		
RT	Raumtemperatur		
s	Sekunde		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
T_m	Schmelztemperatur		
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>		
TBE	Tris-Borat-EDTA		
TBS	Tris gepufferte Salzlösung		
TE	Tris-EDTA		
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin Tris-HCl Tris-(hydroxymethyl)-aminoethanhydrochlorid		
TOF	<i>Time of flight</i>		
UV	Ultraviolett		
V	Volt		
v/v	Volumen/Volumen		
w/v	Gewicht/Volumen		
WT	Wildtyp		

Abkürzungen der proteinogenen Aminosäuren

Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code	Genauere Bezeichnung
A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

1. Einleitung

1.1 Lichtperzeption in Höheren Pflanzen

Licht beeinflusst als Umweltfaktor das Leben nahezu aller Organismen in höchstem Maße. Es ist nicht nur Informations-, sondern auch Energiequelle für Lebewesen. Pflanzen sind als sessile und photoautotrophe Organismen in besonderem Maße abhängig von einer bestmöglichen Adaptation an das Sonnenlicht. Um Änderungen der spektralen Zusammensetzung, der Intensität oder der Richtung und Dauer des Tageslichts schnellstmöglich wahrzunehmen und sich diesen anzupassen, kommen in Höheren Pflanzen die drei Photorezeptorklassen Phytochrome, LOV (*Light Oxygen Voltage*)-Sensor-basierte Photorezeptoren und Cryptochrome sowie der UV-Rezeptor UVR8 vor (Abbildung 1) (Hegemann, 2008; Möglich et al., 2010; Spudich et al., 2000; van der Horst and Hellingwerf, 2004). Durch das Zusammenspiel dieser Photorezeptoren wird das Spektrum des Sonnenlichts von UV-B (280 nm) bis Dunkelrot (750 nm) abgedeckt. Im Gegensatz zu Tieren werden sie nicht nur in speziellen Geweben, sondern im gesamten Organismus, teilweise sogar einschließlich der Wurzel, exprimiert (Galvão and Fankhauser, 2015; Kami et al., 2010). Die Entwicklung der Pflanzen wird zumeist durch mehrere Photorezeptoren gleichzeitig reguliert. Dabei kann grundsätzlich zwischen zwei verschiedenen, durch Photorezeptoren hervorgerufenen Antworten unterschieden werden: Auf der einen Seite sind dies adaptive Antworten der gesamten Pflanze wie Phototropismus und *Shade Avoidance Response*, aber auch Prozesse, die auf einzelne Zellen beschränkt sind wie Chloroplastenbewegung und Stomataöffnung. Auf der anderen Seite induziert Licht über Photorezeptoren irreversible Entwicklungsprozesse wie Samenkeimung und Blühinduktion (Batschauer, 1999). Der extreme Einfluss, den Licht über Photorezeptoren auf die pflanzliche Entwicklung hat, wird dadurch sichtbar, dass schätzungsweise über 8000 Gene von *A. thaliana*, und damit mehr als ein Viertel des gesamten Genoms, lichtreguliert sind (Ma et al., 2001).

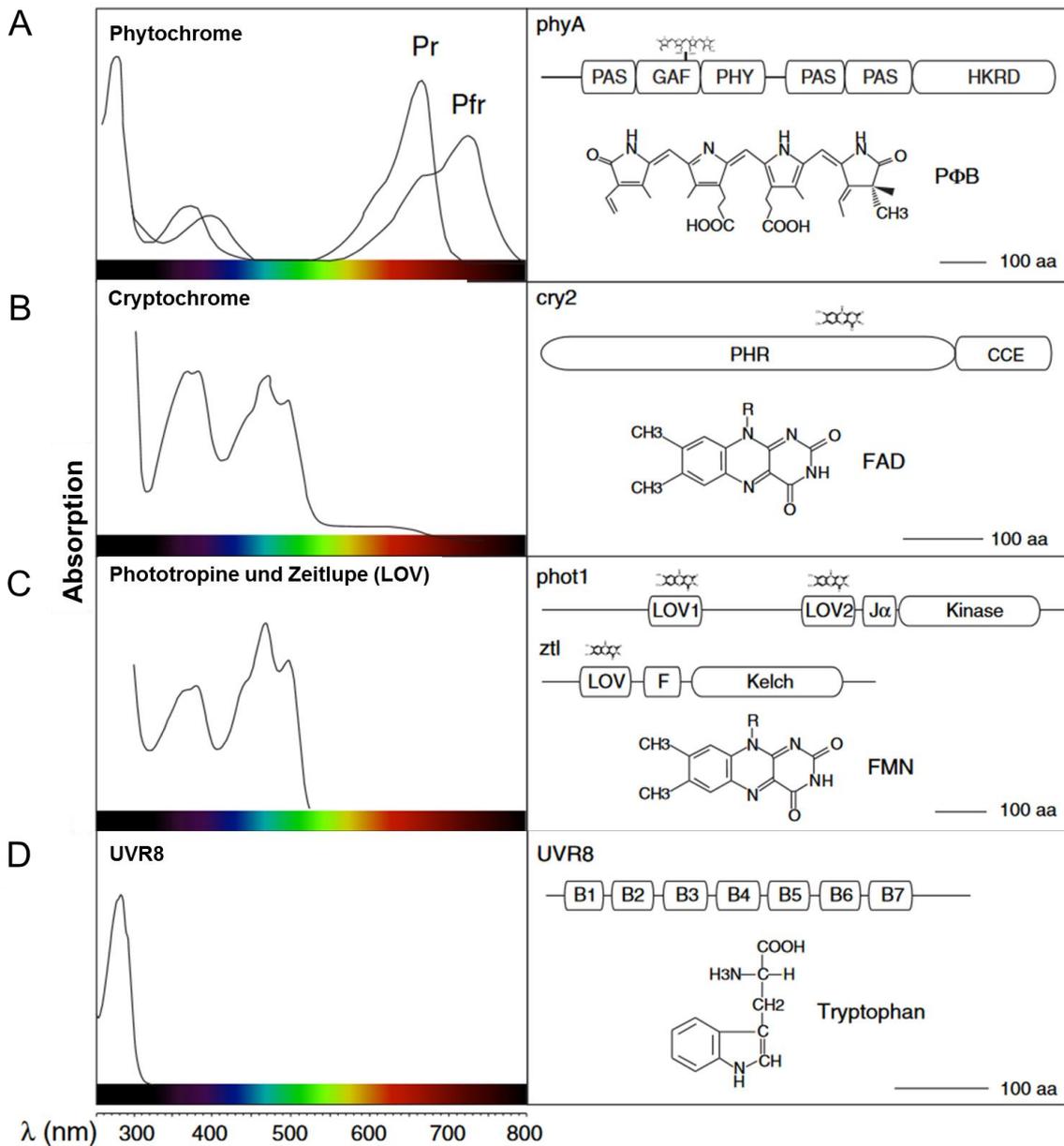


Abbildung 1: Übersicht über die in Höheren Pflanzen vorkommenden vier großen Photorezeptorfamilien. Absorptionsspektren, Chromophore und Domänen von Phytochromen (A), Cryptochromen (B), Phototropinen und Zeitlupe (C) sowie des UV-B Rezeptors UVR8 (D). Abkürzungen der Proteindomänen: HKRD, *Histidine Kinase-related* Domäne; PAS, *Per-Arndt-Sim*-Domäne; GAF, *cGMP-Phosphodiesterase/Adenyl Cyclase/Fh1A*-Domäne; PHY; *Phytochrom*-Domäne; PHR, *Photolyase Homologous Region*-Domäne; CCE; *Cryptochrom C-terminale Extension*; LOV: *Light Oxygen Voltage*-Domäne; F, *F-Box*-Domäne; B1-B7, β -Propeller-Domänen (modifiziert nach Galvão and Fankhauser, 2015).

1.1.1 Rotlichtrezeptoren

Die Rot- und Dunkelrotlichtrezeptoren in Pflanzen sowie anderen Eu- und Prokaryoten werden von Phytochromen (phy) repräsentiert (phyA-E in *A. thaliana*) (Butler et al., 1959; Clack et al., 1994; Rockwell et al., 2006; Sharrock and Quail, 1989). Die Primärstruktur dieser mit ca.

125 kDa relativ großen Proteine lässt sich generell in zwei Domänen teilen: Die N-terminale Sensordomäne bindet in höheren Pflanzen über eine Thioetherbrücke kovalent das offenkettige Tetrapyrrol Phytychromobilin als Chromophor (Abbildung 1), welches maßgeblich an der Photochemie der Phytyochrome beteiligt ist. Die C-terminale Effektor-domäne dient hingegen maßgeblich der Homo- und Heterodimerisierung von Phytyochromen sowie der Signaltransduktion (Burgie and Vierstra, 2014; Kevei and Nagy, 2003).

Der initiale Schritt nach Lichtabsorption in der Photochemie der Phytyochrome ist die Photokonversion, eine lichtgetriebene Konformationsänderung zwischen der Rotlicht-absorbierenden Pr (*red*) Form und der Dunkelrotlicht-absorbierenden Pfr (*far red*) Form (Abbildung 1). Dieser Konformationsänderung liegt eine Photoisomerisierung des Phytychromobilins zu Grunde. Durch Rotlichtbestrahlung wird eine *Z-E*-Isomerisierung an der Doppelbindung zwischen C₁₅ und C₁₆ induziert (Kneip et al., 1999; Rüdiger et al., 1983). Auf die Bildung des *E*-Isomers folgt eine Konformationsänderung des Holo-proteins.

Die Absorptionsspektren der beiden Konformationen lassen sich für die meisten Phytyochrome direkt mit dem Aktionsspektrum der pflanzlichen Antwort in Einklang bringen: Die Bestrahlung etiolierter Keimlinge mit Rotlicht führt zur Konversion des im Dunkeln akkumulierten inaktiven Pr- zum Pfr-Konformer. Dieses ist biologisch aktiv und löst folglich biologische Antworten wie beispielsweise die Photomorphogenese aus. Die Rückreaktion zur Pr-Form wird nicht nur durch Dunkelrotbestrahlung erzielt, sondern geschieht auch in Dunkelheit aufgrund der thermodynamischen Instabilität der Pfr-Konformation. Dieser Prozess wird als Dunkelreversion bezeichnet (Ruddat et al., 1997). Von Phytyochromen gesteuerte biologische Antworten sind demnach vom Verhältnis der aktiven Pfr- zur inaktiven Pr-Konformation bestimmt. Generell wird dabei zwischen zwei Klassen von Phytyochromen unterschieden: Typ-I-Phytyochrome (PhyA in *A. thaliana*) haben eine lichtlabile Pfr-Form und sind für Antworten in extrem niedrigen Fluenzraten (*Very Low Fluence Responses, VLFR*) sowie in hohen Fluenzraten im Dunkelrotbereich (*far-red High-Irradiance Responses, FR-HIR*) zuständig (Kevei et al., 2007). Im Gegensatz dazu steuern die weitgehend stabilen Typ-II-Phytyochrome (PhyB-E in *A. thaliana*) Prozesse unter schwachen Lichtintensitäten (*Low Fluence Responses, LFR*) sowie unter intensivem Rotlicht (*red light High Irradiance Responses, R-HIR*) (Quail, 2002).

Phytyochrome liegen meist konstitutiv als Homodimere vor. phyB bildet zudem auch Heterodimere mit anderen lichtstabilen Phytyochromen (Jones and Edgerton, 1994; Sharrock and Clack, 2004). Auf die Bildung des Pfr-Konformers folgt der Import der sonst cytosolischen Phytyochrome in den Zellkern (Kevei et al., 2007; Kircher et al., 2002; Sakamoto and Nagatani,

1996). Dort kommt es zur Einleitung von *Downstream*-Reaktionen. Zum einen geschieht dies durch die Inhibierung von Transkriptionsfaktoren wie *Phytochrome Interacting Factors* (PIFs) oder dem Ubiquitin E3 Ligase Komplex aus COP1 und SPA1 (Huang et al., 2014; Leivar and Monte, 2014; Shin et al., 2016). Zum anderen wird die Expression bestimmter Gene auf transkriptioneller Ebene durch Transkriptionsfaktoren wie HY5, die im Dunkeln durch COP1/SPA abgebaut werden, induziert, oder auf translationaler Ebene durch noch nicht vollständig erforschte Prozesse wie *Alternative Splicing* reguliert (Shikata et al., 2014).

Zusammenfassend zeichnen sich die verschiedenen Mitglieder der Phytochrom-Familie sowohl durch sehr unterschiedliche als auch überlappende Funktionen aus (Franklin et al., 2003; Monte et al., 2003; Smith et al., 1997). Dabei bestimmen sie den gesamten Lebenszyklus der Pflanzen beginnend bei Samenkeimung (Hennig et al., 2002; Shinomura et al., 1996, 1994) und Deetiolierung (Casal and Boccalandro, 1995; Franklin et al., 2003; Parks and Quail, 1993; Shinomura et al., 2000; Whitelam et al., 1993) über Blühinduktion (Chen et al., 2014; Johnson et al., 1994; Mockler et al., 1999) und *Shade Avoidance*-Reaktionen bis hin zur Seneszenz (Sakuraba et al., 2014).

1.1.2 UV- und Blaulichtrezeptoren

Für die Perzeption von UV-A- und Blaulicht existieren in Höheren Pflanzen zwei Gruppen von Photorezeptoren: Die Cryptochrome sowie die LOV-Sensor- (*Light Oxygen Voltage*) basierten Photorezeptoren, welche Phototropine und die Zeilupe-Familie umfassen. Vertreter kleinerer Proteinfamilien wie die vor ca. 15 Jahren erstmals beschriebenen BLUF (*Blue light sensors using Flavin*)-Domänen Proteine wurden in Pflanzen nur in Euglenaceae gefunden (Park and Tame, 2017).

1.1.2.1 Phototropine

Obwohl das namensgebende Phänomen des Phototropismus schon im 19. Jahrhundert beschrieben wurde (Darwin, C., 1880), wurden die dazugehörigen Photorezeptoren mit NPH1 (*non-phototropic hypocotyl*, PHOT1) und NPL1 (*nph1-like*, PHOT2) erst sehr viel später identifiziert (Christie et al., 1998; Huala et al., 1997). Die beiden in *A. thaliana* vorkommenden Phototropine (phot1 & phot2) weisen stark unterschiedliche Sensitivitäten ihrer Sensordomänen auf und decken somit einen großen Bereich an Fluenzraten ab (Aihara et al., 2008; Christie et al., 1998; Huala et al., 1997; Sakai et al., 2001): phot1 ist sowohl unter

geringen als auch unter hohen Fluenzraten aktiv, wohingegen phot2 nur Starklicht-Antworten steuert.

Phototropine sowie die Mitglieder der Zeitlupe-Familie zeichnen sich alle durch das Vorkommen einer LOV- (*Light Oxygen Voltage*) Domäne aus und werden demnach als LOV-Sensor-basierte Photorezeptoren zusammengefasst (Möglich et al., 2010; Suetsugu and Wada, 2013). Phototropine besitzen zwei LOV-Domänen mit jeweils einem Molekül nicht-kovalent gebundenem FMN als Chromophor (Abbildung 1). Diese beiden Domänen bilden zusammen die N-terminale Sensordomäne, gefolgt von einer C-terminalen Serin/Threonin-Kinase-Domäne.

Die Photoaktivierung der an der Plasmamembran lokalisierten Phototropine erfolgt, indem nach Blaulichtabsorption des FMNs durch eine lichtinduzierte kovalente Thioether-Brücke zwischen einem konservierten Cys der LOV-Domäne und dem Chromophor Konformationsänderungen im Apoprotein induziert werden (Christie et al., 1998; Crosson and Moffat, 2002; Fedorov et al., 2003; Halavaty and Moffat, 2007; Sakamoto and Briggs, 2002). Indem die kovalente Bindung zwischen Kofaktor und Apoprotein beim Übergang des FMNs in den Grundzustand wieder gelöst wird, ist diese Photoaktivierung reversibel (Salomon et al., 2000). Die photoaktivierten Phototropine entfalten schließlich ihre C-terminale Kinase-Domäne und sind somit zugänglich für ATP. Nachfolgend wird die Signaltransduktionskaskade gestartet, bei der es zunächst zur Autophosphorylierung im Kinase-Aktivierungs-*Loop* des Proteins kommt (Inoue et al., 2011, 2008). Die auf diese Weise aktivierten Phototropine initiieren unterschiedliche Reaktionskaskaden, die in den physiologischen Antworten Phototropismus, Chloroplastenbewegung und Öffnen der Stomata resultieren.

Die Phototropin-abhängige Öffnung der Stomata ist eine ihrer am besten charakterisierten Signalwege (Christie et al., 2015; Inoue et al., 2011). Hierbei werden H⁺-ATPasen an Zellmembranen der Schließzellen aktiviert. Diese Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung an speziellen Aminosäure-Resten und dem Binden von 14-3-3 Proteinen an den C-Terminus der H⁺-ATPasen (Kinoshita and Shimazaki, 2002). Die Phosphorylierung der H⁺-ATPasen wird mutmaßlich durch Schließzellen-spezifische Kinasen, den *Blue Light Signaling 1* Proteinen (BLUS1), realisiert. Diese wiederum werden von phot1 und phot2 durch Phosphorylierung aktiviert (Takemiya et al., 2013). Als Antwort auf die Aktivierung der H⁺-ATPasen kommt es zum K⁺-Import in die Schließzellen (Shimazaki et al., 2007), welcher zur Turgorerhöhung und somit zum Anschwellen der Schließzellen und in weiterer Folge zur Öffnung der Stomata führt.

Bei unilateraler Bestrahlung von Sprossen, die Phototropismus auslöst, kommt es zu einem Phosphorylierungsgradienten der Phototropine, wodurch sich letztlich ein lateraler

Auxingradient aufbaut (Christie, 2007). Als phot1-interagierendes Protein konnte NPH3 (*non-phototropic hypocotyl*) identifiziert werden (Lariguet et al., 2006; Liscum and Briggs, 1996, 1995). Dieses ist für die Induktion des lateralen Auxingradienten sowie die anschließende phototrope Krümmung unabdingbar. Einen weiteren, für den Phototropismus wichtigen Signalpartner der Phototropine stellen *Phytochrome Kinase Substrate* (PKS)-Proteine dar, die mit NPH3 und phot1 interagieren (Lariguet et al., 2006). Der daran anschließende Aufbau des Auxingradienten wird maßgeblich durch Umverteilung von PINs, einer Proteinfamilie von *Auxin Efflux Carriern*, realisiert (Friml et al., 2002; Noh et al., 2003).

1.1.2.2. Zeitlupe-Familie

Die Zeitlupe-Proteinfamilie wird in *A. thaliana* von ZEITLUPE (ZTL); FKF1 (*Flavin-binding Kelch repeat, E box*) und LKP2 (*LOV Kelch Protein 2*) repräsentiert (Nelson et al., 2000; Schultz et al., 2001; Somers et al., 2000). Im Gegensatz zu Phototropinen weisen diese Photorezeptoren jeweils nur eine LOV-Domäne auf (Abbildung 1).

Detaillierte Reaktionsmechanismen dieser Photorezeptoren sind noch teilweise unbekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass diese eine zentrale Rolle beim Photoperiodismus und der Kontrolle der circadianen Uhr spielen: Der durch ZTL induzierte lichtgetriebene Abbau von CDFs (*CYCLING DOF FACTORS*) führt zu deren circadianem Expressionsprofil. In letzter Folge kommt es zur Akkumulation des Florigens *Flowering Locus T* (FT) am Ende der Lichtphase, sodass die photoperiodische Blühinduktion realisiert wird. Außerdem konnte für ZTL und LKP2 eine Funktion bei der Stabilisierung des Transkriptionsfaktors CIB1 durch die Inhibierung dessen Abbaus nachgewiesen werden. CIB1 ist wiederum an der Induktion von FT beteiligt (Liu et al., 2013) (s. Kapitel 1.3.1.2, Abbildung 5). Des Weiteren spielen die Mitglieder der Zeitlupe-Familie beim Synchronisieren der Inneren Uhr eine Rolle (Kim et al., 2007; Más et al., 2003; Sawa et al., 2007; Song et al., 2014).

1.1.2.3 UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8)

Rezeptoren zur UV-Perzeption haben in Pflanzen eine vornehmlich adaptive Funktion. Die Identifizierung des UV-B Rezeptors *UV Resistance Locus 8* (UVR8) von *A. thaliana* erfolgte in einem Screen nach UV-hypersensitiven Mutanten (Kliebenstein et al., 2002). UVR8 reguliert zahlreiche Gene, die am UV-Schutz beteiligt sind (Brown et al., 2005).

UVR8 hat keinen prosthetischen Chromophor, sondern die Absorption von Photonen erfolgt durch intrinsische Tryptophane (Christie et al., 2012; Wu et al., 2012). Als Folge dessen kommt

es zur lichtinduzierten Dissoziation zu UVR8-Monomeren und zum Kernimport des sonst cytosolisch als Homodimer vorliegenden UVR8 (Kaiserli and Jenkins, 2007). Die Monomerisierung lässt eine Interaktion mit COP1 zu, einem Schlüsselfaktor in Signalkaskaden von Photorezeptoren, die im sichtbaren Bereich arbeiten (Rizzini et al., 2011). Durch diese Interaktion wird die Expression des Transkriptionsfaktors HY5 eingeleitet, welcher zahlreiche UV-B-gesteuerten Gene reguliert (Heijde and Ulm, 2012). Die auf diese Weise von UVR8 regulierten physiologischen Antworten beinhalten neben UV-Schutz auch das Synchronisieren der Inneren Uhr (Fehér et al., 2011), Blattentwicklung (Wargent et al., 2009), Pathogenabwehr (Demkura and Ballaré, 2012) und Photomorphogenese (Favory et al., 2009).

1.2 Cryptochrom/Photolyase-Familie

Die Cryptochrome (von griechisch *kryptós*, „verborgen“ und *chróma*, „Farbe“) stellen neben den Phototropinen die zweite große Gruppe der Blaulichtrezeptoren in Höheren Pflanzen dar (Gressel, 1979). Sie wurden 1993 zuerst in *Arabidopsis thaliana* und *Sinapsis alba* identifiziert (Ahmad and Cashmore, 1993; Batschauer, 1993), wobei sich ihr Name aufgrund ihrer späten molekularen Identifizierung vom griechischen Wort *kryptós* ableitet (Sancar, 2003). Zusammen mit den Photolyasen werden sie zur Cryptochrom/Photolyase-Familie zusammengefasst, deren Mitglieder in allen drei Domänen des Lebens zu finden sind (Chaves et al., 2011). Die Cryptochrom/Photolyase-Familie vereint damit zwei Proteingruppen mit grundlegend unterschiedlichen Aufgaben, aber strukturellen Ähnlichkeiten (Abbildung 2) (Kanai et al., 1997): Auf der einen Seite stehen Photolyasen, die als blaulichtabhängige DNA-Reparaturenzyme fungieren und auf der anderen Seite Cryptochrome, die als Signalmoleküle vielfältige biologische Antworten regulieren. Eine Verbindung zwischen den beiden Proteingruppen scheint die Subgruppe der DASH-Cryptochrome darzustellen (Chaves et al., 2011).

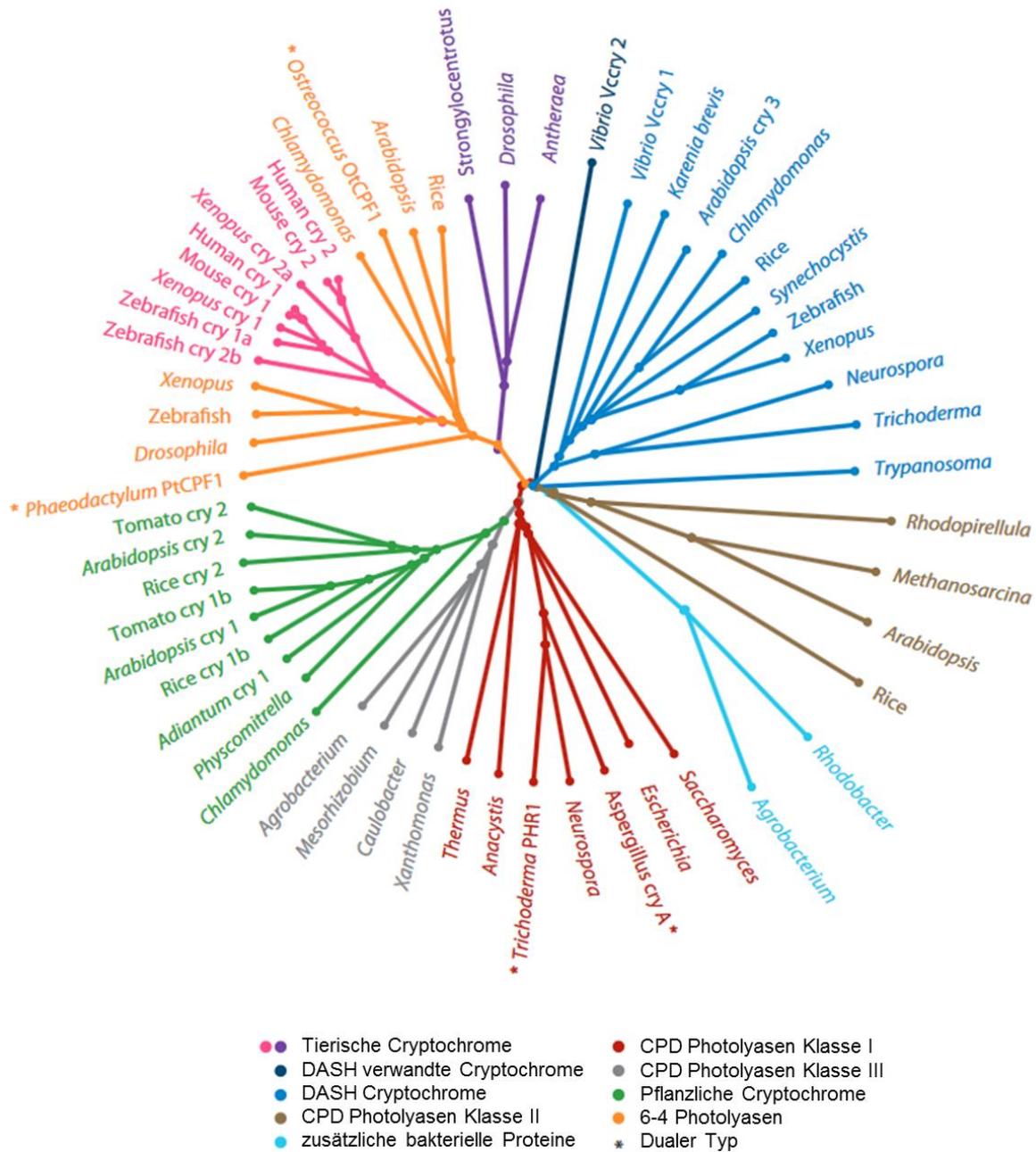


Abbildung 2: Phylogenetischer Baum der Cryptochrom/Photolyase-Familie. Die Cryptochrom/Photolyase-Familie umfasst pflanzliche Cryptochrome (grün), zwei Gruppen von tierischen Cryptochromen (pink & violett), DASH-Cryptochrome sowie DASH-Cryptochrom-verwandte Proteine (blau & dunkelblau), CPD-Photolyasen der Klassen I (rot), II (braun) und III (grau), (6-4)-Photolyasen (gelb) und zusätzliche Proteine, die eine neue Gruppen bilden (hellblau). Mitglieder, die mit einem Stern (*) markiert sind, sind zwei Gruppen zuzuordnen (z.B. sind sie phylogenetisch den CPD oder (6-4) Photolyasen zuzuordnen, aber besitzen auch Photorezeptoraktivität) (abgeändert nach Chaves et al., 2011).

1.2.1 Der Flavin-Kofaktor

Die Mitglieder der Cryptochrom/Photolyase-Familie weisen alle eine hoch konservierte PHR-Domäne (*Photolyase Homologous Region*) mit dem nicht-kovalent gebundenen FAD-Kofaktor

als Chromophor auf (Sancar and Sancar, 1984). Dieser ist essentiell für die Aktivität von Photolyasen und Cryptochromen (Hoang et al., 2008; Jorns et al., 1987; Sancar, 1990), da er sowohl für Lichtperzeption als auch für die katalytische Aktivität der Photolyasen essentiell ist. Die Photochemie des Chromophors wird dabei über die verschiedenen Redoxzustände des Flavins gesteuert (Abbildung 3). Voraussetzung für aktives Protein ist eine Reduktion des Flavins. Dies gilt sowohl für Photolyasen als auch für Cryptochrome. Photolyasen benötigen im aktiven Zustand FADH^- (Jorns et al., 1987; Payne et al., 1987), pflanzliche Cryptochrome hingegen akkumulieren das neutrale Semichinon FADH° (Banerjee et al., 2007). Bei tierischen Cryptochromen wurde anhand von dCry aus *Drosophila melanogaster* FAD° als Signalzustand des Kofaktors identifiziert (Vaidya et al., 2013). Photolyasen katalysieren die Reparatur von UV-Schäden in der DNA, was sich physiologisch als Steigerung der Überlebensrate von Zellen manifestiert (Photoreaktivierung). Cryptochrome hingegen durchlaufen einen Teilprozess der Photoaktivierung zur Bildung eines Flavin-Radikals. Im Falle von pflanzlichen Cryptochromen ist dies die Reduktion vom Grundzustand FAD_{ox} zu FADH° (Photoreduktion).

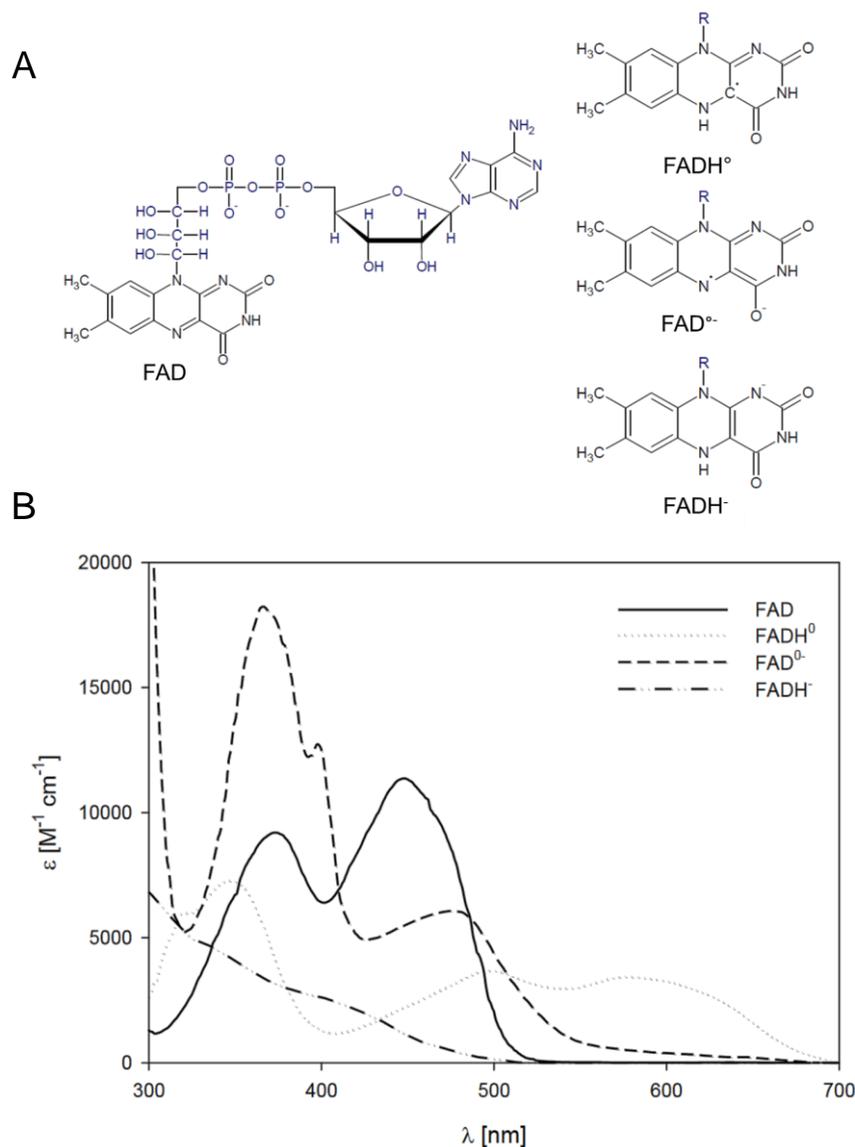


Abbildung 3: Die verschiedenen Redoxzustände des FAD und ihr Absorptionsspektrum. Oxidiert (FAD), semireduziertes Radikal (FADH[•]), anionisches Radikal (FAD^{•-}) und vollständig reduziert (FADH⁻) **(A)** und die dazugehörigen Absorptionen **(B)** (Gebhard Kaiser, 2012).

1.2.2 Photolyasen

Sonnenlicht ist für die meisten Lebewesen auf der Erde als Energie- und/oder Informationsquelle essentiell. Dass Licht aber nicht nur einen positiven Effekt auf Organismen haben kann, zeigten erstmalig Downes und Blunt Ende des 19. Jahrhunderts (Downes and Blunt, 1877). Sie führten einfache Bestrahlungsversuche mit Bakterien durch, indem sie Zuckerlösungen entweder im Dunkeln hielten oder dem Sonnenlicht aussetzten. Dabei zeigten die Dunkelkontrollen rasches Eintrüben durch Bakterienwachstum, wohingegen die bestrahlten Zuckerlösungen klar blieben. Heute ist bekannt, was das Abtöten der

Mikroorganismen bewirkt hat: Der UV-Anteil des Sonnenlichts führte zu letalen Modifikationen der Nukleinsäuren. Dementsprechend kommen in allen Lebewesen Schutzmechanismen vor, um diesen Schäden vorzubeugen. Ende der 1940er Jahre wurde dabei auch erstmals der positive Effekt von Weißlicht nach UV-Bestrahlung entdeckt (Dulbecco, 1949; Kelner, 1949). Jahre später konnten Photolyasen als die Enzyme, die diesen Effekt der Photoreaktivierung katalysieren, identifiziert werden (Sancar and Rupert, 1978; Sancar et al., 1984) und gelten beispielsweise in *A. thaliana* als das effektivste Reparatursystem von UV-Schäden in DNA (Pang and Hays, 1991).

Die am häufigsten durch UV-Strahlung hervorgerufenen DNA-Schäden sind mit 70-80% Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere, kurz CPDs, und mit 20-30% Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukte, kurz (6-4)-Photoprodukte (Abbildung 4) (Friedberg et al., 1995).

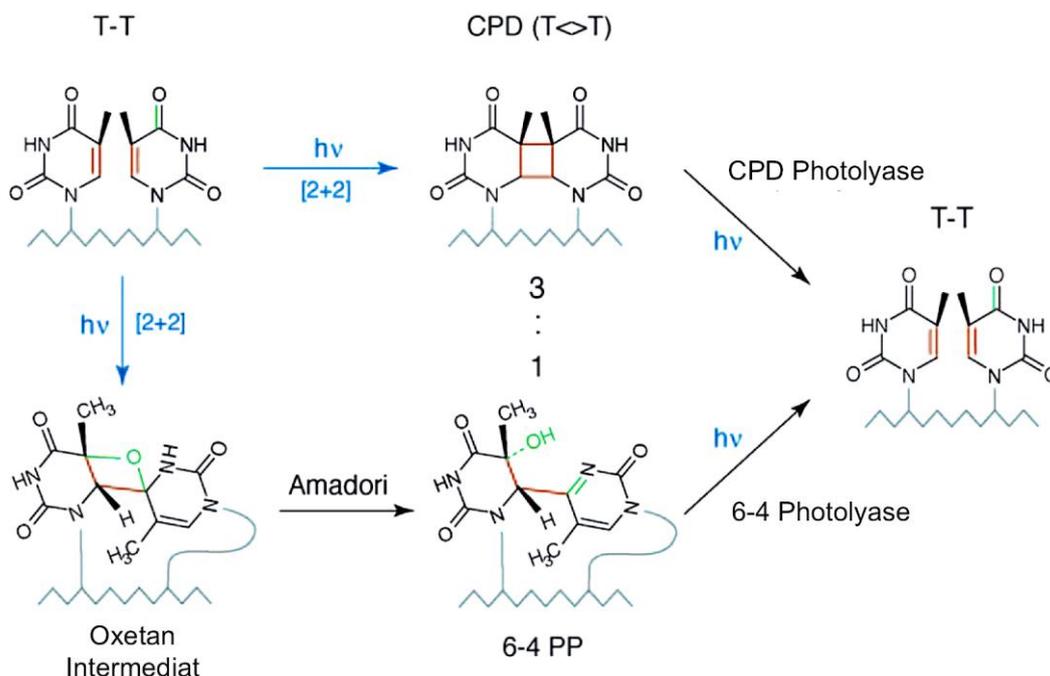


Abbildung 4: UV-induzierte DNA-Schäden und ihre Reparatur durch Photolyasen. Struktur von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) und Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukt (6-4 PP) zwischen zwei benachbarten Thyminen. Die 6-4 PP bilden sich aus einem Oxetan-Intermediat nach einer Amadori-Umlagerung. Die reaktiven Doppelbindungen, die jeweils in der [2+2]-Cycloaddition reagieren, sind in grün und braun hervorgehoben. Die Reaktion wird umgekehrt durch CPD- bzw. (6-4)-Photolyasen (abgeändert nach Essen, 2006).

Aufgrund ihrer Bedeutung als DNA-Reparaturenzyme werden Photolyasen ubiquitär in fast allen Pro- und Eukaryoten, mit Ausnahme von Plazentariern, gefunden (Sancar, 2016; Yasui et al., 1994). Photolyasen werden, abhängig von ihrem Substrat (Abbildung 4), in zwei Untergruppen gegliedert: CPD-Photolyasen, welche Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere reparieren und (6-4)-Photolyasen, die (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukte reparieren (Abbildung 2).

Innerhalb der CPD-Photolyasen wird basierend auf Sequenzanalysen zwischen drei Untergruppen differenziert (Kiontke et al., 2011): Klasse-I-CPD-Photolyasen wurden primär in Mikroorganismen identifiziert und spalteten sich wahrscheinlich evolutionär sehr früh von den Klasse-II-CPD-Photolyasen ab, welche in höheren Eukaryoten und Archeen gefunden wurden (Kanai et al., 1997). Klasse-III-CPD-Photolyasen sind hingegen relativ eng mit den pflanzlichen Cryptochromen verwandt, die eine Schwestergruppe von ihnen bilden (Abbildung 2) (Oberpichler et al., 2011; Oztürk et al., 2008). Jedoch wird davon ausgegangen, dass alle Photolyasen auf einen Urahnen zurückgehen, höchstwahrscheinlich eine CPD-Photolyase, und in der weiteren evolutionären Entwicklung die (6-4)-Photolyasen aus den Klasse-I-CPD-Photolyasen hervorgegangen sind (Todo, 1999). Neuere Daten zeigen eine weitere Gruppe von (6-4)-Photolyasen in einigen Proteobakterien, die sich durch das Vorhandensein eines Eisen-Schwefel-*Clusters* als dritten Kofaktor und einem 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin als Antennenpigment auszeichnen (Abbildung 2) (Oberpichler et al., 2011; von Zadow et al., 2016).

Generell sind Photolyasen monomere Proteine mit ca. 450 bis 550 Aminosäuren, die neben dem FAD-Kofaktor ein zweites Antennenpigment nicht-kovalent gebunden haben (Hamm-Alvarez et al., 1989). Dieses variiert innerhalb der Photolyasen verschiedener Organismen meist zwischen einem Folat (MTHF) und einem Deazaflavin (8-HDF) und ist N-terminal vom Flavin an das Protein nicht-kovalent gebunden (Sancar, 2003). Für die Photochemie ist das zweite Antennenpigment nicht essentiell, da gezeigt wurde, dass die *E. coli*-Photolyase trotz fehlenden Lichtsammelchromophors katalytisch aktiv ist (Payne and Sancar, 1990). Die Enzymaktivität ist jedoch deutlich reduziert, da die Antennenpigmente die Quantenausbeute der Photolyasen aufgrund eines breiteren Absorptionsspektrums und eines höheren Extinktionskoeffizienten als das FADH⁻ deutlich erhöhen und folglich das Aktionsspektrum der Proteine maßgeblich mitgestalten (Sancar, 2003).

1.2.2.1 Photoreaktivierung

Die Besonderheit des DNA-Reparaturmechanismus der Photolyasen ist dessen Lichtabhängigkeit. Ansonsten gleicht der Reaktionsmechanismus einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik, wobei aus Enzym (E) und Substrat (S) über den gebildeten Enzym-Substrat-Komplex (ES) ein Produkt (P) und E entlassen werden (Rupert, 1962a, 1962b). Generell ist die Bildung dieses Substrat-Enzym-Komplexes durch seine hohe Spezifität charakterisiert: Die Affinität der *E. coli*-Photolyase zu geschädigter DNA ist ungefähr um den Faktor 10^5 höher als zu intakter DNA (Husain and Sancar, 1987), wobei die Erkennung des Photoschadens über die Deformation der DNA läuft (Abbildung 4). Die Bindung des Photoschadens ist

lichtunabhängig und führt zu einer verstärkten Krümmung der DNA (Mees et al., 2004). Der CPD-Schaden wird somit aus der sonst intakten Doppelhelix herausgewunden (*Flipping Out*), um ihn in räumlich Nähe zum katalytisch aktiven FADH⁻ zu bringen (Medvedev and Stuchebrukhov, 2001). Nach Photonenabsorption durch das Antennenpigment wird die Energie strahlungslos über Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) zum Flavin weitergeleitet (Harbach et al., 2013). Es kann jedoch auch zur Absorption durch FADH⁻ selbst kommen. Das angeregte Flavin überträgt ein Elektron an das Pyrimidin-Dimer. In Folge der Elektronenaufnahme wird dieses thermodynamisch instabil; es weist nach Hückel keine $(4n+2)\pi$ -Elektronen auf (Sancar, 2003). Es kommt zur Cycloreversion des Dimers und zur Wiederherstellung der Pyrimidin-Monomere, wobei das zuvor oxidierte Flavin wieder zum FADH⁻ reduziert wird.

Bei einem (6-4)-Photoprodukt liegt aufgrund der gebildeten zusätzlichen Hydroxylgruppe eine stärkere Modifikation der DNA vor (Abbildung 4), bei der eine ausschließliche Cycloreversion nicht ausreichend ist. Nach Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes analog zu CPD-Schäden kommt es folglich zu einem anderen Reaktionsmechanismus: Durch die Beteiligung von konservierten intrinsischen Histidinen kommt es zu einer Deprotonierung der Hydroxylgruppe, sodass es über die Bildung des intermediären Ketons bzw. Oxetan-Derivats (Abbildung 4) zur Wiederherstellung der monomeren Pyrimidine kommt (Maul et al., 2008).

1.2.3 DASH-Cryptochrome

Die 2003 erstmals beschriebenen DASH-Cryptochrome (cry-DASH) stellen sowohl funktionell als auch strukturell eine mögliche Zwischenstufe zwischen Photolyasen und Cryptochromen dar. Sie sind strukturell den Photolyasen ähnlicher als den Cryptochromen, da die Cryptochrom-spezifische C-terminale Extension als Signaldomäne zumeist fehlt und sie neben Flavin MTHF als zweites Antennenpigment aufweisen. Auch in ihrer Funktion unterscheiden sie sich sehr von den klassischen Cryptochromen, wobei bis heute die genaue biologische Funktion dieser Untergruppe der Cryptochrom/Photolyase-Familie umstritten ist.

Es konnte zwar gezeigt werden, dass DASH-Cryptochrome *in vitro* in der Lage sind, CPD-Schäden in ssDNA oder *Loop*-Strukturen von dsDNA zu reparieren (Pokorny et al., 2008; Selby and Sancar, 2006), jedoch blieb ein überzeugender Nachweis der DNA-Reparaturfähigkeit von Duplex-DNA aus. Ein möglicher Grund dafür ist, dass das Enzym nicht in der Lage ist, den CPD-Schaden aus Duplex-DNA herauszuwinden, um ihn in räumliche Nähe zum katalytisch aktiven FADH⁻ zu bringen (Pokorny et al., 2008).

Für cry-DASH aus zahlreichen Organismen, einschließlich *A. thaliana* cry3, konnte *in vivo* oder heterologen Systemen keine signifikante Photolyaseaktivität nachgewiesen werden (Daiyasu et al., 2004; Froehlich et al., 2010; Kleine et al., 2003). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass die Reparaturfähigkeit von geschädigter ssDNA nur ein Relikt darstellt und die eigentliche Funktion dieser Proteingruppe die eines Photorezeptors ist (Pokorny et al., 2008; Selby and Sancar, 2006; Veluchamy and Rollins, 2008; Castrillo et al., 2013).

Für *Phycomyces* cry-DASH wurde interessanterweise gezeigt, dass es sowohl *in vitro* CPD-Schäden in dsDNA mit der gleichen Effizienz wie von ssDNA beheben kann und *in vivo* ebenfalls Photolyaseaktivität zeigt (Tagua et al., 2015). cryA ist in *Phycomyces blakesleeenanus* der einzige Vertreter der Cryptochrom/Photolyase-Familie und zeigt im Photolyase-defizienten *E. coli*-Stamm KY1225 (Akasaka and Yamamoto, 1991) vollständige Komplementation. Aus diesem Befund ist zu schließen, dass cryA in *P. blakesleeenanus* eine Schlüsselrolle bei dessen Photoreaktivierung einnimmt. Trotzdem bleibt die Frage, ob diese Photolyasefunktion eine zentrale Schlüsselrolle bei der evolutionären Weiterentwicklung der DASH-Cryptochrome darstellt oder ein Relikt eines sehr alten Vertreters dieser Proteingruppe ist (Tagua et al., 2015).

1.2.4 Tierische Cryptochrome

Auf der Suche nach Photolyase-Homologen in Tieren wurden mit den beiden menschlichen Cryptochromen hCry1 und hCry2 die ersten tierischen Cryptochrome entdeckt (Hsu et al., 1996; Todo et al., 1996). Generell werden diese entsprechend ihrer Lichtabhängigkeit in zwei Subgruppen unterteilt: Typ-I-Cryptochrome haben eine Funktion als circadiane Photorezeptoren und wurden bisher primär in Insekten wie *Drosophila melanogaster* gefunden und charakterisiert. Typ-II-Cryptochrome, die in Vertebraten vorkommen, agieren hingegen als Transkriptionsrepressoren und sind vermutlich nicht durch Licht gesteuert. Jedoch kommen in einigen Organismen Vertreter beider Klassen vor (Chaves et al., 2011). Neben ihrer Funktion als Komponenten der circadianen Uhr wird ihnen eine Rolle bei der Magnetrezeption zugesprochen (Ritz et al., 2000). Eine Schlüsseldomäne für ihre Funktion bei der Signaltransduktion ist die C-terminale Extension als Signaldomäne, die die Cryptochrome von den Photolyasen unterscheidet.

1.2.4.1 Biologische Funktion als Komponenten der circadianen Uhr

Die Funktionsweise der lichtregulierten Typ-I-Cryptochrome wurde am einzigen Cryptochrom von *Drosophila*, dCry, genetisch und *in vitro* untersucht (Emery et al., 1998; Stanewsky et al., 1998). dCry ist am Stellen der Circadianen Uhr beteiligt. Dabei interagiert es lichtabhängig mit dem intrinsischen Oszillator *Timeless* (TIM). TIM bildet mit *Period* (PER) einen Proteinkomplex und reprimiert die durch die beiden Transkriptionsfaktoren CLOCK und CYCLE gesteuerte Expression von dCry und ihrer selbst. Durch die Interaktion von TIM mit dCry kommt es zum Abbau von TIM und die Expression der CLOCK- und CYCLE-gesteuerten Gene dCry, PER und TIM wird initiiert (Stanewsky, 2002).

Knockout-Versuche mit Mäusen haben gezeigt, dass ohne die beiden Cryptochrome jegliche circadiane Rhythmik verloren ist. Somit ist bestätigt, dass diese zentrale Komponenten der circadianen Uhr sind (van der Horst et al., 1999; Vitaterna et al., 1999). Jedoch war in den Mutanten die lichtinduzierte Expression von PER1 & PER2 nicht beeinträchtigt. Damit ist auszuschließen, dass die Cryptochrome eine direkte Rolle bei der Lichtperzeption zum Stellen der circadianen Uhr innehaben (Okamura et al., 1999). Ferner wurde gezeigt, dass Melanopsin, ein Protein der Opsin-Familie, der zentrale circadiane Photorezeptor in Säugetieren ist (Lucas et al., 2003; Semo et al., 2003). Am Beispiel der beiden Cryptochrome aus *Mus musculus* lassen sich die Funktionsweisen der Typ-II-Cryptochrome erklären (Chaves et al., 2011; Ko and Takahashi, 2006): Cry1 & Cry2 wirken zusammen mit PER1 & PER2 als Repressoren der beiden Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL. Diese bilden ein Heterodimer und regulieren die Expression der Cryptochrome, dreier PER-Gene sowie weiterer oszillatorischer Faktoren. Durch die Repression von CLOCK und BMAL wird die Expression dieser Komponenten reprimiert. Neben der transkriptionellen Kontrolle werden die Uhrkomponenten zusätzlich durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung hinsichtlich Lokalisation und Stabilität beeinflusst.

1.2.4.2 Biologische Funktion bei der Magnetrezeption

Für Zugvögel wurde gezeigt, dass für die Funktionsfähigkeit des magnetischen Kompasses kurzwelliges Licht benötigt wird. Da Cryptochrome mit FADH^o einen relativ langlebigen Radikalzustand mit Lebensdauern im Millisekundenbereich akkumulieren, wird deren Funktion als putative Magnetorezeptoren diskutiert (Ritz et al., 2010, 2000; Wiltschko and Wiltschko, 2002). Diese Hypothese wird unterstützt durch Daten von Gegeer et al., die für *D. melanogaster* ein Cryptochrom-basiertes magnetosensitives System in Tieren nachwiesen (Gegeer et al., 2008), indem sie an *cry*-Mutanten zeigten, dass diese im Gegensatz zum Wildtyp

nicht mehr auf ein äußeres Magnetfeld reagieren können. Für pflanzliche Cryptochrome ist eine Beteiligung an der Magnetorezeption hingegen äußerst umstritten (Ahmad et al., 2007; Harris et al., 2009).

1.3 *A. thaliana* Cryptochrom 2

1993 wurden die ersten Cryptochrome in Pflanzen identifiziert (Ahmad and Cashmore, 1993; Batschauer, 1993). Zwar wurde schon in den späten 1970er Jahren für einen putativen Blaulichtrezeptor die Bezeichnung „Cryptochrom“ eingeführt (Gressel, 1979) und Koornneff et al. (1980) identifizierten mit der *hy4*-Mutante eine *Arabidopsis*-Mutante mit defizienter Blaulichtantwort: Die Keimlinge dieser Mutante blieben unter Blaulichtbedingungen im Gegensatz zum Wildtyp lang, nicht aber unter anderen Lichtbedingungen (Rot, Dunkelrot, Dunkel). Doch erst 1993 wurde das zum HY4-Locus korrespondierende *CRY1*-Gen identifiziert: Ahmad und Cashmore führten Screens von T-DNA-Linien durch und identifizierten eine Linie, die den gleichen Phänotyp wie die zuvor beschriebene *hy4*-Mutante zeigte. Die Sequenzanalysen des Gens ergaben starke Homologien zu bakteriellen Photolyasen. Mehrere Monate zuvor wurde im selben Jahr bereits ein Cryptochrom von *Sinapsis alba* beschrieben (Batschauer, 1993) und weitere drei Jahre später gelang die Identifizierung des zweiten pflanzlichen Cryptochroms (*cry2*) aus *A. thaliana* (Hoffman et al., 1996).

1.3.1 Biologische Funktion und Signaltransduktion

cry2 ist neben *cry1* eines der beiden klassischen Cryptochrome in *Arabidopsis thaliana*. Das dritte, *cry3*, ist aufgrund seiner Struktur und Funktion nicht den klassischen, sondern den DASH-Cryptochromen zuzuordnen (Kleine et al., 2003). *cry1* und *cry2* zeichnen sich sowohl durch unterschiedliche, als auch durch überlappende Funktionen bei der Entwicklung der Pflanze aus (Ahmad et al., 1998). Dabei ist der grundlegende molekulare Mechanismus dieser Prozesse das Steuern von differentieller Genexpression der Cryptochrome (Kleine et al., 2007; Ohgishi et al., 2004).

1.3.1.1 Subzelluläre Lokalisation

Cryptochrom 1 und 2 sind beide primär nukleäre Proteine (Cashmore et al., 1999; Guo et al., 1999), wobei nur cry2 ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist (Kleiner et al., 1999; Yu and Lin, 2008). Für cry2 wurde auch eine *Nuclear Localization Sequence* (NLS) innerhalb der C-terminalen Extension des Proteins beschrieben (Kleiner et al., 1999). cry1 hingegen ist auch im Cytoplasma nachweisbar, wobei ein Zusammenhang zwischen biologischer Funktion und subzellulärer Lokalisation des Proteins gezeigt werden konnte (Wu and Spalding, 2007). Diesbezüglich wurde für cry1 analog zu Phytochromen (s. Kapitel 1.2.1) auch eine lichtinduzierte Lokalisationsänderung nachgewiesen. Jedoch ist diese konträr zu Phytochromen: Yang *et al.* (2000) zeigten, dass GUS-Fusionen des Cryptochrom 1 C-Terminus (CCT1) in Dunkelheit ausschließlich im Kern nachweisbar waren, wohingegen in Licht angezogene Pflanzen auch Signal im Cytoplasma zeigten.

1.3.1.2 Photoperiodische Blühinduktion

Die exakte Festlegung des Blühzeitpunktes ist für eine bestmögliche pflanzliche Fitness und das Überleben der Nachkommen essentiell. *A. thaliana* als fakultative Langtagpflanze blüht frühzeitig unter Langtagbedingungen, wohingegen sie unter Kurztagbedingungen ein verspätetes Blühverhalten zeigt (Coupland, 1995). Schon Mitte der 1960er Jahre kamen diesbezüglich Modelle auf, die als zentrale Komponente dieses Photoperiodismus in Langtagpflanzen die circadiane Oszillation von positiven Regulatoren während der Lichtperiode sahen (Pittendrigh, 1964). Diese photoperiodische Blühinduktion ist eine der Hauptfunktionen von cry2. Schon vor der genauen molekularen Identifikation beschrieben Koornneef et al. (1991) unter Langtagbedingungen spätblühende *A. thaliana*-Mutanten. Diese trugen jeweils durch EMS (Ethylmethansulfonat) oder Röntgenstrahlung induzierte Mutationen innerhalb des *fla*-Locus, welcher später dem Gen *CRY2* zugeordnet werden konnte (Guo et al., 1998). Dabei konnte durch den spätblühenden Phänotyp der *cry2*-Mutanten unter Langtagbedingungen gezeigt werden, dass cry2 eine Schlüsselrolle bei der photoperiodischen Blühinduktion spielt. Weitere Forschungen ergaben, dass cry2 analog zur Theorie von Pittendrigh die Akkumulation des Transkriptionsfaktors CONSTANS (CO) am Ende des Langtags (LT) triggert (Valverde et al., 2004). CO wirkt folglich *downstream* von cry2 und aktiviert die Transkription des Florigens *FLOWERING LOCUS T* (FT) (Davis, 2002; Kardailsky et al., 1999; Putterill et al., 1995; Simon et al., 1996). FT zeigt in weiterer Folge der circadianen cry2-gesteuerten Akkumulation von CO ebenfalls eine diurnale Expression mit einem Maximum am Ende der Lichtphase (Endo et al., 2007).

Am Tagesende kommt es zunächst zur verstärkten Akkumulation des Proteins GIGANTEA (GI) und des Blaulichtrezeptors FKF1 (s. Kapitel 1.2.2.2) (Sawa et al., 2007). Diese induzieren als Heterodimer die Degradation der Transkriptionsrepressoren *CYCLING DOF FACTORS* (CDFs), welche an Promotoren von *FT* und *CO* binden (Fornara et al., 2009). Basis für die *cry2*-gesteuerte Akkumulation von *CO*, die schließlich zur Expression von *FT* und damit zur photoperiodischen Blühinduktion führt, ist die stabile Proteinmenge von *cry2* am Ende der Lichtphase (Lin, 2002; Mockler et al., 1999): Im KT oszilliert die Proteinmenge und es kommt nicht zur *cry2*-gesteuerten Blühinduktion. Im LT hingegen ist das *cry2*-Level auch am Ende der Lichtphase hoch. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Regulation der *cry2*-Proteinmenge nur marginal durch die Expression, sondern größtenteils über den Abbau reguliert wird (Harmer et al., 2000). Das hohe *cry2*-Level am Ende der Lichtphase führt dazu, dass das *CO*-Level stabilisiert wird, indem dessen Degradation durch *COP1* und *SPAs* inhibiert wird (Jang et al., 2008; Laubinger et al., 2006). Dies ist durch eine Interaktion von *cry2* mit *SPA1* bedingt (Zuo et al., 2011). Das resultierende hohe Proteinlevel von *CO* führt zur Induktion der *FT*-Expression (Song et al., 2013). Dieses wird zusätzlich durch *cry2* zusammen mit *ZTL* und *LKP2* kontrolliert, indem diese die Proteinlevel der *cry2*-interacting *bHLH* proteins (*CIBs*) stabilisieren (Liu et al., 2008; H. Liu et al., 2013), welche ebenfalls als Transkriptionsfaktoren die *FT*-Expression positiv regulieren (Liu et al., 2013). Endo et al. (Endo et al., 2007) zeigten dabei durch Expression von *CRY2* unter Kontrolle von Gewebe- und Organ spezifischen Promotoren, dass für die Funktionsweise von *cry2* bei der photoperiodischen Blühinduktion dessen Expression in den Phloemgeleitzellen essentiell ist. Eine Überexpression von *cry2* führt jedoch zu keinem geänderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp (Guo et al., 1998).

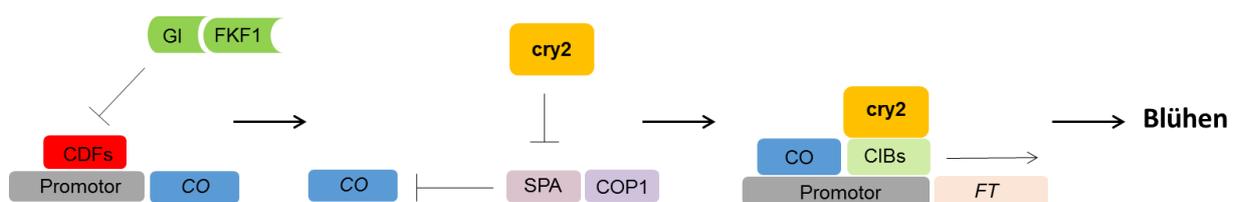


Abbildung 5: *cry2*-regulierte photoperiodische Blühinduktion in *A. thaliana*. Unter Langtagbedingungen führt am Tagesende das Dimer aus GIGANTEA (GI) und FKF1 (*Flavin-binding Kelch repeat, E box*) zur Expression von *CO* (Constans) durch Degradation der Repressoren CDFs (*CYCLING DOF FACTORS*). Gleichzeitig führt das erhöhte *cry2*-Level zur Stabilisierung des *CO*-Levels durch Inhibition dessen Abbaus von *SPAs* und *COP1*. Sowohl *CO* als auch *cry2* initiieren die *FT*- (*Flowering Locus T*) Expression durch Binden an dessen Promotor als Komplex mit *CIBs* (*cry2*-interacting *bHLH* proteins), was letztlich zur Blühinduktion führt.

Versuche mit *cry2*- und *phy*-Mutanten sowie *cry2/phyB*-Doppelmutanten von *A. thaliana* unter verschiedenen Lichtbedingungen haben gezeigt, dass Phytochrom B als Antagonist von *cry2* agiert (Guo et al., 1998; Mockler et al., 1999). *phyB* steuert die rotlichtabhängige Inhibition

der Blühinduktion, wohingegen *cry2* blaulichtabhängig die inhibierende *phyB*-Antwort unterdrückt. Dementsprechend kommt es abhängig von den Lichtbedingungen zu einem Gleichgewicht der *phyB*- und *cry2*-getriggerten Signalwege.

Neben *cry2* scheint auch *cry1* eine Beteiligung bei der Blühinduktion zu haben, da *cry1cry2*-Doppelmutanten unter kontinuierlichem Blaulicht später blühen als die *cry2*-Einzelmutante (Mockler et al., 2003). Andere unabhängige Versuche bestätigten dies oder machten gegenteilige Beobachtungen, sodass die Rolle von *cry1* bei der Blühinduktion nicht vollständig geklärt ist (Bagnall et al., 1996; Blázquez et al., 2003; Mockler et al., 1999; Zagotta et al., 1996). Unterstützt wird eine Beteiligung von *cry1* an der Blühinduktion mit dem Fund eines hyperaktiven *cry1*-Allels, welches für ein Protein mit einer Punktmutation (*cry1* L407F) kodiert (Exner et al., 2010). *A. thaliana* mit diesem Allel zeigt sowohl im Kurz- als auch im Langtag ein frühzeitiges Blühverhalten im Vergleich zum Wildtyp.

1.3.1.3 Photomorphogenese

Der Prozess der Photomorphogenese dient der bestmöglichen Anpassung der Keimlinge an ihre Umgebung. Die mit diesem Begriff zusammengefassten Prozesse sind die Inhibierung des Hypokotylstreckenwachstums sowie die Ergrünung und Öffnung der Kotyledonen (Chory, 1997; McNellis and Deng, 1995). Neben den Phytochromen (s. Kapitel 1.2.1) ist Cryptochrom 1 der primäre Photorezeptor zur Steuerung dieser Prozesse (Ahmad and Cashmore, 1993; Koornneef et al., 1980; Lin et al., 1995b, 1995a). Doch auch *cry2* konnte eine Funktion bei der Photomorphogenese nachgewiesen werden: Unter Schwachlicht ($< 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) zeigen *cry2*-Mutanten einen signifikanten Unterschied zum Wildtyp hinsichtlich Kotyledonenöffnung und Hypokotyllänge. Versuche mit Doppelmutanten bestätigten, dass *cry1* und *cry2* bei der Deetiolerung redundant agieren (Ahmad et al., 1998). Die Grundlage für die biologische Funktion der beiden Cryptochrome bei unterschiedlichen Lichtintensitäten ist die unterschiedliche Lichtstabilität der beiden Photorezeptoren: *cry1* ist lichtstabil, wohingegen *cry2* lichtlabil ist (Lin et al., 1998; Yu et al., 2009).

Für beide Cryptochrome kommt es im Gegensatz zu ihrer Funktion bei der Blühinduktion bei der Photomorphogenese zu einem Dosis-abhängigen Effekt. Dementsprechend zeigen *CRY1*- oder *CRY2*-überexprimierende Pflanzen ein kürzeres Hypokotyl als der entsprechende Wildtyp (Lin et al., 1998, 1996, 1995a).

Ein wichtiger Aspekt für die Signaltransduktion der pflanzlichen Cryptochrome ist deren Interaktion mit COP1 (*constitutive photomorphogenic 1*) über die CTE (Wang et al., 2001; Yang

et al., 2001). COP1 ist ein Zinkfinger-Protein, das maßgeblich daran beteiligt ist, die pflanzliche Photomorphogenese zu unterdrücken (Deng et al., 1992). COP1-defiziente *A. thaliana*-Keimlinge zeigten auch in Dunkelheit einen Phänotyp als seien sie in Licht gewachsen (Wei and Deng, 1996). Dies erreicht COP1, indem es in der Abwesenheit von Licht die Proteolyse von positiven Elementen der Photomorphogenese wie dem bZIP-Transkriptionsfaktor HY5 steuert (Oyama et al., 1997). Die Induktion des proteasomalen Abbaus von HY5 erzielt COP1 durch dessen Ubiquitinierung mit Hilfe anderer Faktoren des so genannten CDD-Proteinkomplexes (Yi and Deng, 2005). Dabei ist COP1 in Dunkelheit konstitutiv im Zellkern lokalisiert und wird lichtabhängig ins Cytoplasma transportiert (von Arnim et al., 1997; Holm and Deng, 1999; Stacey et al., 2000), wobei ausschließlich im Zellkern lokalisiertes Protein aktiv ist (Subramanian et al., 2004). Wenn COP1 im Licht durch die Interaktion mit cry1/2 inaktiviert ist, wird das konstitutiv nukleäre HY5 akkumuliert, kann an Promotoren von lichtgesteuerten Genen binden und deren Expression initiieren (Chattopadhyay et al., 1998). Versuche mit transgenen Keimlingen konnten diesbezüglich eine direkte Korrelation zwischen HY5-Level und dem Ausmaß der biologischen Antwort zeigen (Osterlund et al., 2000).

1.3.2 Struktur

Cryptochrom 1 und 2 setzen sich grundlegend aus zwei Hauptdomänen zusammen: Die N-terminale *Photolyase Homologous Region* (PHR) mit nicht-kovalent gebundenem Flavin-Kofaktor sowie die C-terminale Extension, die Cryptochrome von Photolyasen und DASH-Cryptochromen unterscheidet. Als zweites Antennenpigment ist MTHF in der Diskussion (Malhotra et al., 1995). Für cry2 ist bis heute weder von der PHR-Domäne, noch von der Vollängenversion des Proteins eine Kristallstruktur verfügbar. Lediglich für cry1 wurde die PHR-Domäne erfolgreich kristallisiert und die Struktur gelöst. Aufgrund der starken sequenziellen Ähnlichkeit zwischen den PHR-Domänen von cry1 und cry2 (s. Anhang A1) kann von dieser vereinfacht auf die Struktur von cry2 geschlossen werden (Hoffman et al., 1996).

1.3.2.1 PHR-Domäne mit Flavin-Kofaktor

Die PHR-Domäne von cry1 ist in zwei Subdomänen unterteilt: Die N-terminale α/β -Domäne (13-139) und die C-terminale α -Domäne (217-495), welche den Kofaktor FAD bindet (Abbildung 6) (Brautigam et al., 2004). Dabei umschließt die α/β -Domäne eine fünfteilige β -Faltblattstruktur, die von vier α -Helices und einer 3_{10} -Helix umgeben ist. Die Verbindung zur C-terminalen Domäne schafft dabei eine Verbindungsregion, die nur marginal über geordnete

Regionen verfügt. Die C-terminale α -Domäne umfasst mit 14 α -Helices und zwei 3_{10} -Helices keine β -Faltblätter. Zwischen einem Cysteinrest der Verbindungsregion und einem weiteren Cystein der N-terminalen Subdomäne wurde in der Kristallstruktur eine Disulfidbrücke detektiert. Ob sich diese *in vivo* ausbildet, ist unklar (Brautigam et al., 2004).

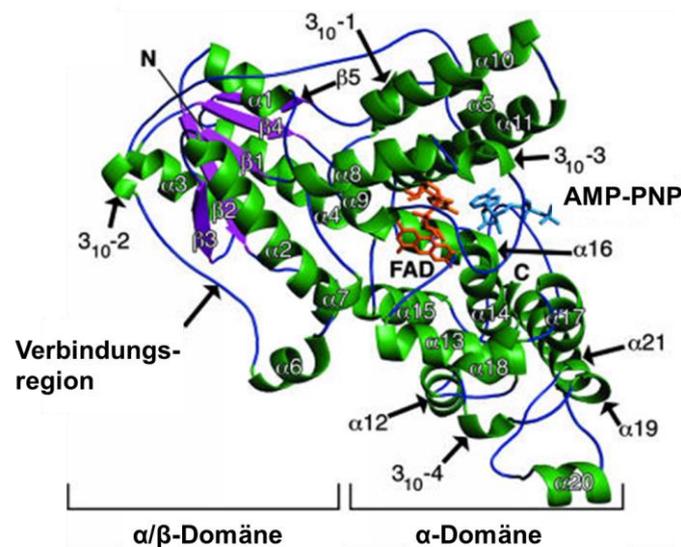


Abbildung 6: Struktur der cry 1 PHR-Domäne. Die PHR-Domäne ist in die α/β - und die α -Subdomäne unterteilt. Farbgebung: grün, α -Helices; violett, β -Faltungen; dunkelblau, Loop Regionen; orange, FAD-Kofaktor; hellblau, AMP-PNP, welches in der nativen Struktur nicht gebunden war (modifiziert nach Brautigam et al., 2004).

Der Flavin-Kofaktor ist in einer U-förmigen Konformation assoziiert, die in allen Photolyasen, Cryptochromen sowie DASH-Cryptochromen vorkommt. Dabei ragt nur ein Teil des Kofaktors über die Oberfläche des Apoproteins heraus. Diese FAD-Bindetasche weist auf der einen Seite größtenteils hydrophobe Aminosäurereste auf und ist auf der anderen Seite mit positiv geladenen und polaren Aminosäuren ausgekleidet. (Brautigam et al., 2004).

Obwohl in früheren Studien teilweise MTHF als zweiter Kofaktor der Cryptochrome detektiert wurde, wurde dessen Bindung in der Kristallstruktur von cry1 nicht bestätigt. Eine mögliche Erklärung ist, dass MTHF bei der Aufreinigung vom Apoprotein gelöst wurde. Aber auch die nachträgliche Inkubation der Kristalle mit MTHF war nicht erfolgreich war.

1.3.2.2 Cryptochrom C-Terminus (CCT)

Die C-terminale Extension (CCE) bildet die zweite Hauptdomäne der Cryptochrome. Sie ist im Gegensatz zur PHR-Domäne kaum strukturiert und variiert hinsichtlich Länge und Sequenz sehr stark zwischen den einzelnen Cryptochromen (Partch et al., 2005). Trotz dieser

Sequenzunterschiede weisen alle Cryptochrome mit dem DAS-Motiv eine Gemeinsamkeit innerhalb des C-Terminus auf. Diese fasst drei Motive (DQXVP – Asp/Glu – STAES) zusammen, die in entsprechender Abfolge in allen pflanzlichen Cryptochromen hoch konserviert sind (Lin, 2002). Die Flexibilität des C-Terminus ist möglicherweise der Grund dafür, dass bis heute für kein pflanzliches Cryptochrom eine Kristallstruktur der Vollängenversion gelöst werden konnte.

Die Expression von CCT-GUS-Fusionen in transgenen Pflanzen führt zu einem *cop*-Phänotyp. Es wurde geschlussfolgert, dass die C-terminale Extension wichtig für die Signalweiterleitung ist: Viele Proteininteraktionen verlaufen über den C-Terminus der Cryptochrome (Wang et al., 2001; Yang et al., 2001). Dabei ist das aktuelle Model, dass dieser in der Abwesenheit von Licht an die PHR-Domäne andockt. Durch die Absorption von Blaulicht kommt es zu einer Konformationsänderung des C-Terminus, wodurch sich dieser von der PHR-Domäne löst und für Interaktionspartner zur Verfügung steht (Partch et al., 2005).

1.3.3 Aktivierungs- und Signalmechanismus

Cryptochrome durchlaufen eine Aktivierungskaskade bis sie ihren signalaktiven Zustand erreicht haben. Der erste Schritt ist die Photoreduktion von FAD. Die Akkumulation dieses *Lit States* des Flavins ist essentiell für die nachfolgenden Schritte. Erst dann folgen Konformationsänderungen und Phosphorylierung der Cryptochrome. Danach kann schließlich die Interaktion mit Signalpartnern erfolgen und *Downstream*-Reaktionskaskaden initiiert werden. Im Gegensatz zu *cry1* ist bei *cry2* die blaulichtinduzierte Degradation ein wichtiger Aspekt seiner Funktion.

1.3.3.1 Photoreduktion und Photozyklus

Die Photoreduktion des Flavin-Kofaktors kommt in allen pflanzlichen Cryptochromen vor und gilt als deren primärer Aktivierungsmechanismus, was von zahlreichen Forschergruppen in unabhängigen Experimenten bestätigt wurde (u.a. Ahmad, 2016; Ahmad et al., 2002; Banerjee et al., 2007; Bouly et al., 2007; Burney et al., 2012; Herbel et al., 2013). Dabei konnte gezeigt werden, dass der im Dunkeln akkumulierte Grundzustand des Flavins die oxidierte Form ist. Nach Belichtung mit Blaulicht kommt es in pflanzlichen Cryptochromen zur Akkumulation von FADH° und FADH^- , mit FAD° als kurzlebiger Zwischenstufe (Müller, et al., 2014). FADH° und FADH^- reoxidieren in Abwesenheit von Licht innerhalb von wenigen Minuten wieder zum FAD

(Abbildung 7). Nur einer dieser Redoxzustände, im Fall der pflanzlichen Cryptochrome FADH° , ist der *Lit State* des Flavins (Banerjee et al., 2007).

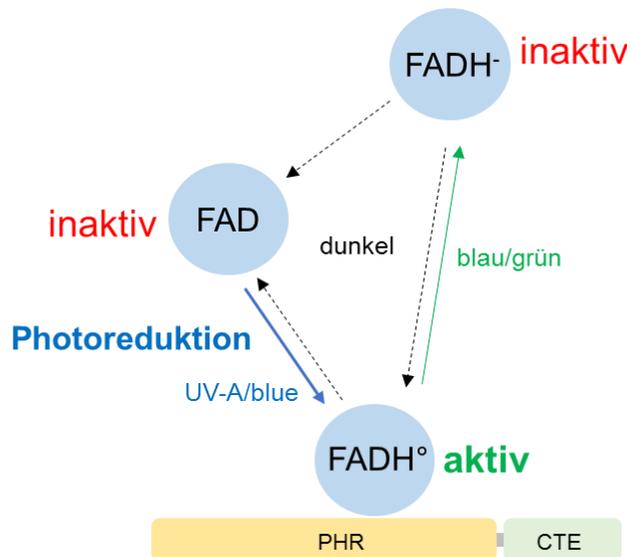


Abbildung 7: Photozyklus des Flavin-Kofaktors in pflanzlichen Cryptochromen. Der Grundzustand des Flavins ist die oxidierte Form, welche nach Bestrahlung mit Blaulicht in die aktive semireduzierte Form, FADH° , übergeht. Diese liegt im Äquilibrium mit dem signalinaktiven FADH^- vor. Auch Bestrahlung mit Grünlicht führt zur Akkumulation dieser inaktiven Form. In Dunkelheit kommt es zur Reoxidation und damit zur Anreicherung von FAD_{ox} (nach Bouly et al., 2007).

Der Photozyklus pflanzlicher Cryptochrome (Abbildung 7) konnte durch spektroskopische und physiologische Versuche nachgewiesen werden. Das Aktionsspektrum der Cryptochrome *in planta* korreliert mit dem Absorptionsspektrum des oxidierten FAD (Abbildung 3) (Ahmad et al., 2002). Bestätigt werden diese *in vivo*-Befunde mit Analysen des aufgereinigten Holoproteins. Dieses zeigt im Dunkeln das Absorptionsspektrum des FAD_{ox} (Abbildung 3) (Bouly et al., 2007; Lin et al., 1995b; Malhotra et al., 1995; Zeugner et al., 2005). Nach Bestrahlung von Cryptochrom mit Blaulicht kann die Photoreduktion spektroskopisch verfolgt werden. Die Absorption des oxidierten FAD nimmt ab, wobei sich zeitgleich eine metastabile Redoxspezies anreichert, die als alleinige Redoxspezies von FAD im längerwelligen Spektrum über 500 nm absorbiert (Abbildung 3). Bestätigt wurde die Bildung des semireduzierten Radikals als Folge von Blaulichtbestrahlung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit *CRY*-überexprimierenden Insektenzellen durch EPR-Spektroskopie (Bouly et al., 2007; Lin et al., 1995b). Mittels Experimenten *in planta* konnte bekräftigt werden, dass es sich mit dem FADH° um den *Lit State* des Flavins handelt (Giovani et al., 2003; Lin et al., 1995b). *In planta* und *in vitro* wurden annähernd gleiche Lebensdauern des Flavin-Signalzustandes mit 5 min (*cry1*) und 16 min (*cry2*) *in planta* (Herbel et al., 2013) bzw. 3-4 min *in vitro* für *cry1* und *cry2* bestimmt (Banerjee et al., 2007; Bouly et al., 2007; Müller and Ahmad, 2011). Diese relative

Langlebigkeit des Radikalzustandes ist damit zu begründen, dass das Protein lang genug im aktiven Zustand verweilen muss, um durch die Interaktion mit Signalpartnern Signalkaskaden anzuschalten. Mit simultaner Bestrahlungen von Keimlingen mit Grün- und Blaulicht konnte nachgewiesen werden, dass Grünlicht einen antagonistischen Effekt auf die Cryptochrom-Antwort hat. Diese bichromatisch bestrahlten Keimlinge zeigten u.a. deutlich längere Hypokotyle als Keimlinge, die nur mit Blaulicht bestrahlt worden waren. Ein ähnlicher Effekt ist mit der gleichzeitigen Bestrahlung mit Weiß- und Grünlicht beobachtet worden (Bouly et al., 2007). Dies ist damit zu erklären, dass der Signalzustand des Flavins in einen anderen, inaktiven Zustand übergeht. Eine mögliche biologische Funktion dieser konträren Wirkung von Blau- und Grünlicht auf die Aktivität der Cryptochrome könnte ähnlich zum Phytochrom-vermittelten *Shade Avoidance Syndrome* (Faigón-Soverna et al., 2006) in der bestmöglichen Adaptation an die Umgebung begründet sein. Eine Veränderung des Spektrums durch Nachbarpflanzen führt aufgrund der Grünlücke des Chlorophylls zu einer Anreicherung des Lichts im grünwelligen Spektrum (Franklin and Whitelam, 2005; Vandenbusche et al., 2005). Als Schattenvermeidungsreaktion könnte es diesbezüglich überlebenswichtig für dort wachsende Keimlinge sein, die deetiolerierende Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums zu umgehen (Bouly et al., 2007).

Es ist davon auszugehen, dass das semireduzierte Radikal, wenn es angeregt wird, weiterreagiert zur inaktiven vollständig reduzierten Form, FADH^- . *In vitro*-Versuche mit cry1 haben gezeigt, dass die Reoxidierung des FADH° zum FAD_{ox} signifikant verlangsamt ist, wenn zuvor mit Grünpulsen bestrahlt wurde. Somit liegt es nahe zu vermuten, dass es bei Bestrahlung mit Grünlicht zu einer Reduktion des FADH° kommt. Jedoch konnte von FADH^- weder ein Nachweis *in planta*, noch unter aeroben Bedingungen erfolgen (Bouly et al., 2007). Grund dafür könnte dessen Kurzlebigkeit sein. Da FADH° aber nicht nur im Spektrum über 500 nm eine starke Absorption zeigt, sondern auch im kürzerwelligen Bereich des Lichts absorbiert, ist davon auszugehen, dass schon nach Blaulichtbestrahlung ein Äquilibrium an FADH° und FADH^- vorliegt, welches durch weitere Bestrahlung mit Blau- oder Grünlicht stark auf die Seite der vollständig reduzierten Spezies, FADH^- , verschoben wird.

Neuere *in vivo*- und *in vitro*-Studien deuten darauf hin, dass Cryptochrome über die Reoxidation von FADH° und FADH^- zu FAD_{ox} an der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind (Consentino et al., 2015; van Wilderen et al., 2015). Diesbezüglich wird eine Funktion dieser ROS an der Cryptochrom-gesteuerten Signaltransduktion vermutet (Müller and Ahmad, 2011; Wiltschko et al., 2016).

Bezüglich der Akkumulation des FADH° ist eine direkte Reduktion des Flavins durch externe Reduktionsmittel aufgrund der Redoxpotentiale des zellulären Milieus sowie des Redoxpaares $\text{FAD}_{\text{ox}}/\text{FADH}^\circ$ auszuschließen (Liu et al., 2010). Diesbezüglich wurde zuerst für die *E. coli*-Photolyase die Rolle von intrinsischen Tryptophanen als Elektronendonoren postuliert (Li et al., 1991). Dieses Modell wurde später auf die so genannte Tryptophan-Triade als Elektronentransportkette ausgeweitet (Aubert et al., 2000). Dabei wird bei Photolyasen die Reduktion des im katalytisch inaktiven Zustand akkumulierten FADH° erzielt, indem drei Tryptophane des Apoproteins als Elektronendonoren dienen. Durch die Absorption eines Photons wird das FADH° angeregt und entzieht dem ersten Tryptophan ein Elektron. Das auf diese Weise entstandene Tryptophan-Radikal entzieht dem darauffolgenden Tryptophan ein Elektron, welches nun ebenfalls oxidiert wird. Das letzte, an der Oberfläche des Apoproteins ständige Tryptophan wird durch seine Deprotonierung stabilisiert und durch ein extrinsisches Reduktionsmittel reduziert. Für Photolyasen ist die Photoreduktion generell und damit die Rolle der Trp-Triade, für die Photolyase-Aktivität *in vivo* nicht essentiell, sondern es kommt auf andere Weise zu einer Akkumulation des katalytisch aktiven FADH^- (Partch and Sancar, 2005; Sancar, 2003).

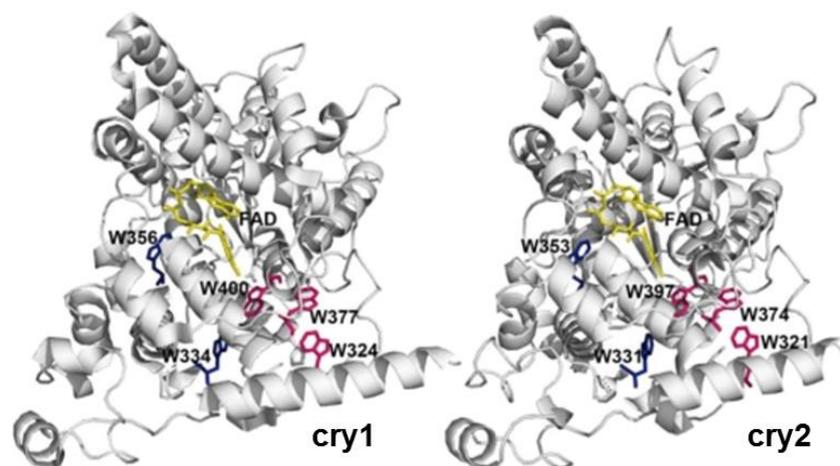


Abbildung 8: Konservierte Tryptophane in cry1 und cry2. Die Model- (cry2) bzw. Kristallstruktur (cry1) der PHR-Domänen von cry1 und cry2 zeigen jeweils fünf konservierte Tryptophane. Diese umfassen neben der Tryptophan-Triade (pink, W324-W377-W400 in cry1 und W321-W374-W397 in cry2) auch jeweils zwei zusätzliche Tryptophan-Reste (blau), die sich in der Nähe befinden (W356, W334 in cry1 und W353, W331 in cry2) (Li et al., 2011).

Da die drei beteiligten Tryptophane in allen untersuchten Mitgliedern der Cryptochrom-Photolyase-Familie gefunden wurden, wurde eine Notwendigkeit der Tryptophan-Triade für die Photoreduktion der Cryptochrome postuliert (Aubert et al., 2000). Durch Vergleiche von Sequenz und Struktur konnten in *A. thaliana* Cryptochrom 1 und 2 die jeweils zur *E. coli*-Photolyase äquivalenten Tryptophane identifiziert werden (Abbildung 8). Zeugner et al.

(Zeugner et al., 2005) zeigten für *cry1*, dass ein Austausch zweier dieser drei Tryptophane (W400, W324) *in vitro* zu einem Ausbleiben der Photoreduktion und *in planta* zu einer Funktionslosigkeit des Proteins führte. Folglich wurde gezeigt, dass für die in Cryptochromen essentielle Photoreduktion wiederum die Trp-Triade notwendig ist.

Zu den Befunden von Zeugner et al. (Zeugner et al., 2005) konträre Daten zeigen sowohl für *cry1*, als auch für *cry2* eine Photoaktivierung, die zumindest *in vivo* unabhängig von der Trp-Triade zu verlaufen scheint (Gao et al., 2015; Li et al., 2011). Analog zu Zeugner et al. (2005) wurden entsprechende *cry*-Konstrukte mit Trp zu Ala/Phe-Austauschen für die heterologe Expression und die Etablierung transgener *Arabidopsis*-Linien im *cry1cry2*- bzw. *cry1*-Hintergrund für Komplementationsstudien hergestellt. Die spektroskopischen Analysen *in vitro* zeigten für die *cry1*- sowie *cry2*-Konstrukte ebenfalls ein Ausbleiben der Photoreduktion oder nur eine marginale Reduktion des FAD_{ox} . Dies konnten auch weitere unabhängige Datensätze bestätigen (El-Esawi et al., 2015). Die *in planta*-Studien mit transgenen Linien hingegen zeigten für die *cry1* Trp-Triade-Mutanten (W324, W377, W400) eine mindestens partielle Komplementation des *cry1*-Hintergrunds. Dementsprechend wurde anhand der *cry*-gesteuerten biologischen Antworten wie der Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums eine biologische Aktivität der Konstrukte festgestellt. Jedoch zeigte *cry1* W400A eine konstitutive, lichtunabhängige Aktivität.

Bezüglich der *cry2* Trp-Triade Mutanten offenbarten die jeweiligen Kontrollen eine Hyperaktivität für zwei der drei Trp-Austausche (W374, W397): Die entsprechenden Komplementationslinien zeigten auch im Dunkeln deutlich verkürzte Hypokotyle und im Kurztag angezogen ein verfrühtes Blühverhalten im Vergleich zu dem *cry1cry2*-defizienten Hintergrund der Komplementationslinien. Aufgrund dieses *cop*-Phänotyps (*constitutive photomorphogenesis*) kann keinerlei Interpretation der Daten hinsichtlich Photoaktivierung erfolgen. Die einzigen Mutationen, die in *cry2* keine Hyperaktivität des Proteins vermittelten, waren Ala/Phe-Austausche des oberflächenständigen Tryptophans W321 (Abbildung 8). Die biologische Aktivität von *cry2* W321A war allerdings deutlich geringer als die des Wildtyp-Photorezeptors.

Die Notwendigkeit der lang für essentiell gehaltenen Trp-Triade für die Photoreduktion der pflanzlichen Cryptochrome *in planta* wird zumindest mit den neuen Daten für *cry1* angezweifelt (Gao et al., 2015). Auch andere Daten bestätigen die Diskrepanz zwischen der *in vivo*- und *in vitro*-Rolle der Trp-Triade durch eine funktionierende Photoreduktion der Trp-Triade-Mutanten in Insektenzellen (Engelhard et al., 2014). Entsprechend kam die Bezeichnung "Tryptophan-Triade Paradoxon" auf (Liu et al., 2010). Diesbezüglich wurde postuliert, dass die Reste der

Trp-Triade vielmehr einen wichtigen Beitrag für die native Struktur der Cryptochrome leisten und weniger für die Photoreduktion essentiell sind (Li et al., 2011). Es sind weitere Daten notwendig, um genauere Einblicke in die für pflanzliche Cryptochrome essentielle Photoreduktion zu bekommen. Dabei ist eine Beteiligung von bereits identifizierten, hoch konservierten zusätzlichen Tryptophanen (Abbildung 8) nicht auszuschließen (Engelhard et al., 2014; Gao et al., 2015).

1.3.3.2 Konformationsänderung & Phosphorylierung

Die auf die Photoreduktion folgenden Schritte sind Konformationsänderungen des Proteins sowie dessen Phosphorylierung (Liu et al., 2017; Shalitin et al., 2002; Tan et al., 2013).

Durch die Konformationsänderung von cry wird sehr wahrscheinlich eine Zugänglichkeit für Signalpartner erzielt (Kondoh et al., 2011; Partch et al., 2005). Die Lichtabhängigkeit dieses Mechanismus wird dadurch verdeutlicht, dass die *in vitro* nicht photoreduzierbare Trp-Triade-Mutante *cry1* W324F keine entsprechenden Konformationsänderungen zeigt (Kondoh et al., 2011). Die Belichtung des Vollängenproteins scheint primär zu einer Umlagerung der CCE zu führen. Allerdings zeigt auch die PHR-Domäne mit fehlendem C-Terminus lichtinduzierte Strukturänderungen (El-Esawi et al., 2015; Kondoh et al., 2011). Möglicherweise initiieren die strukturellen Änderungen der PHR-Domäne eine Umstrukturierung der C-terminalen Extension (Thöing et al., 2015). Diese beschriebenen Konformationsänderungen der PHR-Domäne scheinen ausreichend zu sein für eine Aktivität des Proteins, sofern der C-Terminus als Signaldomäne für Interaktionen nicht benötigt wird: Sowohl *in planta* als auch in *Yeast-2-Hybrid*-Interaktionsstudien zeigten die C-terminal verkürzten Versionen biologische Aktivität (He et al., 2015; Kennedy et al., 2010).

Auch die Phosphorylierung gilt für die biologische Aktivität der pflanzlichen Cryptochrome als essentiell. Diesbezüglich wurden unterschiedliche zelluläre Kinasen identifiziert, welche die Phosphorylierung induzieren (Liu et al., 2017). Dabei wird ausschließlich photoreduziertes Cryptochrom phosphoryliert. Massenspektrometrische Analysen haben dabei 24 unterschiedliche Phosphorylierungsstellen *in planta* gezeigt, insbesondere innerhalb der C-terminalen Extension (Liu et al., 2017; Wang et al., 2017).

Die Notwendigkeit der Dimerisierung von *cry1* und *cry2* für deren biologische Aktivität ist umstritten. Sowohl für *cry1* als auch *cry2* wurde eine von Licht unabhängige Dimersierung beschrieben, die über die PHR Domäne vermittelt wird (Rosenfeldt et al., 2008; Sang et al., 2005). Eine neuere Y2H-Studie beschreibt jedoch eine Blaulichtabhängigkeit der Homodimer-

bzw. Oligomerisierung von cry2 (Wang et al., 2016). Unabhängig von der Lichtabhängigkeit wurden *in vitro* bisher weder cry2-, noch cry1-Dimere oder –Oligomere nachgewiesen, was auf eine relativ schwache Interaktion oder die Rolle zusätzlicher Proteine hindeuten würde.

Die beschriebene Photoaktivierung der pflanzlichen Cryptochrome unterliegt möglicherweise einer Regulierung durch andere Proteine, die unabhängig von der Interaktion mit Signalpartnern zu sein scheint. Wang et al. (2016) zeigten, dass das Gleichgewicht an aktivem cry2 über eine negative blaulichtabhängige Rückkopplung durch andere Proteine reguliert wird. Damit wurde neben dem blaulichtinduzierten cry2-Abbau ein zweiter unabhängiger Mechanismus zum Regulieren der aktiven cry2-Menge vorgestellt. Dabei regulieren photoaktivierte Cryptochrome durch direkte Interaktion mit diesen Proteinen selbst ihre eigenen aktiven Proteinlevel, da diese u.a. deren Phosphorylierung sowie Dimerisierung unterdrücken. Dementsprechend wurde neben der Photoaktivierung auch ein Mechanismus der Photoinaktivierung postuliert und analog dazu die identifizierten Proteine als *Blue-Light Inhibitors of Cryptochrome* (BIC) benannt.

1.3.3.3 Lichtinduzierter Abbau

Ein wichtiger weiterer Schritt in der Regulation von cry2 ist dessen blaulichtinduzierter Abbau. Die Lichtlabilität äußert sich darin, dass cry2 in etiolierten Keimlingen, die ins Licht überführt werden, rasch abgebaut wird (Ahmad et al., 1998; Lin et al., 1998; Shalitin et al., 2002; Zuo et al., 2012). Dabei ist die cry2-Proteolyse fluenzratenabhängig: Je höher die Lichtintensität, desto schneller der Abbau. Keimlinge und adulte Pflanzen, welche konstant im Blaulicht angezogen werden, zeigen ein konstantes cry2-Level (Mockler et al., 2003). Dabei ist die Proteinmenge hauptsächlich durch den Abbau reguliert. Obwohl auch die Transkription eine gewisse circadiane, lichtunabhängige Oszillation zeigt, hat diese nur geringen Einfluss auf die Proteinmenge (Ahmad et al., 1998; Tóth et al., 2001).

Dass der cry2-Abbau direkt mit dessen Photoaktivierung gekoppelt ist, wird dadurch verdeutlicht, dass ausschließlich phosphoryliertes Protein der Abbaumaschinerie zugeführt wird (Wang et al., 2017, Yu, et al., 2007). Dementsprechend wurde gezeigt, dass nicht nur der Abbau Fluenzraten-abhängig ist, sondern auch die vorgeschaltete Phosphorylierung (Liu et al., 2017). Des Weiteren hat Grünlicht ebenso wie auf die biologische Antwort von cry2 auch auf dessen Abbau einen inhibierenden Effekt (Herbel et al., 2013). Diese Lichtlabilität und somit das cry2-Level ist folglich mit seiner Funktion beim Photoperiodismus und der Photomorphogenese unter Schwachlicht verknüpft (s. Kapitel 1.4.1).

Die blaulichtabhängige Degradation von cry2 wird durch dessen Ubiquitinierung initiiert. Nach der auf die Phosphorylierung folgende Polyubiquitinierung durch die COP1/SPA E3 Ligase kommt es zum Abbau durch das 26S Proteasom (Shalitin et al., 2002; Yu et al., 2007; Zuo et al., 2012). Eine regulierende Funktion des Abbaus konnte dabei neben COP1 und SPA- (*Suppressor of Phytochrome A*) Proteinen auch für Phytochrom A nachgewiesen werden (Weidler et al., 2012).

1.3.4 Cryptochrom 2 und ATP

Im Jahr 2003 wurde erstmals die ATP-Bindung pflanzlicher Cryptochrome für *A. thaliana* cry1 beschrieben. Diese ist in mehreren unabhängigen Versuchen gezeigt worden, jedoch variieren die gezeigten Dissoziationskonstanten für ATP und cry1 zwischen 4,2 und 23 μM und für cry2 bzw. 0,9 und 49 mM (Bouly et al., 2003; Brautigam et al., 2004; Engelhard et al., 2014; Ozgür and Sancar, 2006).

Die cry1 PHR-Kristallstruktur (Brautigam et al., 2004) bestätigte die Metabolit-Bindung über nachträgliche Inkubation der Kristalle mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Derivat AMP-PNP und erlaubte die Identifizierung der Metabolit-Bindetasche (s. Kapitel 1.3.2 a). Dabei liegt der Adenin-Rest direkt innerhalb der hydrophoben Seite der FAD-Bindetasche und ist mit den beiden Aminosäureresten Leu-296 und Tyr-402 assoziiert (Abbildung 9). Die äquivalenten Positionen dieser beiden Reste in Photolyasen nehmen zwei Tryptophane ein, welche für die Bindung der Pyrimidin-Dimere essentiell sind (Brautigam et al., 2004). Zusätzlich zur Assoziation des ATP durch Leu-296 und Tyr-402 ist das Nukleotid durch Wasserstoffbrücken über polare Aminosäuren gebunden und der Flavin-Kofaktor steht über Wassermoleküle indirekt mit AMP-PNP in Kontakt (Abbildung 9); der Adeninrest ist nur 11 Å vom Isoalloxazinring des FAD entfernt. Die Phosphatreste des AMP-PNP tragen nicht zur Bindung bei, sondern sind oberflächenständig. Es kommt auch zu keinem Kontakt zwischen Protein und Mg^{2+} , welches vom Triphosphat-Rest des Metabolits assoziiert ist.

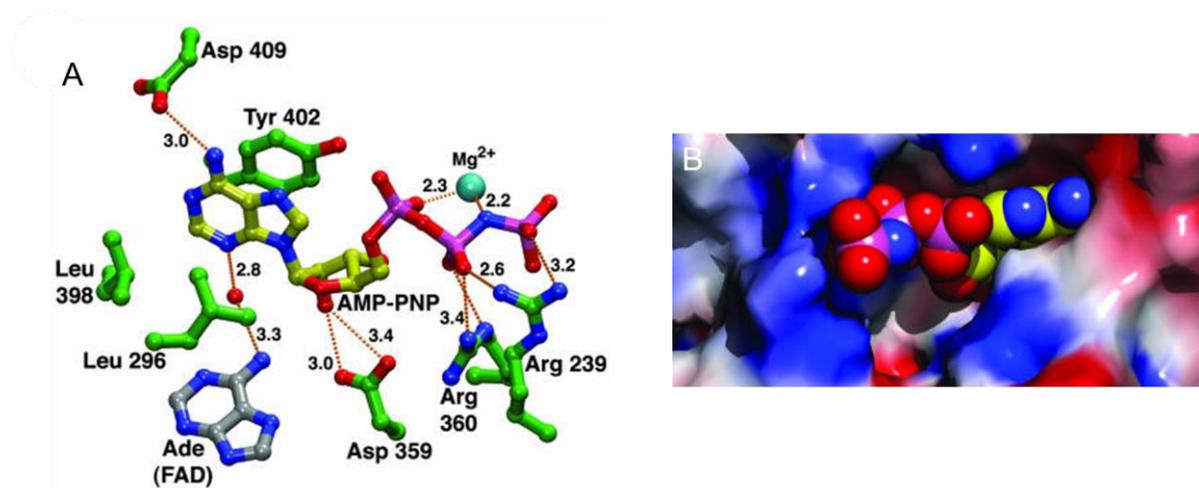


Abbildung 9: Die AMP-PNP Bindestelle von cry1. (A) Die Kristallstruktur von cry1 PHR deckte Leu-296 und Tyr-402 als verantwortliche Aminosäurereste für die Metabolit-Bindung auf. Farbgebung: gelb, Kohlenstoff, grün, Kohlenstoff vom Protein; silber, Kohlenstoff vom FAD; rot, Sauerstoff; blau, Stickstoff; gelb, Schwefel; pink, Phosphor. Wasserstoffbrückenbindungen sind mit gestrichelten Linien dargestellt. Die dazugehörigen Distanzen sind in Å angegeben. (B) zeigt die FAD-Höhle innerhalb des Proteins. Die Farbgebung ist die gleiche wie in (A).

Da bislang keine Kristallstruktur von cry2 verfügbar ist, konnte auch die exakte Identifikation der ATP-Bindestelle nicht erfolgen. Sequenzvergleiche der beiden Cryptochrome aus *A. thaliana* (Anhang A1) ergaben Tyr-399 als homologe Position in cry2 zu Tyr-402 in cry1 (Engelhard et al., 2014). Direkte Beweise für dieses Tyrosin als essentiell für die Metabolitbindung gab es bislang aber nicht und wurden in der vorliegenden Arbeit gesucht.

Die genaue Funktion sowie biologische Relevanz der nachgewiesenen ATP-Bindung pflanzlicher Cryptochrome ist bislang unklar, obwohl Sequenzvergleiche ergaben, dass die an der ATP-Bindung beteiligten Aminosäure-Reste innerhalb der pflanzlichen Cryptochrome stark konserviert sind (Orth et al., 2017). Da bisher keine *in planta*-Studien existieren, kann ausschließlich auf *in vitro*-Daten oder Versuche, die in heterologen Systemen erfolgten, zurückgegriffen werden. Mehrere Studien zeigten, dass es durch ATP-Zugabe zu einer Verstärkung der Photoreduktion kommt, indem FADH[•] stabilisiert wird (Burney et al., 2009; Cailliez et al., 2014; El-Esawi et al., 2015; Engelhard et al., 2014; Immeln et al., 2007; Müller et al., 2014). Da Versuche mit ITP (Inosin Triphosphat), der oxidierten Form von ATP, den gleichen Effekt erzielten wie mit ATP, ist eine Rolle als direktes Reduktionsmittel auszuschließen (Engelhard et al., 2014). Als mögliche Erklärung für die erhöhte Effizienz der Photoreduktion wurde vielmehr eine ATP-induzierte, lichtunabhängige Konformationsänderung in Betracht gezogen, welche zu einem effektiveren Elektronentransfer führen könnte. Diese ATP-induzierten strukturellen Änderungen sind für cry1 bereits mehrfach beschrieben worden (Burney et al., 2009a; El-Esawi et al., 2015; Orth et al., 2017) und sind

ebenfalls für cry2 in der Diskussion (Engelhard et al., 2014). Eine durch ATP-Bindung herbeigeführte Strukturänderung konnte jedoch für die cry1 PHR-Kristallstruktur nicht nachgewiesen werden, weil keine Unterschiede in den Strukturen zwischen nativem und AMP-PNP-gebundenem Protein feststellbar waren (Brautigam et al., 2004). Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass die Kristallpackung eine räumliche Änderung verhindert, wenn nachträglich der Ligand zugegeben wird.

Zusätzlich wurde eine Verbesserung der Photoreduktion über eine ATP-vermittelte Erhöhung des pKa-Wertes des Aminosäurerestes D396 in cry1 (D393 in cry2) postuliert (Cailliez et al., 2014; Müller et al., 2014). Dieses Asp ist der Protonendonator nach Elektronenübertragung auf FAD. Durch die Senkung des pH-Wertes konnte ebenso wie durch die Anwesenheit von ATP eine Protonierung der Asparaginsäure erzielt werden, die in einer verstärkten Akkumulation des FADH° mündet. Jedoch konnten Engelhard et al. (Engelhard et al., 2014) zeigen, dass auch bei pH 5,7, einem pH-Wert bei dem D393 vollständig protoniert vorliegen sollte, ATP immer noch einen verstärkenden Effekt auf die Photoreduktion von cry2 *in vitro* hat. Dementsprechend ist die Funktion der ATP-Bindung auch *in vitro* noch nicht vollständig geklärt.

Die ATP-Bindung hat nicht nur einen verstärkenden Effekt auf die Akkumulation von FADH° im Wildtyp-Protein, sondern komplementiert zumindest partiell die fehlende Photoreduktion von Trp-Triade-Mutanten (El-Esawi et al., 2015; Engelhard et al., 2014). So konnte *in vitro* und in cry-exprimierenden Insektenzell-Extrakten gezeigt werden, dass die vorher nicht photoreduzierbaren Trp-Triade-Mutanten (s. Kapitel 1.3.3) durch die Anwesenheit von Metaboliten wie ATP wieder photoreduzierbar sind. Entsprechend wurde eine Erklärung für das „Tryptophan-Triade-Paradoxon“ geliefert: Durch ATP-induzierte Konformationsänderungen könnte es zu alternativen Elektronentransferwegen kommen (Abbildung 10). Sequenzanalysen, die auf der cry1 PHR-Kristallstruktur beruhen, konnten neben den Tryptophanen der Trp-Triade noch zwei weitere Tryptophane identifizieren (W331, W376), die alternative Elektronentransferwege bilden könnten. Da Austausch dieser beiden Tryptophane *in vitro* zu einer geringeren Photoreduktion führten, ist anzunehmen, dass sie auch bei cry2 WT abgelesen werden. Außerdem wäre aber auch eine alternative Route der Elektronen über Tyr-399 und das gebundene ATP denkbar.

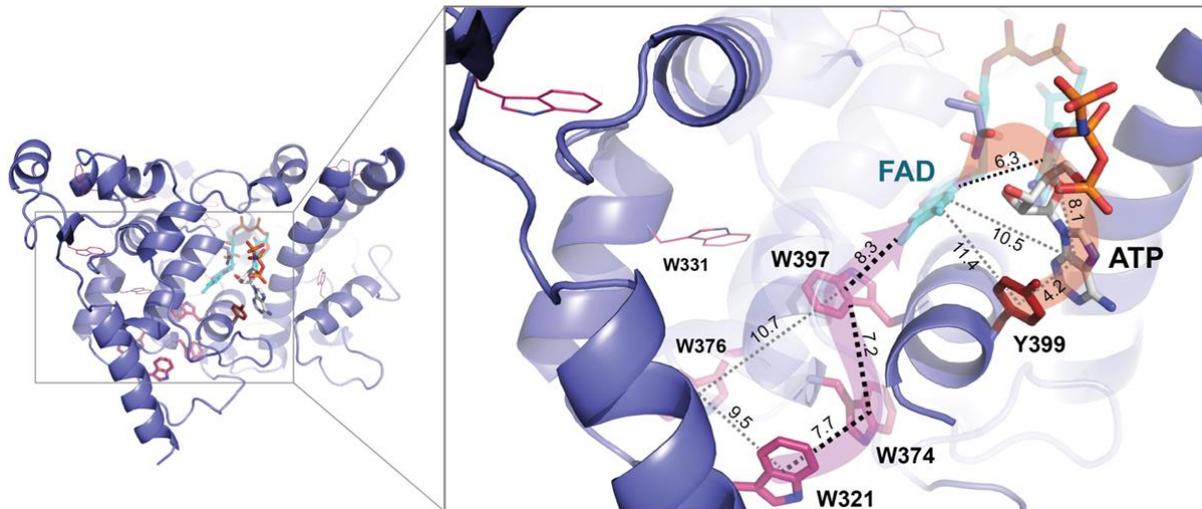


Abbildung 10: Am Elektronentransfer beteiligte Aminosäurereste. Die auf der cry1-Kristallstruktur basierende Modelstruktur der cry2 PHR-Domäne zeigt ATP gebunden durch die putative Metabolitbindestelle Tyr-399 sowie die Tryptophane der Trp-Triade (pink, W397-W374-W321). Des Weiteren sind zwei Tryptophane gezeigt (W331, W376), die an einer alternativen Elektronentransportkette für die Photoreduktion beteiligt sein könnten. In orange ist eine mögliche Route der Elektronen über das ATP und Tyr-399 dargestellt. Entfernungen sind mit gestrichelten Linien dargestellt und in Å angegeben (Engelhard et al., 2014).

Jedoch gibt es bis dato keinerlei konkrete Beweise für diese Hypothese.

1.3.4.1 Chemische Cryptochrom Inhibitoren

Neben ATP und ATP-Derivaten sowie NADH, für die ein positiver Effekt auf die Aktivität von cry2 zumindest *in vitro* nachgewiesen wurde (Engelhard et al., 2014), wurde auch eine Substanz identifiziert, die die biologische Funktion der pflanzlichen Cryptochrome deutlich herabsetzt (Ong et al., 2017). 3-Bromo-7-nitroindazol (3B7N), ein bekannter neuronaler NO-Synthase-Inhibitor in Säugetieren (Abbildung 11, Bedrosian et al., 2012), wurde *in planta* an Keimlingen getestet und zeigte einen deutlichen und spezifischen inhibitorischen Effekt auf die cry1-Antwort.

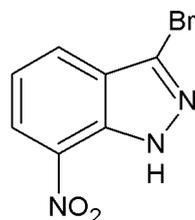


Abbildung 11: Struktur von 3-Bromo-7-nitroindazol (3B7N).

Initiale *in vitro*-Studien konnten dabei eine Bindung zwischen cry1 und diesem Inhibitor nachweisen. Darauf basierend untersuchten Orth et al. (2017) den Bindemechanismus genauer und bewiesen eine mit der ATP-Bindung interferierende Assoziation an die Metabolitbindestelle von cry1 (Abbildung 12).

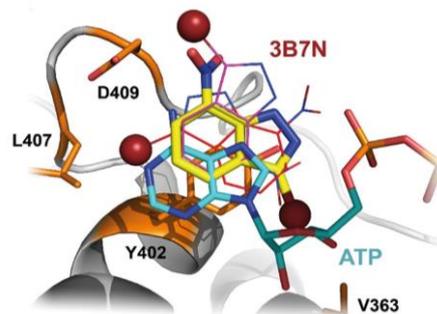


Abbildung 12: Möglicher Bindemechanismus des cry-Inhibitors 3-Bromo-7-nitroindazol an cry1. Das Model zeigt drei mögliche Bindemechanismen (rot, gelb, lila) von 3B7N an Tyr-402 von cry1. (Orth et al., 2017)

Des Weiteren konnte eine durch 3B7N hervorgerufene verringerte Akkumulation von FADH° im Zuge der Photoreduktion nachgewiesen werden. Jedoch bleibt der genaue Wirkmechanismus von 3B7N unklar. Außerdem gibt es bislang keine Studien zur Wirkung von 3B7N auf cry2.

1.4 Zielsetzung

In *Arabidopsis thaliana* kommen neben dem DASH-Cryptochrom cry3 zwei klassische Cryptochrome vor: Cryptochrom 1 und 2. 2003 wurde erstmals deren ATP-Bindefähigkeit anhand von cry1 beschrieben (Bouly et al., 2003). Sequenzanalysen pflanzlicher Cryptochrome ergaben, dass die in *A.t.* cry1 identifizierte Metabolitbindetasche hoch konserviert ist. Jedoch ist bisher die biologische Funktion der ATP-Bindung unbekannt und funktionelle Analysen der ATP-Bindung *in planta* wurden bis dato nicht gemacht. Des Weiteren ist aufgrund der fehlenden Kristallstruktur von cry2 dessen ATP-Bindestelle nicht definiert, sondern wurde lediglich durch Sequenzanalysen mit cry1 und der daraus resultierenden Modellstruktur postuliert.

Im Rahmen dieser Arbeit soll die ATP-Bindung von cry2 näher durch *in vitro*- und *in planta*-Analysen charakterisiert werden.

In einem ersten Schritt soll die ATP-Bindung von cry2 und einer cry2-Mutante mit einem Austausch in der vorhergesagten ATP-Bindetasche mit Techniken wie Isothermer Titrationskalorimetrie untersucht werden. Nachfolgend soll analysiert werden, ob die gefundene cry2-Mutante, die kein ATP bindet, den Phänotyp von cry2-defizienten *Arabidopsis*-Pflanzen komplementieren kann. Durch weitere *in vitro*-Studien gilt es, die Auswirkung der ATP-Bindung auf das Verhalten von cry2 genauer zu untersuchen, wobei der Fokus auf der Analyse möglicher ATP-induzierter struktureller Änderungen liegt.

Ong et al. (2017) identifizierten einen Inhibitor, 3-Bromo-7-nitroindazol (3B7N), der die cry1-Antwort *in planta* stark reduziert. 3B7N scheint an der gleichen Stelle von cry1 wie ATP zu binden (Orth et al., 2017). Ob dies auch für cry2 gilt, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

2. Material

2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung & Hersteller
Autoklav	V-150 Systec, Wetzlar
Blotapparatur	Mini-Trans-Blot Cell Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Blotting</i> -Papier	MN 218 B Macherey & Nagel, Düren
ESP-Spektrometer	ESP 300 E (Bruker)
Feinwaage	Satorius, Hamburg
Fluorimeter	RF-5301 PC Spectrofluorimeter, Shimadzu
French Press	French Pressure Cell Press (SLM AMINO Spectronic)
Gelapparatur	Mini Protean® 3 Cell Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock	Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg
Infrarot-Scanner	Odyssey <i>Infrared Imaging System</i> LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Inkubatorschrank	B6060 Heraeus, Hanau
Inkubatorschüttler	G25 New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
ITC	MicroCal ITC200 (Malvern Instruments)
Konvokales Laser Scanning Mikroskop	KLSM SP5 (Leica)
Magnetrührer	RCT basic Ika Werke, Staufen
Mikropipetten	Research variable 2,5, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 Eppendorf, Hamburg

Nitrocellulosemembran	porablot NCP Macherey & Nagel, Düren
pH-Meter	Lab 850 Schott Instruments, Landshut, mit Elektrode
Photometer	GeneQuant 1300 (Heraeus, Hanau)
Photometer	Nano Drop ND 1000 Spectrophotomete (Thermo Scientific)
Photospektrometriemeter	USB2000+UV-VIS-ES, Ocean Optics
Protein-Aufreinigungssystem	ÄKTA Purifier FPLC system, Amersham Biosciences
Sicherheitslicht rot	TLD 18 W/15 Philips, Amstelveen, Niederlande
Spannungs-/Stromquelle	Power 300 Electrophoresis Power Supply Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Sterilbank	KS 12, Thermo Scientific, Langenselbold
Thermocycler	Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)
Thermocycler für qPCR	Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden)
Thermomixer	comfort Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Sonorex TK52 Bandelin Electronic, Berlin
Vortex	Genie 2 Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Weißlichtlampen	Cool White Light
Weißlichtschrank	AR-75L, CLF Plant Climatics, Emersacker
Xenon-Lampe mit angeschlossener Kühlung	Kryo-Thermostat WK 5 (Colora Messtechnik GmbH, Lorch)
Zellmühle	Schwingmühle MM200, Retsch, Haan
Zentrifuge	Biofuge pico Heraeus, Hanau
Zweistrahlfotometer mit angeschlossener Kühlung	UV—2401 PC UV-VIS Recording Spectrophotometer (Shimadzu, Japan) mit Kryo-Thermostat WK 5 (Colora Messtechnik GmbH, Lorch)

2.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Einwegküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Falconröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.3 Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Antigen	Quelle	Herkunft
primär	α His ₆	His ₆ -Tag	Maus	Clontech, Mountain View, CA, USA
sekundär	α Mouse 800	Maus IgG	Affe	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
primär	α CCT2	CCT2; Peptid: SEGKNLEGIQDSSDQ	Kaninchen	Eurogentec
sekundär	α Rabbit HRP	Kaninchen IgG	Ziege	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
primär	α Tubulin	α Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
sekundär	α Mouse HRP	Ratte IgG	Ziege	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

2.4 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen) oder Applichem (Darmstadt) in analytischer Qualität bezogen.

2.5 Oligonukleotide¹

Klonierung von *CRY2* in pENTR™/D-TOPO® mit zusätzlichem C-terminalen **STOP-Codon** über Gateway®-Klonierung

Forward: 5'-caccatgaagatggacaaaaagactatag-3'

Reverse: 5'-tcattggcaaccatttttcccaaac-3'

Klonierung von *CRY2 PHR* in pCDFDuet1 über SacI und NotI

Forward: 5'-tgggagctcgaagatggacaaaaagactatagtttggt-3'

Reverse: 5'- ccagcggccgctcagatcatgatctgtgcttca

Klonierung von *CRY2* in pAS2-1 und pACT2 über SfiI und XmaI

Foward: 5'-tggggccatggaggccatgaagatggacaaaaag-3'

Reverse: 5'-ccacccgggtcattggcaaccatttttcccaaact-3'

qRT-PCR gegen *Arabidopsis thaliana CRY2* (At1G04400)

Forward: 5'- ccgatggccacgagcttgat -3'

Reverse: 5'- aagctcgggaagccattgcc -3'

qRT-PCR gegen *Arabidopsis thaliana FT* (At1G65480, Intron spanning)

Forward: 5'- actggaacaaccttggcaatgaga -3'

Reverse: 5'- gccacgggaaggccgagatt -3'

qRT-PCR gegen *Arabidopsis thaliana ACT2* (At3G18780)

Forward: 5'- cgccatccaagctgttctctct -3'

Reverse: 5- tcccgtctgctgtgtggt -3'

¹ Die Restriktionsschnittstellen bzw. für Gateway® benötigten Überhänge sind jeweils unterstrichen.

2.6 Plasmide

Plasmid	Funktion	Selektionsmarker	Firma/Herkunft
pCDFDuet TM -1	heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	Spectinomycin-Resistenz	Novagen
pENTR TM /D-TOPO [®]	Zwischenvektor	Kanamycin-Resistenz	Invitrogen
pB7RWG2 C.term	Stabile Integration in <i>Arabidopsis thaliana</i>	Spectinomycin-, BASTA [®] -Resistenz	(Karimi et al., 2002)
pBacPAK9	<i>Template</i>	Ampicillin-Resistenz	(Engelhard et al., 2014)
pAS2-1	Hefe-2-Hybrid	Tryptophan-Auxotrophie	Clontech
pACT2	Hefe-2-Hybrid	Leucin-Auxotrophie	Clontech

2.7 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Funktion	Herkunft
BL21 (DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]ΔhsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> Δ <i>EcoRI-B</i> <i>int::(lac::PlacUV5::T7 gene1) i21</i> Δ <i>nin5</i>	Heterologe Proteinexpression	Stratagene
Top 10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Klonierung	Thermo Fisher Scientific

2.8 *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme

Stamm	Funktion	Herkunft
GV3101 pMP90	Transformation von <i>A. thaliana</i>	Koncz et al., 1992

2.9 *Arabidopsis thaliana*-Linien

Genotyp	Ökotyp	Allel	Gen-Nummer	Herkunft
<i>cry2</i>	Col-0	<i>cry2-1</i> (Nr.: 4769740)	AT1G04400	Guo et al., 1998
Wildtyp	Col-0			U. Höcker, Köln

2.10 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Funktion	Herkunft
Y2H Gold	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1UAS-Gal1TATA-His3, GAL2UAS-Gal2TATA-Ade2, URA3 :: MEL1UAS-Mel1TATA, AUR1-C MEL1</i>	Hefe-2-Hybrid	Clontech

3. Methoden

3.1 Anzucht und Kultivierung der Organismen

3.1.1 *Escherichia coli*

Puffer und Reagenzien

LB-Medium	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)
Spectinomycin	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 20 µg/mL
Gentamycin	60 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 µg/mL
Kanamycin	100 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 50 µg/mL
Rifampicin	50 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 µg/mL
Glycerol	50% (v/v), steril

Zur Kulturhaltung für etwa vier Wochen wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme auf selektiven LB-Platten ausgestrichen oder ausplattiert und nach Inkubation bei 37 °C über Nacht für die entsprechende Zeit bei 4 °C gelagert.

Für die Anzucht von Flüssigkulturen wurden 3 mL LB mit entsprechendem Antibiotikum monoklonal angeimpft und über Nacht bei 37 °C und schüttelnd bei 250 rpm inkubiert. Zur langfristigen Lagerung von *E. coli* wurden Cryo-Stocks hergestellt. Dazu wurden jeweils 500 µL Flüssigkultur mit dem gleichen Volumen 50%igem sterilen Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

Puffer und Reagenzien

YEB-Medium	5 g/L Rinderextrakt, 1 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 0,3 g/L MgSO ₄ , (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)
Spectinomycin	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 20 µg/mL
Gentamycin	60 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 µg/mL
Kanamycin	100 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 50 µg/mL
Rifampicin	50 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 µg/mL
DMSO	steril

Agrobacterium tumefaciens wurde auf YEB-Medium kultiviert. Aus monoklonalen Flüssigkulturen konnten ebenfalls Cryo-Stocks hergestellt werden, die zur langfristigen Lagerung bei -80 °C geeignet waren. Dazu wurden in geeigneten Cryo-Gefäßen 930 µL Kultur mit 70 µL sterilem DMSO gemischt.

3.1.3 *Arabidopsis thaliana*

Puffer und Reagenzien

½ MS-Medium	2,15 g/L Murashige-Skoog-Salzmischung, 0,5 g/L MES-KOH (pH 5,7), 9 g/L Phyto-Agar, steril
Sterilisationslösung	5% NaOCl, 0,05% Tween
Pikiererde	ohne Zusatz von Dünger
Vermiculit	grobkörnig

Zur kurzzeitigen Kultivierung von *Arabidopsis*-Keimlingen eignete sich die Anzucht auf ½ MS-Platten oder Filterpapier. Dazu wurden die Samen auf zuvor gewässertem Filterpapier ausgelegt.

Für die sterile Anzucht auf ½ MS-Platten wurden die Samen vor der Aussaat mit Natriumhypochlorid-Lösung sterilisiert. Dazu wurden ca. 100 Samen zuerst für 2 min in

70%igem Ethanol inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, 2000 rpm) erfolgte die Inkubation in 5%iger Hypochlorid-Lösung mit 0,05% Tween für 15 min. Nach fünfmaligem Waschen mit Aqua bidest. und Zentrifugationsschritten zwischen den Waschgängen wurden 500 µL 0,15%ige Phyto-Agar-Lösung zugegeben.

Für eine längerfristige Kultivierung von *A. thaliana* erfolgte die Anzucht auf einem 1:1-Gemisch aus Erde und Vermiculit.

Unabhängig von der Art der Anzucht, wurden die Samen nach der Aussaat für drei Tage bei 4 °C vernalisiert. Nach der Vernalisation wurden die Samen in Weißlicht überführt. Entweder wurden die Pflanzen dann weiterhin unter Weißlicht aufgezogen oder die Samen nach vier Stunden Keiminduktion in andere Lichtbedingungen (Dunkel oder Dauerblaulicht) überführt.

3.1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

Puffer und Reagenzien

YPD-Medium	20 g/L Pepton, 10 g/L Hefe-Extrakt, 20 g/L Glukose, (für Platten: 20 g/L Bacto-Agar)
Double Drop-Out Medium (- Trp, -Leu)	6,7 g/L Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 20 g/L Glukose, 1,54 g/L Aminosäure-Mischung ohne Trp und Leu (Sigma-Aldrich), 15 g/L Bacto-Agar
Glycerol	50% (v/v), steril

Analog zu *E. coli* und *A. tumefaciens* wurde *S. cerevisiae* für bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert. Dafür wurde der Pilz entweder auf Voll- oder Minimalmedium zuvor bei 30 °C kultiviert bis Kolonien gewachsen sind (3-5 d). Zur Langzeitlagerung bei -80 °C wurden Glycerolstocks hergestellt, indem 500 µL Flüssigkultur mit 500 µL Glycerol gemischt wurden.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Puffer und Reagenzien

dYT-Medium	16 g/L Trypton; 10 g/L Hefeextrakt; 5 g/L NaCl
RF1-Lösung	100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ x 4H ₂ O, 30 mM Kaliumacetat (pH 7,5), 10 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 15% (v/v) Glycerol
RF2-Lösung	10 mM MOPS (pH 5,8), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 15% (v/v) Glycerol
MgCl₂	1 M
MgSO₄	1 M

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 100 mL dYT-Medium mit einer frischen 2 mL Übernachtskultur angeimpft und mit jeweils 1 µL Magnesiumchlorid und Magnesiumsulfat versetzt. Bei 37 °C wurde schüttelnd bei 250 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht ist. Nachdem die Zellen für 30 min auf Eis gelagert wurden, wurden sie geerntet (3000 rpm, 8 min, 4 °C) und in 33 mL steriler RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 5 mL RF2-Lösung aufgenommen. Nach einer Inkubationsphase von 30 min auf Eis waren die kompetenten Zellen bei -80 °C lagerfähig.

3.2.2 Transformation von *E. coli*

Puffer und Reagenzien

LB-Medium	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)
Spectinomycin	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 20 µg/mL
Gentamycin	60 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 µg/mL
Kanamycin	100 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 50 µg/mL
Rifampicin	50 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 µg/mL

Zur Transformation von *E. coli* wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Zu 100 µL Zellen wurde ca. 1 µg Plasmid-DNA gegeben. Nach vorsichtigem Mischen und 30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für 60 s in 42 °C überführt. Abschließend wurde 1 mL LB-Medium hinzugegeben und bei 37 °C und 300 rpm für 60 min inkubiert. Auf selektive LB-Platten wurden schließlich 20 µL des Transformationsansatzes ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Puffer und Reagenzien

QIAprep Mini Prep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
------------------------------	---------------------

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das o.g. Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.4 Standard-Polymerase-Kettenreaktion

Puffer und Reagenzien

Phusion DNA-Polymerase (2 U/μL)	20 mM Tris-HCl (pH 7,4 bei 25°C), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM KCl, Stabilisierer: 200 μg/mL BSA and 50% Glycerol; (New England Biolabs)
5x Phusion HF-Puffer	mit 7,5 mM Mg ²⁺ ; (New England Biolabs)
dNTPs	Jeweils 10 mM; (Fermentas)
3' und 5' Primer	Jeweils 10 μM

Die Methode der PCR (*polymerase chain reaction*) wurde zur Amplifizierung von Nukleinsäuren *in vitro* genutzt. Dabei wurde DNA mittels einer Polymerase exponentiell vermehrt. Kurze Oligonukleotide (Primer) gaben Anfang und Ende des *Templates* vor, indem sie zu diesen Sequenzen komplementär waren. Durch Hybridisierung der Primer an den Matrizenstrang konnte die DNA-Polymerase diese auffüllen und somit die Ziel-DNA amplifizieren (Mullis and Faloona, 1987).

Standardmäßig wurde die Phusion DNA-Polymerase der Firma *New England Biolabs* genutzt. Als Kontrolle wurde eine Probe ohne DNA (NTC, *No Template Control*) mitlaufen lassen. Die Reaktionsansätze und Amplifikationsbedingungen sind unten aufgeführt.

Standard-PCR Reaktionsansatz

5x Phusion HF Puffer	10 μL
10 mM dNTPs	1 μL
10 μM 3' Primer	2,5 μL
10 μM 5' Primer	2,5 μL
DMSO (optional)	1,5 μL
Phusion DNA-Polymerase	0,5 μL
<i>Template</i> -DNA	variabel ²
Nuklease freies Wasser	auf 50 μL auffüllen

² DNA	Menge
genomisch	50 – 250 ng
plasmid	1 pg – 10 ng

Standard-PCR Programm

Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	10 s	} 43 Zyklen
<i>Annealing</i>	T_m der Primer ³ - 5 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s pro kb	
Finale Extension	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

3.2.5 Klonierung

3.2.5.1 Gateway®-Klonierung

Für die Klonierung der *CRY2*-Konstrukte in den pB7RWG2C-term.-Vektor für die stabile Integration in *Arabidopsis* wurde die Gateway®-Klonierung genutzt. Diese bedient sich eines Charakteristikums der Lambda Bakteriophage: Der sequenzspezifischen Rekombination (Landy, 1989). Dafür wurden für die Amplifikation des Inserts die Primer mit kurzem (ca. 4-10 bp) Anhang versehen, über welche eine direkte Ligation in den Gateway® *Entry*-Vektor erfolgen kann. Dabei entstanden an beiden Seiten des Inserts neue Flankierungssequenzen. Diese wurden später von Rekombinasen erkannt, sodass eine direkte Integration des Inserts aus dem Zwischen- in den Endvektor erfolgen konnte.

Gateway®-Vektoren zeichnen sich neben der von ihnen vermittelten Antibiotikaresistenz durch einen zweiten Selektionsmarker aus: Aufgrund des so genannten Selbstmordgens *ccdB*, dessen Genprodukt die bakterielle DNA-Gyrase inhibiert (Bernard and Couturier, 1992), sollen ausschließlich transformierte Zellen überleben (Bernard et al., 1994).

³ $T_m = 2\text{ °C} \times [\text{Adenin} + \text{Thymin}] + 4\text{ °C} \times [\text{Guanin} + \text{Cytosin}]$

TOPO®-Reaktion**Puffer und Reagenzien**

pENTR™/D-TOPO® Vektor	15-20 ng/μL, linearisiert, in 50% (v/v) Glycerol, 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,1% (v/v) Triton X-100, 100 μg/mL BSA, 30 μM Bromphenolblau (pENTR™/D-TOPO® <i>Cloning Kit</i> , Invitrogen)
dNTPs	Jeweils 12,5 mM in Aqua bidest. (pENTR™/D-TOPO® <i>Cloning Kit</i> , Invitrogen)
Salzlösung	1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂ (pENTR™/D-TOPO® <i>Cloning Kit</i> , Invitrogen)
Kanamycin	100 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 50 μg/mL
LB-Medium	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)

Voraussetzung für die TOPO®-Reaktion, welche die Ligation des PCR-Produktes in den Zwischenvektor beschreibt, ist eine spezifische Erkennungssequenz am 5'-Ende des Inserts. Diese wurde bei der Amplifikation mittels PCR an die eigentliche Zielsequenz angehängt (s. Kapitel 3.2.4), indem die Primer so designt wurden, dass der *Forward* Primer am 5'-Ende den essentiellen CACC-Überhang trägt. Unmittelbar nach der Amplifikation des Inserts wurde dieses über die TOPO®-Reaktion in den Zwischenvektor pENTR™/D-TOPO® ligiert:

Reaktionsansatz TOPO-Reaktion

PCR-Produkt	0,5–4 μL
Salzlösung	1 μL
Aqua bidest.	auf 5 μL auffüllen
TOPO® Vektor	1 μL

Das Verhältnis von PCR-Produkt zu Vektor lag dabei zwischen 0,5:1 und 2:1. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und damit chemisch kompetente Zellen transformiert (s. Kapitel 3.2.2). Auf Selektionsplatten wurden mögliche Transformanten identifiziert, welche mit einer Übernachtskultur für eine Plasmidpräparation weiterkultiviert wurden. Die Konstrukte wurden nach der Isolation der Plasmide (s. Kapitel

3.2.3) mittels eines Test-Restriktionsverdau und schließlich mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG, Konstanz auf Richtigkeit überprüft.

LR Rekombinationsreaktion

Puffer und Reagenzien

LR Clonase™ II Enzym Mix	Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix, Invitrogen
Proteinase K Lösung	2 µg/µL (Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix, Invitrogen)
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
LB-Medium	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)
Spectinomycin	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 20 µg/mL

Um das Insert aus dem Zwischenvektor in den Endvektor pB7RWG2-C.term.(Karimi et al., 2002) (Abbildung 13) mittels Rekombination zu überführen, wurde der verifizierte Zwischenvektor mit Insert mit dem Endvektor nach folgendem Reaktionsansatz gemischt:

Reaktionsansatz Clonase-Reaktion

Zwischenvektor (50-150 ng)	1-7 µL
Endvektor (150 ng/µL)	1 µL
TE-Puffer (pH 8,0)	auf 8 µL auffüllen

2 µL des LR Clonase™ II Enzym Mix wurden mit jedem Reaktionsansatz bei 25 °C eine Stunde inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde jeweils 1 µL der Proteinase K Lösung zugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Direkt im Anschluss wurden jeweils 2 µL der Reaktionsansätze zur Transformation von 100 µL chemisch kompetenten Zellen genutzt (s. Kapitel 3.2.2). Nach einer Plasmidisolierung (s. Kapitel 3.2.3) aus Flüssigkultur wurden die Konstrukte noch einmal über einen Test-Verdau mit Restriktionsenzymen verifiziert.

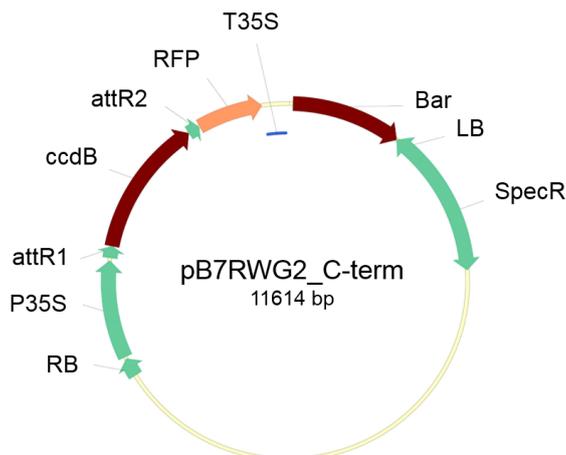


Abbildung 13: Ausgangsvektor für die stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*. Die beiden Flankierungssequenzen **RB** (*Right Border*) und **LB** (*Left Border*) begrenzen die T-DNA-Sequenz. **attR1** und **attR2** sind die Erkennungssequenzen für die Rekombinasen, welche das Selektionsgen **ccdB** gegen das Zielgen austauschen. Der zweite Selektionsmarker während der Klonierung ist das Spectinomycin-Resistenz vermittelnde Gen **SpecR**. Selektionsmarker in *Arabidopsis thaliana* ist das BASTA®-Resistenz vermittelnde Gen **Bar**. Der Promotor **P35S** reguliert die Expression des Zielgens bis zum Terminator **T35S**. **RFP** vermittelt ein mCherry-Tag an das Zielprotein.

3.2.5.2 Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Puffer und Reagenzien

Restriktionsenzyme	SacI, NotI, SfiI, XmaI in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 200 µg/mL BSA, 50% (v/v) Glycerol (NEB)
10x CutSmart® Puffer	500 mM Kaliumacetat, 200 mM Tris/Acetate, 100 mM Magnesiumacetat, 1 mg/mL BSA, pH 7,9 (NEB)
T4-DNA Ligase	10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerol (NEB)
10x Ligase-Puffer	500 mM Tris/HCl (pH 7,4), 100 mM MgCl ₂ , 10 mM ATP, 100 mM DTT

Im Vorfeld der heterologen Expression verkürzter *CRY2*-Versionen in *E. coli* sowie der Hefe-2-Hybrid-Interaktionsstudien mit Vollängen-cry2 wurde mittels Restriktionsschnittstellen kloniert. Hierzu verwendete Primer wurden so gewählt, dass die jeweilige Sequenz der Zielproteine abgedeckt und an die Amplifikate die benötigten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme angehängt wurden. Daran anschließend erfolgte über die Multiple Klonierungsstelle der Vektoren pCDFDuet-1, pAS2-1 und pACT2 eine direkte Endvektorklonierung. Dafür wurden PCR-Produkt und der Ausgangsvektor mit gleichen Restriktionsenzymen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (s. Kapitel 3.2.6.2). Für die Ligation

wurden Insert, Vektor und DNA-Ligase nach u.g. Reaktionsansatz gemischt und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert.

Reaktionsansatz Ligation

10x T4 DNA-Ligase Puffer	2 μ L
Vektor-DNA (4kb)	50 ng
Insert-DNA (1 kb)	37,5 ng
T4 DNA-Ligase	1 μ L
Aqua bidest.	auf 20 μ L auffüllen

Nach einer Hitzedeaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 min wurden 100 μ L chemisch kompetente Zellen mit 5 μ L des Reaktionsansatzes transformiert (s. Kapitel 3.2.2). Die Konstrukte wurden aus monoklonalen Flüssigkulturen isoliert (s. Kapitel 3.2.3) und mittels Test-Restriktionsverdau und Sequenzierung verifiziert (s. Kapitel 3.2.6).

3.2.6 Überprüfung von Konstrukten

Zur primären Überprüfung von Konstrukten wurden entsprechende Transformanten mittels einer Direkt-PCR überprüft. Aus den auf diese Weise vorselektierten Klonen wurden die Vektoren isoliert und mittels eines Test-Restriktionsverdaus verifiziert. Als letzter Schritt erfolgte die Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG, Konstanz.

3.2.6.1 Kolonie-PCR

Puffer und Reagenzien

Taq DNA-Polymerase	in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5% (v/v) Tween 20, 0,5% IGEPAL® CA-630, 50% (v/v) Glycerol (NEB)
10x ThermoPol Reaction Buffer	200 mM Tris/HCl (pH 8,8), 100 mM KCl, 20 mM MgSO ₄ , 1% (v/v) Triton X-100
dNTPS	jeweils 10 mM
3'- und 5'-Primer	10 μ M

Im Anschluss an eine Klonierung erfolgte zur Identifizierung möglicher korrekter Klone eine Vorselektion über eine Direkt-PCR. Dazu wurden Kolonien eines Transformationsansatzes in 5 μL Aqua bidest. inokuliert und zunächst 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend sollte das Zielgen über folgenden Reaktionsansatz unter u.g. Bedingungen amplifiziert werden:

Kolonie-PCR Reaktionsansatz

10x ThermoPol Reaktionspuffer	2,5 μL
10 mM dNTPs	0,5 μL
10 μM 3' Primer	0,5 μL
10 μM 5' Primer	0,5 μL
Taq DNA-Polymerase	0,125 μL
<i>Template</i> -DNA	5 μL
Nuklease freies Wasser	auf 25 μL auffüllen

Kolonie-PCR Programm

Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	
Denaturierung	95 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	T_m der Primer ⁴ – 5 °C	60 s	} 35 Zyklen
Elongation	68 °C	60 s pro kb	
Finale Extension	68 °C	5 min	
	4 °C	∞	

Die PCR-Produkte der unterschiedlichen Reaktionsansätze wurden mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft (s. Kapitel 3.2.7).

⁴ $T_m = 2\text{ °C} \times [\text{Adenin} + \text{Thymin}] + 4\text{ °C} \times [\text{Guanin} + \text{Cytosin}]$

3.2.6.2 Test-Restriktionsverdau

Puffer und Reagenzien

Restriktionsenzyme	z.B. EcoRI, BamHI in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 200 µg/mL BSA, 50% (v/v) Glycerol (NEB)
10x CutSmart® Puffer	500 mM Kaliumacetat, 200mM Tris-acetate, 100 mM Magnesiumacetat, 1 mg/mL BSA, pH 7,9 (NEB)

Im Anschluss an eine Kolonie-PCR erfolgte eine Verifizierung über einen Restriktionsverdau. Dazu wurde das Plasmid nach einer Isolation aus entsprechender Flüssigkultur mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Diese wurden so gewählt, dass ein Enzym im Vektor und ein weiteres Enzym im Insert schneidet. Der Reaktionsansatz nach u.g. Beispiel wurde bei 37 °C eine Stunde inkubiert und schließlich die entstandenen Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (s. Kapitel 3.2.7).

Reaktionsansatz Test-Restriktion

Restriktionsenzyme	je 0,5 µL
Plasmid-DNA (ca. 200 ng/µL)	2 µL
10x Cut Smart Puffer	2,5 µL
Aqua bidest.	auf 25 µL auffüllen

3.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Puffer und Reagenzien

TBE-Puffer	10,8 g/L Tris, 5,5 g/L Borsäure, 4 mL/L, 0,5 M EDTA/NaOH (pH 8,0)
TBE-Agarose-Gel	1-3% (w/v) Agarose in TBE-Puffer
Midori Green	Midori Green Advance (Biozym), 12,5 µL pro 250 µL Agarosegel
DNA-Marker	2-Log Ladder, 0,1-10 kbp (NEB), LMW DNA Ladder, 25-266 bp (NEB)
5x Probenpuffer	1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde genutzt, um Nukleinsäuren innerhalb eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufzutrennen (Wagner, 1964).

Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer aufgekocht, um sie vollständig zu lösen. *Midori Green* wurde zugegeben und die Mischung in die Gelkammern gegossen. Mit Hilfe eines Gelkammes wurden Aussparungen für die Probenaschen geschaffen. Zur Elektrophorese wurde das Gel in Schlitten mit TBE-Puffer überschichtet, sodass ein Stromfluss gewährleistet war. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Zur vollständigen Separation wurden die Proben bei 80-100 V für bis zu 1,5 h aufgetrennt. Durch die Anwesenheit von *Midori Green* konnten die Banden unter UV-Licht dokumentiert werden.

3.2.8 Transkriptionsanalyse

Die quantitative *realtime* PCR (qRT-PCR) diente als Methode zur relativen Quantifizierung und Überprüfung spezifischer Transkriptmengen. Dazu erfolgte im Vorfeld eine Gesamt-RNA Extraktion aus *A. thaliana* Keimlingen und adulten Pflanzen, die zuvor phänotypisch analysiert wurden. Es folgte die Behandlung extrahierter RNA mit DNase und eine abschließende Reverse Transkription für die Synthese der als *Template* fungierenden cDNA.

3.2.8.1 RNA-Extraktion aus Keimlingen

Puffer und Reagenzien

RLT Puffer mit 20 µL/mL 2 M DTT	
RW1 Puffer	RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden)
RPE Puffer	
Ethanol, reinst	

Zu Beginn wurde das Pflanzenmaterial (max. 100 mg) mit zwei Stahlkugeln versetzt und mit einer Zelmühle behandelt (3x 30 Hz, 30 s) und zwischen den einzelnen Zyklen immer wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aus dem auf diese Weise aufgebrochenen Zellmaterial wurde die Gesamt-RNA analog zu den Angaben des Herstellers extrahiert.

3.2.8.2 DNase-Verdau

Puffer und Reagenzien

TURBO DNase (2 U/μL)

10x TURBO DNase Puffer Turbo DNA-free Kit (Invitrogen)

**DNase
Inaktivierungspuffer**

Um verbleibende DNA aus den RNA-Extrakten zu entfernen, wurden die Proben für 30 min bei 37 °C mit DNase verdaut. Dazu wurden zu den restlichen circa 45 μL RNA-Extrakt (s. Kapitel 3.1.1.1) 5 μL 10x DNase-Puffer und 1 μL Enzym gegeben.

Im Anschluss an die Inkubation wurde die DNase durch Zugabe von 5 μL DNase Inaktivierungspuffer inaktiviert: Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde zentrifugiert (1,5 min; 10.000 rpm). Der Überstand enthielt nun die DNA-freie RNA.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch mit einem Nanodrop2000 bestimmt.

3.2.8.3 Reverse-Transkription

Puffer und Reagenzien

Oligo-dT-Primer

dNTP-Mix NanoScript 2 (PrimerDesign)

NanoScript 4x Puffer

NanoScript 2 Enzym

Die Reverse Transkription diente der Synthese von cDNA anhand des mRNA-*Templates*.

Beim anfänglichen *Annealing* wurden RNA und Oligo-dT-Primer gemischt (s.u.) sowie für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

Annealing

RNA <i>Template</i> (bis zu 2 µg)	x µL
Oligo-dT-Primer	1 µL
Nuklease freies Wasser	auf 10 µL auffüllen

Danach wurde der Reaktionsmix für die Extension zugegeben (s.u.) und bei 42 °C für 20 min inkubiert. Zur Hitzedeaktivierung des Enzyms wurde für 10 min auf 75 °C erhitzt.

Extension

NanoScript 4x Puffer	5 µL
dNTP Mix (je 10 mM)	1 µL
Nuklease freies Wasser	3 µL
NanoScript 2 Enzym	1 µL

3.2.8.4 Quantitative *realtime* PCR**Puffer und Reagenzien**

2x qPCRBIO SyGreen Mix	qPCRBIO SyGreen Mix Separate Rox (PCR Biosystems)
3' und 5' Primer	Jeweils 10 µM

Bei der Quantifizierung der Transkriptmenge unter Nutzung eines DNA-interkalierenden Farbstoffes wird sich der exponentiellen Zunahme der Fluoreszenz mit jedem Zyklus der PCR bedient.

Die verschiedenen Reaktionsansätze (s.u.) wurden in Triplikaten ausgeführt. Des Weiteren wurde für jedes genutzte Primerpaar immer eine Kontrolle (*No Template Control*) ohne cDNA durchgeführt.

qRT-PCR Reaktionsansatz

2x qPCRBIO SyGreen Mix	10 µL
3' Primer (10 µM)	0,8 µL
5' Primer (10 µM)	0,8 µL
cDNA <i>Template</i> (< 100 ng)	5 µL
Nuklease freies Wasser	3,4 µL

Die qRT-PCR und daran anschließende Schmelzkurve wurden mit dem Thermocycler *RotorGene Q* der Firma Qiagen durchgeführt.

qPCR Programm

Initiale Denaturierung	95 °C	15 min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95 °C	5 s	
<i>Annealing</i>	60 °C	10 s	
Elongation	72 °C	15 s	
Schmelzkurve	72-95 °C		

Die relative Expression der Zielgene wurde mittels folgender Formel bestimmt (Pfaffl, 2001):

$$\text{Verhältnis}_{WT/Mutante} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Ct_{\text{Zielgen}}(WT-Mutante)}}{(E_{\text{AKT2}})^{\Delta Ct_{\text{AKT2}}(WT-Mutante)}}$$

Formel 1: Relative Induktion eines Gens. Wobei *E*, Primereffizienz; *Ct*, *Cycle threshold* ist.

Dabei gibt „E“ die Primereffizienz, also die exponentielle Amplifikation der cDNA pro PCR-Zyklus an. Die Ct-Werte (*Cycle threshold*) geben dabei den Zyklus der PCR an, bei dem die Fluoreszenz des dsDNA-interkalierenden Farbstoffs über einen bestimmten Schwellenwert gestiegen ist. Die nach Pfaffl (2001) berechnete relative Induktion eines Gens wird auch als *Relative Fold Change* bezeichnet. Es wurden zwei Bedingungen (WT und Mutante) miteinander verglichen und jede dieser beiden quantifizierbar gemacht, indem die Ct-Werte gegen die des unbeeinflussten *Housekeeping*-Gens *AKT2* normiert wurden.

3.3 Herstellung transgener Pflanzen

Zur Herstellung transgener *Arabidopsis*-Linien wurde sich im Zuge dieser Arbeit der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten *Floral Dip* Methode bedient. Dabei wurde das Zielgen über transformierte Agrobakterien in die Pflanzen eingebracht, indem sich eines binären Systems bedient wurde (Hellens et al., 2000). So trugen die Agrobakterien neben dem Zielvektor mit der zu inserierenden T-DNA Sequenz ein Ti-Plasmid (Tumor induzierendes). Dieses kodiert für Gene, deren Genprodukte für das Einbringen der Fremd-DNA in die Pflanzenzellen essentiell sind (Clough and Bent, 1998; Tzfira and Citovsky, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die *CRY2*-Konstrukte (WT, W321A, Y399A, Y399F) in den Vektor pB7RWG2C.term. für Komplementationsstudien in *cry2*-defiziente *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit Col-0 Hintergrund gebracht werden.

3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *A. tumefaciens*

Puffer und Reagenzien

YEB-Medium	5 g/L Rinderextrakt, 1 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 0,3 g/L MgSO ₄ , (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)
Gentamycin	60 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 µg/mL
Rifampicin	50 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 µg/mL
NaCl	0,15 M in Aqua bidest.
CaCl₂	20 mM in Aqua bidest.

Die Basis für die Transformation von *Arabidopsis* durch die *Floral Dip* Methode sind Agrobakterien, die das Transgen tragen. Dazu wurden *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen zunächst chemisch kompetent gemacht.

Mit einer Einzelkolonie des Stammes GV3101 pMP90 wurde eine 20 mL Übernachtskultur mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 28 °C und 250 rpm kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurden 500 mL frisches YEB auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt. Diese Hauptkultur wurde erneut bei 28 °C und 250 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 erreicht wurde. Dann wurden die Zellen 10 min mit 4500 rpm abzentrifugiert und in 100 mL Natriumchlorid-

Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 4500 rpm wurden die Bakterien in 10 mL eiskalter Calciumchlorid-Lösung resuspendiert. In 100 mL Aliquots wurden die nun chemisch kompetenten *Agrobacterium*-Zellen bei -80 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

3.3.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Puffer und Reagenzien

YEB-Medium	5 g/L Rinderextrakt, 1 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 0,3 g/L MgSO ₄ , (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)
Spectinomycin	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 20 µg/mL
Gentamycin	60 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 µg/mL
Kanamycin	100 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 50 µg/mL
Rifampicin	50 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 µg/mL
Infiltrationsmedium	10 mM MgCl ₂ , 10 mM MES/KOH (pH 5,6), 150 µM Acetosyringon

Zur Transformation des *Agrobacterium*-Stammes GV3101 pMP90 mit dem Zielvektor wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 5 µL Plasmid-DNA versetzt. Nach 5 min Inkubation auf Eis folgten 5 min Kälteschock in flüssigem Stickstoff und 5 min Hitzeschock bei 37 °C. Danach wurde der Transformationsansatz mit 1 mL YEB-Medium versetzt und für 2-4 h bei 28 °C und 300 rpm inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen geerntet (3 min, 4000 rpm) und der Überstand dekantiert. Die Bakterien wurden auf selektiven YEB-Platten ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert bis Kolonien erschienen.

3.3.3 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Puffer und Reagenzien

YEB-Medium	5 g/L Rinderextrakt, 1 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 0,3 g/L MgSO ₄ , (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)
Spectinomycin	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 20 µg/mL
Gentamycin	60 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 µg/mL
Kanamycin	100 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 50 µg/mL
Rifampicin	50 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 µg/mL
Infiltrationsmedium	10 mM MgCl ₂ , 10 mM MES-KOH (pH 5,6), 150 µM Acetosyringon

Im Vorfeld der stabilen Integration in *Arabidopsis* wurden die Konstrukte in Tabakpflanzen getestet. Dafür wurden Übernachtkulturen sowohl von den Agrobakterien, angesetzt, die den Zielvektor sowie das Konstrukt p19 trugen. Durch die Expression von p19 wurde ein Genprodukt erzielt, welches posttranskriptionelles *Gene Silencing* reprimiert und somit eine höhere Ausbeute des Zielproteins erreicht (Canto et al., 2006; Hsieh et al., 2009; Voinnet et al., 2003). Jeweils 3 mL YEB wurden mit einer Kolonie des entsprechenden Genotyps angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 250 rpm inkubiert. Nach ca. 14 h Inkubation wurden jeweils 2 mL der Kultur in 4 mL frisches Medium (mit entsprechenden Antibiotika) überführt. Nach erneuter Inkubation bei 28 °C und 250 rpm für 4 h wurden die Zellen geerntet (4 °C, 4000 rpm, 15 min) und in 1 mL eiskaltem Infiltrationsmedium resuspendiert. Mit diesem wurden die Kulturen jeweils auf eine OD₆₀₀ von 0,7-0,8 gebracht. Dabei wurden alle Ansätze mit dem Zielvektor im Verhältnis 1:1 mit Zellen, die das p19 Konstrukt trugen, gemischt. Dies sollte gewährleisten, dass nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur durch Konjugation eine Coinfiltration von Zielvektor und p19 erfolgen kann. Die Tabakpflanzen wurden ca. 4 h vor der Infiltration gewässert und mit einer Plastikhaube abgedeckt, um durch die hohe Luftfeuchtigkeit ein Öffnen der Stomata zu erreichen. Die Infiltration der Zellen in die Pflanzen erfolgte mittels Spritzen ohne Kanülen in die Blattunterseite durch die geöffneten Stomata. Die Pflanzen wurden anschließend wieder in Klimakammern überführt und für weitere 2-3 Tage kultiviert, um eine möglichst hohe Menge an Zielproteine zu erhalten. Die Konstrukte wurden schließlich über *Western Blot* verifiziert (s. Kapitel 3.5.5).

3.3.4 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Puffer und Reagenzien

YEB-Medium	5 g/L Rinderextrakt, 1 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 0,3 g/L MgSO ₄ , (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)
Spectinomycin	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 20 µg/mL
Gentamycin	60 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 µg/mL
Rifampicin	50 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 µg/mL
Inokulationsmedium	5% (w/v) Sucrose, 0,05% (v/v) Silwet L-77 (Momentive Performance Materials GmbH)

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens* wurden die Pflanzen bis zur Bildung von sekundären Interfloreszenzen auf Erde unter Langtag-Bedingungen angezogen.

Zwei Tage vor der Transformation wurden mit jeweils einer Einzelkolonie der entsprechenden *Agrobacterium*-Genotypen Übernachtskulturen angeimpft (5 mL YEB mit entsprechenden Antibiotika) und bei 28 °C und 250 rpm kultiviert. Nach ca. 14 h wurden die entsprechenden Kulturen in jeweils 100 mL frischem YEB (mit entsprechenden Antibiotika) inokuliert und erneut bei 28 °C und 250 rpm inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet (15 min, 4000 rpm) und mit Inokulationsmedium auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,8 eingestellt. Zum *Dippen* der Pflanzen wurden Erlenmeyerkolben mit einem genügend breiten Durchmesser genommen: Darin wurden alle oberirdischen Teile der Pflanzen in Inokulationsmedium getaucht und für ca. 30 s darin geschwenkt. Um eine hohe Transformationseffizienz zu erzielen, wurden unmittelbar vor der Transformation offene Blüten entfernt. Die Pflanzen wurden dann in Eimer überführt, aus denen sie nicht herausragen, und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Um eine geringe Lichtintensität zu erzielen, wurden die Eimer zusätzlich mit weißem Karton abgedeckt und schließlich in eine Klimakammer mit Langtag-Bedingungen überführt. Nach ein bis zwei Tagen konnten alle Abdeckungen entfernt und die Pflanzen bis zur Samenreife weiterkultiviert werden.

3.3.5 Selektion und Zucht von transgenen *Arabidopsis thaliana*

Puffer und Reagenzien

BASTA®-Lösung	200 µg/mL BASTA®-Stammlösung (Aventis), 0,05% (v/v) Silwet L-77 (Momentive Performance Materials GmbH)
----------------------	--

Zur Etablierung transgener *Arabidopsis*-Linien wurden die Samen der *gedipten* Pflanzen geerntet. Diese entsprechen im Fall einer erfolgreichen Transformation der T₁-Generation und sind hinsichtlich des Transgens heterozygot (Abbildung 14). Da die inserierte T-DNA neben dem Zielgen noch für einen Selektionsmarker kodiert, konnten die Transformanten mittels BASTA® Selektion identifiziert und anschließend weiterkultiviert werden. BASTA®, oder auch Phosphinothricin ist ein Herbizid, welches die Glutamin-Synthetase und in weiterer Folge die Photosynthese hemmt.

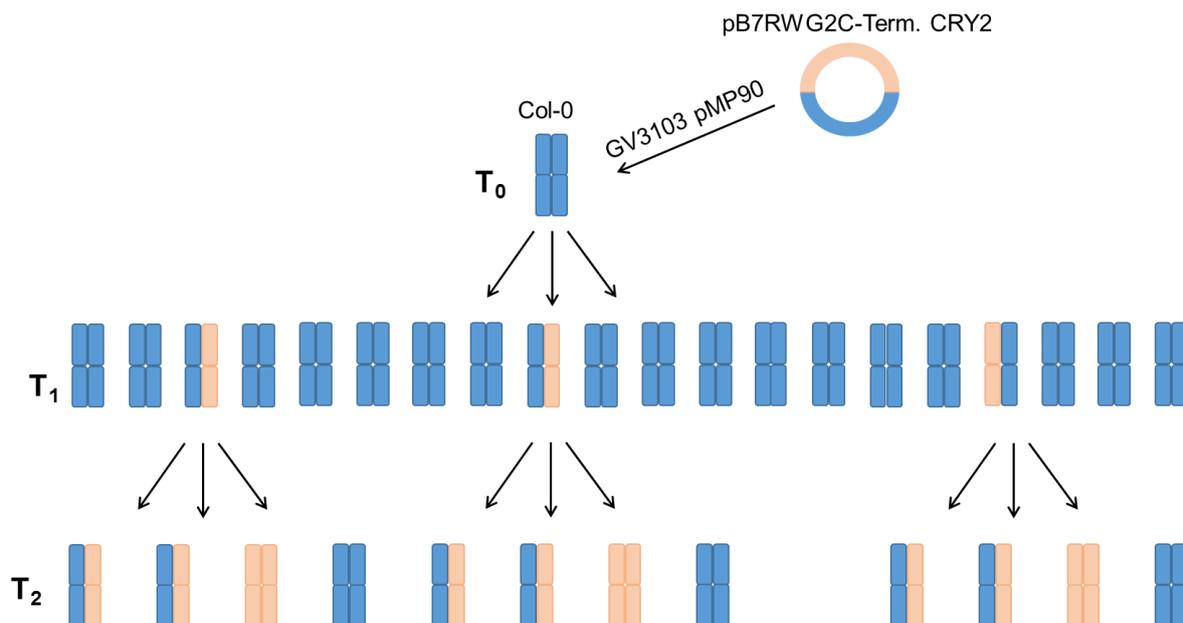


Abbildung 14: Etablierung transgener *Arabidopsis thaliana* Linien mittels *Floral Dip*. Nach dem *Dippen* der T₀-Generation mit transgenen Agrobakterien (GV3101 pMP90 pB7RWG2C-term. CRY2/CRY2) wurden die T₁-Samen geerntet und nach BASTA®-Selektion der aus ihnen hervorgehenden Keimlinge die heterozygot transgenen Linien weiterkultiviert. Deren Samen (T₂) konnten schließlich geerntet werden und mit dieser Generation weitere Experimente erfolgen (nach Christian Michalski, 2017).

Für die Selektion wurden die geernteten T₁-Samen nach einer Samenruhe von 2 Wochen bei 4 °C dicht auf Erde ausgesät. Ungefähr eine Woche nach Keimung wurden die Pflanzen dreimal im Abstand von zwei Tagen mit der BASTA®-Arbeitslösung besprüht. Die

überlebenden Keimlinge produzieren das Enzym Phosphinothricin-Acetyl-Transferase aus *Streptomyces viridochromogenes* als Genprodukt des BASTA®-Resistenzgens. Sie sind somit heterozygot hinsichtlich des inserierten Transgens und wurden bis zur Samenreife weiterkultiviert. Die Ernte der T₂-Samen erfolgte für jede Pflanze separat, da jede dieser Pflanzen auf ein Transformationsevent zurückgeht und somit einer unabhängigen Linie entspricht. Da für die nachfolgenden Studien die sehr aufwendige Zucht bis zur Homozygotie nicht notwendig ist, wurden sämtliche weiterführende Experimente mit der T₂-Generation gemacht. Dazu wurden mittels *Western Blot* pro Genotyp mindestens drei unabhängige Linien identifiziert, die eine genügend hohe Expressionsrate des Zielgens aufwiesen.

3.4 Proteininteraktionsstudien mittels Hefe-2-Hybrid-System

Zur Untersuchung der ATP- und Lichtabhängigkeit der cry2-Dimer- bzw. Oligomerisierung wurde sich des Hefe-2-Hybrid-Systems bedient. Diese Methode basiert grundlegend auf der Komplementation des Transkriptionsfaktors GAL4: Dessen zwei Domänen, DNA-Bindedomäne (BD) und Aktivierungsdomäne (AD), wurden jeweils an eines der zu untersuchenden Proteine fusioniert. Im Falle der Interaktion wird der Transkriptionsfaktor wiederhergestellt und spezielle Reportergene exprimiert.

3.4.1 Herstellung chemisch kompetenter Hefe

Puffer und Reagenzien

YPD-Medium	20 g/L Pepton, 10 g/L Hefe-Extrakt, 20 g/L Glukose, (für Platten: 20 g/L Bacto-Agar)
1,1x TE/LiAC	110 mM Lithiumacetat, 11 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1,1 mM EDTA, steril

Zur Herstellung chemische kompetenter Hefe wurde der Stamm Y2H Gold zuvor auf YPD-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation von ungefähr drei Tagen bei 30 °C erschienen die ersten Kolonien. Eine Kolonie wurde in 3 mL YPD inokuliert und bei 30 °C und 250 rpm über Nacht inkubiert. Nach ca. 14 h wurden mit dieser Übernachtkultur 50 mL frisches YPD

angepflegt. Diese Hauptkultur wurde für ca. 20 h weiter bei 30 °C und 250 rpm kultiviert bis eine OD₆₀₀ von 0,15 bis 0,3 erreicht war. Dann wurden die Zellen geerntet (1000 rcf, 5 min) und in 100 mL YPD resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubationsphase von 3 bis 5 h bei 30 °C und 250 rpm bis eine OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 erreicht war. Anschließend wurden die Zellen erneut geerntet (1000 rcf, 5 min) und mit 30 mL sterilem Aqua bidest. gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1000 rcf, 5 min) wurden die Zellpellets in 1,5 mL 1,1x TE/LiAC aufgenommen. Nach kurzem Zentrifugieren bei Maximalgeschwindigkeit für 15 s wurden die Zellpellets in 600 µL 1,1x TE/LiAC resuspendiert und konnten direkt für eine Transformation weiterverwendet werden.

3.4.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Puffer und Reagenzien

NaCl-Lösung	0,9% NaCl in Aqua bidest, steril
PEG/LiAC	40% (w/v) PEG 3350, 100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, steril
DMSO	steril
Carrier-DNA	10 µg/µL Lachssperma-DNA (Clontech)
Double Drop-Out Medium (- Trp, -Leu)	6,7 g/L Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 20 g/L Glukose, 1,54 g/L Aminosäure-Mischung ohne Trp und Leu (Sigma-Aldrich), 15 g/L Bacto-Agar

Unmittelbar vor der Transformation der kompetenten Hefezellen wurde die *Carrier-DNA* 5 min bei 95 °C denaturiert und direkt im Anschluss auf Eis gestellt. Pro Transformationsansatz wurden 5 µL der *Carrier-DNA* mit 100 ng der Zielvektoren, welche für die jeweiligen Fusionen aus Zielprotein und GAL4-Domäne kodieren, gemischt und anschließend mit 100 µL kompetenten Zellen versetzt. Nach vorsichtigem Mischen durch Invertieren wurden pro Probe 500 µL PEG/LiAC zugesetzt. Es folgte ein Inkubationsschritt von 30 min bei 30 °C, währenddessen die Proben im Abstand von 10 min immer wieder vorsichtig geschüttelt wurden. Nach der Zugabe von 20 µL DMSO wurden die Transformationsansätze im Wasserbad bei 42 °C für 15 min inkubiert. Danach wurden die Zellen bei Maximalgeschwindigkeit für 15 s pelletiert und anschließend in 1 mL YPD aufgenommen. Nach erneuter Inkubation bei 30 °C für 30 min wurden die Zellen geerntet (Maximalgeschwindigkeit, 15 s) und anschließend in 100 µL NaCl-Lösung resuspendiert. Dann

wurden die unterschiedlichen Transformationsansätze auf selektiven *DropOut*-Platten ausgestrichen und für 3 bis 5 Tage bei 30 °C inkubiert bis Kolonien sichtbar wurden. Als Selektionsmarker dienten dabei Aminosäureauxotrophien, sodass transformierte Zellen durch die integrierten Reportergene in der Lage waren, auf Mangelmedium zu wachsen.

3.4.3 Interaktionsanalyse mittels Minimalmedium

Puffer und Reagenzien

NaCl-Lösung	0,9% NaCl in Aqua bidest, steril
Double Drop-Out-Medium (- Trp, -Leu)	6,7 g/L Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 20 g/L Glukose, 1,54 g/L Aminosäure-Mischung ohne Trp und Leu (Sigma-Aldrich), 15 g/L Bacto-Agar
Triple Drop-Out Medium (- Trp, -Leu, -His)	6,7 g/L Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 20 g/L Glukose, 1,46 g/L Aminosäure-Mischung ohne Trp, Leu, His (Sigma-Aldrich), 15 g/L Bacto-Agar
Quadruple Drop-Out-Medium (- Trp, -Leu, -His, -Ade)	6,7 g/L Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 20 g/L Glukose, 1,39 g/L Aminosäure-Mischung ohne Trp, Leu, His, Adenin (Sigma-Aldrich), 15 g/L Bacto-Agar
Qintruple Drop-Out-Medium (-Trp, -Leu, -His, -Ade, + Aureobasidin A)	Clontech

Als *Readout* für eine Interaktion konnten beim verwendeten Hefestamm Y2H Gold mehrere Genprodukte dienen: Drei verschiedene GAL4 gesteuerte Promotoren sind fest ins Genom integriert, die die Expression von vier verschiedenen Reportern regulieren. Diese Reportergene kodieren für Genprodukte, welche Histidin- sowie Adenin-Auxotrophie und die Resistenz gegenüber dem für Hefe letalen Antibiotikum Aureobasidin A erlauben.

Zur Analyse putativer Interaktionen über Auxotrophie oder Antibiotikaresistenz gegenüber Aureobasidin A wurde das Wachstum der transformierten Hefezellen auf Minimalmedium untersucht. Dazu wurden pro Transformationsansatz jeweils neun Transformanten auf eine entsprechende Platte mit *DropOut*-Medium überführt. Dazu wurden die Kolonien in 15 µL NaCl-Lösung inokuliert und davon jeweils 2 µL auf die entsprechenden Platten getropft. Als Kontrolle wurden dabei alle zu analysierenden Transformanten parallel auf *Double DropOut*-Medium angezogen. Um einen möglichen Lichteffect der Interaktion zu untersuchen, wurden

alle Ansätze in doppelter Ausführung hergestellt: Eine Hälfte der Platten wurde im Dunkeln, die andere Hälfte in $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 471 \text{ nm}$) bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ für 7 Tage inkubiert.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Puffer und Reagenzien

LB-Medium	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, (für Platten: 15 g/L Bacto-Agar)
Spectinomycin	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 20 $\mu\text{g/mL}$
IPTG	1 M in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 1 mM
PBS	8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,8 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,24 g/L KH_2PO_4

Die Expression der C-terminal verkürzten cry2-Versionen erfolgte in *E. coli*-Zellen mit dem IPTG-induzierbarem Duet-Vektor pCDFDuet-1. IPTG wirkt als künstlicher Induktor des *lac*-Operons durch Binden des spezifischen Repressors. Auf diese Weise ist der T5-Promotor zugänglich und die Expression des Zielgens wird ermöglicht. Da IPTG anders als Laktose nicht metabolisierbar ist, blieb dessen Konzentration während des gesamten Experiments konstant und eine durchgehend hohe und regulierbare Expression war gewährleistet.

Testkinetiken zu Beginn bestätigten die Expressionsbedingungen, die auf Orth et al. (Orth et al., 2017) basieren. Analog dazu wurde klassisches LB-Medium, eine Temperatur von $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und 1 mM IPTG als Expressionsbedingungen für alle weiterführenden Experimente gewählt.

Zu Beginn der Expression wurde abends am ersten Tag eine Übernachtskultur angesetzt. Dazu wurden 50 mL LB-Medium mit entsprechender Antibiotikumkonzentration mit einer *E. coli*-Kolonie eines frischen Transformationsansatzes inokuliert. Nach Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 250 rpm für circa 14 h wurden am nächsten Morgen jeweils 2 mL der Übernachtskultur in jeweils sechs neue Schikanekolben mit 50 mL LB und Antibiotikum überführt. Diese Vorkulturen wurden erneut für 6 bis 8 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 250 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden mit den

sechs Vorkulturen jeweils sechs Expressionskulturen angeimpft. Diese sechs Hauptkulturen wurden zunächst bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,3 bis 0,4 bei 37 °C und 150 rpm angezogen. Erst dann wurde die Temperatur auf 25 °C runterreguliert. Sobald die exponentielle Phase (OD_{600} von 0,6-0,8) erreicht worden ist, wurde die Expression des Zielgens mit IPTG induziert. Da cry2 lichtlabil ist, wurden von der Induktion an alle weiterführenden Arbeiten, Proteinaufreinigung eingeschlossen, im Dunkeln bzw. rotem Sicherheitslicht ausgeführt.

Nach circa 14 h Expression wurden die Zellen am darauf folgenden Tag geerntet. Dazu wurden die Expressionskulturen bei 4 °C und 4500 rpm für jeweils 20 min abzentrifugiert. Die resultierenden Zellpellets wurden mit PBS gewaschen und erneut bei 4 °C und 4500 rpm für 90 min zentrifugiert. Die Lagerung der Zellen bis zur Weiterverwendung erfolgte bei -80 °C.

3.5.2 Proteinextraktion

3.5.2.1 Denaturierender Gesamtproteinextrakt aus Keimlingen oder Tabak

Puffer und Reagenzien

5x SDS-Probenpuffer	225 mM Tris-HCl (pH 6,8), 250 mM DTT, 5% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
----------------------------	--

Zur Gesamtproteinextraktion aus *Arabidopsis*-Keimlinge wurden diese nach einer Vernalisationsphase (3 d, 4 °C) für vier Tage auf nassem Filterpapier angezogen. Die Anzucht erfolgte im Dunkeln, um den Hintergrund bei *Western Blots*, hervorgerufen durch Massenproteine aus den Chloroplasten, zu verringern. Des Weiteren können so besonders hohe Mengen vom Zielprotein cry2 erzielt werden. Für die Proteinextraktion aus *N. benthamiana* wurde transformiertes Blattmaterial 2-3 Tage nach Infiltration geerntet.

Das Pflanzenmaterial wurde mit einer Zelmühle (30 Hz, 30 s) in Anwesenheit von zwei Stahlkugeln aufgeschlossen, wobei es zwischen den drei Zyklen immer wieder in flüssigem Stickstoff runtergekühlt wurde. Im Anschluss wurden die Proben mit 2,5x SDS-Probenpuffer versetzt (100 µL Puffer pro 100 Keimlinge) und für 25 min bei 95 °C aufgeköcht. Um Zellreste zu entfernen, wurde zuletzt bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Die Überstände mit dem gelösten Gesamtprotein wurden bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

3.5.2.2 Denaturierender Gesamtproteinextrakt aus *E. coli***Puffer und Reagenzien**

5x SDS-Probenpuffer	225 mM Tris-HCl (pH 6,8), 250 mM DTT, 5% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
----------------------------	--

Die Gesamtproteinextraktion aus *E. coli* für SDS-PAGE oder *Western Blots* erfolgte analog zum Gesamtextrakt aus *Arabidopsis*: Geerntete *E. coli*-Zellpellets wurden direkt in 1x SDS-Probenpuffer (50 µL Puffer pro mL Kultur) aufgekocht (95 °C, 10 min). Zum Entfernen von Zellresten wurde im Anschluss bei Maximalgeschwindigkeit 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

3.5.2.3 Nativer löslicher Proteinextrakt aus *E. coli***Puffer und Reagenzien**

Sørensens Phosphat Puffer A	0,2 M Na ₂ HPO ₄ in Aqua bidest.
Sørensens Phosphat Puffer B	0,2 M NaH ₂ PO ₄ in Aqua bidest.
Lysozym	10 mg/mL in Aqua bidest.
Protease-Inhibitoren	200 mM Benzamidin in Aqua bidest., 0,8 mM E-64 in Aqua bidest., 1,5 mM Pepstatin A in Methanol und Essigsäure (9:1), 100 mM PMSF in Ethanol
2x <i>E. coli</i> Lyse-Puffer	100 mM Phosphat (42 mL Sørensens Puffer A + 8 mL Sørensens Puffer B pro 100 mL), 600 mM NaCl, 20% (v/v) Glycerol, 1% (v/v) Triton X-100, 20 mM Imidazol
1x <i>E. coli</i> Lyse-Puffer	<i>E. coli</i> Lyse Puffer, 10 mM β-Mercaptoethanol, 10 mM Benzamidin, 14 µM E-64, 8,8 µM Pepstatin A, 4,5 mM PMSF 1 g/mL Lysozym

Für die Aufreinigung von heterolog exprimierten Proteinen und anschließend deren proteinbiochemische Charakterisierung ist ausschließlich lösliches Protein verwendbar. Für die Extraktion von löslichem Protein wurden Zellpellets, in denen das Zielgen exprimiert wurde, bei Raumtemperatur aufgetaut und mit 1x *E. coli* Lyse-Puffer versetzt (2–3 mL Puffer pro Gramm Pellet).

Das Aufbrechen der Zellen erfolgte mittels einer *French Press* in Gegenwart von Lysozym: Die in *E. coli* Lyse-Puffer resuspendierten Pellets wurden drei Zyklen *French Press* bei 1000 psi Druck unterzogen. Anschließend wurden aus den Proben die Zellreste entfernt mittels Zentrifugation bei 18.000 rpm und 4°C für 1,5 h und anschließender Filtration durch einen 0,45 µm Filter. Die enthaltenen Extrakte wurden für die Proteinaufreinigung direkt weiterverwendet.

3.5.2.4 Nativer löslicher Proteinextrakt aus Sf21-Insektenzellen

Puffer und Reagenzien

Lyse Puffer	200 mM NaCl, 50 mM Phosphat (21 mL Sørensens Puffer A + 4 mL Sørensens Puffer B pro 100 mL), 0,1% Triton X-100, 10% Glycerol
--------------------	--

Die Expression des Zielproteins in Sf21-Zellen erfolgte durch Mitarbeiter der Gruppe von M. Ahmad in Paris, sodass für das Gewinnen von aufgereinigtem Protein nur die lösliche Proteinextraktion sowie dessen Aufreinigung anstanden. Dazu wurden die Zellpellets zunächst auf Eis aufgetaut. Aufgrund des Fehlens einer Zellwand bei tierischen Zellen, war zum Aufschließen der Zellen keine Behandlung mit Lysozym oder *French Press* notwendig, sondern das Zusetzen eines Detergenz war ausreichend. Die Zellpellets wurden in Lyse-Puffer (pro mL Pellet 10 mL Puffer) resuspendiert und anschließend eine Stunde auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde eine Stunde bei 18.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und durch 0,45 µm-Filteraufsätze filtriert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine.

3.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.5.3.1 Amidoschwarz-Methode

Puffer und Reagenzien

Amidoschwarz-Lösung	Amidoschwarz bis zu einer OD ₆₁₅ von 10, 90% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig
Waschlösung	90% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Eisessig
Natronlauge	0,2 M
Proteinstandard	10 mg/mL BSA-Stammlösung

Zur Konzentrationsbestimmung eines Gesamtproteinextraktes oder eines Gemisches an löslichen Proteinen war die Amidoschwarz-Methode die Methode der Wahl (Popov et al., 1975). Dabei wurde es sich zu Nutze gemacht, dass Proteine, wenn sie den Farbstoff Amidoschwarz kovalent gebunden haben, spezifisch bei 615 nm absorbieren. Auf diese Weise konnte die Proteinkonzentration indirekt photometrisch über die OD₆₁₅ bestimmt werden. Die Basis dafür war, dass zuvor eine Eichgerade mit Proteinstandards bestimmt wurde, um mittels der gemessenen OD₆₁₅ auf die eingesetzte Proteinmenge schließen zu können.

Es wurden jeweils 10 µL einer Probe mit unbekannter Proteinkonzentration eingesetzt und mit Aqua bidest. auf 200 µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Je 800 µL Amidoschwarz-Lösung wurden zugegeben und anschließend kräftig gemischt durch Vortexen. Nach Zentrifugation (12 min, 10.000 rcf, RT) wurden die Pellets mit jeweils 1 mL Waschlösung gewaschen und wieder zentrifugiert (12 min, 10.000 rcf, RT). Nach dem Trocknen der Pellets wurden die nun an Amidoschwarz gebundenen Proteine durch Zugabe von 1 mL Natronlauge in Lösung gebracht und schließlich die OD₆₁₅ der Proben bestimmt. Als *Blank* wurde dabei eine Probe genutzt, die kein Protein enthielt, aber genauso wie die anderen Proben behandelt wurde.

3.5.3.2 Spektroskopische Methode

Die Konzentration an aufgereinigtem cry2 wurde, anders als Proteingemische, nicht über die Amidoschwarz-Methode bestimmt. Aufgrund des charakteristischen Absorptionsspektrums des Flavin-Cofaktors wurde dieses zur Konzentrationsbestimmung herangezogen. Dabei

wurde davon ausgegangen, dass alles im Dunkeln oder rotem Sicherheitslicht gehaltene cry2 im Verhältnis 1:1 vollständig mit oxidiertem FAD besetzt ist.

Das vollständig oxidierte FAD zeigt im nicht-kovalent gebundenen Zustand zwischen 400 und 500 nm ein dreigipfliges Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 450 nm. Mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes kann nun die Konzentration von cry2 indirekt über den molaren Extinktionskoeffizienten des gebundenen Flavins bei 450 nm berechnet werden:

$$c = \frac{Abs}{\epsilon \cdot d}$$

Formel 3: Lambert-Beersches Gesetz. Wobei Abs , gemessene Absorption des gebundenen FAD_{ox} bei 450 nm; d , Schichtdicke der Küvette [cm]; ϵ , molarer Extinktionskoeffizient des gebundenen FAD_{ox} bei 450 nm = $11,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Burney et al., 2009); c , Konzentration des gebundenen FAD_{ox} [mM] ist.

3.5.4 Elektrophorese von Proteinen

3.5.4.1 Denaturierende SDS-PAGE nach Lämmli

Puffer und Reagenzien

Lämmli-Puffer	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 1% (w/v) SDS
Protein-Größenstandard	PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific
Trenngel (10%)	10% (v/v) Acrylamid, 0,265% (v/v) Bisacrylamid, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS
Sammelgel (3,5%)	3,5% (v/v) Acrylamid, 0,13% (v/v) Bisacrylamid, 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,2% (w/v) SDS
Abdichtgel	1 mL Trenngel + 16 μL 10% (w/v) APS + 2,4 μL TEMED
Polymerisationsstarter	10% (w/v) APS, TEMED
5x SDS-Probenpuffer	225 mM Tris-HCl (pH 6,8), 250 mM DTT, 5% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Proteinmarker	BlueStar Prestained Protein Marker (Nippon Genetics)

Die SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis) nach Lämmli (Laemmli, 1970) ist ein elektrophoretisches Trennverfahren von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen. Dabei wird sich des Detergenzes SDS bedient, welches kovalent an die zu trennenden Proteine bindet. Damit wird dafür gesorgt, dass alle Proteine die gleiche negative Formalladung tragen und die Auftrennung nur nach der Größe der Proteine hin zur Anode geschieht. Aus diesem Grund wurden die zu trennenden Proteingemische zuvor in 1x SDS-Probenpuffer aufgeköcht.

Das diskontinuierliche Polyacrylamidgel bestand dabei aus zwei Phasen: Sammel- und Trenngel. Diese beiden wiesen neben einer unterschiedlichen Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentration einen unterschiedlichen pH-Wert auf. Dies führte dazu, dass innerhalb des grobporigen Sammelgels mit niedrigerem pH die Proteinproben auf eine Lauffront gebracht werden und es erst innerhalb des feinporigeren Trenngels mit höherem pH zur Auftrennung des Gemisches kommt. Somit entstanden scharfe Proteinbanden.

Pipettierschema für 2 Gele:	Trenngel (10%)	Sammelgel (3,5%)
20% Acrylamid + 0,53% Bisacrylamid	5 mL	1,25 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 mL	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,25 mL
Aqua bidest.	2,5 mL	2,45 mL
10% SDS	100 µL	100 µL
10% APS	40 µL	37,5 µL
TEMED	6 µL	2,5 µL

Für die SDS-PAGE wurde das Mini Protean® 3 Cell System (BIO-RAD, München) genutzt. Nach dem o.g. Pipettierschema wurden die Phasen des Gels zusammenpipettiert. Zu Anfang wurden 300 µL Abdichtgel (1 mL des Trenngels mit 16 µL 10%igem APS und 2,4 µL TEMED) zwischen die beiden Glasplatten, die das Gel halten, gegossen. Nach dessen Auspolymerisieren wurde das Trenngel gegossen, welches mit Aqua bidest. überschichtet wurde, um eine gerade Oberfläche zu schaffen. Nach dessen vollständiger Polymerisation

folgte schließlich das Sammelgel. Bei diesem wurden die so genannten Gelkämme eingefügt, um Aussparungen im Gel für die Probestaschen zu schaffen.

Für die Elektrophorese wurden die Probestaschen des vollständig polymerisierten Gels mit circa 5 µg (*E. coli*) bis 30 µg (*Arabidopsis*/Tabak) Proteinextrakt befüllt. Die Zwischenräume in der Elektrophoresekammer wurden mit Lämmli-Puffer gefüllt, um einen kontinuierlichen Stromfluss zu ermöglichen. Die Auftrennung erfolgte schließlich bei konstant 25 mA pro Gel und maximal 300 V für etwa 45 min. Danach erfolgte entweder die Detektion der Proteine auf dem Gel mittels Coomassie-Färbung oder der Transfer dieser auf eine Membran zur *Western Blot* Analyse.

3.5.4.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Puffer und Reagenzien

Färbelösung	0,05% (w/v) Coomassie R250, 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig
Entfärbelösung	10% (v/v) Eisessig

Zur Sichtbarmachung der Proteine im Anschluss an eine SDS-PAGE erfolgte die Detektion mittels des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie. Dieser bindet an basische Seitenketten der Aminosäuren und erlaubt damit eine Färbung der Proteine.

Dazu wurden die entsprechenden Gele in Coomassie-haltiger Färbelösung für circa 2 min in einer Mikrowelle aufgekocht. Danach erfolgte die Inkubation der Gele über Nacht in 10%iger Essigsäure auf einem Tischschüttler zur Reduktion des Hintergrundes, sodass die Proteinbanden sichtbar wurden.

3.5.5 *Western Blot*

Um ein Zielprotein in komplexen Proteingemischen zu detektieren, wurde der so genannte *Western Blot* durchgeführt (Towbin et al., 1992). Dabei folgte auf eine SDS-PAGE ein Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Protein-bindende Membran. Auf dieser konnte das Zielprotein immunologisch nachgewiesen werden.

3.5.5.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran (*Wet Blot*)**Puffer und Reagenzien**

Transfer Puffer	20% (v/v) Methanol, 48 mM Tris-HCl (pH \geq 9), 39 mM Glycin, 0,0372% (w/v) SDS
Blotting-Papier	MN 218 B (Macherey & Nagel, Düren)
Nitrocellulosemembran	Porablot NCP (Macherey & Nagel, Düren)

Beim *Wet Blot* erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Protein-bindende Membran per Elektro-*Blotting*. Dabei waren alle Komponenten vollständig mit Puffer überschichtet, sodass ein Stromfluss gewährleistet war.

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden Gel, Membran und *Blotting*-Papier für circa 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Danach erfolgte der luftblasenfreie Zusammenbau der vorgekühlten Komponenten. Der Transfer auf die Nitrocellulosemembran in Richtung Anode erfolgte für 1 h bei konstant 100 V und maximal 0,35 A. Um starkem Erhitzen vorzubeugen, wurde zusätzlich ein Kühlpack mit in den Puffertank gegeben.

3.5.5.2 Immunodetektion

Puffer und Reagenzien

Blocking-Puffer	7,5% (w/v) Milchpulver in TBS
TBS	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl
TBS-T	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% (v/v) Tween20
primäre Antikörper	1:1000 (α CCT2) oder 1:2000 (α Tubulin, α His ₆) in TBS-T
sekundäre Antikörper	1:10.000 in TBS-T

Vor der Immunodetektion wurde die Membran nach dem Transfer durch *Blocken* abgesättigt, um unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran und somit starken Hintergrund zu verhindern. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in *Blocking*-Puffer inkubiert. Im Anschluss daran

erfolgte der immunologische Nachweis der Zielproteine. Dabei wird grundlegend zwischen primären und sekundären Antikörpern unterschieden: Primäre Antikörper binden spezifisch an das Zielprotein, wohingegen sekundäre Antikörper den jeweiligen primären als Antigen erkennen. Erst die sekundären Antikörper ermöglichen die Detektion im Anschluss, beispielsweise über eine Fluoreszenzmarkierung. Da mehrere sekundären Antikörper an einen primären binden können, erfolgt auf diese Weise eine Signalverstärkung.

Nach dem Blocken der Membran folgten drei Waschzyklen à 10 min mit TBS-T. Daraufhin wurde die Membran entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach erneuten drei Waschgängen (10 min in TBS-T) erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Nach zweimal zehninütigem Waschen mit TBS-T und einem abschließenden Waschschrift mit TBS erfolgte die Detektion.

3.5.5.3 Nachweis der Proteine mittels *Enhanced Chemiluminescence*

Puffer und Reagenzien

Luminol/Enhancer Lösung	Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD, München)
Peroxid-Lösung	
Kodak developer & replenisher	Röntgenfilm-Entwickler, über Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kodak fixer	Röntgenfilm-Fixierer, über Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Waschbad	Wasser mit etwas Essigsäure
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences, Freiburg
Hypercassette™	Amersham Biosciences, Freiburg

Die Detektion der Zielproteine ist maßgeblich anhängig von der Wahl des sekundären Antikörpers, da es verschiedene Arten der *Western Blot* Detektion gibt. Bei der so genannten ECL- (*Enhanced Chemiluminescence*) Methode ist der sekundäre Antikörper an eine Peroxidase (i.d.R. aus Meerrettich) gekoppelt. Diese ist in der Lage, enzymatisch Wasserstoffperoxid umzusetzen und damit in Gegenwart von Luminol eine chemilumineszente Reaktion zu starten. Diese Lichtemission kann durch Auflegen eines Films sichtbar gemacht werden. Diese Methode der *Western Blot* Detektion ist extrem sensitiv. Des Weiteren zeichnet

sie sich oft durch einen geringeren Hintergrund aus, weswegen sie gerade bei pflanzlichen Proben das Mittel der Wahl ist.

Für die ECL-Detektion wurden die beiden Substrat-Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran darin für 5 min unter Schütteln inkubiert, um die Reaktion zu starten. Für eine Membran der Größe 6 cm x 8 cm wurden insgesamt 7 mL Substrat benötigt. Im Anschluss an die initiiierende Inkubation wurde die Membran in eine Klarsichtfolie eingeschweißt, um einem Austrocknen der Membran und damit einem Abbrechen der Reaktion vorzubeugen. Zur Detektion der ECL-Reaktion wurde unter schwachem Rotlicht ein Film auf die Membran aufgelegt. In Abhängigkeit von der Signalstärke wurde der Film unterschiedlich lang exponiert (10 s bis 30 min). Schließlich wurde dieser durch Inkubation im Entwicklerbad für 1 min entwickelt und durch Inkubation im Fixierbad für 10 min fixiert. Zwischendrin erfolgt ein Waschschrift im Waschbad.

3.5.5.4 Nachweis der Proteine mittels LICOR *Odyssey Infrared Imaging System*

Eine Alternative zur ECL-Detektion ist die Detektion mittels Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpern. Mit dem *Odyssey Infrared Imaging System* der Firma LICOR können die Fluorophore IRDye700 und IRDye800 der sekundären Antikörper mit 689 nm bzw 778 nm angeregt werden. Die Emission wird mittels eines Scanners detektiert. Aufgrund der zwei Kanäle zur Anregung und Emissionsdetektion können zwei unterschiedliche Zielproteine gleichzeitig detektiert werden. Des Weiteren ist im Gegensatz zur ECL-Reaktion eine Quantifizierung möglich, da eine Linearität zwischen Zielproteinmenge und Signalintensität besteht.

3.5.5.5 *Strippen* der Membran

Puffer und Reagenzien

Stripping-Puffer 62,5 mM Tris-HCl, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS

Da bei einer ECL-Detektion nicht zwei Zielproteine gleichzeitig detektierbar sind, müssen bei dieser Methode gegebenenfalls Antikörper wieder abgelöst werden können, damit die Detektion eines zweiten Proteins erfolgen kann. Beim *Strippen* der Membran werden die Antikörper mittels SDS denaturiert. In Kombination mit dem Reduktionsmittel β -

Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken spaltet, kann im Anschluss an die Behandlung eine erneute Immunodetektion erfolgen.

Zum *Stripping* der Antikörper wurde die Membran 20 min bei 65 °C in *Stripping*-Puffer inkubiert (ca. 20 mL pro Membran). Nach drei Waschstufen (10 min mit TBS-T) konnte eine erneute Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper erfolgen (s. Kapitel 3.5.5.2)

3.5.6 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* und Sf21-Zellen

3.5.6.1 Ni²⁺ NTA-Affinitätschromatographie

Puffer und Reagenzien

Sørensens Phosphat-Puffer A	0,2 M Na ₂ HPO ₄ in Aqua bidest.
Sørensens Phosphat-Puffer B	0,2 M NaH ₂ PO ₄ in Aqua bidest.
Puffer A1: No-Imidazole-Puffer	50 mM Phosphat pH 7,5 (21 mL Sørensens Puffer A + 4 mL Sørensens Puffer B pro 100 mL), 200 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 10 mM β-Mercaptoethanol
Puffer B1: High-Imidazole-Puffer	50 mM Phosphat pH 7,5 (21 mL Sørensens Puffer A + 4 mL Sørensens Puffer B pro 100 mL), 200 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 500 mM Imidazol
HisTrap HP 1 mL	1 mL Säulenvolumen, max. Druck 0,3 MPa, max. Flussrate 1 mL/min, (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
HisTrap FF crude 1 mL	1 mL Säulenvolumen, max. Druck 0,3 MPa, max. Flussrate 1 mL/min, (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
ÄKTA Wasser	Aqua bidest. mit 0,02% Natriumazid

Proteine mit sechsfachem Histidin-*Tag* (His₆-*Tag*) können mittels *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC) aufgereinigt werden. Das Prinzip dahinter beruht darauf, dass die Imidazolringe der His-*Tags* durch Nickelionen gebunden werden. Die Nickelionen selbst sind an vier der sechs Koordinationsstellen durch den Komplexbildner Nitrilotriessigsäure (NTA) an

eine Sepharosematrix assoziiert. Dementsprechend stehen zwei Koordinationsstellen für die Bindung mit den freien Elektronenpaaren des Stickstoffs eines Imidazolrings zur Verfügung.

Die gebundenen Histidin-*getagten* Proteine werden nach der Bindung an die Matrix einem Waschschrift unterzogen, um ungebundene Proteine herauszuwaschen. Die Elution des Zielproteins erfolgt schließlich, indem die Konzentration des Strukturanalogons Imidazol schrittweise so weit erhöht wird, dass Histidin aus der Bindung verdrängt wird.

Die Aufreinigung erfolgte mittels eines ÄKTA *Purifiers* der Firma Amersham analog zum publizierten Protokoll von Pokorny et al. (Pokorny et al., 2005). Dazu wurden die nativen löslichen Proteinextrakte von *E. coli*- oder Sf21-Zellen nach Zentrifugation und Filtration direkt weiterverwendet. Der gesamte Prozess der Aufreinigung erfolgte unter rotem Schutzlicht bei 4 °C und erfolgte für *E. coli* sowie Sf21-Extrakte gleichermaßen mit dem einzigen Unterschied, dass für die Aufreinigung des *E. coli*-Lysats die *Fast Flow* Säule und für Sf21-Lysat die *High Performance*-Säule genutzt wurde. Vor Beginn der eigentlichen Aufreinigung wurden System und Systemschläuche zunächst mit Wasser gespült. Die Säulen, die gemäß Herstellerangaben auf 20%igem Ethanol gelagert werden, wurden mit mindestens 5 Säulenvolumen Wasser gespült. Danach erfolgte die Äquilibration von System, Systemschläuchen und Säulen mit Puffer auf die gleiche Art.

Die Aufreinigung des löslichen Proteinlysats beinhaltete mehrere Schritte. Nach einer erneuten Äquilibration der Säule wurde das Lysat mit 1 mL/min Flussrate auf die Säule geladen und anschließend ungebundenes Protein herausgewaschen. Bei allen Schritten betrug die Imidazolkonzentration konstant 2%, um unspezifische Bindungen an die Säule zu verringern. Das Eluieren des Zielproteins erfolgte mit einem linearen Konzentrationsgradienten an Imidazol von 2% bis 100%.

Schritt	Anteil <i>High Imidazol-Puffer</i>	Imidazol-konzentration	Säulen-volumen
Äquilibrierung der Säule	2%	10 mM	3
Laden des Proteinlysats	2%	10 mM	variabel
Herauswaschen von ungebundenem Protein	2%	10 mM	20
Elution	2-100%	10–500 mM	35
<i>Gradient Delay</i>	100%	500 mM	8
Reäquilibrierung der Säule	2%	10 mM	3

Durch Detektoren, welche Absorptionen bei den verschiedenen Wellenlängen 280 nm, 260 nm, 450 nm messen, konnten die unterschiedlichen Aufreinigungsschritte mit- bzw. nachverfolgt werden.

3.5.6.2 Größenausschlusschromatographie

Puffer und Reagenzien

Sørensens Phosphat-Puffer A	0,2 M Na ₂ HPO ₄ in Aqua bidest.
Sørensens Phosphat-Puffer B	0,2 M NaH ₂ PO ₄ in Aqua bidest.
Laufpuffer	50 mM Phosphat pH 7,5 (21 mL Sørensens Puffer A + 4 mL Sørensens Puffer B pro 100 mL), 200 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 10 mM β-Mercaptoethanol
Superdex 200 10/300 GL	24 mL Säulenvolumen, max. Druck 1,5 MPa, max. Flussrate 0,4 mL/min, (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
Proteinstandards	2 mg/mL Cytochrome C (12,4 kDa), 3 mg/mL Carbonanhydrase (29 kDa), 10 mg/mL Albumin (66 kDa), 4 mg/mL β-Amylase (200 kDa), 2 mg/mL Blue Dextran (2000 kDa; alle: Sigma Aldrich) in Laufpuffer
ÄKTA Wasser	Aqua bidest. mit 0,02% Natriumazid

Bei der Größenausschlusschromatographie beruht die Reinigung auf einer Trennung der Proteine anhand ihrer Größe. Dem zu Grunde liegt die unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeit innerhalb einer porösen Matrix: Kleine Moleküle sind in der Lage, in die Poren der Matrix einzudringen: Folglich wird ihr Diffusionsvolumen und damit einhergehend ihre Retentionszeit im Gegensatz zu größeren Molekülen deutlich erhöht. Die Auftrennung ist also genau anders herum als bei einer SDS-PAGE: Kleinere Moleküle wandern deutlich langsamer durch die Matrix als größere.

Anwendung findet die Größenausschlusschromatographie nicht nur zum Zwecke der Aufreinigung von Proteinen, sondern auch zum Umpuffern und zur nativen Größenbestimmung.

Nach Waschen und Äquilibrieren von System, Systemschläuchen und Säule mit jeweils zwei Säulenvolumen wurde die Säule zunächst mit Proteinstandards kalibriert. Dazu wurden dieselben Konditionen genutzt wie bei der späteren Probe auch. Nach dem Durchlauf der eigentlichen Probe konnte nun anhand der Kalibrierung die Größe des Zielproteins abgeschätzt werden.

3.5.6.3 Entsalzung und Ankonzentrieren

Puffer und Reagenzien

Sørensens Phosphat-Puffer A	0,2 M Na ₂ HPO ₄ in Aqua bidest.
Sørensens Phosphat-Puffer B	0,2 M NaH ₂ PO ₄ in Aqua bidest.
Lagerungspuffer	50 mM Phosphat pH 7,5 (21 mL Sørensens Puffer A + 4 mL Sørensens Puffer B pro 100 mL), 200 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol, 10 mM β-Mercaptoethanol
Membrankonzentrator	Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices mit 30 kDa <i>Cut-off</i> (Millipore)

Nach der Aufreinigung von Proteinlysat mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie war das aufgereinigte Protein mit hohen Konzentrationen an Imidazol versetzt, welche zum Ausfallen des Proteins führen können. Aus diesem Grund war es essentiell, das störende Imidazol auf eine Konzentration von unter 1 mM herauszuverdünnen. Dies geschah mit Hilfe von Membrankonzentratoren mit einem *Cut-off* von 30 kDa. Das bedeutet, dass Moleküle mit

einem Molekulargewicht von unter 30 kDa durch Zentrifugation abgetrennt werden können. Da dies neben einem entsalzenden auch einen ankonzentrierenden Effekt auf die Proteinlösung hat, wurde sich dieser Methode auch bedient, um die Proteinfractionen nach der Aufreinigung anzukonzentrieren. Dabei wurde nach Herstellerangaben mehrmals bei 4500 rpm bei 4 °C für 12 min zentrifugiert. Zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten wurde die Proteinlösung immer wieder durch Auf- und Abpipetieren durchmischt, um Präzipitation vorzubeugen. Nach Entsalzung waren die Proteinlösungen lagerfähig bei -80 °C.

3.6 Spektroskopische Methoden

Die spektroskopische Charakterisierung des aufgereinigten Cryptochroms erfolgte mittels UV-Vis-, Fluoreszenz- und EPR-Spektroskopie.

3.6.1 UV-Vis Spektroskopie

Puffer und Reagenzien

DTT-Stammlösung	1 M DTT in Aqua bidest.
Interferenzfilter 450 nm	DAL 450, 39% Transmission, 12 nm Bandbreite (Schott, Mainz)

Bei der UV-Vis-Spektroskopie kann die Absorption einer Substanz im Ultravioletten (UV) und sichtbaren Spektrum (Vis von engl. *visible*) der elektromagnetischen Strahlung bestimmt werden. Diese kommt dabei durch den Übergang von Valenzelektronen aus niedrigeren energetischen Zuständen in höherenergetische Zustände zustande: Die Elektronen gehen von dem höchstbesetzten Molekülorbital, dem HOMO (*highest occupied molecular orbital*), in das darüberliegende unbesetzte Molekülorbital, das LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*), über. Dabei muss das zu absorbierende Photon genau diese Energiedifferenz innehaben. Die Energie elektromagnetischer Strahlung ist dabei von ihrer Wellenlänge abhängig:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

Formel 4: Einstein-Bohr-Gleichung. Wobei E , Energie; h , Plancksches Wirkungsquantum; c , Lichtgeschwindigkeit; λ , Wellenlänge ist.

Im Zuge dieser Arbeit wurde die UV-Vis-Spektroskopie genutzt, um den FAD-Kofaktor des Cryptochroms zu charakterisieren: Anhand der spezifischen Absorptionsspektren der verschiedenen Redoxzustände kann die Photoreduktion verfolgt werden.

Das verwendete Photometer ist ein Zweistrahlphotometer, welches die Absorption der Probe gegen eine Referenzküvette mit Puffer misst. Nichtsdestotrotz musste zuvor eine reine Puffermessung erfolgen, um die *Baseline* zu bestimmen. Für die Messungen wurden in der Regel 20 μM Protein eingesetzt, um auswertbare Ergebnisse zu erzielen. Als externes Reduktionsmittel wurden in allen Studien 10 mM DTT zugesetzt, um die Photoreduktion zu ermöglichen. Die Bestrahlung erfolgte mittels einer gekühlten Xenon-Lampe, deren Emission durch Verwendung eines Interferenzfilters auf 450 nm reguliert wurde. Die verwendete Lichtintensität betrug $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Da Photoreduktion sowie Dunkelreversion auch Temperatur abhängig sind, wurden alle Messungen bei konstant 15 °C durchgeführt.

3.6.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Bei der Fluoreszenz-Spektroskopie wird die Lichtemission einer Substanz in Folge von Absorption elektromagnetischer Strahlung gemessen. Dabei gilt das Stokessche Gesetz $\lambda_{\text{em}} > \lambda_{\text{abs}}$: Die Wellenlänge der emittierten Strahlung muss größer als die der absorbierten Strahlung sein. Es kommt folglich zur so genannten Rotverschiebung.

Durch die Absorption eines Photons werden Elektronen in einen höherenergetischen Zustand gehoben. In diesem verweilen sie für kurze Zeit und fallen schließlich unter Emission von elektromagnetischer Strahlung in den Grundzustand zurück. Im Gegensatz zur Phosphoreszenz geschieht dies ohne Spinumkehr der Elektronen und geschieht somit um ein Vielfaches schneller.

Durch Cryptochrom gebundenes FAD zeigt keine Fluoreszenz, da diese vom Protein gequencht wird. Sobald es aber beispielsweise durch Präzipitation zur Freilassung des Kofaktors kommt, kann ein extremer Anstieg der Fluoreszenz beobachtet werden. Dies wurde

sich zu Nutze gemacht, um die aufgereinigten cry2-Versionen genauer zu charakterisieren. Dabei wurden jeweils 4 μM Protein mit 450 nm angeregt und die resultierende Emission zwischen 480 nm und 780 nm gemessen. Die genutzte Spaltbreite bei Anregung und Emission betrug jeweils 10 nm.

3.6.3 Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie

Die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (kurz: ESR oder engl. EPR) ist eine Methode, mit welcher Moleküle mit ungepaarten Elektronen detektiert werden können. Grundlage dafür ist das Aufspalten der entarteten Energiezustände eines Radikals in einem äußeren Magnetfeld. In Folge dessen kann die Absorption im Mikrowellenspektrum gemessen und daraus Rückschlüsse auf die paramagnetische Umgebung gezogen werden.

Um für aufgereinigtes Cryptochrom 2 die Bildung des semireduzierten FAD-Radikals, FADH^\bullet , zu detektieren, wurden jeweils 400 μL 70 μM Protein pro Messung eingesetzt. Die Proben wurden zuvor für 25 min bei Raumtemperatur mit 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$) bestrahlt und schließlich mit flüssigem Stickstoff auf 130 K heruntergekühlt. Die Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Olaf Burghaus (FB Chemie).

3.7 Protein-Ligand-Studien

3.7.1 ThermoFAD

Puffer und Reagenzien

Metabolit-Stammlösung	0,1 M Metabolit (AMP-PNP, ADP, ATP, NAD, NADH, NADP, NADPH) in Aqua bidest.; 41 mM 3-Bromo-7-nitroindazol in DMSO
------------------------------	---

Mittels ThermoFAD kann qualitativ die Bindung zwischen einem Liganden und einem Flavin-haltigen Protein nachgewiesen werden kann (Forneris et al., 2009). Diese Methode beruht auf dem stabilisierenden Effekt, welchen die Bindung eines Liganden auf das Protein ausübt. Die Stabilisation kann dann über die Schmelzpunkterhöhung des Proteins nachgewiesen werden:

Das Protein wird mit dem Liganden schrittweise erhitzt bis der Flavin-Kofaktor durch Präzipitieren des Proteins freigelassen und damit ein Anstieg der Fluoreszenz detektiert werden kann. Bei diesem schrittweisen Erhitzen eines Proteins ist irgendwann ein Punkt erreicht, ab dem die native Struktur thermodynamisch instabil wird und sich das Protein beginnt, zu entfalten. Dabei ist der Schmelzpunkt T_m eines Proteins definiert, als die Temperatur, bei der die native und entfaltete Form des Proteins im Gleichgewicht liegen, wobei es einen direkten Zusammenhang zwischen der Schmelztemperatur eines Proteins und der freien Enthalpie ΔG der Entfaltungsreaktion gibt (Brandts and Lin, 1990; Matulis et al., 2005). Dieser Punkt entspricht dem Wendepunkt der sigmoidalen Kurve, die sich ergibt, wenn die aus dem Entfalten von cry2 resultierende FAD-Fluoreszenz gegen die Temperatur geplottet wird. Aufgrund der damit einhergehenden Exposition hydrophober Aminosäuren an der Oberfläche des Proteins, kommt es zu dessen Aggregation und der Schmelzpunkt eines Proteins wird auch als Temperatur der hydrophoben Exposition T_h bezeichnet. Die Bindung von Liganden hat nachweislich Auswirkungen auf die Schmelztemperatur des Proteins. Wobei die durch die Ligandenbindung hervorgerufene Temperaturänderung ΔT proportional von Bindungskonstante und Ligandenkonzentration abhängig ist (Matulis et al., 2005). Im Fall von cry2 wird die Schmelztemperatur bestimmt, indem die FAD-Fluoreszenz gemessen wird. Diese geht auf das Entlassen des non-kovalent gebundenen Kofaktors zurück.

Um die Metabolit-Bindung der aufgereinigten Proteine zu untersuchen, wurden diese schrittweise in dessen Anwesenheit (0,1, 1 bzw. 10 mM Endkonzentration) mit dem Thermocycler *Rotor-Gene Q* (Qiagen, Hilden) erhitzt. Die resultierende Fluoreszenz wurde detektiert und über die resultierenden Schmelzkurven der jeweilige Schmelzpunkt bestimmt.

3.7.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Puffer und Reagenzien

ITC-Puffer	50 mM HEPES/NaOH (pH 8,0), 200 mM NaCl, 10% Glycerol, 5 mM β -Mercaptoethanol, 25 mM EDTA
ATP	0,2 mM ATP (Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz; Roth) in ITC-Puffer

Da ThermoFAD eine indirekte Methode ist, um rein qualitativ die Bindung zwischen Protein und Ligand zu bestimmen, sollte dies zusätzlich auf eine quantitative Art erfolgen. Aus diesem Grund wurde die Affinität der aufgereinigten Proteine und ATP mittels ITC (*Isothermal Titration*

Calorimetry) quantifiziert. Dabei werden enthalpische Änderungen, hervorgerufen durch die Protein-Ligand-Bindung, gemessen. Darauf basierend können zahlreiche thermodynamische Größen wie Dissoziationskonstante (K_D) und Bindungsenthalpie (ΔH) bestimmt werden, sodass eine thermodynamische Charakterisierung dieser Bindung möglich ist.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass der Ligand zur Proteinklösung in der Probenzelle des Kalorimeters titriert wird und nach jedem Titrationsschritt enthalpische Änderungen gemessen werden. Dies geschieht, indem Wasser innerhalb einer Referenzzelle auf die gleiche Temperatur wie die Lösung in der Probenzelle gebracht und dabei gemessen wird, welche Energie pro Zeiteinheit dafür benötigt wird. Durch Integration der resultierenden Peaks wird das Verhältnis zwischen der freigesetzten (exotherme Reaktion) oder benötigten (endotherme Reaktion) Wärmemenge und dem steigenden Verhältnis der Konzentrationen an Protein und Ligand aufgetragen. Daraus resultiert eine Bindungskurve, anhand deren Steigung die Assoziationskonstante K_A und das entsprechende molare Verhältnis der Reaktanten (Bindungsstöchiometrie) abgelesen werden kann. Mittels der Bindungsenthalpie, die an der Energiemenge in der Sättigung der Bindungskurve abgelesen werden kann, können über die Gibbsche Gleichung die Freie Gibbsche Energie (ΔG) sowie die Entropie (ΔS) berechnet werden:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S$$

Formel 5: Gibbsche Gleichung. Wobei ΔG , Freie Gibbsche Enthalpie; ΔH , Bindungsenthalpie; ΔS , Entropie; R , Allgemeine Gaskonstante; T , absolute Temperatur; K , Assoziationskonstante ist.

Für ITC-Messungen wurden zur Vergleichbarkeit von Mutanten und Wildtyp jeweils die gleichen Mengen an Protein und Ligand eingesetzt: Jeweils 0,2 mM ATP wurde zu 260 μ L 40 μ M cry2 titriert. Das Protein wurde vor der Messung in 1 L entgastem ITC-Puffer über Nacht bei 4 °C dialysiert, da Phosphat oder Tris basierte Puffer aufgrund ihrer thermodynamischen Instabilität für ITC-Experimente ungeeignet sind. In dem entstehenden Dialysat wurde das ATP unmittelbar vor der Messung gelöst. Zu Beginn wurde mit einer Wasser-in-Wasser-Messung überprüft, ob das Gerät intakt und sauber war. Bei der Messung wurden schließlich in 13 Titrationsschritten jeweils 3 μ L des Metaboliten zum Protein titriert. Als Kontrolle wurde die Verdünnungsenthalpie von ATP in Puffer gemessen und im Falle einer Bindung von der Bindungsenthalpie von Protein und ATP subtrahiert.

3.7.3 Partielle Proteolyse mit Trypsin

Puffer und Reagenzien

Trypsin-Stammlösung	200 μ M, aus Rinderpankreas, TPCK behandelt, \geq 10.000 BAEE Einheiten pro mg Protein (Sigma-Aldrich)
Trypsin-Puffer	50 μ M HCl, 1 μ M CaCl ₂
5x Stopp-Puffer	5 mM EDTA & 5 mM PMSF in 5x SDS-Probenpuffer (225 mM Tris-HCl (pH 6,8), 250 mM DTT, 5% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau)
ATP	1 M (Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz; Roth) in Aqua bidest.

Mittels der partiellen Proteolyse mit Trypsin können indirekt Konformationsänderungen eines Proteins untersucht werden (Halliday et al., 1984; Partch et al., 2005). Der Hintergrund dabei ist, dass bei Konformationsänderungen bestimmte Bereiche des Proteins für die Protease nicht mehr zugänglich sind und es dementsprechend zu Änderungen im Fragmentmuster kommt. Dieses kann nach einer Separation mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung visualisiert werden.

Für die Proteolyse von aufgereinigtem cry2 unter unterschiedlichen Bedingungen wurden jeweils 10 μ M Protein mit 10 mM DTT vorgelegt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze entweder mit 1 mM ATP oder dem gleichen Volumen Puffer versetzt, sodass das Gesamtvolumen 19 μ L entsprach. Nach 10 min Inkubation bei 15 °C wurden den Proben jeweils 1 μ L Trypsin-Stammlösung oder für die Kontrolle ohne Protease das gleiche Volumen Trypsin-Puffer zugesetzt. Die anschließende Inkubation erfolgte für 10 oder 30 min bei 30 °C. Danach wurden die Reaktionsansätze mit jeweils 5 μ L 5x Stopp-Puffer gemischt und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Die Separation erfolgte auf einem vorgegossenen Gradientengel (BIO-RAD) per SDS-PAGE (s. Kapitel 3.5.4) und anschließender Coomassie-Färbung der Proteinbanden.

3.7.4 Cross-Linking

Puffer und Reagenzien

Formaldehyd	37% mit ca. 10% Methanol zur Stabilisation
Tris/HCl	0,5 M, pH 6,8
5x SDS-Probenpuffer	225 mM Tris-HCl (pH 6,8), 250 mM DTT, 5% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
ATP	1 M (Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz; Roth) in Aqua bidest

Zur Untersuchung des Dimer- bzw. Oligomerisierungsverhaltens von *cry2 in vitro* wurde das Protein unter verschiedenen Bedingungen (\pm ATP, Licht) mittels *Cross-Linking* untersucht. Dabei wurde es sich zu Nutze gemacht, dass bei schwachen Proteininteraktionen diese durch das Einsetzen von Quervernetzern detektiert werden können, indem kovalente Bindungen zwischen den einzelnen Proteinmonomeren erzeugt werden. Die Selektivität der Reaktion hängt dabei von der Größe der Quervernetzer ab. Kleine Moleküle wie Formaldehyd zeigen eine höhere Selektivität als größere Moleküle. Formaldehyd reagiert dabei mit primären Aminen wie der Aminogruppe von Proteinen in einer Kondensationsreaktion zu einer Schiffschen Base als Intermediat. Diese reagiert mit einem zweiten Protein weiter, indem eine kovalente Bindung entsteht. Zum Quenchen der Reaktion werden Verbindungen wie Tris oder Glycin in hohen Konzentrationen zugegeben, die mit dem Quervernetzer abreagieren.

In einem 20 μ L Reaktionsansatz wurden 10 μ M Protein mit 10 mM DTT gemischt. Um den Effekt von ATP auf die Dimer- bzw. Oligomerisierung zu untersuchen, wurde die Hälfte der Proben mit 1 mM ATP versetzt. Die Ansätze wurden mit 0,5-4% Formaldehyd für 10-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Lichtabhängigkeit zu untersuchen, wurde währenddessen mit 100 μ mol $m^{-2} s^{-1}$ Blaulicht bestrahlt. Zur Visualisierung der *Cross-Linking*-Produkte wurden die Reaktionsansätze mit 1x SDS-Probenpuffer bei 95 °C aufgeköcht, anschließend mittels SDS-PAGE auf einem Gradientgel separiert und schließlich mit Coomassie gefärbt.

3.7.5 HDX-MS

Puffer und Reagenzien

Stopp-Puffer	400 mM H ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 2,2
ATP	0,1 M (Adenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz; Roth) in Aqua bidest

Um putative Konformationsänderungen genauer untersuchen zu können, wurde das aufgereinigte Protein über *Hydrogen/Deuterium-Exchange Mass Spectrometry* (HDX-MS) untersucht. Dabei wird dieses in Deuterium-haltigem Puffer inkubiert und anschließend mit Pepsin verdaut und die resultierenden Fragmente massenspektrometrisch analysiert (LC-MS). Die Basis für das Experiment ist der Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium in das zu untersuchende Protein (Englander et al., 1997). Abhängig von ihrer Umgebung, werden Wasserstoff-Atome innerhalb des Proteins unterschiedlich schnell gegen Deuterium ersetzt. Im Zuge dieser Methode werden nur Austausche von Wasserstoffen der Amidgruppen der Aminosäuren untersucht, da nur diese Austausche in einem messbaren Bereich liegen. Wasserstoffe, die direkt an ein Kohlenstoff gebunden sind, werden nicht bzw. nur extrem langsam ausgetauscht und solche, die an Seitenketten gebunden sind, werden zu schnell ausgetauscht, sodass dieser Austausch ebenfalls nicht messbar ist (Engen and Wales, 2015). Je exponierter eine Region des Proteins ist, desto höher ist dessen Wasserstoff/Deuterium-Austauschrate. Dies ist zum einem mit der besseren Zugänglichkeit in exponierten Bereichen zu begründen, zum anderen wird der Austausch nicht mehr durch Wasserstoffbrückenbindungen blockiert. Folglich können mit dieser Methode strukturelle Änderungen sowie Ligandbindungstaschen innerhalb eines Proteins bestimmt werden.

Es wurde ein kommerziell erwerbliches Setup (SYNAPT G2-Si, Waters) mit Autosampler (LEAP Technologies), ACQUITY UPLC M-Class System (Waters) und HDX Manager (Waters) genutzt. Dabei wurden die lichtexponierten Bereiche der Geräte mit Alufolie abgedeckt, um das Protein vor Licht zu schützen. Für jeden der beiden LCMS-Läufe (0 und 1 mM ATP), wurden 7,5 µL Protein (50 µM) in ein frisches Gefäß pipettiert und mit 61,8 µL H₂O- (t₀) bzw. D₂O-basiertem Puffer verdünnt. Nach einer Inkubation für bestimmte Zeitpunkte (0, 10, 100, 1000, 10.000 s), wurden jeweils 55 µL der Lösung abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß mit ebenfalls 55 µL auf 1 °C vorgekühltem Stopp-Puffer überführt. Nach dem Quenchen der Reaktion, wurden 95 µL dieser Lösung auf die Enzymate BEH Pepsin-Säule (HDX manager, Waters) geladen. Dazu wurde das Gemisch mit 0,1% Methansäure und einer Flussrate von 100 µL/min bei 20 °C aufgetrennt. Die resultierenden Peptide wurden bei 0,5 °C

mit einer C18-Trap Säule aufgefangen und bei 0,5 °C mit einer 1 x 100 mm ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 µm Säule (Waters) mit einer Flussrate von 30 µL/min aufgetrennt. Dazu wurde folgender Gradient der Lösungsmittel A (0,1% Ameisensäure in Wasser) und B (0,1% Ameisensäure in Acetonitril) verwendet: Linearer Anstieg von 5% B zu 35% B innerhalb von 7 min, gefolgt vom Anstieg auf 85% B für 1 min und anschließendem Halten von 85% B für 2 min. Als letztes wurde die Säule für 1 min mit 95% B gewaschen und mit 5% B reäquilibriert. Für die Detektion der t_0 -Probe wurde der *Enhanced high definition* MS (HDMS_e) Modus verwendet, wohingegen für die deuterierten Proben der *High Definition* (HDMS) Modus genutzt wurde. Die *Lock* Massenspektren wurden alle 45 s mit Glu-fibrinopeptide B als Standard ($M^{2+} = 785.8427$ m/z) gemessen. *Blank*-Läufe wurden zwischen den einzelnen Messungen durchgeführt, um Verunreinigungen vorzubeugen. Peptide des Messzeitpunktes t_0 wurden mit ProteinLynx Global SERVER 3.0.1 (Waters) identifiziert. Die anschließende Auswertung der deuterierten Proben erfolgte mit DynamX 3.0 (Waters). Als minimale Peakintensität wurden 103 counts angenommen. Außerdem wurden nur Fragemente mit einer Länge zwischen 4 und 15 aa ausgewertet. Als Standardabweichung wurde 4σ angenommen, um die Varianz zwischen den einzelnen Wiederholungen zu berechnen. Der Versuch wurde von Dr. Wieland Steinchen durchgeführt.

3.8 Unterstützer der praktischen Arbeit

Name	Methode	Ergebnis
Dr. Olaf Burghaus, FB Chemie	EPR-Spektroskopie	Abbildung 31
Dr. Uwe Linne, FB Chemie	MALDI-TOF	Abbildung 19
Dr. Wieland Steinchen, FB Chemie	HDX-MS	Abbildung 34, Anhang A7

4. Ergebnisse

Um die ATP-Bindung von *A. thaliana* Cryptochrom 2 näher zu untersuchen, wurde sich mehrerer *in planta*- und *in vitro*- Analysen bedient. Dazu wurden zum einen cry2-Versionen mit einem Austausch innerhalb der postulierten ATP-Bindestelle in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt und zum anderen ebendiese Versionen für Komplementationsstudien in *cry2*-defiziente *Arabidopsis*-Pflanzen eingebracht.

4.1 Expression und Aufreinigung von Proteinen

Für die proteinbiochemischen Analysen der ATP-Bindung von *A. thaliana* Cryptochrom 2 wurden sowohl Volllängen- als auch C-terminal verkürzte Konstrukte genutzt (Abbildung 15, Anhang A2-A4).



Abbildung 15: Im Zuge der *in vitro*-Analysen genutzte Cryptochrom 2-Versionen. His₆, N-terminales *Tag* aus sechs Histidinen; PHR, *Photolyase Homologous Region*; CTE, C-terminale Extension. Die jeweiligen Mutationen der verkürzten Versionen sind angegeben. Die Zahlen geben jeweils die Länge der Proteine in Aminosäuren an. Das Volllängenprotein hat eine Masse von 73,5 kDa und die verkürzten Versionen von ca. 59 kDa. Sequenzen sind im Anhang A2-A4 aufgeführt.

Da sich die Expression von Volllängenversionen der *A. thaliana* Cryptochrome 1 und 2 in *E. coli* als nicht erfolgreich herausgestellt hat, wurden verkürzte Versionen hierfür genutzt, welche sich auf die PHR-Domäne (495 aa) mit N-terminalem His₆-Tag beschränken. Neben dem WT-Konstrukt als Kontrolle wurden mutierte cry2-Versionen mit einem Austausch des Tyr-399 zu Phenylalanin sowie zu Alanin genutzt. Diese dienten zur Analyse des Tyr-399 als vorhergesagt wichtige Position für ATP-Bindung (Anhang A1) und weiterer

proteinbiochemischer Charakterisierung der ATP-Bindung *in vitro*. In einer weiteren verkürzten cry2-Version zur heterologen Expression in *E. coli* wurde das oberflächenständige Tryptophan der Trp-Triade, Trp-321, gegen ein Alanin ausgetauscht. Um zu prüfen, ob sich die C-terminal verkürzten Versionen hinsichtlich ATP-Bindung wie die Vollängenversionen verhalten, wurde ein WT-Konstrukt mit N-terminalem His₆-Tag für die Expression in Insektenzellen genutzt.

4.1.1 Aufreinigung der PHR-Domänen

Die Expression der verkürzten Konstrukte (Abbildung 15), welche mittels klassischer Klonierung über Restriktionsschnittstellen hergestellt wurden (s. Kapitel 3.2.5), erfolgte über den IPTG-induzierbaren Vektor pCDFDuet-1 in BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen. Dabei beruhten die gewählten Expressionsbedingungen auf Orth et al. (2017), welche mit Testexpressionen über einen Zeitraum von 24 h hinsichtlich der Ausbeute an löslichem Protein überprüft wurden. Die Expressionen für die nachfolgenden Proteinaufreinigungen erfolgten jeweils mit zweimal 9 L *E. coli*-Kulturen unter rotem Sicherheitslicht. Die gewählten Bedingungen erlaubten Ausbeuten an löslichem Protein, die ausreichend für die nachfolgenden biochemischen Analysen waren. Der primäre Schritt der Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie über den ÄKTA-Purifier (GE Healthcare) im Sicherheitslicht. Dabei konnte die gesamte Aufreinigung über die Detektion der Absorptionen bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 450 nm (oxidiertes FAD) verfolgt werden. Um einen bestmöglichen Reinheitsgrad zu erzielen, wurden verschiedene Aufreinigungsbedingungen getestet. Dabei wurde zwischen verschiedenen Salzkonzentrationen, unterschiedlich langen Waschperioden des an der Säule gebundenen Proteins, der Zugabe von Detergenz zum Waschpuffer sowie unterschiedlichen Nickel-Säulen variiert. Es hat sich hierbei gezeigt, dass die höchste Reinheit der Proteine mit der dicht gepackten *High-Performance*-Nickel-Säule und einer hohen NaCl-Konzentration (1 M) im Puffersystem erzielt werden konnte (Abbildung 16). Die größten Verunreinigungen konnten im Vergleich zu anderen Aufreinigungsbedingungen deutlich reduziert werden (Abbildung 17).

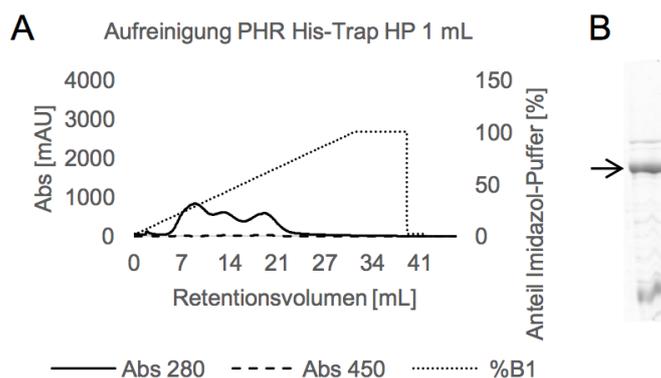


Abbildung 16: Beispielhafte Aufreinigung der PHR-Domänen über die *High Performance Nickel-Säule*. **(A)** Chromatogramm des Elutionsschrittes der Aufreinigung von cry2 WT PHR mit dem ÄKTA-*Purifier* mit kontinuierlich ansteigender Imidazolkonzentration im *High-Imidazole-Puffer* B1. Der Waschpuffer, mit dem zuvor das an der Säule gebundene Protein gewaschen wurde, enthielt 1 M NaCl. Die Absorptionen bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 450 nm (FAD_{ox}) wurden detektiert, um die Elution nachverfolgen zu können. Die drei entstandenen Peaks wurden gepoolt und ankonzentriert. **(B)** Reinheit des aufgereinigten Proteins. Der Pfeil kennzeichnet die cry2 PHR-Bande in einem Coomassie-gefärbten Gel, welche nachfolgend mittels *Western Blot* verifiziert wurde.

Jedoch stellte sich diese Vorgehensweise aus zwei Gründen für die nachfolgenden Aufreinigungen als nicht praktikabel heraus: Zum einen führte der dichte Packungsgrad der *High Performance-Säule* innerhalb kürzester Zeit zum Verstopfen dieser, sodass nur extrem geringe Volumina an Lysat auf die Säule geladen werden konnten. Zum anderen war das reinere Protein weder stabil, es präzipitierte selbst unter Schutzlicht und bei 4 °C innerhalb von Minuten, noch war es photoreduzierbar. Auch die Verwendung eines Tris-basierten Puffers zeigte keinerlei Wirkung zum Vorbeugen der Präzipitation. Demzufolge wurden die Aufreinigungsbedingungen so angepasst, dass zwar keine hohen Reinheitsgrade, dafür aber stabile und spektroskopisch aktive Proteine erhalten werden konnten. Somit wurden eine weniger dicht gepackte Nickel-Säule (*Fast Flow-Säule*) und niedrigere Salzkonzentrationen (0,2 M) in den Puffern verwendet (Abbildung 17). Die Zusammensetzung der standardmäßig genutzten Pufferbedingungen ist in Kapitel 3.5.2.3 aufgeführt.

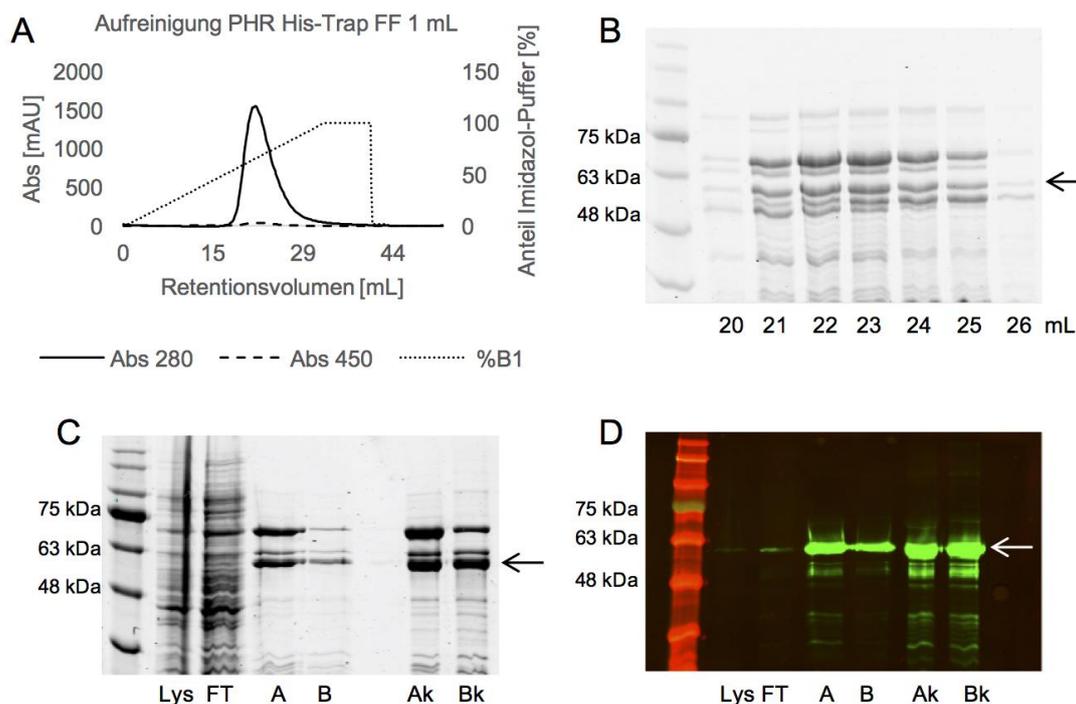


Abbildung 17: Beispielhafte Aufreinigung der PHR-Domänen über die *Fast Flow* Nickel-Säule. (A) Chromatogramm des Elutionsschrittes der Aufreinigung von cry2 WT PHR mit dem ÄKTA-Purifier bei kontinuierlich ansteigender Imidazolkonzentration im *High-Imidazole*-Puffer B1. Der Waschpuffer, mit dem zuvor das an der Säule gebundene Protein gewaschen wurde, enthielt 0,2 M NaCl. Die Absorptionen bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 450 nm (FAD_{ox}) wurden detektiert, um die Elution nachverfolgen zu können. Die Fraktionen des entstandenen Peaks wurden per SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft (B). Demzufolge wurden die Fraktionen der Retentionsvolumina 21 bis 25 mL gepoolt und ankonzentriert. (C, D) zeigen ein Coomassie-Gel (C) und einen *Western Blot* mit α His₆-Antikörper (D) einer repräsentativen Aufreinigung über die *Fast Flow*-Säule, indem auf die Säule geladenes Lysat (Lys), Durchfluss (FT), der gepoolte Peak des Chromatogramms (A) sowie gepoolte Fraktionen des Ausläufers dieses Peaks (B) gezeigt sind. Ebenfalls sind die ankonzentrierten Proteinpools von A und B dargestellt (Ak, Bk). Jeweils 5 μ g Protein sowie links der Proteinmarker (BlueStar Prestained Protein Marker, Nippon Genetics) wurden in den Abbildungen B bis D geladen.

Eine an die Affinitätschromatographie anschließende Größenausschlusschromatographie (Abbildung 18) erwies sich als nicht hilfreich, da dieser weitere Aufreinigungsschritt ebenfalls zur Präzipitation des Proteins führte und deswegen nicht routinemäßig an die Affinitätschromatographie angeschlossen wurde.

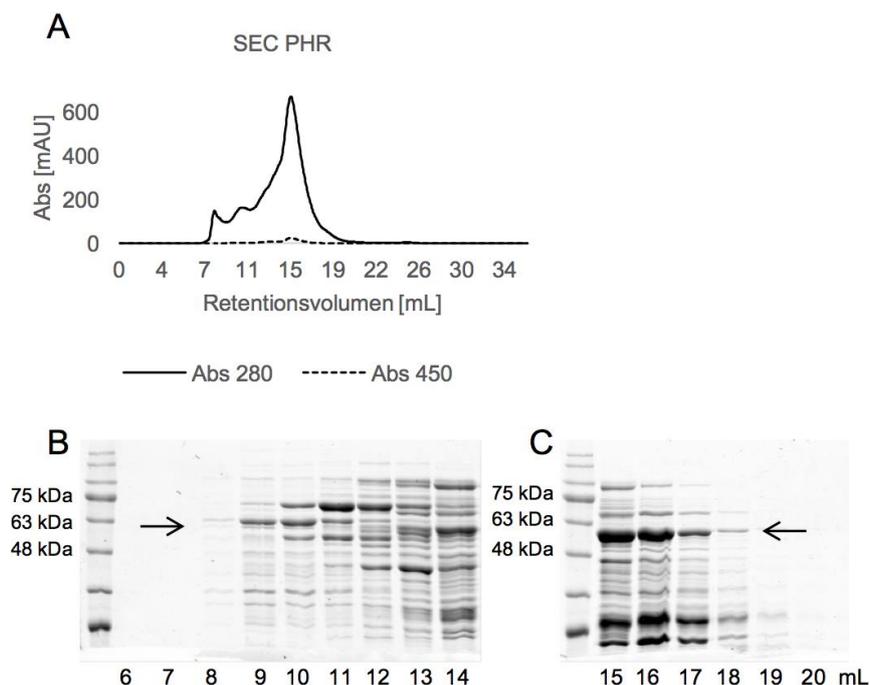


Abbildung 18: Repräsentative Größenausschlusschromatographie (SEC) einer zuvor über Nickel-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigten PHR-Domäne. (A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von cry2 W321A PHR. Es wurde die analytische Säule Superdex 200 von Amersham genutzt und die Chromatographie über die Detektion der Absorptionen bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 450 nm (FAD_{ox}) verfolgt. Jeweils 15 µL Protein der einzelnen Retentionsvolumina-Fractionen wurden per SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (B, C). Jeweils links ist der Proteinmarker dargestellt. Die Proteinbanden, die auf cry2 PHR zurückgehen (59 kDa), sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die standardmäßige Aufreinigung der C-terminal verkürzten Proteine über Metallionen-Affinitätschromatographie mit einem Phosphat-basierten Puffersystem mit niedrigeren NaCl-Konzentrationen (0,2 M) und der *Fast-Flow-Nickel-Säule*. Hinsichtlich der Verunreinigungen unterschieden sich die cry2-Versionen nicht wesentlich (Abbildung 19): Die beiden Hauptverunreinigungen neben Abbauprodukten ließen sich durch MALDI-TOF-Analysen (durchgeführt von Dr. U. Linne, Chemie) einer Aminotransferase und einem *Heat Shock Protein* (HSP60) aus *E. coli* zuordnen. Nach Aufreinigung und Ankonzentrieren auf ca 50 µM wurden jeweils 1-2 mL rekombinantes Protein aus 18 L Expressionskultur erhalten. Einzig die Trp-Triade-Mutante cry2 W321A PHR lieferte etwa doppelt so große Mengen an löslichem Protein. Jedoch wurde dessen Expression und Aufreinigung nur einmal durchgeführt und es konnte unter diesen Bedingungen kein Unterschied in der Reinheit zu den anderen Proben beobachtet werden.

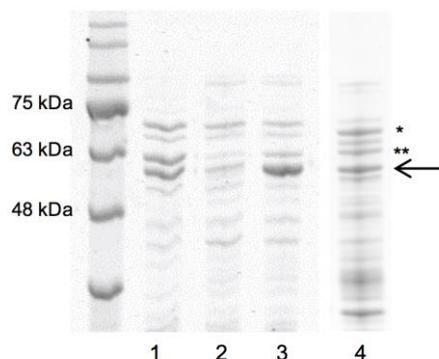


Abbildung 19: Reinheit der aufgereinigten C-terminal verkürzten cry2-Versionen. cry2 WT PHR (1), cry2 Y399A PHR (2), cry2 W321A PHR (3) und cry2 Y399F PHR (4) nach der Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie. Jeweils 2 µg Gesamtprotein der Aufreinigung wurden über SDS-PAGE separiert und mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Der Pfeil kennzeichnet die PHR-Banden, welche mittels *Western Blot* mit αHis₆-Antikörpern verifiziert wurde. Die größten Verunreinigungsbanden wurden isoliert und über MALDI-TOF-Massenspektrometrie als *Heat Shock Protein* (HSP60; **) und Aminotransferase (*) identifiziert (In Zusammenarbeit mit Dr. U. Linne).

4.1.2 Aufreinigung des cry2 Vollängenproteins

Die Expression des Vollängen-cry2 in Sf21-Insektenzellen im Vektor pBacPAK9 erfolgte durch die Gruppe von M. Ahmad in Paris (Anhang A3). Nach der Extraktion des löslichen Proteins erfolgte die Aufreinigung unter Rotlicht über den ÄKTA *Purifier* mit der *High Performance* Nickel-Säule und dem gleichen Puffersystem wie bei den C-terminal verkürzten Versionen (s. Kapitel 3.5.2.3). Hierbei kam es ebenfalls aufgrund des dichten Packungsgrades der Säule innerhalb kürzester Zeit zu einem starken Druckanstieg des Systems, sodass das Protein nur noch mit einer Flussrate von 0,2 mL/min auf die Säule geladen werden konnte. Die Elution über ansteigende Konzentrationen an Imidazol konnte über die Detektion der Absorptionen bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 450 nm (oxidiertes FAD) verfolgt werden. Die Elution ergab zwei resultierende Proteinpeaks, wobei ausschließlich der zweite ebenfalls einen sichtbaren FAD_{ox}-Peak zeigte. Die Fraktionen beider Peaks wurden jeweils gepoolt, ankonzentriert und über SDS-PAGE und *Western Blot* analysiert (Abbildung 20). Diese Analysen ergaben, dass der zweite Peak große Mengen an sehr reinem cry2 enthielt. Im Gegensatz zu den verkürzten cry2-Versionen waren schon nach nur einem Aufreinigungsschritt nur marginale Verunreinigungen durch Fremdproteine erkennbar, sodass keine Größenausschlusschromatographie oder andere Aufreinigungsmethoden mehr angeschlossen werden mussten. Aus 2 g Zellpellet wurden 2 mL 20 µM cry2 gewonnen. Ein stärkeres Ankonzentrieren des Proteins war nicht möglich, da es sonst zur Präzipitation kam.

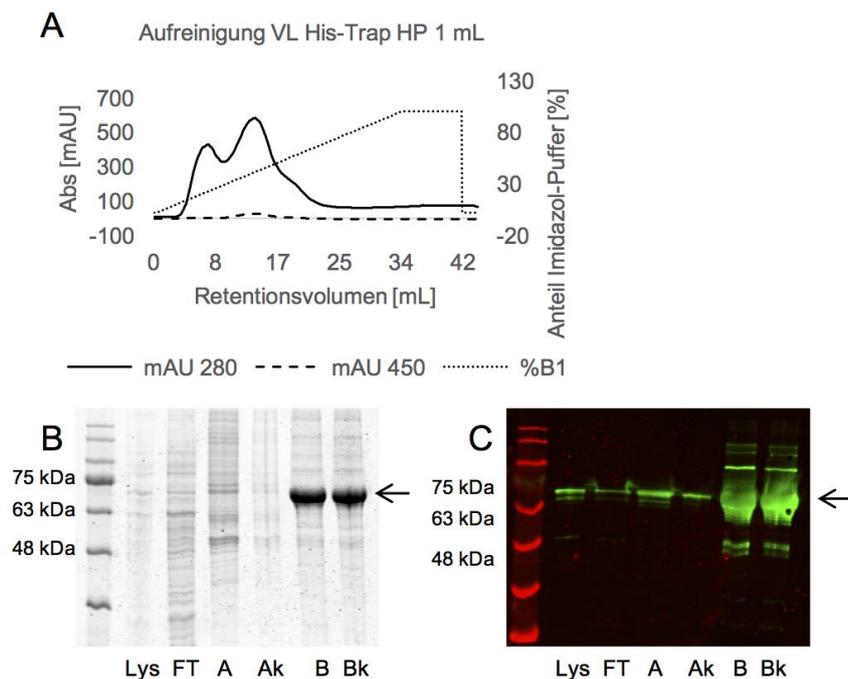


Abbildung 20: Aufreinigung des Volllängen-cry2 über Affinitätschromatographie. (A) Chromatogramm des Elutionsschrittes der Aufreinigung von cry2 WT mit dem ÄKTA-Purifier mit kontinuierlich ansteigender Imidazolkonzentration im *High-Imidazole*-Puffer B1. Die Absorptionen bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 450 nm (FAD_{ox}) wurden detektiert, um die Elution nachverfolgen zu können. Die Fraktionen der beiden entstandenen Peaks wurden jeweils gepoolt und ankonzentriert. (B, C) zeigen ein Coomassie-Gel (B) und einen *Western Blot* mit α His₆-Antikörper (C) mit auf die Säule geladenem Lysat (Lys), Durchfluss (FT), der gepoolte erste Peak des Chromatogramms (A) sowie der gepoolte zweite Peak (B). Ebenfalls sind die ankonzentrierten Proteinpools von A und B gezeigt (Ak, Bk). Jeweils 5 μ g Protein sowie links der Proteinmarker wurden in B und C geladen.

4.2 Nachweis der ATP-Bindung an cry2 *in vitro*

Die Metabolit-Bindung von cry2 WT, den beiden Tyrosin-Mutanten Y399A und Y399F sowie der Trp-Triade-Mutante W321A wurde *in vitro* mit zwei unabhängigen Methoden analysiert, um Aufschluss über die ATP-Bindestelle in cry2 zu erhalten. Zur rein qualitativen Untersuchung wurde die ThermoFAD-Methode herangezogen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) verifiziert.

4.2.1 ThermoFAD

Zum Vergleich des ATP-Bindungsverhaltens von verkürztem und Volllängen-Cryptochrom 2 wurden beide affinitätsgereinigten Wildtyp-Proteine in Gegenwart von 10 mM DTT mit und

ohne 1 mM ATP in den gleichen Pufferbedingungen mittels ThermoFAD aufgeschmolzen. Dabei wurde der Anstieg der Flavin-Fluoreszenz gegen die Temperatur geblottet. Die erste Ableitung der resultierenden sigmoidalen Kurve zeigte in ihrem Maximum den Schmelzpunkt der Proteine (Abbildung 21 B). Beide Wildtyp-Proteine zeigten ähnliche Ergebnisse (Abbildung 21): Die Schmelzkurven in Abwesenheit von ATP zeigten jeweils einen Peak, dessen Maximum die Schmelztemperaturen von 59 °C (VL) und 56 °C (PHR) zeigt. In Anwesenheit von ATP kommt es zur Verschiebung des Schmelzpunktes um jeweils exakt 13 °C hin zu 72 °C (VL) bzw 69 °C (PHR). Zur Berechnung des Signifikanzniveaus des ATP-Effektes wurde der zweiseitige T-Test unter Berücksichtigung der Varianzheterogenität der Datensätze herangezogen. Dieser verifiziert den signifikant stabilisierenden Effekt von ATP sowohl auf Vollängen-cry2, als auch auf die PHR-Domäne mit p-Werten unter 0,001 (Abbildung 21).

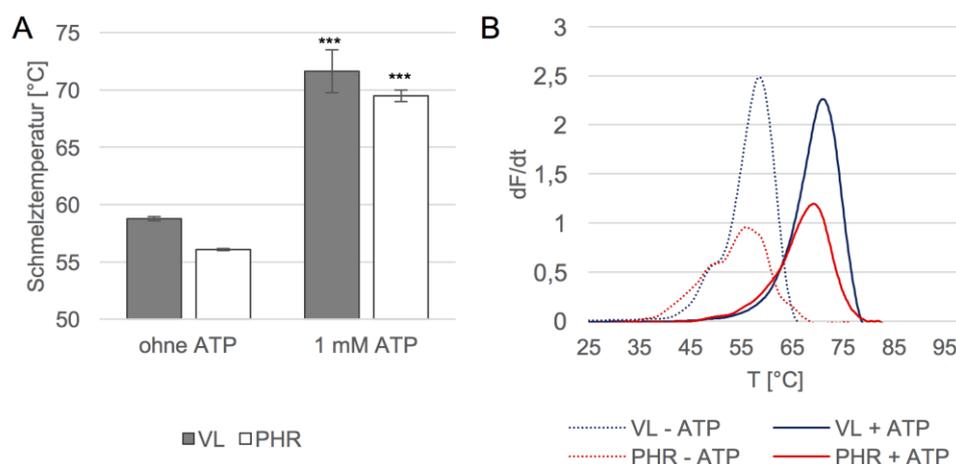


Abbildung 21: Vergleich von Volllänge- und verkürztem cry2 WT hinsichtlich ATP-Bindung. Jeweils 10 μ M aufgereinigtes Vollängen-cry2 (VL) und C-terminal verkürztes cry2 (PHR) wurden mittels ThermoFAD hinsichtlich ihrer ATP-Bindung in der Anwesenheit von 10 mM DTT untersucht. **(A)** Schmelzpunkte der Proteine mit und ohne 1 mM ATP. **(B)** Schmelzkurven der Proteine mit und ohne 1 mM ATP. Es sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Proben mit und ohne ATP sind mit *** (p -Wert $\leq 0,001$) dargestellt. $n = 3$.

Nachdem gezeigt wurde, dass sich Vollängenprotein und verkürzte Version von cry2 WT hinsichtlich der ATP-Bindung gleich verhalten, wurde der Effekt von ATP auf die PHR-Domänen der mutierten Proteine cry2 Y399A sowie Y399F und W321A untersucht (Abbildung 22 A, B). Beide Tyr-Mutanten zeigten mit ca. 65 °C bereits ohne Zugabe von ATP einen deutlich höheren Schmelzpunkt als das Wildtypprotein. Jedoch konnte mit 1 mM ATP keine signifikante Stabilisierung der Proteine erfolgen. Der Austausch des Tyr zu Phe führte hingegen zu einem signifikant destabilisierenden Effekt von 1 mM ATP um 1,7 °C (p -Wert 0,008). Auffällig bei den Schmelzprofilen der Tyr-Mutanten ist hierbei, dass ausschließlich bei cry2 Y399F nach Zugabe des Metabolits der vorangelayerte Peak verschwindet, der ohne

ATP zu sehen war. Bei Y399A hingegen ist dies nicht der Fall. Die Trp-Triade-Mutante *cry2* W321A hingegen zeigte ebenfalls in Antwort auf ATP-Zugabe eine Stabilisierung, die um 5 °C höher ist als beim Wildtyp.

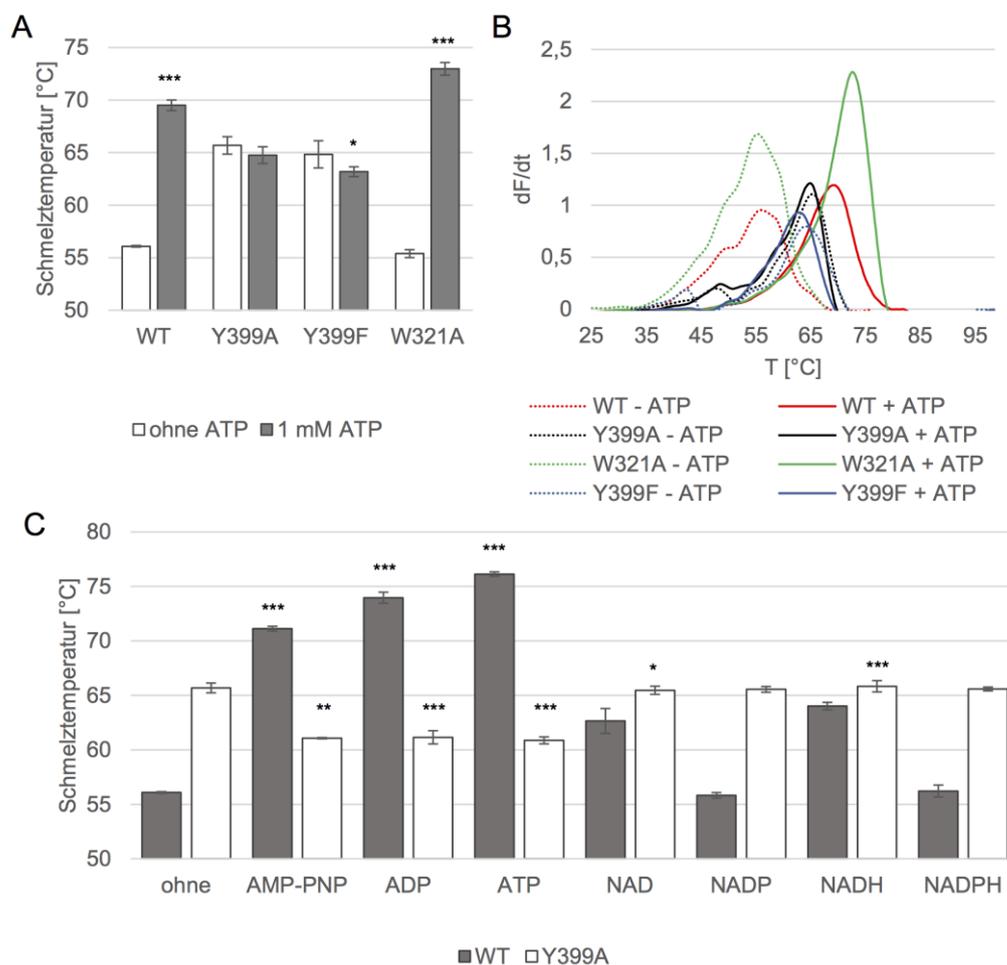


Abbildung 22: Einfluss von Metaboliten auf die PHR-Domänen von *cry2* WT, *cry2* Y399A sowie Y399F und *cry2* W321A. Jeweils 10 μ M der aufgereinigten C-terminal verkürzten PHR-Domänen wurden mittels ThermoFAD hinsichtlich ihrer ATP-Bindung in der Anwesenheit von 10 mM DTT untersucht. **(A)** Schmelzpunkte der Proteine mit und ohne 1 mM ATP. **(B)** Schmelzkurven der Proteine mit und ohne 1 mM ATP. **(C)** Schmelztemperaturen von *cry2* WT PHR und *cry2* Y399A PHR mit und ohne 10 mM Metabolite. Mittelwerte und Standardabweichungen sind gezeigt. Signifikante Unterschiede zwischen Proben mit und ohne Metaboliten sind mit *** (p-Wert \leq 0,001), ** (p-Wert \leq 0,005) und * (p-Wert \leq 0,05) dargestellt. $n \geq 3$.

Neben ATP sollte der Effekt anderer Metabolite auf die Proteine getestet werden. Neben den ATP-Derivaten ADP und AMP-PNP, welches durch seine zusätzliche Imidfunktion des Phosphotriesters nicht hydrolysierbar ist, wurden NAD und NADH sowie NADP und NADPH untersucht (Abbildung 22 C). Um auch Effekte von Liganden, die eventuell mit einer geringen Affinität binden, identifizieren zu können, wurden die Metaboliten mit jeweils 10 mM Endkonzentration eingesetzt bei gleicher Konzentration der Proteine von 10 μ M. Entsprechend

stärker wirkte ATP bei cry2 WT PHR: Statt zu einem Temperaturunterschied von 13 °C führte die Zugabe von 10 mM ATP nun zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur um 20 °C. Neben ATP hatten auch ADP ($\Delta T_m \approx 18$ °C) und AMP-PNP ($\Delta T_m \approx 15$ °C) einen ebenfalls signifikant stabilisierenden Effekt auf cry2 WT PHR, wobei dieser in beiden Fällen etwas weniger stark ausfiel als mit ATP. Im Gegensatz dazu konnte bei erhöhter Konzentration der Metabolite nun eine signifikante Destabilisierung von cry2 Y399A PHR nachgewiesen werden. Neben ATP senkten auch ADP und AMP-PNP den Schmelzpunkt der Tyr-Mutante signifikant von 65 °C auf ca. 61 °C. Sowohl die oxidierte, als auch die reduzierte Form des NADP hatten weder auf cry2 WT PHR, noch auf cry2 Y399A PHR eine Wirkung. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von NAD und NADH zu einer signifikanten Stabilisierung des Wildtyp-Proteins um ca. 6 °C (NAD) bzw. 8 °C (NADH). Die Tyr-Mutante hingegen zeigte bei Zugabe von NAD(H) keinen Unterschied im Schmelzpunkt im Vergleich zu den Ansätzen ohne Metabolitzugabe.

4.2.2 Isotherme Titrationskalorimetrie

Zur Verifizierung und Quantifizierung der Thermo-FAD-Daten wurde die ATP-Bindung für die C-terminal verkürzten Versionen von cry2 WT und den beiden Tyr-Mutanten mittels Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) analysiert. Die affinitätsgereinigten Proteine wurden in ITC-Puffer (s. Kapitel 3.7.2) über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die Dialyse hatte zwei Gründe: Zum einen sollte eventuell noch gebundenes ATP aus den Proteinen herausverdünnt werden, um eine Verfälschung der K_D -Werte aufgrund einer Vorbesetzung mit Metabolit auszuschließen, zum anderen war eine Umpufferung der Proteine für diese Methode erforderlich. Der Lagerungspuffer der Proteine war aufgrund der thermodynamischen Instabilität des Phosphats für ITC ungeeignet und musste gegen HEPES ausgetauscht werden. Des Weiteren musste dem Puffer EDTA zum Binden von Mg^{2+} zugesetzt werden. Da die PHR-Versionen alle eine Verunreinigung durch ein Chaperon, welches ebenfalls ATP bindet, aufwiesen, musste ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse durch die ATP-Bindung der Verunreinigung verfälscht werden. Da bekannt ist, dass HSP60 ausschließlich mit Mg^{2+} als Kofaktor in der Lage ist, ATP zu binden (Brocchieri and Karlin, 2000), sollten diese Ionen mit dem Komplexbildner EDTA gebunden werden.

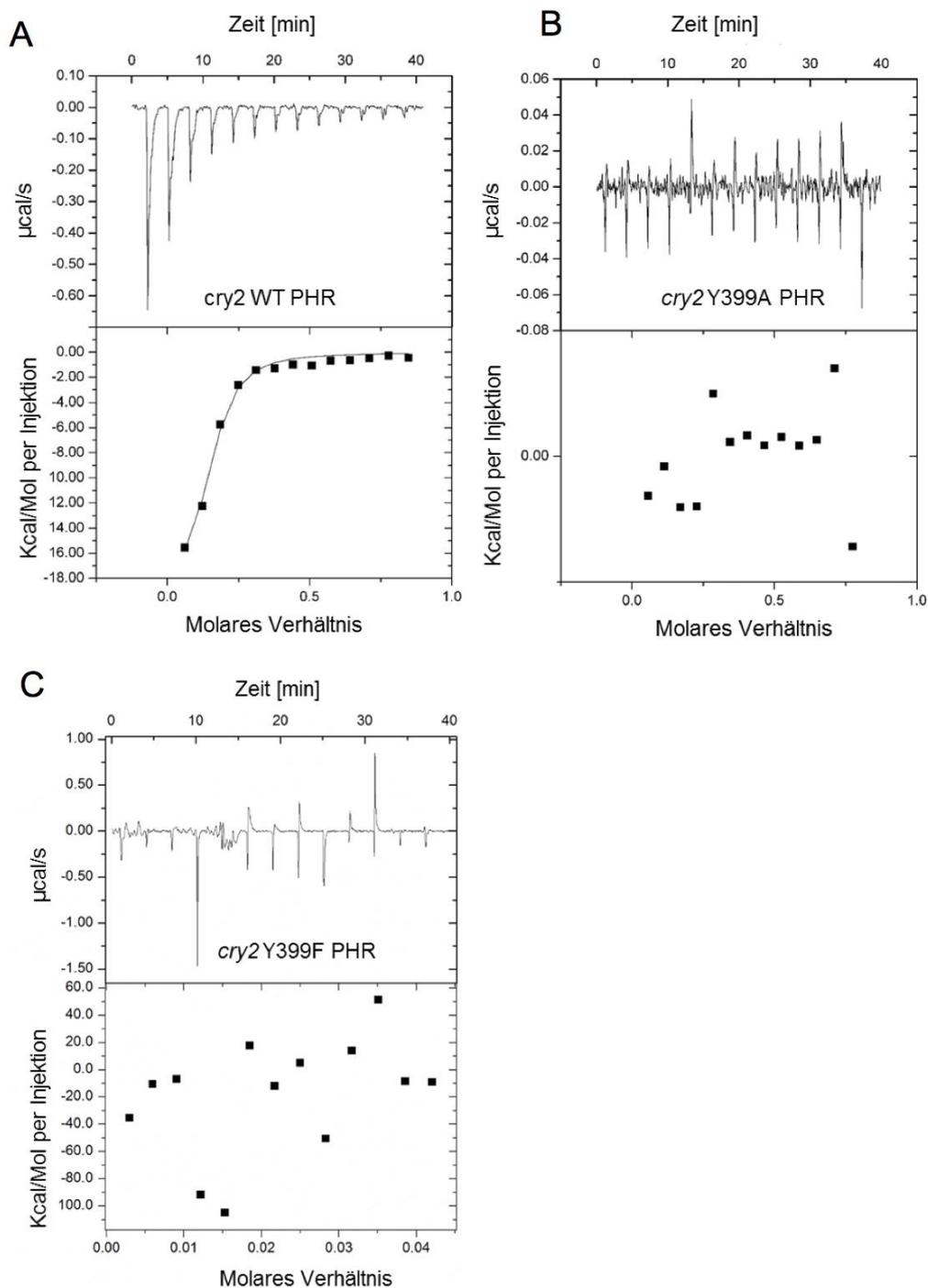


Abbildung 23: Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) von *cry2* WT und *cry2* Y399A/F mit ATP. Die Bindung zwischen *cry2* WT PHR (A), *cry2* Y399A PHR (B) bzw. *cry2* Y399F PHR (C) und ATP wurde mittels ITC untersucht. Zu den frisch in ITC-Puffer dialysierten Proteinen mit einer Konzentration von 40 µM wurde in 13 Injektionen jeweils 3 µL 0,2 mM ATP titriert. Die resultierenden thermodynamischen Änderungen wurden gemessen (oben). Die Flächen unter den erhaltenen Peaks wurden mit *Origin* integriert und *gefittet* (unten). Für *cry2* WT PHR ergab sich für die Bindung mit ATP abzüglich der Verdünnungsenthalpie von ATP in Puffer (Anhang A6) eine mittlere K_D von $1,09 \pm 0,48$ µM. Für beide Tyr-Mutanten konnten unter den gleichen Bedingungen keine Bindungskurven erhalten werden. Alle Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt.

Unmittelbar vor der Messung wurde die Konzentration der frisch dialysierten Proteine photometrisch über den molaren Extinktionskoeffizienten des FAD_{ox} bestimmt (s. Kapitel 3.5.3.2) und mit dem Dialysat die ATP-Lösung hergestellt. In 13 Injektionen wurden jeweils $3 \mu\text{L}$ $0,2 \text{ mM}$ ATP-Lösung zu $40 \mu\text{M}$ Proteinlösung titriert. Bei jeder Titration wurden die resultierenden thermodynamischen Änderungen gemessen. Dabei führte die Integration der Peaks für den Wildtyp zu einer Bindungskurve, anhand derer sich die K_D für die Bindung zwischen Protein und Ligand errechnen lässt. Als Kontrollen wurde die Verdünnungsenthalpie von ATP in Puffer bestimmt (Anhang A6). Aus den drei unabhängig durchgeführten Messungen für das Wildtyp-Protein und ATP ergab sich abzüglich der Verdünnungsenthalpie von ATP in Puffer eine mittlere K_D von $1,09 \pm 0,48 \mu\text{M}$. Doppelpeaks, die u.a. aus Verunreinigungen resultieren können und die Ergebnisse verfälschen, wurden nicht beobachtet. Das molare Verhältnis von Protein und Ligand lag dabei in allen drei Experimenten unter $0,5$. Für beide Tyr-Mutanten wurde unter den gleichen Bedingungen die Affinität zu ATP analysiert. In mehreren unabhängigen Messungen konnte jeweils keine Bindungskurve bestimmt und somit keine K_D berechnet werden.

4.3 Analyse der ATP-Bindung *in planta*

Der Effekt von ATP auf *A.t.* Cryptochrom 2 *in planta* lässt sich ausschließlich indirekt über Komplementationsversuche mit Mutanten untersuchen. Demzufolge wurden in *A. thaliana* des Ökotyps Col-0 im *cry2*-defizienten Hintergrund (Allel *cry2-1*) verschiedene *cry2*-Versionen über *Floral Dip* eingebracht, um anhand ihrer biologischen Aktivität Rückschlüsse auf die Wirkung der ATP-Bindung von *cry2* zu ziehen. Als *Readout* für die biologische Aktivität der Proteine sollten drei unterschiedliche *cry2*-gesteuerte Antworten dienen: Die Photomorphogenese unter Schwachlichtbedingungen (s. Kapitel 4.3.1), die blaulichtinduzierte Degradation von *cry2* in etiolierten Keimlingen (s. Kapitel 4.3.2) sowie die photoperiodische Blühinduktion (s. Kapitel 4.3.3). Für die Untersuchung des ATP-Effektes wurden *cry2*-Versionen in die *cry2*-defizienten Pflanzen wiedereingebracht, die einen Austausch in dem zuvor als für ATP-Bindung essentiell verifizierten Y399 durch Alanin und Phenylalanin (Y399A und Y399F) hatten. Als Kontrollen wurden neben transgenen Linien, die *cry2* WT exprimieren, auch Komplementationslinien mit der Trp-Triade-Mutante *cry2* W321A untersucht. Von allen vier Konstrukten wurden mindestens drei unabhängige Linien der T_2 -Generationen untersucht.

4.3.1 Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums

Unter Schwachlichtbedingungen ($< 1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ist primär *cry2* in *A. thaliana* an der Photomorphogenese von Keimlingen beteiligt. Folglich wurden die transgenen Komplementationslinien nach der Samenvernalisation für sechs Tage unter schwachem Blaulicht ($0,65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) angezogen und ihre Hypokotyllängen gemessen. Es wurden jeweils drei bis vier unabhängige T_2 -Linien pro Genotyp analysiert, wobei die *cry2*-Mutante und der Col-0-Wildtyp als Kontrollen dienten. Aufgrund der Aufspaltung der transgenen Linien sind die resultierenden Ergebnisse als *Boxplots* dargestellt, welche direkte Vergleiche der statistischen Parameter Median, Mittelwert sowie Minimal- und Maximalwert und oberes und unteres Quartil erlauben (Abbildung 24). Zur Vereinfachung der statistischen Darstellung wurden Pflanzen, anhand deren Phänotyps eindeutig hervorging, dass sie wieder zur *cry2*-Mutante aufgespalten hatten, aus der Statistik herausgenommen. Verifiziert wurde dies mit einer Direkt-PCR repräsentativer Keimlinge mittels Primern gegen das 3'-Ende des Gens, welches bei den *cry2*-defizienten Pflanzen deletiert ist (Daten nicht gezeigt).

Da gezeigt wurde, dass die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums als *cry*-regulierte biologische Antwort einen starken *Dosis-Response*-Effekt zeigt, müssen für die Interpretation der Daten die *cry2*-Proteinmengen der T_2 -Linien berücksichtigt werden (Abbildung 24 C, D). Beim Vergleich der Linie, die Wildtyp *cry2* unter Kontrolle des 35S-Promotor exprimiert (*cry2* WT Linie 1.4) mit dem eigentlichen Wildtyp (WT) fällt dieser Effekt auf: Die transgene *cry2* WT-Linie zeigt bei Anzucht im schwachen Blaulicht deutlich kürzere Hypokotyle als der originale Wildtyp. Wie erwartet, zeigten alle getesteten transgenen Linien eine deutlich größere Varianz als *cry2* und WT, da dort die Daten von sowohl homo- als auch heterozygoten Pflanzen gewonnen wurden. Die vier analysierten Linien, welche *cry2* W321A exprimierten, zeigten trotz hoher *cry2*-Level alle einen Phänotyp mit langen Hypokotylen, welcher der *cry2*-Mutante ähnlich war. Entsprechend konnten für diesen Genotyp keine Aufspaltungen zur *cry2*-Mutante identifiziert und aus der Statistik genommen werden.

Die drei untersuchten *cry2* Y399A exprimierenden Linien zeigten ein Proteinlevel, welches dem transgenen Wildtyp sehr ähnlich war. Trotzdem waren die Hypokotyle im Vergleich zum Wildtyp länger, wenn auch nicht so lang wie die der *cry2* W321A-Linien.

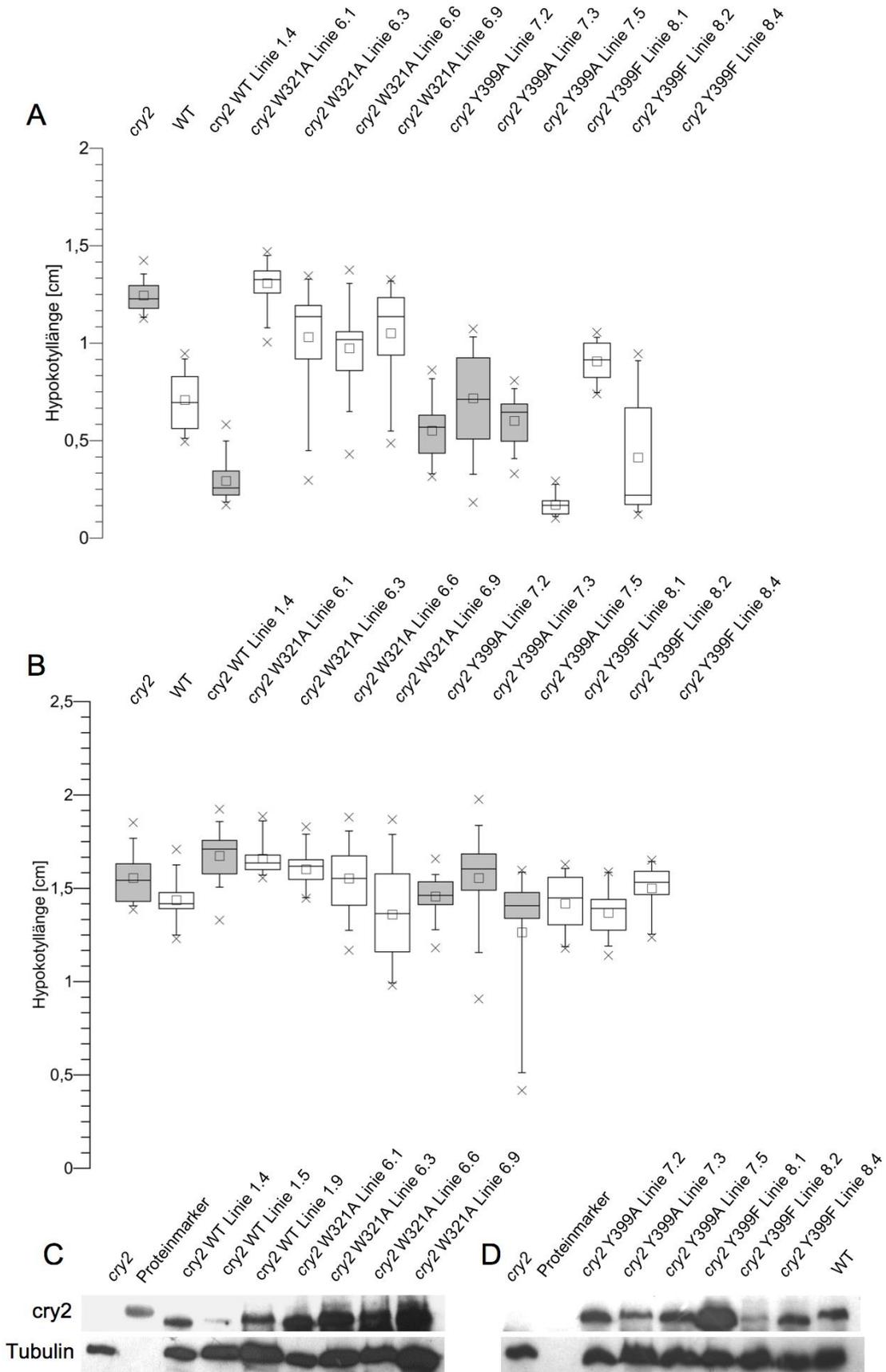


Abbildung 24: Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums transgener *A. thaliana*-Linien unter schwachem Blaulicht. T₂-Komplementationslinien im *cry2*-defizienten Hintergrund, in die über *Floral Dip* *cry2* WT, *cry2* W321A sowie *cry2* Y399A/F wiedereingebracht wurde, wurden auf ½-MS-Platten nach dreitägiger Samenvernalisation für sechs Tage in schwachen Blaulicht ($\lambda_{\max} = 471 \text{ nm}$; $0,65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) **(A)** bzw. Dunkelheit **(B)** aufgezogen. Die Hypokotyllängen der Keimlinge wurden mit ImageJ® gemessen und mit QtiPlot statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind als *Boxplots* dargestellt. Anfang und Ende der Boxen repräsentieren oberstes und unterstes Quartil, sodass die Boxen den Bereich zeigen, indem 50% der Daten eines Datensatzes verteilt sind. Die beiden *Whisker* am Ende der Boxen kennzeichnen zusätzlich den Bereich, in dem 5% bzw. 95% der Daten verteilt sind. Minimal- und Maximalwerte sind als Kreuze, Mediane als Strich innerhalb der Box und Mittelwerte als Rechtecke dargestellt. Für die Linien, welche *cry2* Y399A/F bzw. *cry2* WT exprimierten, wurden die Pflanzen, welche wieder zur *cry2*-Mutante aufgespalten hatten, aus der statistischen Analyse herausgenommen. Dies geschah anhand ihres Phänotyps und wurde mittels Direkt-PCR repräsentativer Keimlingen mit Primern gegen das 3'-Ende des Gens verifiziert. Folglich umfasst die gezeigte Statistik für *cry2* WT, *cry2* Y399A und *cry2* Y399F exprimierende Linien ausschließlich homo- und heterozygote Pflanzen. $n \geq 12$. **(C)** und **(D)** zeigen die *cry2*-Proteinlevel der in den Analysen genutzten transgenen Linien mit der *cry2*-Mutante (*cry2*) als Negativ- und dem Col-0-Wildtyp (WT) als Positivkontrolle. Jeweils 30 μg Gesamtproteinextrakt von 4 Tage alten etiolierten Keimlingen wurde mittels SDS-PAGE auf vorgegossenen Gradientengelen (BIO-RAD) separiert. Nach dem Transfer auf Nitrocellulosemembranen per *Wet Blot* erfolgte die Immunodetektion von *cry2* über αCCT2 -Antikörper. Nach der ECL-Detektion wurde die Membran *gestript* und mit $\alpha\text{Tubulin}$ -Antiserum inkubiert. Die zweite Detektion erfolgte ebenfalls über ECL.

Die drei *cry2* Y399F-Linien hatten sehr unterschiedliche Proteinlevel. Eine Linie zeigte eine extreme Überexpression des Transgens (Linie 8.1), wohingegen eine Linie ein sehr geringes *cry2*-Level aufwies (Linie 8.2). Diese Unterschiede im Proteingehalt spiegelten sich in den jeweiligen Phänotypen wider: Die Varianz der Hypokotyllängen war entsprechend groß und reichte von extrem kurz bis relativ lang im Vergleich zu den Kontrollen. Die Linie mit moderatem Expressionslevel (Linie 8.4), welche der WT-Linie entsprechend war, lies sich direkt mit dieser vergleichen und zeigte, dass diese Linien ebenfalls kurze Hypokotyle aufwiesen. Eine genaue quantitative Aussage bezüglich des Vergleichs mit dem transgenen Wildtyp ist aber nicht möglich.

Da eine Aussage hinsichtlich Photoaktivierung von *cry2* nur getroffen werden kann, wenn keine der Linien einen *cop*-Phänotyp aufweist, wurden Dunkelkontrollen mit in diese Studie einbezogen (Abbildung 24 B). Dabei zeigten alle getesteten transgenen Linien lange Hypokotyle wie der Wildtyp und die *cry2*-Mutante. Dementsprechend führte keine eingebrachte Mutation zu einer Hyperaktivität von *cry2* und Rückschlüsse auf die Wirkung von ATP auf die biologische Aktivität von *cry2* können folglich getroffen werden.

4.3.2 Blaulichtinduzierter Abbau

Einer der schnellsten durch *cry2* vermittelten Prozesse ist dessen Abbau beim Transfer etiolierter Keimlinge in Blaulicht. Somit kann dieser Prozess direkt mit der Aktivität von *cry2* korreliert werden. Entsprechend wurde jeweils eine repräsentative transgene Linie der verschiedenen Genotypen für vier Tage im Dunkeln aufgezogen. Die etiolierten Keimlinge

wurden schließlich bis zu 50 min mit Blaulicht ($\lambda_{\max} = 471 \text{ nm}$; $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bestrahlt. Nach Gesamtproteinextraktion und SDS-PAGE wurden die cry2-Level über ECL *Western Blot* mittels αCCT2 -Antikörpern detektiert, wobei Tubulin als Ladekontrolle genutzt wurde. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Da über eine ECL-Detektion aufgrund der fehlenden Proportionalität von Proteinmenge zu Signalintensität keine direkte Quantifizierung erfolgen kann, wurde dafür das *Odyssey Infrared Imaging System* verwendet (Abbildung 25 E). Dabei wurden die Signalintensitäten der jeweiligen Antikörper-Fluorophore genutzt, um die cry2-Intensitäten ins Verhältnis zur Ladekontrolle Tubulin zu setzen. Die erhaltenen Resultate wurden dann auf den Startzeitpunkt t_0 der Bestrahlung normiert, um relative Werte zu erhalten.

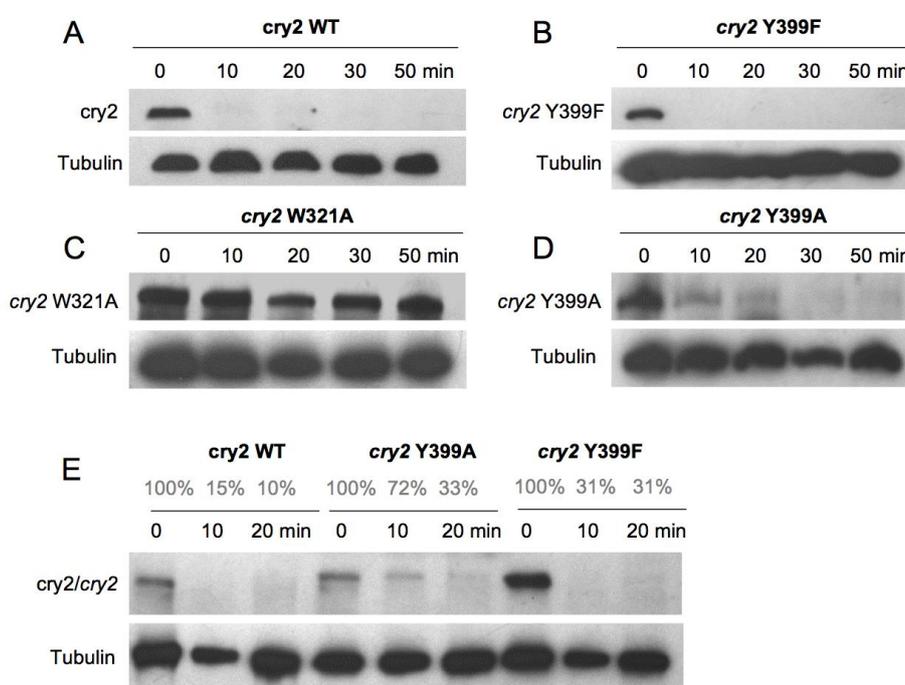


Abbildung 25: Blaulichtinduzierter cry2-Abbau in transgenen *Arabidopsis*-Linien. T₂-Saatgut transgener Linien wurde auf Filterpapier ausgesät. Nach dreitägiger Samenvernalisation und vierstündiger Keiminduktion mit Weißlichtbestrahlung wurden die Keimlinge vier Tage in Dunkelheit aufgezogen. Die Blaulichtbestrahlung ($\lambda_{\max} = 471$; $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) erfolgte für bis zu 50 min. Danach wurden Gesamtproteinextrakte der Proben hergestellt, 30 μg dieser auf ein Gradientengel (BIO-RAD) geladen und mittels SDS-PAGE separiert. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte über *West Blot*. Die Immunodetektion erfolgte mittels αCCT2 -Antikörpern. Für die ECL-Detektion wurde ein HRP-fusionierter sekundärer Antikörper genutzt, für die Odyssey-Detektion ein Fluorophor-markierter sekundärer Antikörper. Nach der ECL-Detektion von cry2 wurde die Membran *gestript* und mit $\alpha\text{Tubulin}$ -Antikörpern inkubiert. Darauf folgte eine erneute ECL-Detektion. Bei der Nutzung des Odyssey-Systems erfolgte die Detektion von Zielprotein und Ladekontrolle simultan. **(A)-(D)** zeigen ECL-Blots der vier analysierten transgenen Linien. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und jeweils ein repräsentativer Blot gezeigt. In **(E)** ist ein direkter Vergleich des Abbaus von cry2 WT, cry2 Y399A sowie cry2 Y399F dargestellt. Die eingefügte Quantifizierung über die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde dabei wie folgt hergeleitet: **Relatives CRY2-Level** = $\frac{\text{CRY2}_x/\text{Tubulin}_x}{\text{CRY2}_0/\text{Tubulin}_0}$. Dabei ist CRY2_x bzw. Tubulin_x das jeweilige Signal zum Zeitpunkt x der Bestrahlung und CRY2₀ bzw. Tubulin₀ das jeweilige Signal zum Zeitpunkt 0.

Die pro Genotyp mehrfach durchgeführten Experimente zeigten alle die gleichen Ergebnisse. Unter den genutzten Bedingungen war bereits nach zehn Minuten Bestrahlung kein *cry2*-Signal mehr für das Wildtyp-Protein detektierbar. Im Gegensatz dazu war auch nach 50 min Bestrahlung mit Blaulicht keinerlei Abbau von *cry2* W321A im ECL *Blot* nachweisbar. Somit zeigt die Trp-Triade-Mutante auch in diesem Assay einen sehr deutlichen Unterschied zum Wildtyp. *cry2* Y399A hingegen zeigte erneut eine Antwort zwischen Wildtyp *cry2* und *cry2* W321A. Es war zwar ein deutlicher Abbau des Proteins zu sehen, jedoch weniger schnell als beim Wildtyp. Der größte Unterschied im Abbau von *cry* WT und *cry2* Y399A wurde dabei nach 10 min Bestrahlung beobachtet. Bestätigt wurden diese Daten mit der quantitativen Auswertung, die einen direkten Vergleich der verschiedenen Linien zulässt. Diese zeigte ebenfalls einen Unterschied zwischen den beiden Tyr-Mutanten. *cry2* Y399F schien sich eher wie *cry2* WT zu verhalten.

4.3.3 Photoperiodische Blühinduktion

Die Regulation der photoperiodische Blühinduktion ist die Hauptfunktion von *cry2* in *A. thaliana*. Entsprechend sollte dieser Prozess zur Analyse der transgenen Linien herangezogen werden. Da Blühverhalten von sehr vielen Umweltfaktoren beeinflusst ist, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt (Daten nicht gezeigt), auf deren Basis die Experimente mit den transgenen Linien ausgeführt wurden. Die Vorversuche zeigten, dass die Dauer bis zur Blütenbildung negativ mit der Lichtintensität korreliert. Je niedriger die Lichtintensität war, desto später erfolgte Blühinduktion und folglich desto größer war der Unterschied zwischen *cry2*-Mutante und Wildtyp. Des Weiteren durfte der Rotanteil des Weißlichts nicht zu gering sein, da sonst die zu *cry2* antagonistische Funktion von PhyB nicht eintrat und Mutante und WT einen zu ähnlichen Phänotyp zeigten. Entsprechend dieser Vorversuche wurden die Blühversuche mit Weißlicht einer Intensität von ca. $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und dem in Anhang A7 aufgeführten Spektrum unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) durchgeführt. Trotz der erfolgreichen Vorversuche blieb eine Komplementation der getesteten transgenen Linien, einschließlich der für die Auswertbarkeit des Versuchs essentiellen Positivkontrolle der mit *cry2* WT transformierten *cry2*-Nullmutante aus (Abbildung 26 A). Mehrere unabhängige Versuche zeigten das gleiche Ergebnis, sodass über qRT-PCR eine Transkriptanalyse zur Überprüfung eines möglichen *Gene Silencing*-Effektes erfolgte. Dazu wurde zunächst am Ende des Langtages (ZT 15 h) Pflanzenmaterial von 18 Tage alten Pflanzen der Genotypen *cry2*, Wildtyp und transgenem Wildtyp geerntet. Daraus wurde die RNA extrahiert, diese einem DNase-Verdau unterzogen und über Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die resultierende cDNA wurde zunächst auf das *FT*-Transkript hin

untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse spiegelten die Resultate der Blühversuche wider: Die Col-0 Wildtyp-Pflanzen (WT) zeigten relativ zur *cry2*-Mutante eine starke Induktion von *FT*, wohingegen die mit *cry2* WT transformierte *cry2*-Mutante kaum einen Unterschied zu der *cry2*-Mutante zeigte. Um die *CRY2*-Expression näher zu untersuchen, wurden qRT-PCR-Analysen mit Primern gegen *CRY2* durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde Pflanzenmaterial derselben transgenen Linie genutzt, das zuvor positiv auf eine Komplementation des transgenen Wildtyps im Keimlingsstadium (s. Kapitel 4.3.1) getestet wurde. Die sechs Tage alten Keimlinge zeigten relativ zur *cry2*-Mutante deutlich höhere *CRY2*-Transkriptlevel. Dabei geht die im Vergleich zum originalen Wildtyp erhöhte Transkriptmenge einher mit dem erhöhten Proteinlevel dieser transgenen Linie (Abbildung 24 C). Diese Linie zeigt jedoch analog zur fehlenden *FT*-Induktion nach 18 Tagen ebenfalls kein *CRY2*-Transkript mehr (Abbildung 26).

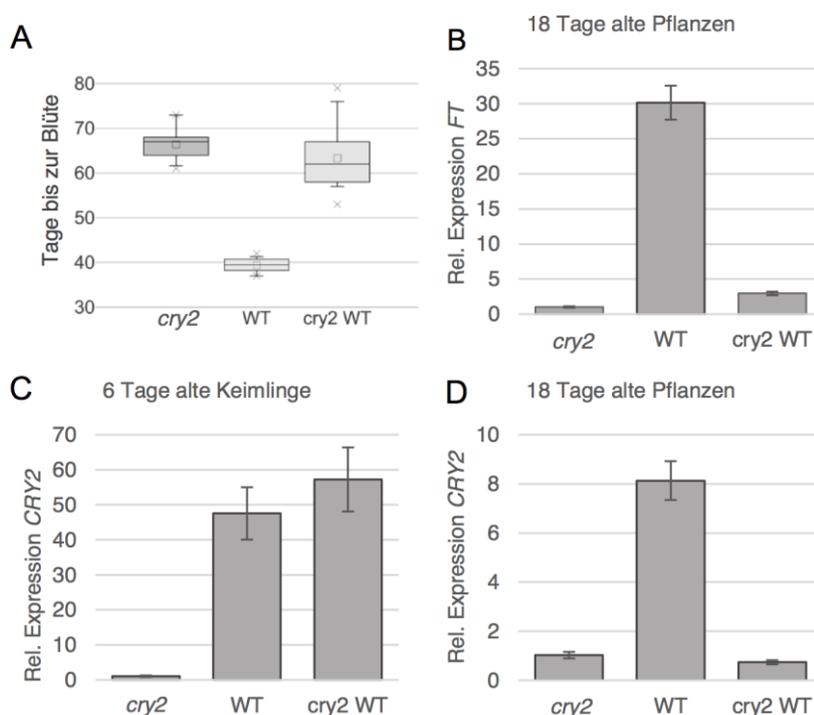


Abbildung 26: Photoperiodische Blühinduktion und darauf aufbauende Transkriptanalysen. (A) *cry2*-Mutante, Col-0 WT und transgener WT im *cry2*-defizienten Hintergrund (*cry2* WT) wurden auf Erde ausgesät und nach dreitägiger Samenvernalisation in Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 Dunkel) mit Weißlicht der Intensität $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ überführt (Spektrum s. Abbildung Anhang 2). Die Tage bis zur Blüte der Pflanzen wurden als Tag, an dem der Spross 5 mm Länge erreichte, definiert und für die einzelnen Pflanzen dokumentiert. Pro Genotyp wurden 12 Einzelpflanzen untersucht. (B) und (D) zeigen Transkriptanalysen der in (A) untersuchten Pflanzen von *FT* (B) und *CRY2* (D). Dabei wurde jeweils von den Pflanzen am Ende des Langtages (ZT 15 h) RNA extrahiert, mit DNase verdaut und nach Reverse Transkription über qRT-PCR untersucht. Die relative Expression von *CRY2* und *FT* wurde nach Kapitel 3.2.8 4 durch die Normierung auf die Transkriptlevel des *Housekeeping* Gens Aktin berechnet und ins Verhältnis zur *cry2*-Mutante gesetzt. Analog dazu erfolgte die Berechnung der in (C) dargestellten relativen Induktion von *CRY2* in 6 Tage alten Keimlingen, welche zuvor bereits hinsichtlich Photomorphogenese phänotypisch untersucht wurden (s. Kapitel 4.3.1).

Phänotypische Untersuchungen der nachfolgenden T₃-Generation zeigten, dass es in den transgenen Linien nur zu einer Stilllegung des eingebrachten *CRY2*-Gens und nicht zu einer Co-Suppression mit dem endogenen *CRY1* kam (Daten nicht gezeigt). Durch den nachgewiesenen Verlust der *CRY2*-Expression im adulten Stadium der transgenen Pflanzen konnte keine phänotypische Untersuchung hinsichtlich deren Blühverhaltens erfolgen.

4.4 Charakterisierung der Auswirkung von ATP-Bindung

in vitro

Neben der Untersuchung des Einflusses von ATP auf die Aktivität von *Arabidopsis cry2 in planta* sollte eine Charakterisierung der Wirkung von ATP auf Wildtyp- und Mutanten-*cry2 in vitro* erfolgen. Hierfür wurden spektroskopische und biochemische Methoden eingesetzt.

4.4.1 Spektroskopische Untersuchungen

4.4.1.1 UV-Vis Spektroskopie

Die initiiierende Charakterisierung der Proteine hinsichtlich Photoreduzierbarkeit verlief in Abwesenheit von ATP (Abbildung 27). Diese lässt sich durch Absorptionsspektroskopie verfolgen, da die unterschiedlichen Redoxspezies von FAD unterschiedliches Absorptionsverhalten zeigen (Abbildung 3). Dazu wurden die aufgereinigten Proteine (jeweils ca. 20 μM) in Gegenwart von 10 mM DTT als externes Reduktionsmittel mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) für bis zu 60 min bestrahlt. Diese Versuche wurden bei einer kontrollierten Temperatur von 15 °C durchgeführt. Nach der Bestrahlung wurden die Dunkelreversionen der Proteine untersucht, indem diese 1 h bei 15 °C in Dunkelheit inkubiert wurden.

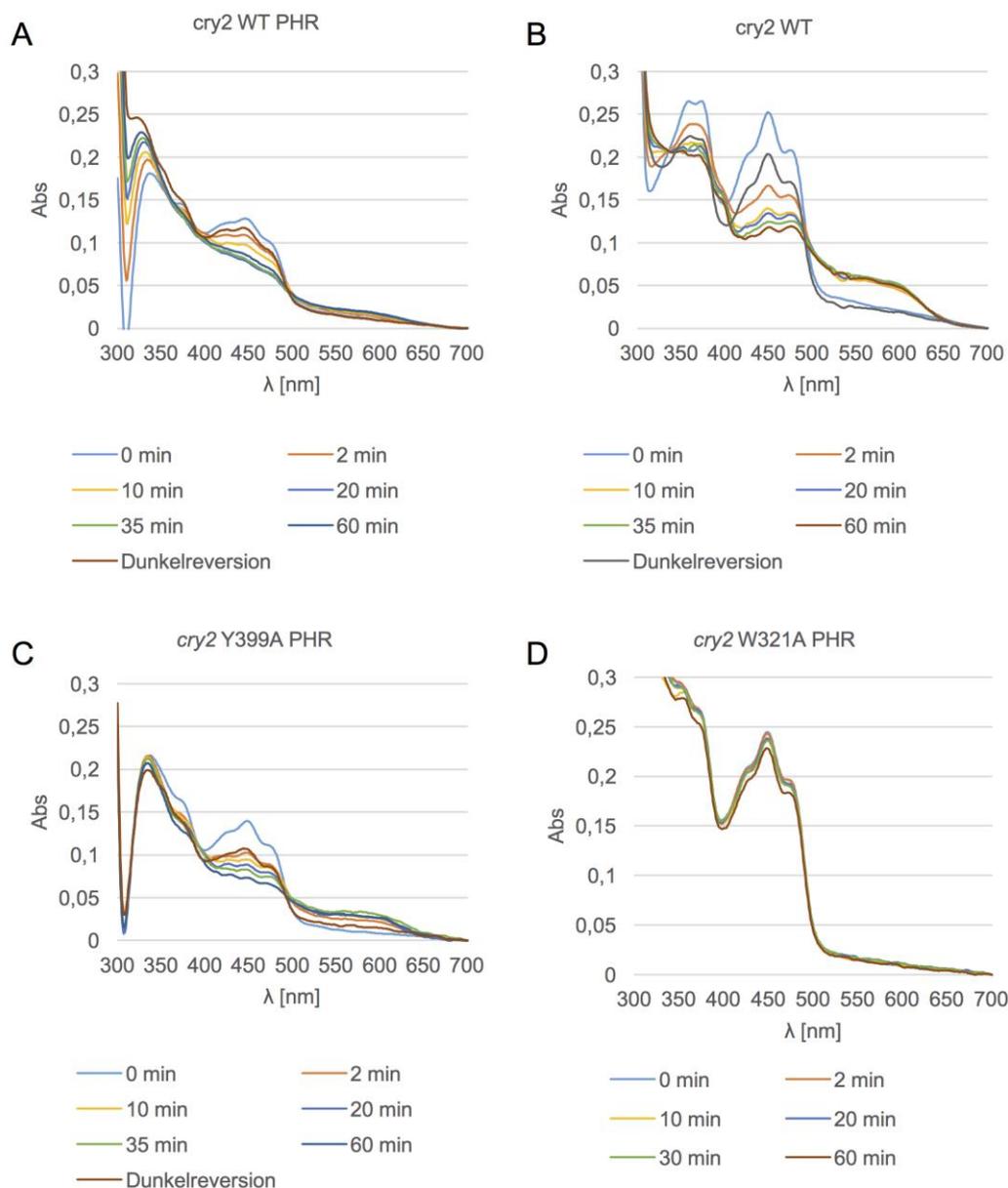


Abbildung 27: Photoreduktion und Dunkelreversion der aufgereinigten cry2-Proteine. Die affinitäts-gereinigten Proteine cry2 WT PHR (A), cry2 WT Volllänge (B), cry2 Y399A PHR (C) und cry2 W321A PHR (D) wurden für bis zu 60 min mit Blaulicht ($\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in Gegenwart von 10 mM DTT bei 15 °C bestrahlt und nach den angegebenen Zeitpunkten die jeweiligen Absorptionsspektren aufgenommen. Für die Dunkelreversion wurden die Proteine nach der Bestrahlung für eine Stunde bei 15 °C in Dunkelheit inkubiert.

Bis auf die Trp-Triade-Mutante zeigten alle untersuchten Proteine im Laufe der Bestrahlung mit Blaulicht eine Abnahme der Absorption bei 450 nm und eine Zunahme der Absorption im längerwelligen Bereich (> 500 nm). Jedoch ergaben sich starke Unterschiede zwischen den Proteinen in der Intensität der spektralen Veränderungen. Die Volllängenversion des Wildtyp-Proteins zeigte eine stärkere Photoreduktion im Vergleich zur PHR-Domäne von cry2 WT. Ferner wurde beobachtet, dass sich die Absorptionen der verschiedenen cry2-Varianten im UV-Bereich deutlich unterschieden und auch das gleiche Protein aus unterschiedlichen

Aufreinigungen im kurzwelligen Bereich Absorptionsunterschiede aufwies (Daten nicht gezeigt). Somit war eine absolute Quantifizierung der Bildung von FADH° und somit auch ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Reduktionskinetiken nicht möglich. Lediglich können qualitative Effekte in der Abnahme von FAD_{ox} sowie der Akkumulation des FADH° verglichen werden. Diese zeigten aber eindeutige Unterschiede zwischen den verschiedenen *cry2*-Varianten. Bei beiden Wildtyp-Proteinen sowie der Tyr-Mutante kann eine Akkumulation des semireduzierten Flavins (Abs > 500 nm) ausgehend vom oxidierten Flavin (Abs 450 nm) innerhalb von Minuten nach der Bestrahlung mit Blaulicht beobachtet werden. Diese Photoreduktion war reversibel, wenn die Proteine im Dunkeln inkubiert wurden, da sich die oxidierte Spezies von FAD wieder anreicherte. Im Gegensatz dazu zeigte *cry2* W321A PHR auch nach einer Stunde Bestrahlung keine Veränderungen im Absorptionsspektrum.

Nach der Überprüfung der Photozyklen sollte ein Effekt von ATP auf die Photoreduktion sowohl qualitativ, als auch semiquantitativ untersucht werden. Dazu erfolgte die Bestrahlung der Proteine analog zum zuvor beschriebenen Vorgehen in Anwesenheit von 1 mM ATP. Hierfür wurden zunächst die beiden WT-Proteine untersucht (Abbildung 28). *cry2* WT PHR zeigte im Laufe der Bestrahlung in Anwesenheit von ATP starke Lichtstreuung im langwelligen Bereich, sodass keine spektroskopische Untersuchung danach mehr möglich war. Diese Zunahme der Lichtstreuung, die vermutlich durch Aggregation bedingt war, trat nur auf, wenn sowohl ATP als auch Licht anwesend waren. Unterschiedliche Aufreinigungen von *cry2* WT PHR zeigten unterschiedliche Kinetiken der Aggregation (Abbildung 28 A, C). Neben ATP wurden auch ADP und AMP-PNP getestet und hatten den gleichen Effekt (Abbildung 28 B, D). Des Weiteren wurde keine Abnahme der Aggregation erzielt, wenn eine 10-fach geringere ATP-Konzentration eingesetzt wurde. Anders verhielt sich die Vollängen-Version von *cry2* mit keiner Aggregation auch nach 60-minütiger Bestrahlung (Abbildung 28 F). Diese Befunde wurden in mehreren unabhängigen Experimenten bestätigt.

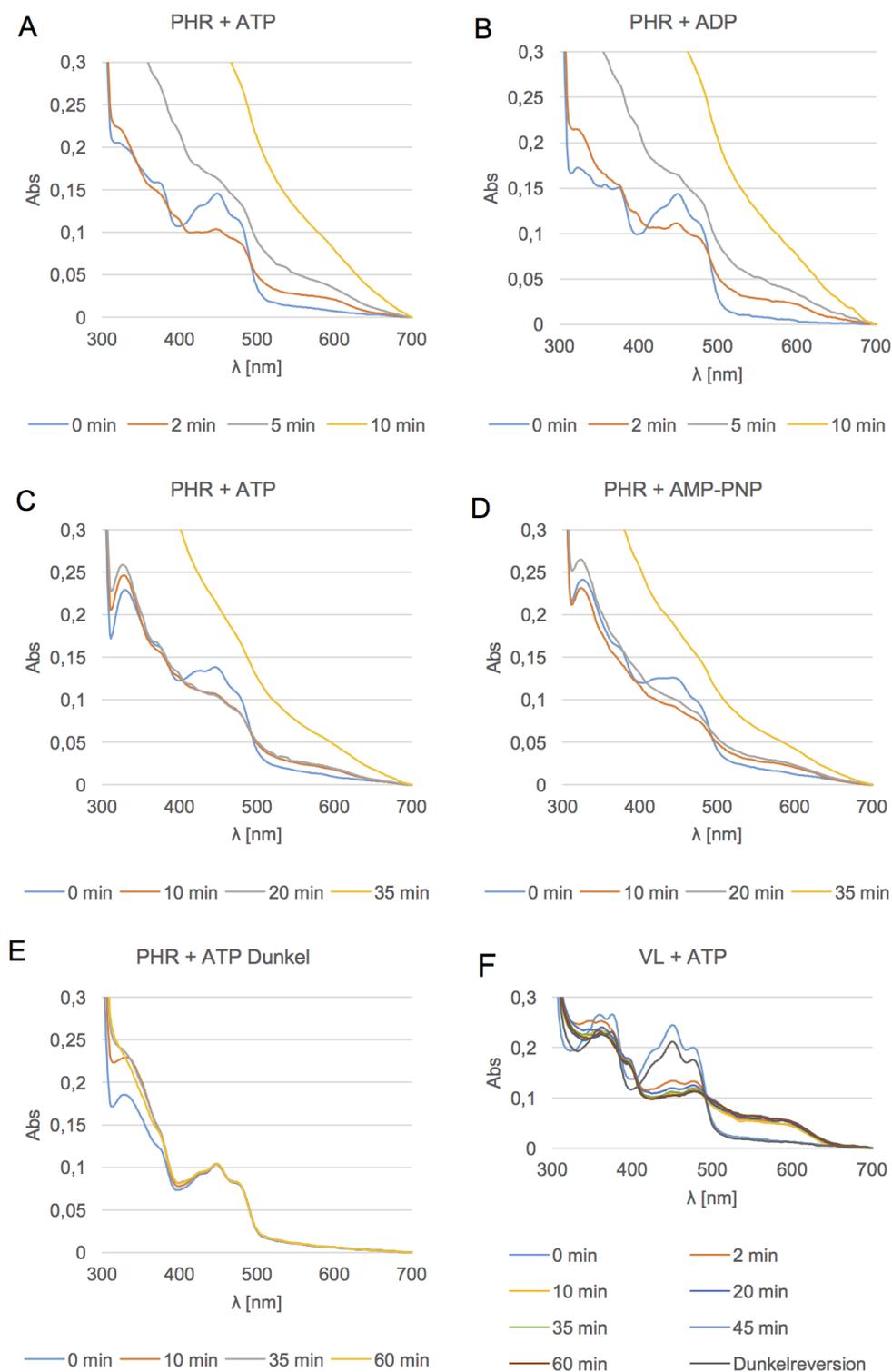


Abbildung 28: Qualitativer Effekt von Metaboliten auf die Photoreduktion und Dunkelreversion von cry2 WT. Die affinitätsgereinigten Proteine cry2 WT PHR (A-E) sowie cry2 WT Volllänge (F) wurden für bis zu 60 min mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in Gegenwart von 10 mM DTT und 1 mM ATP, ADP oder AMP-PNP bei 15 °C bestrahlt und nach den angegebenen Zeitpunkten die jeweiligen Absorptionsspektren aufgenommen. Für die Dunkelreversion wurden die Proteine nach der Bestrahlung für eine Stunde bei 15 °C in Dunkelheit inkubiert. Es sind verschiedene Aufreinigungen von cry2 WT PHR gezeigt: (A) und (B) zeigen die gleiche Aufreinigung sowie (C)-(E).

Generell war bei allen getesteten Proteinen immer eine gewisse Streuung auch unabhängig von ATP festzustellen, was sich besonders im längerwelligen Bereich des Spektrums feststellen lässt (Abbildung 27). Dieser Effekt konnte durch Filtration oder Zentrifugation der Proben nicht vermindert werden.

Für die *cry2* Y399A-Mutante konnte durch Zugabe von ATP kein Einfluss auf die Photoreduktion nachgewiesen werden. Für die *cry2* W321A-Mutante jedoch zeigte sich eine leichte Photoreduktion im Gegensatz zum gleichen Protein in Abwesenheit von ATP (Abbildung 29).

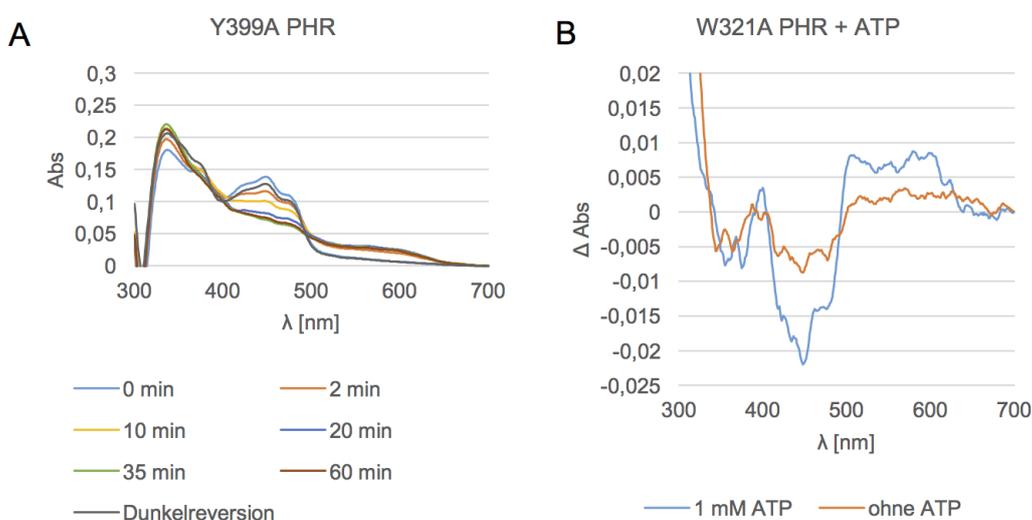


Abbildung 29: Einfluss von ATP auf die Photoreduktion von *cry2* Y399A PHR und *cry2* W321A PHR. Die affinitätsgereinigten Proteine *cry2* Y399A PHR (**A**) und *cry2* W321A PHR (**B**) wurden für bis zu 60 min mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in Gegenwart von 10 mM DTT und 1 mM ATP bei 15 °C bestrahlt und nach den angegebenen Zeitpunkten die jeweiligen Absorptionsspektren aufgenommen. Für *cry2* W321A PHR (**B**) ist zur besseren Visualisierung das Differenzspektrum der Absorptionen (Dunkel-Licht) nach 20 min Bestrahlung dargestellt. Für die Dunkelreversion wurden die Proteine nach der Bestrahlung für eine Stunde bei 15 °C in Dunkelheit inkubiert.

Um eine mehr quantitative Aussage zum Einfluss von ATP auf die Photoreduktion zu bekommen, wurden die Reaktionskinetiken von *cry2* WT und *cry2* Y399A-Mutante mit und ohne ATP geplottet. Dazu wurden die Änderungen der Absorptionen bei 450 nm (FAD_{ox}) sowie 520 nm (FADH°) zu den jeweiligen Zeitpunkten bestimmt und auf die jeweilige Absorption zum Zeitpunkt t_0 normiert. Auf diesem Weg sollte für die beiden Proteine genauer ermittelt werden, welchen Einfluss ATP auf die Photoreduktion hat (Abbildung 30). Aufgrund der zuvor beschriebenen Aggregation von *cry2* WT PHR wurde hierfür Volllängen-*cry2* eingesetzt.

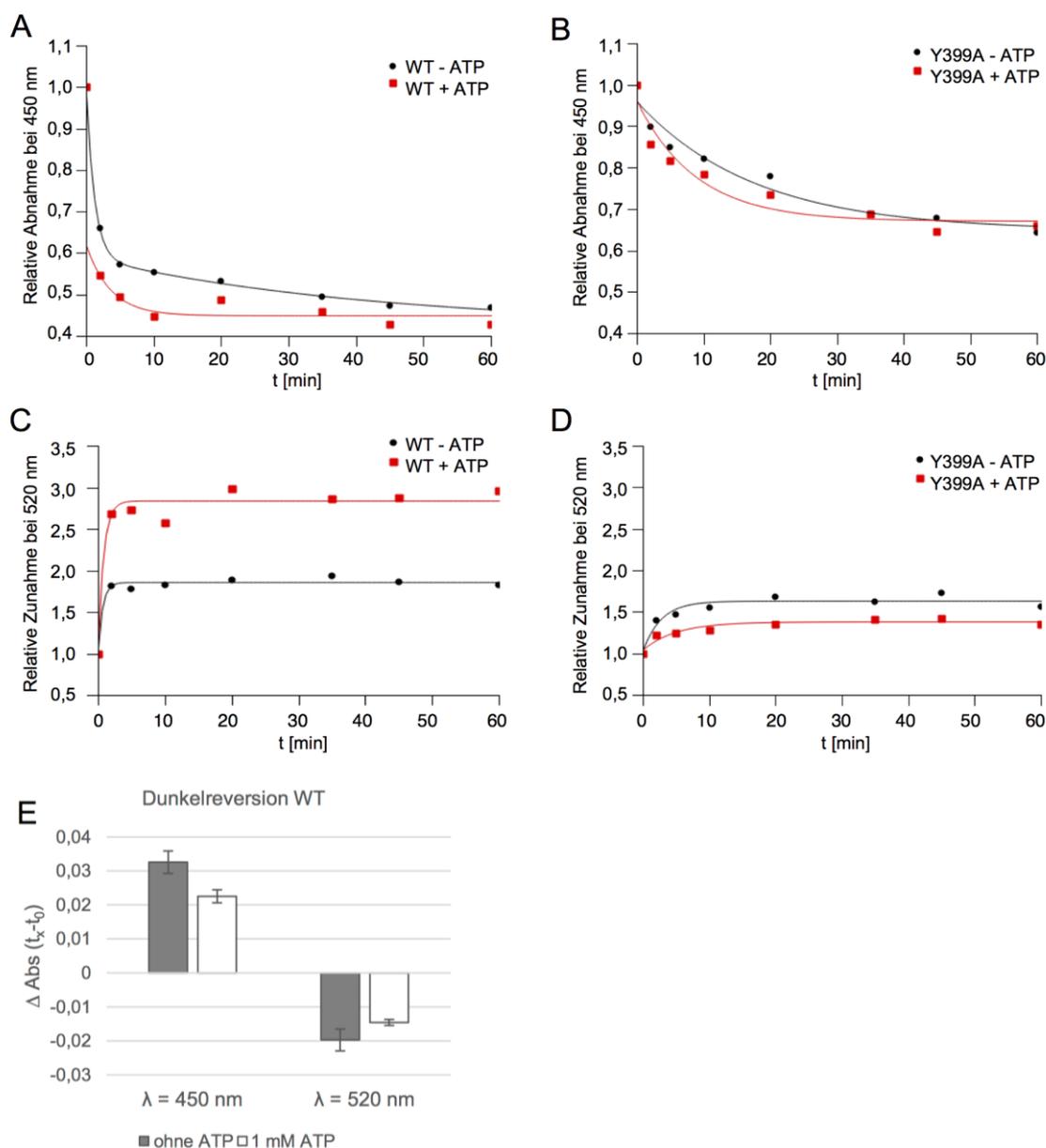


Abbildung 30: Effekt von ATP auf die Photoreduktion von cry2 WT und cry2 Y399A PHR. Die affinitätsgereinigten Proteine cry2 Y399A PHR (A, C) und cry2 WT (B, D) wurden für bis zu 60 min mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in Gegenwart von 10 mM DTT bei 15 °C bestrahlt und nach den angegebenen Zeitpunkten die jeweiligen Absorptionsspektren aufgenommen. Um den Effekt von ATP zu untersuchen, wurden zusätzlich in der Hälfte der Proben 1 mM ATP eingesetzt. Die relativen Änderungen der Absorptionen bei 450 nm bzw. 520 nm wurden für die unterschiedlichen Zeitpunkte (t_x) wie folgt berechnet: **Relative Änderung** = $\frac{\text{Abs}(t_x)}{\text{Abs}(t_0)}$. Die Ergebnisse wurden jeweils für 450 nm sowie 520 nm für WT und cry2 Y399A PHR geplottet und exponentiell gefittet. Dabei wurde für (A), (C) und (D) ein Ein-Komponenten-Fit und für (B) ein Zwei-Komponenten-Fit angenommen. (E) zeigt die Dunkelreversion von cry2 WT mit und ohne 1 mM ATP. Dafür wurde das Protein 2 min mit Blaulicht (450 nm; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in Gegenwart von 10 mM DTT bei 15 °C bestrahlt und dann für 5 min im Dunkeln gehalten. Die Änderungen der Absorptionen ($t_x - t_0$) bei 450 nm und 520 nm sind gezeigt. Es wurden Triplikate gemessen und die resultierenden Mittelwerte sowie Standardabweichungen sind gezeigt.

Die Ergebnisse zeigten, dass ATP auf die Kinetik der Photoreduktion der cry2 Y399A-Mutante keinen Effekt hatte. Die gemessenen Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne ATP

lagen im Bereich der Messungenauigkeit. Bei der Abnahme der Absorption bei 450 nm war für das Wildtyp-Protein kein starker ATP-Effekt nachweisbar. Auf die Zunahme der Absorption bei 520 nm hingegen hatte ATP einen deutlich verstärkenden Effekt. Die final erreichte Absorption bei 520 nm wurde durch ATP um das ca. 1,5-fache verstärkt. Die Darstellung verdeutlichte, dass bereits nach wenigen Minuten Bestrahlung das Maximum der 520 nm-Absorption erreicht war. Neben dem positiven Effekt von ATP auf die FADH^o-Akkumulation von cry2 WT wurde auch dessen Dunkelreversion untersucht (Abbildung 30 E). Dazu wurde cry2 WT 2 min mit Blaulicht bestrahlt und danach für 5 min in Dunkelheit inkubiert. Die Photoreduktion wurde spektroskopisch verfolgt und die jeweiligen Differenzen der Absorptionen bei 450 nm und 520 nm vor und nach der Inkubation im Dunkeln dargestellt. Das in Triplikaten durchgeführte Experiment zeigte, dass 1 mM ATP die Reakkumulation von FAD_{ox} sowie die Abnahme von FADH^o signifikant reduzierte.

4.4.1.2 EPR-Spektroskopie an cry2 W321A

Um einen Effekt von ATP auf die durch Absorptionsspektroskopie nur ansatzweise nachweisbare Photoreduktion der cry2 W321A-Mutante mit einer unabhängigen Methode zu überprüfen, wurde das Protein EPR-spektrometrisch bei 130 K mit dem *Electron Spin Resonance ESP 300 E* Spektrometer der Firma Bruker untersucht. Dabei sollte eine Akkumulation von FADH^o in Antwort auf ATP und Licht in einem äußeren Magnetfeld über die resultierende Absorption im Mikrowellenbereich detektiert werden (Abbildung 31).

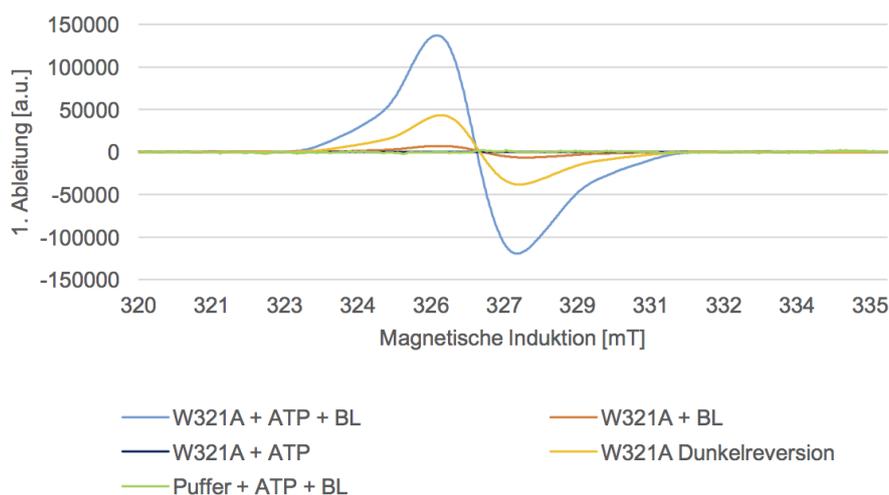


Abbildung 31: EPR-Spektroskopische Analyse von cry2 W321A PHR. 70 μM affinitätsgereinigtes cry2 W321A PHR wurde 20 min mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$; $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in Gegenwart von 10 mM DTT mit und ohne 1 mM ATP bei RT bestrahlt (BL), anschließend in $\text{N}_2(l)$ eingefroren und die EPR-Spektren bei 130 K aufgenommen. Als Kontrollen wurde ATP in Puffer unter den gleichen Bedingungen bestrahlt und gemessen (Puffer + ATP + BL) sowie eine unbestrahlte Dunkelprobe des Proteins mit ATP (W321A + ATP) sowie die Dunkelreversion des zuvor in Anwesenheit von ATP bestrahlten Proteins nach 60 min gemessen (In Zusammenarbeit mit Dr. O. Burghaus).

Um einen durch eventuell andere Radikale hervorgerufenen Effekt ausschließen zu können, wurden entsprechende Kontrollen durchgeführt. Diese zeigten, dass weder ATP noch der Proteinpuffer nach Blaulichtbestrahlung ein EPR-Signal ergaben. Auch unbestrahltes Protein mit ATP oder bestrahltes Protein ohne ATP führten zu keiner Detektion einer radikalischen Spezies. Sobald *cry2* W321A PHR jedoch in Gegenwart von 1 mM ATP mit Blaulicht bestrahlt wurde, konnte im magnetischen Feld ein paramagnetisches Signal mit einem g-Faktor von 2,003 und einer *Peak-to-Peak*-Breite von 1,74 mT nachgewiesen werden. Eine Dunkelinkubation für 1 h im Anschluss an Blaulichtbestrahlung führte zu einer deutlichen Abnahme des Signals. Der Datensatz bestätigte folglich die Ergebnisse der UV-Vis-Spektroskopie.

4.4.1.3 Fluoreszenzspektroskopie an *cry2*-Aggregaten

Zur näheren Charakterisierung der durch Blaulichtbestrahlung und ATP hervorgerufenen Aggregation von *cry2* WT PHR wurden die Aggregate Fluoreszenz-Emissions-spektroskopisch analysiert, um eine eventuelle Freisetzung von FAD_{ox} zu detektieren. Dies wäre ein Hinweis für eine vollständige Entfaltung des Proteins gewesen. 4 μM vollständig aggregiertes *cry2* WT PHR wurde untersucht. Als Kontrollen dienten jeweils 4 μM *cry2* WT PHR, *cry2* Y399A PHR und *cry2* W321A PHR. Als weitere Kontrolle wurde 4 μM freies FAD herangezogen.

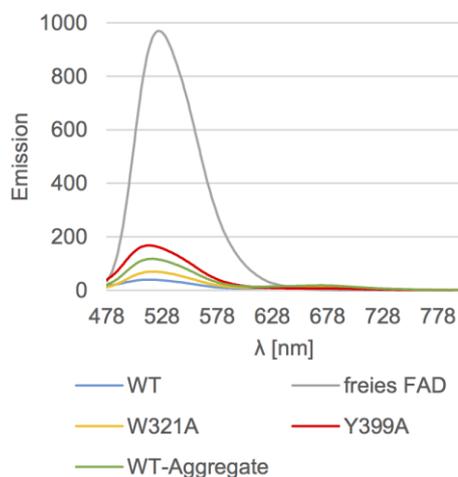


Abbildung 32: Fluoreszenz-Emissions-Spektroskopie an *cry2*. Jeweils 4 μM *cry2* WT PHR (WT), *cry2* Y399A PHR (Y399A) und *cry2* W321A PHR (W321A) wurden mit 450 nm angeregt und die resultierende Emission zwischen 470 und 800 nm detektiert. Auf die gleiche Weise wurden 4 μM vollständig durch Blaulichtbestrahlung in Anwesenheit von 1 mM ATP aggregiertes *cry2* WT PHR (WT Aggregate) analysiert. Allen Proben wurde 10 mM DTT zugesetzt.

Zur Detektion der FAD_{ox}-Fluoreszenz wurden die Proben mit 450 nm bestrahlt und die resultierende Emission gemessen (Abbildung 32). Dabei zeigte das freie FAD eine extrem starke Fluoreszenz mit einem Maximum bei ca. 520 nm. In allen Proteinproben war diese Fluoreszenz stark gequencht, sodass nur eine schwache Emission messbar war.

4.4.2 Partielle Proteolyse von cry2 zum Nachweis von ATP-induzierten strukturellen Änderungen

Zur Analyse möglicher ATP-induzierter Konformationsänderungen wurde das cry2 Volllängenprotein in An- und Abwesenheit von ATP mit Trypsin verdaut. Nach der Proteolyse für 10 bzw. 30 min wurde die Reaktion gequencht, die Fragmente über SDS-PAGE separiert und anschließend mit Coomassie gefärbt (Abbildung 33).

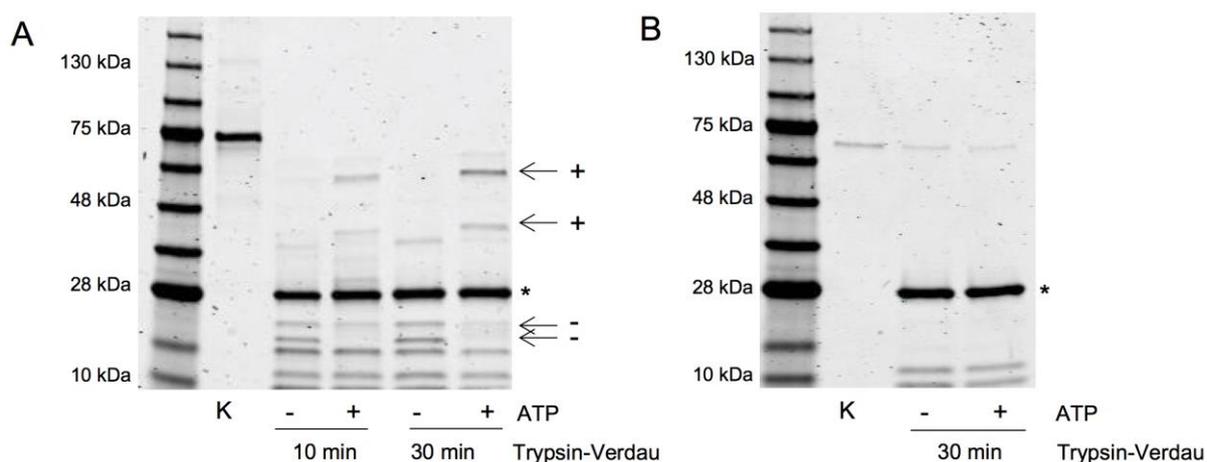


Abbildung 33: Partielle Proteolyse von cry2 WT mit Trypsin mit und ohne ATP. Trypsin-Verdau von Volllängen-cry2 (A) bzw. BSA (B) in An- (+) und Abwesenheit (-) von 1 mM ATP. Die Proben wurden für die angegebene Zeit mit 10 μ M Trypsin bei 30 °C inkubiert. Zur Kontrolle (K) wurden stattdessen Trypsin-Puffer (50 μ M HCl, 1 μ M CaCl₂) ohne Enzym gegeben. Zum Quenchen der Reaktion wurde Stopp-Puffer (5 mM EDTA & 5 mM PMSF in 5x SDS-Probenpuffer) zugegeben und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Auftrennung der Proteinfragmente erfolgte über SDS-PAGE. Zur Visualisierung wurden die Proteine anschließend mit Coomassie angefärbt. Es wurden Triplikate durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis ist dargestellt. Die Pfeile zeigen die Änderungen im Fragmentmuster nach Zugabe von ATP an; Banden die durch die Zugabe von ATP zusätzlich erscheinen, sind mit einem + gekennzeichnet, Bandenintensitäten, die in Anwesenheit von ATP geringer werden, sind mit einem – gekennzeichnet. * zeigt die Proteinbande, die auf Trypsin zurückzuführen ist. Jeweils ganz links ist der Proteinmarker aufgetragen.

Als Negativkontrolle wurde die Proteolyse von BSA mit Trypsin durchgeführt, welches dafür bekannt ist, ATP zu binden (Bauer et al., 1992; Takeda et al., 1997). Dieses zeigte mit ATP keine Veränderung des Bandenmusters nach dem Trypsin-Verdau im Vergleich zur ATP-freien Probe.

Die Inkubation von cry2 mit ATP führte zu deutlich unterschiedlichen Fragmentmustern, sowohl nach 10 min, als auch nach 30 min Trypsin-Verdau im Vergleich zu den ATP-freien Proben. Besonders auffällig war, dass die Bindung von ATP dazu führte, dass große Fragmente des Proteins unverdaut blieben. Auch die 30-minütige Inkubation mit Trypsin führte nicht zu einem Abbau dieser Banden. Folglich zeigten die Proben mit ATP im Vergleich zu den anderen weniger bzw. weniger starke Banden der kleineren Fragmente (< 30 kDa).

4.4.3 HDX-MS von cry2 PHR zum Nachweis von ATP-induzierten strukturellen Änderungen

Um die vorherigen Daten zu ATP-induzierten Konformationsänderungen von cry2 zu verifizieren und genauer zu untersuchen, wurde die PHR-Domäne von cry2 WT in An- und Abwesenheit von 1 mM ATP über HDX-MS analysiert. Dazu wurde das Protein für bestimmte Zeiten (0; 00:00:10 h; 00:01:40 h; 00:16:40 h; 02:46:40 h) in Deuterium-haltigem Puffer bei 25 °C inkubiert. Nach dem Quenchen der Reaktion wurde das Protein mit Pepsin verdaut und die resultierenden Fragmente hinsichtlich ihres Wasserstoff-Deuterium-Austausches über Massenspektrometrie analysiert. Um die Aggregation des Proteins zu verhindern und ausschließlich durch ATP bedingte strukturelle Änderung zu detektieren, wurden die Arbeiten unter Ausschluss von Licht durchgeführt. Der relative Einbau von Deuterium im Vergleich von ATP-ungebundenem und ATP-gebundenem Zustand wurde bestimmt und auf die modellierte Struktur von cry2 übertragen (Abbildung 34). Das Modell der cry2-Struktur wurde mit SWISSMODEL anhand der Kristallstruktur von cry1 WT PHR (PDB-ID: 1U3D) als *Template* erstellt. *Heatmaps* der Deuterium-Inkorporation und die generelle Sequenzabdeckung der Massenspektrometrie nach Pepsin-Verdau sind im Anhang A7 aufgelistet. Insgesamt wurde eine Peptidabdeckung von 88,7% und eine durchschnittliche Abdeckung der Aminosäuren (*Redundancy*) von 2,06 erzielt (Abbildung Anhang 3).

Die erzielten Befunde zeigten, dass es durch das Binden von ATP innerhalb der PHR-Domäne von cry2 WT zu einer Veränderung der Wasserstoff/Deuterium-Austauschrate kommt. Dabei führte die ATP-Zugabe zu einer Abnahme der Austauschrate im Vergleich zum ungebundenem-Zustand des Proteins. Somit induzierte die Bindung des Metabolits vorrangig eine Blockade bestimmter Bereiche des Proteins, sodass diese Amidgruppen des Aminosäurerückgrates nach Bindung des Metabolits nicht mehr oder nur noch erschwert für Deuterium zugänglich waren. Extrem auffällig war dabei die starke Verringerung der Exposition der C-terminalen Helix der PHR-Domäne (I474-I495) nach Metabolitzugabe. Dieser

Bereich, der beim Volllängenprotein in die C-terminale Extension übergeht, war am stärksten von einer Reduktion der Deuterium-Inkorporation nach ATP-Bindung betroffen. Weitere relativ stark betroffene Bereiche befanden sich in der α -Subdomäne (214-495) mit der FAD- und ATP-Bindehöhle. Neben drei Verbindungsregionen (I300-L312, F328-P339 und I225-D231) mit teilweise geringer sekundärer Strukturierung, waren die beiden Helices, die direkt in der FAD- sowie Metabolit-Bindetasche (L247-F253 und D393-Y399) liegen, von ATP-induzierten Konformationsänderungen mit einer Verringerung der Austauschraten betroffen. Andere Bereiche des Proteins, insbesondere nahezu die gesamte α/β -Subdomäne (6-132), zeigten keine großen Konformationsänderungen. Entsprechend der partiellen Proteolyse des Volllängen-cry2 zeigte HDX-MS, dass es durch die ATP-Bindung zu einer kompakteren Struktur des Proteins kommt, was sich nicht zuletzt in den relativ großflächigen Umstrukturierungen des C-terminalen Bereichs der PHR Domäne widerspiegelte.

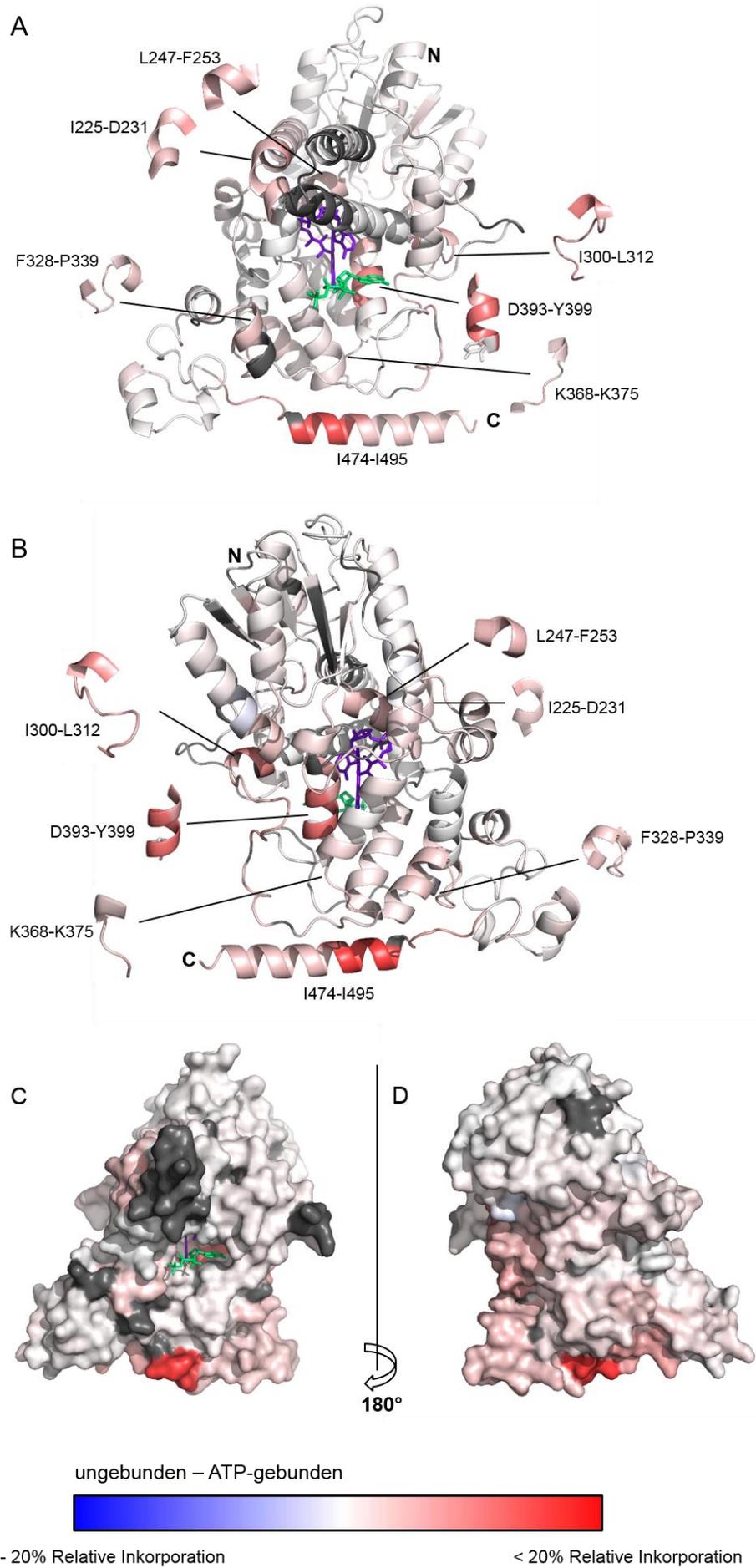


Abbildung 34: Relative Inkorporation von Deuterium in cry2 WT PHR im Vergleich von ungebundenem- und ATP-gebundenem Zustand. Cry2 WT PHR wurde 2 h, 46 min und 40 s in Deuterium-haltigen Puffer inkubiert. Nach dem Quenchen der Reaktion wurde das Protein mit Pepsin verdaut und massenspektrometrisch untersucht. Die relative Inkorporation von Deuterium wurde bestimmt und das Verhältnis von ATP-ungebundenem zu ATP-gebundenem Zustand berechnet. Die Ergebnisse wurden mit PyMOL auf die Modellstruktur von cry2 WT PHR (generiert mit SWISSMODEL mit der Kristallstruktur von cry1 WT PHR [PDB-ID: 1U3D] als *Template*) übertragen. FAD (violett) und AMP-PNP (grün) wurden aus der Struktur von cry1 übernommen. In grau sind Bereiche, zu denen keine Daten vorlagen, dargestellt. **(A)** und **(B)** zeigen ein *Cartoon*-Modell, jeweils um 180° gedreht, wobei C- und N-Terminus des Proteins gekennzeichnet sind. Bestimmte Sequenzen des Proteins sind noch einmal vergrößert dargestellt und die entsprechenden Aminosäuren angegeben. Tyr-399 ist als *Stick*-Darstellung hervorgehoben **(C)** und **(D)** zeigen ein *Surface*-Modell von A und B, ebenfalls jeweils um 180° gedreht. Der Versuch wurde von Dr. W. Steinchen durchgeführt.

4.5 Analysen zur cry2-cry2-Interaktion

Ein möglicher Einfluss von ATP auf Dimerisierung- bzw. Oligomerisierung von cry2 wurde durch Y2H Analysen und *in vitro* untersucht.

4.5.1 Hefe-2-Hybridanalysen zur Dimerisierung von cry2

Zur Untersuchung einer möglichen ATP-Abhängigkeit der cry2-cry2-Interaktion wurde sich des *Yeast-2-Hybrid*-Systems bedient. Die Vollängen-Versionen von cry2 WT, der cry2 Y399A-Mutante sowie der cry2 W321A-Mutante wurden in die beiden Hefevektoren pAS2-1 und pACT2 kloniert, um Fusionen mit der Aktivierungsdomäne (AD) bzw. DNA-Bindedomäne (BD) des Transkriptionsfaktors GAL4 zu erhalten. Durch Verwendung des Hefestammes Y2H Gold®, welcher sich durch die stabile Integration von drei verschiedenen GAL4-regulierten Promotoren auszeichnet, konnte die Interaktion über Histidin- sowie Adenin-Auxotrophie und Resistenz gegenüber dem für Hefe letalen Antibiotikum Aureobasidin A analysiert werden.

4.5.1.1 Qualitative Analyse über Auxotrophie

Die qualitativen Interaktionsanalysen über Aminosäureauxotrophien und die Resistenz gegenüber Aureobasidin A erfolgten über die Anzucht auf Minimalmedium. Dabei wurden zunächst chemisch kompetente Zellen des Stammes Y2H Gold® mit den jeweiligen pAS2-1- und pACT2-Konstrukten transformiert. Pro Transformationansatz wurden jeweils pAS2-1- und pACT2-Konstrukt eingebracht, sodass schließlich jeweils eine AD- und eine BD-Fusion des Zielproteins exprimiert wurden. Nach erfolgter positiver Selektion der Transformanten über die durch die Vektoren vermittelten Aminosäureauxotrophien wurden jeweils neun Klone pro

Transformationsansatz auf eine Interaktion der Fusionsproteine hin untersucht. Dafür wurden diese auf Minimalmedium ohne Leu, Trp, His und Adenin sowie zusätzlichem Antibiotikum Aureobasidin A ausplattiert. Als Kontrolle diente dabei die Anzucht der jeweiligen Transformanten auf Minimalmedium, das ausschließlich auf die Anwesenheit der Vektoren selektiert (Abbildung 35). Um zu überprüfen, ob ein Fusionskonstrukt eine autoaktivierende Wirkung aufwies, wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen nur ein Fusionsprotein und die zweite GAL4-Domäne unfusioniert in Y2H Gold® exprimiert wurden. Zur Analyse einer Blaulichtabhängigkeit der Proteininteraktion wurden die verschiedenen Transformationsansätze auf Minimalmedium in Dunkelheit bzw. bestrahlt mit $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 471 \text{ nm}$) angezogen.

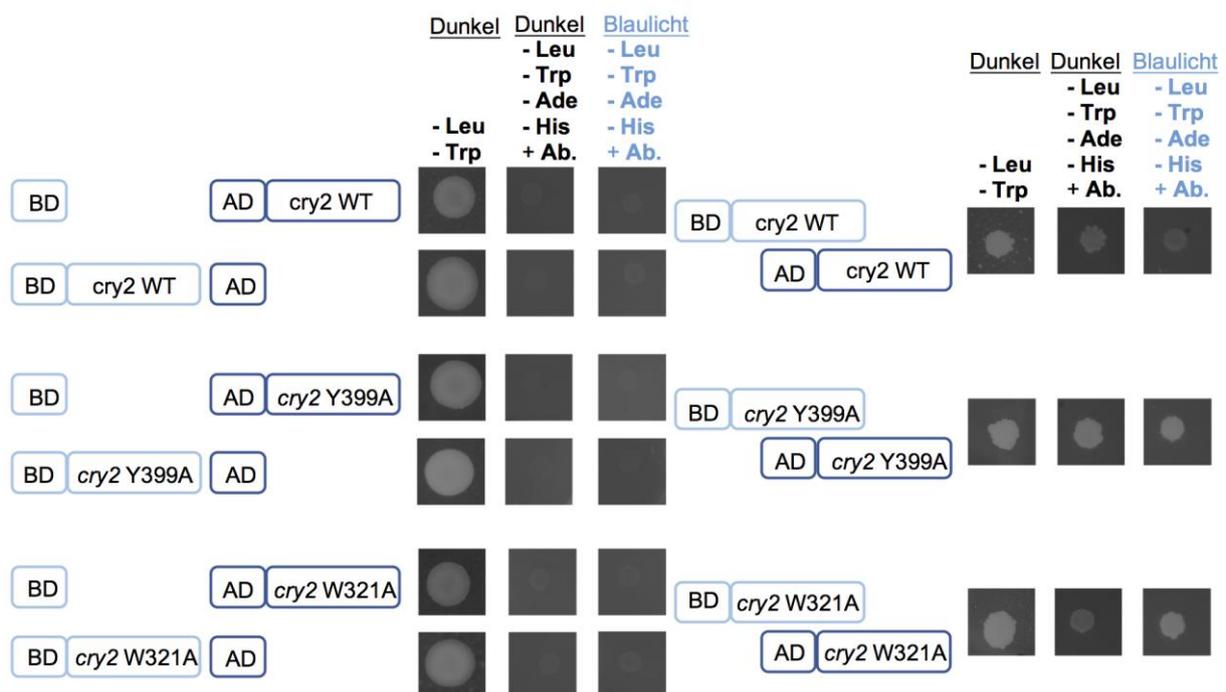


Abbildung 35: Yeast-2-Hybrid-Interaktionsstudien mit cry2 WT, cry2 Y399A und cry2 W321A. Der Hefestamm Y2H Gold® wurde mit pAS2-1 und pACT2 transformiert, welche für Fusionsproteine von cry2 WT, cry2 W321A und cry2 Y399A mit der Aktivierungsdomäne (AD) bzw. der DNA-Bindedomäne (BD) des Transkriptionsfaktors GAL4 kodieren. Jeweils neun Klone wurden pro Transformationsansatz auf Minimalmedium bei 30 °C angezogen. Zur Selektion der Transformanten wurde Doppel-DropOut-Medium genutzt (- Leu, - Trp), zur Interaktionsanalyse hingegen *Quintruple-DropOut*-Medium (- Leu, - Trp, - His, - Ade + Aureobasidin [Ab.]). Zur Analyse einer Lichtabhängigkeit der Interaktion wurde die Interaktionsanalyse in zwei verschiedenen Lichtbedingungen durchgeführt (Dunkelheit, bzw. $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht; $\lambda_{\text{max}} = 471 \text{ nm}$). Zur Überprüfung der Autoinduktion der Konstrukte wurden Doppeltransformationen unter den gleichen Bedingungen analysiert, wobei nur einer der beiden eingebrachten Vektoren für eine Fusion mit dem Zielprotein kodiert. Jeweils ein repräsentativer Klon ist gezeigt.

Über die Anzucht der transformierten Hefe auf Minimalmedium konnte unter beiden Lichtbedingungen für keines der eingesetzten Fusionsproteine eine Autoinduktion der Reporter-Expression nachgewiesen werden. Folglich waren alle Konstrukte für

Interaktionsanalysen geeignet. Diese zeigten sowohl für cry2 WT, als auch die cry2 Y399A-Mutante und die W321A-Mutante eine lichtunabhängige Dimerisierung- bzw. Oligomerisierung. Auffällig war, dass das Wachstum der in Licht angezogenen Klone im Gegensatz zu den Dunkelkontrollen verlangsamt war. Doch nach fünftägiger Inkubation bei 30 °C hatten sich die Koloniegrößen angeglichen. Generell zeigten die mit beiden GAL4-Fusionen transformierten Genotypen eine etwas andere Morphologie der Kolonien als die Kontrollen, welche nur ein Fusionskonstrukt exprimierten. Letztere waren deutlich kleiner und zeigten ausgefranste Ränder.

4.5.2 *Cross-Linking* zum Nachweis einer möglichen cry2-Dimerisierung

Zur *in vitro*-Analyse eines möglichen Effektes von ATP auf die Dimer- bzw. Oligomerisierung von cry2, wurde aufgereinigtes Vollängen-Protein über *Cross-Linking* analysiert. Dazu wurde es mit Formaldehyd in verschiedenen Konzentrationen bei Raumtemperatur für 10 bzw. 60 min inkubiert. Die entstandenden Reaktionsprodukte wurden nach dem Quenchen mit Tris über ein Gradientengel separiert und mittels Coomassie angefärbt (Abbildung 36). Um den Effekt von ATP zu untersuchen, wurde einigen Proben zuvor 1 mM ATP zugesetzt. Zusätzlich wurde die Lichtabhängigkeit der Reaktion durch eine Bestrahlung der Proben mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) untersucht.

Die in Abbildung 36 gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass die Größe der *Cross-Linking*-Reaktionsprodukte stark von der Dauer der Reaktion und der Konzentration des *Cross-Linkers* abhängig ist. Die sechzigminütige Inkubation von cry2 WT mit 4% Formaldehyd führte zur Bildung von Aggregaten, die nicht mehr in die Gelmatrix eindringen konnten (Abbildung 36 B). Beim Einsatz einer geringeren Formaldehyd-Konzentration sowie kürzerer Inkubationszeit hingegen tauchte neben der starken Proteinbande, die auf das cry2 Monomer zurückzuführen ist, eine zweite, schwächere Bande auf (Abbildung 36 A). Diese liegt mit knapp über 180 kDa über der größten Bande des Proteinmarkers, sodass sich eine Größe des Komplexes nur grob abschätzen lässt. Es ist davon auszugehen, dass sich um ein Oligomer aus drei oder vier cry2-Monomeren handelt.

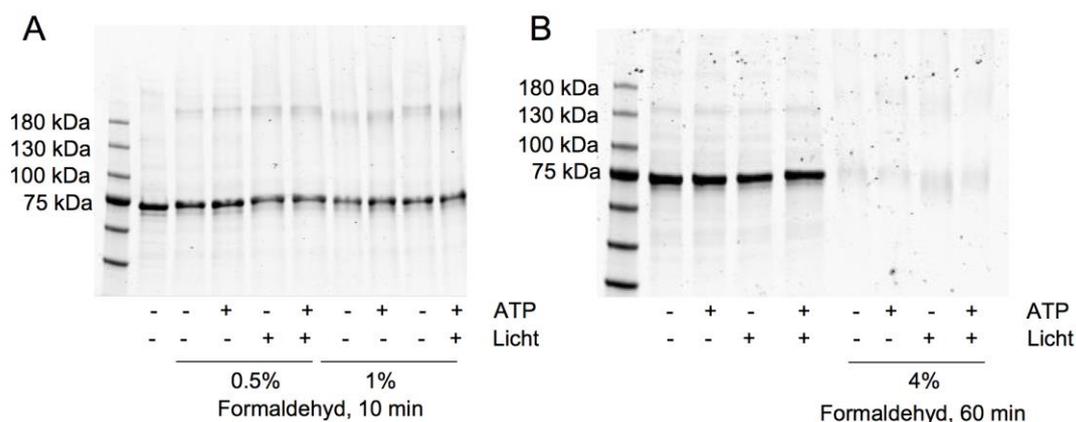


Abbildung 36: Cross-Linking von cry2 WT. 10 μM aufgereinigtes cry2 WT wurde für 10 min **(A)** bzw. 60 min **(B)** mit verschiedenen Konzentrationen Formaldehyd bei RT inkubiert. Zur Untersuchung einer möglichen ATP-Abhängigkeit wurde einigen Proben zusätzlich 1 mM ATP zugesetzt. Um einen Blaulichteffekt zu testen, wurden einige Reaktionsansätze außerdem während der Reaktion mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$; $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bestrahlt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Tris gequencht. Die resultierenden Reaktionsprodukte wurden über SDS-PAGE mit Gradientengelen separiert und mit Coomassie gefärbt. Jeweils links wurde der Proteinmarker aufgetragen und die korrespondierenden Massen in kDa sind gezeigt.

4.6. Analysen zur Wirkungsweise von 3-Bromo-7-nitroindazol

Um den kürzlich beschriebenen Inhibitor pflanzlicher Cryptochrome, 3-Bromo-7-nitroindazol (3B7N) (Abbildung 11), hinsichtlich einer möglichen Interferenz mit deren ATP-Bindung zu untersuchen, wurden diesbezüglich *in planta*- sowie *in vitro*-Studien mit aufgereinigtem cry2 durchgeführt.

4.6.1 Wirkung von 3-Bromo-7-nitroindazol *in planta*

Um die publizierte Wirkung von 3B7N *in planta* zu verifizieren und näher zu charakterisieren, wurden die Experimente von Ong et al. (Ong et al., 2017) reproduziert und um die Untersuchung eines möglichen Effektes von 3B7N auf Phototropine erweitert.

Dafür wurden *Arabidopsis*-Keimlinge verschiedener Genotypen unter verschiedenen Lichtbedingungen mit und ohne 3B7N aufgezogen und ihre Hypokotyllängen bzw. die Krümmungswinkel nach unilateraler Blaulichtbestrahlung der Hypokotyle verglichen (Abbildung 37). Wildtyp-Keimlinge wurden unter Blau-, Rot und Dunkelrotlicht sowie in

Dunkelheit aufgezogen. Als Kontrolle diente dabei DMSO in gleicher Konzentration wie in der 3B7N-Lösung, da 3B7N nicht vollständig in wässrigem Lösungsmittel löslich ist. Dabei zeigte sich, dass es ausschließlich bei der Blaulichtantwort der Keimlinge zu einem inhibierenden Effekt durch 3B7N kam. Die Keimlinge in den anderen Lichtprogrammen verhielten sich wie die Kontrolle mit DMSO. Um diesen Effekt des Inhibitors näher zu untersuchen, wurden *cry1*- sowie *cry1cry2*- und Wildtyp-Keimlinge unter $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht aufgezogen und erneut die Hypokotyllängen gemessen. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich der Wildtyp negativ von 3B7N beeinflusst wurde. Die Cryptochrom-Mutanten blieben unbeeinflusst. Diese Versuchsergebnisse sind übereinstimmend mit den publizierten Resultaten, die einen spezifischen inhibitorischen Effekt von 3B7N auf Cryptochrom-Antworten beschreiben.

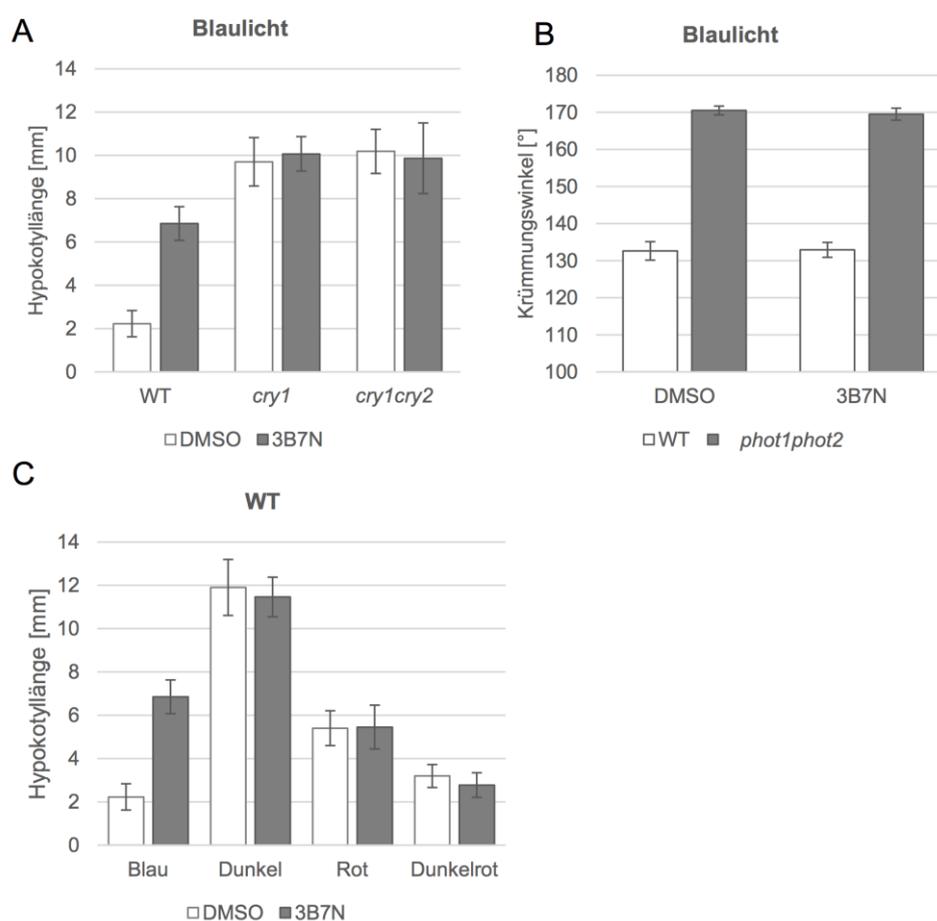


Abbildung 37: Wirkung von 3-Bromo-7-nitroindazol auf verschiedene Photorezeptoren. *Arabidopsis*-Samen unterschiedlicher Genotypen wurde auf $\frac{1}{2}$ MS-Platten mit $2,5 \mu\text{M}$ 3B7N bzw. DMSO als Kontrolle ausgesät. Nach Vernalisation von drei Tagen und einer Keiminduktion mit 4 h Weißlicht wurden die Platten in die unterschiedlichen Lichtbedingungen für vier Tage überführt. **(A, C)** Hypokotyllänge verschiedener Genotypen in verschiedenen Lichtbedingungen: Blau ($\lambda_{\text{max}} = 471 \text{ nm}$, $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Rot ($\lambda_{\text{max}} = 673 \text{ nm}$, $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), Dunkelrot ($\lambda_{\text{max}} = 748 \text{ nm}$, $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und Dunkelheit. $n \geq 20$. **(B)** Krümmungswinkel von Keimlingen, die nach dreitägiger Anzucht in Dunkelheit für 24 h in unilaterales Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$) überführt wurden. Die *phot1phot2*-Mutanten wurden in $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und die WT-Keimlinge in $0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Mindestens 20 Keimlinge wurden pro Genotyp bzw. Lichtbedingung mit ImageJ® hinsichtlich ihrer Hypokotyllängen ausgewertet. Mittelwerte und Standardabweichungen sind gezeigt.

Zudem wurde hierbei ein möglicher Einfluss von 3B7N auf Phototropine untersucht. Dazu wurde der Krümmungswinkel vier Tage alter *phot1phot2*- und WT-Keimlinge bestimmt. Diese wurden drei Tage in Dunkelheit aufgezogen und schließlich für 24 h in $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (*phot1phot2*) bzw. $0,03 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (WT) unilaterales Blaulicht (465 nm) überführt (Abbildung 37). Der apparative Aufbau für den Bestrahlungsversuch machte es nicht möglich, dass alle vier Ansätze gleichzeitig exakt den selben Lichtbedingungen ausgesetzt wurden. Nichtsdestotrotz zeigten die *phot1phot2*-Mutanten nahezu keinen Phototropismus. Die Wildtyp-Keimlinge hingegen zeigten ein starkes Wachstum zum Licht, was durch einen starken Krümmungswinkel deutlich wurde. Jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Keimlingen, die auf 3B7N oder DMSO angezogen wurden. Folglich konnte unter den gegebenen Bedingungen ausschließlich ein 3B7N-Effekt auf die Antwort der Cryptochrome gezeigt werden. Die untersuchten biologischen Antworten der Phototropine und Phytochrome wurde nicht durch den Inhibitor beeinträchtigt.

Für eine nähere Charakterisierung der Wirkung des Inhibitors auf *cry2* wurde dessen Effekt auf transgenen Linien getestet, die verschiedene *cry2* Versionen exprimierten. Diese wurden entsprechend zum zuvor beschriebenen Versuch auf Medium mit und ohne 3B7N angezogen. Um den 3B7N-Effekt spezifisch auf *cry2* zu testen, wurden die Keimlinge nicht unter $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Blaulicht, sondern unter $0,65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ angezogen. Eine wie in Kapitel 4.3.1 genutzte *Boxplot*-Darstellung der Ergebnisse war in diesem Versuch nicht sinnvoll, da es zu einer weniger übersichtlichen Darstellungsweise führte (die zur *cry2*-Mutante aufgespaltenen Pflanzen konnten nicht wie in Kapitel 4.3.1 aus der Statistik herausgenommen werden, um eine bessere Visualisierung zu erzielen). Dementsprechend sind die Ergebnisse als Verteilung dargestellt (Abbildung 38). Ebenso wie in Abbildung 37 gezeigt, war ein deutlicher Effekt von 3B7N auf die Wildtyp-Keimlinge zu sehen. In der Verteilungsdarstellung ist eine Verschiebung der Hypokotyllängen der getesteten Keimlinge hin zu längeren Hypokotylen zu sehen. Die *cry1cry2*-Mutanten zeigten keinen Effekt. Die *cry2*-defizienten Keimlinge zeigten einen sehr geringen negativen Effekt von 3B7N. Die transgenen Keimlinge der WT-Linie (Linie 1.4) zeigten in ihrer Verteilung ohne den Inhibitor eine Dreigipflichkeit in der biologischen Antwort. Diese ist mit der Aufspaltung des T₂-Saatguts zur *cry2*-Mutante sowie zu homozygoten und heterozygoten Transgenen zu erklären, da es sich bei der *cry*-gesteuerten Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums um einen Dosis-abhängigen Effekt handelt. Durch Zusatz von 3B7N kommt es zu einer Verschiebung dieser Dreigipflichkeit hin zu längeren Hypokotylen. Dabei blieb die Maximallänge der Hypokotyle, welche von der aufgespaltenen *cry2*-Mutante repräsentiert wurden, durch 3B7N unbeeinflusst.

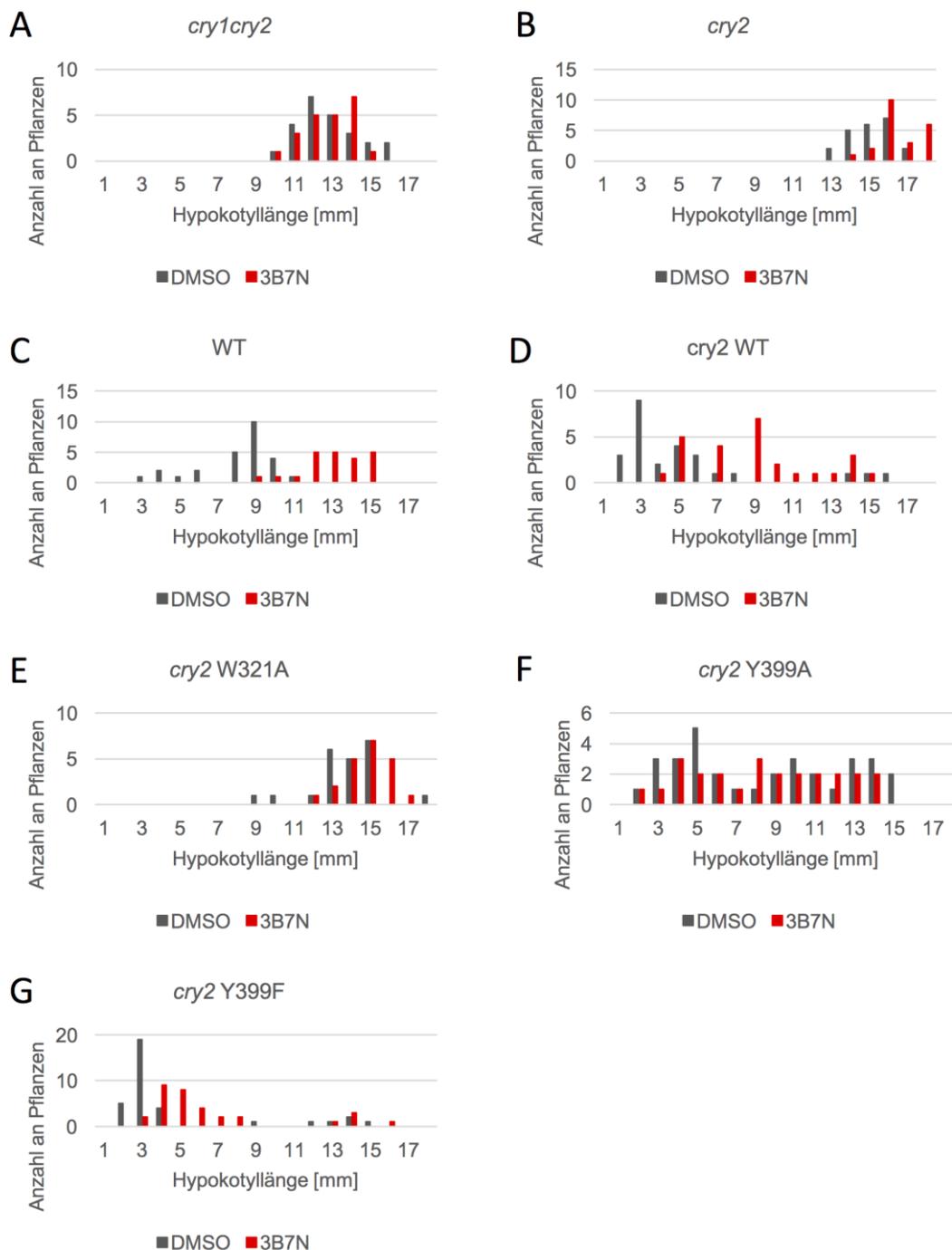


Abbildung 38: Einfluss von 3-Bromo-7-nitroindazol auf *cry2* WT, *cry2* W321A sowie *cry2* Y399A/F auf Inhibition des Hypokotyllängenwachstums. Samen repräsentativer transgener Linien, welche die verschiedenen *cry2*-Versionen konstitutiv exprimieren, wurden auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit $2,5 \mu\text{M}$ 3B7N bzw. DMSO als Kontrolle ausgelegt und nach drei Tagen Vernalisation sowie 4 h Keiminduktion durch Weißlichtbestrahlung in schwaches Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 471 \text{ nm}$; $0,65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) überführt. Nach sechs Tagen wurden die Hypokotyllängen von mindestens 20 Keimlingen mit ImageJ® gemessen.

Für die *cry2* Y399A exprimierende Linie (Linie 7.2) zeigte 3B7N keinerlei Effekt. Die Verteilung der Hypokotyllängen war mit und ohne den Inhibitor identisch. Jedoch resultierte der

Austausch an Position 399 von Tyr zu Phe (Linie 8.1) zu einer Antwort auf den Zusatz von 3B7N, weil in Anwesenheit von 3B7N deutlich längere Hypokotyle gemessen wurden als bei der Kontrolle. Bei der Trp-Triade-Mutante *cry2* W321A (Linie 6.1) konnte nur ein marginaler Effekt durch Applikation von 3B7N beobachtet werden. Jedoch zeigte die getestete Linie bereits ohne 3B7N stark verlängerte Hypokotyle im Vergleich zur Linie, die Wildtyp-*cry2* exprimiert (s. Kapitel 4.3.1). Dunkelkontrollen zeigten für alle getesteten Genotypen keinen 3B7N-Effekt (Daten nicht gezeigt).

4.6.2 Wirkung von 3-Bromo-7-nitroindazol auf *cry2 in vitro*

Zur näheren Charakterisierung einer möglichen Interferenz des *cry*-Inhibitors mit der ATP-Bindung von *cry2* wurde die 3B7N-Bindung von *cry2* WT PHR und *cry2* Y399A PHR *in vitro* untersucht. Dabei wurden die aufgereinigten Proteine in Gegenwart von ATP und bzw. oder 3B7N mittels ThermoFAD aufgeschmolzen (Abbildung 39).

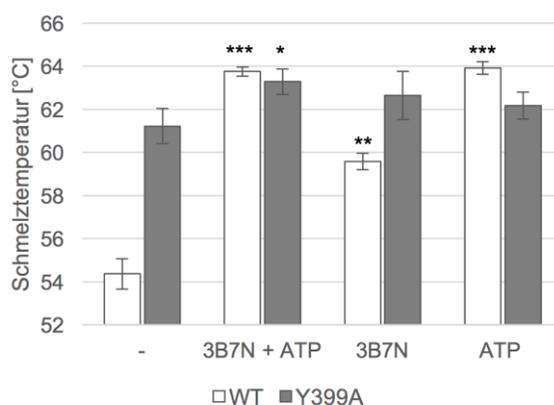


Abbildung 39: Untersuchung des Effektes von 3-Bromo-7-nitroindazol auf *cry2* WT PHR und *cry2* Y399A PHR im Vergleich mit ATP. Aufgereinigte C-terminal verkürzte PHR-Domänen wurden mittels ThermoFAD hinsichtlich ATP- und 3B7N-Bindung in der Anwesenheit von 10 mM DTT und 2,4% (v/v) DMSO untersucht. Schmelzpunkte der Proteine mit und ohne 0,1 mM ATP bzw. 3B7N. Signifikante Unterschiede zwischen Proben mit und ohne Metaboliten sind mit *** (p-Wert $\leq 0,001$), ** (p-Wert $\leq 0,005$) und * (p-Wert $\leq 0,05$) dargestellt. n = 3.

Durch die Anwesenheit von DMSO kam es zu einer generellen Erniedrigung der Schmelztemperaturen für beide *cry2* Versionen (vgl. Abbildung 22). Zudem war der stabilisierende Effekt von ATP auf *cry2* WT in Anwesenheit von DMSO verringert. Statt zu einer Schmelzpunkterhöhung von 13 °C wurde nur noch eine Temperaturdifferenz von ca. 10 °C beobachtet. Auch durch Zusatz von DMSO zeigte die *cry2* Y399A-Mutante keinerlei Beeinflussung durch ATP. *cry2* WT wurde durch 3B7N in seinem Schmelzverhalten stabilisiert,

wobei ΔT mit ca. 5 °C deutlich geringer war als die durch ATP hervorgerufene Temperaturänderung. Cry2 Y399A PHR hingegen zeigte keinerlei signifikanten Effekt durch die Zugabe von 3B7N. Sowohl Wildtyp, als auch die Mutante zeigten jedoch eine signifikante Erhöhung der Schmelztemperaturen bei gleichzeitigem Zusatz von ATP und 3B7N. Wobei für cry2 WT PHR der Effekt der gleiche war, wie wenn nur ATP zugegeben wurde.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die ATP-Bindung des Blaulichtrezeptors Cryptochrom 2 aus *Arabidopsis thaliana in planta* und *in vitro* näher zu charakterisieren. Obwohl bereits 2003 die ATP-Bindfähigkeit pflanzlicher Cryptochrome an *A.t. cry1* erstmals beschrieben (Bouly et al., 2003) und seitdem immer weitere Forschung diesbezüglich betrieben wurde, ist die biologische Funktion der Bindung von ATP an Cryptochromen unklar. Auch war die ATP-Bindestelle speziell von *cry2* nicht definiert.

Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurde sich im Zuge dieser Arbeit zahlreicher proteinbiochemischer sowie genetischer und pflanzenphysiologischer Methoden bedient.

5.1 Heterologe Expression und Aufreinigung der *cry2*-Proteine

Die Basis für erfolgreiche *in vitro*-Analysen von *cry2* ist dessen heterologe Expression und anschließende Aufreinigung. Bisher ist es noch nicht gelungen, pflanzliche Cryptochrome wie *cry1* und *cry2* von *A. thaliana* als Vollängenversionen löslich in *E. coli* zu exprimieren. Die entsprechenden Proteine lagen allenfalls in *Inclusion Bodies* vor. In eukaryotischen Expressionssystemen wie Insektenzellen (Banerjee et al., 2007; Li et al., 2011; Özgür and Sancar, 2006) oder HEK-Zellen (Sang et al., 2005; Yang et al., 2016) können die Proteine jedoch in voller Länge löslich produziert werden. In *E. coli*-Zellen hingegen ist die Expression von *cry1* und *cry2* auf deren PHR-Domänen beschränkt (Brautigam et al., 2004; Orth et al., 2017). Nur für das DASH-Cryptochrom *cry3* aus *A. thaliana* sowie andere *cry*-DASH konnten erfolgreiche Expressionen der Vollängenversion in *E. coli*-Zellen gezeigt werden, die zu löslichen Proteinen führten (Klar et al., 2007; Pokorny et al., 2005). Für *cry3* ist zudem die erfolgreiche Kristallisation des Vollängenproteins und dessen Struktur mittels Röntgenbeugung beschrieben (Klar et al., 2007; Pokorny et al., 2005; Pokorny et al., 2008), die bisher sowohl für *cry1*, als auch für *cry2* ausblieb. Da sich das DASH-Cryptochrom *cry3* strukturell von den beiden klassischen pflanzlichen Cryptochromen *cry1* und *cry2* durch das Fehlen eines flexiblen C-Terminus (CCE) auszeichnet, liegt es nahe zu vermuten, dass dieser Grund für die Schwierigkeiten bei Expression und Aufreinigung von *cry1* und *cry2* ist. Es

gelang Brautigam et al. (Brautigam et al., 2004), cry1 PHR ohne CCE zu kristallisieren und eine Kristallstruktur zu lösen. Für cry2 PHR ist bis heute jedoch nur eine Modellstruktur verfügbar, die auf der cry1-Struktur basiert.

Aufgrund der bekannten Schwierigkeit der Expression pflanzlicher Cryptochrome voller Länge in *E. coli* wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich C-terminal verkürzte Versionen von cry2 WT, cry2 Y399A/F und cry2 W321A rekombinant exprimiert, für die jedoch gezeigt wurde, dass sie sich hinsichtlich der Metabolitbindung sehr ähnlich zum Volllängenprotein verhalten (Abbildung 21). Die generellen Ausbeuten an aufgereinigtem Protein waren verhältnismäßig eher gering. Dies ist konsistent mit den zuvor beschriebenen Problemen der Expression pflanzlicher Cryptochrome in *E. coli*. cry2 PHR wurde zusammen mit HSP60 aus *E. coli* aufgereinigt (Abbildung 19). Das Entfernen der Chaperone führte zum Präzipitieren der PHR-Domäne, sodass eine verbesserte Aufreinigung der cry2-Versionen nicht durchführbar war. Dieses Präzipitieren von nahezu HSP60-freiem cry2 PHR verdeutlicht, dass ein Grund für die erschwerten Bedingungen der Proteinproduktion möglicherweise in einer erschwerten Proteinfaltung der Cryptochrome in heterologen Expressionssystemen liegen könnte. Zudem könnten wichtige posttranslationale Modifikationen in rekombinant produzierten Proteinen verändert sein. Diese Vermutungen werden dadurch unterstützt, dass das in Sf21-Zellen produzierte cry2 zwar in deutlich höheren Mengen gewonnen werden konnte, jedoch ebenfalls beim Ankonzentrieren auf Konzentrationen über 20 µM präzipitierte (Daten nicht gezeigt).

5.2 Y399 als Teil der Metabolit-Bindungsstelle von *A.t.*

Cryptochrom 2

Durch das Fehlen einer Kokristallstruktur von cry2 mit ATP bzw. AMP-PNP ist die exakte Bindetasche für ATP oder andere Adenin-Nukleotide bisher nicht bekannt. Für cry1 PHR hingegen ergab die Struktur von Proteinkristallen, die mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Derivat AMP-PNP getränkt waren, die ATP-Bindetasche (Brautigam et al., 2004). AMP-PNP ist insbesondere durch die Aminosäuren Tyr-402 und Leu-296 innerhalb der PHR-Domäne von cry1 assoziiert, welche in den verwandten Photolyasen für die Bindung des Photoschadens der DNA zuständig sind (Brautigam et al., 2004). Damit ist eine direkte räumliche Nähe des Adeninrings von ATP zum FAD-Kofaktor gegeben (Abbildung 9). Auch unabhängige Bindungsstudien bestätigten, dass Tyr-402 in cry1 essentiell für dessen

Metabolitbindung ist (Orth et al., 2017). Sequenzvergleiche von cry1 und cry2 (s. Anhang A1) ergaben dabei die Aminosäuren Tyr-399 sowie Leu-293 als äquivalente Positionen in cry2 (Engelhard et al., 2014). Um Y399 als primär verantwortlich für die Metabolitbindung von cry2 zu verifizieren, wurden cry2-Konstrukte etabliert, welche an dieser Position einen Austausch des Tyrosins zu Phenylalanin (Y399F) bzw. zu Alanin (Y399A) trugen. Die aufgereinigten PHR-Domänen dieser cry2-Konstrukte wurden hinsichtlich ihrer ATP-Bindfähigkeit mittels ThermoFAD-Assays und ITC untersucht. In beiden Ansätzen wurden dabei Metabolitkonzentrationen im millimolaren Bereich (final 0,1 bis 10 mM) eingesetzt, die den natürlichen ATP-Konzentrationen im pflanzlichen Cytosol entsprechen (Blatt, 1987).

Zunächst wurde mit beiden unabhängigen Methoden die bereits beschriebene Affinität von cry2 WT zu ATP bestätigt (Ozgür and Sancar, 2006). Sowohl die verkürzte Version, als auch die Vollängenversion zeigten den gleichen deutlichen Effekt in ThermoFAD-Assays gegenüber dem Metaboliten ($\Delta T_m \approx 13 \text{ }^\circ\text{C}$). Dieses Verhalten von PHR-Domäne und Vollängenprotein wurde mit ITC bestätigt. Die hier für die Bindung zwischen cry2 WT PHR und ATP gezeigte K_D von $1,09 \pm 0,48 \text{ } \mu\text{M}$ ist sehr ähnlich zu der zuvor für Vollängen-cry2 publizierten K_D von $0,9 \text{ } \mu\text{M}$, die mit der selben Methode bestimmt wurde (Ozgür and Sancar, 2006). Bei Dissoziationskonstanten in diesem Bereich ist von einer relativ starken Affinität des Proteins zum Liganden zu sprechen. Auffällig bei den durch ITC-Experimenten erhaltenen Datensätzen (Abbildung 23) ist, dass das aus ihnen hervorgehende molare Verhältnis von cry2 WT PHR und ATP immer deutlich unter 1 liegt. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ozgür und Sancar (Ozgür and Sancar, 2006), welche eine stöchiometrische Bindung von Protein und Ligand zeigten. Der Grund für das geringe molare Verhältnis dieser ATP-Bindung könnte die Oligomerisierung von cry2 PHR sein (Bugaj et al., 2013). Somit ist wahrscheinlich, dass ein bestimmter Anteil des Proteins als Oligomer vorlag, dessen Monomere wahrscheinlich nicht mehr für eine Bindung von ATP zur Verfügung standen. Auf die erhaltene K_D sollte dieser Effekt jedoch nur einen geringen Einfluss haben.

Die Datensätze für cry2 WT PHR bestätigen klar, dass die Metabolitbindung nicht durch den C-Terminus des Proteins beeinflusst ist und somit die Verwendung der PHR-Domäne zum Studium der ATP-Bindung zulässig ist. Da allen Puffern bei den ATP-Bindungsstudien kein Mg^{2+} zugesetzt wurde, kann ein Beitrag von Mg^{2+} zur Bindung von ATP an cry2 ausgeschlossen werden, wie dies auch in der cry1 PHR-Kristallstruktur zu sehen war (Brautigam et al., 2004).

Unter den gleichen experimentellen Bedingungen, wie sie für das Wildtyp-Protein verwendet wurden, wurden die beiden cry2 Y399-Mutanten hinsichtlich ihres ATP-Bindungsverhaltens

charakterisiert. Mit beiden Methoden konnte in mehreren unabhängigen Experimenten keine Bindung zwischen ATP und *cry2* Y399A bzw. Y399F nachgewiesen werden. Hiermit wurde nicht nur gezeigt, dass das Tyr-399 essentiell für die ATP-Bindung ist, sondern auch, dass die Reinheit der genutzten Proteinpräparationen ausreichend für die durchgeführten Studien war. Keines der vorhandenen Fremdproteine bindet unter den genutzten experimentellen Bedingungen ATP. Somit sind die gemessenen Effekte allein auf *cry2* zurückzuführen. Für das Wildtyp-Protein wurde gezeigt (Abbildung 22 A, C), dass eine durch Ligandenbindung hervorgerufene Verschiebung des Schmelzpunktes des Proteins proportional von der eingesetzten Ligandenkonzentration abhängig ist (Matulis et al., 2005). Entsprechend wurde überprüft, ob durch den Einsatz einer 10-fach höheren Metabolitkonzentration (10 mM) eine Bindung zwischen Y399A PHR und ATP nachgewiesen werden konnte. Doch auch bei erhöhter Metabolitkonzentration war kein stabilisierender Effekt auf das Protein messbar (Abbildung 22 C). Der destabilisierende Effekt des Metaboliten auf *cry2* Y399F, der schon mit 1 mM ATP signifikant war, ist auf eine mögliche Restbindung des mutierten Proteins zurückzuführen, die durch andere Aminosäuren vermittelt sein könnte. Diese Restbindung wird durch erhöhte Konzentrationen an Ligand nach dem Prinzip von Le Chatelier favorisiert und zeichnet sich folglich für Y399A erst bei 10-fach erhöhten ATP-Konzentrationen ab. Eine Bindung des Liganden über Leu-293 führt vermutlich zu dessen Fehlstellung innerhalb der Bindetasche und somit zum dem in ThermoFAD-Assays beobachteten destabilisierenden Effekt. Da Phenylalanin strukturell ähnlich zu Tyrosin ist, ist damit der stärkere Effekt bei Y399F im Gegensatz zu Y399A erklärbar. Um diese putative Restbindung zu verifizieren, könnte zusätzlich zur Mutation von Tyr-399 Leu-293 (Leu-296 in *cry1*) ausgetauscht und anschließend untersucht werden, ob ATP noch einen Effekt auf das mutierte Protein hat. Das Äquivalent zu Leu-293 in *cry1* (Leu-296) wurde anhand der *cry1*-AMP-PNP-Kokristallstruktur ebenfalls als an der Metabolitbindung beteiligt identifiziert (Abbildung 9).

Die Ergebnisse der Bindungsstudien zeigen eindeutig, dass unter den gegebenen Bedingungen ein Austausch des Tyr-399 zu einem Verlust bzw. einer erheblichen Reduktion der ATP-Bindefähigkeit des Proteins führt und diese Aminosäure somit für die Metabolitbindung weitgehend essentiell ist. Auch die HDX-MS-Daten (Abbildung 34) bestätigen die Region um Y399 als Metabolitbindetasche, weil es in dieser Region (E393-Y399) zu einer verhältnismäßig starken Reduktion der Deuterium-Inkorporation nach Zugabe von 1 mM ATP kam. Dass Y399 von einem differentiellen Austausch nicht betroffen war, kann mit der Positionierung von ATP in der Bindetasche erklärt werden: Mittels HDX wird ausschließlich der Deuterium-Austausch von amidischen Wasserstoffen des Aminosäure-Rückgrates gemessen. Falls es zu einer Assoziation des ATP an Y399 kommt, welche die amidischen Wasserstoffe nicht für einen Austausch durch Deuterium blockt, wird folglich auch

keine Differenz zwischen ungebundenem- und ATP-gebundenem Zustand in der Austauschrate gemessen. Insgesamt zeigen diese Daten Y399 als wichtigen Rest für die Bindung von ATP und bestätigen die räumliche Nähe zwischen FAD und ATP innerhalb der α -Subdomäne.

Die hier gezeigten Befunde verdeutlichen die Relevanz von Tyr-399 für die ATP-Bindung von *cry2*, stehen aber im Gegensatz zu Daten von Engelhard et al. (Engelhard et al., 2014). Diese zeigten für die Vollängenversion von *cry2* Y399A über ATP-Agarose-Affinitätschromatographie eine intakte ATP-Bindung dieser Mutante. Die Affinität zu ATP ist für die Try-Mutante mit einer angegebenen K_D von 12 ± 2 mM sogar noch höher als die Kontrollreaktion mit *cry2* WT (49 ± 12 mM). Diesbezüglich wurde von Engelhard et al. für *cry2* Y399A keine reduzierte ATP-Bindfähigkeit, sondern eine fehlende Reaktionsfähigkeit auf ATP postuliert. Jedoch muss diesbezüglich verdeutlicht werden, dass bei einer gemessenen K_D im millimolaren Bereich nicht mehr von einer spezifischen Bindung gesprochen werden kann. Orth et al. (Orth et al., 2017) sprechen beispielsweise schon bei einer K_D von $50,4 \pm 28,0$ μ M von einer fehlenden Affinität der Bindung bei der homologen *cry1*-Mutante Y402A PHR. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die im Zuge der Engelhard-Publikation genutzten experimentellen Bedingungen nicht ausgereift genug waren, um eine direkte Aussage über die Bindungsverhältnisse zu treffen.

cry2 WT PHR und *cry2* Y399A PHR wurden nicht nur hinsichtlich Bindung von ATP, sondern auch anderer Adenine untersucht, um eine Aussage darüber treffen zu können, welchen Beitrag Substituenten des Adeninrings zur Bindung beisteuern (Abbildung 22 C). Durch die in ThermoFAD-Assays zu ATP ($\Delta T_m \approx 20$ °C) gefundenen sehr ähnlichen Effekte seiner Derivate ADP ($\Delta T_m \approx 18$ °C) und AMP-PNP ($\Delta T_m \approx 15$ °C) auf *cry2* WT PHR sowie den zwar weniger starken, aber dennoch signifikanten Einflüssen von NAD ($\Delta T_m \approx 6$ °C) und NADH ($\Delta T_m \approx 8$ °C) wurde gezeigt, dass der Adenosin-Rest wichtig für die Metabolitbindung ist. Die Phosphat-Reste, insbesondere das γ -Phosphat, sind hingegen für die Bindung nicht bedeutsam (Abbildung 40). Diese Daten sind in Übereinstimmung mit der *cry1* PHR/AMP-PNP Kokristallstruktur (Brautigam et al., 2004) und publizierten Bindungsstudien für *cry1* (Orth et al., 2017). Die Kristallstruktur zeigt, dass der Adenin-Rest des Liganden mit Y402 und L296 assoziiert ist (Abbildung 9). Der Adeninring ist folglich essentiell für die Bindung des Metabolits. Die Phosphate hingegen haben keinen direkten Kontakt zum Protein, ebenso wie das mit den Phosphaten assoziierte Mg^{2+} . Die Bindung von NAD(H) zeigt, dass die Metabolitbindetasche sehr geräumig ist. Auch die Kristallstruktur von *cry1* PHR zeigte dies sowie, dass die Metabolittasche von *cry1* größer ist als die Bindetasche für den DNA-Schaden in Photolyasen

und DASH-Cryptochromen. Die zusätzliche Phosphatgruppe in NADP(H) führt zu einem Verlust der Bindung, vermutlich aus sterischen Gründen.

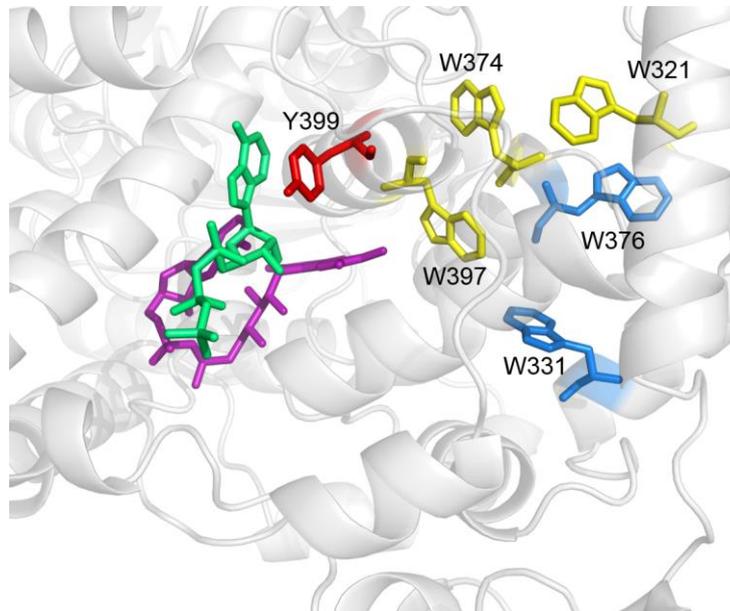


Abbildung 40: Model der FAD-Bindehöhle von *A.t. cry2* mit der im Rahmen dieser Arbeit bestätigten Metabolitbindestelle. Das Homologiemodel, welches auf der Kristallstruktur von cry1 PHR (PDB-ID: 1U3D) basiert, wurde mit SWISSMODEL generiert und mit PyMOL bearbeitet. Es zeigt AMP-PNP und FAD aus der cry1-Struktur. Die in dieser Arbeit bestätigte Metabolitbindestelle von Cryptochrom 2 wird u.a. von Y399 gebildet. Des Weiteren sind die an der Trp-Triade beteiligten Tryptophane W397, W374 und W321 sowie Tryptophane, die an einem putativen alternativen Elektronentransportweg beteiligt sein könnten (W331, W376), dargestellt. Farbgebung: violett, FAD; grün, AMP-PNP; rot, Tyr-399; gelb, Tryptophane der Trp-Triade; blau, Tryptophane, die möglicherweise an einem alternativen Elektronentransport beteiligt sind.

Die aus den *in vitro*-Bindungsstudien gewonnenen Daten lassen sich wie folgt zusammenfassen: *A.t.* Cryptochrom 2 bindet unabhängig von Licht- und der C-terminalen Extension ATP und andere Metabolite mit Adenin-Ring. Hierfür ist Tyr-399 essentiell (Abbildung 40).

5.3 ATP-Bindung von *A.t.* Cryptochrom 2 verstärkt dessen biologische Aktivität

Obwohl die ATP-Bindefähigkeit von cry2 klar gezeigt wurde, gab es bisher keine Studien über die biologische Relevanz dieser Bindung.

Entsprechend anderer Komplementationsversuche von *A. thaliana* Cryptochrommutanten mit *cry2*, welche die biologischen Funktion der Trp-Triade adressierten (Li et al., 2011), wurden die *cry2*-Konstrukte *cry2* WT, *cry2* W321A und *cry2* Y399A/F über *Floral Dip* in *cry2*-defiziente Pflanzen eingebracht. Die konstitutive Expression erfolgte unter Kontrolle eines einfachen 35S-Promotors. Zur Vermeidung eines möglichen negativen Einflusses eines angehängten Reporterproteins wie GFP wurden unfusionierte *cry2*-Versionen genutzt. Li et al. (Li et al., 2011) brachten für ihre Komplementationsversuche die verschiedenen *cry2*-Varianten als GFP-Fusionen in *A. thaliana* mit *cry1cry2*-Hintergrund ein. Die Arbeiten dieser Gruppe wurden ebenfalls mit einem einfachen konstitutiven 35S-Promotor durchgeführt. Die Unterschiede zu den Daten von Li et al. (Li et al., 2011) bestehen darin, dass im Rahmen dieser Arbeit unfusionierte *cry2*-Versionen sowie ein *cry2*-defizienter Hintergrund der transgenen Linien verwendet wurden.

In den in dieser Arbeit generierten transgenen Linien wurde ein *Gene Silencing* der Transgene im Adultstadium der T₂-Generation beobachtet (Abbildung 26). *Gene Silencing* ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Etablierung transgener Linien, welches mit sehr unterschiedlichen Expressionsleveln des Transgens in unabhängigen Linien einhergeht, insbesondere, wenn konstitutive Promotoren wie der CaMV-35S-Promotor verwendet werden (Holtorf et al., 1995; Peach and Velten, 1991; Schubert et al., 2004). Das auf die Nachfolgegeneration übertragene *Silencing* kann dabei auf zwei verschiedenen Ebenen eintreten, wobei es zu epigenetischen Effekten und nicht zu Abänderungen der Sequenz des Transgens kommt. Es kann sowohl auf transkriptionaler (TGS, transkriptionelles *Gene Silencing*) als auch auf post-transkriptionaler Ebene (PTGS, post-transkriptionelles *Gene Silencing*) zum *Gene Silencing* kommen (Vaucheret et al., 1998), wobei siRNAs (*small interfering RNAs*) eine zentrale Rolle innehaben (Hamilton and Baulcombe, 1999; Mette et al., 2000; Sijen et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass es Zusammenhänge zwischen Insertionsrate des Transgens bzw. dessen Transkriptlevel und *Gene Silencing* gibt. Abhängig vom jeweiligen Gen kommt es bei der Überschreitung des Transkriptlevels eines spezifischen Schwellenwertes zur Stilllegung des Transgens, welches in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung der transgenen Pflanze auftreten kann (Schubert et al., 2004). Die Stärke der *cry2*-Antwort ist sehr stark von dessen Proteinlevel abhängig, welche durch zahlreiche *Downstream*-Komponenten vermittelt wird. Kleine Veränderungen im *cry2*-Level können somit auf dieses sensitive System große Auswirkungen haben, zumal etwa ein Viertel aller Gene in *Arabidopsis* lichtgesteuert ist (Ma et al., 2001) und *cry2* dabei einen wichtigen Beitrag hat. Somit wäre das *Gene Silencing* der eingebrachten *cry2*-Konstrukte eine Gegenreaktion der Pflanze, das sensitive regulatorische Netzwerk nicht zu stören.

Das im Adultstadium der transgenen Pflanzen aufgetretene *Gene Silencing* beschränkte somit sämtliche Analysen der transgenen Linien auf das Keimlingsstadium, wobei dies lediglich die Analyse der Auswirkung von Aminosäureaustauschen in *cry2* auf das Blühverhalten verhinderte, nicht aber *cry2* Antworten im Keimlingsstadium tangierte.

5.3.1 ATP-Bindung an *cry2* stimuliert dessen Rolle bei der Photomorphogenese

Eine teilweise redundante Funktionsweise von *cry1* und *cry2* zeigt sich insbesondere bei der Photomorphogenese bzw. Deetiolierung von Keimlingen (Ahmad et al., 1998), wobei *cry1* und *cry2* unter verschiedenen Fluenzraten arbeiten. Aufgrund seiner Lichtlabilität hat *cry2* bei der Photomorphogenese nur eine Funktion unter Schwachlichtbedingungen. Somit wurde dieser Intensitätsbereich gewählt, um die transgenen Linien zu analysieren.

Die Inhibierung des Hypokotylstreckenwachstums wird oft als biologische Antwort zur Phänotypisierung transgener *cry*-überexprimierender Pflanzen herangezogen, obwohl eine starke Abhängigkeit zwischen biologischer Antwort und Menge des Photorezeptors bekannt ist (Lin et al., 1998, 1996, 1995a). Deshalb müssen die biologischen Antworten der transgenen Linien mit den entsprechenden Proteinmengen verglichen werden. Obwohl die Varianz der *cry2*-Level der hier untersuchten transgenen Linien teilweise groß war (Abbildung 24), lassen sich dennoch konkrete Aussagen über die biologische Aktivität von *cry2* Y399A und Y399F im Vergleich zum Wildtyp-Protein treffen. Drei *cry2* Y399A-Linien, deren *cry2*-Gehalte sehr ähnlich der der *cry2* WT-exprimierenden Linie waren, zeigten eine geringere biologische Aktivität als die *cry2* WT-Linie (Abbildung 24). Jedoch zeigten die Daten auch, dass der Verlust der ATP-Bindung nicht zu einem vollständigen Verlust der Aktivität des Proteins führte. Weiterhin wurde beobachtet, dass *cry2* Y399F eine stärkere biologische Funktion als *cry2* Y399A hat und sich ähnlich zum Wildtyp *cry2* verhält. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Tyr und Phe strukturähnlich sind und die *cry2* Y399F Mutante somit noch ATP binden kann. Gestützt wird diese Hypothese durch den Befund, dass ein Cryptochrom aus Tomate an der zu Y399 homologen Position statt eines Tyr ein Phe aufweist (Perrotta et al., 2001).

5.3.2 ATP-Bindung fördert den Abbau von Cryptochrom 2

Da der Blaulicht-induzierte Abbau von cry2 direkt mit dem Ausmaß seiner lichtabhängigen Aktivierung korreliert (Shalitin et al., 2002; Wang et al., 2017; Zuo et al., 2012), kann dieser Prozess als *Readout* für die biologische Aktivität von cry2 genutzt werden (Li et al., 2011).

Wie in anderen Arbeiten beschrieben (Ahmad et al., 1998; Herbel et al., 2013), zeigte cry2 WT in etiolierten Keimlingen, die in Blaulicht überführt werden (hier: $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), einen sehr raschen Abbau. Die Kinetik dieser Reaktion kann aufgrund der Fluenzratenabhängigkeit nicht direkt mit anderen Publikationen verglichen werden, da diese zum Teil deutlich höhere Lichtintensitäten nutzten (Li et al., 2011). Analog zur reduzierten Aktivität bei der Photomorphogenese zeigte cry2 Y399A im Vergleich zum Wildtyp einen deutlich verlangsamten Abbau (Abbildung 25 E). Des Weiteren zeichnete sich beim Abbau von cry2 ein Unterschied zwischen Proteinen mit Austausch des Y399 zu Ala und Phe ab. cry2 Y399F war in seiner Abbaukinetik dem Wildtyp-Protein erneut sehr ähnlich. Durch die Fluenzratenabhängigkeit des cry2-Abbaus (Ahmad et al., 1998) ist es jedoch durchaus möglich, dass unter geringeren Fluenzraten ein signifikanter Unterschied zwischen cry2 WT und cry2 Y399F detektierbar ist. Zusätzlich zu den Daten bezüglich der cry2-gesteuerten Photomorphogenese unter Schwachlichtbedingungen, konnte erneut in einem unabhängigen Experiment gezeigt werden, dass der Verlust der ATP-Bindung nicht zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität von cry2 führt, diese aber deutlich verringert. Des Weiteren zeichnete sich auch in diesem Datensatz eine putative Restbindung in cry2 Y399F ab.

5.4 *In planta*-Rolle der Tryptophan-Triade in

Cryptochrom 2 am Beispiel von W321

Publizierte Daten zeigen eindeutig, dass die Trp-Triade für die *in vitro*-Photoreduktion des FAD in Cryptochromen essentiell ist (Burney et al., 2009; Engelhard et al., 2014; Gao et al., 2015; Li et al., 2011; Zeugner et al., 2005). Ob die Trp-Triade auch für die biologische Funktion der Cryptochrome erforderlich ist, wird kontrovers diskutiert (Zeugner et al., 2005; Li et al., 2011; Gao et al., 2015). Die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sind nicht mit der Vorstellung vereinbar, dass die Trp-Triade für die biologische Funktion der Cryptochrome unwichtig ist, weil der Austausch des Oberflächen-ständigen Tryptophans der Trp-Triade,

W321, durch ein Alanin zu einem starken Verlust der Aktivität des Photorezeptors führt und selbst bei starker Überexpression nahezu keine Komplementation des *cry2*-Mutanten-Phänotyps erfolgte (Abbildung 24). Des Weiteren ist der Blaulicht-induzierte Abbau von *cry2* W321A im Vergleich zum Wildtyp-Protein stark verlangsamt, aber nicht völlig verhindert (Abbildung 25). Damit ist gezeigt, dass entsprechend der Aussage von Gao et al. (Gao et al., 2015) und Li et al. (Li et al., 2011) ein Austausch von W321 nicht zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität von *cry2* führt. Die Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit stehen in Einklang mit den von Zeugner et al. (Zeugner et al., 2005) publizierten Daten zur funktionellen Analyse der Trp-Triade in *cry1*. Diese zeigen, dass der Austausch des oberflächenexponierten W324 sowie von W400 zu Ala zu einem starken Verlust der biologischen Aktivität führt.

Eine Aussage über die Funktion der beiden inneren Tryptophane der Triade von *cry2* (W397 und W374) bei der Photoaktivierung *in vivo* kann anhand der Daten von Li et al. (Li et al., 2011) deshalb nicht gemacht werden, weil die entsprechenden Mutanten (W374A/F, W397A/F) konstitutiv aktiv sind und einen *cop*-Phänotyp erzeugen.

5.5 Einfluss von ATP auf Cryptochrom 2 *in vitro*

5.5.1 Einfluss von ATP auf den Photozyklus von Cryptochrom 2

Die in dieser Arbeit erzielten Daten sind in Übereinstimmung mit dem beschriebenen Photozyklus pflanzlicher Cryptochrome, da *cry2* WT im Dunkelzustand FAD_{ox} gebunden hat, welches unter Bestrahlung mit Blaulicht zu $FADH^{\circ}$ reduziert wird (Abbildung 27). Über die mögliche Bildung anderer Redoxspezies des Flavins in der PHR-Domäne von *cry2* konnte keine Aussage getroffen werden, weil die Absorptionsspektren im UV-Bereich nicht eindeutig interpretierbar waren. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zu Vollängen-*cry2* WT, bei dem das für FAD_{ox} typische Absorptionsmaximum bei ca. 370 nm deutlich zu erkennen war. Weiterhin unterschieden sich die Absorptionsspektren im UV-A Bereich zwischen unterschiedlichen Präparationen der PHR-Domänen deutlich. In weitgehender Übereinstimmung mit publizierten Daten (Banerjee et al., 2007; Li et al., 2011; Ozgür and Sancar, 2006) sind die hier gemessenen Absorptionsspektren des Vollängen-*cry2*, welches in Insektenzellen produziert wurde und im gleichen Puffer wie die PHR-Domänen vorlag. Somit

sind die spektralen Unterschiede von PHR-Domäne und Vollängen-cry2 durch das Fehlen bzw. die Anwesenheit des C-Terminus erklärbar. Aufgrund dieser Inkonsistenz können auch mangels Dekonvolution der Spektren keine generellen Aussagen über den Flavin-Photozyklus von cry2 gemacht werden, wohl aber über die *steady-state* Mengen von FAD_{ox} und $FADH^\circ$. Dies wird als unproblematisch gesehen, weil zahlreiche Evidenzen dafürsprechen, dass nur das pflanzliche Cryptochrom mit neutralem Flavinradikal dem *Lit State* entspricht, der als einziger im Bereich über 500 nm absorbiert und somit klar in den hier gezeigten Spektren detektierbar ist. Sowohl Wildtyp Vollängen-cry2 als auch dessen PHR-Domäne zeigen eine Photoreduktion des FAD_{ox} zum $FADH^\circ$ in Antwort auf Blaulichtbestrahlung. Jedoch fällt diese unterschiedlich stark aus: Das Vollängenprotein zeigte unter gleichen Versuchsbedingungen eine deutlich stärkere Akkumulation von $FADH^\circ$ ausgehend von FAD_{ox} . Damit liegt die Vermutung nahe, dass auch die C-terminale Extension einen gewissen Einfluss auf die Photoreduktion des Kofaktors hat. Möglicherweise durch einen verbesserten Elektronentransfer oder durch Stabilisierung des *Lit States*. Da jedoch keine direkten Vergleiche der Photoreduktionskinetiken unterschiedlicher Proteine gemacht wurden, sondern der Einfluss von ATP auf die Photoreduktion der einzelnen cry2-Versionen untersucht werden sollte, sind die Unterschiede in den Reaktionsintensitäten nicht relevant.

Neben cry2 WT, zeigte auch die cry2 Y399A PHR-Mutante ohne Zugabe von ATP die Akkumulation von $FADH^\circ$ in Folge von Blaulichtbestrahlung. Damit können die *in planta*-Daten, die zeigen, dass cry2 Y399A noch biologische Aktivität besitzt, mit dessen Photoreduzierbarkeit korreliert werden. Wie die fehlende Metabolitbindung der Tyr-399A Mutanten schon vermuten ließ, hat die Metabolitzugabe keinerlei Effekt auf deren Photoreduktion (Abbildung 30). Dieser ausbleibende Effekt von ATP auf die Photoreduktion von cry2 Y399A ist in Übereinstimmung mit Daten von Engelhard et al. (Engelhard et al., 2014). Die Zugabe von ATP zu Wildtyp-cry2 steigert dessen final erreichte $FADH^\circ$ -Konzentration bei Blaulichtbestrahlung um das ca. 1,5-Fache (Abbildung 30). Da die Abnahme des FAD_{ox} bei ATP-Zugabe jedoch nicht um den gleichen Faktor verstärkt ist, ist davon auszugehen, dass sich die Bildung des neutralen Flavinradikals noch aus einem anderen *Pool* speist. Jedoch muss bedacht werden, dass neben FAD_{ox} auch $FAD^{\circ-}$ und $FADH^\circ$ bei 450 nm, wenn auch mit deutlich geringerem molaren Extinktionskoeffizienten, absorbieren. Neben einer Steigerung der Photoreduktion durch ATP konnte auch eine Stabilisierung des gebildeten $FADH^\circ$ und somit eine verzögerte Dunkelreversion nachgewiesen werden (Abbildung 30 E). Die hier gefundenen höheren *steady-state* Gehalte von $FADH^\circ$ in cry2 in Folge von ATP-Zugabe ist in Übereinstimmung mit anderen Publikationen zu cry2 und anderen pflanzlichen Cryptochromen (Burney et al., 2009; Cailliez et al., 2014, 2014; El-Esawi et al., 2015; Engelhard et al., 2014; Immeln et al., 2007; Orth et al., 2017). Dennoch muss festgehalten werden, dass auch konträre

Auffassungen zur Wirkung von ATP auf den Photozyklus von pflanzlichen Cryptochromen publiziert wurde, die keinerlei Effekt von ATP auf die Photoreduktion postulieren (Gao et al., 2015).

Mit der durch Metabolitbindung gesteigerten Menge an Photorezeptor mit neutralem Flavin-Semichinon im Licht ist gleichzeitig eine Erklärung für die verringerte biologische Aktivität der Y399A Mutante gegeben. Aufgrund der relativ starken Affinität von cry2 zu ATP ($K_D = 1,09 \mu\text{M}$) ist davon auszugehen, dass das Protein *in vivo* vollständig mit ATP oder anderen Adeninen besetzt ist. Dadurch kommt es zu einer höheren Menge an *Lit State* im Wildtyp-cry2 im Vergleich zur Y399A-Mutante. Ein höherer Anteil von cry2 im *Lit State* steht für die Interaktion mit *Downstream*-Komponenten wie COP1 zur Verfügung (Wang et al., 2001; Yang et al., 2001). Dies mündet in eine Akkumulation des Transkriptionsfaktors HY5 und damit in eine verstärkte biologische Antwort (Chattopadhyay et al., 1998; Osterlund et al., 2000). Auch der Blaulicht-induzierte Abbau von cry2 erfordert einen photoaktivierten Photorezeptor, der der Abbaumaschinerie zugeführt wird (Herbel et al., 2013; Wang et al., 2017). Somit ist der verstärkende Effekt der ATP-Bindung für diese biologische Antwort von cry2 analog zum Geschehen bei der Deetiolierung.

Ein weiterer Beweis für den positiven Einfluss von ATP auf die Akkumulation von FADH° wird mit der Trp-Triade-Mutante deutlich. Diese bindet noch ATP (Abbildung 22), ist aber nicht mehr in der Lage, *in vitro* in Abwesenheit von ATP zu photoreduzieren (Abbildung 27), was bereits in anderen Arbeiten gezeigt wurde (Engelhard et al., 2014; Gao et al., 2015; Li et al., 2011; Zeugner et al., 2005). Die Zugabe von ATP führt dazu, dass die cry2 W321A-Mutante photoreduzierbar wird (Abbildung 29, Abbildung 31). Die hier gezeigten EPR-Signale für das gebildete FADH° in cry2 mit einem g-Wert von 2,001 und einer *Peak-to-Peak*-Breite von 1,74 mT sind sehr ähnlich zu bereits publizierten Daten für cry2 mit einem g-Wert ≈ 2 und 1,75 mT *Peak-to-Peak*-Breite (Banerjee et al., 2007).

Der stimulierende Effekt von ATP auf die ansonsten fehlende Photoreduktion der cry2 Trp-Triade-Mutante W321A wurde auch schon von Engelhard et al. (Engelhard et al., 2014) beschrieben. Es kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie sich Wildtyp-cry2 in Abwesenheit von ATP und cry2 W321A in Anwesenheit von ATP hinsichtlich ihrer Menge an im Blaulicht akkumuliertem FADH° unterscheiden. Die stark verringerte biologische Aktivität von cry2 W321A (Abbildung 24, Abbildung 25) verdeutlicht aber, dass die ATP-Bindung den Ausfall der Trp-Triade nicht vollständig komplementieren kann. Somit ist die Bedeutung der Trp-Triade für die Photoreduktion und folglich für biologischen Funktion von Cryptochromen erneut untermauert. Für Wildtyp-cry2 ist die ATP-Bindung nicht essentiell für dessen

biologische Aktivität, fördert diese aber. Die Befunde der Trp-Triade-Mutante lassen schließen, dass durch ATP-Bindung ein alternativer Elektronentransportweg zur Photoreduktion des FAD genutzt werden kann. Dies könnte gleichermaßen für den Wildtyp-Photorezeptor gelten, sodass nun Elektronen über zwei Wege zur Photoreduktion des FAD eingeschleust werden, was die Effizienz der Photoreduktion steigert.

5.5.2 ATP induziert strukturelle Änderungen in cry2

Die nachgewiesene Steigerung der FADH^o-Akkumulation in cry2 durch ATP Bindung wirft die Frage auf, inwiefern dies mechanistisch erfolgt. Eine naheliegende Vermutung ist, dass ATP-induzierte Konformationsänderungen zur Steigerung der Photoreduktion führen.

Zur Klärung dieser Frage wurden hier wie bereits zuvor in anderen Arbeiten (Burney et al., 2009; Kondoh et al., 2011; Orth et al., 2017; Partch et al., 2005, Engelhard et al., 2014) mögliche ATP-induzierte Konformationsänderungen über partielle Proteolyse von cry2 mit Trypsin untersucht (Abbildung 33). Im Vergleich von Vollängen-cry2 mit und ohne ATP-Zugabe ist ersichtlich, dass es durch die Bindung von ATP zu strukturellen Änderungen im Protein kommt. Dabei bleiben größere Bereiche innerhalb des Proteins vor der Proteolyse durch Trypsin geschützt, was darauf hindeutet, dass es zu einer verringerten Exposition bestimmter Teilbereiche des Proteins an dessen Oberfläche durch ATP-Bindung kommt. Dies wäre dann der Fall, wenn ATP-Bindung zu einer kompakteren Form des cry2 führen würde. Diese Schlussfolgerung wird durch die HDX-MS-Daten der PHR-Domäne von cry2 WT (Abbildung 34) bestätigt. Hier zeigte sich, dass durch die Bindung von ATP Strukturänderungen induziert werden, die in einer Abnahme der Zugänglichkeit für Deuterium im Vergleich zum ungebundenen Zustand resultieren. Die HDX-MS Daten zeigen, dass ATP-Bindung insbesondere im C-terminalen Bereich der PHR-Domäne zu Umstrukturierungen führt. Damit sind für cry2 lichtunabhängige strukturelle Änderungen durch ATP-Bindung bewiesen, die für cry1 mit anderen, aber weniger aussagefähigen Techniken gezeigt (Burney et al., 2009; El-Esawi et al., 2015; Orth et al., 2017) bzw. für cry2 postuliert wurden (Engelhard et al., 2014). Dass Brautigam et al. (Brautigam et al., 2004) keinen Unterschied in der Kristallstruktur zwischen AMP-PNP-freiem und AMP-PNP-gebundenem Zustand identifizieren konnten, ist vermutlich dem Umstand geschuldet, dass ein nachträgliches Inkubieren der Proteinkristalle mit dem Liganden in diesen keine strukturellen Änderungen erzwingen konnte.

Die zuvor publizierten Ergebnisse einer ATP-induzierten Strukturänderung von cry2 basieren auf limitierter Proteolyse (Engelhard et al., 2014). Die hier gezeigten HDX-MS Daten liefern

darüberhinaus aber detaillierte Einblicke, in welchen Bereichen von cry2 sich die Strukturänderungen vollziehen. Neben der relativ starken Umstrukturierung in der C-terminalen Region (I474-I495) der PHR-Domäne wurden ebenfalls in der α -Subdomäne, insbesondere in der FAD- und ATP-Bindetasche sowie Verbindungsregionen, welche diese umgeben, strukturelle Änderungen gefunden (Abbildung 34). Es liegt also nahe, dass es durch die Metabolitbindung zur räumlichen Nähe von FAD und ATP kommt. Des Weiteren deutete es sich an, dass die Regionen um die von Engelhard et al. (Engelhard et al., 2014) postulierten alternativen Elektronentransportwege mit W331 und W376 ebenfalls von strukturellen Änderungen durch die ATP-Bindung betroffen sind.

Müller et al. (Müller et al., 2014) postulieren eine durch ATP-Bindung induzierte Konformationsänderungen in cry1 mit damit einhergehender Anhebung des pKa-Wertes des putativen Protonendonors D396 (D393 in cry2). Dieser Asparaginsäure-Rest überträgt ein Proton auf FAD^o zur Bildung von FADH^o. Damit würde eine Verstärkung der Photoreduktion durch Verbesserung der Protonenübertragung durch ATP-Bindung erklärt werden. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde dieser Aspekt der ATP-Bindung nicht adressiert. Folglich kann keine konkrete Aussage über eine ATP-induzierte Verbesserung des Protonentransfers getroffen werden. Der HDX-MS-Datensatz zeigt aber, dass es in dem Bereich um D393 in cry2 zu relativ starken ATP-induzierten Änderungen kommt, da diese Aminosäure direkt in der ATP-Bindehöhle liegt. Eine ausschließliche Verbesserung der Protonenübertragung auf FAD^o durch ATP-Bindung ist aber eher unwahrscheinlich, weil dies die Photoreduktion der Trp-Triade Mutante nicht erklären kann, da vor dem Protonentransfer ja ein Elektronentransfer auf FAD_{ox} erfolgen muss. Somit ist davon auszugehen, dass ATP-Bindung zusätzlich die Nutzung einer alternativen Elektronentransfer-Route fördert.

Strukturelle Änderungen in cry2 durch ATP-Bindung wurden in dieser Arbeit auch durch ThermoFAD-Assays gezeigt (Abbildung 21, Abbildung 22). Diese Änderungen wurden für Vollängen-cry2 und die PHR-Domäne von cry2 dargestellt. Somit wurde auch mit diesen Assays wie mit HDX-MS gezeigt, dass die PHR-Domäne Konformationsänderungen ohne den C-Terminus durchläuft, wie bereits zuvor postuliert wurde (Kondoh et al., 2011; Partch et al., 2005). Da Vollängen-cry2 und cry2 PHR sich jedoch auch ohne Anwesenheit von ATP in ihren Schmelztemperaturen unterscheiden, liegt es nahe zu vermuten, dass die C-terminale Extension einen Einfluss auf die Konformation der Proteine hat. Die C-terminale Extension könnte hierbei die PHR-Domäne stabilisieren. Ein stabilisierender Effekt der C-terminalen Extension auf die PHR-Domäne wäre dadurch erklärbar, dass die PHR-Domäne, nicht aber das Vollängen-cry2 in Gegenwart von ATP und Licht aggregiert (Abbildung 28). Es wurde zuvor gezeigt, dass cry2 Licht-induzierte Konformationsänderungen durchläuft, die in der

PHR-Domäne starten und die Umstrukturierung des C-Terminus nach sich ziehen (Kondoh et al., 2011; Partch et al., 2005; Thöing et al., 2015). Da nicht nur durch Licht, sondern auch alleine durch Bindung von ATP strukturelle Änderungen induziert werden, liegt es nahe zu vermuten, dass die PHR-Domäne ohne C-Terminus die mehrstufige Konformationsänderung nur unvollständig durchläuft und es demzufolge zur Aggregation des Proteins kommt. Das Volllängenprotein hingegen durchläuft zunächst die gleichen strukturellen Änderungen in der PHR-Domäne, gefolgt von einer zusätzlichen Umstrukturierung der C-terminalen Extension, die das Protein stabilisiert und in Lösung hält. Die Hypothese, dass es zu ATP-induzierten strukturellen Änderungen im Bereich des C-terminalen Bereichs der PHR-Domäne kommt, beruht auf den hier gezeigten HDX-MS Daten. Diese Änderungen könnten sich dann direkt auf die C-terminale Extension übertragen.

Die Aggregation von cry2 WT PHR in Antwort auf Blaulicht und ATP-Bindung durch Konformationsänderungen und nicht durch Entfaltung des Proteins mit Exposition hydrophober Bereiche ist deshalb wahrscheinlich, weil der Flavin-Kofaktor in den Aggregaten gebunden bleibt und nicht, wie bei einer Entfaltung zu erwarten wäre, entlassen wird (Abbildung 32). Es ist auch unwahrscheinlich, dass eine durch ATP-Bindung verstärkte Photoreduktion zu vermehrter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt (Consentino et al., 2015; van Wilderen et al., 2015), die nachfolgend das Protein schädigen und dessen Aggregation initiieren, weil diese auch beim Volllängenprotein auftreten müsste.

Alle Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, zeigen deutlich, dass die ATP-Bindung zu Konformationsänderungen von cry2 führt. Aufgrund der partiellen Wiederherstellung der ansonsten fehlenden Photoreduktion der Trp-Triade-Mutante durch ATP-Bindung ist eine Erschließung neuer Elektronentransferwege sehr wahrscheinlich. Die bisherigen Daten können aber keine konkrete Aussage über die alternativen durch ATP-induzierten Elektronentransferwege machen. Mögliche alternative Elektronentransportwege schließen neben einer Route, die ATP in den Elektronentransferweg einschließt und Y399 beinhaltet, auch die in Cryptochromen konservierten Tryptophane (W331 und W376 in cry2) in der näheren Umgebung des FAD ein (Abbildung 10). Es wurde hier durch HDX-MS gezeigt, dass die Regionen um diese beiden Tryptophane zwar von ATP-induzierten Umstrukturierungen betroffen sind, jedoch sind weitere Versuche erforderlich, um diesen Befund insbesondere durch Analyse von Mutanten in diesen Aminosäureresten zu verifizieren.

5.5.3 ATP hat keinen nachweisbaren Effekt auf die cry2-cry2-Interaktion

Es konnte gezeigt werden, dass pflanzliche Cryptochrome dimerisieren (Rosenfeldt et al., 2008; Sang et al., 2005; Wang et al., 2016). Inwieweit dieser Prozess durch Licht kontrolliert ist, ist nicht endgültig geklärt. In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, ob ATP-Bindung und Licht einen Einfluss auf die Dimerisierung von cry2 hat.

Die Interaktionsstudien erfolgten in Hefe über Y2H-Analysen durch Expression von cry2-Fusionsproteinen mit den jeweiligen Domänen AD und DNA-BD des Transkriptionsfaktors GAL4. Dabei zeigte sich, dass Blaulicht keinen Einfluss auf die Dimerisierung zu haben scheint (Abbildung 35). Die Lichtunabhängigkeit der Dimerisierung von cry2 wird dabei nicht nur durch das Wachstum der Kolonien auf Selektionsplatten, die im Dunkeln gehalten wurden, gezeigt. Zusätzlich wird dies auch dadurch verdeutlicht, dass sich die Trp-Triade-Mutante cry2 W321A wie der Wildtyp verhält, obwohl in den vorangehenden Experimenten gezeigt wurde, dass die Photoreduktion dieser Mutante auch in Anwesenheit von ATP, wie dies *in vivo* gegeben ist, deutlich abgeschwächt ist. Die Beobachtung der lichtunabhängigen Dimerisierung steht im Gegensatz zu neueren Daten, die eine lichtabhängige cry2-cry2-Interaktion ebenfalls im Yeast-2-Hybrid-Assay zeigen (Wang et al., 2016). Ein möglicher Grund für den fehlenden Lichteffekt ist, dass unter den genutzten Versuchsbedingungen schlichtweg kein Effekt feststellbar war, da es sich um rein qualitative Analysen handelte. Folglich ist also anhand der im Rahmen dieser Arbeit generierten Datensätze nicht auszuschließen, dass es Licht- und/oder ATP-abhängig zur Bildung von höhermolekularen Komplexen kommt. Diese waren unter den genutzten Versuchsbedingungen nicht nachweisbar, da cry2 wahrscheinlich konstitutiv bereits als Di- bzw. Oligomer vorliegt und nicht mehr zwischen den unterschiedlichen Komplexgrößen unterschieden werden konnte.

In Ergänzung zu den Y2H Daten konnte auch *in vitro* über *Cross-Linking* des Volllängenproteins mit Formaldehyd kein Einfluss von ATP oder Licht auf die cry2-cry2-Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 36). Jedoch wurde dabei deutlich, dass cry2 konstitutiv wahrscheinlich nicht nur als Dimer, sondern vielmehr als höhermolekularer Komplex *in vitro* vorliegt. Eine genaue Aussage darüber, wieviele cry2-Monomere einen Komplex bilden, kann jedoch unter den genutzten Versuchsbedingungen nicht getroffen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass es durch Licht und/oder ATP zur Bildung hochmolekularer Komplexe aus Dimeren oder Oligomeren von cry2 kommt, die mit der verwendeten Technik nicht näher charakterisierbar waren.

5.6 3-Bromo-7-nitroindazol bindet ebenfalls an Y399

Ong et al. (Ong et al., 2017) identifizierten 3-Bromo-7-nitroindazol als chemischen Inhibitor von cry1. Weitere Untersuchungen (Orth et al., 2017) zeigten, dass es zu einem interferierenden Effekt von 3B7N und ATP kommt. 3B7N bindet ebenfalls an die Metabolitbindestelle von cry1 und hemmt die Akkumulation von FADH°. Wobei bislang unklar war, ob 3B7N auch auf andere Photorezeptoren mit Flavin als Chromophor wirkt. Um diese Wissenslücke zu schließen und zu klären, ob 3B7N generell auf pflanzliche Cryptochrome wirkt, sollten die Analysen auf cry2 ausgeweitet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass 3B7N die cry2-Antwort senkt und vermutlich an der gleichen Stelle wie ATP bindet, da es ebenfalls wie ATP nicht auf die Y399A-Mutante wirkt (Abbildung 39). Die Bindung von 3B7N führt in ThermoFAD Assays aber zu einer geringeren Veränderung der Schmelztemperatur verglichen zu ATP. Ähnliche Befunde wurden zuvor für cry1 erzielt (Orth et al., 2017). Die Interferenz von 3B7N mit ATP-Bindung konnte auch *in planta* nachgewiesen werden, da auch dort cry2 Y399A und im Gegensatz zum Wildtyp-Protein keine Beeinträchtigung nachweisbar war (Abbildung 38). Im Vergleich der Wirkung von 3B7N auf die Y399A- und Y399F-Mutanten konnte ein Unterschied festgestellt werden, der Art, dass nur die Y399F-Mutante auf den Inhibitor reagierte. Somit ist zu vermuten, dass es bei der Y399F-Mutante zu einer Bindung des Inhibitors kommt, was durch die strukturelle Ähnlichkeit von Tyr und Phe erklärbar ist. Überraschend ist der Befund, dass es bei einer 3B7N-Endkonzentration von 2,5 µM im Medium überhaupt zu einem inhibierenden Effekt kommt, weil die Affinität von Cryptochromen zu ATP höher zu sein scheint als zu 3B7N (Abbildung 39) (Orth et al., 2017) und ATP in deutlich höheren Konzentrationen im Cytosol vorliegen sollte. Zu erklären wäre dieser Effekt damit, dass die Aufnahme von 3B7N in die Zellen aktiv erfolgt und damit deutlich höhere Konzentrationen an 3B7N im Zellinneren erreicht werden (Orth et al., 2017). Ob dies aber tatsächlich der Fall ist, ist ungeklärt

Da 3B7N zu einer Verminderung nicht aber zu einem vollständigen Verlust der cry-Antwort führt (Abbildung 37, Abbildung 38), können zwei mögliche Wirkungsmechanismen zur Erklärung herangezogen werden. Zum einen könnte 3B7N mit ATP um die Bindestelle konkurrieren und somit die fördernde Wirkung von ATP auf die Cryptochrome hemmen. Zum anderen könnte 3B7N als Elektronenakzeptor fungieren und Elektronen von reduziertem Flavin oder Tryptophanen der Trp-Triade abziehen, sodass weniger photoaktives Cryptochrom vorläge. Welche dieser Möglichkeiten den tatsächlichen Gegebenheiten entspricht, müssen weiterführende Arbeiten klären.

Obwohl sowohl Phytochrome, als auch Phototropine ATP binden (Takayama et al., 2011), führt 3B7N nicht zu deren Inhibierung (Abbildung 37), sondern wirkt exklusiv auf Cryptochrome. Dies verdeutlicht die Unterschiedlichkeit der ATP-Bindung dieser Photorezeptoren. Phototropine und vermutlich auch Phytochrome binden ATP als Substrat für ihre Kinaseaktivität. Für cry2 wurde im Gegensatz zu cry1 keine Kinaseaktivität nachgewiesen (Ozgür and Sancar, 2006). Dementsprechend wird verdeutlicht, dass die Metabolitbindung für cry1 und cry2 eine andere Funktion in der Verstärkung der biologischen Aktivität des Proteins hat.

6. Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wurden diverse *in planta*- und *in vitro*- Ansätze gewählt, um die Metabolit-Bindung des Blaulichtrezeptors Cryptochrom 2 aus *Arabidopsis thaliana* näher zu charakterisieren. Obwohl seit 2003 die ATP-Bindfähigkeit pflanzlicher Cryptochrome bekannt ist (Bouly et al., 2003), gab es bisher keine Analyse darüber, welchen Einfluss die ATP-Bindung von Cryptochromen auf deren Funktion *in planta* hat. Die Bindestelle für ATP war für Cryptochrom 1 aufgrund von Strukturdaten bekannt, nicht aber für cry2. Ebenfalls war unbekannt, welche Aminosäureaustausche in cry2 zu einem Verlust der ATP-Bindung führen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst Tyr-399 als essentiell für die ATP-Bindung von cry2 identifiziert werden. Komplementationsstudien der *Arabidopsis cry2* Mutante zeigten, dass die ATP-Bindung für cry2 nicht essentiell ist, diese aber eine deutlich verstärkende Wirkung auf die biologische Aktivität dieses Photorezeptors hat. Unter Einbeziehung der Analyse einer Trp-Triade Mutante konnte die biologische Funktion der ATP-Bindung genauer charakterisiert werden. Es zeigte sich, dass es aufgrund der ATP-Bindung zu strukturellen Änderungen des Proteins sowie zu einer Verstärkung der Photoreduktion und einer Verzögerung der Dunkelreversion kommt. Die ATP-induzierten strukturellen Änderungen sind dabei unabhängig von Licht sowie der C-terminalen Extension des Proteins. Da die zuvor *in vitro* nicht photoreduzierbare Trp-Triade-Mutante durch die Bindung von ATP bei Bestrahlung zumindest partiell FADH^o anzureichern kann, ist wahrscheinlich, dass es durch die ATP-induzierten Konformationsänderungen zur Nutzung alternativer Elektronentransportwege in cry2 kommt. Dennoch kann ATP-Bindung die Unterbrechung des Elektronentransfers über die Trp-Triade nicht vollständig kompensieren, da die entsprechende Mutante ebenfalls biologisch weniger aktiv ist, wie hier gezeigt werden konnte.

Weitere Arbeiten sind erforderlich, um die an alternativen Elektronentransferwegen beteiligten Aminosäuren zu identifizieren.

Zudem wurde 3-Bromo-7-nitroindazol (3B7N) als Inhibitor von cry2 charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Tyr-399 zu einer verminderten Bindung von 3B7N führt, sodass ATP und 3B7N vermutlich an der gleichen Stelle von cry2 binden. Der genaue Wirkmechanismus von 3B7N muss in zukünftigen Arbeiten geklärt werden.

7. Literatur

- Ahmad, M. (2016). Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 33, 108–115.
- Ahmad, M., Cashmore, A.R., (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366, 162–166.
- Ahmad, M., Galland, P., Ritz, T., Wiltschko, R., Wiltschko, W. (2007). Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 225, 615–624.
- Ahmad, M., Grancher, N., Heil, M., Black, R.C., Giovani, B., Galland, P., Lardemer, D. (2002). Action spectrum for cryptochrome-dependent hypocotyl growth inhibition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129, 774–785.
- Ahmad, M., Jarillo, J.A., Cashmore, A.R. (1998). Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 10, 197–207.
- Aihara, Y., Tabata, R., Suzuki, T., Shimazaki, K.-I., Nagatani, A. (2008). Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 56, 364–375.
- Akasaka, S., Yamamoto, K. (1991). Construction of *Escherichia coli* K12 phr deletion and insertion mutants by gene replacement. *Mutat. Res.* 254, 27–35.
- von Arnim, A.G., Osterlund, M.T., Kwok, S.F., Deng, X.W. (1997). Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114, 779–788.
- Aubert, C., Vos, M.H., Mathis, P., Eker, A.P., Brettel, K. (2000). Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* 405, 586–590.
- Bagnall, D.J., King, R.W., Hangarter, R.P. (1996). Blue-light promotion of flowering is absent in *hy4* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 200, 278–280.
- Banerjee, R., Schleicher, E., Meier, S., Viana, R.M., Pokorny, R., Ahmad, M., Bittl, R., Batschauer, A. (2007). The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *J. Biol. Chem.* 282, 14916–14922.
- Batschauer, A. (1999). Light perception in higher plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 153–166.
- Batschauer, A. (1993). A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 4, 705–709.
- Bauer, M., Baumann, J., Trommer, W.E. (1992). ATP binding to bovine serum albumin. *FEBS Lett.* 313, 288–290.
- Bedrosian, T.A., Fonken, L.K., Demas, G.E., Nelson, R.J. (2012). Photoperiod-dependent effects of neuronal nitric oxide synthase inhibition on aggression in Siberian hamsters. *Horm. Behav.* 61, 176–180.
- Bernard, P., Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* 226, 735–745.
- Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E.M., Couturier, M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene. *Gene* 148, 71–74.
- Blakeslee, J.J., Bandyopadhyay, A., Peer, W.A., Makam, S.N., Murphy, A.S. (2004). Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol.* 134, 28–31.

- Blatt, M.R. (1987). Electrical characteristics of stomatal guard cells: The contribution of ATP-dependent, "Electrogenic" transport revealed by current-voltage and difference-current-voltage analysis. *J. Membr. Biol.* 98, 257–274.
- Blázquez, M.A., Ahn, J.H., Weigel, D. (2003). A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 33, 168–171.
- Bouly, J.-P., Giovani, B., Djamei, A., Mueller, M., Zeugner, A., Dudkin, E.A., Batschauer, A., Ahmad, M. (2003). Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with *Arabidopsis* and human cryptochrome-1. *Eur. J. Biochem.* 270, 2921–2928.
- Bouly, J.-P., Schleicher, E., Dionisio-Sese, M., Vandenbussche, F., Van Der Straeten, D., Bakrim, N., Meier, S., Batschauer, A., Galland, P., Bittl, R., Ahmad, M. (2007). Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J. Biol. Chem.* 282, 9383–9391.
- Brandts, J.F., Lin, L.N. (1990). Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry (Mosc.)* 29, 6927–6940.
- Brautigam, C.A., Smith, B.S., Ma, Z., Palnitkar, M., Tomchick, D.R., Machius, M., Deisenhofer, J. (2004). Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12142–12147.
- Brocchieri, L., Karlin, S. (2000). Conservation among HSP60 sequences in relation to structure, function, and evolution. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 9, 476–486.
- Brown, B.A., Cloix, C., Jiang, G.H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D.J., Jenkins, G.I. (2005). A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18225–18230.
- Bugaj, L.J., Choksi, A.T., Mesuda, C.K., Kane, R.S., and Schaffer, D.V. (2013). Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells. *Nat. Methods* 10, 249–252.
- Burgie, E.S., Vierstra, R.D. (2014). Phytochromes: An Atomic Perspective on Photoactivation and Signaling. *Plant Cell Online* 26, 4568–4583.
- Burney, S., Hoang, N., Caruso, M., Dudkin, E.A., Ahmad, M., Bouly, J.-P. (2009). Conformational change induced by ATP binding correlates with enhanced biological function of *Arabidopsis* cryptochrome. *FEBS Lett.* 583, 1427–1433.
- Burney, S., Wenzel, R., Kottke, T., Roussel, T., Hoang, N., Bouly, J.-P., Bittl, R., Heberle, J., Ahmad, M. (2012). Single amino acid substitution reveals latent photolyase activity in *Arabidopsis cry1*. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51, 9356–9360.
- Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W., Hendricks, S.B. (1959). Detection assay and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45, 1703–1708.
- Cailliez, F., Müller, P., Gallois, M., de la Lande, A. (2014). ATP binding and aspartate protonation enhance photoinduced electron transfer in plant cryptochrome. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 12974–12986.
- Canto, T., Uhrig, J.F., Swanson, M., Wright, K.M., MacFarlane, S.A. (2006). Translocation of Tomato bushy stunt virus P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity. *J. Virol.* 80, 9064–9072.
- Casal, J.J., Boccalandro, H. (1995). Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 197, 213–218.
- Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J., Liu, D. (1999). Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760–765.

- Castrillo, M., García-Martínez, J., Avalos, J. (2013). Light-dependent functions of the *Fusarium fujikuroi* CryD DASH cryptochrome in development and secondary metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2777–2788.
- Celej, M.S., Montich, G.G., Fidelio, G.D. (2003). Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 12, 1496–1506.
- Chattopadhyay, S., Ang, L.H., Puente, P., Deng, X.W., Wei, N. (1998). Arabidopsis bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* 10, 673–683.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.-O., van der Horst, G.T.J., Batschauer, A., Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 335–364.
- Chen, A., Li, C., Hu, W., Lau, M.Y., Lin, H., Rockwell, N.C., Martin, S.S., Jernstedt, J.A., Lagarias, J.C., Dubcovsky, J. (2014). Phytochrome C plays a major role in the acceleration of wheat flowering under long-day photoperiod. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10037–10044.
- Chory, J. (1997). Light modulation of vegetative development. *Plant Cell* 9, 1225–1234.
- Christian Michalski (2017). Die Rolle von AGD12 bei phototroper und gravitroper Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation.
- Christie, J.M. (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 21–45.
- Christie, J.M., Arvai, A.S., Baxter, K.J., Heilmann, M., Pratt, A.J., O'Hara, A., Kelly, S.M., Hothorn, M., Smith, B.O., Hitomi, K., Jenkins, G.I., Getzoff, E.D. (2012). Plant UVR8 Photoreceptor Senses UV-B by Tryptophan-Mediated Disruption of Cross-Dimer Salt Bridges. *Science* 335, 1492–1496.
- Christie, J.M., Blackwood, L., Petersen, J., Sullivan, S. (2015). Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant Cell Physiol.* 56, 401–413.
- Christie, J.M., Reymond, P., Powell, G.K., Bernasconi, P., Raibekas, A.A., Liscum, E., Briggs, W.R. (1998). Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282, 1698–1701.
- Clack, T., Mathews, S., Sharrock, R.A. (1994). The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.* 25, 413–427.
- Clough, S.J., Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 16, 735–743.
- Consentino, L., Lambert, S., Martino, C., Jourdan, N., Bouchet, P.-E., Witczak, J., Castello, P., El-Esawi, M., Corbineau, F., d'Harlingue, A., Ahmad, M. (2015). Blue-light dependent reactive oxygen species formation by Arabidopsis cryptochrome may define a novel evolutionarily conserved signaling mechanism. *New Phytol.* 206, 1450–1462.
- Crosson, S., Moffat, K. (2002). Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell* 14, 1067–1075.
- Daiyasu, H., Ishikawa, T., Kuma, K., Iwai, S., Todo, T., Toh, H. (2004). Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 9, 479–495.
- Darwin, C. (1880). The Power of movements in Plants. *Capo Press Repr.*
- Davis, S.J. (2002). Photoperiodism: the coincidental perception of the season. *Curr. Biol.* 12, 841–843.

- Demkura, P.V., Ballaré, C.L. (2012). UVR8 Mediates UV-B-Induced Arabidopsis Defense Responses against *Botrytis cinerea* by Controlling Sinapate Accumulation. *Mol. Plant* 5, 642–652.
- Deng, X.W., Matsui, M., Wei, N., Wagner, D., Chu, A.M., Feldmann, K.A., Quail, P.H. (1992). COP1, an Arabidopsis regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell* 71, 791–801.
- Devlin, P.F., Kay, S.A. (2000). Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12, 2499–2510.
- Downes, A., Blunt, T.P. (1877). Researches on the Effect of Light upon Bacteria and other Organisms. *Proc. R. Soc. Lond.* 26, 488–500.
- Dulbecco, R. (1949). Reactivation of ultra-violet-inactivated bacteriophage by visible light. *Nature* 163, 949.
- El-Din El-Assal, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, A.J., Raz, V., Koornneef, M. (2001). A QTL for flowering time in Arabidopsis reveals a novel allele of CRY2. *Nat. Genet.* 29, 435–440.
- El-Esawi, M., Glascoe, A., Engle, D., Ritz, T., Link, J., Ahmad, M. (2015). Cellular metabolites modulate in vivo signaling of Arabidopsis cryptochrome-1. *Plant Signal. Behav.* 10, e1063758.
- Emery, P., So, W.V., Kaneko, M., Hall, J.C., Rosbash, M. (1998). CRY, a Drosophila clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95, 669–679.
- Endo, M., Mochizuki, N., Suzuki, T., Nagatani, A. (2007). Cryptochrome 2 in vascular bundles regulates flowering in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 84–93.
- Engelhard, C., Wang, X., Robles, D., Moldt, J., Essen, L.-O., Batschauer, A., Bittl, R., Ahmad, M. (2014). Cellular metabolites enhance the light sensitivity of Arabidopsis cryptochrome through alternate electron transfer pathways. *Plant Cell* 26, 4519–4531.
- Engen, J.R., Wales, T.E. (2015). Analytical Aspects of Hydrogen Exchange Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Anal. Chem. Palo Alto Calif* 8, 127–148.
- Englander, S.W., Mayne, L., Bai, Y., Sosnick, T.R. (1997). Hydrogen exchange: the modern legacy of Linderstrøm-Lang. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 6, 1101–1109.
- Essen, L.-O. (2006). Photolyases and cryptochromes: common mechanisms of DNA repair and light-driven signaling? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 51–59.
- Exner, V., Alexandre, C., Rosenfeldt, G., Alfarano, P., Nater, M., Caflisch, A., Gruissem, W., Batschauer, A., Hennig, L. (2010). A gain-of-function mutation of Arabidopsis cryptochrome1 promotes flowering. *Plant Physiol.* 154, 1633–1645.
- Faigón-Soverna, A., Harmon, F.G., Storani, L., Karayekov, E., Staneloni, R.J., Gassmann, W., Más, P., Casal, J.J., Kay, S.A., Yanovsky, M.J. (2006). A constitutive shade-avoidance mutant implicates TIR-NBS-LRR proteins in Arabidopsis photomorphogenic development. *Plant Cell* 18, 2919–2928.
- Favory, J.-J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravec, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G.I., Oakeley, E.J., Seidlitz, H.K., Nagy, F., Ulm, R. (2009). Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *EMBO J.* 28, 591–601.
- Fedorov, R., Schlichting, I., Hartmann, E., Domratcheva, T., Fuhrmann, M., Hegemann, P., (2003). Crystal structures and molecular mechanism of a light-induced signaling switch: The Phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys. J.* 84, 2474–2482.
- Fehér, B., Kozma-Bognár, L., Kevei, É., Hajdu, A., Binkert, M., Davis, S.J., Schäfer, E., Ulm, R., Nagy, F. (2011). Functional interaction of the circadian clock and UV RESISTANCE

- LOCUS 8-controlled UV-B signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 67, 37–48.
- Fornara, F., Panigrahi, K.C.S., Gissot, L., Sauerbrunn, N., Rühl, M., Jarillo, J.A., Coupland, G. (2009). *Arabidopsis* DOF transcription factors act redundantly to reduce *CONSTANS* expression and are essential for a photoperiodic flowering response. *Dev. Cell* 17, 75–86.
- Fornaris, F., Orru, R., Bonivento, D., Chiarelli, L.R., Mattevi, A. (2009). ThermoFAD, a Thermofluor-adapted flavin ad hoc detection system for protein folding and ligand binding. *FEBS J.* 276, 2833–2840.
- Franklin, K.A., Praekelt, U., Stoddart, W.M., Billingham, O.E., Halliday, K.J., Whitelam, G.C. (2003). Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131, 1340–1346.
- Franklin, K.A., Whitelam, G.C. (2005). Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Ann. Bot.* 96, 169–175.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (1995). DNA Repair and Mutagenesis. *ASM Press*.
- Friml, J., Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415, 806–809.
- Froehlich, A.C., Chen, C.-H., Belden, W.J., Madeti, C., Roenneberg, T., Mellow, M., Loros, J.J., Dunlap, J.C. (2010). Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 9, 738–750.
- Galvão, V.C., Fankhauser, C. (2015). Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Curr. Opin. Neurobiol.* 34, 46–53.
- Gao, J., Wang, X., Zhang, M., Bian, M., Deng, W., Zuo, Z., Yang, Z., Zhong, D., Lin, C. (2015). Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of *Arabidopsis* CRY1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 9135–9140.
- Gebhard Kaiser (2012). Verbesserte in vitro und in planta DNA-Reparatur durch CPD-Photolyasen., Dissertation.
- Gegear, R.J., Casselman, A., Waddell, S., Reppert, S.M. (2008). Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature* 454, 1014–1018.
- Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M., Brettel, K. (2003). Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat. Struct. Biol.* 10, 489–490.
- Gressel, J., (1979). Blue Light Photoreception. *Photochem. Photobiol.* 30, 749–754.
- Guo, H., Duong, H., Ma, N., Lin, C. (1999). The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 19, 279–287.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., Lin, C. (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279, 1360–1363.
- Halavaty, A.S., Moffat, K. (2007). N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from *Avena sativa*. *Biochemistry (Mosc.)* 46, 14001–14009.
- Halliday, K.R., Stein, P.J., Chernoff, N., Wheeler, G.L., Bitensky, M.W. (1984). Limited trypsin proteolysis of photoreceptor GTP-binding protein. Light- and GTP-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* 259, 516–525.
- Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950–952.

- Hamm-Alvarez, S., Sancar, A., Rajagopalan, K.V. (1989). Role of enzyme-bound 5,10-methenyltetrahydropteroylpolyglutamate in catalysis by *Escherichia coli* DNA photolyase. *J. Biol. Chem.* 264, 9649–9656.
- Harbach, P.H.P., Schneider, M., Faraji, S., Dreuw, A. (2013). Intermolecular Coulombic Decay in Biology: The Initial Electron Detachment from FADH(-) in DNA Photolyases. *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 943–949.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A. (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* 290, 2110–2113.
- Harris, S.-R., Henbest, K.B., Maeda, K., Pannell, J.R., Timmel, C.R., Hore, P.J., Okamoto, H. (2009). Effect of magnetic fields on cryptochrome-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. R. Soc. Interface* 6, 1193–1205.
- He, S.-B., Wang, W.-X., Zhang, J.-Y., Xu, F., Lian, H.-L., Li, L., Yang, H.-Q. (2015). The CNT1 Domain of *Arabidopsis* CRY1 Alone Is Sufficient to Mediate Blue Light Inhibition of Hypocotyl Elongation. *Mol. Plant* 8, 822–825.
- Hegemann, P. (2008). Algal sensory photoreceptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 167–189.
- Heijde, M., Ulm, R. (2012). UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci.* 17, 230–237.
- Hellens, R., Mullineaux, P., Klee, H. (2000). Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci.* 5, 446–451.
- Hennig, L., Stoddart, W.M., Dieterle, M., Whitelam, G.C., Schäfer, E. (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128, 194–200.
- Herbel, V., Orth, C., Wenzel, R., Ahmad, M., Bittl, R., Batschauer, A., (2013). Lifetimes of *Arabidopsis* cryptochrome signaling states in vivo. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 74, 583–592.
- Hoang, N., Schleicher, E., Kacprzak, S., Bouly, J.-P., Picot, M., Wu, W., Berndt, A., Wolf, E., Bittl, R., Ahmad, M. (2008). Human and *Drosophila* cryptochromes are light activated by flavin photoreduction in living cells. *PLoS Biol.* 6, e160.
- Hoffman, P.D., Batschauer, A., Hays, J.B. (1996). PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases. *Mol. Gen. Genet.* 253, 259–265.
- Holm, M., Deng, X.W. (1999). Structural organization and interactions of COP1, a light-regulated developmental switch. *Plant Mol. Biol.* 41, 151–158.
- Holtorf, S., Apel, K., Bohlmann, H. (1995). Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 29, 637–646.
- Hsieh, Y.-C., Omarov, R.T., Scholthof, H.B. (2009). Diverse and newly recognized effects associated with short interfering RNA binding site modifications on the Tomato bushy stunt virus p19 silencing suppressor. *J. Virol.* 83, 2188–2200.
- Hsu, D.S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R.P., Todo, T., Wei, Y.F., Sancar, A. (1996). Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 13871–13877.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., Briggs, W.R. (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278, 2120–2123.
- Huang, X., Ouyang, X., Deng, X.W. (2014). Beyond repression of photomorphogenesis: role switching of COP/DET/FUS in light signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, SI: Cell signalling and gene regulation 21, 96–103.

- Husain, I., Sancar, A. (1987). Binding of *E. coli* DNA photolyase to a defined substrate containing a single T mean value of T dimer. *Nucleic Acids Res.* 15, 1109–1120.
- Immeln, D., Schlesinger, R., Heberle, J., Kottke, T. (2007). Blue light induces radical formation and autophosphorylation in the light-sensitive domain of *Chlamydomonas* cryptochrome. *J. Biol. Chem.* 282, 21720–21728.
- Inoue, S., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Doi, M., Shimazaki, K. (2008). Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5626–5631.
- Inoue, S., Matsushita, T., Tomokiyo, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kinoshita, T., Shimazaki, K. (2011). Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 156, 117–128.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693–1696.
- Jang, S., Marchal, V., Panigrahi, K.C.S., Wenkel, S., Soppe, W., Deng, X.-W., Valverde, F., Coupland, G. (2008). *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *EMBO J.* 27, 1277–1288.
- Johnson, E., Bradley, M., Harberd, N.P., Whitelam, G.C. (1994). Photoresponses of Light-Grown phyA Mutants of *Arabidopsis* (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiol.* 105, 141–149.
- Jones, A.M., Edgerton, M.D. (1994). The anatomy of phytochrome, a unique photoreceptor in plants. *Semin. Cell Biol.* 5, 295–302.
- Jorns, M.S., Baldwin, E.T., Sancar, G.B., Sancar, A. (1987). Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis. *J. Biol. Chem.* 262, 486–491.
- Kaiserli, E., Jenkins, G.I. (2007). UV-B promotes rapid nuclear translocation of the *Arabidopsis* UV-B specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus. *Plant Cell* 19, 2662–2673.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 91, 29–66.
- Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H., Todo, T. (1997). Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J. Mol. Evol.* 45, 535–548.
- Kang, C.-Y., Lian, H.-L., Wang, F.-F., Huang, J.-R., Yang, H.-Q. (2009). Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 2624–2641.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., Weigel, D. (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 286, 1962–1965.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193–195.
- Kelner, A. (1949). Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultra-violet Irradiation Injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 35, 73–79.
- Kennedy, M.J., Hughes, R.M., Peteya, L.A., Schwartz, J.W., Ehlers, M.D., Tucker, C.L. (2010). Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* 7, 973–975.
- Kevei, E., Nagy, F. (2003). Phytochrome controlled signalling cascades in higher plants. *Physiol. Plant.* 117, 305–313.

- Kevei, E., Schafer, E., Nagy, F. (2007). Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. *J. Exp. Bot.* 58, 3113–3124.
- Kim, W.-Y., Fujiwara, S., Suh, S.-S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam, H.G., Somers, D.E. (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449, 356–360.
- Kinoshita, T., Shimazaki, K. (2002). Biochemical evidence for the requirement of 14-3-3 protein binding in activation of the guard-cell plasma membrane H⁺-ATPase by blue light. *Plant Cell Physiol.* 43, 1359–1365.
- Kiontke, S., Geisselbrecht, Y., Pokorny, R., Carell, T., Batschauer, A., Essen, L.-O. (2011). Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA. *EMBO J.* 30, 4437–4449.
- Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognár, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Muller, T., Bauer, D., Adám, E., Schäfer, E., Nagy, F. (2002). Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* 14, 1541–1555.
- Klar, T., Pokorny, R., Moldt, J., Batschauer, A., Essen, L.-O. (2007). Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *J. Mol. Biol.* 366, 954–964.
- Kleine, T., Kindgren, P., Benedict, C., Hendrickson, L., Strand, A. (2007). Genome-wide gene expression analysis reveals a critical role for Cryptochrome 1 in the response of *Arabidopsis* to high irradiance. *Plant Physiol.* 144, 1391–1406.
- Kleine, T., Lockhart, P., Batschauer, A. (2003). An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 35, 93–103.
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K., Batschauer, A. (1999). Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 19, 289–296.
- Kliebenstein, D.J., Lim, J.E., Landry, L.G., Last, R.L. (2002). *Arabidopsis* UVR8 Regulates Ultraviolet-B Signal Transduction and Tolerance and Contains Sequence Similarity to Human Regulator of Chromatin Condensation 1. *Plant Physiol.* 130, 234–243.
- Kneip, C., Hildebrandt, P., Schlamann, W., Braslavsky, S.E., Mark, F., Schaffner, K. (1999). Protonation state and structural changes of the tetrapyrrole chromophore during the Pr → Pfr phototransformation of phytochrome: a resonance Raman spectroscopic study. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 15185–15192.
- Ko, C.H., Takahashi, J.S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* 15, 271–277.
- Koncz, C., Schell, J., and Rédei, G. P. (1992). T-DNA transformation and insertion mutagenesis. *Plant Mol Biol.* 20, 963–976.
- Kondoh, M., Shiraishi, C., Müller, P., Ahmad, M., Hitomi, K., Getzoff, E.D., Terazima, M. (2011). Light-induced conformational changes in full-length *Arabidopsis thaliana* cryptochrome. *J. Mol. Biol.* 413, 128–137.
- Koornneef, M., Hanhart, C.J., van der Veen, J.H. (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 229, 57–66.
- Koornneef, M., Rolff, E., Spruit, C.J.P. (1980). Genetic Control of Light-inhibited Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Z. Für Pflanzenphysiol.* 100, 147–160.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 913–949.
- Lariguet, P., Schepens, I., Hodgson, D., Pedmale, U.V., Trevisan, M., Kami, C., de Carbonnel, M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Liscum, E., Fankhauser, C. (2006). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10134–10139.
- Laubinger, S., Marchal, V., Le Gourrierec, J., Gentilhomme, J., Wenkel, S., Adrian, J., Jang, S., Kulajta, C., Braun, H., Coupland, G., Hoecker, U. (2006). Arabidopsis SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer CONSTANS to regulate its stability. *Dev. Camb. Engl.* 133, 3213–3222.
- Leivar, P., Monte, E. (2014). PIFs: systems integrators in plant development. *Plant Cell* 26, 56–78.
- Li, B., Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 7, 957–963.
- Li, X., Wang, Q., Yu, X., Liu, H., Yang, H., Zhao, C., Liu, X., Tan, C., Klejnot, J., Zhong, D., Lin, C. (2011). Arabidopsis cryptochrome 2 (CRY2) functions by the photoactivation mechanism distinct from the tryptophan (trp) triad-dependent photoreduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 20844–20849.
- Li, Y.F., Heelis, P.F., Sancar, A. (1991). Active site of DNA photolyase: tryptophan-306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair in vitro. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 6322–6329.
- Lin, C. (2002). Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 14 Suppl, S207-225.
- Lin, C., Ahmad, M., Cashmore, A.R. (1996). Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 10, 893–902.
- Lin, C., Ahmad, M., Gordon, D., Cashmore, A.R. (1995a). Expression of an Arabidopsis cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8423–8427.
- Lin, C., Robertson, D.E., Ahmad, M., Raibekas, A.A., Jorns, M.S., Dutton, P.L., Cashmore, A.R. (1995b). Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science* 269, 968–970.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., Cashmore, A.R. (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2686–2690.
- Liscum, E., Briggs, W.R. (1996). Mutations of Arabidopsis in potential transduction and response components of the phototropic signaling pathway. *Plant Physiol.* 112, 291–296.
- Liscum, E., Briggs, W.R. (1995). Mutations in the NPH1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* 7, 473–485.
- Liu, B., Liu, H., Zhong, D., Lin, C. (2010). Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 578–586.
- Liu, H., Wang, Q., Liu, Y., Zhao, X., Imaizumi, T., Somers, D.E., Tobin, E.M., Lin, C. (2013). Arabidopsis CRY2 and ZTL mediate blue-light regulation of the transcription factor CIB1 by distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17582–17587.

- Liu, H., Yu, X., Li, K., Klejnot, J., Yang, H., Lisiero, D., Lin, C. (2008). Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis. *Science* 322, 1535–1539.
- Liu, Q., Wang, Q., Deng, W., Wang, X., Piao, M., Cai, D., Li, Y., Barshop, W.D., Yu, X., Zhou, T., Liu, B., Oka, Y., Wohlschlegel, J., Zuo, Z., Lin, C. (2017). Molecular basis for blue light-dependent phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 2. *Nat. Commun.* 8, 15234.
- Liu, Y., Li, X., Li, K., Liu, H., Lin, C. (2013). Multiple bHLH proteins form heterodimers to mediate CRY2-dependent regulation of flowering-time in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 9, e1003861.
- Lucas, R.J., Hattar, S., Takao, M., Berson, D.M., Foster, R.G., Yau, K.-W. (2003). Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299, 245–247.
- Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H., Deng, X.W. (2001). Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* 13, 2589–2607.
- Malhotra, K., Kim, S.T., Batschauer, A., Dawut, L., Sancar, A. (1995). Putative blue-light photoreceptors from Arabidopsis thaliana and Sinapis alba with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 6892–6899.
- Mao, J., Zhang, Y.-C., Sang, Y., Li, Q.-H., Yang, H.-Q. (2005). From The Cover: A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12270–12275.
- Más, P., Kim, W.-Y., Somers, D.E., Kay, S.A. (2003). Targeted degradation of TOC1 by ZTL modulates circadian function in Arabidopsis thaliana. *Nature* 426, 567–570.
- Matulis, D., Kranz, J.K., Salemme, F.R., Todd, M.J. (2005). Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 5258–5266.
- Maul, M.J., Barends, T.R.M., Glas, A.F., Cryle, M.J., Domratcheva, T., Schneider, S., Schlichting, I., Carell, T. (2008). Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47, 10076–10080.
- McNellis, T.W., Deng, X.W. (1995). Light control of seedling morphogenetic pattern. *Plant Cell* 7, 1749–1761.
- Medvedev, D., Stuchebrukhov, A.A. (2001). DNA repair mechanism by photolyase: electron transfer path from the photolyase catalytic cofactor FADH(-) to DNA thymine dimer. *J. Theor. Biol.* 210, 237–248.
- Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A.P.M., Carell, T., Essen, L.-O. (2004). Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science* 306, 1789–1793.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A., Matzke, A.J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* 19, 5194–5201.
- Minervini, G., Mazzotta, G.M., Masiero, A., Sartori, E., Corrà, S., Potenza, E., Costa, R., Tosatto, S.C.E. (2015). Isoform-specific interactions of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Sci. Rep.* 5, 12605.
- Mockler, T., Yang, H., Yu, X., Parikh, D., Cheng, Y., Dolan, S., Lin, C. (2003). Regulation of photoperiodic flowering by Arabidopsis photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2140–2145.

- Mockler, T.C., Guo, H., Yang, H., Duong, H., Lin, C. (1999). Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Dev. Camb. Engl.* 126, 2073–2082.
- Möglich, A., Yang, X., Ayers, R.A., Moffat, K. (2010). Structure and Function of Plant Photoreceptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 21–47.
- Monte, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Zhang, Y., Li, X., Young, J., Austin-Phillips, S., Quail, P.H. (2003). Isolation and characterization of phyC mutants in Arabidopsis reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell* 15, 1962–1980.
- Müller, P., Ahmad, M. (2011). Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception. *J. Biol. Chem.* 286, 21033–21040.
- Müller, P., Bouly, J.-P., Hitomi, K., Bolland, V., Getzoff, E.D., Ritz, T., Brettel, K. (2014). ATP binding turns plant cryptochrome into an efficient natural photoswitch. *Sci. Rep.* 4, 5175.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335–350.
- Nelson, D.C., Lasswell, J., Rogg, L.E., Cohen, M.A., Bartel, B. (2000). FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in Arabidopsis. *Cell* 101, 331–340.
- Noh, B., Bandyopadhyay, A., Peer, W.A., Spalding, E.P., Murphy, A.S. (2003). Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* 423, 999–1002.
- Oberpichler, I., Pierik, A.J., Wesslowski, J., Pokorny, R., Rosen, R., Vugman, M., Zhang, F., Neubauer, O., Ron, E.Z., Batschauer, A., Lamparter, T. (2011). A Photolyase-Like Protein from *Agrobacterium tumefaciens* with an Iron-Sulfur Cluster. *PLoS ONE* 6.
- Ohgishi, M., Saji, K., Okada, K., Sakai, T. (2004). Functional analysis of each blue light receptor, *cry1*, *cry2*, *phot1*, and *phot2*, by using combinatorial multiple mutants in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2223–2228.
- Okamura, H., Miyake, S., Sumi, Y., Yamaguchi, S., Yasui, A., Muijtjens, M., Hoeijmakers, J.H., van der Horst, G.T. (1999). Photic induction of *mPer1* and *mPer2* in *cry*-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 286, 2531–2534.
- Ong, W.-D., Okubo-Kurihara, E., Kurihara, Y., Shimada, S., Makita, Y., Kawashima, M., Honda, K., Kondoh, Y., Watanabe, N., Osada, H., Cutler, S.R., Sudesh, K., Matsui, M. (2017). Chemical-Induced Inhibition of Blue Light-Mediated Seedling Development Caused by Disruption of Upstream Signal Transduction Involving Cryptochromes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 58, 95–105.
- Orth, C., Niemann, N., Hennig, L., Essen, L.-O., Batschauer, A. (2017). Hyperactivity of the Arabidopsis cryptochrome (*cry1*) L407F mutant is caused by a structural alteration close to the *cry1* ATP-binding site. *J. Biol. Chem.* 292, 12906–12920.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., Deng, X.W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* 405, 462–466.
- Oyama, T., Shimura, Y., Okada, K. (1997). The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.* 11, 2983–2995.
- Ozgür, S., Sancar, A. (2006). Analysis of autophosphorylating kinase activities of Arabidopsis and human cryptochromes. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 13369–13374.

- Oztürk, N., Kao, Y.-T., Selby, C.P., Kavakli, I.H., Partch, C.L., Zhong, D., Sancar, A. (2008). Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*. *Biochemistry (Mosc.)* 47, 10255–10261.
- Ozturk, N., Selby, C.P., Annayev, Y., Zhong, D., Sancar, A. (2011). Reaction mechanism of *Drosophila* cryptochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 516–521.
- Pang, Q., Hays, J.B. (1991). UV-B-Inducible and Temperature-Sensitive Photoreactivation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 95, 536–543.
- Park, H.W., Kim, S.T., Sancar, A., Deisenhofer, J. (1995). Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* 268, 1866–1872.
- Park, S.-Y., Tame, J.R.H. (2017). Seeing the light with BLUF proteins. *Biophys. Rev.* 9, 169–176.
- Parks, B.M., Quail, P.H. (1993). *hy8*, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell* 5, 39–48.
- Partch, C.L., Clarkson, M.W., Özgür, S., Lee, A.L., Sancar, A. (2005). Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 3795–3805.
- Partch, C.L., Sancar, A. (2005). Photochemistry and photobiology of cryptochrome blue-light photopigments: the search for a photocycle. *Photochem. Photobiol.* 81, 1291–1304.
- Payne, G., Heelis, P.F., Rohrs, B.R., Sancar, A. (1987). The active form of *Escherichia coli* DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both in vivo and in vitro. *Biochemistry (Mosc.)* 26, 7121–7127.
- Payne, G., Sancar, A. (1990). Absolute action spectrum of E-FADH₂ and E-FADH₂-MTHF forms of *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry (Mosc.)* 29, 7715–7727.
- Peach, C., Velten, J. (1991). Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol. Biol.* 17, 49–60.
- Perrotta, G., Yahoubyan, G., Nebuloso, E., Renzi, L., Giuliano, G. (2001). Tomato and barley contain duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant Cell Environ.* 24, 991–998.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- Pittendrigh, C.S. (1964). The Entrainment of Circadian Oscillations by Skeleton Photoperiods. *Science* 144, 565.
- Pokorny, R., Klar, T., Essen, L.-O., Batschauer, A. (2005). Crystallization and preliminary X-ray analysis of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61, 935–938.
- Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A., Essen, L.-O. (2008). Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 21023–21027.
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S., Matthies, H. (1975). Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. *Acta Biol. Med. Ger.* 34, 1441–1446.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., Coupland, G. (1995). The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80, 847–857.
- Quail, P.H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 85–93.

- Ritz, T., Adem, S., Schulten, K. (2000). A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophys. J.* 78, 707–718.
- Ritz, T., Ahmad, M., Mouritsen, H., Wiltschko, R., Wiltschko, W. (2010). Photoreceptor-based magnetoreception: optimal design of receptor molecules, cells, and neuronal processing. *J. R. Soc. Interface* 7, 135-146.
- Rizzini, L., Favory, J.-J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 332, 103–106.
- Rockwell, N.C., Su, Y.-S., Lagarias, J.C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 837–858.
- Rosenfeldt, G., Viana, R.M., Mootz, H.D., von Arnim, A.G., Batschauer, A. (2008). Chemically induced and light-independent cryptochrome photoreceptor activation. *Mol. Plant* 1, 4–14.
- Ruddat, A., Schmidt, P., Gatz, C., Braslavsky, S.E., Gärtner, W., Schaffner, K. (1997). Recombinant type A and B phytochromes from potato. Transient absorption spectroscopy. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 103–111.
- Rüdiger, W., Thümmel, F., Cmiel, E., Schneider, S. (1983). Chromophore structure of the physiologically active form (P(fr)) of phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 6244–6248.
- Rupert, C.S. (1962a). Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. I. Kinetics of the reaction. *J. Gen. Physiol.* 45, 703–724.
- Rupert, C.S. (1962b). Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. II. Formation of an enzyme-substrate complex. *J. Gen. Physiol.* 45, 725–741.
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., Okada, K. (2001). Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6969–6974.
- Sakamoto, K., Briggs, W.R. (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* 14, 1723–1735.
- Sakamoto, K. & Nagatani, A. (1996). Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J.* 10, 859-868.
- Sakuraba, Y., Jeong, J., Kang, M.-Y., Kim, J., Paek, N.-C., Choi, G. (2014). Phytochrome-interacting transcription factors PIF4 and PIF5 induce leaf senescence in Arabidopsis. *Nat. Commun.* 5, 4636.
- Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U., Briggs, W.R. (2000). Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 9401–9410.
- Sancar, A. (2016). Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 55, 8502–8527.
- Sancar, A. (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem. Rev.* 103, 2203–2237.
- Sancar, A., Rupert, C.S. (1978). Cloning of the phr gene and amplification of photolyase in Escherichia coli. *Gene* 4, 295–308.
- Sancar, A., Sancar, G.B. (1984). Escherichia coli DNA photolyase is a flavoprotein. *J. Mol. Biol.* 172, 223–227.
- Sancar, G.B. (1990). DNA photolyases: physical properties, action mechanism, and roles in dark repair. *Mutat. Res.* 236, 147–160.

- Sancar, G.B., Smith, F.W., Lorence, M.C., Rupert, C.S., Sancar, A. (1984). Sequences of the *Escherichia coli* photolyase gene and protein. *J. Biol. Chem.* 259, 6033–6038.
- Sang, Y., Li, Q.-H., Rubio, V., Zhang, Y.-C., Mao, J., Deng, X.-W., Yang, H.-Q. (2005). N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of Arabidopsis Cryptochrome 1. *Plant Cell* 17, 1569–1584.
- Sawa, M., Nusinow, D.A., Kay, S.A., Imaizumi, T. (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science* 318, 261–265.
- Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S., Schmidt, R. (2004). Silencing in Arabidopsis T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects. *Plant Cell* 16, 2561–2572.
- Schultz, T.F., Kiyosue, T., Yanovsky, M., Wada, M., Kay, S.A. (2001). A role for LKP2 in the circadian clock of Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 2659–2670.
- Selby, C.P., Sancar, A. (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17696–17700.
- Semo, M., Peirson, S., Lupi, D., Lucas, R.J., Jeffery, G., Foster, R.G. (2003). Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (rd/rd cl) mice. *Eur. J. Neurosci.* 17, 1793–1801.
- Shalitin, D., Yang, H., Mockler, T.C., Maymon, M., Guo, H., Whitelam, G.C., Lin, C. (2002). Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* 417, 763–767.
- Sharrock, R.A., Clack, T. (2004). Heterodimerization of type II phytochromes in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11500–11505.
- Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1989). Novel phytochrome sequences in Arabidopsis thaliana: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* 3, 1745–1757.
- Shikata, H., Hanada, K., Ushijima, T., Nakashima, M., Suzuki, Y., Matsushita, T. (2014). Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 18781–18786.
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S.M., Kinoshita, T. (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 219–247.
- Shin, A.-Y., Han, Y.-J., Baek, A., Ahn, T., Kim, S.Y., Nguyen, T.S., Son, M., Lee, K.W., Shen, Y., Song, P.-S., Kim, J.-I. (2016). Evidence that phytochrome functions as a protein kinase in plant light signalling. *Nat. Commun.* 7, 11545.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Chory, J., Furuya, M. (1994). The Induction of Seed Germination in Arabidopsis thaliana Is Regulated Principally by Phytochrome B and Secondarily by Phytochrome A. *Plant Physiol.* 104, 363–371.
- Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., Furuya, M. (1996). Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8129–8133.
- Shinomura, T., Uchida, K., Furuya, M. (2000). Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122, 147–156.
- Sijen, T., Vijn, I., Rebocho, A., van Blokland, R., Roelofs, D., Mol, J.N., Kooter, J.M. (2001). Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr. Biol.* 11, 436–440.

- Simon, R., Igeño, M.I., Coupland, G. (1996). Activation of floral meristem identity genes in Arabidopsis. *Nature* 384, 59–62.
- Smith, H., Xu, Y., Quail, P.H. (1997). Antagonistic but complementary actions of phytochromes A and B allow seedling de-etiolation. *Plant Physiol.* 114, 637–641.
- Somers, D.E., Devlin, P.F., Kay, S.A. (1998). Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science* 282, 1488–1490.
- Somers, D.E., Schultz, T.F., Milnamow, M., Kay, S.A. (2000). ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from Arabidopsis. *Cell* 101, 319–329.
- Song, Y.H., Estrada, D.A., Johnson, R.S., Kim, S.K., Lee, S.Y., MacCoss, M.J., Imaizumi, T. (2014). Distinct roles of FKF1, Gigantea, and Zeitlupe proteins in the regulation of Constans stability in Arabidopsis photoperiodic flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 17672–17677.
- Song, Y.H., Ito, S., Imaizumi, T. (2013). Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves. *Trends Plant Sci.* 18, 575–583.
- Spudich, J.L., Yang, C.S., Jung, K.H., Spudich, E.N. (2000). Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 365–392.
- Stacey, M.G., Kopp, O.R., Kim, T.H., von Arnim, A.G. (2000). Modular domain structure of Arabidopsis COP1. Reconstitution of activity by fragment complementation and mutational analysis of a nuclear localization signal in planta. *Plant Physiol.* 124, 979–990.
- Stanewsky, R. (2002). Clock mechanisms in Drosophila. *Cell Tissue Res.* 309, 11–26.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S.A., Rosbash, M., Hall, J.C. (1998). The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in Drosophila. *Cell* 95, 681–692.
- Subramanian, C., Kim, B.-H., Lyssenko, N.N., Xu, X., Johnson, C.H., von Arnim, A.G. (2004). The Arabidopsis repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6798–6802.
- Suetsugu, N., Wada, M. (2013). Evolution of Three LOV Blue Light Receptor Families in Green Plants and Photosynthetic Stramenopiles: Phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and Aureochrome. *Plant Cell Physiol.* 54, 8–23.
- Tagua, V.G., Pausch, M., Eckel, M., Gutiérrez, G., Miralles-Durán, A., Sanz, C., Eslava, A.P., Pokorný, R., Corrochano, L.M., Batschauer, A. (2015). Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 15130–15135.
- Takayama, Y., Nakasako, M., Okajima, K., Iwata, A., Kashojiya, S., Matsui, Y., Tokutomi, S., (2011). Light-induced movement of the LOV2 domain in an Asp720Asn mutant LOV2-kinase fragment of Arabidopsis phototropin 2. *Biochemistry* 50, 1174–1183.
- Takeda, S., Miyauchi, S., Nakayama, H., Kamo, N. (1997). Adenosine 5'-triphosphate binding to bovine serum albumin. *Biophys. Chem.* 69, 175–183.
- Takemiya, A., Sugiyama, N., Fujimoto, H., Tsutsumi, T., Yamauchi, S., Hiyama, A., Tada, Y., Christie, J.M., Shimazaki, K. (2013). Phosphorylation of BLUS1 kinase by phototropins is a primary step in stomatal opening. *Nat. Commun.* 4, 2094.
- Tan, S.-T., Dai, C., Liu, H.-T., Xue, H.-W. (2013). Arabidopsis casein kinase1 proteins CK1.3 and CK1.4 phosphorylate cryptochrome2 to regulate blue light signaling. *Plant Cell* 25, 2618–2632.

- Thöing, C., Oldemeyer, S., Kottke, T. (2015). Microsecond Deprotonation of Aspartic Acid and Response of the α/β Subdomain Precede C-Terminal Signaling in the Blue Light Sensor Plant Cryptochrome. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 5990–5999.
- Todo, T. (1999). Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat. Res.* 434, 89–97.
- Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T., Ikenaga, M. (1996). Similarity among the Drosophila (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* 272, 109–112.
- Tóth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A.J., Nagy, F., Kozma-Bognár, L. (2001). Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 127, 1607–1616.
- Tzfira, T., Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 147–154.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., Coupland, G. (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* 303, 1003–1006.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398, 627–630.
- van der Horst, M.A., Hellingwerf, K.J. (2004). Photoreceptor proteins, “star actors of modern times”: a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc. Chem. Res.* 37, 13–20.
- van Wilderen, L.J.G.W., Silkstone, G., Mason, M., van Thor, J.J., Wilson, M.T. (2015). Kinetic studies on the oxidation of semiquinone and hydroquinone forms of Arabidopsis cryptochrome by molecular oxygen. *FEBS Open Bio* 5, 885–892.
- Vaidya, A.T., Top, D., Manahan, C.C., Tokuda, J.M., Zhang, S., Pollack, L., Young, M.W., Crane, B.R. (2013). Flavin reduction activates Drosophila cryptochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 110, 20455-20460.
- Vandenbussche, F., Pierik, R., Millenaar, F.F., Voesenek, L.A.C.J., Van Der Straeten, D. (2005). Reaching out of the shade. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 462–468.
- Vaucheret, H., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Mourrain, P., Palauqui, J.C., Vernhettes, S. (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 16, 651–659.
- Veluchamy S. and Rollins J.A. (2008). A CRY-DASH-type photolyase/cryptochrome from *Sclerotinia sclerotiorum* mediates minor UV-A-specific effects on development. *Fungal Genet Biol.* 45, 1265-76.
- Vitaterna, M.H., Selby, C.P., Todo, T., Niwa, H., Thompson, C., Fruechte, E.M., Hitomi, K., Thresher, R.J., Ishikawa, T., Miyazaki, J., Takahashi, J.S., Sancar, A. (1999). Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12114–12119.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 33, 949–956.
- von Zadow, A., Ignatz, E., Pokorny, R., Essen, L.-O., Klug, G. (2016). Rhodobacter sphaeroides CryB is a bacterial cryptochrome with (6-4) photolyase activity. *FEBS J.* 283, 4291–

- Wagner, M. (1964). A Method for the direct determination of Desoxyribonuclease following agar gel electrophoresis. *J. Chromatogr.* 14, 107–108.
- Wang, H., Ma, L.G., Li, J.M., Zhao, H.Y., Deng, X.W. (2001). Direct interaction of Arabidopsis cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* 294, 154–158.
- Wang, Q., Barshop, W.D., Bian, M., Vashisht, A.A., He, R., Yu, X., Liu, B., Nguyen, P., Liu, X., Zhao, X., Wohlschlegel, J.A., Lin, C. (2017). The Blue Light-Dependent Phosphorylation of the CCE Domain Determines the Photosensitivity of Arabidopsis Cry2. *Mol. Plant* 10, 357.
- Wang, Q., Zuo, Z., Wang, X., Gu, L., Yoshizumi, T., Yang, Z., Yang, L., Liu, Q., Liu, W., Han, Y.-J., Kim, J.-I., Liu, B., Wohlschlegel, J.A., Matsui, M., Oka, Y., Lin, C. (2016). Photoactivation and inactivation of Arabidopsis cryptochrome 2. *Science* 354, 343–347.
- Wargent, J.J., Gegas, V.C., Jenkins, G.I., Doonan, J.H., Paul, N.D. (2009). UVR8 in Arabidopsis thaliana regulates multiple aspects of cellular differentiation during leaf development in response to ultraviolet B radiation. *New Phytol.* 183, 315–326.
- Wei, N., Deng, X.W. (1996). The role of the COP/DET/FUS genes in light control of arabidopsis seedling development. *Plant Physiol.* 112, 871–878.
- Weidler, G., Zur Oven-Krockhaus, S., Heunemann, M., Orth, C., Schleifenbaum, F., Harter, K., Hoecker, U., Batschauer, A. (2012). Degradation of Arabidopsis Cry2 is regulated by SPA proteins and phytochrome A. *Plant Cell* 24, 2610–2623.
- Whitelam, G.C., Johnson, E., Peng, J., Carol, P., Anderson, M.L., Cowl, J.S., Harberd, N.P. (1993). Phytochrome A null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* 5, 757–768.
- Wiltschko, R., Ahmad, M., Nießner, C., Gehring, D., Wiltschko, W. (2016). Light-dependent magnetoreception in birds: the crucial step occurs in the dark. *J. R. Soc. Interface* 13.
- Wiltschko, W., Wiltschko, R. (2002). Magnetic compass orientation in birds and its physiological basis. *Naturwissenschaften* 89, 445–452.
- Wu, D., Hu, Q., Yan, Z., Chen, W., Yan, C., Huang, X., Zhang, J., Yang, P., Deng, H., Wang, J., Deng, X., Shi, Y. (2012). Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* 484, 214–219.
- Wu, G., Spalding, E.P. (2007). Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 18813–18818.
- Wu, L., Yang, H.-Q. (2010). Cryptochrome 1 is implicated in promoting R protein-mediated plant resistance to Pseudomonas syringae in Arabidopsis. *Mol. Plant* 3, 539–548.
- Yang, H.Q., Tang, R.H., Cashmore, A.R. (2001). The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* 13, 2573–2587.
- Yang, L., Wang, X., Deng, W., Mo, W., Gao, J., Liu, Q., Zhang, C., Wang, Q., Lin, C., Zuo, Z., (2016). Using HEK293T Expression System to Study Photoactive Plant Cryptochromes. *Front Plant Sci.* 7, 940.
- Yang, H.Q., Wu, Y.J., Tang, R.H., Liu, D., Liu, Y., Cashmore, A.R. (2000). The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* 103, 815–827.
- Yanovsky, M.J., Mazzella, M.A., Whitelam, G.C., Casal, J.J. (2001). Resetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in Arabidopsis. *J. Biol. Rhythms* 16, 523–530.

- Yasui, A., Eker, A.P., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M., Oikawa, A. (1994). A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J.* 13, 6143–6151.
- Yi, C., Deng, X.W. (2005). COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 15, 618–625.
- Yu, X., Klejnot, J., Zhao, X., Shalitin, D., Maymon, M., Yang, H., Lee, J., Liu, X., Lopez, J., Lin, C. (2007). Arabidopsis cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *Plant Cell* 19, 3146–3156.
- Yu, X., Lin, C. (2008). A photoreceptor going nowhere but the nucleus. *Plant Signal. Behav.* 3, 331–332.
- Yu, X., Sayegh, R., Maymon, M., Warpeha, K., Klejnot, J., Yang, H., Huang, J., Lee, J., Kaufman, L., Lin, C. (2009). Formation of nuclear bodies of Arabidopsis cry2 in response to blue light is associated with its blue light-dependent degradation. *Plant Cell* 21, 118–130.
- Zagotta, M.T., Hicks, K.A., Jacobs, C.I., Young, J.C., Hangarter, R.P., Meeks-Wagner, D.R. (1996). The Arabidopsis ELF3 gene regulates vegetative photomorphogenesis and the photoperiodic induction of flowering. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 10, 691–702.
- Zeugner, A., Byrdin, M., Bouly, J.-P., Bakrim, N., Giovani, B., Brettel, K., Ahmad, M. (2005). Light-induced electron transfer in Arabidopsis cryptochrome-1 correlates with in vivo function. *J. Biol. Chem.* 280, 19437–19440.
- Zuo, Z., Liu, H., Liu, B., Liu, X., Lin, C. (2011). Blue light-dependent interaction of CRY2 with SPA1 regulates COP1 activity and floral initiation in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 21, 841–847.
- Zuo, Z.-C., Meng, Y.-Y., Yu, X.-H., Zhang, Z.-L., Feng, D.-S., Sun, S.-F., Liu, B., Lin, C.-T. (2012). A Study of the Blue-Light-Dependent Phosphorylation, Degradation, and Photobody Formation of Arabidopsis cry2. *Mol. Plant* 5, 200–207.

Anhang

Anhang A1

Programm: stretcher

Länge: 691

Identität: 325/691 (47.0%)

Ähnlichkeit: 437/691 (63.2%)

Lücken: 89/691 (12.9%)

Treffer: 1502

Cry1	1	MSGSVSGCGSGGCSIVWFRDLRVEDNPALAAAVRAGPVIALFVWAPEEE	50
	 : : : .	
Cry2	1	MKMDKK-----TIVWFRDLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEE	43
Cry1	51	GHYHPGRVSRWWLKNSLAQLDSSLRSLGTCLITKRSTDSVASLLDVVKST	100
		.: . : : :: : : :	
Cry2	44	GQFYPPGRASRWWWKQSLAHLSQLKALGSDLTLIKTHNTISAILDCIRVT	93
Cry1	101	GASQIFFNHLYDPLSLVRDHRADVLTAQGIAVRSFNADLLYEPWEVTDE	150
		: : . : . :: : : : . : :	
Cry2	94	GATKVVFNHLYDPVSLVRDHTVKEKLVVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCE	143
Cry1	151	LGRPFSMFAAFWERCLSMYPDPESPLLPPK-----KIISGDVSKCVADP	194
		.: : . : : : : : : . .. : :: : :	
Cry2	144	KGKPFTSFNSYWKKCLDMSI--ESVMLPPPWRLMPITAAAEAIWACSIEE	191
Cry1	195	LVFEDDSEKGSNALLARAWSPGWSNGDKALTTFFINGPLLEYSKNRRKADS	244
		.: : : :: : : : : ...	
Cry2	192	LGLENEAEKPSNALLTRAWSPGWSNADKLLNEFIEKQLIDYAKNSKKVVG	241
Cry1	245	ATTSFLSPHLHFGEVSVRKVFHLVRIKQVAWANEGNEAGEESVNLFLKSI	294
		.: : . : : : : : : : : . : . .. : : : :	
Cry2	242	NSTSLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQIIWARDKNSEGEESADLFLRGI	291

Anhang A2

Basensequenz des in *E. coli* heterolog exprimierten cry2 WT PHR in pCDF-DUET1

atgggcagcagccatcaccatcatcaccacagccaggatccgaattcgagctcgaagatggacaaaaagactatagtttggtt
 agaagagacctaaggattgaggataatcctgcattagcagcagctgctcacgaaggatctgttttctgtcttcatttggtgctctga
 agaagaaggacagttttatcctggaagagctcaagatggtggatgaaacaatcactgctcacttatctcaatcctgaaggctctt
 ggatctgacctcactttaatcaaaaaccacaacacgatttcagcgtatctggattgatccgcgttaccgggtctacaaaagctgctt
 taaccacctctatgatcctgtttcgtagttcgggaccataccgtaaaggagaagctggtggaacgtgggatctctgtgcaaagcta
 caatggagatctattgatgaaccgtgggagatatactgcgaaaagggcaaaccttttacgagttcaattctactggaagaaatg
 cttagatgtcgattgaatccgttatgcttctcctcctggcgggtgatgccaataactgcagcggctgaagcgattggcggttc
 gattgaagaactagggctggagaatgaggccgagaaaccgagcaatgcggtgtaactagagcttggtctccaggatggagca
 atgctgataagtactaaatgagttcatcgagaagcagttgatagattatgcaaagaacagcaagaaagttgttgggaattctactt
 cactactttctccgatctccatttcggggaaataagcgtcagacacgtttccagtggtgcccggatgaaacaaattatgggcaag
 agataagaacagtgaaggagaagaaagtcagatcttttcttaggggaatcggtttaagagagtattctcggtatatatgtttcaac
 ttcccgtttactcacgagcaatcgttgttgagtcattcctcgttttccctcggatgctgatgttgataagttcaaggcctggagacaag
 gcaggaccggttatccggttggtggatgccggaatgagagagcttgggctaccggatggatgcataacagaataagagtgattgt
 ttcaagctttgctgtgaagtttctcctccatggaaatggggaatgaagtattctgggatacacttttgatgctgattggaatgtg
 acatccttggtggcagtatatctctgggagatccccgatggccacgagcttgatcgcttgacaatcccgcgttacaaggcgc
 aatatgaccagaaggtgagtacataaggcaatggctcccagcttgcgagattgccaactgaatggatccatcatccatggg
 acgctccttaaccgtactcaaagcttctggtgtggaactcggaacaaactatgcgaaaccattgtagacatcgacacagctcgt
 gagctactagctaaagctatttcaagaaccggtgaagcacagatcatgatctga

TTT in cry2 Y399F PHR

GCC in cry2 Y399A PHR

GCA in cry2 W321A PHR

Aminosäuresequenz des in *E. coli* heterolog exprimierten cry2 WT PHR (58,8 kDa)

MGSSHHHHHSQDPNSSKMDKKTIVWFRRDLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYPRASRWWM
 KQSLAHLSQLKALGSDLTLIKTHNTISAILDCIRVTGATKVVFNHLYDPVSLVRDHTVKEKLVERGISVQSYNGDLL
 YEPWEIYCEKGKPFSTFNSYWKCLDMSIESVMLPPPWRMLPITAAAEAIWACSIIEELGLENAEKPSNALLTRAW
 SPGWSNADKLLNEFIEKQLIDYAKNSKKVVGNSTSLLSPYLHFGEISVRHVFQCARMKQIIWARDKNSEGEESADL
 FLRGIGLREYSRYICFNFPFTHQSLLSHLRFPPWDADVDFKAWRQGRGTGYPLVDAGMRELWATGWMHNRIRV
 IVSSFAVKFLLLPWKGMKYFWDTLDDADLECDILGWQYISGSIPDGHLDRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLP
 ELARLPTEWIHPWDAPLTVLKASGVELGTNYAKPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMI-

Anhang A3

Basensequenz des in Sf21-Zellen heterolog exprimierten cry2 WT PHR in pBACPAK9

atgggcagcagccatcatcatcatcatcatagcagcggcctggcgccgagccatagcctagcatgactggggacagcaaatgggtcgccgatcc
 gaattcgccacatgaagatggacaaaagactatagttggtttagaagagacctaggattgaggataatcctgcattagcagcagctgctcacgaaggatc
 tgttttcctgtctcattgggtgctgaagaagaaggacagtttatcctggaagactcaagatgggtgatgaacaatcactgctcacttactcaatcctgaa
 ggccttgatctgacctcactttaatacaaacccacacacagattcagcgatctggattgtatccggttaccgggtctacaaaagctgctttaaccacctctat
 gatcctgttctgtagttcgggaccataccgtaaaggagaagctgggaacgtgggatctctgtgcaaagctacaatggagatctattgatgaaccgtgggag
 atatactcggaaaaggcacaacctttacgattcaattctactggaagaaatgcttagatagtcgattgaatccggtatgcttctcctccttggcgggtgatgcc
 aataactgcagcggctgaagcattggcggtgctgattgaagaactagggctggagaatgaggccgagaaaccgagcaatgctgttaactagagcctgg
 tctccaggatggagcaatgctgataagtactaaatgagttcatcgagaagcagttgatagattatgcaaagaacagcaagaaagttggtggaattctactcac
 tactttcctcctatctccatttcgggaaataagcgtcagacacgtttccagtgtgcccgatgaacaaattatgggcaagagataagaacagtgaggag
 aagaaagtcagatcttttctagggaatcggttaagagagtattcctcggtatataatgttcaactcccgttactcacgagcaatcgtgttgagtcattcggttt
 tccctgggatgctgatgttgataagttcaaggcctggagacaaggcagaccggtatccggtgggtgatgccggaatgagagagccttgggctaccggatgga
 tgcataacagaataagagtgattgttcaagcttctgtgaaagttcttctcctccatgaaatggggaatgaagtattctgggatacacttttgatgctgattgga
 atgtgacatcctggctggcagtatatctcgggatatccccgatgccacagcgttgatcgctggacaatcccgcgttacaaggcggcaaatatgaccgaga
 aggtgagtacataaggcaatggctcccagcgttgcgagattgccaactgaatggatccatcatccatgggacgctccttaaccgtactcaaagcttctggtg
 gaactcggaaacaaactatgcgaaacccattgtagacatcgacacagctcgtgagctactagctaaagctattcaagaaccgtaagcacagatcatgatcg
 gagcagcacctgatgagattgtagcagatagcttcgagccttaggggctaataaccattaaagaacctggtcttgcctctgtcttctaatgaccaa caagta
 cctcggctgtcgttacaacgggtcaagagagtgaacctgaggaagaagaagagagagacatgaagaaatcaggggattcgatgaaaggagtggtt
 tcgactgctgaatcttcttctcctcagtggttttcgagctgtcgttggcatcagaaggggaagaatcgtgaaggtattcaagattcatctgatcagattac
 tacaagtttgggaaaaaatggtgcaaatga

Aminosäuresequenz des in Sf21-Zellen heterolog exprimierten cry2 WT PHR (73,5 kDa)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFATMKMDKKTIVWFRRDLRIEDNPALAAAHEGSVFP
 VFIWCPEEEGQFYPGRASRWWMKQSLAHLSQLKALGSDLTIKHTNTISAILDCIRVTGATKVVFNHLYDPVSLV
 RDHTVKEKLVVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGPFTSFNSYWKCLDMSIESVMLPPPWRMLPITAAAEAIW
 ACSIEELGLENEAEKPSNALLTRAWSPGWSNADKLLNEFIEKQLIDYAKNSKKVVGNSTSLLSPYLHFGAISVRHVF
 QCARMKQIWARDKNSGEESADLFLRGIGLREYSRYICFNFPFTHQSLLSHLRFFPWDADVDKFKAWRQGRGTG
 YPLVDAGMRELWATGWMHNRIRVIVSSFAVKFLLLPWKWGMKYFWDTLLDADLECDILGWQYISGSIPDGHELD
 RLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPELARLPTEWIHPWDAPLTVLKASGVELGTNYAKPIVDIDTARELLAKAISRT
 REAQIMIGAAPDEIVADSFEALGANTIKEPGLCPSVSSNDQVPSAVRYNGSKRVKPEEEEEERDMKKSRRGFDERE
 LFSTAESSSSSVFFVSQSCSLASEGKNLEGIQDSSDQITTSLGKNGCK-

Anhang A4

Basensequenz des in *Arabidopsis thaliana* exprimierten cry2 WT

atgaagatggacaaaaagactatagtttggttagaagagacctaaggattgaggataatcctgcattagcagcagctgctcacgaaggatctgttttctgtctt
catttggtcctgaagaagaaggacagttttatcctggaagagctcaagatggtggatgaaacaatcactgctcacttatcctgaaggctcttgatct
gacctcactttaatcaaaaccacaacacgatttcagcagcttggattgatccggttaccggtgctacaaaagtcgtcttaaccacctctatgatcctgttctgt
agttcgggaccataccgtaaaggagaagctggtggaacgtgggatcctgtgcaaaagctacaatggagatctattgtatgaaccgtgggagatatactgcgaa
aagggcaaacctttacgagttcaattctactggaagaaatgcttagatgtcgtatgaatccgttatgcttcctcctctggcgggtgatccaataactgcagc
ggctgaagcagattggcggttctgattgaagaactagggtggagaatgaggccgagaaaccgagcaatgcttgaactagagcttggctccaggatgg
agcaatgctgataagttactaaatgattcatcgagaagcagttgatagattatgcaagaacagcaagaaagttggtggaattctacttactacttctccgat
ctccatttggggaaataagcgtcagacacgtttccagtggtcccggatgaaacaaattatattgggcaagagataagaacaggaaggagaagaagtgca
gatcttttctaggggaatcgtttaagagagtattctcggatataatgttcaactcccgttactcagagcaatcgttggatcctcgttttcccttgggatg
ctgatgtgataagttcaaggcctggagacaaggcaggaccggtatccgttgggtgatccggaatgagagagcittgggctaccggatggatgcataacag
aataagagtgtattcaagcttctgtgaaagttctctcctccatggaaatggggaatgaagtatttctgggatacactttggatgctgattggaatgtgacac
ctggctggcagtatatcctctgggagtatccccgatggccacgagcttgatcgttggacaatcccgcgttacaggcgccaaatgaccagaagggtgagta
cataaggcaatggctcccagcttgcgagattgccaaactgaatggatccatccatgggacgctccttaaccgtactcaaagcttctggtgtggaactcgga
acaaactatgcgaaaccattgtagacatcgacacagctcgtgactactagctaaagctatttcaagaaccggtgaagcacagatcatgatcggagcagca
cctgatgagattgtagcagatagctcagggccttaggggctaataaccattaaagaacctggtctttgccatctgttcttaatgaccaacaagtacctcggt
gttcgttacaacgggtcaagagagtgaaacctgaggaagaagaagagagagacatgaagaaatctaggggattcgatgaaagggagttgtttcactgactgt
gaatcttcttctcagtggtgtttctcgttcgagcttctcgttggcatcagaagggaagaatctggaaggattcaagattcatctgatcagattactacaagtt
gggaaaaaatggttccaatga

TTT in cry2 Y399F

GCC in cry2 Y399A

GCA in cry2 W321A

Aminosäuresequenz des in *Arabidopsis thaliana* exprimierten cry2 WT

MKMDKKTIVFRRDLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYPGRASRWWWKQSLAHLSQLKALGSDL
TLIKHTHTISAILDCIRVTGATKVVFNHLYDPVSLVRDHTVKEKLVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKGPFTSFN
SYWKKCLDMSIESVMLPPPWRMLPITAAAEAIWACSIIEELGLENAEKPSNALLTRAWSPGWSNADKLLNEFIEKQ
LIDYAKNSKKVVGNSTLLSPYLHFGEISVRHVFCARMKQIIWARDKNSEGEESADLFLRGIGLREYSRYICFNFP
FTHEQSLLSHLRFFPVDADVDFKAWRQGRGTGYPLVDAGMRELWATGWMHNRIRVIVSSFAVKFLLLPWKWGM
KYFDWTLDDADLECDILGWQYISGSIPDGHELDRLDNPALQGAKYDPEGEYIRQWLPELARLPTEWIHHPWDAPL
TVLKASGVELGTNYAKPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMIGAAPDEIVADSFEALGANTIKPEGLCPVSSNDQQV
PSAVRYNGSKRVKPEEEEEERDMKSRGFDERELFSTAESSSSSSVFFVSQCSLASEGKNLEGIQDSSDQITSL
GKNGCQ-

Anhang A5

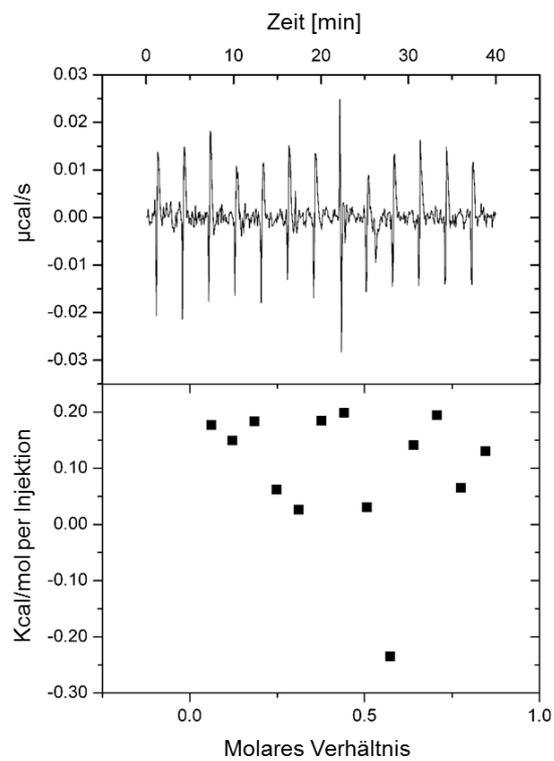


Abbildung Anhang 1: Isotherme Titrationskalorimetrie mit ATP in Puffer. Zur Erfassung der Verdünnungsenthalpie wurden in 13 Injektionen jeweils $3 \mu\text{L}$ $0,2 \text{ mM}$ ATP zum ITC-Puffer titriert. Die thermischen Änderungen wurden gemessen und die resultierenden Peaks mit Origin integriert und gefittet.

Anhang A6

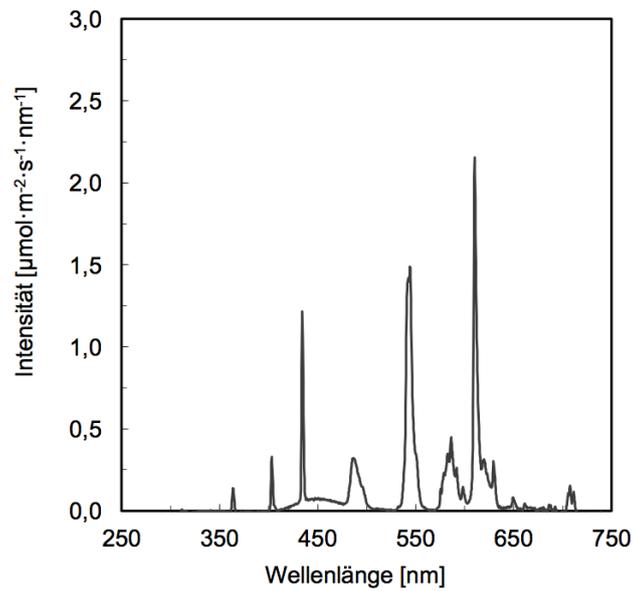
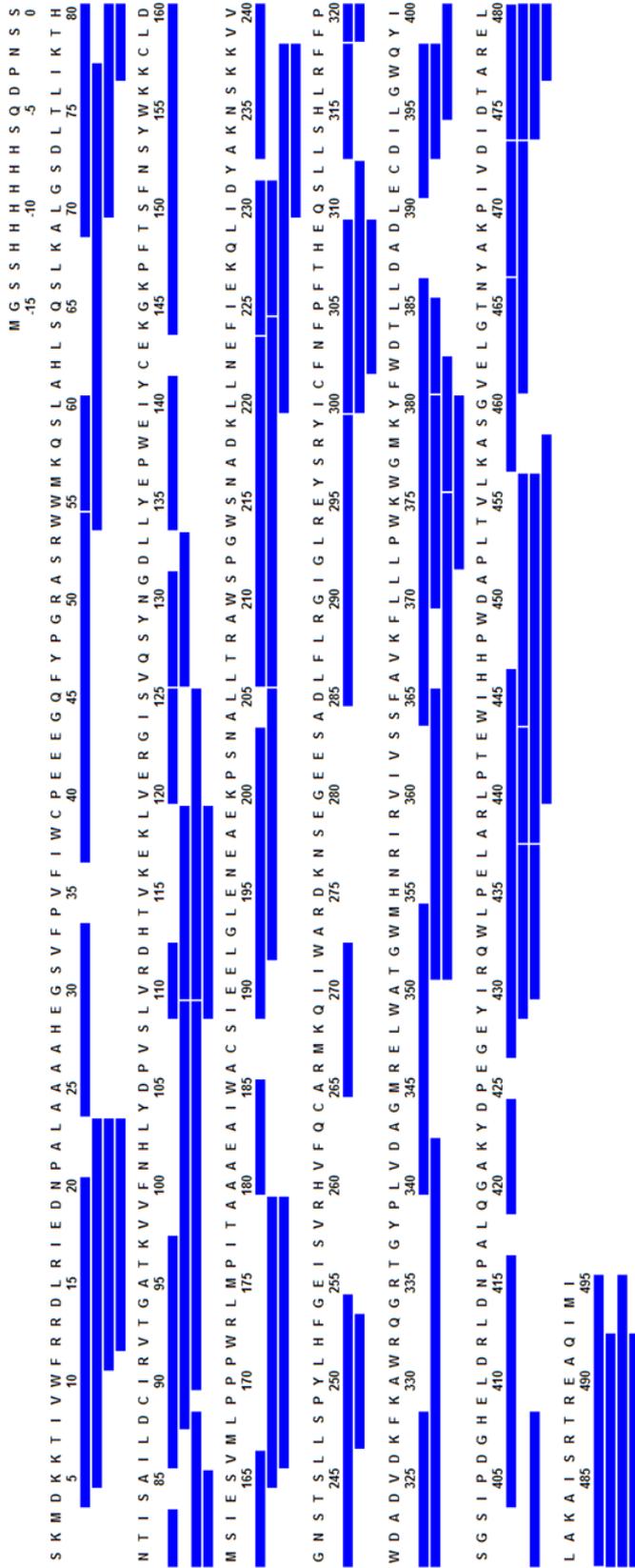


Abbildung Anhang 2: Emissionsspektrum der im Blühversuch genutzten Weißlichtlampen. Das Emissionsspektrum der im Blühversuch (s. Kapitel 4.3.3) genutzten Lampen (Osram Lumilux Cool White Lamps L36W/840) wurde mit einem Optometer gemessen. Die Integration der Peaks führte zu einer Intensität des Weißlichts von ca. $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Anhang A7



Total: 72 Peptides, 88.7% Coverage, 2.06 Redundancy

Abbildung Anhang 3: Coverage-Map des Pepsin-Verdaus für HDX-MS. cry2 WT PHR wurde mit Peptin verdaut und die resultierenden Peptide massenspektrometrisch untersucht. Jeder blaue Balken stellt ein identifiziertes Peptid dar. Insgesamt wurden 72 Peptide identifiziert, was eine Abdeckung von 88,7% ist.

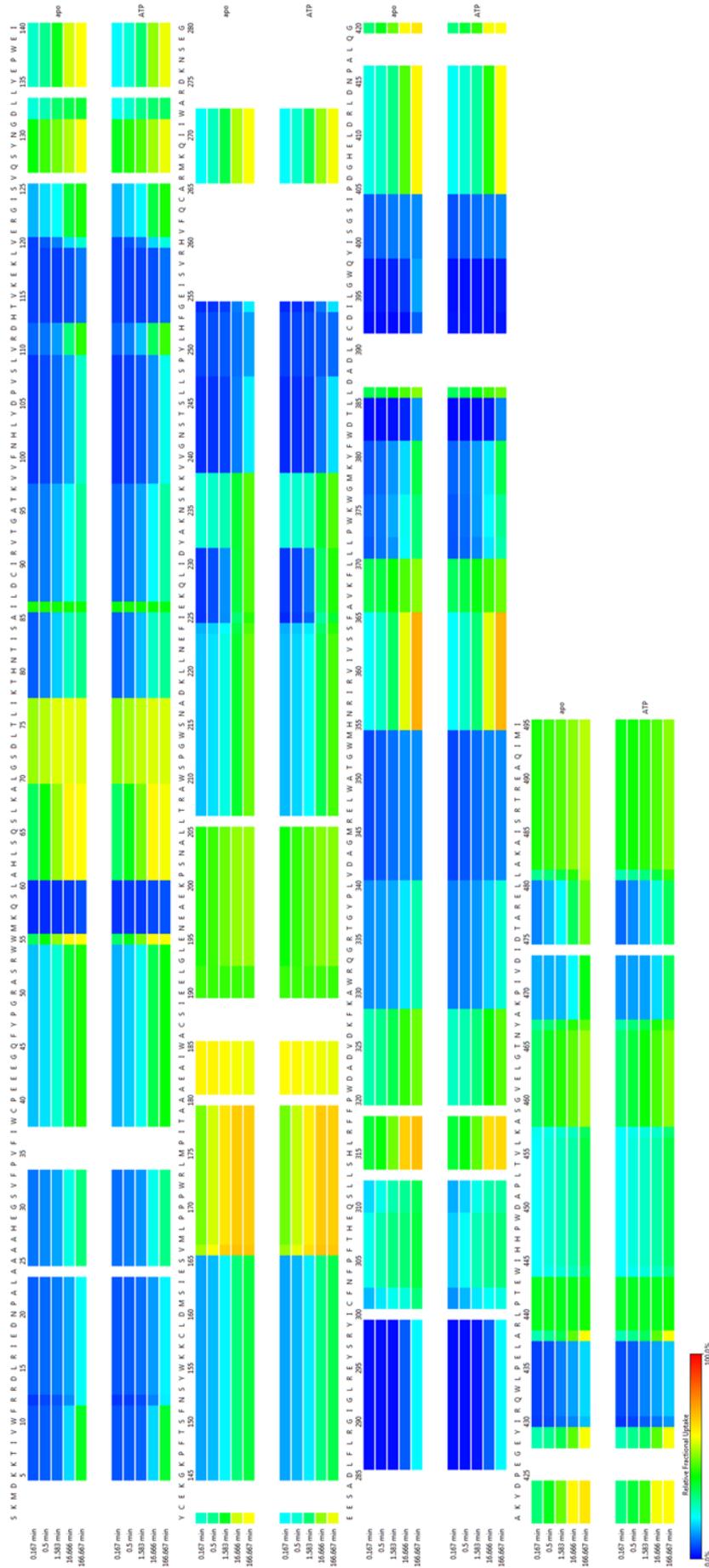


Abbildung Anhang 4: Heatmap der HDX-MS-Daten von cry2 WT PHR mit und ohne ATP. cry2 WT PHR wurde in An- und Abwesenheit (apo) von 1 mM ATP für die angegebenen Zeiten in Deuterium-haltigen Puffer inkubiert. Danach wurde das Protein mit Pepsin verdaut und die resultierenden Peptide massenspektrometrisch untersucht. Dargestellt ist die relative Inkorporation von Deuterium in den beiden Zuständen.

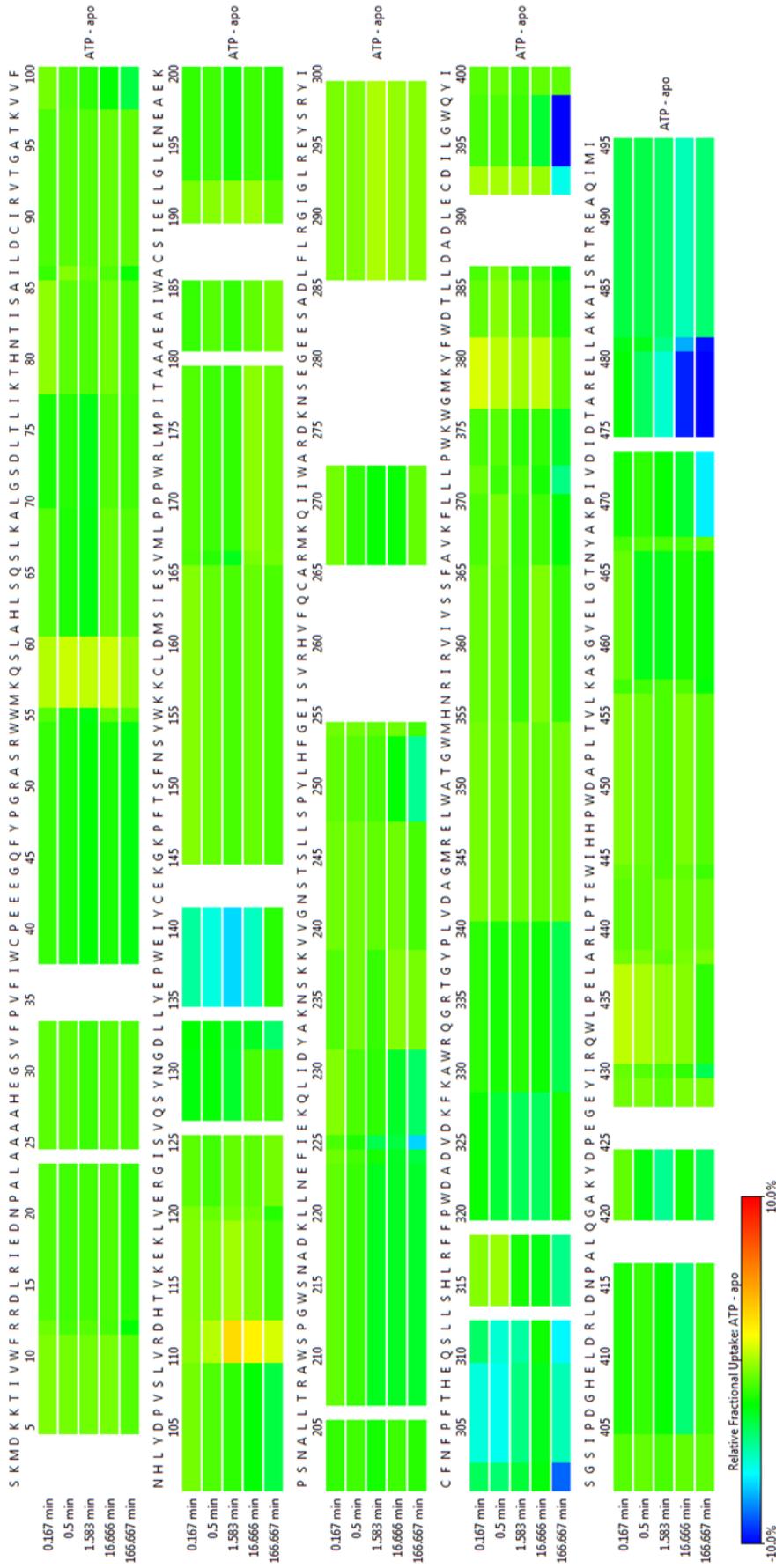


Abbildung Anhang 5: Heatmap der Differenz der Relativen Deuterium Inkorporation zwischen ATP-gebundenem und ATP-ungebundenem (apo) Zustand von cry2 WT PHR. cry2 WT PHR wurde in An- und Abwesenheit (apo) von 1 mM ATP für die angegebenen Zeiten in Deuterium-haltigen Puffer inkubiert. Danach wurde das Protein mit Pepsin verdaut und die resultierenden Peptide massenspektrometrisch untersucht. Dargestellt ist die relative Inkorporation von Deuterium zwischen den beiden Zuständen (ATP – apo).

Diese Seite (Lebenslauf) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Alfred Batschauer danken. Nicht nur dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Arbeit bei ihm anzufertigen, sondern auch für die stetige Unterstützung während dieser Zeit. Auch in anstrengenden Zeiten konnte ich auf seine Hilfe immer zählen. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders bedanken. Danke, Alfred! Ich weiß Deine Bemühungen sehr zu schätzen!

Ein nächster großer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Batschauer. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die mir die letzten drei Jahre so angenehm gemacht haben und für die stetige Unterstützung. Ein großer Dank geht dabei an Agnes Damm, ohne deren Hilfe ich wahrscheinlich nicht Herr geworden wäre über die Unmengen an Pflanzen. Außerdem war sie auch während des gesamten Laborablaufs jeden Tag aufs Neue eine große Hilfe. Ich danke Dr. Richard Pokorny, Christian Orth, Nils Niemann und Dr. Ella Charkiewicz für die große Hilfe bei Proteinaufreinigung und den restlichen biochemischen und spektroskopischen Methoden sowie der stetigen Diskussionsbereitschaft. Annika Brych gilt mein Dank für die tolle Unterstützung bei qRT-PCR sowie allen anderen alltäglichen Problemen im Laboralltag. Jeanette Schermuly danke ich für die Unterstützung bei der Klonierung und zusammen mit Bertram Kraus und Birte Wagner für die generelle Unterstützung im Laboralltag.

Außerdem geht ein großer Dank an Dr. Christian Michalski. Zum einen für die generelle sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung, die mir sehr viel während der ganzen Zeit gebracht hat. Und zum anderen für den großen Anteil, den auch er neben den Mitgliedern der AG Batschauer daran hatte, dass ich eine sehr schöne Doktorandenzeit hatte.

Weiterhin möchte ich meinem Zweitgutachter Prof. Dr. Claus Schwechheimer danken für die Übernahme der Zweitkorrektur und die weiterbringenden Diskussionen während meiner Doktorandenzeit.

Ich danke außerdem Dr. Uwe Linne für die massenspektrometrischen Analysen, Dr. Olaf Burghaus für die EPR-spektroskopischen Messungen, Dr. Wieland Steinchen für die HDX-MS Analysen und der Gruppe von Margaret Ahmad in Paris für die Bereitstellung von Vollängen-cry2.

Außerdem danke meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, meinem Freundeskreis und ganz besonders Tim Münstermann für die generelle Unterstützung in jeder Lebenslage. Ohne Euch wäre ich aufgeschmissen!

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Einfluss von ATP auf die biologische Aktivität von Cryptochrom 2 aus *Arabidopsis thaliana*.“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, _____