

**Aktivierung und Inaktivierung von *Arabidopsis thaliana*  
Cryptochromen durch BIC1**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Dennis Kock  
aus Marburg

Marburg an der Lahn, 2023

Die vorliegende Dissertation wurde von April 2019 bis Mai 2023 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg  
(Hochschulkennziffer 1180) als Dissertation angenommen am: 19.07.2023

Prüfungskommission:

Erstgutachter:	Prof. Dr. Alfred Batschauer
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Lars Voll
Prüfer:	Prof. Dr. Lars Opgenoorth
	Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der Disputation: 27.09.2023

## Summary

The focus of this study was to improve the understanding of the activation and deactivation of *A. thaliana* cryptochromes, particularly with regard to the inhibition of cry1 and cry2 by the antagonistic protein Blue Light Inhibitor of Cryptochromes 1 (BIC1). In the first studies of BICs after their discovery in 2016, BIC1 and BIC2 from *A. thaliana* showed distinct and specific inhibitory effects on the cryptochromes (Wang *et al.*, 2016). Using various protein-biological and plant-physiological methods in this work, some of these inhibitory effects were confirmed and further data on the role of BICs provided.

Overexpression lines of BIC1 in *A. thaliana* Col-0 background showed longer hypocotyls under blue light, delayed flowering under long-day conditions, and a shade avoidance response even under long day conditions with strong white light during the day. These observations demonstrated a partial inhibition of cryptochromes through BIC1 overexpression and therefore a dose-response of cryptochrome activity.

*In vitro* studies focused on heme-binding by BIC1 (initially demonstrated in the dissertation of N. Niemann, Philipps-University of Marburg, 2021) were continued. A general affinity of heme to BIC1 was confirmed *in vitro* and *in planta*. Through the replacement of the three cysteine residues in BIC1 by alanines (BIC1<sup>3CA</sup> mutant), it was shown that this mutant protein when heterologously expressed in *E. coli* is incapable of binding heme. Likewise, this mutant no longer exhibited the formation of intermolecular disulfide bridges which were observed in BIC1<sup>WT</sup> when recombinantly expressed in *E. coli*. However, BIC1<sup>3CA</sup> still showed biological activity *in planta*, indicating that the ability to form intermolecular disulfide bridges are not essential for the BIC1 inhibition of cryptochromes.

The formation of photobodies by cry1 under strong blue light described by Liu *et al.* (2022) were confirmed in this study. In contrast to previous results, photobodies were not only identified in the nucleus but also in the cytoplasm of *N. benthamiana* leaf cells. The formation of cry1 photobodies was inhibited by co-expression of BIC1, confirming the results of Liu *et al.* (2022). Further work is needed to identify the function and biological relevance of these cry1 photobodies.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit lag der Fokus darauf, das Verständnis über die Aktivierung und Deaktivierung von *A. thaliana* Cryptochromen zu verbessern, insbesondere in Bezug auf die Inhibierung von cry1 und cry2 durch das antagonistische Protein *Blue light Inhibitor of Cryptochromes 1* (BIC1). In den ersten Arbeiten zu BICs nach deren Entdeckung in 2016 zeigten BIC1 und BIC2 aus *A. thaliana* eindeutige und spezifische inhibitorische Wirkungen auf die Cryptochrome (Wang *et al.*, 2016). Mithilfe verschiedener proteinbiologischer und pflanzenphysiologischer Methoden wurden in dieser Arbeit einige dieser hemmenden Effekte bestätigt und zusätzliche Daten zur Rolle der BICs bereitgestellt.

Überexpressions-Linien von BIC1 in *A. thaliana* Col-0-Hintergrund zeigten längere Hypokotyle unter Blaulicht, einen verzögerten Blühbeginn unter Langtagbedingungen und eine Schattenvermeidungsreaktion unter Langtagbedingungen und starkem Weißlicht. Diese Beobachtungen zeigten, dass eine Überexpression von BIC1 zu einer partiellen Inhibierung von Cryptochromen führt und somit eine dosisabhängige Reaktion der Cryptochrom Aktivität auftritt.

*In vitro* Studien zur Häm-Bindung durch BIC1 (zuerst gezeigt in der Dissertation von N. Niemann, Philipps-Universität Marburg, 2021) wurden fortgesetzt. Bestätigt werden konnte eine generelle Affinität von Häm zu BIC1 *in vitro* und *in planta*. Durch Austausch von drei Cysteinreste in BIC1 zu Alanin (BIC1<sup>3CA</sup> Mutante) wurde gezeigt, dass dieses Protein kein Häm mehr bindet, wenn es heterolog in *E. coli* exprimiert wird. Ebenso zeigte diese Mutante keine Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken, die bei der rekombinanten Expression von BIC1<sup>WT</sup> in *E. coli* beobachtet wurden. Dennoch zeigte BIC1<sup>3CA</sup> *in planta* weiterhin biologische Aktivität, was darauf hindeutet, dass die Fähigkeit zur Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken für die Inhibierung der Cryptochrome durch BIC1 nicht entscheidend ist.

Die zuvor bei Liu *et al.* (2022) beschriebene cry1 *photobodody* Bildung unter starken Blaulicht-Bedingungen wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Hierbei konnte im Gegensatz zu bisherigen Ergebnissen *photobodies* nicht nur im Zellkern, sondern auch im Cytoplasma von *N. benthamiana* Blattzellen identifiziert werden. Die Bildung von cry1 *photobodies* wurde durch die Co-Expression von BIC1 gehemmt, was die Ergebnisse von Liu *et al.* (2022) ebenfalls bestätigt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Funktion und biologische Relevanz dieser cry1 *photobodies* zu identifizieren.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Pflanzliche Photorezeptoren und die Wahrnehmung von Licht.....	1
1.1.1	Rotlichtrezeptoren .....	3
1.1.2	UV- und Blaulichtrezeptoren .....	4
1.1.3	Cryptochrom/Photolyase Superfamilie (CPF).....	6
1.2	FAD-Bindung durch Cryptochrome und ihre Rolle in der Photochemie.....	7
1.3	ROS, deren Bildung, Entgiftung und Funktion als Signalmoleküle .....	10
1.4	Cryptochrom 1 und Cryptochrom 2 in <i>A. thaliana</i> und deren Wirkungsweisen.....	11
1.4.1	Cryptochrom-vermittelte Schattenvermeidungsreaktion .....	13
1.4.2	Die Bildung von <i>photobodies</i> durch Cryptochrom 1 und 2 .....	15
1.4.3	Photoaktivierung pflanzlicher Cryptochrome durch Oligomerisierung.....	16
1.5	Die Rolle von BICs bei der Inhibierung von Cryptochromen .....	17
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	<b>21</b>
2.1	Geräte .....	21
2.2	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.3	Antikörper .....	23
2.4	Chemikalien .....	23
2.5	Plasmide .....	23
2.5.1	Vektoren für stabile Transformation in <i>A. thaliana</i> .....	24
2.5.2	Vektoren für <i>in planta</i> Anwendungen und transienter Expression in <i>N. benthamiana</i> .....	25
2.5.3	Vektoren für heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	25
2.6	Puffersysteme .....	26
2.7	Proteinmarker .....	26
2.8	<i>Escherichia coli</i> -Stämme .....	27
2.9	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme .....	27
2.10	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien .....	28

2.11	Verwendete Websites .....	29
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>30</b>
3.1	Anzucht und Kultivierung spezifischer Organismen .....	30
3.1.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	30
3.1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
3.1.3	<i>Escherichia coli</i> .....	33
3.1.4	<i>Nicotiana benthamiana</i> .....	33
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	34
3.2.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	34
3.2.2	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen .....	35
3.2.3	Gateway-Klonierung .....	35
3.2.4	Überprüfung von Konstrukten und Agarose-Gelelektrophorese.....	37
3.2.5	Q5 <sup>®</sup> - <i>Side-directed-mutagenesis</i> .....	39
3.2.6	DNA-Sequenzierung .....	41
3.3	Herstellung transgener Pflanzen.....	41
3.3.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>A. tumefaciens</i> .....	42
3.3.2	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> .....	43
3.3.3	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
3.3.4	Selektion und Zucht von transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	44
3.3.5	Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	46
3.4	Proteinbiochemische Methoden .....	48
3.4.1	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	48
3.4.2	Aufreinigung löslicher, rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> .....	49
3.4.3	Aufkonzentrieren von Proteinen .....	50
3.4.4	Denaturierender Proteinextrakt aus <i>A. thaliana</i> Keimlingen .....	51
3.4.5	Aufreinigung von BIC1-GFP aus <i>N. benthamiana</i> und Immunpräzipitation mittels $\alpha$ GFP-Agarose <i>Beads</i> .....	52
3.4.6	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	54
3.4.7	Elektrophorese von Proteinen .....	56
3.4.8	Coomassie Färbung .....	57
3.4.9	<i>Western Blot</i> .....	57
3.4.10	<i>Native-PAGE</i> .....	62

3.5 Pflanzen <i>Assays</i> .....	63
3.5.1 Bestrahlung und Hypokotyllängenbestimmung .....	64
3.5.2 Blühzeitbestimmung .....	64
3.5.3 <i>Shade-Avoidance</i> Typisierung .....	64
3.6 Spektroskopische Methoden .....	65
3.6.1 UV/VIS-Spektroskopie .....	65
3.6.2 Fluoreszenz-Spektroskopie .....	66
3.6.3 Massenspektrometrie .....	69
3.7 RNA-Sequenzierung .....	70
3.7.1 Proben Aufzucht .....	70
3.7.2 RNA-Aufreinigung .....	71
3.7.3 RNA-Qualitäts Check .....	72
3.7.4 Bioinformatische Auswertung .....	72
3.8 Konfokale Laserscan Mikroskopie .....	72
3.8.1 GFP/RFP Lokalisierung .....	73
3.8.2 Pd-mP <i>Assay</i> .....	74
3.8.3 Entstehung von <i>photobodies</i> .....	76
3.9 Statistische Analysen .....	77
<b>4 Zielsetzung .....</b>	<b>79</b>
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>80</b>
5.1 Nachweis von BIC1 Kofaktoren und der Einfluss von Aminosäuren Austausch auf die Kofaktorbindung .....	80
5.1.1 Heterologe Expression von BIC1 <sup>WT</sup> und BIC1 <sup>3CA</sup> in <i>E. coli</i> und Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken .....	80
5.1.2 Spektroskopische Analyse aufgereinigter BIC1-Varianten .....	85
5.1.3 Nachweis von Häm als Kofaktor von BIC1 <sup>WT</sup> <i>in planta</i> .....	86
5.1.4 Expression und Analyse von BIC1 <sup>H13A3CA</sup> .....	88
5.1.5 Quantifizierung von Häm als BIC1 Kofaktor und Test auf Peroxidaseaktivität im <i>Amplex Red Assay</i> .....	91
5.1.6 Test auf Peroxidaseaktivität von BIC1 <sup>WT</sup> mit Chloronaphthol als Substrat .....	94
5.1.7 Co-Lokalisierung von BIC1 <sup>WT</sup> mit Palladium-mesoporphyrin IX (Pd-mP) .....	97

5.2	BIC1 <sup>WT</sup> zeigt konservierte Sequenzähnlichkeiten in der Ordnung der <i>Brassicales</i> ..	101
5.3	Einfluss der Cystein-Austausche in BIC1 auf dessen biologische Funktion <i>in planta</i>	103
5.3.1	Expression von BIC1 in <i>Nicotiana benthamiana</i> und Transformation in <i>A. thaliana</i> .....	103
5.3.2	Wechselwirkungen zwischen BIC1-Überexpressionen <i>in planta</i> und biologischer Funktion von Cryptochromen .....	106
5.3.3	Weitere Effekte der Überexpression von BIC1 in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	112
5.4	Blaulicht-Effekt auf transkriptioneller Ebene .....	115
5.4.1	Transformation von HA-BIC1 in <i>cry1/cry2</i> Doppel- <i>Knockout</i> -Mutante.....	115
5.4.2	Biologische Replikate zeigen hohe Varianz.....	117
5.5	<i>Photobodies</i> von Cryptochrom 1 und Inhibierung durch BIC1 .....	122
5.5.1	Intrazelluläre Lokalisation von Cryptochrom 1 und 2 .....	122
5.5.2	<i>cry1</i> bildet <i>photobodies</i> unter starken Lichtbedingungen .....	124
5.5.3	Einfluss der Position des GFP-tags im <i>cry1</i> -GFP Konstrukt.....	127
5.5.4	BIC1 <sup>WT</sup> und BIC1 <sup>3CA</sup> inhibieren die Entstehung der <i>cry1 photobodies</i> .....	128
5.5.5	Die hyperaktive Mutante <i>cry1</i> <sup>L407F</sup> bildet keine <i>photobodies</i> .....	130
5.5.6	Die hyperaktive Mutante <i>cry1</i> <sup>L407F</sup> ist unter starkem Blaulicht ähnlich stabil wie WT <i>cry1</i> .....	131
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>134</b>
6.1	BIC1 zeigt spezifische Häm-Bindung ohne spezifische Peroxidaseaktivität.....	134
6.1.1	Die BIC1 <sup>3CA</sup> Mutante zeigt keine spezifische Häm-Bindung .....	134
6.1.2	BIC1 zeigt keine enzymatische Peroxidaseaktivität .....	139
6.2	BIC1 inhibiert Cryptochrom Funktionen .....	143
6.2.1	Etablierung von <i>A. thaliana</i> BIC1 <sup>WT</sup> und BIC1 <sup>3CA</sup> Überexpressions-Linien....	143
6.2.2	BIC1 Überexpression hemmt die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums durch <i>cry1</i> .....	144
6.2.3	BIC1 Überexpression hemmt die Blaulicht-abhängige Blühinduktion.....	146
6.2.4	BIC1-Überexpression initiiert Blaulicht-abhängige SAR durch partielle <i>cry</i> Inhibierung .....	147
6.2.5	Partielle Inhibierung von <i>cry</i> durch BIC1 sorgt für <i>cry</i> -Dosiseffekte.....	149
6.3	Mögliche Modifikationen von BIC1 durch Cryptochrome .....	151

6.4	Blaulicht-abhängige, aber Cryptochrom-unabhängige Transkriptom-Veränderungen	154
6.5	Cryptochrom 1 bildet <i>photobodies</i> unter starkem Blaulicht .....	156
6.5.1	Die Bildung von <i>cry1 photobodies</i> ist Abhängig von der Positionierung des fusionierten GFP .....	156
6.5.2	<i>cry1 photobodies</i> im Zellkern und Cytoplasma .....	157
6.5.3	BIC1 unterdrückt die Entstehung von <i>cry1 photobodies</i> .....	160
6.5.4	Hyperaktive Mutante <i>cry1<sup>L407F</sup></i> bildet keine <i>photobodies</i> .....	160
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>163</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>191</b>
8.1	Aminosäuresequenzen und DNA-Sequenzen verwendeter Konstrukte.....	191
8.2	Anhang Abbildungen .....	198

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Abb.	Abbildung
BIC	<i>Blue-light Inhibitor of Cryptochromes</i>
BZR1	<i>Brassinazole-resistant 1</i>
C	Celsius
CCE	C-terminale Extension
cDNA	komplementäre DNA
CIB1	<i>Cryptochrome-interacting basic helix-loop-helix 1</i>
CID	<i>Cryptochrom-interagierende Domäne</i>
Cm	Chloramphenicol
CO	CONSTANS
Col	Columbia
COP	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC
CPF	Cryptochrom/Photolyase Superfamilie
cry	Cryptochrom
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cul	Cullin
d	Tage
DEG	unterschiedlich exprimierte Gene
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>F/L</i>	<i>Frame- und Line-Averages</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FC	<i>Fold Change</i>
F-Generation	Tochtergeneration
<i>FT</i>	<i>Flowering Locus T</i>
Fur	Regulatorprotein für Eisenaufnahme
g	Erdbeschleunigung, Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GUS	Beta-Glucuronidase
h	Stunde
HA	Teil-Peptidsequenz Influenza-Hämagglutininprotein
HRP	Meerrettichperoxidase
HY5	LONG HYPOCOTYL 5
Hz	Hertz
IDR	Intrinsisch ungeordnete Region
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
KLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
L	Liter
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
Ler	<i>Landsberg erecta</i>
LLPS	<i>liquid-liquid-phase-separation</i>
m	Meter
M	Molar
mA	Milliampere

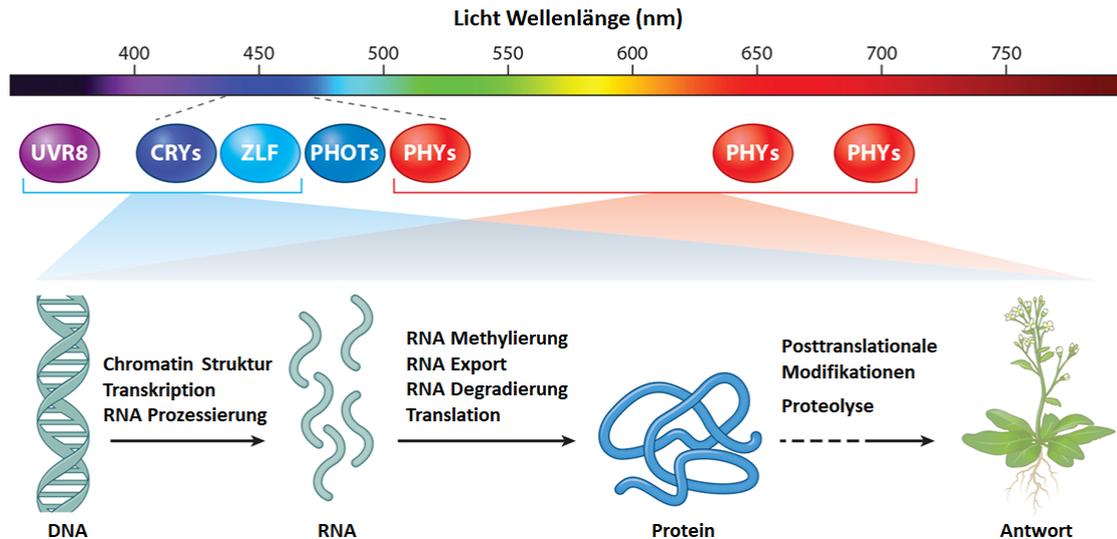
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter, Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger-RNA
MTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolat
n	Größe der Stichprobe
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
NES	Kern-Exportsequenz
ng	Nanogramm
NLS	Kern-Lokalisationssequenz
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ns	nicht signifikant
nt	nicht transformiert
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ox	Überexpression, oxidiert
P	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHR	<i>photolyase homology region</i>
phy	Phytochrom
PIF	<i>phytochrome interacting factor</i>
PPK	photoregulatorische-Protein-Kinasen
PUBQ10	Promotor Ubiquitin-10
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RFU	Relative Fluoreszenz Einheit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukleasen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	Schattenvermeidungsreaktion
SPA	SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME
Spec	Spectinomycin
SV	Säulenvolumen
T-DNA	Transferierte DNA
Trp	Tryptophan
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolettstrahlung
v	Volumen
V	Volt
VIS	<i>visible</i>
WT	Wildtyp
$\alpha$	gegen
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ mol	Mikromol

# 1 Einleitung

## 1.1 Pflanzliche Photorezeptoren und die Wahrnehmung von Licht

Die Erde empfängt eine Energie von 1361 Joule pro Quadratmeter pro Sekunde von der Sonne (Kopp und Lean, 2011). Ein Teil dieser Energie wird von phototrophen Organismen wie Cyanobakterien, Algen und Pflanzen verwendet, um aus CO<sub>2</sub> und Wasser, Sauerstoff und Zucker herzustellen. Dieser Mechanismus ist als oxygene Photosynthese bekannt und ermöglicht erst das Leben von aeroben Organismen, einschließlich des Menschen (Whitmarsh und Govindjee, 1999). Ein Teil der elektromagnetischen Strahlung, die wir mit unseren Augen als sichtbares Licht wahrnehmen, kann jedoch nicht nur als Energielieferant für phototrophe Organismen dienen, sondern auch als Information über die Umwelt für diese und fast alle anderen weiteren Organismen. Die Fähigkeit, Informationen über die Umwelt aus Licht zu gewinnen, wird durch sogenannte Photorezeptoren ermöglicht. Photorezeptoren regulieren eine Vielzahl an biologischen Prozessen, wie z. B. die Photomorphogenese, Phototropismus, Blühverhalten, Detektion von Nachbarpflanzen und Steuerung der Inneren Uhr bei Pflanzen (Lin, 2000).

Höhere Pflanzen verfügen über Photorezeptoren mit unterschiedlichen Absorptionsspektren. Diese Photorezeptoren ermöglichen es den Pflanzen, die spektrale Zusammensetzung, Intensität, Richtung und Dauer des Tageslichts effizient zu erkennen und sich entsprechend anzupassen. Die verschiedenen Photorezeptorklassen umfassen dabei den UV-B Rezeptor *UV RESISTANCE LOCUS 8* (UVR8) (Heijde und Ulm, 2012), verschiedene Phytochrome (phy), die im Rot- und Dunkelrotlicht agieren (Quail, 2010), die UV-A und Blaulichtrezeptoren, Phototropine (PHOT) (Christie, 2007), *Light Oxygen Voltage* (LOV) -Domäne/F-Box Proteine (Zeitlupe Familie, ZTL; *Flavin-binding Kelch repeat, F box*, FKF1; *LOV Kelch Protein 2*, LKP2) (Ito *et al.*, 2012), sowie Cryptochrome (cry) (Wang und Lin, 2020b) (**Abb. 1**).



**Abb. 1: Photorezeptoren Höherer Pflanzen und Prozesse, die sie steuern.** Gezeigt sind Photorezeptoren in ihren jeweiligen Wirkungs- und Absorptionsbereichen. Der im UV-B und Blaulicht agierende Rezeptor UVR8, im UV-A und Blaulicht agierende Cryptochrome (cry), PHOTs und LOV-Domäne/F-Box Proteine ZTL/FKF1/LKP2, dargestellt durch ZLF. Im Rot- und Dunkelrotlicht agierende Phytochrome (phy). Modifiziert nach Wang und Lin 2020b.

Die Pflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) gehört zur Familie der Kreuzblütler (*Brassicaceae*) und ist für die Photobiologie der Pflanzen der bedeutsamste Modellorganismus. *A. thaliana* bietet zahlreiche Vorteile für die Forschung, da ihr Lebenszyklus von der Keimung bis zur Samenreife nur ca. 6 Wochen beträgt, die Pflanze sehr klein und handhabbar in den meisten Laboratorien ist und die Fähigkeit zur Selbstbefruchtung besitzt, während auch Protokolle für Kreuzungen etabliert sind (Meinke *et al.*, 1998). Die Pflanze ist auch aufgrund ihres kleinen Genoms, welches ca. 25.000 Gene enthält und im Jahr 2000 vollständig sequenziert wurde (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) und der Zugänglichkeit für verschiedene genetische Ansätze einschließlich CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Miki *et al.*, 2018) ein ideales Modellsystem. Durch die Generierung von *A. thaliana* Mutationslinien durch das Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens*, sowie Sammlungen von T-DNA-Insertionsmutanten-Linien und deren Analyse wurden an dieser Modellpflanze wichtige Entdeckungen von grundlegenden Prozessen auch im Bereich der Photobiologie gemacht, einschließlich der Entdeckung aller Photorezeptoren von Höheren Pflanzen, wie oben beschrieben (Clough und Bent, 1998; Krysan *et al.*, 2002).

### 1.1.1 Rotlichtrezeptoren

Die Rot- und Dunkelrotlicht Photorezeptoren in *Arabidopsis thaliana* sind die Phytochrome A-E (Butler *et al.*, 1959; Clack *et al.*, 1994). Allgemein gesprochen haben Phytochrome zwei strukturell wichtige Domänen, die N-terminale Sensordomäne und die C-terminale Effektordomäne. Über die Effektordomäne wird die Dimerisierung, sowie die Signaltransduktion vermittelt (Quail, 1997; Qiu *et al.*, 2017). Die C-terminale Domäne besteht wiederum aus Subdomänen, den Per-Arndt-Sim (PAS) -Domänen und einer *Histidine Kinase-related* (HisK-like) -Domäne. Letztere ist verwandt mit Histidin Kinasen, wie man sie auch in cyanobakteriellen Phytochromen noch funktional findet (Yeh *et al.*, 1997; Yeh und Lagarias, 1998). Die Photochemie wird durch einen Bilin Chromophor und dessen Proteinumgebung in der hoch konservierten, N-terminalen, photosensorischen Kernregion ermöglicht. Diese Kernregion besteht aus PAS, cGMP-Phosphodiesterase/adenyl Cyclase/Fh1A (GAF) und Phytochrom (PHY) -Domänen (Wagner *et al.*, 2005). Die durch Rotlicht ausgelöste Konformationsänderung des Chromophors entsteht durch eine *Z-E*-Isomerisierung einer Doppelbindung zwischen C15 und C16 (Kneip *et al.*, 1999). Phytochrome liegen entweder in einem Rotlicht-absorbierenden (Pr) Zustand oder dem biologisch aktiven, Dunkelrotlicht-absorbierenden (Pfr) Zustand vor. Dabei konvertiert die Pr-Form nach Absorption von Rotlicht in die Pfr-Form und *vice versa*. Die Rückreaktion kann zusätzlich über eine thermische Rückreaktion, der Dunkel-Reversion, über eine längere Inkubation in Dunkelheit ablaufen, bei der die instabilere Pfr-Konformation zu Pr reuert (Borthwick *et al.*, 1952; Kunkel *et al.*, 1995). Die Signal-Antwort von pflanzlichen Phytochromen ist komplexer als bei Prokaryoten und beinhaltet einen Rotlicht-gesteuerten Transport in den Zellkern, Bildung von *nuclear bodies* und Regulation von Transkriptionsfaktoren (Van Buskirk *et al.*, 2014). Vereinfacht lassen sich die Phytochrom-Antworten durch verschiedene Arbeitsweisen unter bestimmten Fluenzraten unterscheiden. In *A. thaliana* steuern bei niedrigen Fluenzraten (LFR) die lichtstabilen phyB-E die Lichtantworten. Nach Anregung und Kernimport interagiert bspw. die Pfr-Form von phyB mit dem Transkriptionsfaktor *phytochrome interacting factors 3* (PIF3) und sorgt letztendlich für eine Änderung der Genexpression (Ni *et al.*, 1999). Zudem werden PIFs durch Pfr dem Abbau zugeführt (Legris *et al.*, 2019). Die Signalübertragung wird durch Protein-Protein Interaktion gewährleistet. Für eine Phytochrom-Antwort unter sehr niedrigen Fluenzraten (VLFR) und hohen Fluenzraten im Dunkelrotlicht (HIR) akkumuliert das lichtlabile phyA (*A. thaliana*) durch die Proteine *Far-red elongated Hypocotyl 1* (FHY) und *FHY1 Like* (FHL) nach Lichtaktivierung im Zellkern (Genoud *et al.* 2008). Im Gegensatz zu

phyB, welches primär im Rotlicht agiert, steuert somit phyA die Deetiolerung im Dauer-Dunkelrotlicht (Parks und Quail, 1993). Neben der direkten Interaktion mit Transkriptionsfaktoren fungieren Phytochrome ebenso wie Cryptochrome als Repressoren von weitem negativen Komponenten der Photomorphogenese. Hierbei inaktivieren Phytochrome und Cryptochrome den CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)/ SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME A-105 (SPAs) E3 Ubiquitin Ligase Komplex durch lichtgetriebene Interaktion und ermöglichen die Deetiolerung über Transkriptionsfaktoren wie LONG HYPOCOTYL5 (HY5) und LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED 1 (HFR1), welche ansonsten im Dunkeln durch COP1/SPA polyubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zugeführt würden (Su *et al.*, 2017). Zusammenfassend regulieren Phytochrome eine Vielzahl an Prozessen, wie der Samenkeimung (Shinomura, 1997), Blühinduktion (Halliday *et al.*, 2003) und der Schattenvermeidungsreaktion (*shade-avoidance response*, SAR), eine Anpassungsreaktion um in dichter Vegetation aus dem Schatten anderer Pflanzen heraus ans Licht zu wachsen (Franklin und Whitelam, 2005).

## **1.1.2 UV- und Blaulichtrezeptoren**

### **1.1.2.1 Phototropine**

Zur Wahrnehmung von Licht in den blauen und ultravioletten Bereichen des Spektrums spielen unter anderem Phototropine (PHOT) eine wichtige Rolle. Die in *A. thaliana* vorhandenen PHOT1 und PHOT2 regulieren den lichtinduzierten Phototropismus, das Wachstum hin (positiver Phototropismus) oder weg (negativer Phototropismus) vom Licht (Liscum und Briggs, 1995; Briggs und Christie, 2002). Phototropine binden über die LOV-Domänen den Chromophor Flavinmononukleotid (FMN). Dieser sorgt nach Absorption für eine Konformationsänderung im Apoprotein, sodass eine Signaltransduktionskaskade gestartet wird, angefangen mit lichtinduzierter Autophosphorylierung (Christie *et al.*, 1998; Sullivan *et al.*, 2008). Im Dunklen ist FMN nicht kovalent gebunden, während im Licht eine Cysteinylation auftritt (Salomon *et al.*, 2000). Einige der wichtigsten durch Phototropine ausgelösten Reaktionen sind neben dem Phototropismus die Regulation des Wachstums von Pflanzenzellen (Takemiya *et al.*, 2005), der Chloroplastenbewegung (Sullivan *et al.*, 2008) und der Öffnung der Stomata und der damit verbundenen Regulation des Gasaustausches (Talbot *et al.*, 2006).

### 1.1.2.2 Zeitlupe-Familie

Auch die Blaulichtrezeptoren der Zeitlupe-Familie zeichnen sich durch eine LOV-Domäne mit gebundenem FMN als Chromophor aus. Zusätzlich charakteristisch für die ZTL/FKF1/LKP2 Proteine sind die namensgebenden F-Box und Kelch-Domänen (Nelson *et al.*, 2000; Imaizumi *et al.*, 2003). Proteine dieser Familie regulieren maßgeblich die circadiane Uhr und photoperiodisches Blühverhalten (Kim *et al.*, 2007). Teilweise sind die Wirkungsmechanismen dieser Photorezeptoren noch nicht im Detail verstanden, jedoch konnte beispielsweise gezeigt werden, dass rhythmische Expression von ZTL für die Kontrolle des Proteasom-abhängigen Abbaus des Uhr-Proteins *Timing of CAB Expression1* (TOC1) notwendig ist. Folglich wird die circadiane Uhr und einhergehende circadiane Veränderungen der Genexpression durch Regulation der Stabilität von TOC1 durch eine Protein-Protein Interaktion mit ZTL gewährleistet (Más *et al.*, 2003). FKF1 sorgt für lichtgetriebenen Abbau von *Cycling DOF Factor 1* (CDF1), dem Repressor für CONSTANS (CO) und sorgt somit für dessen Stabilisierung und für eine Blühinduktion (Imaizumi *et al.*, 2005). Eine andere Art der Regulation des photoperiodischen Wegs erfolgt auf Ebene der Transkription durch *Cryptochrome-interacting basic helix-loop-helix 1* (CIB1). Dieser Transkriptionsfaktor interagiert Licht-abhängig mit cry2. Zusätzlich wird der Abbau von CIBs durch ZTL nach dessen Photoaktivierung unterdrückt (Liu *et al.*, 2013).

### 1.1.2.3 Ultraviolett-B Rezeptor

Der UVR8 Photorezeptor wurde erstmalig bei einem Screening nach UV-B hypersensitiven *Arabidopsis* Mutanten entdeckt (Kliebenstein *et al.*, 2002). Im inaktiven Zustand ist UVR8 ein Homodimer, das nach UV-B Absorption monomerisiert. Die Absorption erfolgt hierbei nicht, wie bei anderen Photorezeptoren üblich, über einen zusätzlichen Chromophor, sondern über intrinsische Tryptophane (Rizzini *et al.*, 2011). Die aktiven UVR8 Monomere akkumulieren im Zellkern und interagieren dort unter anderem mit der E3 Ubiquitin Ligase COP1 (Kaiserli und Jenkins, 2007; Favory *et al.*, 2009). COP1 ist ein multifunktionales Protein in der Signaltransduktionskette vieler Photorezeptoren und fungiert als Repressor in der Photomorphogenese (Yi und Deng, 2005). Durch die Interaktion von UVR8 und COP1 wird der Transkriptionsfaktor HY5 stabilisiert und UV-B responsive Gene werden aktiviert. Zu den UV-B-induzierten Genen zählen solche, die wichtig für UV-Schutz (Chalkon-Synthase,

Flavonol-Synthase) und Reparatur von DNA-Schäden (Photolyase) sind (Kliebenstein *et al.*, 2002; Britt, 2004; Oravecz *et al.*, 2006).

### 1.1.3 Cryptochrom/Photolyase Superfamilie (CPF)

Cryptochrome sind eine weitere Klasse an Blaulichtrezeptoren und sind zugehörig zu der CPF. Die Mitglieder der CPF lassen sich grob unterteilen in Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) Photolyasen, den (6-4)-Photoprodukt Photolyasen und in die der Cryptochrome (Tagua *et al.*, 2015). Photolyasen lassen sich anhand deren Substratspezifität der zu reparierenden DNA Schäden in die jeweiligen Klassen einteilen. Cryptochrome lassen sich zusätzlich in die Gruppen der Pflanzen-, Tier- und sogenannte *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *human* (DASH)-Cryptochrome unterteilen. Obwohl Cryptochrome von Pflanzen und Tieren strukturelle Ähnlichkeiten zu Photolyasen aufweisen, wirken diese ausschließlich als Photorezeptoren und sind nicht in der Lage, CPDs zu reparieren. Stattdessen haben sie eine Funktion als Photorezeptoren, die bei der Steuerung der circadianen Uhr oder bei pflanzlichen Entwicklungsprozessen wie der Deetiolierung oder der Blühinduktion eine wichtige Rolle spielen (Sancar, 2003; Chaves *et al.*, 2011). Eine gewisse Ausnahme machen Cryptochrome der Säugetiere, die Bestandteil der Inneren Uhr sind und vermutlich nicht als Photorezeptoren fungieren (Michael *et al.*, 2017). Strukturell weisen alle CPF-Mitglieder eine konservierte *photolyase homology region* (PHR-Domäne) auf (Brudler *et al.*, 2003). An dieser binden sie den Kofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) (Lin *et al.*, 1995; Malhotra *et al.*, 1995). Zusätzlich besitzen viele Cryptochrome eine meist stark variable und flexible C-terminale Extension (CCE), die wie die PHR-Domäne für die Signalübertragungen essentiell ist (Yang *et al.*, 2000; Kennedy *et al.* 2010; Zuo *et al.* 2011).

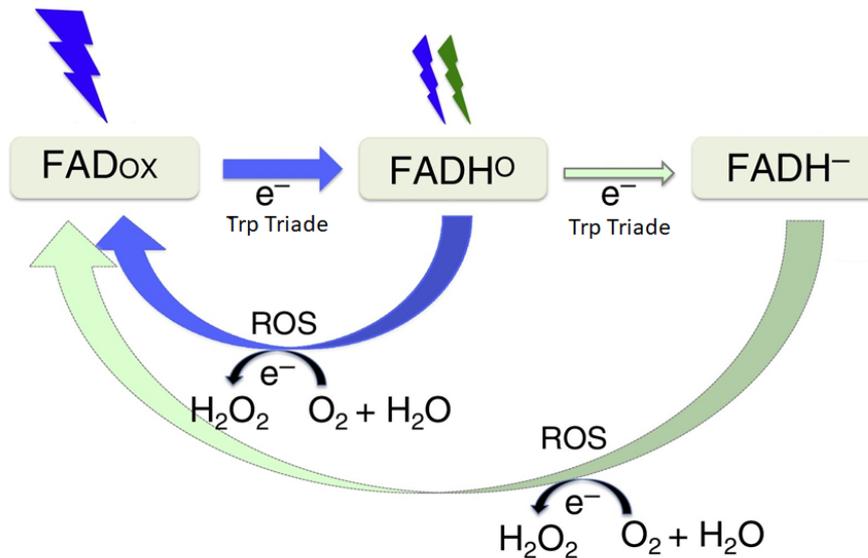
Im Vergleich zu anderen Cryptochromen fungieren DASH-Cryptochrome, hauptsächlich als DNA-Reparaturenzyme (Brudler *et al.*, 2003; Selby und Sancar, 2006; Pokorny *et al.*, 2008). Neben einem cry-DASH (cry3), mit DNA-Reparatur Funktion von CPDs in einzelsträngiger- oder *loop*-DNA (Pokorny *et al.*, 2008), gibt es in *A. thaliana* zwei weitere typische Pflanzen-Cryptochrome, cry1 und cry2. Trotz hoher Identität ihrer Aminosäuresequenz von 47% (Ähnlichkeit 63%) unterscheiden sich beide Cryptochrome in ihrer Funktion und auch Stabilität nach Anregung durch Licht. In *A. thaliana* werden über 1000 Gene durch Cryptochrome reguliert (Ma *et al.*, 2001). Dies spiegelt die immense Wichtigkeit von Cryptochromen in der Entwicklung der Pflanze wider.

## 1.2 FAD-Bindung durch Cryptochrome und ihre Rolle in der Photochemie

Auch *A. thaliana* Cryptochrome binden wie alle Mitglieder der CPF nicht-kovalent einen photochemisch aktiven Flavin-Kofaktor (FAD) in ihrer konservierten PHR-Domäne (Lin *et al.*, 1995; Banerjee *et al.*, 2007; Bouly *et al.*, 2007). Das Flavin absorbiert dabei, je nach Redoxzustand, in einem Bereich von 300-500 nm (Schwinn *et al.*, 2020) und wird nachfolgend reduziert. Diese Photoreduktion des Flavin-Kofaktors ist der initiale Schritt in der Photoaktivierung von Cryptochromen und ihrer biologischen Aktivität (Wang *et al.*, 2015a). Die Photoreduktion konnte anhand unterschiedlicher Absorptionsspektren der FAD Redoxzustände via UV/VIS-Spektroskopie nachvollzogen werden (Banerjee *et al.*, 2007).

Für die Erweiterung des Absorptionsspektrum binden viele CPF-Mitglieder ein zusätzlichen Antennenchromophor. Dieser kann, je nach Organismus und Protein, zum Beispiel ein Folat wie MTHF (5,10-Methenyltetrahydrofolat) oder ein Deazaflavin (8-HDF) sein (Eker *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1988). Die absorbierte Energie von MTHF wird durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auf das benachbarte FAD übertragen und sorgt somit für effizientere Photoreduktion von FAD (Payne und Sancar, 1990; Brazard *et al.*, 2012). Weder für cry1 noch für cry2 gibt es eindeutigen Evidenzen für eine Anwesenheit eines Antennenchromophors. Folat-Bindung von cry2 wurde aber postuliert, weil das Aktionsspektrum von Licht-abhängiger Degradation ein Maximum bei 380 nm besitzt, ähnlich dem eines Folats (Hoang *et al.*, 2008). Andererseits konnte in der Kristallstruktur von cry1-PHR kein MTHF nachgewiesen werden (Brautigam *et al.*, 2004). Auch bei neueren Strukturen wie von der PHR-Domäne von cry2 wird aufgrund einer strukturellen Helix, die in die potentielle Bindungstasche des zweiten Kofaktors hineinragt und den Eingang zu dieser blockiert, davon ausgegangen, dass cry2 keinen Antennenchromophor bindet (Ma *et al.*, 2020b).

Nach Absorption von Blaulicht von pflanzlichen Cryptochromen wird FAD von seiner vollständig oxidierten Form FADox zu FADH<sup>o</sup> und in geringem Umfang zum vollreduzierten FADH<sup>-</sup> reduziert (**Abb. 2**). Dieser Mechanismus scheint in pflanzlichen Cryptochromen universell zu sein (Ahmad *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2007; Bouly *et al.*, 2007).



**Abb. 2: Photoreduktion von FAD in *Arabidopsis* Cryptochromen.** Der Kofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) liegt bei Cryptochromen in drei Zuständen vor. Im Dunkeln liegt das Flavin im oxidierten Redoxzustand vor und die Cryptochrome sind inaktiv. Nach Blaulichtbestrahlung (Maximum bei 450 nm) wird FAD<sub>ox</sub> zu FADH<sup>°</sup> durch Elektronentransfer über die Tryptophan Triade photoreduziert. Eine dadurch ausgelöste Konformationsänderung der Cryptochrome sorgt für eine Entfaltung des C-Terminus, welcher die Zugänglichkeit für Signalpartner begünstigt. Cryptochrome sind in diesem Zustand biologisch aktiv. Weitere Bestrahlung von FADH<sup>°</sup> mit Blau- oder Grünlicht verursacht eine weitere Reduzierung zu der (wie FAD<sub>ox</sub> ebenfalls inaktiven) Form FADH<sup>-</sup>. Diese weitere Photoreduktion ist weniger effizient. Bei der Re-Oxidierung von FADH<sup>°</sup> oder FADH<sup>-</sup> zu FAD<sub>ox</sub> wird ein Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen und es entstehen ROS, wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dieser Vorgang ist somit nur unter aeroben Bedingungen möglich. Die Photoreduktion ist somit reversibel. Modifiziert nach Ahmad 2016.

Die in Proteinen der CPF-Familie konservierte Tryptophan-Triade (teilweise auch Tyrosine), besonders bei bakteriellen Photolyasen erforscht, bestehend aus drei hochkonservierten Tryptophanen, ermöglicht einen Elektronentransport von der Oberfläche des Proteins bis zum FAD im Inneren (Brettel *et al.*, 2000; Giovani *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2018). Hierbei wird das FAD\* nach Absorption von Blaulicht durch das proximale Trp reduziert und erhält ein Proton von einem zu N5 des Isoalloxazinrings nahe gelegenen Asp (Asp396 in cry1) (Kottke *et al.*, 2006; Hense *et al.*, 2015;). Aufgrund des entstandenen Elektronenlochs erfolgt im Anschluss ein Elektronentransport innerhalb der Trp-Triade, bis letztendlich das an der Oberfläche exponierte Tryptophan als Kation-Radikal vorliegt, deprotoniert wird und somit FADH<sup>°</sup> stabilisiert wird (Brettel *et al.*, 2000; Kottke *et al.*, 2006). Für pflanzliche Cryptochromen wird FADH<sup>°</sup> als biologisch aktiver Zustand gesehen (Banerjee *et al.*, 2007; Bouly *et al.*, 2007). Das exponierte Tryptophan wird letztendlich durch ein externes Reduktionsmittel reduziert (Li *et al.*, 1991; Immeln *et al.*, 2012).

Eine weitere Reduktion von FADH<sup>o</sup> zu dem vollreduzierten FADH<sup>-</sup> ist bei Photolyasen der notwendige Zustand zur Reparatur von DNA-Schäden (Sancar, 2003). Bei Cryptochromen hingegen konnte beobachtet werden, dass der vollreduzierte Zustand durch weitere Bestrahlung von Blau- und Grünlicht erzeugt werden kann (Banerjee *et al.*, 2007; Bouly *et al.*, 2007). *In planta* konnte eine antagonistische Wirkung von Grünlicht auf die Aktivität von Cryptochromen gezeigt werden. Beispielsweise waren bei einem Prozess der Deetiolerung (Inhibierung des Hypokotylstreckungswachstums im Licht) die Hypokotyllängen von *A. thaliana* Keimlingen unter gleichzeitiger Blau- und Grünlicht-Bestrahlung länger als unter monochromatischem Blaulicht. Diese teilweise Inaktivierung von Cryptochromen könnte eine mögliche Anpassung sein, um Grünlicht von benachbarten Pflanzen zu detektieren und somit eine Schattenvermeidungsreaktion zu initiieren (Bouly *et al.*, 2007).

*In vitro* ist die Trp-Triade essentiell für die Photoreduktion von Cryptochromen. Ob eine intakte Trp-Triade auch für die biologische Aktivität der Cryptochrome erforderlich ist, wurde in Zweifel gezogen durch die Analyse von Pflanzen, die Trp-Triade Mutanten exprimierten (Gao *et al.*, 2015). So zeigen die Mutanten *cry2*<sup>W321A</sup> oder *cry1*<sup>W324A</sup> noch eine geringe biologische Aktivität, beobachtet für Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums (Li *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2015). Somit zeigt sich, dass immer noch eine Blaulicht-induzierte Antwort, trotz Mutationen innerhalb der Trp-Triade möglich ist und dies, obwohl die Photoreduktion *in vitro* stark verlangsamt ist oder sogar ausbleibt. Einige *cry2* Trp-Mutanten, die *in vitro* verminderte Photoreduktion aufweisen, zeigten verstärkte Photoreduktion nach Bindung von ATP und ATP-Analoga (Engelhard *et al.*, 2014). ATP beschleunigte nicht nur die Photoreduktion von *cry2*, sondern hatte, basierend auf Proteolyse-Assays, auch Einfluss auf die Struktur von *cry2*. Bei einer Mutante, die unfähig ist ATP zu binden (*cry2*<sup>Y399A</sup>) beobachtete man verringerte biologische Aktivität (Eckel *et al.*, 2018). Die Bindung von ATP durch *cry1* war bereits zuvor im Kontext einer möglichen Kinaseaktivität von *cry1* beschrieben worden (Bouly *et al.*, 2003). Zusammengefasst deuten diese Befunde darauf hin, dass die Bindung von ATP für die Funktion der Cryptochrome nicht essentiell ist, aber deren Photoreduktion beschleunigt, möglicherweise durch „Öffnung“ von alternativen Elektronentransferwegen.

### 1.3 ROS, deren Bildung, Entgiftung und Funktion als Signalmoleküle

Der Vorgang der Photoreduktion ist reversibel und eine sogenannte Re-Oxidation zurück zu FADox läuft in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff ab und sorgt für eine Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (**Abb. 2**), wie z.B. Wasserstoffperoxid, mit noch weitestgehend unbekannter physiologischer Wirkung (Müller und Ahmad, 2011; Consentino *et al.*, 2015; Van Wilderen *et al.*, 2015).

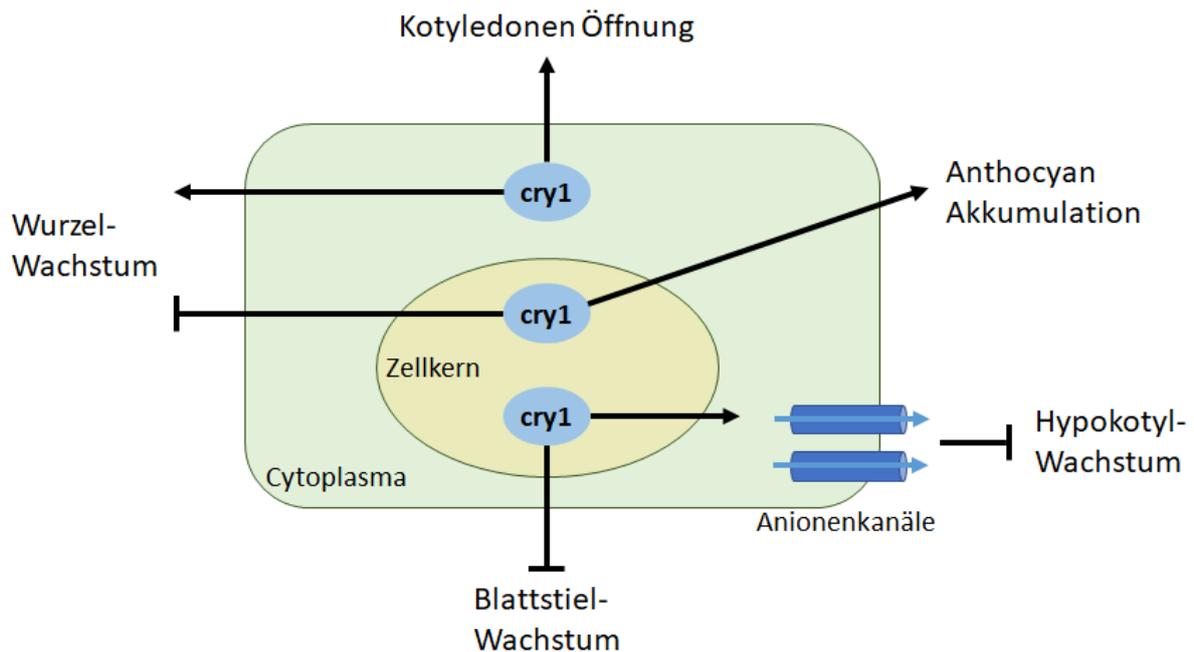
Nach Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff entsteht Superoxid ( $O_2^{\circ-}$ ), welches in Anwesenheit von Wasser weiter zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reagieren kann (Winterbourn, 2008). In Pflanzen entstehen ROS vor allem als Nebenprodukte der Atmungskette und Photosynthese (Huang *et al.*, 2016; Foyer und Hanke, 2022). In hohen Konzentrationen wirken ROS toxisch, da sie alle Biomoleküle oxidieren und somit auch den Zelltod auslösen können (Allen, 1995; Girotti, 2001; Apel und Hirt, 2004). Superoxiddismutasen, Katalasen oder Peroxidasen wandeln enzymatisch ROS in ungiftige Moleküle um. Hierbei reduzieren Peroxidasen Peroxide (auch Wasserstoffperoxid) unter Verwendung eines Substrates bzw. Elektronendonors, wie z.B. Ascorbat, zu Wasser und oxidieren das Substrat (Grodén und Beck, 1979). Katalasen hingegen katalysieren die Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff (Vidossich *et al.*, 2012). Der Elektronendonator, oder auch das Substrat einer Peroxidase, ist meist Enzym-spezifisch. So weisen Ascorbat-Peroxidasen eine hohe Spezifität zu Ascorbat auf, wohingegen die Meerrettichperoxidase weniger spezifisch zu einem Substrat bzw. Reduktionsmittel ist (Candeias *et al.*, 1997). In Häm-haltigen Peroxidasen, wie der gut untersuchten Meerrettichperoxidase, wird der Transfer von zwei Elektronen eines Substrates auf Peroxide katalysiert, sodass Wasser und ein oxidiertes Substrat entstehen. Das Häm als Kofaktor nimmt dabei eine höhere Oxidationsstufe ein und ermöglicht so den Elektronentransfer und die Spaltung von Wasserstoffperoxid (Rodríguez-López *et al.*, 2001). Das Häm kann unterschiedlich an das Enzym gebunden sein. Am häufigsten ist Häm *b* nicht kovalent gebunden, oder Häm *c* kovalent über Cysteine an das Protein gebunden. Es wird vermutet, dass unterschiedliche Verknüpfungen des Häm-Kofaktors mit dem Protein einen veränderten Einfluss auf die Reduktion von Häm haben könnten (Bowman und Bren, 2008; Poulos, 2014). Neben der o.g. kovalenten Bindung von Häm über Cysteine sind auch solche Bindungen über Histidin beschrieben, wenn auch seltener vorkommend (Nothnagel *et al.*, 2011).

ROS können (in niedrigen Konzentrationen) auch als Signalmoleküle fungieren (Desikan *et al.*, 2000; Apel und Hirt 2004; Torres *et al.*, 2006). Durch spezifische Oxidation von Cysteinen oder Methioninen können Proteine aktiviert oder gehemmt werden. (Forman *et al.*, 2010). So sorgt die Entstehung von ROS während oxidativem Stress generell dafür, dass sich die Pflanze an ihre Umwelt anpasst, z.B. indem durch genetische und epigenetische Änderungen spezifische Pflanzenentwicklungen in Gang gesetzt werden (Huang *et al.*, 2019). Ein prominentes Beispiel der Signal- und Abwehrfunktion von ROS ist die Abwehr von Pflanzenpathogenen. Bei einem sogenannten oxidativen *burst* werden ROS gebildet, die beispielsweise angreifende Pathogene schädigen (Keppler *et al.*, 1989) oder auch für eine Verstärkung von Zellwänden sorgen können (Bradley *et al.*, 1992; Lamb und Dixon, 1997).

#### 1.4 Cryptochrom 1 und Cryptochrom 2 in *A. thaliana* und deren Wirkungsweisen

Ein zu *CRY1* von *Arabidopsis* homologes Gen wurde erstmalig in *Sinapis alba* gefunden (Batschauer, 1993). Zuvor wurde dieses Gen von *Arabidopsis* als *HY4*-Gen bezeichnet, weil dessen Mutante (*hy4*) bei der Deetiolierung wenig auf Blaulicht reagiert (Koornneef *et al.*, 1980; Ahmad und Cashmore, 1993).

Die Hauptfunktion von *cry1* ist die Regulation der Deetiolierung im Blaulicht. *cry1* ist unter moderaten Blaulicht Intensitäten stabil und wird nur unter sehr hohen Fluenzraten (100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) degradiert (Miao *et al.*, 2022). Somit ist *cry1* unter mittleren und hohen Fluenzraten biologisch aktiv. Die durch *cry1* regulierten Prozesse sind sehr vielseitig. Hierzu zählen die Inhibition des Hypokoyllängenwachstums und die Entfaltung der Kotyledonen (Sharma *et al.*, 2014). *cry1* ist sowohl im Cytoplasma, als auch im Zellkern lokalisiert und erfüllt je nach Lokalisation unterschiedliche Funktionen (**Abb. 3**; Wu und Spalding, 2007). Analysen von *cry1* Mutanten oder Konstrukten von *cry1* mit einer Kern-Lokalisationssequenz (NLS) bzw. Exportsequenz (NES) zeigten, dass cytoplasmatisches *cry1* die Öffnung der Keimblätter, sowie das Wurzelwachstum positiv beeinflusst. Im Zellkern lokalisiertes *cry1* hingegen inhibiert das Wurzel-, Hypokotyl- (über Aktivierung von Ionenkanälen und Depolarisierung der Membran) und Blattstiel-Wachstum. Zusätzlich sorgt es für die Bildung von Anthocyanen. Andere Studien zeigten, dass ausschließlich im Zellkern lokalisiertes *cry1* im Licht durch photoregulatorische-Protein-Kinasen 1 (PPK1) phosphoryliert und durch die E3 Ubiquitin Ligase Cul4<sup>COPI/SPAs</sup> ubiquitiniert und somit dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Liu *et al.*, 2022).



**Abb. 3: Die Lokalisation von cry1 entscheidet über dessen Blaulicht-induzierte Signaltransduktion.** Bei niedrigen Fluenzraten aktives, cytoplasmatisches cry1 fördert das Wurzel-Wachstum, sowie die Öffnung von Kotyledonen. Die hemmende Wirkung von nuklearen cry1 auf das Wurzel-, Blattstiel- und Hypokotyl-Wachstum wird überwiegend durch hohen Fluenzraten reguliert. Modifiziert nach Wu und Spalding, 2007.

Cryptochrom 2 wurde einige Jahre nach cry1 in *A. thaliana* entdeckt (Hoffman *et al.*, 1996). Im Vergleich zu cry1 ist cry2 ausschließlich im Zellkern lokalisiert, lichtlabil und wird bereits unter niedrigen Fluenzraten von Blaulicht (ab  $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) abgebaut (Lin *et al.* 1998; Kleiner *et al.* 1999). Hieraus lässt sich schließen, dass cry2 besonders unter niedrigen Fluenzraten aktiv ist. Trotz überschneidender biologischer Funktionen beider Cryptochrome in der Photomorphogenese, spielt cry2 eine wichtige und zentrale Rolle in der Steuerung des Blühverhaltens. Für cry2 wurde der spezifische Interaktionspartner CIB1 nachgewiesen. Nach lichtabhängiger, direkter Protein-Protein Interaktion bindet CIB1 bestimmte Promoter Sequenzen und stimuliert die Expression von *Flowering Locus T (FT)* (Liu *et al.*, 2008). Auch sorgt die stabilisierende Wirkung auf das CO-Protein durch die Inhibierung von COP1/SPAs durch Cryptochrome für eine Blühinduktion (Valverde *et al.*, 2004; Sarid-Krebs *et al.*, 2015). Nichtsdestotrotz zeigt die *cry1/cry2* Doppel-Mutante einen noch späteren Blühbeginn als die *cry2* Mutante, was auf einen zusätzlichen Einfluss von cry1 bei der Blühinduktion hinweist (Mockler *et al.*, 1999).

Damit konsistent ist der Umstand, dass die hyperaktive Mutante *cry1<sup>L407F</sup>* schnelleres Blühverhalten unter Langtag (14-16 h Licht) und Kurztag (8 h Licht) Bedingungen zeigt (Exner *et al.*, 2010). Die Mutante zeigt zusätzlich Hypersensitivität gegenüber Blaulicht in der

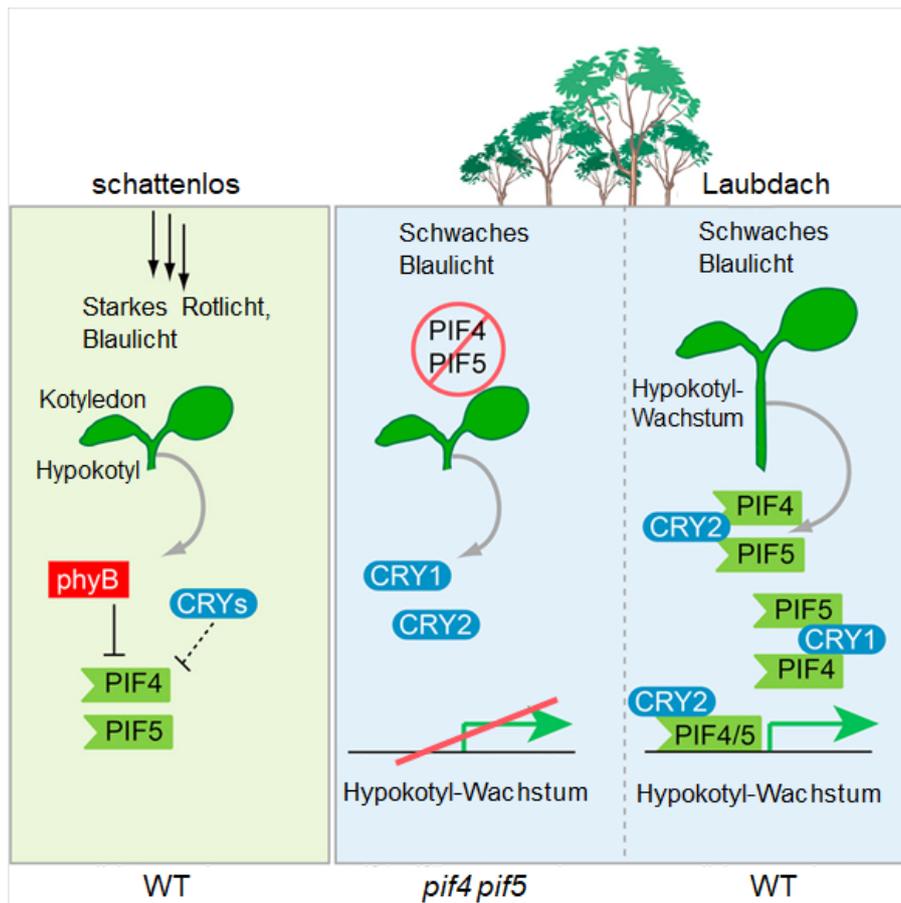
Inhibition des Hypokotylstreckungswachstums und einen sog. *cop*-Phänotyp, also auch im Dunkeln verkürzte Hypokotyle. Die molekularen Gründe für den beobachteten Phänotyp sind noch unbekannt, jedoch werden veränderte Photochemie vermutet (Orth *et al.*, 2017).

*cry1* und *cry2* haben eine Vielzahl von gemeinsamen Interaktionspartnern, die jedoch zu unterschiedlichen biologischen Antworten und letztendlich unterschiedlichen Genexpressionen führen können (Ohgishi *et al.*, 2004). Beide Cryptochrome binden Licht-abhängig COP1 und SPAs und hemmen hierdurch die Aktivität dieses E3 Ubiquitin Ligase Komplexes, was dazu führt, dass im Licht Transkriptionsfaktoren für die Photomorphogenese wie HY5 oder die Blütenbildung (CO), nicht mehr polyubiquitiniert und abgebaut werden (Fankhauser und Ulm, 2011; Ponnu und Hoecker, 2021). Allerdings unterscheidet sich die Art der Bindung der Cryptochromen an den COP1/SPA E3 Ubiquitin Ligase Komplex. SPA1 wird von *cry1* über die CCE gebunden, und die Interaktion von SPA1 mit COP1 wird dadurch inhibiert (Lian *et al.*, 2011). *cry2* bindet mit der PHR-Domäne an SPA1 und mit der CCE COP1. Diese *cry2*-SPA Interaktion verstärkt die Bindung von COP1 an *cry2* und bewirkt somit die Hemmung der Aktivität von COP1 (Zuo *et al.* 2011; Weidler *et al.* 2012). Obwohl die Sequenzen der CCE, von *cry1* und *cry2* sehr unterschiedlich in ihren Sequenzen sind, ist ein sog. Valin-Prolin (VP) Motiv konserviert, welches für die Bindung von COP1 essentiell ist (Lau *et al.*, 2019).

#### 1.4.1 Cryptochrom-vermittelte Schattenvermeidungsreaktion

Beide Cryptochrome spielen, wie Phytochrome auch, eine wichtige Rolle in der sogenannten Schattenvermeidungsreaktion (SAR). Mithilfe der SAR besitzen Pflanzen die Möglichkeit, durch andere Pflanzen erzeugten „Schatten“, der die Intensität des Blaulichts abschwächt, oder das Rot:Dunkelrot-Verhältnis reduziert, durch Cryptochrome bzw. durch Phytochrome wahrzunehmen und dieser Situation durch gesteigertes Wachstum des Sprosses oder der Petiolen zu entkommen (**Abb. 4**). Beide Lichtbedingungen führen zu ähnlichen regulatorischen Mechanismen (Franklin und Whitelam, 2005; Keller *et al.*, 2011; Keuskamp *et al.*, 2012). Die Detektion von einem niedrigen Rot:Dunkelrot-Verhältnis unter einem Laubdach wird primär durch *phyB* vermittelt. Unter vollem Licht interagieren die Pfr-Formen von *phyB* und auch von *phyA* mit PIFs, und inhibieren deren Aktivität direkt oder durch Phosphorylierung durch PPKs, was schlussendlich zu deren Abbau führt (Legris *et al.*, 2019). Unter Schwach-Lichtbedingungen sind die PIFs stabil und fördern die Expression von Genen, die für das Pflanzenwachstum wichtig sind (Franklin und Quail, 2010; Park *et al.*, 2018). PIF7

beispielweise bindet E-Box Sequenzen von *YUCCA* Genen, die wichtige Enzyme in der Auxin-Biosynthese codieren und somit eine SAR bedingen (Tao *et al.*, 2008). Unter schwachem Blaulicht interagieren cry1 und cry2 direkt mit PIF4 und PIF5, sodass Gene für das Hypokotyl-Wachstum aktiviert werden (Pedmale *et al.*, 2016). Die genauen molekularen Mechanismen der durch schwaches Blaulicht-getriebenen Schattenvermeidungsreaktion sind allerdings noch nicht vollständig verstanden.



**Abb. 4: Eine direkte Interaktion von Cryptochromen mit PIFs sorgt für Regulation von Pflanzenwachstum unter schwachem Blaulicht.** Unter schattenlosen, sonnigen Bedingungen werden PIFs direkt oder indirekt durch phyB und cry inhibiert und degradiert. Unter schwachem Blaulicht interagieren beide Cryptochrome mit PIF4 und PIF5, was in einer veränderten Genexpression resultiert und Hypokotyl-Wachstum fördert. Hierdurch wird eine Schattenvermeidungsreaktion hervorgerufen. In einer *pif4pif5* Mutante bleibt der Effekt aus. Modifiziert nach (Pedmale *et al.*, 2016).

### 1.4.2 Die Bildung von *photobodies* durch Cryptochrom 1 und 2

Obwohl die *A. thaliana* Cryptochrome 1 und 2 eine hohe strukturelle Ähnlichkeit und überschneidende Funktionen aufweisen, wurden die durch Blaulicht induzierte Bildung sogenannter *photobodies* (Protein-Ansammlung sichtbar durch cry-GFP Fusionsproteine) zunächst nur bei cry2 beobachtet (Yu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016). Die zunächst nur für cry2 beschriebene *photobody* Bildung könnte darin begründet sein, dass cry2 bereits bei niedrigen Fluenzraten von Blaulicht biologisch aktiv ist und ab einer Fluenzrate von 20  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  *photobodies* bildet (Lin *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2009).

In jüngster Zeit wurden auch *photobodies* von cry1 in *A. thaliana* Protoplasten und HEK293T Zellen (menschliche, embryonale Nierenzellen) beschrieben, welche erst bei Blaulicht Intensitäten von ca. 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  im Zellkern, nicht jedoch im Cytoplasma beobachtet wurden (Liu *et al.*, 2022). Diese Beobachtungen stützen die These, dass cry1 primär unter starkem Blaulicht biologisch aktiv ist.

Trotz intensiver Forschung an der Bildung von Cryptochrom *photobodies* sind deren biologische Bedeutung noch weitestgehend unverstanden. Generell sind *photobodies* morphologisch unterscheidbare, subnukleare Domänen, die Mikroumgebungen beispielsweise für die Regulation von Protein-Dynamiken, als auch der DNA-Reparatur bereitstellen (Shaw und Brown 2004; Banani *et al.*, 2017). Sogenannte Stress-Granula (SG) sind ebenfalls membranlose, transiente Kondensate, die hauptsächlich die Regulation von Stress koordinieren. Hierbei ist auffällig, dass sogenannte intrinsische, ungeordnete Regionen (*intrinsic disordered region*, IDR) und RNA-bindende Domänen vermehrt in Proteinen innerhalb solcher biomolekularen Kondensaten wie SG oder *photobodies* vorhanden sind (Brangwynne *et al.*, 2015; Banani *et al.*, 2017; Maruri-López *et al.*, 2021). Diese können durch ihre unstrukturierten Sequenz-Elemente schwach adhäsive, intermolekulare Wechselwirkungen eingehen. Ein Beispiel ist das Protein BuGZ aus *Xenopus*, wichtig für den Aufbau von Mikrotubuli, das nach Mutation in der IDR keine Phasen-Separation und *droplet*-Bildung mehr eingehen kann und einen verschlechterten Aufbau von Mikrotubuli zeigt (Jiang *et al.*, 2015).

Auch cry1 und cry2 haben intrinsisch ungeordnete Region in ihrem C-Terminus, (CCE). Die CCE (und vermutlich die Kernlokalisationssequenz innerhalb der CCE) bei cry2 sind essentiell für eine „flüssige“ Phasen-Separation (Wang *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2023).

Bei Blaulicht-induzierten *cry2 photobodies* konnte eine Co-Lokalisation mit dem Transkriptionsfaktor *Teosinte-Branched1-Cycloidea-PCF 22* (TCP22) und nachfolgende Regulation von Komponenten der Inneren Uhr wie *Circadian Clock Associated 1* (CCA1) beobachtet werden (Mo *et al.*, 2022). Bei Blaulicht-induzierten *cry1 photobodies* konnte beobachtet werden, dass diese mit COP1 co-lokalisieren (Liu *et al.*, 2022). Auch co-lokalisiert *cry1* mit SPA1 in *nuclear bodies* (Lian *et al.*, 2011). Die biologische Relevanz von *cry1 photobodies* ist noch unbekannt.

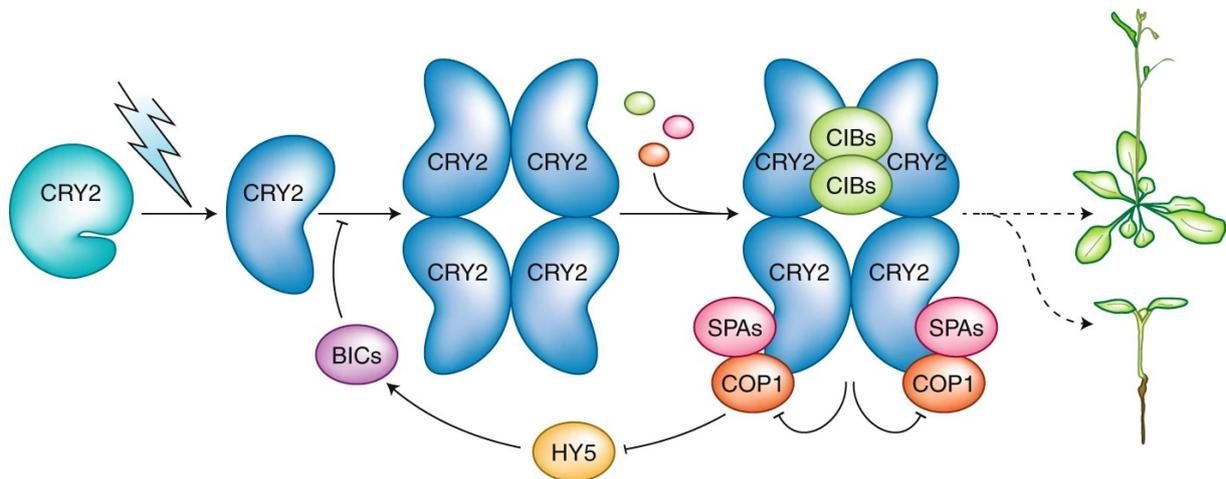
### 1.4.3 Photoaktivierung pflanzlicher Cryptochrome durch Oligomerisierung

Bei pflanzlichen Cryptochromen ist die CCE mit der PHR-Domäne im Dunkeln assoziiert. Bei *cry2* konnte mittels Kernspinresonanz (NMR) eine Blaulicht-abhängige Entfernung der CCE von der PHR-Domäne beobachtet werden (Goett-Zink *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2023).

Innerhalb der CCE von *cry2* konnten anfangs drei Serine nachgewiesen werden, die im Blaulicht phosphoryliert werden. Durch Austausch dieser Serine wird die Degradation und physiologische Aktivität verringert (Wang *et al.*, 2015b). Kinasen, die *cry2* an bis zu 24 Resten phosphorylieren können, werden als PPKs bezeichnet (Liu *et al.*, 2017). Auch *cry1* wird durch PPKs phosphoryliert, sowie nachfolgend poly-ubiquitiniert und degradiert. Dies erfolgt jedoch erst, wie bereits erwähnt, bei höheren Fluenzraten ( $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) als bei *cry2* (Shalitin *et al.*, 2003; Miao *et al.*, 2022). Somit spielt die Phosphorylierung eine wichtige Rolle für die Signalantwort von Cryptochromen. Da PPKs nur im Zellkern lokalisiert sind (Ni *et al.*, 2017), wird auch nur das dort lokalisierte, nicht aber cytosolisches *cry1* phosphoryliert, poly-ubiquitiniert und dem Abbau zugeführt. Die verschiedenen physiologischen Reaktionen der unterschiedlich lokalisierten *cry1* könnten durch diesen Mechanismus erklärt werden.

Sowohl die CCE von *cry1*, als auch von *cry2* können Signalantworten auch ohne die konservierte PHR-Domäne auslösen (Yang *et al.*, 2000). Dies ist jedoch nur der Fall, wenn die CCE an ein Protein gebunden ist, welches oligomerisiert, so wie  $\beta$ -Glucuronidase. Die Fusionsproteine zeigen einen konstitutiven photomorphologischen Phänotyp (COP). Diese und weitere Arbeiten deuten darauf hin, dass Cryptochrome in einem Oligomer physiologisch aktiv sind (Yang *et al.*, 2000; Rosenfeldt *et al.*, 2008). Über Experimente wie *Yeast-two-hybrid Assay* und Co-Immunpräzipitation konnte eine Oligomerisierung von Cryptochromen über die N-terminale Domäne gezeigt werden (Sang *et al.*, 2005). Homodimerisation von *cry2* ist Blaulicht-abhängig, gezeigt durch CoIP von *cry2* aus HEK293T (Wang *et al.*, 2016). Durch die

Oligomerisierung wird die Interaktion mit Interaktionspartnern unterstützt, wie bei den bereits erwähnten CIB1 oder dem COP1-SPAs-Komplex (Shao *et al.*, 2020; Wang und Lin 2020a; Palayam *et al.*, 2021) (**Abb. 5**). Kryo-elektronenmikroskopie Strukturen und Gelfiltration beweisen, dass pflanzliche Cryptochrome Blaublicht-abhängig Tetramere bilden (Ma *et al.*, 2020a; Ma *et al.*, 2020b; Shao *et al.*, 2020).



**Abb. 5: Blaulicht-induzierte Cryptochrom Oligomerisierung und Stabilisierung von HY5.** Inaktives cry2 Monomer im Dunkeln mit geschlossener Konformation (CCE assoziiert mit PHR) bildet nach Photoreduktion durch Blaulicht und Bildung einer offenen Konformation (exponierte CCE) ein Homotetramer. Das Tetramer interagiert mit Signalproteinen wie CIB1 oder dem COP1-SPAs-Komplex und sorgt direkt oder indirekt für veränderte Genexpression. Die Bindung und Inaktivierung des COP1/SPAs-Komplexes stabilisiert den Transkriptionsfaktor HY5, der die Transkription von BICs aktiviert. BICs sorgen dann für eine Hemmung der Oligomerisierung. Inaktivierung der cry2 Signaltransduktion durch negativen *Feedback-Loop*. Pfeile zeigen positiven Effekt, T-Linien zeigen inhibitorischen Effekt. Modifiziert nach Wang und Lin 2020a.

## 1.5 Die Rolle von BICs bei der Inhibierung von Cryptochromen

Neben den bereits oben genannten sind sogenannte *Blue-light Inhibitor of Cryptochromes* (BICs) weitere Bindungspartner der Cryptochrome (**Abb. 5**). Zuerst wurden BICs entdeckt, indem in *Arabidopsis* FOX (Pflanzen die cDNA in voller Länge überexprimieren)- Linien nach negativen Regulatoren von Cryptochromen gesucht wurde, indem nach einem *cry1/cry2* Mutanten-Phänotyp gesucht wurde (Wang *et al.*, 2016; Ichikawa *et al.*, 2006). Die gefundenen FOX-Linien überexprimierten BIC1 (Wang *et al.*, 2016). Diese Proteine sind nur in Landpflanzen vorkommend (Wang *et al.*, 2017b). *Arabidopsis* Pflanzen, die BIC1 überexprimieren sind weniger sensitiv gegenüber Blaulicht und zeigen unter Blaulicht eine geringere Inhibition des Hypokotyllängenwachstums, verringerte Anthocyan Akkumulation und im Langtag einen verspäteten Blühbeginn. In *A. thaliana* gibt es noch ein *BIC1* Homolog,

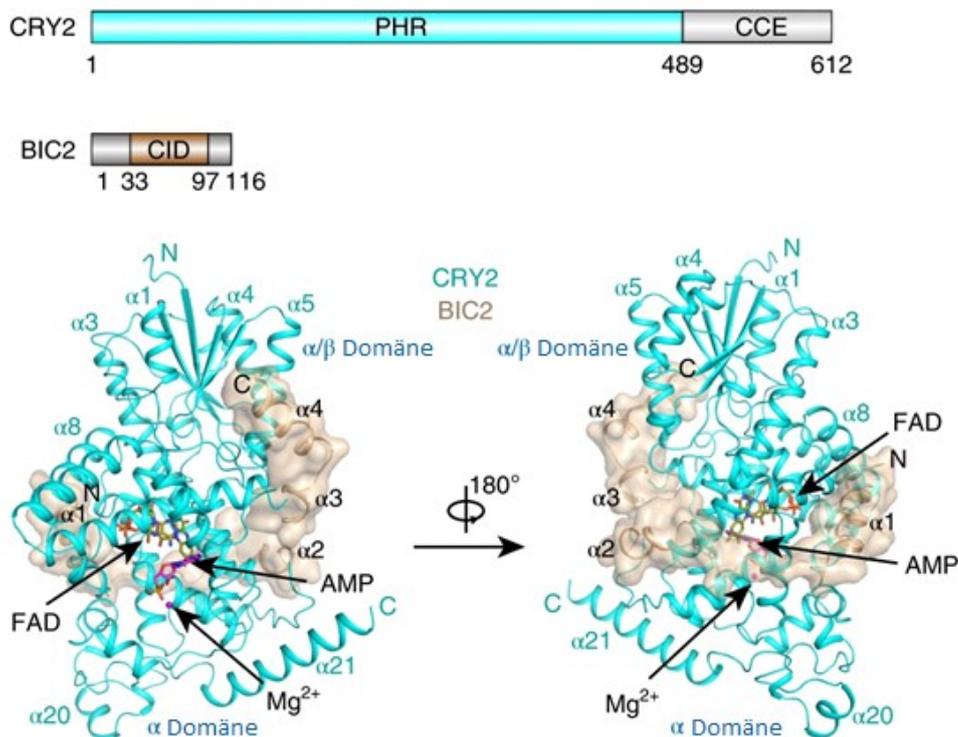
welches entsprechend als *BIC2* bezeichnet wurde. Erst die Doppelmutante *bic1bic2*, nicht aber die Einzelmutanten, zeigt einen Phänotyp ähnlich der Überexpression von Cryptochromen. Die phänotypischen Veränderungen der BIC-Überexpressions Linien reflektieren sich auch in deren Transkriptom, welches mit dem der *cry1/cry2* Doppelmutante große Übereinstimmung hat (Wang *et al.*, 2016).

So wurden innerhalb der Blaulicht-regulierten Gene 998 Gene gefunden, die sowohl von Cryptochromen, als auch von BICs reguliert sind. Zusätzlich wurde entdeckt, dass 425 Gene ausschließlich durch BIC reguliert sind. Dies suggeriert, dass BICs zusätzlich eine Funktion unabhängig von der Inhibition der Cryptochrome haben könnten. In der Pflanze *Triticum aestivum* interagiert BIC1 unter anderem als transkriptioneller Co-Aktivator mit dem Transkriptionsfaktor *Brassinazole-resistant 1* (BZR1) und sorgt für eine positive Regulierung des Brassinosteroid Signalmechanismus. Darüber hinaus interagiert BIC1 mit dem Transkriptionsfaktor PIF4 und sorgt für eine Expression spezifischer Gene wichtig für das Pflanzenwachstum, wie z.B. PIF4 selbst (Yang *et al.*, 2021)

In Abwesenheit von Licht werden die Gene für BICs in *A. thaliana* nur schwach exprimiert. Blau- Rot- und Dunkelrotlicht induzieren die Expression von BICs was in eine um das Hundertfache erhöhten Transkriptmenge resultiert (Wang *et al.*, 2017b). Ein wichtiger Regulator für die Deetiolierung ist der Transkriptionsfaktor HY5. Dieser bindet an die Promoter Regionen von *BICs* und deren G-Box und CT-Box Sequenzen, sodass die Transkription der *BIC* Gene erhöht wird (Wang *et al.*, 2017b). Ermöglicht wird dies durch die Photoaktivierung der Cryptochrome und Phytochrome und der damit einhergehenden Interaktion und Hemmung des COP1/SPA E3 Ubiquitin Ligase Komplexes und daraus resultierender Stabilisierung von HY5. Die dadurch verstärkte Expression von BIC1 und BIC2 und deren inhibitorische Wirkung auf Cryptochrome zeigt, dass beide Komponenten sich gegenseitig regulieren. Somit sind BICs ein negativer *Feedback-Loop* und der Schalter der Repression von Cryptochromen.

Konsistent mit der Funktion als negative Regulatoren von Cryptochromen inhibieren BIC1 und BIC2 die frühen Schritte der Cryptochrom Aktivierung. So verhindern beide BICs die Blaulicht-abhängige Phosphorylierung von *cry1* und *cry2* und auch die nachfolgende Degradierung von *cry2* (Wang *et al.*, 2016). Auch die Blaulicht-abhängige Entstehung von *cry2 photobodies* wird durch eine Überexpression von BICs verhindert, ebenso die Oligomerisierung von *cry*. Im Vergleich dazu besitzt die *bic1bic2* Mutante eine geringere Menge an *cry2* unter Blaulicht und ist sensitiver auf dieses.

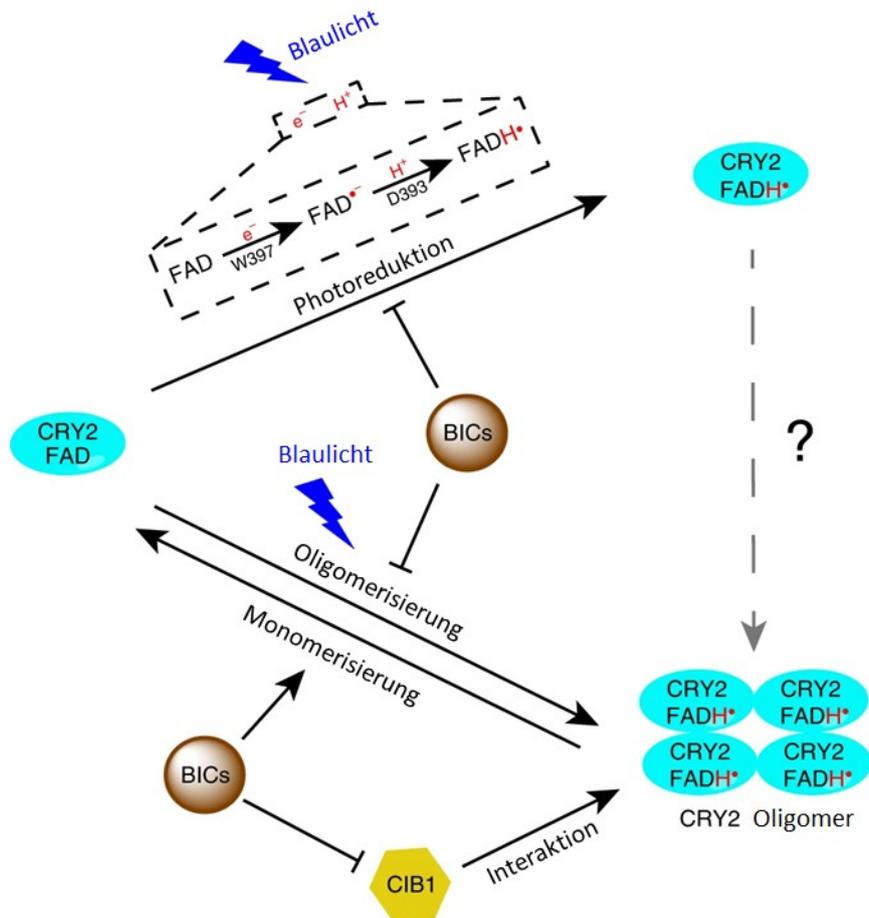
Diese Inhibierung basiert auf einer direkten Interaktion von BICs mit Cryptochromen und wurde unter anderem durch eine Kristallstruktur von BIC2 und cry2 gezeigt (**Abb. 6**). Hierbei wurde die konservierte, Cryptochrom-interagierende Domäne (CID) von BIC2 mit der PHR-Domäne von cry2 co-exprimiert und die Struktur des cry2-PHR und BIC2-CID Komplexes durch Kryoelektronenmikroskopie aufgeklärt (Ma *et al.*, 2020b).



**Abb. 6:** BIC2 bindet um die Furche zwischen der  $\alpha/\beta$ - und der  $\alpha$ -Subdomäne von cry2. Strukturen beider Proteine, bestehend aus der konservierten PHR-Domäne von cry2 (cyan) und der CID von BIC2 (braun). Gebunden sind zusätzlich der Kofaktor FAD, sowie AMP und  $Mg^{2+}$ . Modifiziert nach Ma *et al.* 2020b.

BIC2 windet sich gürtelartig um cry2 und bindet über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen mit seinen 4  $\alpha$ -Helices an cry2. Die  $\alpha 1$ -Helix von BIC2 befindet sich in der Nähe der FAD Bindetasche und interagiert dort mit dem *phosphate-binding-loop*. Dieser *loop* interagiert normalerweise mit FAD und beeinflusst möglicherweise die FAD-Redoxzustände (Hitomi *et al.*, 2009). Die bisherigen Daten zeigen, dass BIC2 nicht nur die Oligomerisierung von cry2 sterisch behindert, sondern auch die Photoreduktion des FAD verhindert. Zusätzlich wird durch Bindung von BIC2 an cry2 die Aminosäure D393, die als Protonen-Donor bei der Bildung des neutralen Flavin Semichinons dient, räumlich zum Isoalloxazinring des FAD entfernt. Somit wird die Bildung dieses für die Funktion der Cryptochrome essentiellen Redoxspezies des Flavins behindert (Ma *et al.*, 2020b).

Zusammengefasst lässt sich die Inhibierung der Cryptochrome durch BICs durch zwei Mechanismen beschreiben (**Abb. 7**). Zum einen wird die die Bildung des Flavin-Semichinons inhibiert und zum anderen die Oligomerisierung zu einem Tetramer (Ma *et al.*, 2020b). Ebenso inhibiert BIC1 die Interaktion zwischen cry2 und anderen Interaktionspartnern wie CIB1 oder SPA1 (Wang *et al.*, 2016). Auch ist beschrieben, dass das nach Photoaktivierung entstandene Cryptochrom-Tetramere durch BICs monomerisiert werden (Ma *et al.*, 2020b).



**Abb. 7: BICs inhibieren die Bildung des signalaktiven cry2 durch Hemmung von Oligomerisierung und Bildung des FADH<sup>•</sup>.** BIC inhibiert zusätzlich die Interaktion mit Signalproteinen wie CIB1 und sorgt für Auflösung des cry2 Tetramers. Auswirkungen auf den Zusammenhang zwischen Photoreduktion und Photoaktivierung (rechte Seite der Abbildung) sind noch unklar. Modifiziert nach Ma *et al.* 2020b.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Agarose Kammersystem	BioMax MP 1015, Kodak
Autoklav	V-150 Systec
Blotapparatur	<i>Mini-Trans-Blot Cell</i> Bio-Rad Laboratories GmbH
Feinwaage	Satorius
Fluoreszenzspektrometer	RF-5301PC, Shimadzu
French Press	<i>French Pressure Cell Press</i> , SLM AMINO Spectronic
Gelapparatur	<i>Mini Protean® 3 Cell</i> Bio-Rad Laboratories GmbH
Heizblock	Thermomixer <i>comfort</i> Eppendorf, Hamburg
Infrarot-Scanner	Odyssey® <i>Infrared Imaging System</i> LiCOR Biosciences
Inkubatorschrank	B6060 Heraeus
Inkubatorschüttler (Kultivierung von <i>E. coli</i> )	MaxQ 4000 Inkubator, Thermo Scientific Multitron Pro, Infors HT
Inkubatorschüttler (Kultivierung von <i>A. tumefaciens</i> )	G25, New Brunswick Scientific Co., inc
Magnetrührer	RCT basic Ika Werke
Mikropipetten	<i>Research variable</i> 2, 5, 10, 20, 100, 200, 1000 µl Eppendorf
KLSM	Leica SP2. SP5
KLSM-Objektive	HC P1 APO 20.0x0x70 Imm/CORR U HCX PL APO 40.0x1.25 OIL UV HCX PL APO CS 40.0x1.30 OIL UV HCX PL APO CS 63.0x1.40 OIL
Kühltruhe	<i>Ultra low</i> , Sanyo; <i>Ultra-low</i> , New Brunswick
Lichtmessgerät	LiCOR, inc.; LI-185B
pH-Meter	Lab850 Schott Instruments, mit Elektrode

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung und Hersteller</b>
Photometer	GeneQuant 1300, Heraeus NanoDrop ND 1000, Thermo Scientific
Protein- Aufreinigungssystem	<i>ÄKTA Purifier FPLC system</i> , Amersham Biosciences
Quarzküvetten	105.200-QS 10mm, Hellma
Sicherheitslicht-Dunkelrot	EncapSullte, Typ R20
Spannungs-/Stromquelle	Power 300, Integra Biosciences
Sterilbank	KS 12, Thermo Scientific
Thermocycler	<i>Mastercycler Gradient</i> , Eppendorf
Vortex	Genie 2, Scientific Industries
Zellmühle	MM200, Retsch
Zentrifugen	Biofuge pico Heraeus J2-21. Beckmann 400R, Heraeus 5417R, Eppendorf Mikro200/200R, Hettich
Zweistrahlphotometer mit Kühlung	UV-1800, Shimadzu; Kryo-Thermostat WK 5, Colora Messtechnik GmbH

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Aluminiumfolie	Roth, JES Collection
Einmalküvetten	Sarstedt
Einweg-Handschuhe (Latex, Nitril)	Sempercare
Falconröhrchen (15 mL, 50 mL)	Greiner Bio-One GmbH
Membrankonzentrator	Amicon <sup>TM</sup> Ultra 10 kDa MWCO, Millipore
<i>Mini-Protean® TGXTM Precast Gels</i>	BioRad
Pipettenspitzen (1 mL; 200, 20, 10 µL)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,1 mL)	Qiagen
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt

## 2.3 Antikörper

Antikörper	Bezeichnung	Antigen	Quelle	Herkunft
Primär	$\alpha$ HA	3xHA-tag	Ratte	Klon 3F10, Roche (Nr.: 11867423001)
Sekundär	$\alpha$ Rat 800CW	Ratte IgG	Ziege	LiCOR Bioscience (Nr.: 926-32219)
Sekundär	$\alpha$ Rat HRP	Ratte IgG	Ziege	Merck (Nr.: AP136P)
Primär	$\alpha$ Tubulin	$\alpha$ Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich GmbH (Nr.: 020M4753)
Sekundär	$\alpha$ Mouse 700CW	Maus IgG	Esel	LiCOR Bioscience (Nr.: 926-32222)
Primär	$\alpha$ His	His6-tag	Maus	antibodies.com (Nr.: X1990)
Sekundär	$\alpha$ Mouse 800CW	Maus IgG	Esel	LiCOR Bioscience (Nr.: 926-32212)
Primär, polyklonal	$\alpha$ cry1	cry1 Protein	Kaninchen	AG Batschauer (2009), Abiocode
Sekundär	$\alpha$ Rabbit 800CW	Kaninchen IgG	Ziege	LiCOR Bioscience (Nr.: 926-32211)

## 2.4 Chemikalien

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

## 2.5 Plasmide

Vektoren wurden für ihren jeweiligen Einsatzbereich für verschiedene Modellorganismen und Anwendungen ausgewählt.

### 2.5.1 Vektoren für stabile Transformation in *A. thaliana*

Für eine stabile Transformation von *A. thaliana*, wurde ein binäres Vektorsystem, sogenannte *Gateway*-Vektoren, verwendet. Für BIC1 wurde der UniProt-Code: Q9LXJ1 verwendet. Klontiert wurde Aminosäure 2-140. Für die eingefügten DNA-Sequenzen, sowie Aminosäuresequenzen der BIC1-Konstrukte siehe Kapitel Anhang 8.1. Eine Resistenz gegen das Herbizid Glufosinat wird in dieser Arbeit mit dem Handelsnamen Basta® benannt.

Plasmid	Funktion	Selektionsmarker	Quelle
pGWB614	35S pro, C-3xHA	Spec, Cm, Basta	(Nakamura <i>et al.</i> , 2010)
pGWB615	35S pro, N-3xHA	Spec, Cm, Basta	(Nakamura <i>et al.</i> , 2010)
pUBN-3HA-Dest V341	PUBQ10::3xHA-tag N-terminal	Spec, Cm, Basta	(Grefen <i>et al.</i> , 2010)
pUBC-3HA-Dest V386	PUBQ10::3xHA-tag C-terminal	Spec, Cm, Basta	(Grefen <i>et al.</i> , 2010)
pDONR221 BIC1 <sup>WT</sup>	<i>Entry</i> -Vektor	Kan	Biocat
pDONR221 BIC1 <sup>3CA</sup>	<i>Entry</i> -Vektor	Kan	Biocat

## 2.5.2 Vektoren für *in planta* Anwendungen und transienter Expression in *N. benthamiana*

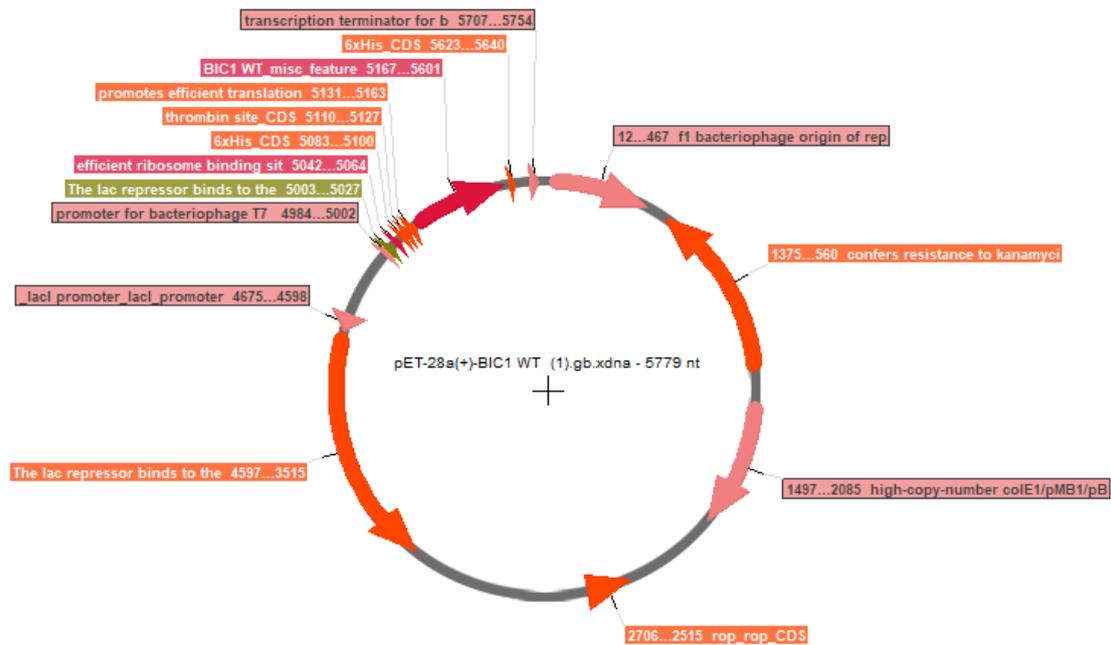
Für transiente Proteinexpressionen in *N. benthamiana* oder Proteinlokalisationsstudien, sowie der Untersuchung von *photobodies* wurden binäre Vektoren verwendet. Für die eingefügten DNA-Sequenzen, sowie Aminosäuresequenzen der BIC1-Konstrukte, sowie von *cry1* und *cry2* siehe Kapitel Anhang 8.1.

Plasmid	Funktion	Selektionsmarker	Quelle
pUGT1 Dest.	Binärer Vektor mGFP5 C-term.	Spec	K. Schumacher, <i>unpublished</i> ; (Grefen <i>et al.</i> , 2010)
pUGT2 Dest.	Binärer Vektor N-term.	GFP Spec	K. Schumacher, <i>unpublished</i> ; (Grefen <i>et al.</i> , 2010)
pUBC-GFP-Dest (V049)	GFP Fusionsprotein C-terminal	Spec, Cm, Basta	(Grefen <i>et al.</i> , 2010)
pUBN-GFP-Dest (V055)	GFP Fusionsprotein N-terminal	Spec, Cm, Basta	(Grefen <i>et al.</i> , 2010)
pUBC-RFP-Dest (V050)	RFP Fusionsprotein C-terminal	Spec, Cm, Basta	(Grefen <i>et al.</i> , 2010)

## 2.5.3 Vektoren für heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Für die Proteinexpression in *E. coli* wurde der IPTG-induzierbare Vektor pET-28a (+) verwendet. Die BIC1 Sequenzen wurden für die Expression in *E. coli* Codon-optimiert. Die Plasmide wurden synthetisch hergestellt und von der Firma Biocat bezogen. Exemplarisch aufgezeigt die Plasmidkarte von BIC1<sup>WT</sup> in pET-28a (+) (**Abb. 8**).

Plasmid	Funktion	Selektionsmarker	Quelle
pET-28a (+) BIC1 <sup>WT</sup>	Proteinexpression	Kanamycin	Biocat
pET-28a (+) BIC1 <sup>3CA</sup>	Proteinexpression	Kanamycin	Biocat
pET-28a (+) BIC1 <sup>H13A3CA</sup>	Proteinexpression	Kanamycin	Biocat



**Abb. 8: Expressionsvektor pET-28a (+) für heterologe Expression in *E. coli*.** Der Vektor ist aufgrund von Lac-Operator Sequenzen über IPTG-Zugabe induzierbar. BIC1 besitzt einen N-terminalen 6xHistidin-*tag*. Plasmid vermittelt Kanamycin Resistenz.

Für die eingefügten DNA-Sequenzen, sowie Aminosäuresequenzen der BIC1-Konstrukte siehe Kapitel Anhang 8.1.

## 2.6 Puffersysteme

Puffer wurden bei Raumtemperatur mit destilliertem Wasser (Aqua bidest.) hergestellt, welches über eine *Merck Millipore* Einheit entsalzt wurde. Für die Einstellung eines spezifischen pH-Wertes wurde ein pH-Meter (Schott Instruments, Lab 850) verwendet.

## 2.7 Proteinmarker

Als Größenmarker für SDS-PAGE und *Western Blot* wurde der Protein Marker *Precision Plus Protein Dual Color Standards* von Bio-Rad verwendet.

## 2.8 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Funktion	Quelle
One Shot Top10	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Transformation, Klonierung	Invitrogen
NEB-Turbo	F' proA+B+ lacIq ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)TetS endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5	Transformation, Klonierung	NEB
NEB 10-beta	Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr- hsdRMS-mcrBC)	Transformation, Klonierung	NEB
BL21 star	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) galdcmrne131 (DE)	Protein- Expression	NEB

## 2.9 *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme

Stamm	Genotyp	Funktion	Quelle
GV3101pMP90	C58 pMP90(pTiC58ΔT- DNA)	Expressionsstamm (Resistenzen: Rifampicin, Gentamycin).	(Koncz und Schell, 1986)
P19	GV3101 pMP90 p19	Unterdrückt posttranskriptionelles <i>Gene</i> <i>silencing</i> (Resistenzen: Rifampicin, Gentamycin, Kanamycin)	(Voinnet et al., 2000; Voinnet et al., 2003; Canto et al., 2006; Hsieh et al., 2009;)
mCherryNLS	GV3101 pMP90 mCherryNLS (pB7-ABAspro- mCherryNLS)	Exprimiert RFP lokalisiert im Zellkern (Resistenzen: Rifampicin, Gentamycin, Spectinomycin)	Katharina Caesar

## 2.10 *Arabidopsis thaliana*-Linien

Die Anzahl an Generation seit Generierung der einzelnen Genotypen ist unbekannt (ausgenommen BIC1ox-Linien).

Genotyp	Ökotyp	Allel	Gen-Nummer	Quelle
Wildtyp	Col-0			U. Höcker, Köln (2014);
<i>cry1/cry2</i>	Col	<i>cry2-1</i> hy4- B104	AT4G08920 AT1G04400	Chentao Lin über Claus Schwechheimer
<i>cry1</i>	Col	hy4-B104	AT4G08920	(Mockler <i>et al.</i> , 1999)
<i>cry2</i>	Col	<i>cry2-1</i> (Nr.: 4769740)	AT1G04400	(Mockler <i>et al.</i> , 1999)
<i>cry1</i> <sup>L407F</sup>	Col	LH1844	AT1G04400	Lars Hennig, Zürich
<i>phyA</i>	Ler	<i>phyA</i> -201	AT1G09570	(Reed <i>et al.</i> , 1993)
<i>phyB</i>	Ler	<i>phyB</i> -5	AT2G18790	(Reed <i>et al.</i> , 1993)
BIC1 <sup>WT</sup> ox_1	Col-0		AT3G52740	Diese Arbeit
BIC1 <sup>WT</sup> ox_2	Col-0		AT3G52740	Diese Arbeit
BIC1 <sup>3CA</sup> ox_1	Col-0		AT3G52740	Diese Arbeit
BIC1 <sup>3CA</sup> ox_2	Col-0		AT3G52740	Diese Arbeit
BIC1 <sup>WT</sup> ox_3 ( <i>cry1/cry2</i> ) (s. o.)	Col-0;	<i>cry2-1</i> hy4- B104	AT3G52740 AT4G08920 AT1G04400	Diese Arbeit
BIC1 <sup>WT</sup> ox_4 ( <i>cry1/cry2</i> ) (s. o.)	Col-0	<i>cry2-1</i> hy4- B104	AT3G52740 AT4G08920 AT1G04400	Diese Arbeit

## 2.11 Verwendete Websites

Zur Berechnung des Molekulargewichts in Dalton von Proteinen wurde folgende Website verwendet: <https://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>

Zum Konvertieren von Gewichts-Konzentrationen in Stoffmengenkonzentration oder Stoffmenge von Proteinen wurde folgende Website verwendet: [https://www.bioline.com/media/calculator/01\\_04.html](https://www.bioline.com/media/calculator/01_04.html)

Zum Konvertieren von DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen und zum Identifizieren von *open-reading-frames* wurde folgende Website verwendet: <https://web.expasy.org/translate/>

Für die Konvertierung von DNA-Sequenzen zu umgekehrter, komplementärer DNA-Sequenz für molekularbiologische Anwendungen wurde folgende Website verwendet: [https://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)

Um zu überprüfen, ob Primer an eine bestimmte DNA-Sequenz binden, wurde folgende Website verwendet: [https://www.bioinformatics.org/sms2/primer\\_map.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/primer_map.html)

Für ein *Multiples-Alignment* von verschiedenen Aminosäuresequenzen wurde die folgende Website verwendet: <https://tcoffee.crg.eu/apps/tcoffee/do:regular>

Für die visuelle Darstellung von *Multiple-Alignment* Daten wurde die folgende Website verwendet: <https://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/>

Für die Darstellung berechneter Proteinstrukturen von BIC1 wurde folgende Website verwendet (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022): <https://alphafold.ebi.ac.uk>

Für die Berechnung auf Testung auf Normalverteilung durch Anderson Darling in Excel, wurde folgende Website als Quelle verwendet: [www.sixsigmablackbelt.de/test-auf-normalverteilung-excel/](http://www.sixsigmablackbelt.de/test-auf-normalverteilung-excel/)

### 3 Methoden

#### 3.1 Anzucht und Kultivierung spezifischer Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Modellorganismen verwendet. Deren Anzucht und Kultivierung erforderte verschiedene Bedingungen und Methodiken.

##### 3.1.1 *Agrobacterium tumefaciens*

###### Reagenzien und Geräte

<b>Inkubationsschüttler</b>	Inkubator G25, New Brunswick Scientific Co., inc
<b>YEB-Medium</b>	5 g/L Rinderextrakt, 1 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 300 mg/L MgSO <sub>4</sub> (für Platten 20 g/L Agar)
<b>Rifampicin</b>	25 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 mg/L
<b>Gentamycin</b>	20 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 mg/L
<b>Spectinomycin</b>	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 100 mg/L
<b>Kanamycin</b>	50 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 25-50 mg/L
<b>DMSO</b>	100%

*Agrobacterium tumefaciens* wurden generell in YEB-Medium bei 28°C und schüttelnd bei ca. 250 rpm kultiviert. Zur langfristigen Lagerung von Kulturen konnten DMSO-Stocks in 7 % DMSO in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden.

##### 3.1.2 *Arabidopsis thaliana*

###### Reagenzien und Geräte

<b>Lichtmessgerät</b>	LI-185B, LiCOR
<b>½ MS-Medium</b>	2,15 g/L Murashige-Skoog-Salzmischung, 0,5 g/L MES-KOH (pH 5,7), 9 g/L Phyto-Agar, steril
<b>Sterilisationslösung</b>	5% NaOCl, 0,05% Tween
<b>Pikiererde</b>	Ohne Zusatz von Dünger
<b>Vermiculit</b>	Grobkörnig

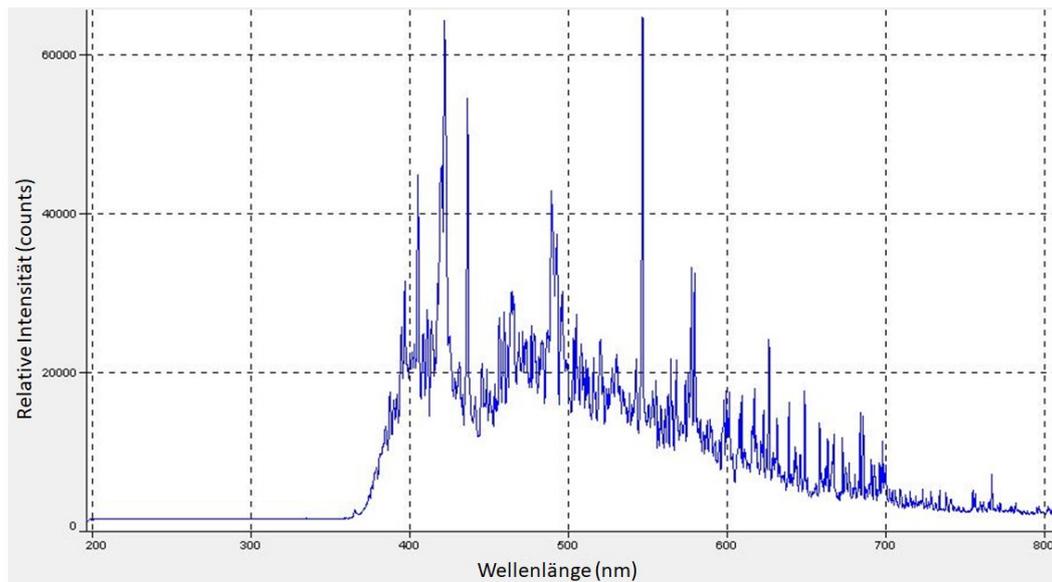
Für Kultivierung über kurze Zeiträume wurden die Samen steril auf ½ MS-Platten oder auf zuvor mit gefiltertem Leitungswasser gewässertem Filterpapier ausgelegt.

Die Sterilisation der Samen erfolgte durch Inkubation in Natriumhypochlorid-Lösung und Ethanol. Hierfür wurden ca. 100 Samen für 2 min in Ethanol (70%) inkubiert und nach Zentrifugation (1 min, 9503 g) und Dekantieren des Alkohols danach für 10-15 min in der Sterilisationslösung inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und abschütten der Sterilisationslösung wurden die Samen 3-5 Mal nach dem Zentrifugieren mit Aqua-bidest. gewaschen. Im Anschluss wurden die Samen in 500 µL 0,15%ige Phyto-Agar-Lösung resuspendiert und auf die Platten pipettiert. So wurde gewährleistet, dass einzelne Samen mit ausreichend Abstand zu anderen Samen ausgebracht wurden. Für kurzfristige Kultivierung und anschließender Extraktion des Gesamtproteinextrakts, wurden die Samen auf dreifach-gestapelten, autoklavierten *Whatman paper* mit steril gefiltertem (0,45 µm Filter) oder autoklavierten Leitungswasser bewässert und ausgesät. Dies ermöglichte die spätere Ernte ohne Agarose-Rückstände.

Für Kultivierung über einen längeren Zeitraum wurden Samen in einem 1:1 Gemisch aus Erde und Vermiculit ausgebracht.

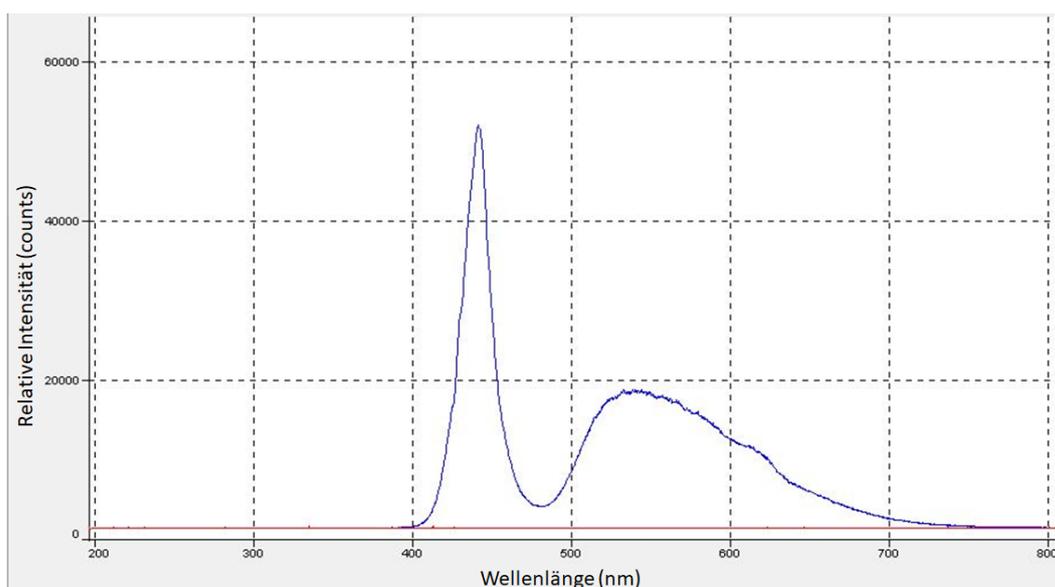
Alle ausgebrachten Samen wurden nach der Ausbringung in Kälte stratifiziert. Dies ermöglichte die gleichzeitige Keimung. Hierfür wurden die ausgebrachten Samen bei 4-6 °C in Dunkelheit vernalisiert. Diese Inkubation erfolgte 2-3 Tage lang. Im Anschluss wurde die Keimung der Samen in der Anzuchtkammer durch Gabe von 4 h Weißlicht induziert. Nach 20 h Inkubation in Dunkelheit bei RT wurden die Keimlinge in spezifische Lichtbedingungen überführt. Hierfür wurden sie entweder in kleine LED-Kammern bei RT gestellt, in der Anzuchtkammer belassen oder in große Anzucht-Schränke überführt.

Die begehbare Anzuchtkammer für *A. thaliana* und *N. benthamiana* wurde unter Langtagbedingungen (16 Licht, 8h Dunkel) betrieben. Die Temperaturen beliefen sich nachts auf 19,5 °C und tagsüber auf 24,5 °C. Die Feuchtigkeit war im Durchschnitt bei 50% relativer Luftfeuchte. Die Lichtverhältnisse der Anzuchtkammer wurden mit einem Photometer ermittelt (**Abb. 9**) Mit einem Lichtmessgerät wurde der Photonenfluss mit 130 µmol/m<sup>2</sup>s ermittelt.



**Abb. 9: Lichtspektrum der begehbaren Anzucht-kammer für Pflanzen unter Langtagbedingungen.** Gemessen wurde mit einem *OceanHDX Photometer Ocean Optics (Ocean-HDX-UV-VIS)*.

Für die Blühzeitbestimmung, Dokumentation der *Cantilen* und Messung der Rosetten wurden die Pflanzen nach Aussaat auf Erde (nach 3.1.2) in große Anzucht-Schränke überführt. Dort wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h tagsüber mit 22 °C und 50% Luftfeuchtigkeit, 8 h nachts mit 18 °C und 50% Luftfeuchtigkeit) angezogen. Mit einem Lichtmessgerät wurde der Photonenfluss mit 115-120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  ermittelt. Das Lichtspektrum der Schränke wurde gleichermaßen ermittelt (**Abb. 10**).



**Abb. 10: Lichtspektrum der Anzucht-Schränke für Pflanzen unter Langtagbedingungen.** Gemessen wurde mit einem *OceanHDX Photometer Ocean Optics (Ocean-HDX-UV-VIS)*.

### 3.1.3 *Escherichia coli*

#### Reagenzien und Geräte

<b>Inkubationsschüttler</b>	MaxQ 4000 Inkubator, Thermo Scientific
<b>LB-Medium</b>	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5g/L NaCl, für Platten: 15 g/L Bacto-Agar
<b>Glycerol</b>	50% (v/v)
<b>Spectinomycin</b>	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration 100 µg/mL
<b>Kanamycin</b>	50 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 25-50 mg/L

*E. coli* Stämme wurden auf selektierenden LB-Platten mit spezifischen Antibiotika ausgestrichen und nach ÜN-Inkubation bei 37 °C anschließend bei 4 °C gelagert.

Bei Flüssigkulturen wurden 3 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit einer von LB-Platten stammenden Kolonie angeimpft. Diese wurde ÜN bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

Für eine längerfristige Lagerung von *E. coli* Stämmen wurde in einem 1:1 Verhältnis die Flüssigkultur mit 50% (v/v) Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert.

### 3.1.4 *Nicotiana benthamiana*

Zur Anzucht von *N. benthamiana* wurden die selbigen Bedingungen wie für *A. thaliana* verwendet. Die Samen wurden nicht direkt vor Aussaat sterilisiert. Die Pflanzen wurden in der Anzuchtkammer kultiviert.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

#### Reagenzien und Geräte

<b>Inkubationsschüttler</b>	MaxQ 4000 Inkubator, Thermo Scientific
<b>dYT-Medium</b>	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefe-Extrakt, 5g/L NaCl
<b>RF1-Lösung</b>	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O, 30 mM Kaliumacetat (pH 7,5), 10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 15% (v/v) Glycerol
<b>RF2-Lösung</b>	10 mM MOPS (pH 5,8), 10 mM RbCl, 75 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 15% (v/v) Glycerol
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1 M
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	1 M

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach einem etablierten Protokoll in der AG Batschauer. Die Zellen der Wahl wurden in 100 mL dYT-Medium mit einer 2 mL Übernachtkultur angeimpft und mit 10 µM Magnesiumchlorid und Magnesiumsulfat (jeweils 1 µL der Stammlösungen auf 100 ml Medium) versetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C schüttelnd bei 250 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 inkubiert. Anschließend werden die Zellen 30 min auf Eis heruntergekühlt, geerntet (1750 g, 8 min, 4 °C) und in 33 mL steriler RF1-Lösung resuspendiert. Nach weiterer 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation und Resuspension in 5 mL RF2-Lösung. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurden die Zellen bei -80 °C für eine längerfristige Lagerung weggefroren.

### 3.2.2 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

#### Reagenzien und Geräte

<b>Heizblock</b>	<i>Thermomixer comfort</i> , Eppendorf
<b>LB-Medium</b>	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, für Platten: 15 g/L Bacto-Agar
<b>Spectinomycin</b>	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration 100 µg/mL
<b>Kanamycin</b>	50 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 25-50 mg/L
<b>Inkubatorschrank</b>	B6060 Heraeus

Für eine Transformation mit entsprechenden Vektoren wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut (Hanahan, 1983). Zu 100 µL *E. Coli* Zellen wurden ca. 1 µg Plasmid-DNA hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 60 s bei 42 °C erhitzt und direkt im Anschluss mit 1 mL LB-Medium vermischt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 300 rpm für 30 min auf einem Heizblock inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 3 min bei RT und 855 g wurde der Überstand dekantiert und eine kleine Menge (30-50 µL) auf eine Agar-Platte mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden kopfüber bei 37 °C ÜN inkubiert.

### 3.2.3 Gateway-Klonierung

Für die Klonierung von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup>-Konstrukten in Vektoren, welche für die Transformation von *A. thaliana* und *N. benthamiana* verwendet wurden, wurde sich der Gateway-Klonierung bedient. Mit dieser Methode kann das Zielgen aus einem Ausgangsvektor heraus (*Entry-vektor*) über sequenzspezifische Rekombination in verschiedene End-Vektoren (*Destination-Vektor*) integriert werden (Landy, 1989). Im Rahmen dieser Arbeit wurde BIC1<sup>WT</sup> aus dem *Entry*-Vektor pDONR221 in die *Destinations*-Vektoren pGWB614, pGWB615, pUBV341 (siehe exemplarisch **Abb. 11**), pUBV386, pUBC-GFP-Dest V049, pUBN-GFP-Dest V055 und pUBC-RFP-Dest V050 kloniert. BIC1<sup>3CA</sup> wurde durch Mutagenese in dem *Entry*-Vektor generiert und in die *Destinations*-Vektoren pUBV341 und pUBC-RFP-Dest V050 kloniert.

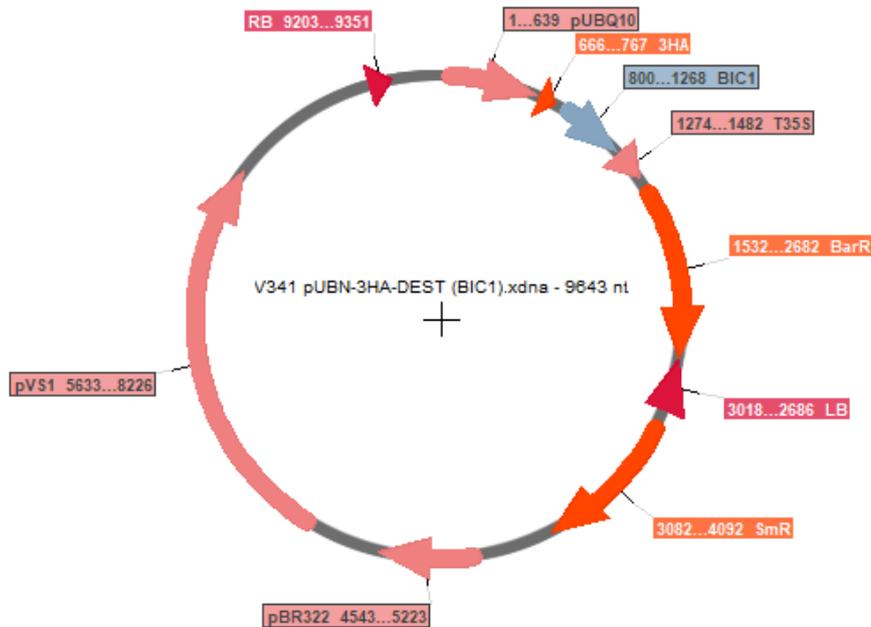
Die Rekombination von *Entry*-Vektor und *Destination*-Vektor wird durch Rekombinasen und spezifische DNA-Sequenzen durchgeführt. Die Gateway-Vektoren haben neben ihrer spezifischen Antibiotika-Resistenz als Selektionsmarker einen zusätzlichen Selektionsmarker. Das sogenannte Selbstmordgen *ccdB*, welches für ein Genprodukt steht, das die bakterielle DNA-Gyrase inhibiert, wird durch das Transgen rekombinant ausgetauscht. So überleben ausschließlich die transformierten Zellen nach erfolgter Rekombination (Bernard und Couturier, 1992; Bernard *et al.*, 1994).

Die LR-Reaktion ist die ausschlaggebende Rekombination des Zielgens vom *Entry*-Vektor in den *Destination*-Vektor.

### Puffer und Reagenzien

<b>LR Clonase™ II Enzym Mix</b>	Gateway LR Clonase™ II Enzym Mix, Invitrogen
<b>Proteinase K</b>	2 µg/µL (Gateway LR Clonase™ II Enzym Mix, Invitrogen)
<b>Lösung</b>	
<b>LB-Medium</b>	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, für Platten: 15 g/L Bacto-Agar
<b>Spectinomycin</b>	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 100 µg/L
<b>Streptomycin</b>	50 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 50 µg/L
<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

Vom *Entry*-Vektor pDONR221 inklusive Transgen wurden 100 ng mit 150 ng des jeweiligen *Destination*-Vektor zusammengeführt und mit TE-Puffer auf 8 µl aufgefüllt. 2 µL des LR Clonase™ II Enzyme Mix wurden zu den Proben gegeben und bis zu 2,5 h bei 25 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 1 µL der Proteinase K Lösung hinzugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. 2,5 µL der Reaktions-Lösung wurden zu *E. coli* Zellen NEB®-beta hinzugegeben und transformiert (siehe Transformation 3.2.2). Die Zellen wurden auf selektiven LB-Medium ÜN bei 37 °C angezogen. Eine Überprüfung der Klonierung erfolgte durch einen Test-Verdau mit Restriktionsenzymen und durch Sequenzierung.



**Abb. 11: Destination-Vektor pUBV341 für stabile *A. thaliana* Transformation.** Die Flankierungssequenzen RB (*right border*) und LB (*left border*) begrenzen die T-DNA Sequenz. BIC1 mit N-terminalem 3xHA-tag und vorgeschaltetem Promotor UBQ10. Das Plasmid vermittelt eine Basta (BarR) und Spectinomycin (SmR) Resistenz.

### 3.2.4 Überprüfung von Konstrukten und Agarose-Gelelektrophorese

#### Reagenzien und Geräte

<b>Inkubationsschüttler</b>	MaxQ 4000 Inkubator, Thermo Scientific
<b>LB-Medium</b>	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, für Platten: 15 g/L Bacto-Agar
<b>Plasmid-Isolation</b>	NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid, Macherey-Nagel (MN)
<b>Restriktionsenzym-Puffer</b>	<i>CutSmart</i> <sup>®</sup> -Puffer 10x; 500 mM Kaliumacetat, 200 mM Tris-Acetat, 100 mM Magnesiumacetat, 1 mg/mL BSA, (pH 7,9); NEB
<b>Restriktionsenzyme</b>	z.B. EcoRI, KpnI 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
<b>TBE-Puffer</b>	10,8 g/L Tris, 5,5 g/L Borsäure, 4 mL/L 0,5 M EDTA/NaOH (pH 8,0)
<b>Midori-Green</b>	<i>Midori Green Advance</i> (Biozym), 12,5 µL pro 250 mL Agarosegel
<b>DNA-Marker</b>	2-Log Ladder, 0,1-10 kbp (NEB)
<b>5x Probenpuffer</b>	1% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin

Konstrukte wurden nach der Gateway Klonierung über Test-Verdaue mit Restriktionsenzymen verifiziert. Hierbei wurde überprüft, ob durch das Einbringen des Transgens Restriktionsenzyme entsprechend den Erwartungen schneiden. Hierbei wurde oft eine Kombination verwendet, bei der das eine Enzym im Vektor, und das andere im Insert schneidet.

Zuvor wurde das zu untersuchende Plasmid aus einer Flüssigkultur mit einem Isolations-Kit (MN) isoliert. Die Konzentration der Plasmide wurde über einen Nanodrop-2000 photometrisch bestimmt. Das LB-Medium enthielt selektive Antibiotika spezifisch für die Plasmide der transformierten *E. coli* Zellen. Die Flüssigkultur wurde mit Transformanten angeimpft und meist ÜN bei 37 °C und 250 rpm kultiviert.

Die Plasmide wurden zusammen mit den Enzymen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Hierbei wurden bis zu 400 ng Plasmid-DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen (1 unit pro 1 µg DNA) und 10x *CutSmart*<sup>®</sup>-Puffer mit Aqua bidest. auf 25 µL aufgefüllt und vermischt.

Im Anschluss wurden die Reaktions-Lösungen auf einem Agarose-Gel aufgetrennt.

Hierbei laufen die Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung zum elektrischen Pluspol. Diese haben aufgrund spezifischer Größen ein spezifisches Laufverhalten und lassen sich somit qualitativ analysieren (Wagner, 1964).

Zur Herstellung der Agarose-Gele wurde Agarose in TBE-Puffer aufgekocht. Nach Zugabe von *Midori Green* wurde die Lösung auf ca. 50 °C abgekühlt und dann in eine Gelkammer gegossen. Vor der Elektrophorese wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet und die DNA-Proben wurden in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-100 V für bis zu 1,5 h. Die DNA konnte durch die Bindung von *Midori Green* und dem *GelDoc*-System mittels UV-Licht visualisierbar gemacht werden.

### 3.2.5 Q5<sup>®</sup>-Side-directed-mutagenesis

#### Reagenzien und Geräte

<b>PCR-Cycler</b>	TC-96/g/H(b)C, Biozym Scientific GmbH; <i>Mastercycler gradient</i> , Eppendorf
<b>LB-Medium</b>	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, für Platten: 15 g/L Bacto-Agar
<b>Kanamycin</b>	50 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 25-50 mg/L
<b>Q5-Polymerase</b>	NEB (2000 units/mL)
<b>Reaktions-Puffer</b>	5x Q5 Reaktions Puffer, NEB
<b>dNTPs</b>	Jeweils 10 mM (Fermentas)
<b>3' und 5'-Primer</b>	Jeweils 10 mM
<b>T4 DNA-Ligasepuffer</b>	NEB
<b>T4 PNK</b>	NEB (10000 units/mL)
<b>T4 DNA Ligase</b>	NEB (400000 units/mL)
<b>Restriktionsenzym</b>	Dpn I, NEB

Durch Mutagenese wurde in dem Vektor pDONR221 mit dem Insert BIC1<sup>WT</sup> die Mutante BIC1<sup>3CA</sup> in selbigem Vektor generiert. Dieses Konstrukt diente als *Entry*-Vektor für weitere Gateway-Klonierungen. Durch die Q5<sup>®</sup>-Side-directed-mutagenesis lässt sich eine Mutation während einer PCR durchführen.

Für eine Schritt-für-Schritt dreifach-Cystein Mutation wurden für jede Mutation jeweils ein Primerpaar verwendet. Hierbei wurde jeweils ein *forward*- und ein *reverse*-Primer verwendet:

**Mat\_Bic1\_C99A\_fwd** TTGGATCGACGCTTCTACCTTCGATACTTG  
**Mat\_Bic1\_C99A\_rev** TCCTTGAGGAGTTCCTCTTG  
**Mat\_Bic1\_C104A\_fwd** CTTTCGATACTGCTCTTGTGCCTGCTGG  
**Mat\_Bic1\_C104A\_rev** GTAGAAGCGTCGATCCAATC  
**Mat\_Bic1\_C135A\_fwd** TCATAACAGAGCTCTCATCCTCAGGGACC  
**Mat\_Bic1\_C135A\_rev** AGTCCACCAGAAGCAGAAG

Die Mutagenese erfolgte während einer PCR. Kurze Oligonukleotide (Primer) binden an das DNA-Template, von denen die Amplifikation der Nukleinsäuren startet. Die Polymerase vollendet den neuen DNA-Strang, inklusive der durch die Primer eingefügten Mutation (Mullis und Faloona, 1987).

Bei einem beispielhaften PCR/Mutagenese-Ansatz wurden folgende Substanzen pipettiert:

<b>Q5®-Polymerase</b>	0,5 µL
<b>5x Reaktions-Puffer</b>	5 µL
<b>10 mM dNTPs</b>	1 µL
<b>10 µM Fwd-Primer</b>	2,5 µL
<b>10 µM Rev-Primer</b>	2,5 µL
<b>Template DNA</b>	1-25 ng
<b>Aqua bidest.</b>	auf 25 µL

Die Amplifikationsbedingungen der PCR wurde an den Reaktionsansatz angepasst. Zu beachten war die Schmelztemperatur des Primer-Paares. Nachfolgend ist ein beispielhaftes PCR-Programm aufgelistet:

<b>Initiale Denaturierung</b>	98 °C	30 s
<b>Denaturierung</b>	98 °C	10 s
<b>Annealing</b>	$T_m$ der Primer – 5 °C	30 s
<b>Elongation</b>	72 °C	Abhängig von Polymerase und <i>Template</i> Größe
<b>Finale Extension</b>	72 °C	2 min
<b>Lagerung</b>	4 °C	unbegrenzt

Die Anzahl an Zyklen (Denaturierung-Elongation) beträgt im generellen 25-35. Durch eine anschließende Behandlung mit Ligasen und Kinasen wurden die PCR-Produkte komplementiert und durch eine Behandlung mit dem Restriktionsenzym Dpn I (1 unit pro 1 µg DNA) wurden die methylierten, ursprünglichen, nicht mutierten *Templates* zerstört:

<b>PCR-Produkt</b>	1 $\mu$ L
<b>T4 Ligasepuffer</b>	1 $\mu$ L
<b>T4 PNK</b>	1 $\mu$ L
<b>T4 DNA Ligase</b>	1 $\mu$ L
<b>Dpn I</b>	1 $\mu$ L
<b>Aqua bidest.</b>	5 $\mu$ L

Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Nach jeder Mutation wurde das mutierte Konstrukt mittels chemischer Transformation in *E. coli* Zellen NEB-Turbo gebracht und auf LB-Platten mit Kanamycin selektiert.

### 3.2.6 DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung von Konstrukten wurden diese zu der Firma Microsynth nach Göttingen zum Sequenzieren versendet. Versendete Plasmide hatten eine Konzentration von 40–100 ng/ $\mu$ L und entweder einen *forward* oder *reverse* Primer mit der Konzentration von 4  $\mu$ M. Es wurde ein Primerpaar für die Sequenzierung des BIC1 Gens verwendet. Die übrigen folgenden Primer sind für die spezifischen Plasmid-Konstrukte:

<b>BIC1_fwd</b>	ATGAATATCGACGACACCACCTC
<b>BIC1_rev</b>	CCTGAGGATGAGGCATCTGTTATG
<b>pGWB614_615_35S_fwd</b>	CGCAAGACCCTTCCTCTATATAGG
<b>pGWB614_HA_rev</b>	CTGCACTGAGCAGCGTAATCTG
<b>pGWB615_NOSt_rev</b>	GCTATGACCATGATTACGAATTGG
<b>V341V386_PUBQ10_fwd</b>	TTTCGTTTCGATCCCAATTTCG
<b>V341V386_T35S_rev</b>	TAGATTTGTAGAGAGAGACTGGTG

### 3.3 Herstellung transgener Pflanzen

Zur Herstellung transgener, stabiler *A. thaliana* Linien wurde sich im Rahmen dieser Arbeit der *floral-dip* Methode bedient. Über zuvor transformierte *Agrobacterium tumefaciens* wurde das Zielgen in die Eizellen der Blüten der Pflanzen eingebracht. Die Transformation in Pflanzen wird durch ein Ti-Plasmid in *A. tumefaciens* ermöglicht. Die in den Agrobakterien exprimierten Virulenzproteine ermöglichen das Einbringen der T-DNA Sequenz inklusive des Zielgens. Die

T-DNA wird an zufälliger Position in das Genom der Pflanze inseriert (Clough und Bent, 1998; Hellens *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> in *A. thaliana* WT und in die *cry1/cry2* Mutante mit dem Ökotyp Col-0 transformiert.

### 3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter *A. tumefaciens*

Agrobakterien wurden für die stabile Transformation von *A. thaliana* und der transienten Transformation von *N. benthamiana* benötigt. Für die Transformation der Agrobakterien selbst mit einem Transgen, wurden diese in Vorarbeiten bereits chemisch kompetent gemacht.

#### Reagenzien und Geräte

<b>Inkubationsschüttler</b>	Inkubator G25, New Brunswick Scientific Co., inc
<b>YEB-Medium</b>	5 g/L Rinder-Extrakt, 1 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 300 mg/L MgSO <sub>4</sub> (für Platten 20 g/L Agar)
<b>Rifampicin</b>	25 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 mg/L
<b>Gentamycin</b>	20 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 mg/L
<b>NaCl</b>	0,15 M in Aqua bidest.
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	20 mM in Aqua bidest.

Eine Einzelkolonie des Agrobakterien Stammes GV3101 pMP90 wurde mit entsprechenden Antibiotika in einer 20 mL Übernachtkultur in YEB-Medium angeimpft und bei 28 °C und ca. 200 rpm kultiviert. Die Vorkultur wurde verwendet, um eine Hauptkultur mit frischem Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 einzustellen und erneut bei 28 °C und ca. 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 zu kultivieren. Danach wurden die Zellen 10 min bei RT und ca. 2000 g pelletiert und in 100 mL Natriumchlorid-Lösung resuspendiert. Der Vorgang wurde wiederholt und das Pellet in 10 mL eiskalter Calciumchlorid-Lösung resuspendiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden in 100 µL *Aliquots* in flüssigem N<sub>2</sub> weggefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.2 Transformation von *A. tumefaciens*

#### Reagenzien und Geräte

<b>Heizblock</b>	<i>Thermomixer comfort</i> , Eppendorf
<b>YEB-Medium</b>	5 g/L Rinder-Extrakt, 1 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 300 mg/L MgSO <sub>4</sub> (für Platten 20 g/L Agar)
<b>Rifampicin</b>	25 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 mg/L
<b>Gentamycin</b>	20 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 mg/L
<b>Spectinomycin</b>	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 100 mg/L
<b>Kanamycin</b>	50 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 25-50 mg/L

Zur Transformation von chemisch kompetenten Zellen des Expressionsstammes GV3101 pMP90 wurden diese mit dem Zielvektor (500 ng Plasmid DNA) 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 5 min in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren, und anschließend für 5 min bei 37 °C für einen Hitzeschock inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 1 mL YEB-Medium auf RT versetzt und der Ansatz bei 28 °C für 4 h (eine Verdopplung von *A. tumefaciens*) schüttelnd bei 250 rpm auf einem Heizblock inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 1520 g für 3 min geerntet und der Überstand dekantiert. Die Bakterien wurden auf selektiven YEB-Platten ausplattiert und bei 28 °C für 2-3 Tage inkubiert bis Kolonien sichtbar waren.

### 3.3.3 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

#### Reagenzien und Geräte

<b>Inkubationsschüttler</b>	Inkubator G25, New Brunswick Scientific Co., inc
<b>YEB-Medium</b>	5 g/L Rinder-Extrakt, 1 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 300 mg/L MgSO <sub>4</sub>
<b>Rifampicin</b>	25 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 mg/L
<b>Gentamycin</b>	20 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 mg/L
<b>Spectinomycin</b>	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 100 mg/L
<b>Infiltrationsmedium</b>	5% (w/v) Sucrose, 0,05% Silwet L-77 (Momentive Performance Materials GmbH)

Die zu transformierenden *A. thaliana* Pflanzen wurden bis zur Ausbildung eines noch geschlossenen Blütenstands in der Anzuchtkammer unter Langtag-Bedingungen angezogen.

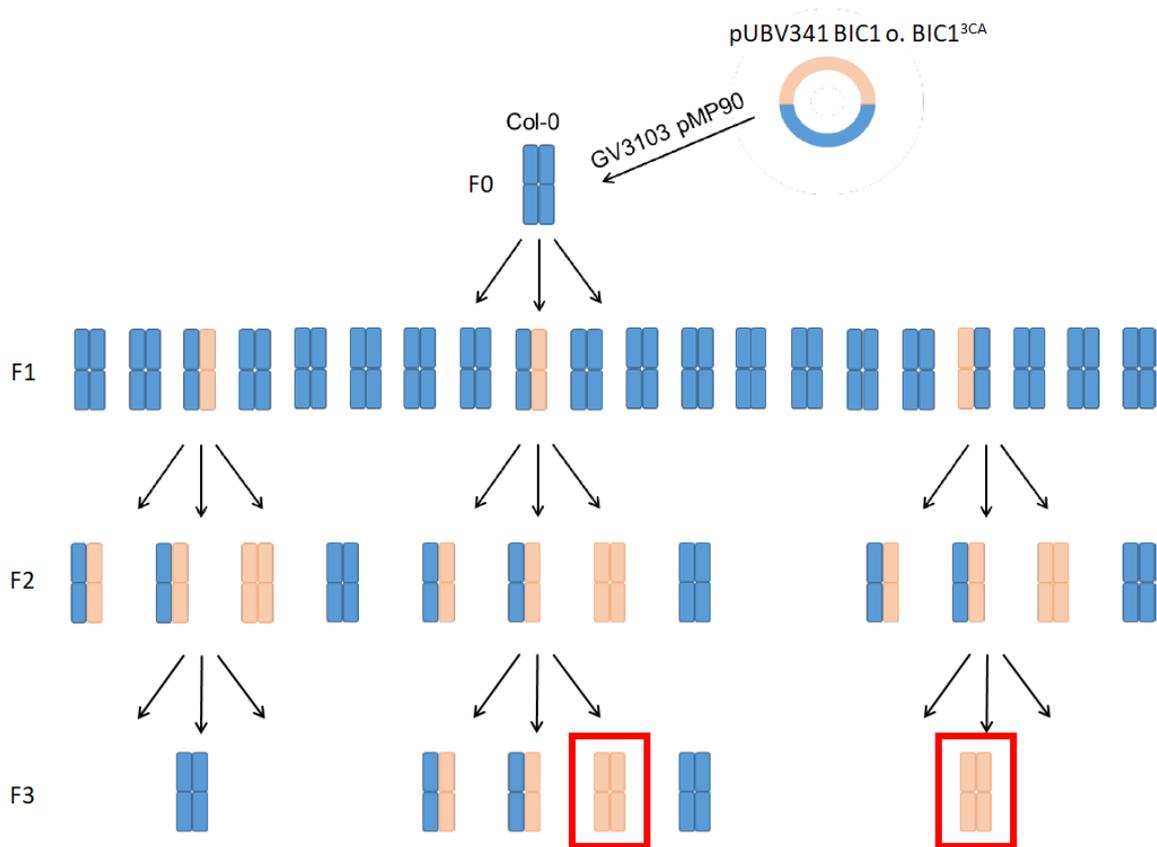
Die zu transformierenden *A. tumefaciens* Zellen wurden zwei Tage zuvor kultiviert. Alle YEB-Medien enthielten selektive Antibiotika. Hierbei wurde eine 3 mL YEB-Lösung mit *A. tumefaciens* (pUBV341, BIC1<sup>WT</sup> oder BIC1<sup>3CA</sup>) angeimpft und ÜN bei 28 °C und 300 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden 3 mL dieser ÜN-Kultur in 100 mL YEB-Medium überführt und erneut ÜN bei 28 °C und 300 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 4500 g, 15 min, RT geerntet und in Infiltrationsmedium resuspendiert, sodass eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 vorlag. Diese Agrobakterien-Suspension wurde in große Glasgefäße überführt, sodass alle oberirdischen Teile von *A. thaliana* für 3-5 s eingetaucht werden konnten. Vorher wurden bereits offene und befruchtete Blütenstände abgeschnitten. Die transformierten Pflanzen wurden in Eimer überführt, diese wurden mit Klarsichtfolie und mit Papier abgedeckt. Nach 2 ½ d in der Anzuchtkammer unter Langtag-Bedingungen wurden die Pflanzen aus dem Eimer herausgestellt und in der Anzuchtkammer bis zur Samenreife weiterkultiviert.

### 3.3.4 Selektion und Zucht von transgenen *Arabidopsis thaliana*

#### Puffer und Reagenzien

<b>Basta-Lösung</b>	1 mL/L Basta-Stammlösung (Aventis), 0,05% (v/v) Silwet L-77 (Momentive Performance Materials GmbH)
---------------------	--

Zur Selektierung transgener *A. thaliana* Linien wurden die geernteten Samen der F1-Generation ausgesät und mit Basta behandelt. Als Selektionsmarker wurde zusammen mit dem Transgen auch eine Resistenz gegen das Herbizid Basta mit transformiert. Das Ziel war letztendlich eine homozygote, unabhängige Linie in der F3-Generation zu generieren (**Abb. 12**).



**Abb. 12: Selektion transgener *A. thaliana* Linien.** Nach der Transformation der F0-Generation mittels *floral-dip* wurden die F1-Samen geerntet. Die Keimlinge der F1-Generation wurden nach Basta-Selektion erneut bis zur Samenreife kultiviert und eine F2-Generation wurde gezüchtet. Diese ist größtenteils heterozygot. Die Pflanzen der F2-Generation wurden mittels *Western Blot* auf transgenes Protein hin überprüft. Zusätzlich wurde die Hypokotyllänge von BIC1<sup>WT</sup>ox-Linien gemessen und auf Normalverteilung hin überprüft. In der F3-Generation wurde selbiges wiederholt. Zusätzlich wurde erneut auf Basta-Resistenz getestet. Bei F2-Eltern, die homozygot waren, haben alle F3-Nachkommen die Basta-Behandlung überlebt. Bei heterozygoten Eltern wären ¼ durch Basta gestorben, vorausgesetzt es handelt sich um ein Transgen (Abb. Anhang 2). Die laut Basta-Behandlung homozygoten F3-Linien (rote Umrandung) wurden für weitere analytische Experimente verwendet (nach Christian Michalski, 2017).

Für die Basta-Behandlung der F1-Generation wurden diese nach 2-wöchiger Stratifikation bei 4-6 C° dicht nebeneinander auf Anzuchterde ausgesät. Nach ca. 7 d nach Keimung wurden die Keimlinge im Abstand von zwei Tagen dreimal mit Basta-Lösung besprüht. Nur Keimlinge, die einen Selektionsmarker und somit auch das Zielgen trugen, überlebten. Transgene F1-Pflanzen sind heterozygot. Die weitere Kultivierung hinzu der F2-Generation erfolgte für jede Pflanze einzeln, da diese eine unabhängige Linien repräsentierte, sprich Pflanzen die aus einem spezifischen Transformationsereignis hervorgingen und sich genotypisch von dem Insertionsort innerhalb des Genoms von anderen Linien unterschieden. Die Pflanzen der F2-Generation wurden mittels *Western Blot* auf transgenes Protein hin überprüft. Für eine Züchtung von

homozygoten Linien wurden die F2-Pflanzen zur Samenbildung kultiviert. Die Keimlinge aus der F3-Generation wurden erneut mit Basta behandelt. Bei F2-Eltern, die homozygot waren, haben alle F3-Nachkommen die Basta-Behandlung überlebt. Bei heterozygoten Eltern wären laut Mendelscher-Regel  $\frac{1}{4}$  durch Basta gestorben (**Abb. Anhang 2**). Die Regel gilt nur, wenn nur ein Transgen inseriert wurde. Zusätzlich wurde die Hypokotyllänge von BIC1<sup>WT</sup>ox-Linien und BIC1<sup>3CA</sup>ox-Linien gemessen und auf Normalverteilung hin überprüft (**Abb. Anhang 3**). Mit den Linien aus der F3-Generation wurden analytische Experimente durchgeführt.

### 3.3.5 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

#### Reagenzien und Geräte

<b>Inkubationsschüttler</b>	Inkubator G25, New Brunswick Scientific Co., inc
<b>YEB-Medium</b>	5 g/L Rinder-Extrakt, 1 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, 300 mg/L MgSO <sub>4</sub> (für Platten 20 g/L Agar)
<b>Rifampicin</b>	25 mg/mL in Methanol; Arbeitskonzentration: 100 mg/L
<b>Gentamycin</b>	20 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 40 mg/L
<b>Spectinomycin</b>	40 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 100 mg/L
<b>Kanamycin</b>	50 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 25-50 mg/L
<b>Infiltrationsmedium</b>	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MES-KOH (pH 5,6), 150 $\mu$ M Acetosyringon

Für Proteinlokalisationsstudien, der Untersuchung von *photobodies*, dem Zusatz von BIC1<sup>WT</sup> mit Palladium-mesoporphyrin (Pd-mP), der Überexpression von BIC1<sup>WT</sup>, sowie vorherigen Tests der Konstrukte auf funktionierende Proteinexpression, bevor diese für stabile Transformation in *A. thaliana* verwendet werden, wurden ausgewählte Konstrukte transient in *N. benthamiana* exprimiert. Für die Transformation der *N. benthamiana* Pflanzen wurden zunächst Übernachtskulturen von transformierten Agrobakterien angesetzt. Neben Agrobakterien die den Zielvektor enthielten, wurden ebenso Agrobakterien angezogen, die das Konstrukt P19 enthielten. Diese wurden später mit dem Expressionsstamm des Zielproteins im Verhältnis 1:1 vermischt. Dessen Genprodukt unterdrückt posttranskriptionelles *Gene Silencing* und erhöht somit die Ausbeute des Zielproteins (Canto *et al.*, 2006; Hsieh *et al.*, 2009). Eine Kolonie des entsprechenden Agrobakterien-Stamms wurde in 3 mL YEP-Medium mit halber Arbeitskonzentration der Antibiotika versetzt, damit diese schneller anwuchsen. Die Bakterien wurden über Nacht bei 28 °C bei 250 rpm inkubiert. Nach ca. 17 h wurden 2 mL der

Übernachtskultur in 4 mL frisches YEB-Medium mit voller Antibiotika-Konzentration überführt und erneut für 4 h bei 28 °C und 250 rpm inkubiert. Von den restlichen 1 mL konnte ein DMSO-Stock hergestellt werden. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C 15 min bei 1520 g geerntet. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1 mL eiskaltem Infiltrationsmedium resuspendiert. Die im Verhältnis 1:1 zu vermischenden Bakterienstämme (mit Zielvektor bzw. P19) wurden mit dem Infiltrationsmedium in der finalen Lösung auf eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,7 eingestellt. Danach wurden die Zellen 1 h bei RT inkubiert, damit die Agrobakterien durch das Acetosyringon in dem Infiltrationsmedium ihre Virulenz Gene hochregulieren, die für einen Transfer der T-DNA notwendig sind. Die zu infiltrierenden *N. benthamiana* Pflanzen wurden bereits am Vorabend ausreichend gewässert und mit einer Plastikhaube bedeckt, damit deren Stomata durch die hohe Luftfeuchtigkeit ausreichend geöffnet sind. Die letztendliche Infiltration erfolgte mit einer 1 mL großen Spritze ohne Kanüle in die Blattunterseite der Blätter durch die Stomata. In der Regel wurde vor allem das erste Blattpaar infiltriert. Die Pflanzen wurden anschließend wieder in die Anzuchtkammer überführt und für weitere 2-7 Tage für nachfolgende Analysen inkubiert. In diesem Zeitraum war die Menge an gebildetem Zielprotein optimal.

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

Für die Charakterisierung von BIC1<sup>WT</sup>, BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup> wurden verschiedene biochemische Methoden verwendet. Diese waren rekombinante Expression in *E. coli*, Aufreinigung über Affinitätschromatographie, Immundetektion und unterschiedliche Analysen der Proteine.

#### 3.4.1 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression der BIC1-Konstrukte BIC1<sup>WT</sup>, BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup> erfolgte in dem IPTG-induzierbarem Vektor pET-28a (+) in dem *E. coli* Expressionsstamm *BL21 star*.

#### Reagenzien und Geräte

<b>Inkubationsschüttler</b>	MaxQ 4000 Inkubator, Thermo Scientific; B6060 Heraeus für 1,5-2 L Erlenmeyerkolben
<b>LB-Medium</b>	10 g/L Bacto-Trypton, 5 g/L Hefe-Extrakt, 5 g/L NaCl, für Platten: 15 g/L Bacto-Agar
<b>Kanamycin</b>	50 mg/mL in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 25-50 mg/L
<b>FeS0<sub>4</sub></b>	10 mM in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 10 µM
<b>5-Aminolävulinsäure</b>	100 mM in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 500 µM
<b>IPTG</b>	1 M IPTG in Aqua bidest.; Arbeitskonzentration: 1 mM
<b>PBS</b>	8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,8 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 0,24 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Eine 50 mL Flüssigkultur wurde mit transformierten *E. coli* Zellen angeimpft und bei 37 °C, ÜN und 200 rpm kultiviert. Alle verwendeten Flüssigkulturen wurde mit spezifischen Antibiotika für die Selektion versetzt. Am folgenden Tag wurden 2 mL der ÜN-Kultur in 50 mL frisches Medium überimpft und für 5 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Große 2 L Kulturen wurden mit der gesamten ‚Auffrischungskultur‘ angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,0 bei 37 °C und 200 rpm angezogen (LB-Medium wurde auf 37 °C vorgewärmt). Vorher wurde das LB-Medium der großen Kulturen mit Eisensulfat und 5-Aminolävulinsäure versetzt, um die Expression von Häm-haltigen Proteinen zu steigern. Nach Erreichen der gewünschten OD<sub>600</sub> wurden die Zellen auf Eis heruntergekühlt, durch 1 mM IPTG Zugabe die Expression

der Zielgene induziert, und bei 25 °C, ÜN und 200 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen bei 5000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und geerntet. Die Ernte erfolgte mit einer J2-91 Zentrifuge von *Beckmann* (JA-20 Rotor). Die pelletierten Zellen wurden mit 40 mL PBS gewaschen, erneut bei 4500 g und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wurden bei -80 °C bis zum Zellaufschluss weggefroren.

### 3.4.2 Aufreinigung löslicher, rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Proteine mit einem 6xHis-tag können über Nickel-Nitrilotriessigsäure- (Ni-NTA) Affinitätschromatographie aus einem Zelllysate aufgereinigt werden. Ni<sup>2+</sup> sind in der Lage, durch Austausch von Wasser mit zwei Histidin Resten des Zielproteins zu interagieren und so über eine hohe Affinität zu binden. Dieser Komplex kann erst durch die Zugabe von Imidazol und den Wechselwirkungen von Imidazol mit der Säulen-Matrix aufgebrochen werden und das Zielprotein von der Ni-NTA-Matrix verdrängen. Somit eluieren die His-getagten Proteine nach Imidazol Zugabe.

#### Puffer und Reagenzien

<b>Lysepuffer</b>	50 mM HEPES (pH 7,0), 500 mM NaCl, 10% Glycerin, 1 mg/mL Lysozym, 0,2 mg/mL DNase, 14 µM E-64, 0,25 mM AEBSF, 1 µM Pepstatin, gelöst in Aqua bidest.; steril filtriert (Nitrocellulose Membran 0,22 µm); spätere Zugabe von Triton X-100 auf Endkonzentration von 1%
<b>Proteinpuffer</b>	50 mM HEPES (pH 7,0), 300 mM NaCl, 10% Glycerin, gelöst in Aqua bidest.; steril filtriert (Nitrocellulose Membran 0,22 µm)
<b>Imidazol Puffer</b>	1 M Imidazol, 50 mM HEPES (pH 7,0), 300 mM NaCl, 10% Glycerin, gelöst in Aqua bidest.; steril filtriert (Nitrocellulose Membran 0,22 µm)
<b>HisTrap-Säule</b>	1 mL HisTrap HP, GE Healthcare

Vor der Aufreinigung der Zielproteine über Affinitätschromatographie an einem *Äkta-Purifier-System* (P10, GE Healthcare) wurden die zuvor pelletierten *E. coli* Zellen lysiert und aufgeschlossen. Die Zellen wurden in einem 50 mL Reaktionsgefäß auf Eis aufgetaut und mit 35 mL, eiskaltem Lysepuffer versetzt und resuspendiert. Zur Zellyse wurde eine *French-Press*

(ca. 1000 psi) verwendet, und die Zellen wurden in drei Durchgängen aufgeschlossen. Hierbei hatte die Zelle eine Temperatur von 4 °C. Das Lysat wurde bei 30000 g und 4 °C für 75 min zentrifugiert, sodass die Zelltrümmer und anderes unlösliches Material pelletiert wurden und lösliche Proteine im Überstand vorlagen.

Bevor das Lysat auf die *HisTrap*-Säule und somit auf die Ni-NTA-Matrix beladen wurde, wurde diese zuvor mit 20 SV (Säulenvolumina) Proteinpuffer äquilibriert. Das Äquilibrieren, das Beladen, und einzelne Waschschrte der Säule erfolgte über eine Peristaltikpumpe. Nachdem das Lysat auf die Säule geladen wurde, wurde dem Lysepuffer Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 1% hinzugefügt und 10 SV über die Säule gegeben, sodass unerwünschte Proteine herausgewaschen wurden. Im Anschluss wurde die Säule mit 20 SV Proteinpuffer nachgewaschen, um das Triton X-100 herauszuwaschen, sodass die Säule an das *Äkta-Purifier-System* angeschlossen werden konnte. Hier wurde ein Imidazol-Stufengradient als Programm zur Aufreinigung *His-getagter* Proteine verwendet. Dabei wurde zu Beginn mit 5 SV, 5%-igem Imidazol Puffer gewaschen und auf 10% (5 SV), 20% (5 SV), 40-50% (5 SV) und 100% (5 SV) erhöht. Die Proteine eluieren bei spezifischen Imidazol Konzentrationen. Die Elution wurde dabei über die Absorption bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 415 nm (Häm) detektiert. Die Proteinlösungen wurden im Anschluss aufkonzentriert und die Imidazol-Konzentration durch Pufferaustausch auf unter 0,2 mM verringert.

### 3.4.3 Aufkonzentrieren von Proteinen

#### Puffer und Reagenzien

<b>Proteinpuffer</b>	50 mM HEPES (pH 7,0), 300 mM NaCl, 10% Glycerin, gelöst in Aqua bidest.
<b>Membran-konzentrator</b>	Amicon™ Ultra 10 kDa MWCO, Millipore

Das Aufkonzentrieren von Proteinlösungen und einhergehender Pufferaustausch erfolgte über einem Membrankonzentrator. Die Proteinlösung wurde 20 min bei 3940 g und 4 °C zentrifugiert. Puffer und Proteine kleiner als 10 kDa wurden durch den *cut-off* Filter hindurchzentrifugiert und verworfen. Zu der Proteinlösung wurde neuer Proteinpuffer hinzugegeben. Nach mehrmaligen Zentrifugationsschritten wurde das gewünschte Volumen bzw. die gewünschte Konzentration erreicht. Zusätzlich wurde so der Imidazol-haltige Puffer

gegen Proteinpuffer ausgetauscht. Die BIC1-Proteine sind größer als 10 kDa und verbleiben daher in dem Überstand.

### 3.4.4 Denaturierender Proteinextrakt aus *A. thaliana* Keimlingen

Zur Gesamtproteinextraktion wurden zwei verschiedene Methodiken angewendet. Bei ergrünten Pflanzen können Chlorophyll-haltige Massenproteine aus Chloroplasten ein stark störendes Signal während des *Western Blots* mit dem Infrarot *Imaging System* geben. Aus diesem Grund wurde durch mehrere Waschschrte mit Aceton versucht, das Chlorophyll herauszuwaschen (Hao *et al.*, 2015). Diese Methode wurde bei der Isolation von 3xHA-BIC1 aus *N. benthamiana* angewendet.

#### Puffer und Geräte

<b>Zellmühle</b>	MM200, Retsch
<b>Proteinextraktions-Puffer</b>	100% (v/v) Aceton, 10% (w/v) Trichloressigsäure, 4,5 mM DTT
<b>Waschpuffer</b>	100% (v/v) Aceton, 45 mM DTT
<b>5xSDS-Probenpuffer</b>	225 mM Tris-HCl (pH 6,8), 250 mM DTT, 5% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau

Blattproben wurden zwischen den Arbeiten in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert bzw. heruntergekühlt. 35-40 mg Pflanzenmaterial wurden mit 2 Stahlkugeln in einem Aufschlussgefäß in eine Zellmühle eingespannt und 3x für 30 s bei 30 Hz aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurde das Pulver in 1 mL Extraktionspuffer resuspendiert und für 1 h bei -20 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 20000 g bei 4 °C und 15 min wurde der Überstand dekantiert und das Präzipitat in 1 mL Waschpuffer resuspendiert. Im Anschluss wurde die Lösung erneut bei -20 °C für 30 min präzipitiert. Dieser Waschrst wurde so lange wiederholt, bis das Präzipitat weiß gefärbt war. In der Regel wurde dies nach 2-3 Waschrst erreicht. Das weiße Präzipitat wurde für 15 min bei RT unter Vakuum gezogen, um die Aceton Reste zu entfernen. Das Präzipitat wurde in SDS-Probenpuffer resuspendiert und für die SDS-PAGE 10 min bei 95 °C gekocht. Vor dem Auftragen der Probe auf ein SDS-Polyacrylamid Gel wurde diese bei 20000 g auf RT für 15 min zentrifugiert, um unlösliches Material zu pelletieren.

In der Regel wurden *Arabidopsis*-Keimlinge im Dunkeln angezogen, wenn der Gesamtproteinextrakt mittels *Western Blot* untersucht werden sollte. Nachfolgend beschriebene Methode wurde bei allen stabilen *A. thaliana* Überexprimierer-Linien angewendet. Durch die Aufzucht in Dunkelheit besitzen die Keimlinge keine ausgebildeten Chloroplasten und zeigen keine störenden Hintergrundsignale durch Chlorophyll-haltige Proteine. Somit konnte auf Waschschrte mit Aceton verzichtet werden und direkt nach dem Aufschluss SDS-Probenpuffer auf den Extrakt gegeben werden (Wang *et al.*, 2017b).

#### **Puffer und Reagenzien**

<b>SDS-Probenpuffer</b>	120 mM Tris-HCl (pH 7,0), 4 % SDS, 5% Glycerol, 10 mM TCEP (neutraler pH-Wert), 0,05% (w/v) Bromphenolblau
-------------------------	--

Die Blattproben wurden wie zuvor behandelt, jedoch nach dem Aufschluss in der Zelmühle direkt in SDS-Probenpuffer resuspendiert.

#### **3.4.5 Aufreinigung von BIC1-GFP aus *N. benthamiana* und Immunpräzipitation mittels $\alpha$ GFP-Agarose beads**

BIC1-GFP wurde transient in *N. benthamiana* exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, mittels  $\alpha$ GFP-Antikörpern das Protein BIC1-GFP zu immunpräzipitieren und in der Massenspektrometrie analytisch zu untersuchen. Hierbei wurden GFP-Trap Agarose beads von Chromotek verwendet. Diese geben aufgrund fehlender leichter Antikörperketten kein störendes Signal in der Massenspektrometrie und somit kann das Zielprotein direkt an den Agarose beads tryptisch verdaut und massenspektrometrisch untersucht werden. Generell wurde für die Immunpräzipitation das Protokoll von Chromotek für „GFP IP of *A. thaliana* plant samples“ verwendet (Hubner *et al.*, 2010).

### Puffer und Reagenzien

<b>Lysepuffer</b>	25 mM HEPES/KOH (pH 7,4-7,5), 100 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,5% Tergitol 15-S-9; 10 mM DTT; 10 mL pro 8 g Blattmaterial
<b>Waschpuffer</b>	25 mM HEPES/KOH (pH 7,4-7,5), 100 mM NaCl, 5% Glycerol
<b>Protease Inhibitoren</b>	PI-Cocktail “ <i>for plant cell and tissue extract</i> ”, 3,3 $\mu$ L pro 100 mg Blattmaterial, Sigma-Aldrich
<b>DNase</b>	1,5 $\mu$ g pro 100 mg Blattmaterial
<b>Sterilfilter</b>	0,45 $\mu$ m Filtropur S, Sarstedt
<b>Antikörper</b>	$\alpha$ GFP-Agarose <i>Beads</i> , Chromotek

*N. benthamiana* Pflanzen wurden vor der Proteinisolation mit *A. tumefaciens* inokuliert, welche mit pUBC-GFP-Dest V049 BIC1-GFP transformiert worden waren (siehe 3.3.5). Nach 4 d Inkubation in der Anzuchtammer unter Langtag-Bedingungen wurde ein infiltriertes Blatt unter einem KLSM analysiert. Bei 488 nm Anregung und Detektion der Emission bei 500 – 550 nm wurde überprüft, ob GFP-Signal detektiert werden kann. Bei Verifizierung wurden die infiltrierten Blätter geerntet und nach einfrieren in flüssigem N<sub>2</sub> bei -80 °C gelagert. Ca. 8 g Blattmaterial wurden für die Immunpräzipitation eingesetzt. Das Blattmaterial wurde unter Einsatz von flüssigem N<sub>2</sub> zu feinem Pulver gemörsert. Protease-Inhibitoren, DNase und Lysepuffer wurden zu dem Pulver gegeben, vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde das Lysat mehrmals durch eine Nadelspitze (0,8 x 40 mm) gedrückt, um den Aufschluss zu verbessern. Nach der Inkubation wurde das Lysat bei 20000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, sodass die Zelltrümmer pelletiert wurden. Der Überstand wurde durch einen 0,45  $\mu$ m Sterilfilter filtriert. Zuvor wurden die  $\alpha$ GFP-*Beads* nach dem Protokoll von Chromotek gewaschen und zu dem Lysat gegeben. Die Agarose *beads* inkubierten 20-60 min bei 6 °C während das Lysat in dieser Zeit invertiert wurde. Im Anschluss wurden die Agarose *beads* bei 2500 g für 5 min bei 4 °C pelletiert und in ein kleines Reaktionsgefäß überführt. Die *Beads* wurden einmal mit Lysepuffer und 2–3-mal mit Waschpuffer gewaschen. Im letzten Schritt wurde der Waschpuffer dekantiert. Die *Beads* wurden entweder direkt in die Massenspektrometrie (Uni Marburg, Fachbereich Chemie) überführt, oder auf ein SDS-Polyacrylamid Gel beladen.

### 3.4.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung von Konzentrationen von Proteinlösungen wurde entweder die Bradford oder Amidoschwarz-Methode verwendet. Bei Proteinlösungen ohne SDS, sprich native, lösliche Extrakte, wurde stets die Methode nach Bradford verwendet. Diese ist jedoch nicht durchführbar, wenn die Extrakte SDS enthielten. In einem solchem Fall wurde stets die Methode mit Amidoschwarz durchgeführt.

#### 3.4.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

##### Reagenzien und Geräte

<b>Bradford-Lösung</b>	Roti-Quant x5 (Roth, Karlsruhe)
<b>Proteinstandard</b>	10 mg/mL BSA
<b>UV/VIS-Spektrometer</b>	GeneQuant 1300, GE Healthcare

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung von Proteinlösungen, die kein SDS enthielten, war die Bradford-Methodik die Methode der Wahl (Bradford, 1976). Die Proteine mit unbekannter Konzentration binden den Farbstoff Coomassie Brillant Blau G-250. Durch die Wechselwirkungen mit den sauren Aminosäureseitenketten verschiebt sich die Absorption des Farbstoffes von 465 zu 595 nm. Die Ausbildung dieses Protein-Farbstoff Komplexes ist bereits nach 2 min abgeschlossen und die Absorption kann mit einem Fotometer bestimmt werden. Für eine genaue Konzentrationsbestimmung ist eine Eichgerade mit BSA bekannter Konzentration und der Bradford-Lösung durchgeführt worden. Die Absorption von 595 nm wurde ermittelt. Hierbei wurde das Lambert-Beer-Gesetz verwendet, bei dem die Konzentration eines Stoffes sich linear zu dessen Absorption verhält.

### 3.4.6.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mit Amidoschwarz

#### Puffer und Reagenzien

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

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen, die aufgrund der Extraktionsmethode SDS enthielten, wurde die Amidoschwarz-Methode verwendet, da diese im Vergleich mit anderen Methoden relativ robust gegenüber SDS ist (Popov *et al.*, 1975). Wenn Proteine den Farbstoff Amidoschwarz binden, lassen sich diese spektroskopisch bei einer Absorption von 615 nm detektieren. Somit lässt sich die Proteinkonzentration über die OD<sub>615</sub> bestimmen. Um auf die gemessene Proteinmenge schließen zu können, muss vorher eine Eichgerade mit einer Proteinlösung erstellt werden, dessen Konzentration bekannt ist. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet.

Von den zu untersuchenden Proben mit unbekannter Konzentration wurden 10-20 µL mit Aqua bidest. auf 200 µL aufgefüllt und zu 800 µL Amidoschwarz-Arbeitslösung gegeben. Nach gründlicher Durchmischung der Proben wurden diese bei RT mit 10000 g für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 1 mL Waschlösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach erneutem Dekantieren wurde das Pellet für ca. 30 min auf RT getrocknet und mit 1 mL Natronlauge resuspendiert. Durch die Natronlauge wurde der Farbstoff Amidoschwarz wieder in Lösung gebracht und konnte bei OD<sub>615</sub> gemessen werden. Das Fotometer wurde zuvor mit einer Probe genullt, die kein Protein enthielt, jedoch wie die anderen Proben mitgeprobt wurde.

### 3.4.7 Elektrophorese von Proteinen

#### Puffer, Reagenzien und Geräte

<b>SDS- Probenpuffer Red</b>	+ 120 mM Tris-HCl (pH 7,0), 4% (w/v) SDS, 5% Glycerol, 10 mM TCEP (pH-neutral), Bromphenolblau (Spatelspitze)
<b>SDS- Probenpuffer Red</b>	- 120 mM Tris-HCl (pH 7,0), 4% (w/v) SDS, 5% Glycerol, Bromphenolblau (Spatelspitze)
<b>Acrylamid-Gele</b>	<i>Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, 4-15%, Bio-Rad</i>
<b>Lämmli-Puffer</b>	250 mM Tris, 1,82 M Glycin, 1% (w/v) SDS
<b>Proteinmarker</b>	<i>Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad</i>
<b>Gelkammer- System</b>	Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad

Mithilfe der SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis*) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das Detergens SDS im Probenpuffer bindet dabei als anionisches Tensid kovalent an Proteine. Die Proteine haben entsprechend ihrer Größe eine spezifische Anzahl an SDS-Molekülen gebunden und somit eine spezifische negative Formalladung. Diese wandern dann in einem elektrischen Feld zur Anode und können so anhand ihres Molekulargewichtes differenziert und analysiert werden. Hierbei migrieren kleine Proteine schneller durch die SDS-Polyacrylamid Gele, da deren Mobilität durch die vernetzten Polyacrylamid-Poren des Gels höher ist. Die Eigenschaften der Auftrennung kann bspw. durch eine veränderte Konzentration an Polyacrylamid (PAA) verändert werden. In dieser Arbeit wurde ein vorgefertigtes Gradienten-Gel (PAA-Konzentration 4-15%) von *Bio-Rad* verwendet. Zuvor wurden die Proteine im SDS-Probenpuffer für 10 min bei 95 °C gekocht, sodass deren Tertiär- und Sekundärstruktur zerstört wurde. Die Proben wurden in einem elektrischen Feld bei konstant 30 mA pro Gel und maximal 300 V aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde ein Lämmli-Puffer verwendet. Als Proteinmarker wurden 3 µL des *Precision Plus Protein Dual Color Standard Markers* geladen.

Folgend konnten die Gele entweder für *Western Blots* oder Coomassie-Färbungen verwendet werden.

### 3.4.8 Coomassie Färbung

#### Reagenzien und Geräte

<b>Inkubations- schüttler</b>	3005, GFL
<b>Färbelösung</b>	0,05% (w/v) Coomassie R250, 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig
<b>Entfärbelösung</b>	10% (v/v) Eisessig

Für die Visualisierung von Proteinen auf einem PAA-Gel ist die Färbung mit Coomassie eine schnelle und einfache Methode. Durch die Zugabe der Färbelösung fallen die sich im Gel befindlichen Proteine aus und binden den Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie. Die Färbung kommt zustande, indem Coomassie an die basischen Seitenketten der Aminosäuren bindet. Das Gel wurde zusammen mit der Färbelösung zur Beschleunigung der Reaktion für ca. 1 min in der Mikrowelle erhitzt und bis zu 8 h bei RT und 100 rpm inkubiert. Danach wurde das Gel in der Entfärbelösung so lange gewaschen, bis der gewünschte Entfärbungsgrad erreicht wurde und die einzelnen Proteinbanden visuell erkennbar waren.

### 3.4.9 *Western Blot*

Für den Nachweis eines Zielproteins in einem Proteingemisch wurde die Methodik des *Western Blots* angewendet (Towbin *et al.*, 1979). Hierbei wurde nach der SDS-PAGE ein Transfer der Proteine aus einer 3D-Matrix heraus auf eine Protein-bindende Membran durchgeführt. Die Proteine auf der neuen 2D-Matrix lassen sich dann mittels Immundetektion spezifisch nachweisen.

### 3.4.9.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran im *Wet-Blot* Verfahren

#### Puffer und Reagenzien

<b>Transfer-Puffer</b>	48 mM Tris-base, 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol
<b>Blotting-Papier</b>	MN 827 B, Macherey-Nagel
<b>Nitrocellulose-Membran</b>	Porablot NCP, Porengröße 0,45 µm, Macherey-Nagel N Hybond ECL 0,45 µm, Amersham Biosciences
<b>PVDF-Membran</b>	Porablot PVDF, Porengröße 0,2 µm, Macherey-Nagel
<b>Gelkammer-System</b>	Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad

Für den Transfer werden bei dem *Wet-Blot* Proteine auf eine Membran durch ein elektrisches Feld migriert. Dabei sind alle Komponenten, sprich *Blotting*-Papier, Gel und Membran mit dem Transfer-Puffer überschichtet, sodass ein kontinuierlicher Stromfluss durch die Zelle gewährleistet ist.

Die Membran wurde für 15 min im Transfer-Puffer vor Beginn des Transfers äquilibriert. Für den Transfer wurden alle Komponenten so zusammengebaut, dass die Proteine in Richtung Anode auf die Membran migrieren. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Membran vorhanden sind, da ansonsten der Transfer behindert wäre. Das elektrische Feld wurde bei konstant 90-100 V und ca. 0,25 A betrieben. Um Überhitzung vorzubeugen, wurde ein Kühlakku mit in den Puffertank gegeben. Je nachdem, ob ein Proteinnachweis mittels LiCOR-Systems oder mit der *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) Methode durchgeführt wurde, wurde entweder eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran verwendet. Eine PVDF-Membran hat den Vorteil, dass sie eine höhere Stabilität aufweist als Nitrocellulose und daher besser für *ECL* geeignet ist.

### 3.4.9.2 Immundetektion von Proteinen

#### Puffer und Reagenzien

<b>Blocking-Puffer</b>	5% (w/v) Milchpulver (Roth) in TBS
<b>TBS</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl
<b>Primäre Antikörper</b>	200 ng/mL ( $\alpha$ HA; Klon 3F10, Ratte), 0,2 ng/mL ( $\alpha$ Tubulin, Maus), 200 ng/mL ( $\alpha$ His, Maus) in 20 mL TBS 20 $\mu$ L des Serums $\alpha$ crv1 (Kaninchen)
<b>Sekundäre Antikörper</b>	100 ng/mL in 20 mL TBS

Die an den *Western Blot* anschließende Immundetektion resultiert aus der Spezifität von Antikörpern zu Zielproteinen, die auf der Membran gebunden sind. Dies ist bspw. durch spezielle Protein-tags erreichbar, welche spezifische Antikörper binden können. Der spezifische Antikörper-Protein-Komplex lässt sich durch verschiedene Methoden visualisierbar machen.

Vor der Immundetektion wurde die zu probende Membran für mindestens 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C in 5% (w/v) Milchpulver geblockt. Dabei werden die Stellen auf der Membran, an der keine Proteine gebunden sind, mit unspezifischen Proteinen aus dem Milchpulver besetzt, sodass die Antikörper für den Proteinnachweis nicht unspezifisch an die Membran binden und eine falsch-positives Signal geben.

Im Anschluss wurde die Membran dreimal mit TBS für jeweils 15 min gewaschen, sodass überschüssiger *Blocking-Puffer* herausgewaschen wurde. Grundsätzlich wird zwischen primären und sekundären Antikörpern unterschieden. Primäre Antikörper binden an ein spezifisches Epitop des Zielproteins oder an ein Protein-tag (z.B. His- oder HA-tag). Sekundäre Antikörper erkennen spezifisch den eingesetzten primären Antikörper und binden diesen. Dieser ermöglicht die Detektion im Anschluss des Immunblottings, beispielsweise über eine Fluoreszenzmarkierung (detektierbar über das *LiCOR-System*) oder einer Konjugation mit *Horseradish peroxidase* (detektierbar über *ECL*). Teilweise können mehrere sekundäre Antikörper einen primären Antikörper binden und sorgen dadurch für eine Signalverstärkung.

Der Primäre Antikörper wurde in einer Konzentration von 200 ng/mL in 20 mL TBS gelöst und auf die Membran gegeben. Dieser inkubierte mindestens für 1 h auf RT oder ÜN bei 4 °C. Im

Anschluss wurde die Membran erneut dreimal mit TBS für 15 min gewaschen und 100 ng/mL des sekundären Antikörpers in TBS wurde für 1 h auf RT mit der Membran inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS erfolgte die Detektion.

### 3.4.9.3 Proteinnachweis mittels *LiCOR Odyssey Infrared Imaging System*

#### Puffer und Reagenzien

<b>Sekundäre Antikörper</b>	$\alpha$ Mouse IRDye700 CW (Tubulin), $\alpha$ Rat IRDye800 CW (für HA-Nachweis) $\alpha$ Mouse IRDye800 CW (für His-tag Nachweis)) $\alpha$ Rabbit IRDye 800 CW (für cry1 Nachweis); 0,1 ng/mL
<b>TBS</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl

Die Wahl der Detektions-Methode hängt unter anderem von den sekundären Antikörpern ab. Bei einem Proteinnachweis mit dem *LiCOR-System* werden sekundäre Antikörper verwendet, die mit einem Fluoreszenzmarker gelabelt sind. Die Fluorophore IRDye700 und IRDye800 (Firma *LiCOR*) werden bei einer Wellenlänge von 685 nm bzw. 785 nm angeregt und emittieren im längerwelligen Bereich. Der Vorteil zweier unterschiedlicher Detektions-Kanäle besteht darin, dass zwei unterschiedliche Zielproteine gleichzeitig detektiert und analysiert werden können. Des Weiteren lässt sich mit dem *LiCOR-System* die Proteinmenge quantifizieren, da eine Linearität zwischen emittierter Signalstärke und Zielproteinmenge über einen weiten Bereich besteht. Von Nachteil bei dieser Methode ist, dass die gesamte Membran mit den Lasern angeregt wird. Somit emittieren auch Proteine, welche bei 685 nm bzw. 785 nm absorbieren und sorgen somit für unspezifisches Signal. Dies ist besonders bei Proteinextrakten aus grün-gewachsenen Pflanzen relevant. Unter anderem aus diesem Grund wurde häufig auf die Methode des *ECL* zurückgegriffen.

### 3.4.9.4 Proteindetektion mittels *Enhanced Chemiluminescence (ECL)*

#### Puffer und Reagenzien

<b>Sekundäre Antikörper</b>	$\alpha$ Rat HRP-konjugiert (HA)
<b>TBS</b>	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl
<b>Luminol/Enhancer Lösung, Peroxid Lösung</b>	<i>Clarity<sup>TM</sup> Western ECL Substrate</i> , Bio-Rad
<b>Entwickler</b>	Entwickler, Carestream Dental; Kodak
<b>Fixierer</b>	Fixierer, Carestream Dental; Kodak
<b>Waschbad</b>	3% (v/v) Essigsäure
<b>Hyperfilm ECL<sup>TM</sup></b>	Amersham Biosciences
<b>Hypercassette<sup>TM</sup></b>	Amersham Biosciences

Eine Alternative zu dem Infrarot-Detektionssystem ist die Proteindetektion über *ECL*. Ein Vorteil dieser Methode ist unter anderem, dass sie deutlich sensitiver ist als über Fluoreszenzmarker, und dass somit geringere Mengen an Zielprotein nachgewiesen werden können. Bei der *ECL*-Methode sind die sekundären Antikörper mit HRP-konjugiert. Diese ist in der Lage, enzymatisch Wasserstoffperoxid und Luminol umzusetzen, sodass Photonen frei werden. Diese chemilumineszente Reaktion kann durch Auflegen eines lichtsensitiven Films auf die Membran sichtbar gemacht werden.

Nach dem letzten Waschriff während des Immunblottings wurden die Substrat Lösungen mit Luminol und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:1 gemischt und für 5 min auf der Membran inkubiert. Dabei wurde die Reaktion mit Luminol und Wasserstoffperoxid gestartet. Die Membran sollte dabei vollständig mit dem Substrat bedeckt sein. Nach der Inkubation wurde das Substrat verworfen und die Membran in eine Plastikfolie eingelegt, sodass Austrocknen verhindert wurde. In einem abgedunkelten Raum mit einer Dunkelrotlicht-Quelle wurde der lichtsensitive Hyperfilm<sup>TM</sup> auf die Membran aufgelegt und in einer Hypercassette<sup>TM</sup> inkubiert. Die Dauer der Exposition kann je nach Signalstärke individuell angepasst werden (von 10 s bis 30 min). Der Film wurde im Anschluss in Entwickler so lange eingelegt, bis sich ein gewünschtes Resultat zeigte. Die Reaktion wurde durch eine kurze Inkubation in 3% (v/v)

Essigsäure gestoppt und anschließend bis zu 3 min in der Fixierer-Lösung inkubiert. Der Film wurde dann in Leitungswasser gewaschen, getrocknet und bis zur Auswertung gelagert.

### 3.4.10 *Native-PAGE*

#### Puffer und Reagenzien

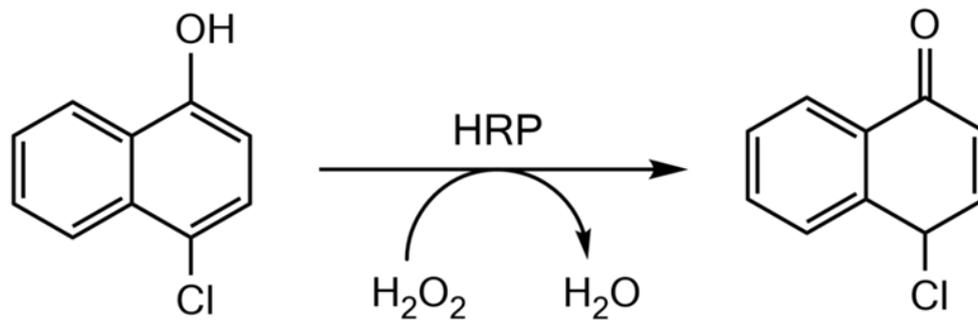
<b>Natives Gel</b>	Mini-PROTEAN TGX Precast Gel 4-15%; Bio-Rad
<b>Ladepuffer</b>	62,6 mM Tris HCl (pH 7,1), 40% Glycerin; Spatelspitze Bromphenolblau
<b>Laufpuffer 10x</b>	0,25 M Tris base, 1,9 M Glycine (pH 8,3)
<b>Laufpuffer 1x</b>	90% (v/v) Aqua bidest., 10% (v/v) Laufpuffer 10x
<b>Proteinpuffer</b>	50 mM HEPES (pH 7,0), 300 mM NaCl, 10% Glycerin, gelöst in Aqua bidest.

Da es sich bei der *Native-PAGE* um eine Methode handelt, Proteine nicht denaturiert auf ein Gel aufzutragen, also im nativen Zustand, wurden alle Arbeiten soweit möglich auf Eis oder im Kühlraum bei ca. 6 °C durchgeführt. Da die Proteine eine unterschiedliche Ladung besitzen, kann in der *Native-PAGE* nicht mehr nach Molekulargewicht der Proteine differenziert werden. Die Proteinlösungen wurden je nach gewünschter Konzentration zuvor mit einem Proteinpuffer verdünnt und mit dem Ladepuffer gemischt. Der Laufpuffer wurde ohne SDS hergestellt. Nachdem das Gel mit den Proteinlösungen beladen wurde, wurde dieses 1 h lang bei niedriger Stromstärke (20 mA) laufen gelassen, bis das BPB des Puffers aus dem Gel herausgelaufen ist. Im Anschluss konnte das Gel z.B. für Coomassie-Färbungen, *Western Blots* oder Chloronaphthol-*Assays* verwendet werden.

#### 3.4.10.1 Test auf Peroxidaseaktivität durch Chloronaphthol

Mit Hilfe des Substrates Chloronaphthol (4-chloro-1-naphthol, 4-CN) wurde auf Peroxidaseaktivität von BIC1 getestet. Dabei wurde eine 1-Step™ Chloronaphthol-Lösung von Thermo Scientific verwendet. Chloronaphthol reagiert spezifisch mit *Horseradish peroxidase* zu einem visuellen, sichtbaren, bläulichen Präzipitat (Young, 1989; Farka *et al.*, 2016). Dabei katalysiert HRP zusammen mit dem Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid 4-CN zu benzo-4-chlorocyclohexadieone (**Abb. 13**). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch BIC1

Chloronaphthol als Substrat in Anwesenheit von  $H_2O_2$  verwenden kann, sodass auf eine Peroxidaseaktivität geschlossen werden könnte. Die zuvor angesetzte *Native-PAGE* und das anschließende Gel wurde für 1 h in der Chloronaphthol-Lösung bei  $6^\circ C$  inkubiert. Anschließend wurde mit dem *GelDoc-System* von *Bio-Rad* eine Fotografie des Gels aufgenommen.



**Abb. 13: Vereinfachte Darstellung des Wirkungsmechanismus von *Horseradish peroxidase* mit Chloronaphthol.** Gezeigt ist die katalytische Konversion von 4-CN zu Benzo-4-chlorocyclohexadienone durch HRP und dem Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid (Modifiziert nach Farka *et al.*, 2016).

### 3.5 Pflanzen Assays

#### Reagenzien und Geräte

<b>Bestrahlungs-Kammern</b>	Flora-LED CLF, Plant Climatics Germany; programmierbares Modell V7 und Modell 201 V7
<b>Anzuchtschrank</b>	CLF Plant Climatics Germany; Modell PGC-7HO
<b>½ MS-Medium</b>	2,15 g/L Murashige-Skoog-Salzmischung, 0,5 g/L MES-KOH (pH 5,7), 9 g/L Phyto-Agar, steril
<b>Sterilisationslösung</b>	5% NaOCl, 0,05% Tween
<b>Pikiererde</b>	Ohne Zusatz von Dünger

Zur Analysierung und Auswertung der Phänotypen der  $BIC1^{WTox}$ - und  $BIC1^{3CAox}$ -Pflanzenlinien, wurden mehrere *Assays* durchgeführt. Diese sollten einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen BIC1 und Cryptochromen dienen.

### 3.5.1 Bestrahlung und Hypokotyllängenbestimmung

Zu untersuchende *A. thaliana* Linien wurden (nach 3.1.2) auf ½ MS-Medium ausgesät und stratifiziert. Nach der Keiminduktion für 4 h in der Anzuchtkammer und anschließender Keimung für 20 h in Dunkelheit bei RT wurden die Keimlinge in die entsprechenden Lichtbedingungen überführt.

Hierbei wurden mit LEDs für Blaulicht 474 nm 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , für Rotlicht 658 nm 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  und für Dunkelrotlicht 741 nm 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  eingestellt. In den Bestrahlungskammern herrschte RT. Die Bestrahlungsdauer für die Messung von Hypokotyllängen betrug 4 d. Nach der Bestrahlung wurden die Keimlinge auf schwarze Pappe ausgelegt und von oben abfotografiert. Hierbei muss der Abstand von Kamera zu Keimlingen immer gleichbleiben. Die Hypokotyllängen wurden in der Software *ImageJ* ausgewertet.

Für die Bestrahlung von *cry1* und *cry1*<sup>L407F</sup> Pflanzen wurde 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  Blaulicht verwendet. Die Stratifikation erfolgte für 1 Tag.

### 3.5.2 Blühzeitbestimmung

Nach Aussaat auf Erde (nach 3.1.2) wurden die Pflanzen in große Anzucht-Schränke überführt. Dort wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h tagsüber mit 22 °C und 50% Luftfeuchtigkeit, 115-120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 8 h nachts mit 18 °C und 50% Luftfeuchtigkeit) angezogen. Die Blühzeitpunkte wurden notiert, wenn die Pflanzen bereits eine erste leicht geöffnete Blüte hatten.

*Cantiles* wurden 9 Wochen nach Keimung fotografiert.

### 3.5.3 Shade-Avoidance Typisierung

Nach Aussaat auf Erde (nach 3.1.2) wurden die Pflanzen in große Anzucht-Schränke überführt. Dort wurden die Pflanzen 3 Wochen unter Langtagbedingungen (16 h tagsüber mit 22 °C und 50% Luftfeuchtigkeit, 115-120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 8 h nachts mit 18 °C und 50% Luftfeuchtigkeit) angezogen. Die Pflanzenrosetten wurden nach 3 Wochen mit einer Plastikpetrischale plattgedrückt und eine Fotografie wurde von oben aufgenommen. Eine 1-Cent Münze diente

dabei als Referenz und wurde mitfotografiert. Der Rosetten-Durchmesser, sowie auch die Blatt-Oberfläche wurde ermittelt, indem die Fotografien in die Software *ImageJ* eingefügt wurden.

### 3.6 Spektroskopische Methoden

Die spektroskopische Charakterisierung der aufgereinigten BIC1-Varianten wurde mit Hilfe von UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt.

#### 3.6.1 UV/VIS-Spektroskopie

Mit der Methode der UV/VIS-Spektroskopie wurde untersucht, ob BIC1 und BIC1-Mutanten eine Affinität zu Häm und Häm-Analoga besitzen, erkennbar durch eine Änderung des Absorptionsspektrums.

#### Reagenzien und Geräte

<b>Fotometer</b>	Zweistrahlfotometer UV-1800; Shimadzu, Japan
<b>Quarzglasküvette</b>	Ultra-Mikro-Küvette 105.250-QS SD, Quarzglas Suprasil, Hellma
<b>Proteinpuffer</b>	50 mM HEPES (pH 7,0), 300 mM NaCl, 10% Glycerin, gelöst in Aqua bidest.
<b>Hämin Lösung</b>	1 mM Hämin in DMSO; Arbeitskonzentration 10 $\mu$ M
<b>Pd-mP Lösung 250 mL</b>	1/10 PBS-Lösung, 0,05% Silwet L-77 (Momentive Performance Materials GmbH), 10 $\mu$ M Pd (II) Mesoporphyrin IX zuvor in 1 mL DMSO gelöst (Frontier Scientific), kühl und dunkel lagern; Arbeitskonzentration 10 $\mu$ M

Bei der UV/VIS-Spektroskopie wird die Absorption einer Substanz im ultravioletten und sichtbaren Spektrum gemessen. Das verwendete Zweistrahlfotometer misst die Absorption der zu untersuchenden Probe gegen eine Referenzküvette. Dadurch werden nur die Unterschiede zwischen beiden Lösungen ermittelt. Die Energie der Photonen ist dabei von ihrer Wellenlänge abhängig (Einstein-Bohr-Gleichung). Für die Messung der Absorption wurden 0,5-1  $\mu$ g/ $\mu$ L Protein in Proteinpuffer in eine Quarzküvette gefüllt und gegen Proteinpuffer in der

Referenzküvette gemessen. Im Anschluss wurden 1-10  $\mu\text{M}$  der zu untersuchenden Substanz zu der Proteinlösung hinzugegeben und erneut gemessen.

### 3.6.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Bei der Fluoreszenz-Spektroskopie wird die Emission einer Substanz gemessen, nachdem diese elektromagnetische Strahlung spezifischer Wellenlänge absorbiert hat. Dabei gilt, dass die emittierte Wellenlänge weniger Energie aufweist, als die absorbierte Wellenlänge (Stokessche Gesetz).

Substanzen absorbieren anhand ihrer strukturellen Charakteristika spezifische elektromagnetische Strahlung, sodass Elektronen angeregt werden und in einen höherenergetischen Zustand gelangen. Bei der Rückkehr zu ihrem Ursprungszustand geben sie Energie in Form von messbarer Fluoreszenz ab. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fluoreszenz von Porphyrinen und von Resorufin gemessen.

#### Reagenzien und Geräte

<b>Fluoreszenz-spektrometer</b>	RF-5301PC, Shimadzu
<b>Quarzglasküvette</b>	Ultra-Mikro-Küvette 105.250-QS SD, Quarzglas Suprasil, Hellma
<b>Proteinpuffer</b>	50 mM HEPES (pH 7,0), 300 mM NaCl, 10% Glycerin, gelöst in Aqua bidest.

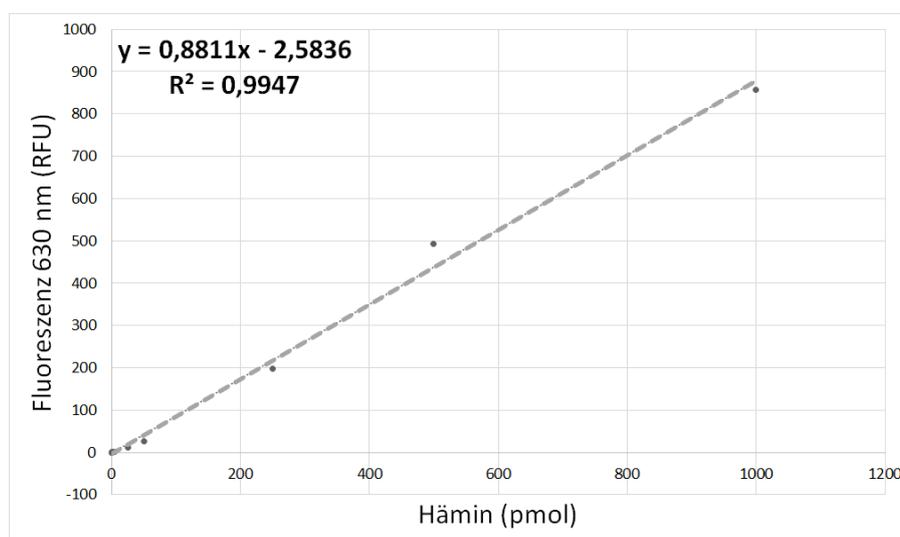
#### 3.6.2.1 Häm Quantifizierung

Mit Hilfe einer stark sauren Oxalsäure kann das Eisen-Ion aus einem Porphyrinring herausgekocht werden. Das resultierende Protoporphyrin kann mittels Fluoreszenz-Spektroskopie detektiert und quantifiziert werden, sodass Rückschlüsse auf vorhandenes Häm in den Proteinlösungen getroffen werden können (Methodik modifiziert nach Sinclair *et al.*, 1999).

## Reagenzien

<b>Oxalsäure</b>	2 M in Aqua bidest., gesättigte Säure, Überstand verwendet
<b>Hämin Lösung</b>	0,435 $\mu$ M in DMSO, aus Schwein, Sigma
<b>Proteinpuffer</b>	50 mM HEPES (pH 7), 300 mM NaCl, 10% Glycerin, gelöst in Aqua bidest.

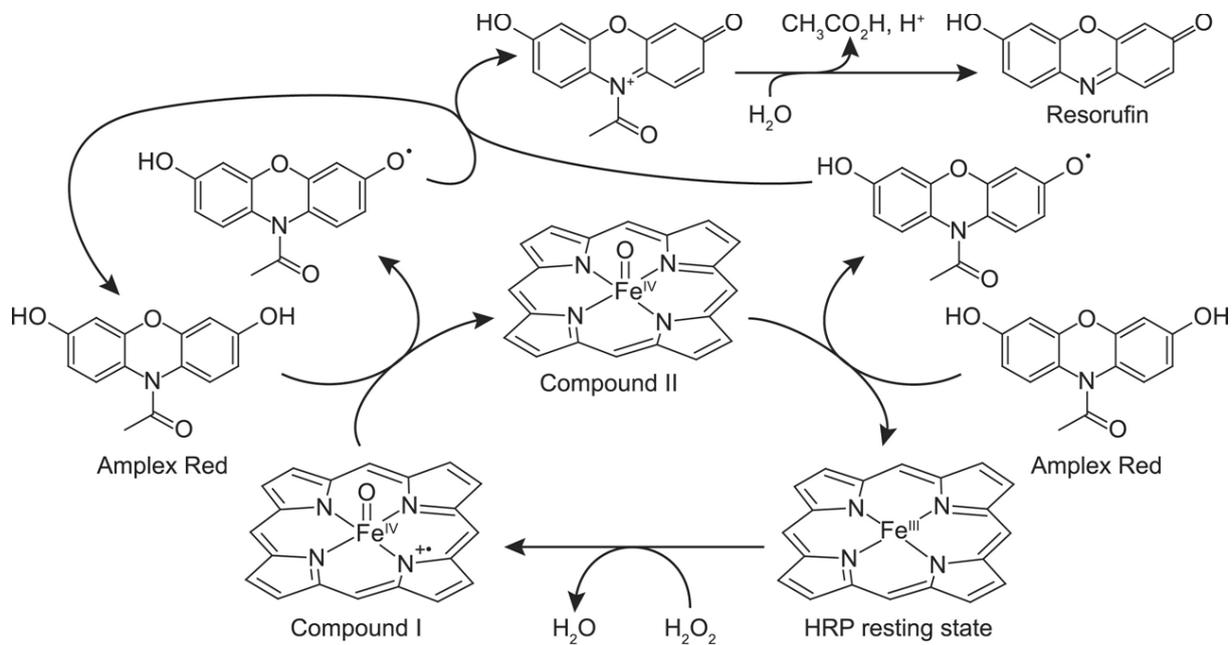
Zu 5  $\mu$ M der Proteinlösungen wurden 2 M Oxalsäure gegeben (Endkonzentration 98% (v/v); 490  $\mu$ L Oxalsäure von 500  $\mu$ L Gesamtvolumen) und diese wurden jeweils bei 95 °C für 20 min auf einem Heizblock gekocht. Gleichbehandelte Proben wurden als Kontrolle vor der Fluoreszenz Messung nicht gekocht, sodass man für die Auswertung jeweils eine Probe mit Häm und eine Probe mit Protoporphyrin misst. Ebenfalls wurden Proben unterschiedlicher Konzentrationen mit einer Hämin Lösung hergestellt, sodass später eine Eichgerade erstellt werden konnte. Beachtet werden musste, dass der *Assay* nur von 1 nM bis 1  $\mu$ M Häm Konzentration pro Ansatz linear ist. Die Emission des Protoporphyrinrings wurde bei einer Anregungswellenlänge von 406 nm bei 653 nm gemessen. Anregungs- und Emissionsmaxima wurden vorher im Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Das Spektrometer wurde mit sehr schneller Scan-Geschwindigkeit, einer hohen Sensitivität und einer Schlitzbreite sowohl bei der Emission, als auch der Anregung von 20 nm verwendet. Die gemessenen Emissionen der erhitzten Proben werden mit denen der nicht erhitzten subtrahiert und dann gegen die Häm Eichgerade getestet (**Abb. 14**).



**Abb. 14:** Eichgerade mittels linearer Regression von Lösungen unterschiedlicher Hämin Konzentration.

### 3.6.2.2 Peroxidase Assay mittels *Amplex Red*

Mit Hilfe des Reagenz *Amplex Red* (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) kann in einem Einzugschritt *Assay* die Peroxidaseaktivität von Proteinen bestimmt werden. In der Gegenwart von Peroxidasen reagiert *Amplex Red* mit Wasserstoffperoxid in einem 1:1 Verhältnis und oxidiert zu dem Produkt Resorufin, dessen spezifische Emission gemessen wurde (modifiziert nach dem Protokoll von Invitrogen zu „*Amplex Red Hydrogen Peroxide Assay Kit*“, **Abb. 15**). Während der Reaktion oxidiert HRP dabei *Amplex Red* zu Resorufin und HRP selbst empfängt Elektronen, sodass die Reaktion wiederholt werden kann (Wang *et al.*, 2017a).



**Abb. 15:** Reaktionsmechanismus von *Horseradish peroxidase* (HRP) mit *Amplex Red*. HRP kann mithilfe des Oxidationsmittels  $H_2O_2$  spezifische Substrate oxidieren. *Amplex Red* wird in diesem Fall zu dem Fluoreszenzfarbstoff Resorufin oxidiert (Anregung bei 530 nm und Emission bei 570-630 nm). Für den Test auf Peroxidaseaktivität kann die HRP durch das zu testende Protein ausgetauscht werden. Zur Übersichtlichkeit wird nur das aktive Zentrum der HRP gezeigt. Substratspezifität muss beachtet werden (Modifiziert nach Wang *et al.*, 2017a).

Durch Oxidation von HRP und Abgabe zweier Elektronen durch Wasserstoffperoxid ändert sich der Redoxzustand des Eisenatoms und lässt gleichzeitig Wasser aus Wasserstoffperoxid entstehen. Das entstandene Radikal gewinnt ein Elektron vom Substrat (hier *Amplex Red*), um in den Zustand von *Compound 2* zu gelangen. Dieser Zustand gelangt zurück zum Ausgangspunkt, indem es ein weiteres Elektron von einem anderen *Amplex Red* Molekül

gewinnt. Die genaue Reaktion der *Amplex Red* Semiquinon- Radikals hinzu Resorufin ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Hypothese ist eine bimolekulare Disproportionierung, die zu einer Deacetylierung führt, sodass letztendlich ein Resorufin und ein Amplex Red Molekül gebildet werden.

### Reagenzien

<b><i>Amplex Red</i></b>	10 mM 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine in DMSO; Cayman chemicals
<b><i>Horseradish peroxidase</i></b>	10 mU/mL in PBS 1x, Grade I AppliChem
<b>PBS 1x</b>	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	20 mM in Aqua bidest., vor Gebrauch frisch ansetzen
<b>Arbeitslösung</b>	89% (v/v) PBS 1x, 2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 0,1 mM <i>Amplex Red</i>

Die zu messenden Proteine wurden in einem 1:1 Verhältnis mit der Arbeitslösung in 100 µl zu einer Protein-Endkonzentration von 5 µM vermischt. Diese wurden dann 30 min im Dunkeln auf RT inkubiert und im Fluorimeter gemessen. Das Fluorimeter wurde mit schneller Scan-Geschwindigkeit, einer geringen Sensitivität und einer Schlitzbreite bei der Emission von 10 nm und bei der Anregung von 5 nm verwendet. Die Anregung erfolgte spezifisch für Resorufin bei 530 nm und ein Emissionsmaxima zwischen 570–630 nm (Messung am Fluoreszenzspektrometer). Als Positivkontrolle wurden 2 mU/ml HRP in 1xPBS gemessen und als Negativkontrolle eine Probe ohne HRP. Die Negativkontrolle wurde von den gemessenen Werten der Proteinlösungen subtrahiert.

### 3.6.3 Massenspektrometrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proteine mittels Massenspektrometrie am Fachbereich Chemie (Universität Marburg) verifiziert. Hierfür wurden bspw. Proteinbanden aus einer mit Coomassie-gefärbten SDS-PAGE herausgeschnitten oder Proteinlösungen nach Immunpräzipitation analysiert (qualitative Protein Identifizierung).

### 3.7 RNA-Sequenzierung

#### Pflanzenlinien und Geräte

<b><i>A. thaliana</i> Linien</b>	WT (Col-0), <i>cry1/cry2</i> (Col), BIC1 <sup>WT</sup> ox_1 (Col-0), BIC1 <sup>WT</sup> ox_2 (Col-0), BIC1 <sup>WT</sup> ox_3 ( <i>cry1/cry2</i> , Col), BIC1 <sup>WT</sup> ox_4 ( <i>cry1/cry2</i> , Col)
<b>Bestrahlungs- Kammern</b>	Flora-LED CLF, Plant Climatics Germany; Modell 201 V7

Die RNAs von unterschiedlichen *A. thaliana* Linien, angezogen unter verschiedenen Lichtbedingungen wurden sequenziert und analysiert. Hierbei wurden die ausgewerteten Daten von Kontrollen (WT und *cry1/cry2* Doppel-Knockout-Mutante), mit zwei BIC1<sup>WT</sup>ox-Linien im Col-0-Hintergrund und zwei BIC1<sup>WT</sup>ox-Linien im *cry1/cry2*-Hintergrund (Col) miteinander verglichen. Teile dieser Arbeit wurde von Kooperationspartnern durchgeführt. Die Sequenzierung der RNA-Proben erfolgte im *Cologne Center for Genomics* (Köln, Deutschland). Die Auswertung der Sequenzierungs-Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Anke Becker und mit Paul Klemm zugehörig der Arbeitsgruppe Lechner; Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg.

#### 3.7.1 Proben Aufzucht

#### Puffer und Reagenzien

<b>MS Medium</b>	4,3 g/L MS (Duchefa), 3% Saccharose, 0,05% MES, 8 g/L Phytoagar, gelöst in Aqua bidest., pH 5,7
------------------	--

Die zu untersuchenden *A. thaliana* Linien wurden Oberflächen-sterilisiert (nach 3.1.2), auf MS-Medium ausgesät und für 3 d im Kühlraum bei 4-6 °C im Dunkeln stratifiziert. Nach der Keiminduktion für 4 h in der Anzuchtammer mit Weißlicht wurden die Keimlinge für 5 d im Dunkeln bei ca. 22 °C aufgezogen. Im Anschluss wurde ein Teil der Keimlinge für 2 h in Blaulicht-Bedingungen überführt. Genutzt wurden hierfür mit Blaulicht LEDs (474 nm, 20 µmol/m<sup>2</sup>s) ausgestattete Bestrahlungs-Kammern. Die restlichen Keimlinge verblieben für diese 2 h im Dunkeln. In den Bestrahlungs-Kammern herrschten ca. 22 °C. Nach der Inkubation wurden die Keimlinge unter Grünlicht geerntet und in flüssigem Stickstoff weggefroren. Dabei

wurden die Keimlinge, ca. 60-120 mg Keimlinge pro Probe, mit einer Schere abgeschnitten, sodass kein Agar in die Proben transferiert wurde. Die Wurzeln der Keimlinge wurden nicht mitgeerntet. Es wurden vier Wiederholungen durchgeführt, wovon drei für die RNA-Sequenzierung genutzt wurden. Gelagert wurden die Proben bei -80 °C.

### 3.7.2 RNA-Aufreinigung

#### Reagenzien und Geräte

<b>Zellmühle</b>	MM200, Retsch
<b>Aufreinigungs-Kit</b>	<i>RNeasy Plant Mini Kit</i> (ID: 74904), QIAGEN; <i>RNase-Free DNase Set</i> (ID: 79254), QIAGEN
<b>Photometer</b>	NanoDrop ND 1000, Thermo Scientific

Ca. 100 mg pro Probe wurden zwischen den Arbeiten in flüssigem N<sub>2</sub> gelagert und heruntergekühlt. Zu dem Pflanzenmaterial wurden 2 Stahlkugeln in einem Aufschlussgefäß hinzugegeben, in eine Zellmühle eingespannt und 3x für 30 s bei 30 Hz aufgeschlossen. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem *RNeasy Plant Mini Kit* (ID: 74904) von QIAGEN. Anpassungen des Protokolls des Herstellers waren die Zugabe von 450 µL des Puffers RLT und die Zentrifugation in den QIAshredder-Säulen für 2 min bei 21380 g. Im Anschluss erfolgte der DNA-Verdau auf der Säule mit dem *RNase-Free DNase Set* (ID: 79254) von QIAGEN. Nach Zugabe von 350 µL RW1 Puffer und 1 min Zentrifugation bei 8000 g erfolgte der Verdau durch Zugabe von 130 µL DNase und 910 µL RDD-Puffer pro Probe für 15 min bei RT. Die Beendigung des Verdau erfolgte durch Zugabe von 350 µL RW1 Puffer und Zentrifugation bei 1 min und 8000 g. Die Proben wurden zweimal auf der Säule mit 500 µL RPE-Puffer gewaschen und erst für 1 min und dann für 2 min bei jeweils 8000 g zentrifugiert. Zum Schluss wurde die trockene Säule für 1 min bei 21380 g zentrifugiert, um die letzten Puffer-Reste zu entfernen. Die trockene, mit RNA-gebundene Säule wurde in ein RNase freies Reaktionsgefäß von Invitrogen (*non stick*) überführt. Eluiert wurde 2x mit 30 µL RNase freiem Wasser für 1 min bei 8000 g, sodass jede Probe in 60 µL Eluat vorlag. Die Konzentration der RNA wurde mit einem Photometer bestimmt.

### 3.7.3 RNA-Qualitäts Check

#### Reagenzien und Geräte

<b>System</b>	Agilent Fragment Analyser 5200
<b>Kit</b>	<i>Agilent DNF471 RNA Kit (15 nt)</i>

Der RNA-Qualitäts Check erfolgte in der AG Becker (Philipps-Universität Marburg). Die Qualität der RNA und deren Grad der Fragmentierung wurde über eine *RNA quality number* (RQN) von 1-10 bestimmt (1 steht hierbei für schlecht und degradiert; 10 für gut und intakt). Diese Zahl gibt das Verhältnis der ribosomalen 28S und 18S Einheiten an und zeigt somit die Integrität der RNA-Proben. Für eine RNA-Sequenzierung war ein RQN von 7 erforderlich, für alle Proben wurde im Durchschnitt ein Wert von 9,5 erreicht. Die Überprüfung erfolgte an einem Agilent Fragment Analyser über das Kit *Agilent DNF471 RNA Kit (15 nt)*. Die Auswertung erfolgte mit der Software *PROSize 3.0*.

Die Proben wurden an das *Cologne Center for Genomics* verschickt und dort sequenziert. Die Proben wurden im Durchlauf A006200277 und A006200283 bearbeitet.

### 3.7.4 Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Auswertung erfolgte im Rahmen einer Kooperation mit Paul Klemm (AG Lechner, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg). Als Referenz Genom wurden die sequenzierten Proben der drei biologischen Replikate gegen das *Arabidopsis* Genome TAIR10.1 gemappt. Gene, die eine größere Differenz als 2-fach in der relativen mRNA-Menge zeigten (*fold change*;  $FC > 2$ ), wurden als differentiell hoch- oder respektive herunter-reguliert betrachtet ( $FC < 2$ ). Die Auswertung erfolgte über die Programme *fastq*, *multiqc*, *samtools*, *bowtie2*, *featureCounts* und *DESeq2*.

## 3.8 Konfokale Laserscan Mikroskopie

Für Proteinlokalisationsstudien, der Untersuchung von *photobodies*, dem Bindungs-Assay von BIC1 mit Pd-mP, sowie zur Analyse von Überexpression von BIC1-GFP wurden ausgewählte Konstrukte transient in *N. benthamiana* exprimiert und mit einem konfokalen Laserscan Mikroskop (KLSM) untersucht. Dabei wurden die infiltrierten Epidermis-Zellen von

*N. benthamiana* betrachtet. Die Blattproben wurden alle von Pflanzen entnommen, welche in der Anzuchtkammer im Langtag gewachsen sind. Die vektortragenden *A. tumefaciens* Zellen wurden nach oben beschriebenem Protokoll transformiert, angezogen und inokuliert. Mit dem KLSM lassen sich Präparate mit Lasern spezifischer Wellenlängen untersuchen. Die verbauten Laser wie z.B. ein Argon-Laser emittiert mehrere Wellenlängen (z.B. 458, 488 und 514 nm). Die Intensität der einzelnen Laser bzw. Wellenlängen wird über *Acousto-Optical Tunable Filter* (AOTF) reguliert und in Prozent angegeben. Dabei ist es meist nicht möglich, die genaue Intensität der eingestrahlenen Laser zu ermitteln. Durch die Bestrahlung wurden meist fluoreszierende Proteine angeregt und deren Emissionen gemessen. Die Detektion erfolgt hier über *Photomultiplier*, die letztendlich ein digitales Signal ausgeben. Die Vorteile gegenüber konventionellen Lichtmikroskopen besteht darin, dass nur ein bestimmter Bereich im Präparat beleuchtet und fokussiert wird. Dadurch hat man eine deutlichere Verbesserung hinsichtlich Auflösung, Tiefenschärfe und Detailvielfalt (Claxton *et al.*, 2006).

### 3.8.1 GFP/RFP Lokalisierung

Für Lokalisationsstudien von BIC1, cry1 und cry2 wurden diese mit GFP als Fusionsprotein transient in *N. benthamiana* exprimiert (Leffel *et al.*, 1997). C-Terminal fusionierte Cryptochrome in dem Konstrukt pUGT1 wurden im *A. tumefaciens* Stamm GV3101 pMP90 exprimiert. Ebenso wurden die Fusionsproteine BIC mit GFP entweder C-Terminal (pUBC-GFP V049) oder N-Terminal (pUBN-GFP V055) verwendet. Als Kontrollstamm wurde mCherryNLS in GV3101 pMP90 co-exprimiert. Das RFP, mit einer Kernlokalisationssequenz ist hierbei größtenteils im Zellkern lokalisiert und dient daher als Nachweis des Zellkerns als Lokalisationsort. Die Aufnahmen erfolgten am KLSM (Leica SP2). Die inokulierten Blattproben wurden direkt von Pflanzen aus der Anzuchtkammer bei Tag entnommen, auf einem Objektträger präpariert und direkt unter dem KLSM untersucht. Die Anregung von GFP erfolgte bei 488 nm und von RFP bei 543 nm. Alle Aufnahmen wurden später in der Analysesoftware von Leica Las X bearbeitet. Um dunkle Bilder aufzuhellen und *vice versa* wurde hierfür im Programm die „*Autoscaled*“ Funktion verwendet, sodass man das visuell beste Ergebnis erzielte.

Die Größe des *Pinholes*, sowie die *Frame-* und *Line-Averages* unterschieden sich, ansonsten wurden die gleichen Bedingungen für die Lokalisationsstudien von *cry1* und *cry2* verwendet:

*Pinhole cry1*: 123  $\mu\text{m}$ , *F/L* 2/8;

*Pinhole cry2*: 132,3  $\mu\text{m}$ , *F/L* 2/4;

400 Hz Scan-Geschwindigkeit; Format 1024x1024; Argon Laser-Intensität: 10-30%; spezifische Laserintensität in Prozent angegeben.

Anregung bei 488 nm: 90,35%                      Emission: 505-515 nm

Anregung bei 543 nm: 100%                      Emission: 600-625 nm

Die Größe des *Pinholes* unterschieden sich, ansonsten wurden die gleichen Bedingungen für die Lokalisationsstudien von *BIC1* verwendet:

*Pinhole BIC1-GFP*: 76,4  $\mu\text{m}$

*Pinhole GFP-BIC1*: 95  $\mu\text{m}$

*F/L* 1/1; 400 Hz Scan-Geschwindigkeit; Format 1024x1024

Anregung bei 488nm: 90,35%                      Emission: 505-515 nm

Anregung bei 543nm: 90,35%                      Emission: 600-625 nm

### **3.8.2 Pd-mP Assay**

Im folgenden *Assay* wurde untersucht, ob GFP-BIC1 mit dem Farbstoff Palladium-mesoporphyrin co-lokalisiert. Durch diese Co-Lokalisation kann auf eine Bindung von GFP-BIC1 mit dem Farbstoff und somit auf eine generelle Affinität zu Porphyrinen geschlossen werden. Das Ansetzen und die Inokulation mit Pd-mP erfolgte generell nach einem etabliertem Protokoll (Vanhee *et al.*, 2011). Die inokulierten Blattproben wurden direkt von Pflanzen aus der Anzuchtkammer bei Tag entnommen, auf einem Objektträger präpariert und direkt unter einem KLSM (Leica SP5) untersucht.

## Reagenzien

<b>PBS 1x</b>	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Pd-mP Lösung 250 mL</b>	1/10 PBS-Lösung, 0,05% Silwet L-77 (Momentive Performance Materials GmbH), 10 µM Pd (II) Mesoporphyrin IX zuvor in 1 mL DMSO gelöst (Frontier Scientific), kühl und dunkel lagern

Hierfür wurde GFP-BIC1 (pUBN-GFP V055) transient in *N. benthamiana* exprimiert. 24 h bevor die KLSM-Aufnahmen gemacht wurden, wurde die Pd-mP Lösung in die Epidermiszellen der bereits mit Agrobakterien inokulierten Blätter gespritzt. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich cry1-GFP (pUGT1) transient in *N. benthamiana* exprimiert und mit der Pd-mP Lösung beprobt.

Die Anregung von GFP erfolgte bei 488 nm und von Pd-mP bei 405 nm. Für die Auswertung der Aufnahmen wurde die Fluoreszenz-Stärke aller Bilder auf die Pd-mP und GFP-Fluoreszenz von den GFP-BIC1 Aufnahmen normalisiert. So kommt der visuelle Unterschied vor allem im Channel der Pd-mP Detektion besser zur Geltung.

Die *Frame-* und *Line-Averages* unterschieden sich bei manchen Proben, ansonsten wurden die gleichen Bedingungen für den Bindungs-*Assay* von GFP-BIC1 verwendet.

*F/L* bei 4/4 bei GFP-BIC1 und WT-Proben.

*F/L* bei 2/2 bei cry1-GFP.

Ansonsten wurden folgende Bedingungen für alle Proben verwendet:

*Pinhole*: 263,1 µm; 400 Hz Scan-Geschwindigkeit; Format 1024x1024

Argon Laser-Intensität 30%; spezifische Laserintensität in Prozent angegeben

Anregung bei 405 nm: 50%

Emission: 420-470 nm

Anregung bei 488 nm: 50%

Emission: 500-550 nm

### 3.8.3 Entstehung von *photobodies*

Im Folgenden experimentellen Ansatz wurde versucht, sogenannte *photobodies* von cry1-GFP zu erzeugen. Hierzu wurden verschiedene Intensitäten und Wellenlängen der KLSM-Laser verwendet. Die inokulierten Blattproben mit pUGT1-cry1 wurden direkt von Pflanzen aus der Anzuchtammer bei Tag entnommen, auf einem Objektträger präpariert und direkt unter dem KLSM untersucht. Bei längerer Bestrahlungsdauer der Proben wurden die Objektträger unter dem KLSM im Strahlengang der Laser belassen. Die Software wurde auf Scan geschaltet, sodass die Laser dauerhaft auf die Probe strahlten. Neben Intensität und Wellenlänge spielt hier noch die Scan-Geschwindigkeit eine wichtige Rolle. Diese bestimmt, wie häufig die Photonen auf die Probe treffen. Alle Aufnahmen wurden später in der Analysesoftware von Leica Las X bearbeitet. Um dunkle Bilder heller zu machen und *vice versa* wurde hierfür im Programm die „Autoscaled“ Funktion verwendet, sodass man das visuell beste Ergebnis erzielte. Die Anregung von GFP erfolgte bei 488 nm. Alle Anwendungen der *photobodies* betreffend wurden am TCS SP5-CLSM durchgeführt.

Für das Finden der passenden Einstellungen zur Induktion der *photobody* Entstehung wurden dieselben Grundeinstellungen beibehalten (**Abb. Anhang 4**):

*Pinhole*: 100 µm; Scan-Geschwindigkeit 400 Hz; *F/L* 3/3; Format 1024x1024

Argon Laser-Intensität 20%; spezifische Laserintensität in Prozent angegeben

Anregung bei 488 nm: 80%

Emission: 500-550 nm

Die Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen für die Induktion von *photobodies* erfolgte für 5 min bei unbekannter Intensität. Hierfür wurden die Proben mit 633, 458, 405 und 488 nm bestrahlt.

Nach Vorversuchen und dem Versuch, die optimalen Bedingungen zur Induktion von cry1-GFP *photobodies* zu finden, wurden spezifische Bedingungen gefunden und für nachfolgende *photobody Assays* verwendet. Außerdem wurden mit selbigen Bedingungen getestet, ob die Orientierung des GFP-Fusionsproteins (N- oder C-Terminal) einen Einfluss auf die Entstehung der *photobodies* hat. Hierfür wurden die Konstrukte pUGT1-cry1 und pUGT2-cry1 transient in *N. benthamiana* exprimiert. Um den Einfluss von BIC1 auf cry1 *photobodies* zu untersuchen, wurden BIC1<sup>WT</sup>- und BIC1<sup>3CA</sup>-RFP Konstrukte (pUBC-RFP-Dest) zusammen mit cry1-GFP (pUGT1) co-exprimiert. GFP ohne Fusionsprotein (pUBN-GFP) wurde ebenfalls getestet, um mögliche GFP-Einflüsse ausschließen zu können. Die Anregung von GFP erfolgte bei 488 nm

und von RFP bei 561 nm. Bei der Durchführung wurde genauso verfahren, wie bei den Vorversuchen.

Die folgenden Bedingungen wurden ausgewählt, da sich bei diesen vermehrt die Entstehung von cry1-GFP *photobodies* beobachten ließen. Die Bestrahlung mit folgenden kombinierten Wellenlängen erfolgte bis zu 15 Minuten:

*Pinhole*: 65µm; *F/L* 3/3; Scan-Geschwindigkeit 400 Hz; Format 1024x1024

Bestrahlung bei Argon Laser Power von 20%, spezifische Laserintensität in Prozent angegeben

405 nm: 10%

458 nm: 80% (bei pUBN-GFP nur 79%)

488 nm: 80%

633 nm: 80%

Emission von GFP 500-550 nm

Für Aufnahme, bei denen das BIC1-RFP in co-exprimierten Proben zusätzlich gemessen wurde, wurde für die Emissionen von RFP zusätzlich der Laser 561nm dazugeschaltet. Jedoch nur während der Bild Aufnahme, nicht während der Vorbestrahlung.

Anregung bei 561 nm: 80%

Emission von RFP: 580-600 nm

### **3.9 Statistische Analysen**

Für die Überprüfung, ob zwei unabhängige Datenreihen einen signifikanten Unterschied aufweisen, wurde der t-Test verwendet. Zuvor wurde mit einem Zwei-Stichproben-F-Test die Varianz ermittelt, sodass entweder ein t-Test für gleiche oder ungleiche Varianzen zweier Stichproben angewendet wurde. Bei mehreren t-Test für einen Versuch wurde anschließend eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt, mit deren Hilfe die Alpha-Kumulierung neutralisiert wurde. Alle Berechnungen wurden mit dem Programm Excel (Microsoft Office Professional Plus 2019) durchgeführt.

Der Zweistichproben-t-Test prüft anhand des Mittelwertes zweier Gruppen, ob sich diese signifikant voneinander unterscheiden. Oft wird mit dem Test überprüft, ob die zu untersuchenden Daten der zuvor aufgestellten Nullhypothese entsprechen. Der t-Test ist

gegenüber Verletzungen der Normalverteilung der Daten relativ robust, daher wurde angenommen, dass alle geprüften Daten normalverteilt sind (Rasch und Guiard, 2004).

Zuvor wurde über einen Zwei-Stichproben-F-Test überprüft, ob die Varianzen ( $v$ ) zweier Datensätze gleich sind oder sich unterscheiden (Rödel, 1971). Dabei wurde für Alpha ein Signifikanzniveau von 0,05 ausgewählt. Durch einen Vergleich der Varianz Verhältnisse errechnet man, ob die Varianzen gleich (Verhältnis von 1 (F)) oder unterschiedlich sind und vergleicht diese mit dem zuvor angenommenen Alphawert:

$$F = v_1/v_2$$

Anschließend wurde entweder ein Zweiseitiger-t-Test mit Annahme gleicher Varianz (homoskedastisch) oder ungleicher Varianz (heteroskedastisch) durchgeführt. Alle Tests wurden mit Annahme einer zweiseitigen Verteilung durchgeführt (Student, 1908).

Nach der Berechnung des t-Testes wurden alle ermittelten Signifikanzniveaus nach Bonferroni korrigiert (Dunn, 1961; Bland und Altman, 1995). Die Korrektur ist wichtig, um den akkumulierenden Alphafehler durch mehrere t-Tests innerhalb eines Versuchs zu neutralisieren. Bei einem angesetzten Signifikanzniveau von  $\alpha$  0,05 kann so anhand der Anzahl durchgeführter t-Tests ein adjustiertes Signifikanzniveau für jedes Experiment berechnet werden:

$$\alpha_{\text{adj}} = \frac{\alpha}{\text{Anzahl der Tests}}$$

Letztendlich wurde so über jede zuvor aufgestellte Nullhypothese geurteilt, ob diese beibehalten oder verworfen wurde, sodass eine Alternativhypothese angenommen werden musste. Anderes gesagt wurde so ermittelt, ob ein Unterschied zweier Datenreihen signifikant ist oder nicht. Die t-Tests wurden immer von der zu untersuchenden Gruppe im Vergleich zum WT als Kontrolle verglichen.

Für das Berechnen von Mittelwert und Standardabweichungen wurde das Programm Excel verwendet. Bei der Auswertung der Häm-Quantifizierung und des *Amplex Red Assays* wurde mit der Formel =STABWN, bei der Quantifizierung der 3xHA-BIC1 Menge in *A. thaliana* Keimlingen mit der Formel =STABW gerechnet.

## 4 Zielsetzung

Die Photoaktivierung von pflanzlichen Cryptochromen ist bereits in Teilen verstanden und beinhaltet initial die Photoreduktion des Flavin-Kofaktors, gefolgt von Konformationsänderungen, Oligomerisierung, Phosphorylierungen und Interaktion mit identifizierten Signaltransduktionskomponenten (Wang und Lin, 2020b). Es war lange Zeit unklar, ob es neben der Dunkelreversion des Flavins hin zu FADox weitere Mechanismen gibt, die die Menge an signalaktivem Cryptochromen regulieren und in den dunkel-adaptierten Zustand versetzen. Dies würde es der Pflanze ermöglichen, sich an Starklichtbedingungen besser anzupassen bzw. schneller zwischen Licht und Dunkelzustand zu unterscheiden. Die im Jahr 2016 entdeckten BICs zeigten, dass es solch einen von der Dunkelreversion unabhängigen Inaktivierungsmechanismus der Cryptochrome gibt (Wang *et al.*, 2016). Protein-Protein-Interaktionsstudien (Wang *et al.*, 2016) und die Aufklärung der cry2-BIC2 Proteinstruktur zeigten, dass BIC2 direkt an cry2 bindet (Ma *et al.*, 2020b).

Im Rahmen dieser Arbeit werden *A. thaliana* Pflanzenlinien generiert, die BIC1 überexprimieren. Diese Linien sollten dazu dienen, herauszufinden, ob BIC1 ausschließlich cry-kontrollierte, oder auch cry1 unabhängige Prozesse beeinflusst.

Vorarbeiten in der AG Batschauer zeigten, dass bei heterologer Proteinexpression von BIC1 in *E. coli* ein Häm *c* als Kofaktor gebunden wird und dass BIC1 möglicherweise als Enzym bei der Umsetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fungieren könnte (Nils Niemann, Dissertation Philipps-Universität Marburg, 2021). Diese Befunde sollten weiter geklärt werden. Durch Austausch von konservierten Cysteinen in der CID von BIC1 sollte weiterhin untersucht werden, ob BIC1 intermolekulare Disulfidbrücken bildet und, wenn ja, ob diese einen Einfluss auf die biologische Funktion von BIC1 haben. Gleichmaßen sollte analysiert werden, ob diese Cysteine die Bindung von Häm *c* beeinflussen.

Es ist nicht vollständig verstanden, ob cry *photobodies* ein Teil der Photoaktivierung oder Orte des cry Abbaus sind. Es war schon länger bekannt, dass cry2 *photobodies* selbst bei niedrigen Fluenzraten von Blaulicht bildet. Auch neuere Befunde unterstützen die These, dass cry1 speziell unter hohen Fluenzraten von Blaulicht arbeitet (Liu *et al.*, 2022). Mit Hilfe von konfokaler-Laserscann-Mikroskopie und transienter Expression von cry1-GFP Konstrukten in *Nicotiana benthamiana* soll analysiert werden, ob auch cry1 *photobodies* bilden kann, was zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht beobachtet worden war.

## 5 Ergebnisse

BIC1 fungiert als Inhibitor von Cryptochromen in *A. thaliana* und *in vitro* (Wang *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2020b). In Vorarbeiten konnte mittels Massenspektrometrie zusätzlich gezeigt werden, dass rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes BIC1, an dem Cystein an Position 99 ein Häm *c* kovalent gebunden hat (Nils Niemann, Dissertation Philipps-Universität Marburg, 2021). Ebenso wurde gezeigt, dass BIC1 vermutlich eine Peroxidaseaktivität hat, zumindest mit dem *Amplex Red* Enzym-Assay. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem die Frage adressiert, ob ein Austausch aller drei Cysteine in *A. thaliana* BIC1<sup>WT</sup> zu Alanin (BIC1<sup>3CA</sup>) zu einem Häm-freien BIC1 führt und diese Austausche auch zu einem Verlust der vermuteten Peroxidaseaktivität führen. Um die Wirkung von BIC1<sup>WT</sup> und der Mutante BIC1<sup>3CA</sup> auf Cryptochrome zu untersuchen, wurden verschiedene *in vitro*- und *in planta* Ansätze verwendet. Unter anderem wurden die BIC1-Versionen heterolog in *E. coli* exprimiert, die Proteine aufgereinigt und in verschiedenen Protein-Assays weiter analysiert. Ebenso wurden für weitere Analysen des inhibitorischen Effekts von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> auf Cryptochrome, diese Proteinversionen in *A. thaliana* überexprimiert und die erhaltenen Linien phänotypisch analysiert.

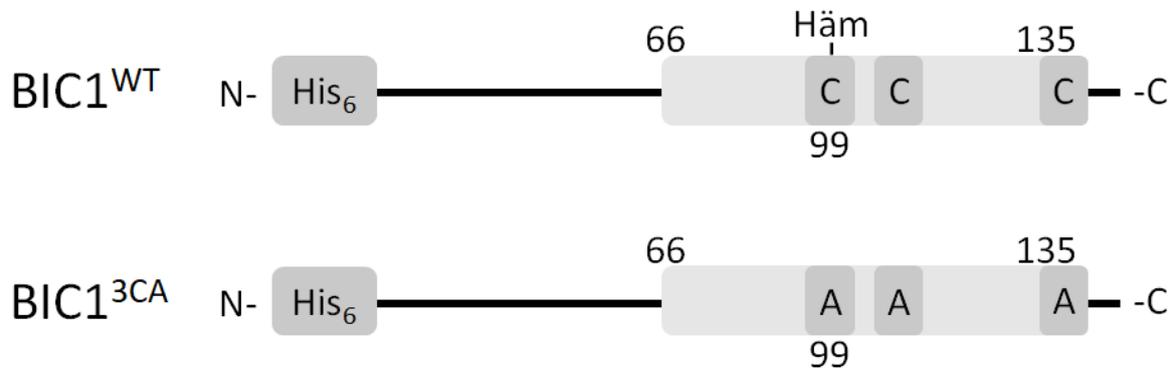
### 5.1 Nachweis von BIC1 Kofaktoren und der Einfluss von Aminosäuren Austauschen auf die Kofaktorbindung

Die Kofaktorbindung von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> wurden nach Expression in *E. coli* sowohl *in vitro*, als auch von BIC1<sup>WT</sup> nach Expression *in planta* analysiert. Hierfür wurde zuvor ein Expressions- und Aufreinigungsprotokoll beider Proteinvarianten etabliert. Für die nachfolgenden Analysen wurden UV/VIS- und Fluoreszenz-Spektroskopie, Massenspektrometrie und *in vitro* Assays verwendet. Für weitere Analysen der Bindung eines Kofaktors wurde auch die Mutante BIC1<sup>H13A3CA</sup> generiert.

#### 5.1.1 Heterologe Expression von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> in *E. coli* und Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken

Für proteinbiochemische Analysen beider BIC1-Varianten wurden diese in *E. coli* transformiert und exprimiert. Für beide Proteine, sowohl Wildtyp BIC1<sup>WT</sup>, als auch BIC1<sup>3CA</sup>, wurden die kodierenden DNA-Bereiche der Vollängen-Proteine in dem Konstrukt pET-28a (+) mit N-

terminalem His<sub>6</sub>-tag verwendet. Beide Konstrukte wurden von der Firma BioCat GmbH bezogen (Abb. 16). Die aus *A. thaliana* stammenden Sequenzen wurden für die Expression in *E. coli* Codon-optimiert.

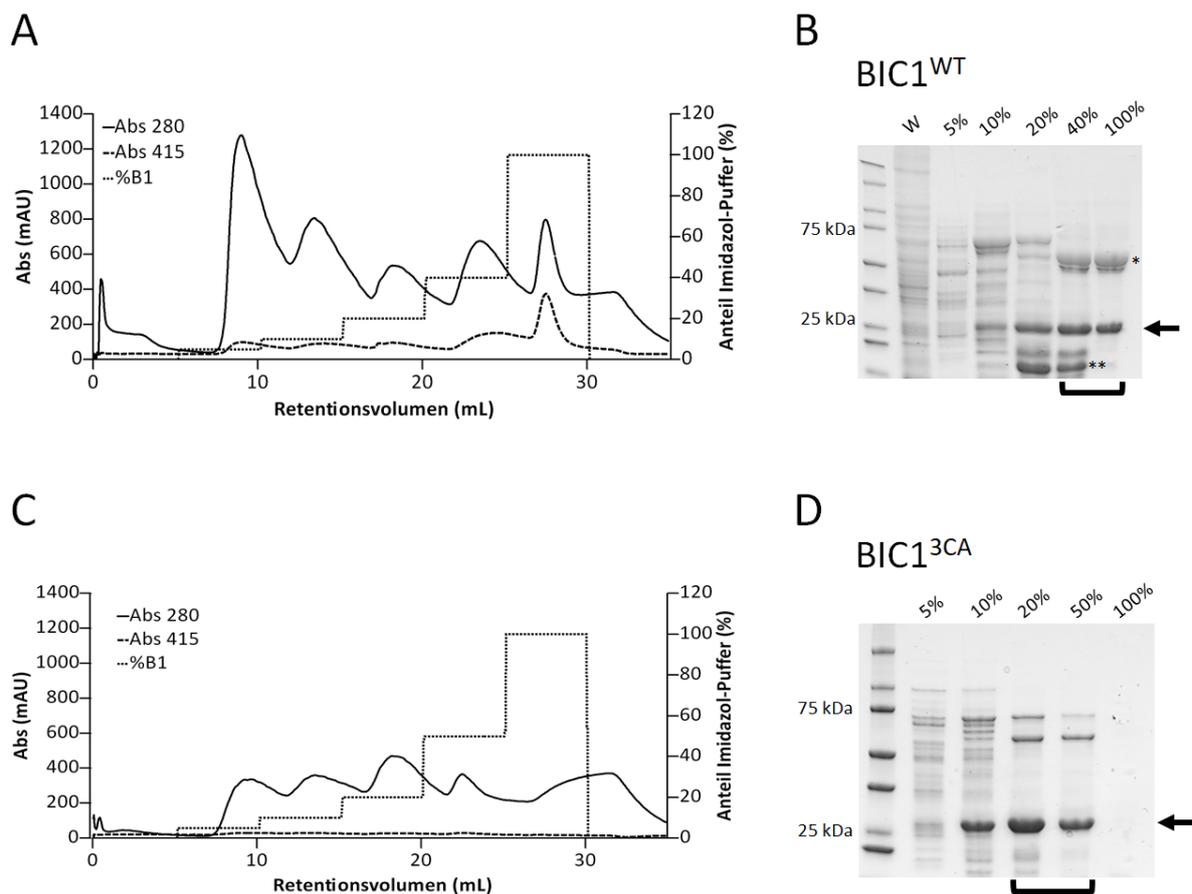


**Abb. 16: Schematische Darstellung der BIC1-Konstrukte, die für die Expression in *E. coli* verwendet wurden.** Beide Varianten des *A. thaliana* Proteins wurden in dem Vektor pET-28a (+) in *E. coli* BL 21 *star* exprimiert. Die Konstrukte sind für *E. coli* Codon-optimiert und weisen eine Länge von 174 Aminosäuren inklusive N-terminalem 6-fachen His-tag auf. Die konservierte Cryptochrom-interagierende Domäne (CID) befindet sich zwischen Position 66-135 der Aminosäuren am C-Terminus. Die genaue CID von BIC1 ist im Gegensatz zu BIC2 noch unbekannt (Ma *et al.*, 2020b). Das in BIC1 konservierte Cystein, an dem die Bindung von Häm *c* in Vorarbeiten mittels Massenspektrometrie entdeckt wurde, ist an Position 99. In der Mutante BIC1<sup>3CA</sup> wurden alle vorhandenen drei Cysteine im Protein durch Alanin ausgetauscht.

Obwohl Häm *c* mittels Massenspektrometrie (Nils Niemann, Dissertation Philipps-Universität Marburg, 2021) an C99 gebunden gezeigt wurde, war nicht auszuschließen, dass auch die beiden weiteren Cysteine eine Häm *c* Bindung ermöglichen. Auch gibt es von BIC1 keine Proteinstruktur, die die Lokalisation des Häm Kofaktors zeigt. Aus diesem Grund wurde eine Dreifach-Mutante hergestellt, die durch Fehlen von allen Cysteinen nicht mehr in der Lage sein sollte, Häm zu binden.

Die Expression erfolgte in dem *E. coli* Stamm BL21 *star*. Das Medium wurde mit Aminolävulinsäure, als Vorstufe des Häms in der Porphyrinsynthese und Eisensulfat supplementiert. Dies sollte einem Mangel des Häm Kofaktors entgegenwirken (Chouchane *et al.*, 2000; Varnado und Goodwin, 2004; Fiege *et al.*, 2018). Die Expression der BIC1-Varianten erfolgte nach IPTG-Induktion in LB-Medium bei 25 °C über Nacht und Schütteln der Zellen mit 150 rpm. Die gewählten Bedingungen waren geeignet, um eine genügende Menge an löslichem BIC1 Protein für nachfolgende Analysen zu erhalten. Die Aufreinigung der His-getagten, rekombinanten Proteine erfolgte über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie mit Hilfe des ÄKTA-Purifier-Systems (GE Healthcare) bei ca. 6 °C. Über die Analysesoftware konnte

während der Aufreinigung die Absorption von aromatischen Aminosäuren bei 280 nm und die von Häm bei 415 nm verfolgt werden (**Abb. 17 A**). In dem Chromatogramm sah man mehrere Protein-Absorptionsmaxima die nach unterschiedlichen Konzentrationen an Imidazol von der Ni<sup>2+</sup>-Säule eluiert wurden. Die Absorption von Häm bei 415 nm fiel bei BIC1<sup>3CA</sup> deutlich geringer aus, als bei der WT-Variante (**Abb. 17 C**). Daraus lässt sich schließen, dass BIC1<sup>3CA</sup> geringere Mengen an Häm gebunden hat. Für beide BIC1-Varianten wurden dieselben Bedingungen für Expression und Aufreinigung gewählt, die vorher durch verschiedene Ansätze getestet wurden. Dabei handelt es sich um Salzkonzentration in den Proteinpuffern und Dauer und Volumina der Waschschritte während der Aufreinigung. Um zu analysieren, welcher Protein-*peak* das aufgereinigte BIC1 enthält, wurden von mehreren Fraktionen der Eluate Proben auf einem SDS-Gel analysiert (**Abb. 17 B, D**).

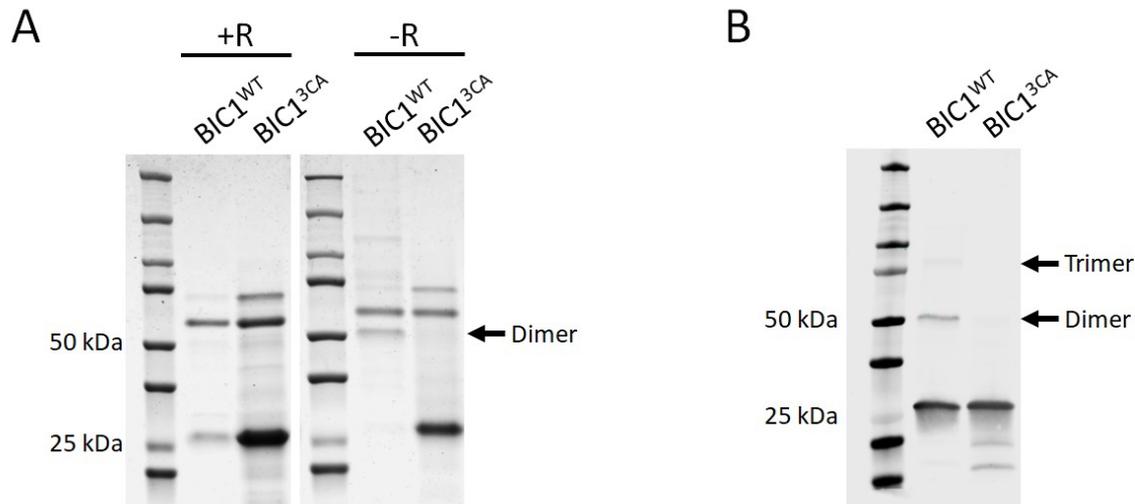


**Abb. 17: Aufreinigung von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> über Affinitätschromatographie.** (A) Chromatogramm und (B) mit Coomassie gefärbtes Gel der SDS-PAGE von der Aufreinigung von BIC1<sup>WT</sup> mit einem ÄKTA-Purifier-System. Die Elution erfolgte mit einem Anstieg von Imidazol über einen Stufengradienten. Imidazolkonzentration des B1 Puffers betrug bei 100% 1 M. Die Absorption bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 415 nm (Häm) wurden detektiert. Das Gel für SDS-PAGE wurde mit Eluaten der Affinitätschromatographie beladen und mit Coomassie gefärbt. Eluate wurden jeweils nach Anstieg der Imidazol Konzentration entnommen (Protein-*peaks*),

um die Reinheit der Proteinlösung zu bestimmen. (C) Chromatogramm und (D) mit Coomassie gefärbtes Gel nach SDS-PAGE der Mutante BIC1<sup>3CA</sup>. Schwarze Pfeile im Coomassie-Gel zeigen BIC1 Banden bei ca. 25 kDa. Die Klammer im Coomassie-Gel zeigt die Fraktionen, die letztendlich für weitere Anwendungen zusammengeführt wurden. \* Chaperone GroEL und DnaK. \*\* Protein zur Regulation der Eisenaufnahme Fur. Alle drei Banden wurden durch Massenspektrometrie am Fachbereich Chemie, Marburg überprüft (siehe Abb. Anhang 1).

Während des Anstiegs des Imidazol-Stufengradienten wurden mehrere Protein-*peaks*, bzw. Proteine eluiert. Durch Auftrennen der Proteine der verschiedenen Eluate in einem SDS-Gel und anschließender Färbung mit Coomassie konnte so die Reinheit der Eluate detektiert werden. Zu erkennen war sowohl bei BIC1<sup>WT</sup>, als auch bei BIC1<sup>3CA</sup>, eine Bande bei ca. 25 kDa. Die zusätzlichen zwei markanten Proteinbanden bei ca. 60 und 75 kDa sind *E. coli* Chaperone GroEL und DnaK. Die markante Proteinbande bei ca. 15 kDa war das Protein Fur, welches die Aufnahme von Eisen reguliert. Die Proteine wurden mittels Massenspektrometrie überprüft, durchgeführt von Dr. U. Linne, Fachbereich Chemie der Philipps-Universität (siehe **Abb. Anhang 1**). Mit zunehmender Imidazol Konzentration während der Aufreinigung verschwanden die restlichen Proteinbanden bzw. unspezifisch gebundenen Proteinverunreinigungen. Jedoch verringerte eine zunehmende Imidazol Konzentration auch die Affinität der His-*getagten* BIC1-Varianten zur Ni<sup>2+</sup>-Matrix. Deshalb wurde BIC1 bei 400-1000 mM Imidazol eluiert, zusammengeführt und für weitere Anwendungen verwendet, und BIC1<sup>3CA</sup> bei 200-500 mM Imidazol. Vermutlich aufgrund der veränderten Eigenschaften von BIC1<sup>3CA</sup> unterschieden sich die Imidazol-Konzentrationen für die Elution. Auf weitere Aufreinigungen mittels Gelfiltration wurde aufgrund bereits hoher Reinheit der Proben verzichtet, die für BIC1<sup>3CA</sup> allerdings etwas höher war als für BIC1<sup>WT</sup>. Die Proteine wurden über einen Membrankonzentrator aufkonzentriert und mit einem Proteinpuffer versetzt, der kein Imidazol enthielt, da dieses bei späteren Anwendungen wie z.B. der UV/VIS-Spektroskopie für ein verändertes Absorptionsspektrum geführt hätte oder die Bindung von möglichen Kofaktoren beeinflusst hätte können. Nach bis zu sechs Puffer-Austauschen hatten die BIC1<sup>WT</sup>- und BIC1<sup>3CA</sup>-Proteinlösungen einen Imidazol-Gehalt von < 0,2 mM.

In vorherigen SDS-PAGEs wurde beobachtet, dass BIC1<sup>WT</sup> bei unzureichender Reduktion durch Reduktionsmittel Oligomer-ähnliche Strukturen aufzeigt. Daher wurden die eluierten und aufkonzentrierten Protein-Varianten jeweils in SDS-Probenpuffer mit und ohne Reduktionsmittel bei 95 °C für 10 Minuten gekocht und für Coomassie-Färbungen und *Western Blots* verwendet (**Abb. 18**). Als Reduktionsmittel wurde TCEP in einer Endkonzentration von 10 mM im SDS-Probenpuffer verwendet.

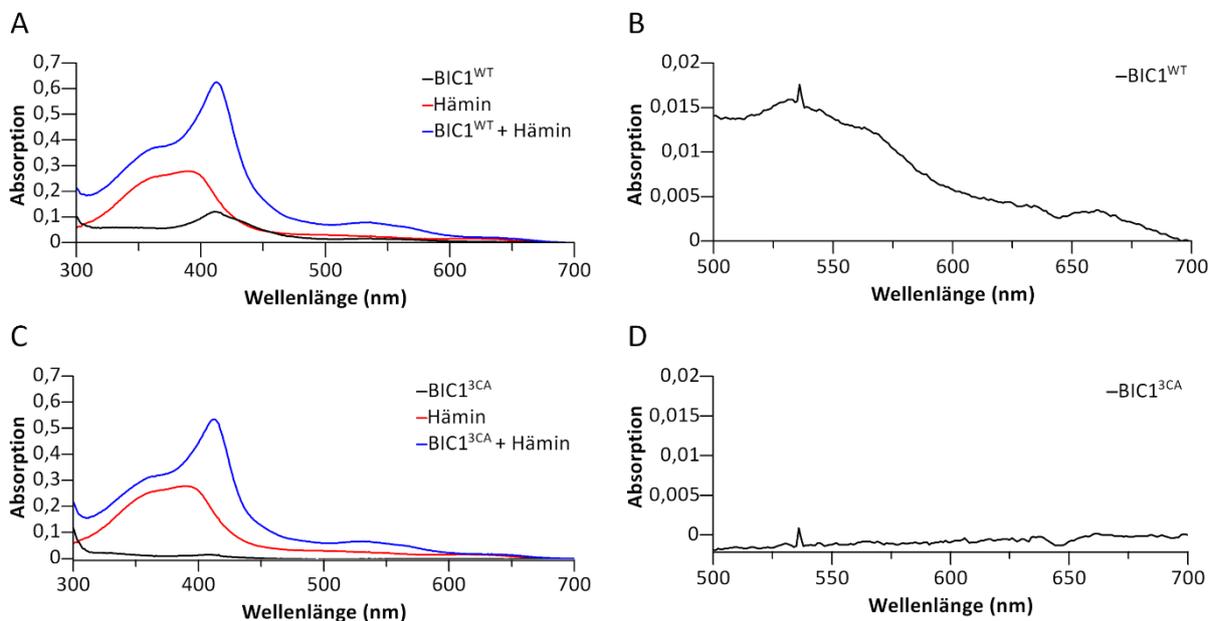


**Abb. 18: BIC1 bildet intermolekulare Disulfidbrücken *in vitro*.** (A) Coomassie-Gel mit 3 µg aufgereinigtem BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup>. Schwarzer Pfeil deutet auf sich bildende Dimere beim Fehlen von Reduktionsmittel bei BIC1<sup>WT</sup> hin. BIC1<sup>3CA</sup> bildet aufgrund nicht vorhandener Cysteine keine Disulfidbrücken und somit keine Dimere. (B) *Western Blot* mit αHIS-Antikörper gegen aufgereinigte BIC1-Varianten. Proteine zeigen Monomer Bande bei ca. 25 kDa und BIC1<sup>WT</sup> zusätzlich Oligomere (schwarze Pfeile). Proteinmenge beträgt 1,5 µg. 10 mM TCEP im SDS-Probenpuffer.

Bei dem mit Coomassie gefärbten Gel war eine zusätzliche Bande bei 50 kDa in der Probe der BIC1<sup>WT</sup>-Proteinlösung zu erkennen (Abb. 18 A, schwarzer Pfeil). Diese Bande war stärker ausgeprägt, wenn die Probe nicht mit TCEP als Reduktionsmittel versetzt worden war. Die Bande des BIC1<sup>WT</sup> Monomers war in der Probe ohne Reduktionsmittel nicht zu sehen. Im Vergleich dazu zeigte die BIC1<sup>3CA</sup>-Variante keine solche Dimerisierung. Auch zeigte BIC1<sup>WT</sup> im *Western Blot* trotz Zusatz von Reduktionsmittel eine noch stärker retardierte Bande als die des Dimers, die bereits im Coomassie-Gel erkennbar war. BIC1<sup>3CA</sup> zeigte im *Western Blot* nur eine Monomer Bande (Abb. 18 B). Aufgrund dessen konnte angenommen werden, dass BIC1 über die Cysteine mit anderen BIC1 intermolekulare Disulfidbrücken bilden konnte. Hierbei war das Dimer nach dem Monomer der favorisierte Zustand. Das Reduktionsmittel TCEP im SDS-Probenpuffer sorgte für eine ausreichende Reduktion solcher Disulfidbrücken und einem Aufbrechen der oligomeren Strukturen. Da BIC1<sup>3CA</sup> keine Cysteine besitzt, bildete diese Variante auch in Abwesenheit von Reduktionsmittel keine Oligomere.

### 5.1.2 Spektroskopische Analyse aufgereinigter BIC1-Varianten

Anhand von UV/VIS-Spektren kann die spezifische Absorption von Proteinen Aufschlüsse über deren gebundenen Kofaktor geben. Bei dem UV/VIS-Spektrum von BIC1<sup>WT</sup> nach der zuvor beschriebenen Aufreinigung war ein Absorptionsmaximum bei ca. 410 nm erkennbar (**Abb. 19 A**). Das beobachtete Maximum hat Ähnlichkeit mit den *Soret*-Banden anderer Häm-bindenden Proteine und zeigte so deutlich die Anwesenheit von Häm in der BIC1<sup>WT</sup>-Lösung. Zusätzlich waren die für Häm charakteristischen Absorptions-Schultern bzw. Q-Banden bei 500-600 nm bei BIC1<sup>WT</sup> (**Abb. 19 B**), nicht jedoch bei BIC1<sup>3CA</sup> (**Abb. 19 D**) erkennbar (Clezy und Morell, 1963; Cowan und Gray, 1989; Rodríguez-Roldán *et al.*, 2006).



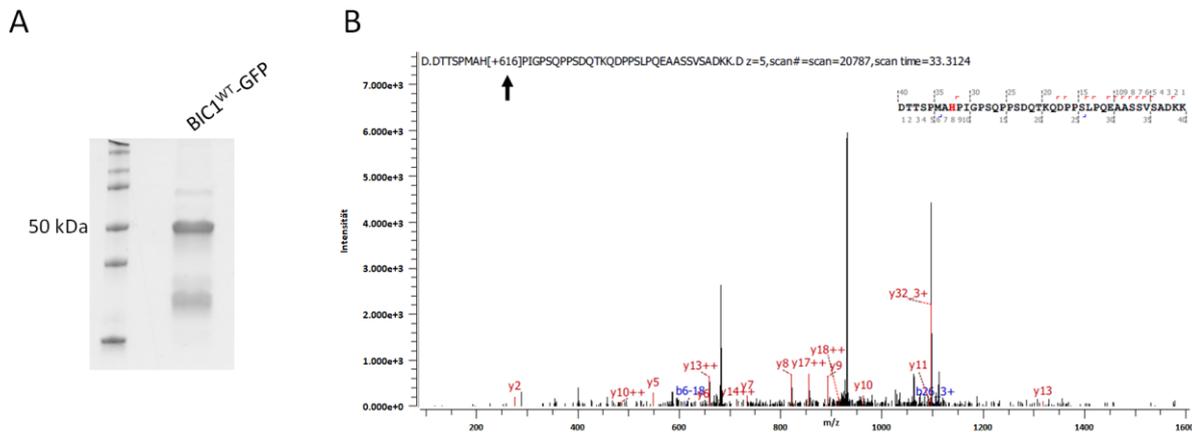
**Abb. 19: BIC1<sup>3CA</sup> zeigt noch eine Affinität zu Häm.** (A) UV/VIS-Spektrum von 1 µg/µL BIC1<sup>WT</sup> mit und ohne zusätzliches Häm. (B) Vergrößertes Spektrum aus (A), gezeigt von 500-700 nm. (C) UV/VIS-Spektrum von 1 µg/µL BIC1<sup>3CA</sup> mit und ohne zusätzliches Häm. (D) Vergrößertes Spektrum aus (C). Beide Proteine wurden mit 10 µM Häm versetzt und spektroskopisch gemessen. Einzelspektren von Häm mit 10 µM.

Nach Zugabe von 10 µM Häm zu der Protein-Lösung erkannte man eine Zunahme der Absorption ebenfalls bei ca. 410 nm. Im Vergleich zu Häm ohne Protein, welches ein Absorptionsmaximum bei 390 nm besaß, kann man durch den *Shift* von 20 nm davon ausgehen, dass BIC1<sup>WT</sup> eine Affinität zu freiem Häm besitzt und dieses in unbekannter Art bindet. Die Mutante BIC1<sup>3CA</sup> zeigte ein ähnliches Verhalten nach Rekonstitution mit 10 µM Häm (**Abb. 19 C**). Allerdings hatte BIC1<sup>3CA</sup> ohne Zugabe von Häm eine geringere Absorption bei

410 nm als BIC1<sup>WT</sup>, was darauf schließen lässt, dass Cysteine in BIC1 die Bindung von Häm fördern. Nichtsdestotrotz scheinen Cysteine nicht essentiell für eine Affinität von Hämin nötig zu sein, da es keinen deutlichen Unterschied zwischen beiden BIC1-Varianten zu geben scheint. Der einzige beobachtbare Unterschied war das Ausbleiben der charakteristischen Q-Banden bei BIC1<sup>3CA</sup>, welchen einen Hinweis auf das Ausbleiben spezifischer Häm-Bindung geben könnte.

### 5.1.3 Nachweis von Häm als Kofaktor von BIC1<sup>WT</sup> *in planta*

BIC1<sup>WT</sup> zeigte nach heterologer Expression und Aufreinigung die Bindung von Häm. Dies bedeutet aber nicht, dass Häm auch an BIC1 in Pflanzen gebunden ist, weil sich das bakterielle Expressionssystem stark von dem eukaryotischen, pflanzlichen System unterscheidet (Gecchele *et al.*, 2015). Um zu überprüfen, ob BIC1<sup>WT</sup> auch in Pflanzen Häm bindet, wurde eine Überexpression von BIC1<sup>WT</sup>-GFP (pUBC-GFP-Dest) in *N. benthamiana* mit anschließender Immunpräzipitation mittels  $\alpha$ GFP-Antikörpern durchgeführt. Hierbei wurde BIC1<sup>WT</sup>-GFP über *A. tumefaciens* in bis zu 24 Tabakpflanzen inokuliert. Nach 4 d Proteinexpression wurde eine Blattprobe im KLSM untersucht. Hierbei wurde getestet, ob ein starkes GFP-Signal detektiert werden konnte (Anregung bei 488 nm und Emission bei 500-550 nm), sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die transiente Expression funktionierte. Die inokulierten Blattproben wurden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Blattproben wurden lysiert, von Zelltrümmern befreit und mit den  $\alpha$ GFP-Antikörpern bei ca. 6 °C inkubiert. Für die Immunpräzipitation wurden GFP-Agarose Antikörper mit dazugehörigem Protokoll verwendet (Chromotek). Nach mehrmaligem waschen und herunterzentrifugieren der Antikörper wurden diese sowohl für massenspektrometrische Analysen (durchgeführt von Dr. Uwe Linne am Fachbereich Chemie, Marburg), als auch für ein Coomassie-Gel verwendet (**Abb. 20**).



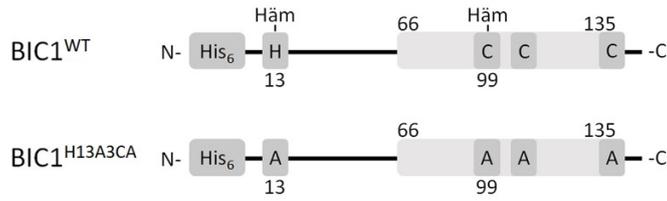
**Abb. 20: Nachweis von Häm-Kofaktor in pflanzlich exprimiertem BIC1<sup>WT</sup>-GFP.** (A) Coomassie gefärbtes SDS-Gel nach BIC1<sup>WT</sup>-GFP Extraktion aus *N. benthamiana* mittels Immunpräzipitation. BIC1<sup>WT</sup>-GFP mit einer Größe von ca. 46 kDa läuft als obere markante Bande. (B) Massenspektrometrischer Nachweis von Häm an BIC1<sup>WT</sup>-GFP. Im Massenspektrum war ein Peptid von BIC1<sup>WT</sup> nachweisbar, welches an H13 (Histidin an 13. Stelle in der Gesamtaminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup>) eine zusätzliche Masse von 616 g/mol, korrespondierend zu Häm, band (durchgeführt von Dr. Uwe Linne am Fachbereich Chemie, Marburg). Geprobt wurde eine Immunpräzipitations-Probe. Verdaut wurde direkt an den  $\alpha$ GFP-Beads (Ergebnisse für Massenspektrometrie siehe Abb. Anhang 1).

Die verwendeten Antikörper/*Nanobodies* sind speziell für Verdauung direkt an den Agarose *Beads* geeignet, da diese keine konventionellen leichten und schweren Antikörperketten besitzen, die in der Massenspektrometrie ein artifizielles Signal ergeben könnten. Anhand des Coomassie-gefärbten Gels konnte man eine definierte Proteinbande bei ca. 46 kDa erkennen (sowohl BIC1<sup>WT</sup> als auch GFP haben eine Masse von ca. 25 kDa). Die starke Bande bei 46 kDa deutete auf eine gute Expression des Fusionsproteins in *N. benthamiana* (Abb. 20 A). Zusätzlich wurde durch die Massenspektrometrie bestätigt, dass es sich um BIC1<sup>WT</sup>-GFP handelt (Abb. Anhang 1). Das Massenspektrum zeigt ein spezifisches Peptid von BIC1<sup>WT</sup>-GFP, an welchem das Histidin an 13. Stelle der Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> eine zusätzliche Masse von 616 g/mol aufwies (Abb. 20 B). Diese zusätzliche Masse korrespondiert mit kovalent gebundenem Häm an Histidin. Bindungen von Häm an Histidin sind relativ selten (Nothnagel *et al.*, 2011). Zusätzlich wurden noch weitere Modifikationen an unterschiedlichen Peptiden gefunden. Diese konnten jedoch nicht spezifischen Modifikationen zugeordnet werden, da meist mehr als eine Aminosäure modifiziert war. Somit konnte ein qualitativer Nachweis von pflanzlich exprimiertem BIC1<sup>WT</sup> gebracht werden, welches kovalent Häm bindet. Anders als vermutet wurde kein Häm *c* gefunden, jedoch an Histidin kovalent verknüpftes Häm.

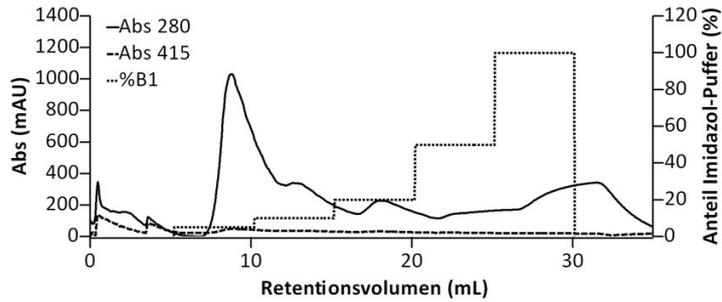
#### 5.1.4 Expression und Analyse von BIC1<sup>H13A3CA</sup>

Das Massenspektrum von in *N. benthamiana* exprimierten BIC1<sup>WT</sup>-GFP zeigte eine Bindung von Häm an einem Histidin, anstatt wie bei rekombinant in *E. coli* exprimierten BIC1<sup>WT</sup> an einem Cystein. Jedoch kann die Massenspektrometrie nur positive Ergebnisse liefern, sodass immer noch die Möglichkeit besteht, dass BIC1<sup>WT</sup> auch *in planta* Häm an einem Cystein bindet. Um eine Funktion von Histidin an 13. Position von BIC1<sup>WT</sup> auf die Bindung von Häm weiter zu untersuchen, wurde die Vierfachmutante BIC1<sup>H13A3CA</sup> konstruiert und in dem Vektor pET-28a (+) mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag in *E. coli* rekombinant exprimiert (**Abb. 21 A**).

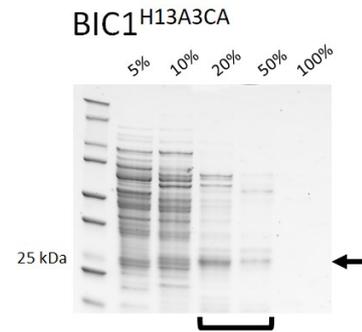
A



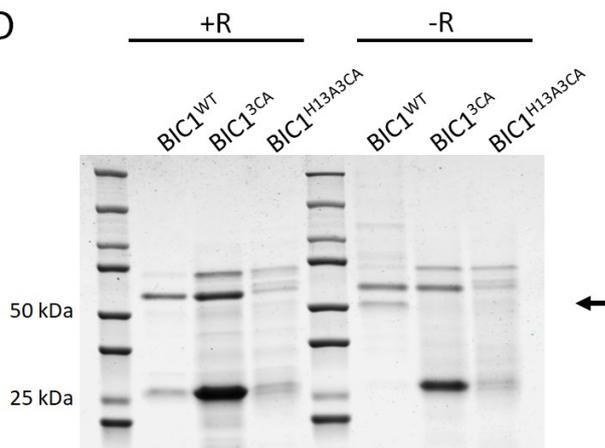
B



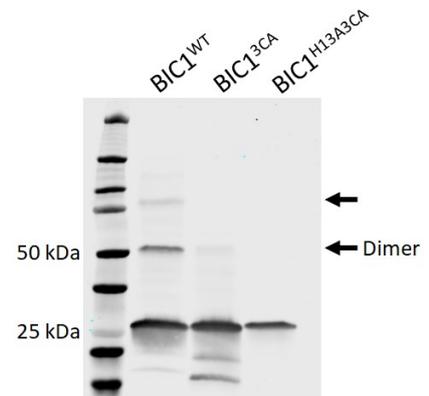
C



D



E



F

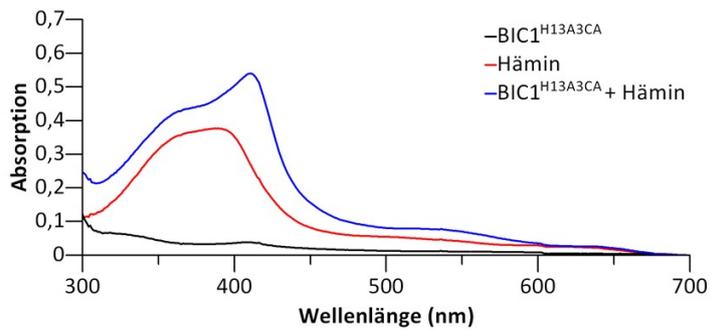


Abb. 21: Histidin Austausch zu Alanin in BIC1 hat keinen zusätzlichen Effekt zum dreifach-Cystein Austausch. (A) BIC1<sup>H13A3CA</sup> wurde in dem Vektor pET-28a (+) in *E. coli* BL 21 *star* exprimiert. Das Konstrukt

wurde für *E. coli* Codon-optimiert und weist eine Länge von 174 Aminosäuren inklusive N-terminalem 6-fachen His-tag auf. Die konservierte CID befindet sich an Position 66-135 der Aminosäuren am C-Terminus. In BIC1<sup>WT</sup> befindet sich das konservierte Cystein an Position 99 und das Histidin, an dessen die Bindung von Häm in pflanzlich exprimierten BIC1<sup>WT</sup> mittels Massenspektrometrie nachgewiesen wurde, an Position 13. In der Mutante BIC1<sup>H13A3CA</sup> wurden alle vorhandenen drei Cysteine und H13 im Protein durch Alanin ausgetauscht. **(B)** Chromatogramm von BIC1<sup>H13A3CA</sup> der Aufreinigung mit dem ÄKTA-Purifier-System. Elution erfolgte mit einem Anstieg von Imidazol über einen Stufengradienten. Die Absorption bei 280 nm (aromatische Aminosäuren) und 415 nm (Häm) wurden detektiert. **(C)** Mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit geladenen Eluaten der dazugehörigen Aufreinigung zeigt die aufgereinigte BIC1<sup>H13A3CA</sup> Mutante. Eluate wurden jeweils nach Anstieg der Imidazol Konzentration von den *Protein-peaks* entnommen, um die Reinheit der Proteinlösung zu bestimmen. Schwarzer Pfeil im Coomassie-Gel zeigt die BIC1<sup>H13A3CA</sup> Bande bei ca. 25 kDa. Die Klammer im Coomassie-Gel zeigt die Fraktionen, die letztendlich für weitere Analysen zusammengeführt wurden. **(D)** Coomassie-Gel mit 3 µg pro Spur aufgereinigtem BIC1<sup>WT</sup>, BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup>. Schwarzer Pfeil deutet auf sich bildende Dimere beim Fehlen von Reduktionsmittel bei BIC1<sup>WT</sup> hin. BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup> bilden aufgrund von Cystein-Mutationen keine Disulfidbrücken und somit keine Dimere. **(E)** *Western Blot* mit αHIS-Antikörper gegen aufgereinigte BIC1-Varianten. Proteine zeigen Monomer Bande bei ca. 25 kDa und BIC1<sup>WT</sup> zusätzlich Oligomere (Schwarze Pfeil). Proteinmenge beträgt 3 µg. Proben wurden mit 10 mM TCEP als Reduktionsmittel (R) versetzt. **(F)** UV/VIS-Spektrum von 1 µg/µL BIC<sup>H13A3CA</sup> und Rekonstitution mit 10 µM Hämin. Einzelspektrum von Hämin mit 10 µM.

Untersucht wurde, ob die Mutante eine noch geringere Häm-Bindung hat, als die Dreifachmutante BIC1<sup>3CA</sup>. Hierbei wurden für die Expression, die Aufreinigung und die Analyse via Coomassie-Gel und *Western Blot* die gleichen Protokolle wie für die Proteinvarianten BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> verwendet.

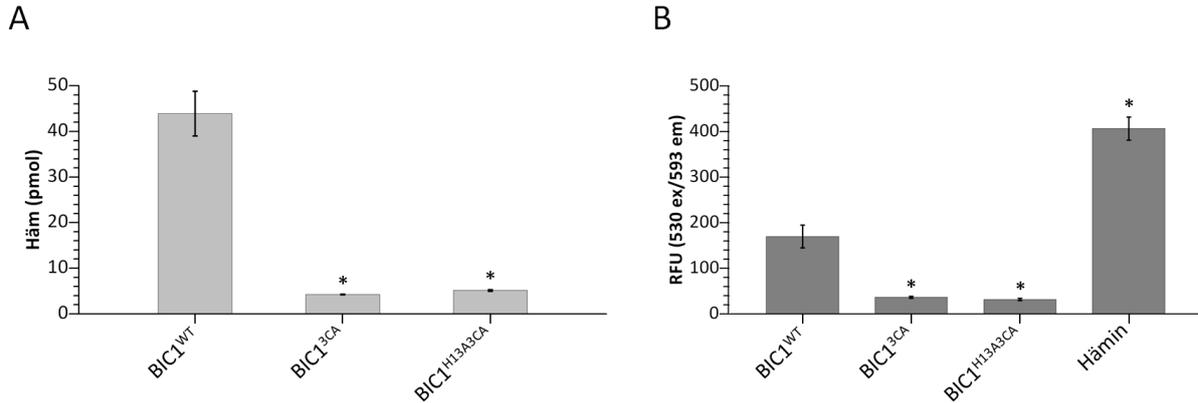
Anhand des Chromatogramms wurde die Elution der Proteine während eines Anstiegs des Imidazol-Stufengradientens detektiert (**Abb. 21 B**). Die Absorption von Häm bei 415 nm war im gesamten Chromatogramm sehr gering. Auf einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel konnte die Reinheit der Proteinlösung analysiert werden (**Abb. 21 C**). Die Proteinbande bei ca. 25 kDa entspricht BIC1<sup>H13A3CA</sup> und erst bei zunehmender Imidazol Konzentration erreichte man eine höhere Reinheit des gewünschten Proteins, indem die ungewollten Proteinverunreinigungen ihre Affinität zur Ni<sup>2+</sup>-Matrix verloren und eluierten. Die Affinitätschromatographie der BIC1<sup>H13A3CA</sup> Mutante zeigte mehr Verunreinigungen und weniger lösliches Protein als bei BIC1<sup>WT</sup>. Die Analyse der BIC1<sup>H13A3CA</sup> Mutante über Coomassie-Gele, *Western Blots* und UV/VIS-Spektroskopie zeigte keine Unterschiede zu der BIC1<sup>3CA</sup> Mutante (**Abb. 21 D, E, F**). Beide Mutanten zeigten aufgrund fehlender Cysteine keine intermolekularen Disulfidbrücken bzw. oligomere Banden. Die Proteinbande von BIC1<sup>H13A3CA</sup>, sowohl im Coomassie-Gel, als auch im *Western Blot* war schwächer als bei den anderen BIC1-Varianten. Dies zeigte die schlechtere Expression und Aufreinigung von BIC1<sup>H13A3CA</sup>. Beide Mutanten zeigten zusätzlich ein ähnliches Verhalten nach Rekonstitution mit 10 µM Hämin. Somit schien selbst BIC1<sup>H13A3CA</sup> noch eine Affinität zu Hämin zu besitzen. Jedoch war das

Absorptionsmaximum nach Rekonstitution bei 410 nm nicht so stark ausgebildet wie bei BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup>.

### 5.1.5 Quantifizierung von Häm als BIC1 Kofaktor und Test auf Peroxidaseaktivität im *Amplex Red Assay*

Die aufgereinigten Proteine BIC1<sup>WT</sup>, BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup> unterschieden sich darin, dass die Mutanten aufgrund fehlender Cysteine keine Disulfidbrücken und somit auch keine Oligomere bilden können. Trotz gezeigter Affinität zu Häm in der UV/VIS-Spektroskopie wurde im folgenden Abschnitt die Frage adressiert, ob die Mutationen zusätzlich noch dafür gesorgt haben, dass BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup> quantitativ weniger Häm nach der heterologen Expression in *E. coli* binden als BIC1<sup>WT</sup> und ob die zuvor bei BIC1<sup>WT</sup> beschriebene Peroxidaseaktivität (zuerst gezeigt durch Nils Niemann, Dissertation Philipps-Universität Marburg, 2021) reduziert ist.

Zunächst wurde über Fluoreszenz-Spektroskopie quantifiziert, inwiefern die Mutationen Einfluss auf die Kofaktor-Bindung haben. Hierfür wurden BIC1<sup>WT</sup>, BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup> miteinander verglichen. Die Proteinlösungen wurden in stark saurer Oxalsäure für jeweils 20 min bei 95 °C gekocht, sodass alle vorhandenen Eisen-Ionen aus bestehenden Porphyrinringen gelöst wurden (Sinclair *et al.*, 1999). Ebenfalls wurden gleichbehandelte Proben der jeweiligen Proteinlösungen vor der Fluoreszenz Messung nicht gekocht, sodass für die Auswertung jeweils Proben mit Häm und Protoporphyrin verglichen wurden. Die eisenfreien Porphyrinringe wurden bei einer Anregungswellenlänge von 406 nm und einer Emission von 653 nm gemessen. Die Messungen wurden mit denen einer Häm-Eichgeraden verglichen, sodass man die Menge an Häm in der Proteinlösung in pmol quantifizieren konnte (**Abb. 22 A**).



**Abb. 22: Häm-Bindung durch Cysteine ist essentiell für resultierende Peroxidaseaktivität von BIC1.** (A) Quantifizierung von Häm in verschiedenen BIC1 Proteinlösungen mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ . Mithilfe von Oxalsäure wurden Eisen-Ionen aus bestehenden Porphyrinringen herausgekocht, sodass die eisenfreien Porphyrinringe mittels Fluoreszenz-Spektroskopie detektiert und quantifiziert wurden. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 406 nm und die Emission wurde bei 653 nm gemessen. Durchgeführte t-Tests signifikant nach Bonferroni-Korrektur bei  $*P < 0,025$ . (B) Test auf Peroxidaseaktivität verschiedener 1  $\mu\text{M}$  BIC1 Lösungen mit dem Reagenz *Amplex Red*. Hierbei reagiert *Amplex Red* in der Gegenwart von Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid in einem 1:1 Verhältnis und oxidiert zu Resorufin. Resorufin wurde bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emission von 593 nm detektiert und quantifiziert. Als Positivkontrolle dienten 2 mU/mL HRP. Die gemessenen Werte der Proteinlösungen wurden für eine Normalisierung der Daten von einer Negativkontrolle ohne HRP subtrahiert. 8,8 pmol Hämin entsprechen der Häm-Menge von 1  $\mu\text{M}$  BIC1<sup>WT</sup> und wurden ohne Zugabe von Proteinen als Kontrolle gemessen. Durchgeführte t-Tests signifikant nach Bonferroni-Korrektur bei  $*P < 0,017$ . Für beide Tests galt  $n = 3$  technische Replikate.

BIC1<sup>WT</sup> zeigte eine 10-fach höhere Konzentration von Häm in der Proteinlösung als BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup>. Unter Annahme einer maximalen Kofaktor-Besetzung von 1:1 zeigte BIC1<sup>WT</sup> einen Besetzungsgrad von ca. 1,8%. Die beiden Mutanten mit einem Besetzungsgrad von ca. 0,2% waren ungefähr 10-fach schlechter besetzt. Die Besetzung wurde über eine gleichzeitig aufgenommene Eichgerade mit Hämin ermittelt. Die geringe Besetzung von Häm könnte entweder auf eine artifizielle Bindung hinweisen oder auf mangelnde Häm Synthese in *E. coli* während der Protein Expression zurückzuführen sein (Chouchane *et al.*, 2000; Varnado und Goodwin, 2004; Fiege *et al.*, 2018). Das immer noch nachweisbare Häm in den Mutanten könnte auf die durch UV/VIS bestätigte Affinität zu Häm zurückzuführen sein, sodass immer noch die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung bestehe. Jedoch konnte es sich nicht um Häm *c* handeln. Bei der Berechnung des Besetzungsgrades wurde davon ausgegangen, dass alle Proteine in der gemessenen Lösungen BIC1-Moleküle waren und Verunreinigungen vernachlässigt wurden. Ebenso wurde angenommen, dass alle gemessenen Häm-Moleküle Kofaktoren von BIC1 waren. Für eine deutliche Verringerung an gebundenem Häm schienen alleine die Austausche der Cysteine verantwortlich gewesen zu sein, da die zusätzliche

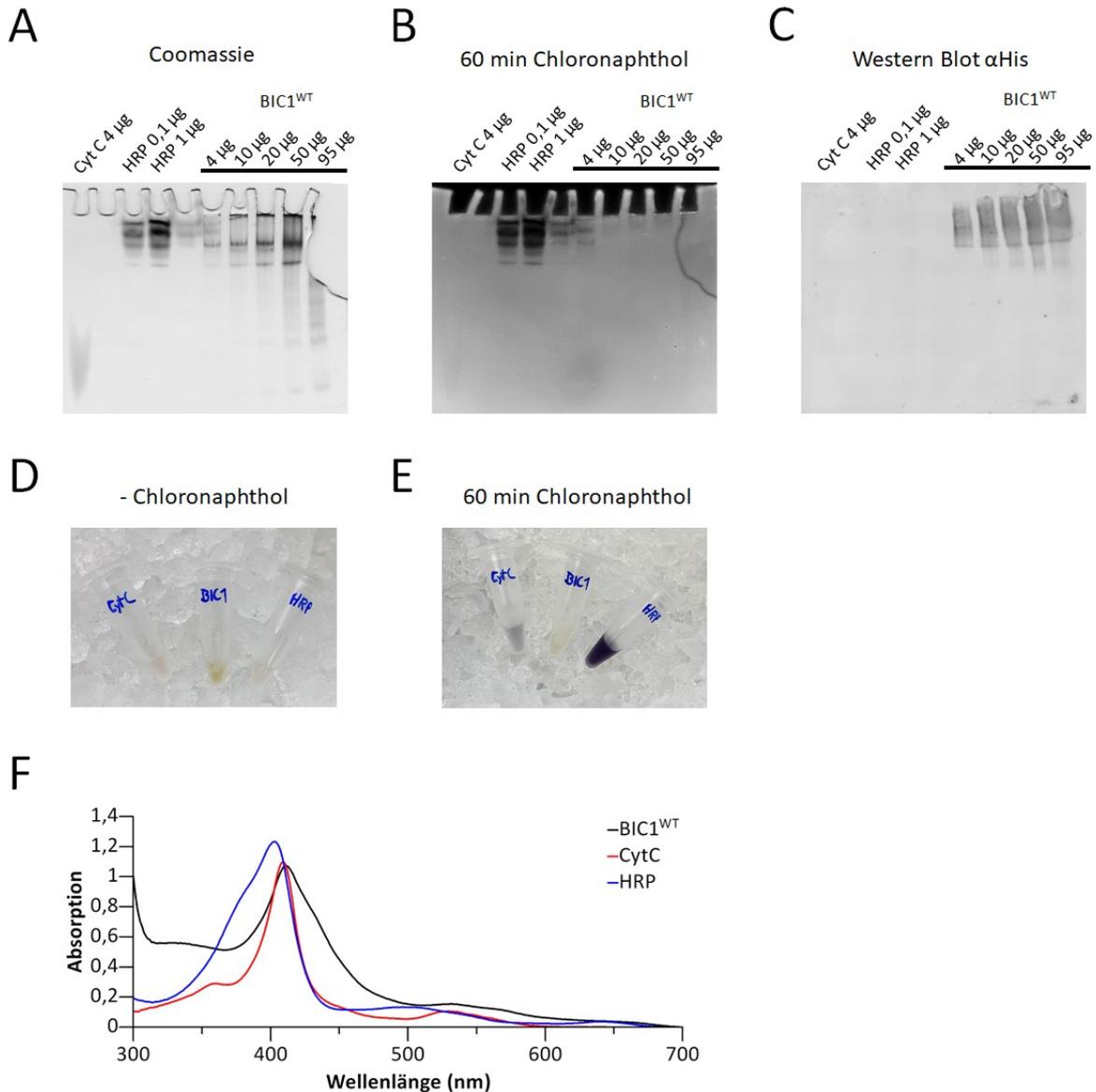
Mutation des Histidin Codons zu Alanin zu keiner weiteren Verringerung an Häm in der Probe führte.

Der Test auf Peroxidaseaktivität der BIC1-Varianten erfolgte mit dem Reagenz *Amplex Red* über Fluoreszenz-Spektroskopie. Hierbei reagiert *Amplex Red* in der Gegenwart von Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid und oxidiert es zu dem Produkt Resorufin. Resorufin kann bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm und einer Emission von 593 nm detektiert und quantifiziert werden (Karakuzu *et al.*, 2019). BIC1<sup>WT</sup>, BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup> wurden in einer Endkonzentration von 1 µM mit 5 mM *Amplex Red* und 10 mM Wasserstoffperoxid für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde Resorufin im Fluorimeter gemessen und die Relative Fluoreszenz Einheit (RFU) wurde ermittelt (**Abb. 22 B**). Die Menge an Häm in den Proteinlösungen schien mit der Peroxidaseaktivität zu korrelieren (nicht statistisch getestet). BIC1<sup>WT</sup>, welches im zuvor gemessenen *Assay* mehr Häm besaß, zeigte hier die stärkste Peroxidaseaktivität. Auch die Cystein Mutationen schienen wieder ausschlaggebend für eine Verringerung der Peroxidaseaktivität zu sein. Trotz eines fehlenden Häm *c* bei BIC1<sup>3CA</sup> und BIC1<sup>H13A3CA</sup> wurde eine schwache Reaktion mit *Amplex Red* gemessen. Dies könnte durch die noch immer vorhandene Affinität zu Hämen erklärbar sein. Somit zeigte sich, dass Häm *c* nicht alleine für die gezeigte Peroxidaseaktivität zuständig war. Das ausgetauschte Histidin in der BIC1<sup>H13A3CA</sup> Mutante hatte keinen Einfluss auf die Peroxidaseaktivität, da es auch keinen Einfluss auf die Häm Besetzung hatte. Hämin wurde zusätzlich noch alleine gemessen, in derselben Konzentration wie Häm in einer 1 µM BIC1<sup>WT</sup> Proteinlösung. Hier zeigte sich, dass bereits Hämin alleine in diesem *Assay* eine Peroxidaseaktivität aufwies. Die Bildung von Resorufin durch Hämin war trotz ähnlicher Häm Konzentration wie bei BIC1<sup>WT</sup> ca. doppelt so stark. Dies könnte z.B. darauf zurückzuführen sein, dass die BIC1<sup>WT</sup> Proteinlösung mit anderen Proteinen verunreinigt war und somit eine falsche Proteinkonzentration von BIC1<sup>WT</sup> berechnet wurde. Alternativ wäre Hämin in diesem *Assay* effektiver als Häm, bspw. durch einen anderen Redoxzustand. Somit kann für BIC1<sup>WT</sup> nicht von einer spezifischen Peroxidase-Aktivität ausgegangen werden, sondern diese ist alleine durch den gebundenen Kofaktor bedingt. In unten beschriebenen *Assays* wurde eine mögliche Peroxidaseaktivität von BIC1<sup>WT</sup> zusätzlich getestet.

### 5.1.6 Test auf Peroxidaseaktivität von BIC1<sup>WT</sup> mit Chloronaphthol als Substrat

Peroxidasen benötigen für die katalytische Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies ein spezifisches Substrat bzw. Reduktionsmittel (Chmielnicka *et al.*, 1971). Das Substrat von BIC1<sup>WT</sup> für eine Peroxidaseaktivität ist jedoch unbekannt.

Für einen weiteren Test auf Peroxidaseaktivität von BIC1<sup>WT</sup> wurde ein weiteres Substrat getestet. Das farblose Substrat Chloronaphthol reagiert mit Peroxidasen (speziell getestet für HRP) in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und bildet das violette Präzipitat Benzo-4-chlorocyclohexadienone (Young, 1989). BIC1<sup>WT</sup> in verschiedenen Konzentrationen wurde mit Kontrollen auf ein natives Gel geladen (**Abb. 23 A, C**). Hierbei wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Lösungen 6 °C hatten und auch das Gel bei niedriger Stromstärke (20 mA, 1h) gelaufen lassen wurde, damit die Proteine nicht denaturierten. HRP wurde als Positivkontrolle geladen, da deren Substratspezifität mit Chloronaphthol bekannt ist. Als Negativkontrolle wurden 4 µg denaturiertes Cytochrom C geladen. Denaturiertes Cytochrom C trägt immer noch kovalent gebundenes Häm *c* und dient als Kontrolle, ob Häm alleine ausreicht, um eine Peroxidaseaktivität in diesem *Assay* zu erzielen, bzw. um zu testen ob der *Assay* spezifisch für enzymatische Reaktionen ist. Nach einstündiger Inkubation des nativen Gels in der Substrat-Lösung wurde eine Aufnahme mit dem *GelDoc-System* von *Bio-Rad* gemacht (**Abb. 23 B**). Das violette Produkt der Chloronaphthol-Lösung war nur bei der Positivkontrolle HRP zu sehen.



**Abb. 23: BIC1<sup>WT</sup> zeigt keine Peroxidaseaktivität mit Chloronaphthol als Substrat in einem nativen Gel.** (A) Mit Coomassie gefärbtes natives Gel mit BIC1<sup>WT</sup> und Kontrollen nach 60 min Inkubation mit Chloronaphthol (Thermo Scientific). (B) Aufnahme des nativen Gels mit dem *GelDoc Go* (Bio-Rad) Imaging System nach einstündiger Inkubation in Chloronaphthol. Peroxidasen wie HRP können das farblose Chloronaphthol als Substrat verwenden und in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in ein violetteres Präzipitat konvertieren. (C) *Western Blot* mit  $\alpha$ His<sub>6</sub>-Antikörpern zur Detektion von BIC1<sup>WT</sup>. Unterschiedliche Konzentrationen von BIC1<sup>WT</sup> wurden auf das native Gel geladen (A, B, C). Als Positivkontrollen wurden unterschiedliche Konzentrationen an HRP geladen. Als Negativkontrolle wurde gekochtes, denaturiertes Cytochrom C geladen. (D) Vergleich Proteinproben vor Zugabe von Chloronaphthol und (E) nach 60-minütiger Inkubation mit Chloronaphthol (50 Vol.%). Die Konzentrationen der Proteine waren: BIC1<sup>WT</sup> 10 µg/µL, Cytochrom C 0,2 µg/µL, HRP 0,6 µg/µL und haben eine vergleichbare Konzentration an Häm. (F) UV/VIS-Spektren der eingesetzten Proteine aus (D, E). Für die Berechnung des Häm-Gehalts wurden jeweils die Absorptionsmaxima verwendet und gegen eine Eichgerade von Hämin geprobt. BIC1<sup>WT</sup> bei 411 nm, Cytochrom C bei 409 nm und HRP bei 403 nm. Experiment wurde mit einem technischen Replikate durchgeführt.

Hieraus lässt sich schließen, dass BIC1<sup>WT</sup> entweder keine Peroxidaseaktivität besitzt, oder Chloronaphthol nicht als Substrat verwenden kann. Nach der Inkubation in der Substrat-Lösung wurde das Gel mit Coomassie gefärbt, sodass man feststellen konnte, dass alle Proteine auf dem Gel geladen und dort nach der *Native-PAGE* vorhanden waren (**Abb. 23 A**). Erkennbar waren Proteinbanden für alle Proteinlösungen, jedoch konnte nur über einen *Western Blot* die tatsächliche Anwesenheit von BIC1<sup>WT</sup> über den His<sub>6</sub>-tag bestätigt werden (**Abb. 23 C**). Zusätzlich lässt sich sagen, dass Häm alleine in diesem *Assay*, anders als im *Assay* mit *Amplex Red*, keinen Peroxidase-ähnlichen-Effekt zeigte. Das denaturierte Cytochrom C zeigte keine violette Färbung und somit keine Reaktion mit Chloronaphthol. Somit war der Kofaktor Häm *c* ohne das Apoprotein Cytochrom C nicht in der Lage Chloronaphthol als Substrat zu verwenden.

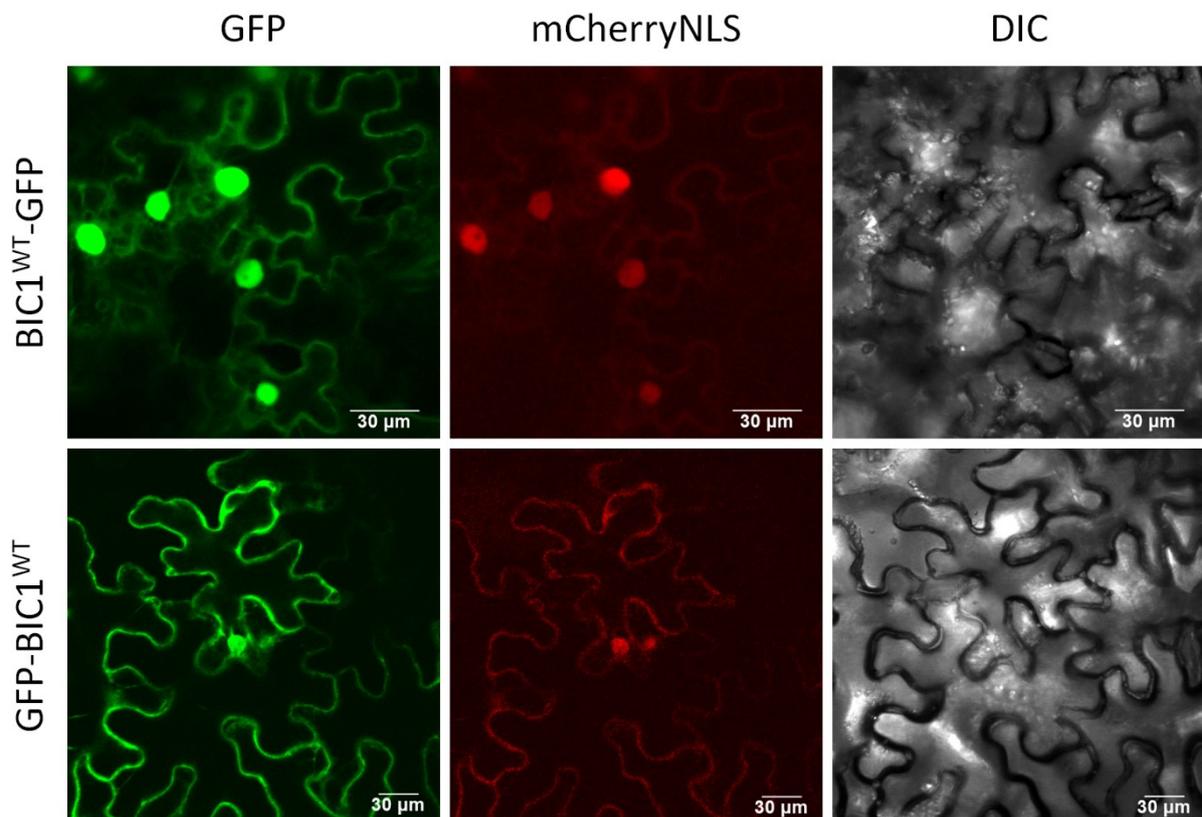
Da es unbekannt war, ob eine vergleichbare Menge an Häm pro Proteinlösung in dem nativen Gel eingesetzt wurde, wurde der Ansatz im Reaktionsgefäß mit vergleichbarer Häm Konzentration angesetzt und wiederholt (**Abb. 23 D, E**). Die Proteinlösungen wurden spektroskopisch so verdünnt, dass eine vergleichbare Häm Konzentration in allen Proteinlösungen gegeben war (**Abb. 23 F**). Über lineare Regression einer Hämin Eichgeraden wurde spektroskopisch der Häm-Gehalt der Proteinlösungen bestimmt. Die eingesetzte Häm Konzentration beträgt bei BIC1<sup>WT</sup> 36 µM, Cytochrom C 37 µM und HRP 41 µM. Die Reaktion von BIC1<sup>WT</sup>, Cytochrom C und HRP mit dem Chloronaphthol-Substrat wurde auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden vor Zugabe von Chloronaphthol und nach 60-minütiger Inkubation mit Chloronaphthol (50 Vol.% des Gesamtvolumen) verglichen. Cytochrom C wurde in diesem Ansatz nicht denaturiert, um dessen Spezifität mit dem Substrat zu testen.

Ohne Chloronaphthol erschienen alle verwendeten Proteine aufgrund in der Lösung befindlichem Häm leicht bräunlich. Nach Zugabe und einstündiger Inkubation mit Chloronaphthol verfärbte sich die HRP-Probe sehr stark dunkelviolett und die Cytochrom C-Probe leicht violett. Die BIC1<sup>WT</sup>-Probe hingegen verfärbte sich nicht. Somit zeigte nur HRP und in gewissem Umfang auch Cytochrom C eine Peroxidaseaktivität, BIC1<sup>WT</sup> hingegen nicht. Ausschließen konnte man deshalb, dass Häm alleine diese Reaktion katalysierte, weil Cytochrom C eine, wenn auch schwache, katalytische Aktivität mit Chloronaphthol im nativen Zustand hatte, im denaturierten Zustand jedoch nicht.

Aufgrund der beiden unterschiedlichen Tests auf Peroxidaseaktivität ist deshalb davon auszugehen, dass BIC1<sup>WT</sup> keine Peroxidase ist. Die mutmaßliche Peroxidase-Aktivität von den BIC1<sup>WT</sup> im *Amplex Red Assay* ist ausschließlich auf Häm *c* zurückzuführen.

### 5.1.7 Co-Lokalisierung von BIC1<sup>WT</sup> mit Palladium-mesoporphyrin IX (Pd-mP)

Palladium-mesoporphyrin hat strukturelle Ähnlichkeiten mit Häm (Severance und Hamza, 2009; Vanhee *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu dem in Häm befindlichen, zentralen Eisen-Ion, kann Palladium-mP im KLSM angeregt und sichtbar gemacht werden. Durch transiente Expression von BIC1<sup>WT</sup> fusioniert mit GFP in *N. benthamiana* und einer Inokulation des Gewebes mit Pd-mP sollte untersucht werden, ob BIC1<sup>WT</sup> eine Affinität zu Porphyrinen besitzt. Um diese Frage zu beantworten, musste vorher untersucht werden, in welchen Kompartimenten BIC1<sup>WT</sup> in der Pflanzenzelle lokalisiert ist und welche Fusion (N- oder C-terminal) mit GFP am geeignetsten ist (Abb. 24).



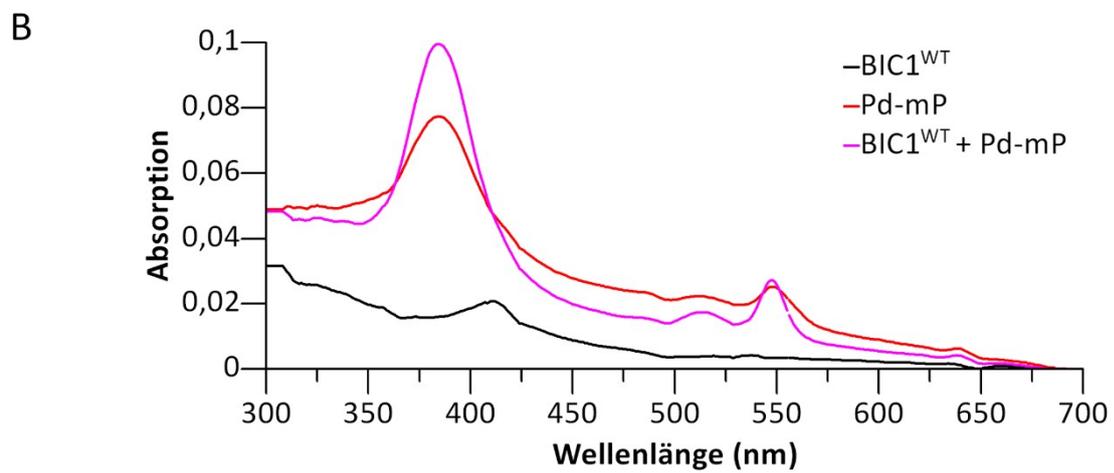
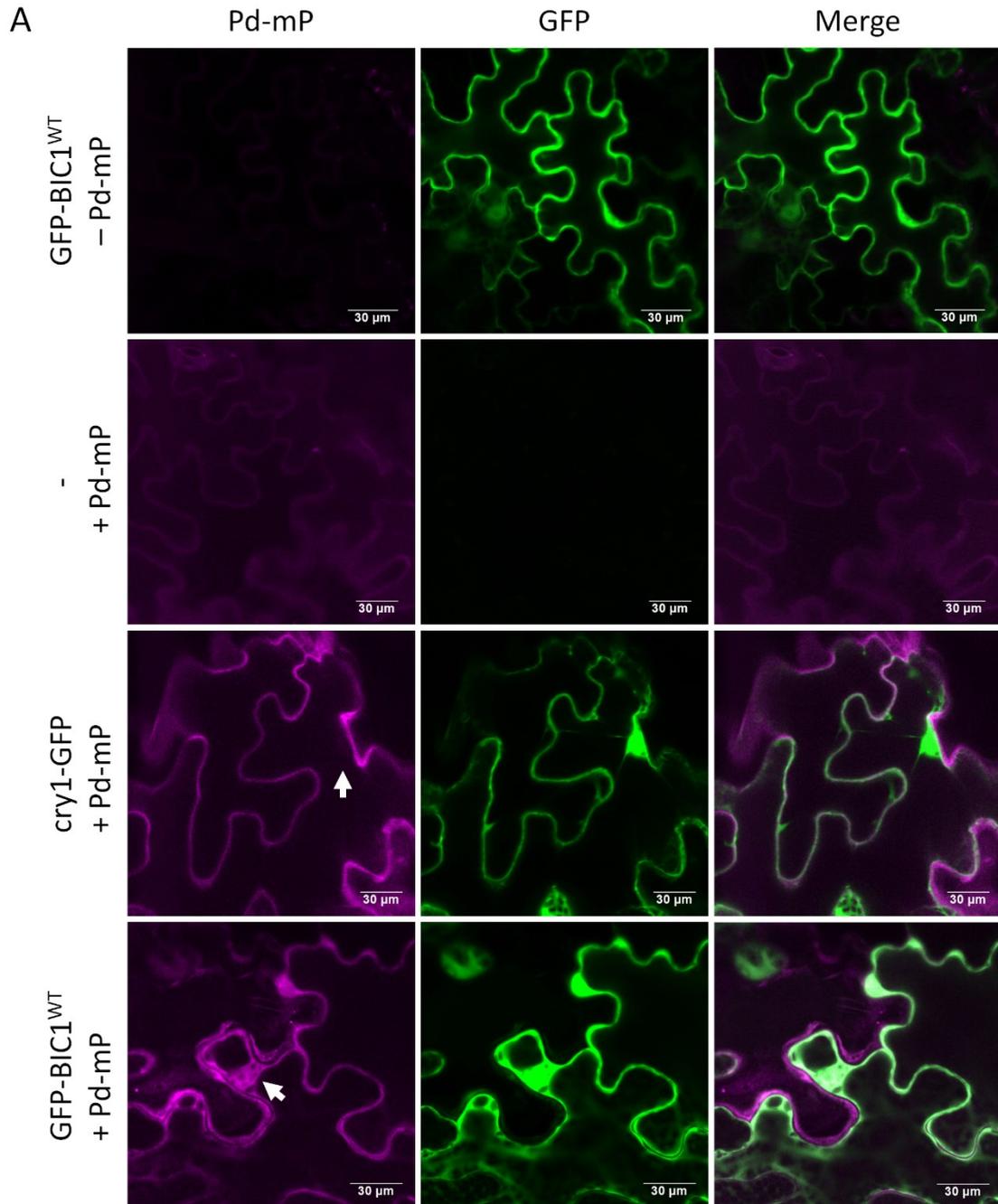
**Abb. 24:** Die N- oder C-terminale Orientierung von GFP an BIC1<sup>WT</sup> hat keinen Einfluss auf dessen Lokalisation in *N. benthamiana*. Für Proteinlokalisationsstudien wurden BIC1<sup>WT</sup>-GFP (pUBC-GFP) und GFP-BIC1<sup>WT</sup> (pUBN-GFP) transient in *N. benthamiana* exprimiert und mittels KLSM untersucht. Co-exprimiert wurde mCherryNLS als Kontrolle zur Identifikation des Zellkerns. GFP wurde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission bei 505-515 nm gemessen. RFP wurde bei einer Wellenlänge von 543 nm angeregt und die Emission bei 600-625 nm gemessen. Zur Kontrolle wurde ebenfalls ein Differentialinterferenzkontrast Bild aufgenommen (DIC). Die Fusionsproteine wurden in den jeweiligen Kanälen einzeln angeregt.

Das Fluoreszenzsignal wurde in den äußersten Epidermiszellen untersucht, weil diese frei von Chloroplasten und somit frei von störender Autofluoreszenz waren. An welcher Stelle GFP mit BIC1<sup>WT</sup> fusioniert war, hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von BIC1<sup>WT</sup> in der Pflanzenzelle. BIC1<sup>WT</sup> wurde hauptsächlich im Zellkern beobachtet, wie mCherry-NLS. Außerdem war BIC1<sup>WT</sup> im Cytosol nahe der Zellmembran lokalisiert. In differenzierten Zellen ist die Vakuole voluminös, sodass das Cytosol nur eine dünne Schicht am Rand der Zelle ausbildet (Serna, 2005; Luther *et al.*, 2021). Das Fusionsprotein ist mit seinen knapp 50 kDa noch im Bereich einer möglichen passiven Diffusion. Jedoch kann ein aktiver Zellkerntransport nicht ausgeschlossen werden (Grossman *et al.*, 2012; Raices und D'Angelo, 2012).

Um zunächst das spezifische Fluoreszenz Signal von Pd-mP herauszufinden, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Zum einen wurde GFP-BIC1<sup>WT</sup> (pUBN-GFP) transient in *N. benthamiana* exprimiert und ohne den Zusatz von Pd-mP unter den verwendeten KLSM-Bedingungen getestet (**Abb. 25 A**, obere Reihe). Im Vergleich dazu wurde eine Probe getestet, in der kein fluoreszierendes Fusionsprotein exprimiert wurde, jedoch 24 h vor der Mikroskopie die Blätter mit Pd-mP inokuliert wurden.

In der Probe ohne Pd-mP erkannte man kein Signal, wenn man die Wellenlänge 405 nm für die Pd-mP Anregung und für die Detektion die Emission 420-470 nm verwendete. Jedoch erkannte man ein schwaches, diffuses Signal nach Inokulation mit dem Farbstoff. Das Signal beschränkte sich primär auf das Cytosol (**Abb. 25 A**, zweite Reihe). Hieraus ließ sich ableiten, dass die gewählten Bedingungen für die Co-Lokalisation geeignet waren.

Als Negativkontrolle wurde cry1-GFP (pUGT1-Dest.) in Tabak exprimiert. 24 h vor der Mikroskopie wurden die zuvor mit *A. tumefaciens* inokulierten Blätter mit einer Pd-mP Lösung versetzt. Selbiges wurde mit dem zu untersuchenden Konstrukt GFP-BIC1<sup>WT</sup> getan. Das Pd-mP Signal schien durch das GFP-Signal der Fusionsproteine verstärkt zu werden, da in dem Detektionsbereich des Pd-mP Kanals (420-470 nm) noch Emission von GFP detektiert werden konnte. Deshalb konnte das Pd-mP Signal in Kombination mit GFP-Fusionsproteinen stärker als in der Kontrolle ohne Fusionsprotein erscheinen. Ein deutlicher Unterschied war jedoch, dass das cry1-GFP Signal im Zellkern akkumulierte, das Pd-mP Signal bei cry1-GFP aber nicht im Zellkern co-lokalisierte (**Abb. 25 A**, Weißer Pfeil). In der Überlagerung der Bilder (*Merge*) bleibt der Zellkern grün, da dort kein Pd-mP Signal lokalisiert wurde, welcher bei Überlagerung von violetterm und grünem Signal zu hellgrünem Signal verschmelzen würde.



**Abb. 25: Palladium-mesoporphyrin co-lokalisiert mit GFP-BIC1<sup>WT</sup>.** (A) Untersucht wurde, ob GFP-BIC1<sup>WT</sup> (pUBN-GFP) mit Pd-mP in *N. benthamiana* co-lokalisiert. Pd-mP wurde in zuvor mit *A. tumefaciens* infiltriertem Gewebe für transiente Expression von GFP-BIC1<sup>WT</sup> inokuliert und 24 h später mittels KLSM untersucht. Mitgetestet wurden verschiedene Kontrollen. GFP-BIC1<sup>WT</sup> ohne Pd-mP zeigte kein Signal im Pd-mP Kanal. Die Probe ohne Fusionsprotein + Pd-mP zeigte unspezifisches, cytoplasmatisches Signal im Pd-mP Kanal. cry1-GFP (pUGT1-Dest.) bindet keine Porphyrine und wurde als Negativkontrolle mitgeprobt. Im Pd-mP Kanal wurde mit einer Wellenlänge von 405 nm angeregt und die Emission bei 420-470 nm gemessen. GFP wurde bei 488 nm angeregt und die Emission bei 500-550 nm gemessen. Im Kanal *Merge* wurden die Signale von Pd-mP und von GFP übereinander gelagert. Wenn die Signale von Pd-mP und GFP co-lokalisieren ergab sich beim Überlagern eine hellgrüne Färbung. Weißer Pfeil deutet auf Zellkerne. (B) UV/VIS-Spektrum von 0,5 µg/µL BIC1<sup>WT</sup> und Rekonstitution mit 1 µM Pd-mP. Spektrum von Pd-mP alleine wurde mit 1 µM Pd-mP gemessen. Konzentration von BIC1<sup>WT</sup> im Spektrum ohne Pd-mP war 0,5 µg/µl.

Im Unterscheid dazu erkannte man eine Co-Lokalisation des Pd-mP Signals mit dem GFP-Signal von GFP-BIC1<sup>WT</sup> im Bereich des Zellkerns (Weißer Pfeil). Im Kanal *Merge* erkannte man eine hellgrüne Färbung, wenn beide Signal übereinander gelagert waren. Somit schien nur bei GFP-BIC1<sup>WT</sup> der Farbstoff Pd-mP im Zellkern zu akkumulieren.

Daraus lässt sich schließen, dass GFP-BIC1<sup>WT</sup> mit Pd-mP co-lokalisiert und BIC1<sup>WT</sup> eine Affinität zu Pd-mP und somit wahrscheinlich generell zu Porphyrinen besitzt. cry1-GFP hingegen schien Pd-mP nicht zu binden.

Zusätzlich ließ sich spektroskopisch nachweisen, dass BIC1<sup>WT</sup> mit Pd-mP rekonstituiert wurde (**Abb. 25 B**). Nach Zugabe von 1 µM Pd-mP Lösung zu 0,5 µg/µL BIC1<sup>WT</sup> erkannte man eine leichte Zunahme der Absorption im Bereich 385 nm und 550 nm, ähnlich wie bei anderen Rekonstitutionen mit Pd-mP (Lara *et al.*, 2005). Dies könnte durch eine spezifische Bindung von Pd-mP an BIC1<sup>WT</sup> erklärbar sein. Jedoch wurden keine Änderungen sowohl bei der Absorption zwischen 600-700 nm, als auch einen möglichen *red-Shift* der Pd-mP Absorption durch Proteinbindung beobachtet. Die Absorptionzunahme unterstützt die Annahme, dass BIC1<sup>WT</sup> eine Affinität zu Pd-mP und somit wahrscheinlich generell zu Porphyrinen besitzt.



sind weiß in einer schwarzen Box markiert. Aminosäuren mit hoher Ähnlichkeit sind schwarz in einer grauen Box. Aminosäuren mit einer mathematischen Sequenzähnlichkeit unterhalb des Schwellenwertes werden als nicht konserviert betrachtet. **(B)** BIC1<sup>WT</sup> Struktur, berechnet von *AlphaFold*. Protein Daten wurden aus *Uniprot* mit dem Proteincode Q9LXJ1 entnommen. *AlphaFold* errechnet einen Konfidenzwert pro Aminosäure von 0-100 (*pLDDT*) und gibt die Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit der Strukturberechnung in Farben wieder. Dunkelblau mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit (*pLDDT* > 90), Blau mit hoher Wahrscheinlichkeit (90 > *pLDDT* > 70), Gelb mit geringer Wahrscheinlichkeit (70 > *pLDDT* > 50) und orange mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit (*pLDDT* < 50).

Die CID von BIC1<sup>WT</sup> ist hoch konserviert und sorgt wahrscheinlich wie bei BIC2 für die Interaktion mit Cryptochromen (Ma *et al.*, 2020b). Alle Cysteine, deren Codone in der Mutante BIC1<sup>3CA</sup> mutiert wurden, befinden sich in dieser Domäne. Das H13, an dem in der Massenspektrometrie ein Häm gefunden wurde, scheint nur in BIC1<sup>WT</sup> der Ordnung der *Brassicales* konserviert zu sein. In anderen BIC1<sup>WT</sup> Proteinen nahe verwandter Pflanzenordnungen ist H13 nicht stringent konserviert.

Bei Betrachtung der BIC1<sup>WT</sup> Struktur, welche von *AlphaFold* berechnet wurde, ist auffällig, dass der Großteil des Proteins ungeordnet ist (**Abb. 26 B**). Einzig die konservierte Cryptochrom-interagierende-Domäne konnte von *AlphaFold* besser berechnet werden. Hierbei berechnet *AlphaFold* einen *per-residue confidence score (pLDDT)* zwischen 0 und 100. Die Wahrscheinlichkeit, dass die berechnete Struktur der Realität entspricht liegt bei Dunkelblau *pLDDT* > 90, Hellblau *pLDDT* >70, Gelb *pLDDT* >50 und Orange *pLDDT* <50. Somit erscheinen die konservierten und daher gut berechenbaren Strukturen blau. Das Cystein 99 bildet über seine Thiol-Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zum benachbarten Tryptophan 96 und eine weitere über ein Stickstoff-Atom. Ebenso werden Wasserstoffbrückenbindungen über den Carbonyl-Sauerstoff zu den benachbarten Phenylalanin 102 und Asparaginsäure 103 gebildet. Dies bedeutet, dass das Cystein in die konservierte, helikale Struktur der CID-eingebunden ist und eine Bindung von Häm *c* unwahrscheinlicher macht, da diese für eine Strukturänderung innerhalb der konservierten Domäne sorgen würde. Es ist auch davon auszugehen, dass die beobachteten, intermolekularen Disulfidbrücken höchstwahrscheinlich für eine strukturelle Änderung sorgen würden, die nicht von der Strukturberechnung berücksichtigt wurde.

Das Histidin 13 befindet sich wahrscheinlich in einem Beta-Faltblatt, jedoch lässt sich durch die schlechte Berechnung von *AlphaFold* nur wenig über dessen strukturelle Beschaffenheit aussagen.

### 5.3 Einfluss der Cystein-Austausche in BIC1 auf dessen biologische Funktion *in planta*

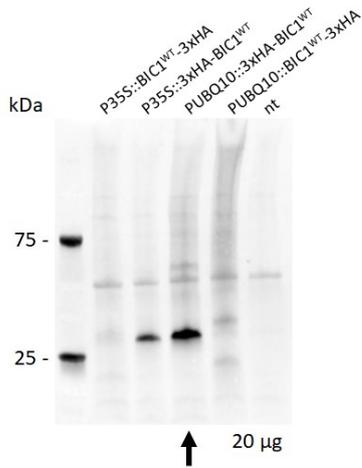
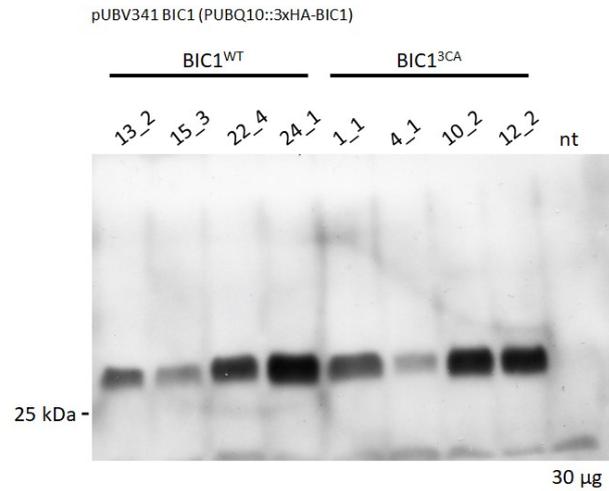
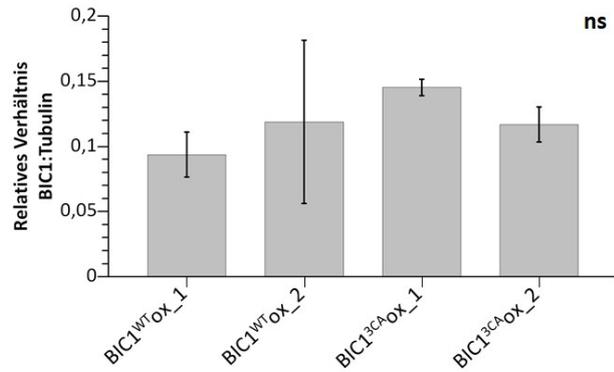
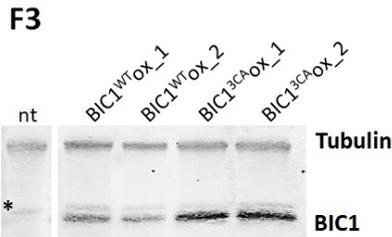
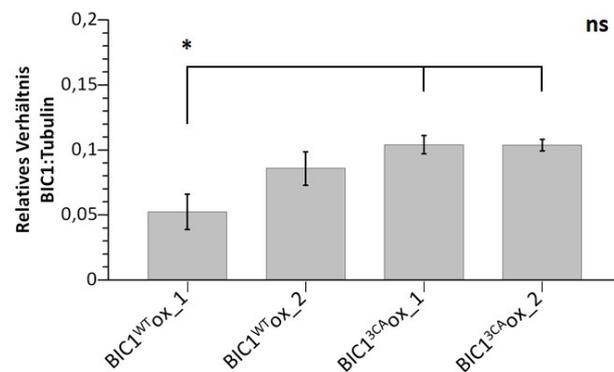
Da die Cysteine in BIC1<sup>WT</sup> Proteinen hoch konserviert sind und sich in einer funktionellen Domäne befinden, wurde durch *in planta* Analysen untersucht, ob deren Austausch durch Mutation hin zu Alanin die Interaktion mit bzw. Inhibierung von Cryptochrom 1 beeinträchtigen. Zusätzlich wurde somit auch analysiert, ob das Verhindern möglicher intermolekulare Disulfidbrücken bei der Mutante BIC1<sup>3CA</sup> einen Einfluss auf die Inhibierung von Cryptochrom hat.

Hierfür wurden *A. thaliana* vom Ökotyp Col-0 verwendet und stabile Linien generiert, die entweder BIC1<sup>WT</sup> oder die Mutante BIC1<sup>3CA</sup> überexprimieren. Um die möglichen Wechselwirkungen zwischen BIC1-Überexpression und biologischer Funktion von Cryptochromen zu untersuchen, wurde der Phänotyp der generierten Linien hinsichtlich bekannter Cryptochrom Reaktionen analysiert. Hierbei wurden die Hypokotyllängen, die Blühzeitpunkte und andere Merkmale der Pflanzen, die entweder BIC1<sup>WT</sup> oder BIC1<sup>3CA</sup> überexprimieren, untersucht und verglichen.

#### 5.3.1 Expression von BIC1 in *Nicotiana benthamiana* und Transformation in *A. thaliana*

Mit dem Ziel, stabile Linien in *Arabidopsis thaliana* zu generieren, wurden verschiedene BIC1-Konstrukte in Vektoren (bezogen von Christopher Grefen, Universität Tübingen) eingebracht und zuvor in *N. benthamiana* vorgetestet. Das Gen für das Protein BIC1<sup>WT</sup> wurde hierbei entweder C- oder N-terminal mit einem HA-tag versehen. Die Expression wurde entweder durch den konstitutiven 35S-Promoter (pGWB614 C-Term., pGWB615 N-Term.) oder den konstitutiven Ubiquitin 10-Promoter (pUBV341 N-Term., pUBV386 C-Term.) getrieben.

Über *A. tumefaciens* wurden die vier Konstrukte in *N. benthamiana* eingebracht und transient exprimiert. Nach 3-4 Tagen wurden die inokulierten Blätter geerntet und aufgeschlossen. Dabei wurde das Pflanzenmaterial mit einer Zelmühle aufgeschlossen und die Proteine mit einem Aceton-Trichloressigsäure-Gemisch präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden gründlich mit Aceton gewaschen, sodass das für die Immundetektion mit dem LiCOR Odyssey-System störende Chlorophyll vollständig entfernt wurde. Nach der Resuspension in Reduktionsmittel enthaltendem SDS-Probenpuffer wurde der Gesamtproteinextrakt mittels *Western Blot* und  $\alpha$ HA-Antikörpern mit dem LiCOR-System untersucht, sodass festgestellt werden konnte, welches Konstrukt qualitativ am Besten in Pflanzen exprimiert wurde (**Abb. 27 A**).

**A****B****C****D**

**Abb. 27: Konstrukt PUBQ10::3xHA-BIC1 (pUBV341) wurde für *A. thaliana* Transformation verwendet.**

(A) *Western Blot* mit  $\alpha$ HA-Antikörpern. Geladen wurden 20  $\mu$ g des Gesamtproteinextraktes von infiltrierten *N. benthamiana* Blättern, die mit den angegebenen Konstrukten transformiert worden waren. Dabei entspricht pGWB614 dem Konstrukt P35S::BIC1<sup>WT</sup>-3xHA, pGWB615 dem Konstrukt P35S::3xHA-BIC1<sup>WT</sup>, pUBV341 dem Konstrukt PUBQ10::3xHA-BIC1<sup>WT</sup>, pUBV386 dem Konstrukt PUBQ10::BIC1<sup>WT</sup>-3xHA. Die BIC1<sup>WT</sup> Proteinbande läuft knapp über der 25 kDa Markerbande. Als Negativkontrolle wurde nicht transformiertes WT Gewebe verwendet (nt). Auswertung erfolgte über das *LiCOR*-System. Der Versuch wurde mit zwei technischen Replikaten bestätigt. (B) *ECL Western Blot* mit  $\alpha$ HA-Antikörpern. *A. thaliana* Transformation erfolgte mit dem Konstrukt PUBQ10::3xHA-BIC1<sup>WT</sup> bzw. PUBQ10::3xHA-BIC1<sup>3CA</sup> (pUBV341). Geladen wurden 30  $\mu$ g des Gesamtproteinextraktes aus *A. thaliana* Keimlingen der F3-Generation. Geprüft wurden Extrakte von vier

BIC1<sup>WT</sup>- und vier BIC1<sup>3CA</sup>-Überexpressions Linien. Als Negativkontrolle wurde nicht infiltriertes Gewebe einer WT-Pflanze verwendet (nt). (C) Nachfolgend werden alle abgebildeten Linien aufgrund besserer Übersichtlichkeit umbenannt. Die BIC1<sup>WT</sup>-Linie 22\_4 ist nachfolgend BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 und 24\_1 ist nachfolgend BIC1<sup>WT</sup>ox\_2. Die BIC1<sup>3CA</sup>-Linie 10\_2 ist nachfolgend BIC1<sup>3CA</sup>ox\_1 und 12\_2 ist nachfolgend BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2. *Western Blot* mit dem *LiCOR*-System zur Quantifizierung der Proteinmenge von transgenem BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> aus Gesamtproteinextraktion aus *A. thaliana* Keimlingen der F3-Generation. Antikörper gegen  $\alpha$ HA-tag und gegen  $\alpha$ Tubulin. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet, und um die BIC1-Intensitäten ins Verhältnis zu setzen. Als Negativkontrolle wurden nicht transformierte WT *A. thaliana* Col-0 verwendet (nt). (D) Quantifizierung der Proteinmenge von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> aus Gesamtproteinextraktion aus *A. thaliana* Keimlingen der F4-Generation. Durchgeführt wie (C). Versuche aus (C) und (D) wurden mit 3 technischen Replikaten durchgeführt. Durchgeführte t-Tests signifikant nach Bonferroni-Korrektur bei \*P < 0,008333. Bei den t-tests wurden alle Gruppen miteinander verglichen. ns steht für nicht signifikant. Standardabweichung als Fehlerbalken wiedergegeben. \* zeigt artifizielles Signal.

Die Expression von BIC1<sup>WT</sup> aus den Konstrukten pGWB614 und pUBV386 war in diesem Ansatz nicht gelungen. Jedoch konnte ein starkes Signal im *LICOR*-System bei den Konstrukten pGWB615 und pUBV341 detektiert werden. Beide Konstrukte sorgten für eine konstitutive Expression, jedoch wurde sich für die folgenden Transformationen in *A. thaliana* für das Konstrukt pUBV341 entschieden, weil hierbei die BIC1-Varianten durch den Ubiquitin Promoter weniger stark konstitutiv exprimiert werden als durch den 35S-Promoter bei pGWB615. Der 35S-Promoter kann aufgrund seiner starken Expressionseigenschaften für *Gene-Silencing* sorgen, sodass in nachfolgenden Generationen weniger oder kein Fremdprotein mehr exprimiert werden würde (Schubert *et al.*, 2004).

Sowohl BIC1<sup>WT</sup> als auch BIC1<sup>3CA</sup> im Konstrukt pUBV341 (PUBQ10::3xHA-BIC1<sup>WT</sup>, PUBQ10::3xHA-BIC1<sup>3CA</sup>), transformiert in *A. tumefaciens*, wurden mit der *floral-dip* Methodik (Clough und Bent, 1998) in die noch geschlossenen Blüten von *A. thaliana* Ökotyp Col-0 eingebracht. Hierbei wurde, wie bei Pflanzen üblich, das Transgen in eine beliebige Stelle im Genom integriert. Mit Hilfe von stark sensitiven *ECL-Western Blots* konnten in der F3-Generation die beiden BIC1-Varianten nachgewiesen werden (**Abb. 27 B**). Hierbei wurden pro Transgen vier unabhängige Linien untersucht und deren Gesamtproteinextrakte qualitativ nach der Expression der transgenen BIC1-Varianten hin untersucht. Die Methode des *ECLs* hat den Vorteil, dass man ausschließlich das Signal der HRP-konjugierten Antikörper  $\alpha$ HA-tag beobachtet, wohingegen beim *LiCOR*-System nicht nur die Fluoreszenz-konjugierten Antikörper im Dunkelrotlicht (ca. 700 und 800 nm) angeregt werden, sondern auch andere Proteine/Moleküle die in diesem Bereich absorbieren. Aus diesem Grund wurde sich bei qualitativen Analysen stets für ein *ECL-Western Blot* entschieden. Für eine Quantifizierung der Proteinmenge von BIC1-Varianten musste jedoch auf das *LiCOR*-System zurückgegriffen werden, da die Intensität der Fluoreszenz-tags proportional und über einen weiten Bereich mit

der Proteinmenge ansteigt. Eine Quantifizierung über *ECL-Western Blot* ist deutlich schwieriger und wurde nicht durchgeführt. Es wurden jeweils zwei unabhängige Linien (Linien die aus einem Transformationsereignis bzw. einem Samen nach der Transformation entstammen) jedes Genotyps für nachfolgende Untersuchungen verwendet, um einen Positionseffekt ausschließen zu können. Hierbei wurde versucht, jeweils zwei Linien zu finden, die ein ähnliches Expressions-Level von transgenem BIC1<sup>WT</sup> bzw. BIC1<sup>3CA</sup> besaßen. Nur Linien mit einer ähnlichen Menge an Zielprotein waren vergleichbar. Sowohl die F3-Linien (**Abb. 27 C**), als auch die F4-Nachzucht Linien (**Abb. 27 D**) wurden verglichen und für spätere Versuche verwendet. Das Expressions-Level von BIC1<sup>WT</sup> schien in den Linien BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 (umbenannt von 22\_4) und BIC1<sup>WT</sup>ox\_2 (24\_1) vergleichbar zu sein. Ebenso vergleichbar waren die Level von BIC1<sup>3CA</sup> in den Linien BIC1<sup>3CA</sup>ox\_1 (10\_2) und BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2 (12\_2). Auch untereinander verglichen zeigten BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> Linien ähnliche Expressionslevel. Abweichend hiervon hatte die Linie BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 eine signifikant geringere BIC1<sup>WT</sup>-Menge im Vergleich zu beiden BIC1<sup>3CA</sup> Linien in der F4-Generation. Ebenfalls beobachtet wurde eine geringe Abnahme aller BIC1-Proteinlevel in der F4-Generation im Vergleich zur F3-Generation.

Die Quantifizierung der BIC1-Proteine erfolgte mit dem *LiCOR*-System, indem die relative Intensität der Fluoreszenz der BIC1 Proteinbanden gemessen wurde und in Relation mit dem Signal von Tubulin gesetzt wurde. Alle vier Linien hatten eine vergleichbare Menge an HA-BIC1<sup>WT</sup> und HA-BIC1<sup>3CA</sup> in der F3-Generation.

Die verwendeten vier Linien wurden nachfolgend auf ihre Homozygotie getestet, indem man die Keimlinge der ausgesäten Samen erneut mit dem Herbizid Basta behandelte, gegen das sie aufgrund des mittransformierten Selektionsmarkers eine Resistenz hatten sollten. Nahezu alle geprobten Pflanzen überlebten, woraus man eine Homozygotie schlussfolgern konnte (**Abb. Anhang 2**).

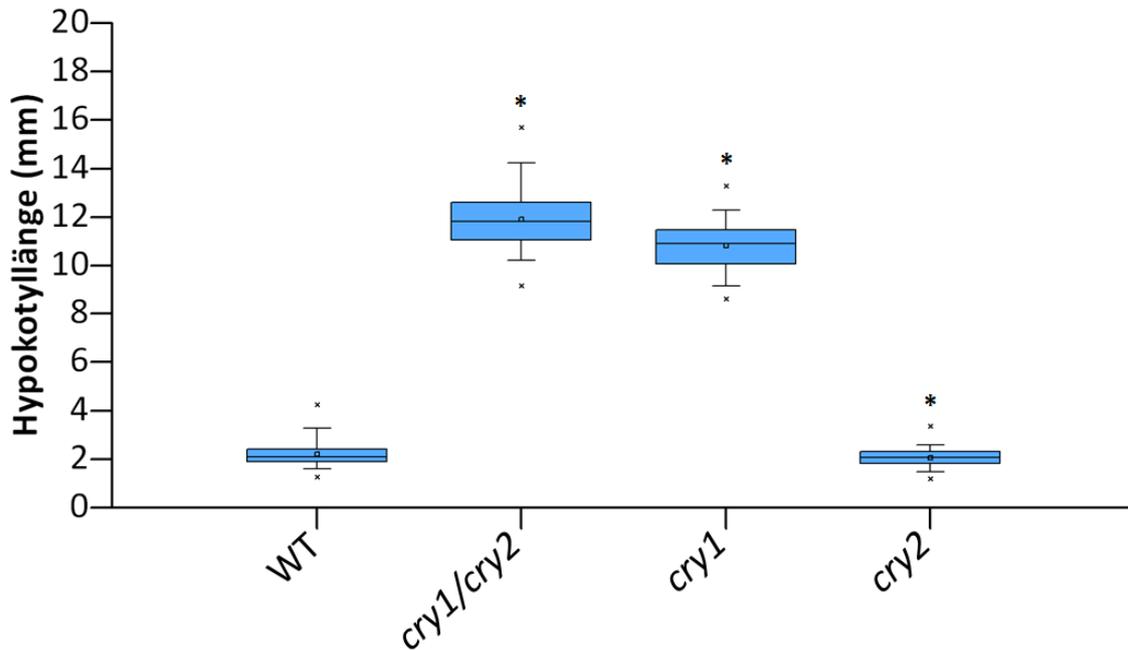
### **5.3.2 Wechselwirkungen zwischen BIC1-Überexpressionen *in planta* und biologischer Funktion von Cryptochromen**

Um zu testen, ob sich die Mutanten Linien BIC1<sup>3CA</sup>ox phänotypisch ähnlich verhalten wie die BIC1<sup>WT</sup>ox-Linien, wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Cryptochrome induzieren verschiedene Signaltransduktionswege bei Anregung durch Blaulicht. So inhibieren sie nach Aktivierung bspw. das Hypokotyllängenwachstum. Dieser Effekt ist Teil der Deetiolerung

(Ahmad *et al.*, 1998). Durch die Messung von Hypokotyllängen bei unterschiedlichen Lichtbedingungen lassen sich so Rückschlüsse auf die Aktivität von Photorezeptoren, wie Cryptochrome im Blaulicht oder auch Phytochrome im Rotlicht bzw. Dunkelrot schließen (Casal und Boccalandro, 1995). Bei einer möglichen Inhibierung von Cryptochrome durch BIC1, wird das Wachstum der Hypokotyle dementsprechend auch im Blaulicht nicht oder weniger inhibiert. Jeweils zwei unabhängige Linien jeden Genotyps aus der F3-Generation (BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 und BIC1<sup>WT</sup>ox\_2 als Überexpressions-Linien von BIC1<sup>WT</sup>; BIC1<sup>3CA</sup>ox\_1 und BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2 als Überexpressions-Linien von BIC1<sup>3CA</sup>) wurden für die weiteren Analysen ausgesucht, da diese vier Linien vergleichbare Protein-Level an transgenem BIC<sup>WT</sup> bzw. BIC1<sup>3CA</sup> haben (**Abb. 27 C**).

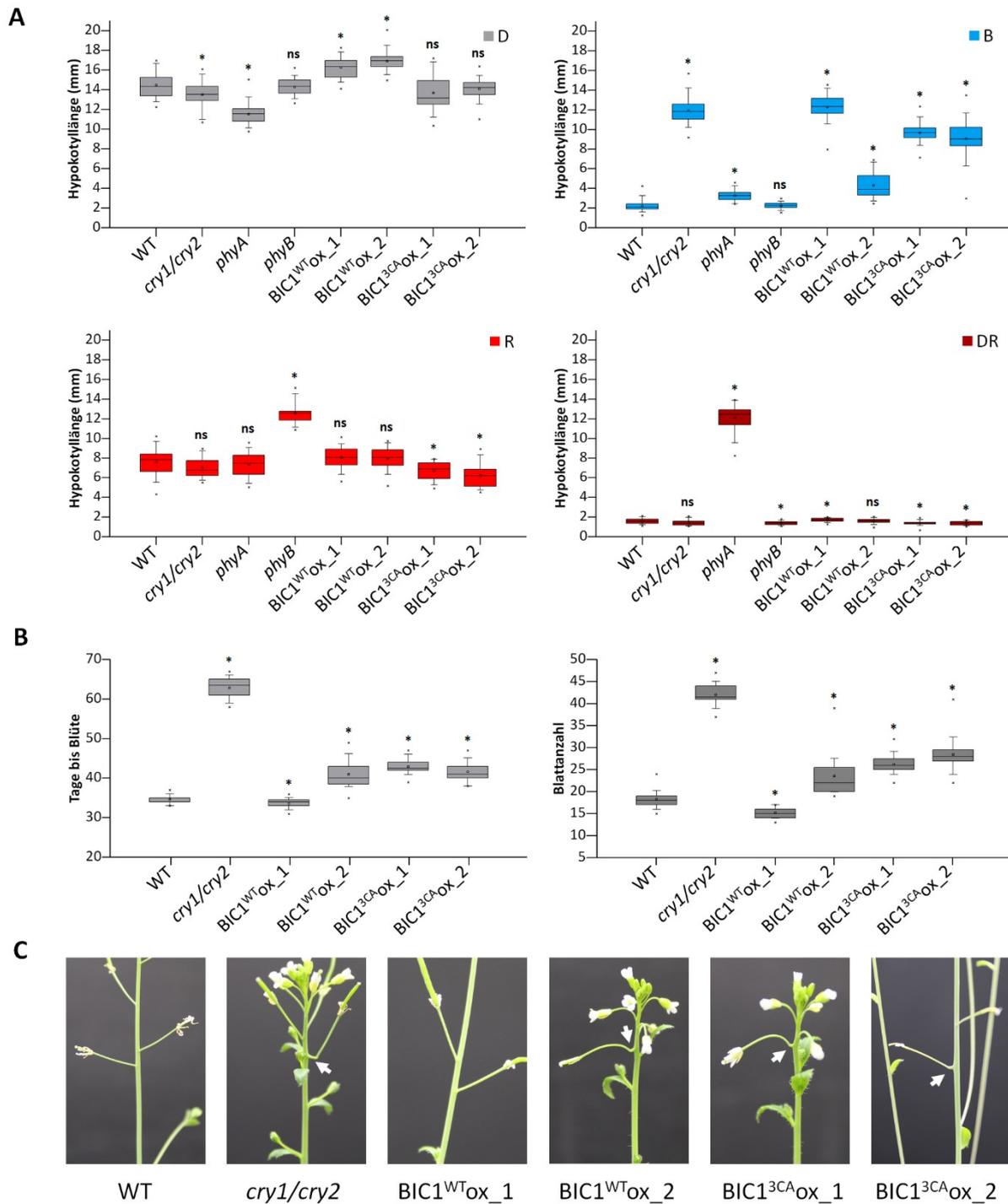
Zusätzlich zu den Quantifizierungen mittels *Western Blot*, wurden die gemessenen Hypokotyllängen (unter Blaulicht-Bedingungen) statistisch auf Normalverteilung hin überprüft. So wurde überprüft, ob die Linien bzw. die Hypokotyllängen nicht zurück zum Phänotyp des Wildtyp hin segregierten, sondern stets normalverteilt waren (**Abb. Anhang 3**). Die Mutanten waren alle normalverteilt, der WT jedoch streute. Dies wurde jedoch vernachlässigt, da eine Streuung des WT die Ergebnisse weniger beeinträchtigt. Erklärbar ist dies möglicherweise durch eine zu kleine Anzahl an getesteten Individuen.

Die Samen der unterschiedlichen Linien wurden auf *Whatman-Papier* ausgesät und im Dunkeln bei 6 °C für 3 Tage stratifiziert. Danach wurde die Keiminduktion in der Anzuchtkammer durch Bestrahlung mit Weißlicht für 4 h gestartet und die Samen danach für 20 h in Dunkelheit in die Anzuchtkammer bei 22°C gestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 4 d bei den Lichtbedingungen Dunkel, Blaulicht (10 µmol/m<sup>2</sup>s), Rotlicht (10 µmol/m<sup>2</sup>s) und Dunkelrotlicht (10 µmol/m<sup>2</sup>s). Nach Ablauf der Inkubation wurden die Keimlinge auf schwarze Pappe ausgelegt, fotografiert und über *ImageJ* die Länge der Hypokotyle bestimmt. Zuvor wurde die Frage adressiert, welches Cryptochrom unter den gewählten Blaulicht-Bedingungen primär für die Inhibition des Hypokotyllängenwachstums verantwortlich ist. Hierfür wurden Wildtyp (WT), *cry1/cry2* Doppel-*Knockout*-Mutante, als auch *cry1* und *cry2* Einzel-*Knockout*-Mutanten getestet (**Abb. 28**). Die Doppel-Mutante hatte ein ca. 10-fach längeres Hypokotyl als der WT, was auf das weitgehende Ausbleiben der Deetiolerung im Blaulicht zeigte. Einen vergleichbaren Phänotyp zeigte die *cry1* Einzel-Mutante. Die Hypokotyllängen der *cry2*-Mutanten waren hingegen kürzer als die der *cry1*-Mutante und ähnlich dem WT. Hieraus ließ sich schließen, dass die beobachtete Deetiolerung durch 10 µmol/m<sup>2</sup>s Blaulicht hauptsächlich durch Cryptochrom 1 gesteuert wurde.



**Abb. 28: Cryptochrom 1 ist essentiell für die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums unter Blaulicht.** Gezeigt sind Hypokotyllängen unterschiedlicher Genotypen unter Blaulicht ( $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Keimlinge wurden nach 3 d Stratifikation bei  $6^\circ\text{C}$  und anschließender Keiminduktion für 4 d unter Blaulicht angezogen. Auswertung erfolgte durch Fotografieren der Hypokotyle auf schwarzer Pappe und Messung der Länge über die Software *ImageJ*. Ausgewertet wurden  $n = 97\text{-}131$  Keimlinge pro Genotyp. Durchgeführte t-Tests signifikant nach Bonferroni-Korrektur bei  $*P < 0,017$ . t-Tests gegen den WT durchgeführt. Boxplots mit angegebenem Median, Mittelwert, Minimum und Maximum und Whiskers im Bereich 95-5.

Für die Untersuchung, ob die  $\text{BIC1}^{3\text{CAox}}$ -Linien einen vergleichbaren Phänotyp zu den  $\text{BIC1}^{\text{WTox}}$ -Linien haben, wurde die Hypokotyllänge verschiedener Genotypen der F3-Generation unter verschiedenen Lichtbedingungen verglichen (**Abb. 29 A**). Hierbei wurde die Frage adressiert, ob die Dreifach-Cystein Mutation der  $\text{BIC1}^{3\text{CAox}}$ -Linien einen Einfluss auf die Cryptochrom Inhibierung zeigen.



**Abb. 29: Die BIC1 Dreifach-Mutation von Cysteinen hat keinen Einfluss auf die Inhibition von Cryptochrom.** (A) Messung der Hypokotyllängen unterschiedlicher Genotypen in unterschiedlichen Lichtbedingungen. Die Samen der unterschiedlichen F3-Linien wurden auf *Whatman*-Papier ausgesät und im Dunkeln bei 6 °C für 3 Tage stratifiziert. Anschließend erfolgte die Keiminduktion in der Anzuchtammer für 4 h und folgende Inkubation im Dunkeln für 20 h. Anschließend folgte die Inkubation für 4 d bei den Lichtbedingungen Dunkel, Blaulicht (10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), Rotlicht (10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) und Dunkelrotlicht (10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Auswertung erfolgte durch Fotografieren der Hypokotyle auf schwarzer Pappe und Messung der Länge über die Software *ImageJ*. Ausgewertet wurden n = 29-40 Keimlinge pro Lichtbedingung pro Genotyp. Unter Blaulichtbedingungen betrug n = 97-131 Keimlinge. Durchgeführte t-Tests signifikant nach Bonferroni-Korrektur bei \*P < 0,00714286. t-Tests gegen den WT durchgeführt. (B) Auswertung der Blühinduktion durch Weißlicht

(115 – 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). In der linken Abb. werden die Tage bis zur ersten Blüte dargestellt. Dabei zählte bereits eine leicht geöffnete erste Blüte als Beginn des Blühens. Nach Blühbeginn wurden die Anzahl der Rosettenblätter (rechtes Diagramm) gezählt. Ausgewertet wurden  $n = 20$  verschiedene Einzelpflanzen. Durchgeführte t-Tests signifikant nach Bonferroni-Korrektur bei  $*P < 0,01$ . t-Tests gegen den WT durchgeführt. Boxplots mit angegebenem Median, Mittelwert, Minimum und Maximum und Whiskers im Bereich 95-5. (C) Fotografien der obersten Blütenstände gezeigter Genotypen. Im Fokus hierbei die *Cantiles*, weißer Pfeil. *Cantiles* treten bevorzugt an der ersten Blüte ohne Begleitblatt auf.

Neben den vier getesteten Überexpressions-Linien wurden als Kontroll-Linien WT (Col-0), Cryptochrom 1 und Cryptochrom 2 Doppel-*Knockout*-Mutante (*cry1/cry2*) und Phytochrom A (*phyA*) und Phytochrom B (*phyB*) Mutante mitgetestet. Nach der Keimung wurden die Keimlinge unter verschiedenen Lichtbedingungen für 4 d angezogen. Alle gezeigten, in Dunkelheit gewachsenen Genotypen wiesen eine Hypokotyllänge größer als 10 mm auf. Im Vergleich zum WT waren die Hypokotyllängen der Mutanten *cry1/cry2* und *phyA* signifikant kürzer und die der Linien  $\text{BIC1}^{\text{WTox}}_1$  und  $\text{BIC1}^{\text{WTox}}_2$  signifikant länger. Unter den verwendeten Blaulicht- und Dunkelrotlicht-Bedingungen wurde das Hypokotyllängenwachstum im WT stark inhibiert. Hier waren die Hypokotyle teilweise 10-mal so kurz wie bei in Dunkelheit angezogenen Keimlingen. Unter Rotlicht war das Hypokotyllängenwachstum ebenfalls deutlich inhibiert. Dies deutete auf die Deetiolierung durch Cryptochrome im Blaulicht und Phytochrome im Rotlicht und Dunkelrotlicht hin. Phytochrom A ist wichtig für eine Deetiolierung im Dunkelrotlicht (siehe *phyA* Mutante), wohingegen Phytochrome B wichtig für die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums im Rotlicht ist (siehe *phyB* Mutante), konsistent mit publizierten Daten (Parks und Quail, 1993). Die *BIC1*-Überexpressionslinien zeigten sowohl im Dunkelrotlicht, als auch in Rotlicht nur einen marginalen Unterschied zum WT. Einzig eine leicht stärkere Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums im Rotlicht durch die beiden  $\text{BIC1}^{3\text{CAox}}$ -Linien im Vergleich zu den anderen Linien war bemerkenswert. In der Cryptochrom Doppel-*Knockout*-Mutante *cry1/cry2* war deutlich, dass Blaulicht nur noch einen sehr kleinen Einfluss auf die Länge des Hypokotyls bzw. dessen Inhibition hatte. Keimlinge im Dunkeln hatten jedoch immer noch ein längeres Hypokotyl, als im Blaulicht aufgezogene Keimlinge. Anhand des Vortests ließ sich auf eine primäre Rolle von Cryptochrom 1 auf die Deetiolierung unter den verwendeten Blaulicht-Bedingungen schließen. Alle getesteten  $\text{BIC1}^{\text{WTox}}$  und  $\text{BIC1}^{3\text{CAox}}$ -Linien hatten ein längeres Hypokotyl unter Blaulichtbedingungen im Vergleich zum WT. Untereinander zeigte nur die Linie  $\text{BIC1}^{\text{WTox}}_2$  eine stärkere Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums im Vergleich zu  $\text{BIC1}^{\text{WTox}}_1$  und der *cry1/cry2* Doppelmutante, jedoch immer noch signifikant schwächer als beim WT. Dies deutete darauf hin, dass die Überexpressionen sowohl von

BIC1<sup>WT</sup> als auch von BIC1<sup>3CA</sup> dazu führte, Cryptochrome zu inhibieren. Die *phyA* Mutante zeigte einen geringen Einfluss auf die Deetiolierung unter Blaulicht, was ebenfalls in Übereinstimmung mit publizierten Daten war (Whitelam *et al.*, 1993; Neff und Chory, 1998).

Die BIC1<sup>3CA</sup> Mutanten hatten im Blaulicht deutlich längere Hypokotyle als der WT. Somit schienen diese Mutanten in ihrer Aktivität hinsichtlich Inhibierung der Funktion von Cryptochrom nicht beeinträchtigt gewesen zu sein. Somit waren auch die intermolekularen Disulfidbrücken, die BIC1<sup>WT</sup> zumindest *in vitro* ausbilden kann, für dessen Funktion nicht essentiell. Die Linien BIC1<sup>WT</sup>ox\_1, BIC1<sup>3CA</sup>ox\_1 und BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2 schienen die Cryptochrome vollständig oder weitgehend zu inhibieren, weil deren Phänotyp ähnlich der *cry1/cry2* Doppel-*Knockout*-Mutante war. Bei der Linie BIC1<sup>WT</sup>ox\_2 beobachtete man nur eine partielle Inhibierung der Cryptochrome. Im Rot- und Dunkelrotlicht verhielten sich alle BIC1 Überexpressions-Linien ähnlich zum WT. Somit inhibieren BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> trotz marginaler, aber signifikanter Unterschiede im Rot- und Dunkelrotlicht wahrscheinlich nicht eine Deetiolierung, welche durch Phytochrom B und respektive Phytochrom A reguliert ist.

Ein weiterer durch Blaulicht regulierter Prozess durch Cryptochrome ist die Blühinduktion, hauptsächlich gesteuert durch Cryptochrom 2 (Valverde *et al.*, 2004). Nach Aussaat unterschiedlicher Genotypen aus der F3-Generation wurden die Pflanzen auf Erde in Anzuchtschränken im Langtag angezogen (16 h Weißlicht bei 115-120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 22 °C tagsüber, 18 °C nachts, 50% Luftfeuchtigkeit). Die Blühinduktion bzw. der Blühbeginn wurde so definiert und ausgewertet, dass bereits eine leicht geöffnete erste Blüte den Blühbeginn definierte. Die Tage von Aussaat bis Blühbeginn und die Anzahl an Rosettenblätter der einzelnen Pflanzen wurden gezählt und ausgewertet (**Abb. 29 B**). Blühzeitpunkt und Anzahl an Rosettenblättern korrelieren meist miteinander. Die Cryptochrom Doppel-*Knockout*-Mutante *cry1/cry2* diente dabei als Kontrolle. Die Kontrolle hatte circa doppelt so lange bis zum Blühbeginn benötigt als der WT (WT  $35 \pm 1$  d und *cry1/cry2*-Mutante  $63 \pm 3$  d). Die Linien BIC1<sup>WT</sup>ox\_2 ( $41 \pm 3$  d), BIC1<sup>3CA</sup>ox\_1 ( $43 \pm 2$  d) und BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2 ( $42 \pm 2$  d) schienen nur wenig, jedoch signifikant länger als der Wildtyp bis zum Blühbeginn benötigt zu haben. Die Linie BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 ( $34 \pm 1$  d) zeigte überraschenderweise einen geringfügig früheren Blühbeginn im Vergleich zum WT. Die Überexpressions-Linien BIC1<sup>WT</sup>ox\_2 und BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2 zeigten untereinander wenig Unterschiede im Blühverhalten, sodass man davon ausgehen konnte, dass die Cystein-Austausche in BIC1 keinen Einfluss auf dessen Funktion im Kontext von Blühverhalten hatten. Bei den Tagen bis zur Blüte waren die Mutanten alle normalverteilt, der WT jedoch streute. Bei den Daten der Blattanzahl waren nur die Kontrollen und

BIC1<sup>3CA</sup>ox\_1 normalverteilt (Test auf Normalverteilung durch Anderson Darling; nicht gezeigt). Die erzielten Befunde deuteten darauf hin, dass BIC1 keinen großen Einfluss auf den Signaltransduktionsweg von Cryptochromen im Kontext von Blüten besaß, oder dass BIC1 beim Zeitpunkt der Blühinduktion nur für eine partielle Inhibierung von Cryptochromen sorgte. Dass BIC1<sup>WT</sup>ox\_1, BIC1<sup>3CA</sup>ox\_1 und BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2 aber biologisch aktiv waren, ergibt sich aus deren Einfluss auf das Hypokotyllängenwachstum.

*A. thaliana* bildet spezielle Strukturen, sogenannte *Cantiles*, wenn ihr Blühbeginn verzögert ist (Gookin und Assmann, 2021). Alle Linien, ausgenommen Wildtyp und BIC1<sup>WT</sup>ox\_1, zeigten ein *Cantile* an der ersten Blüte (**Abb. 29 C**). Dies spiegelte auch die Auswertung der Tage bis Blühbeginn wider, da alle anderen Linien mit verspätetem Blühzeitpunkt auch diese Struktur bildeten.

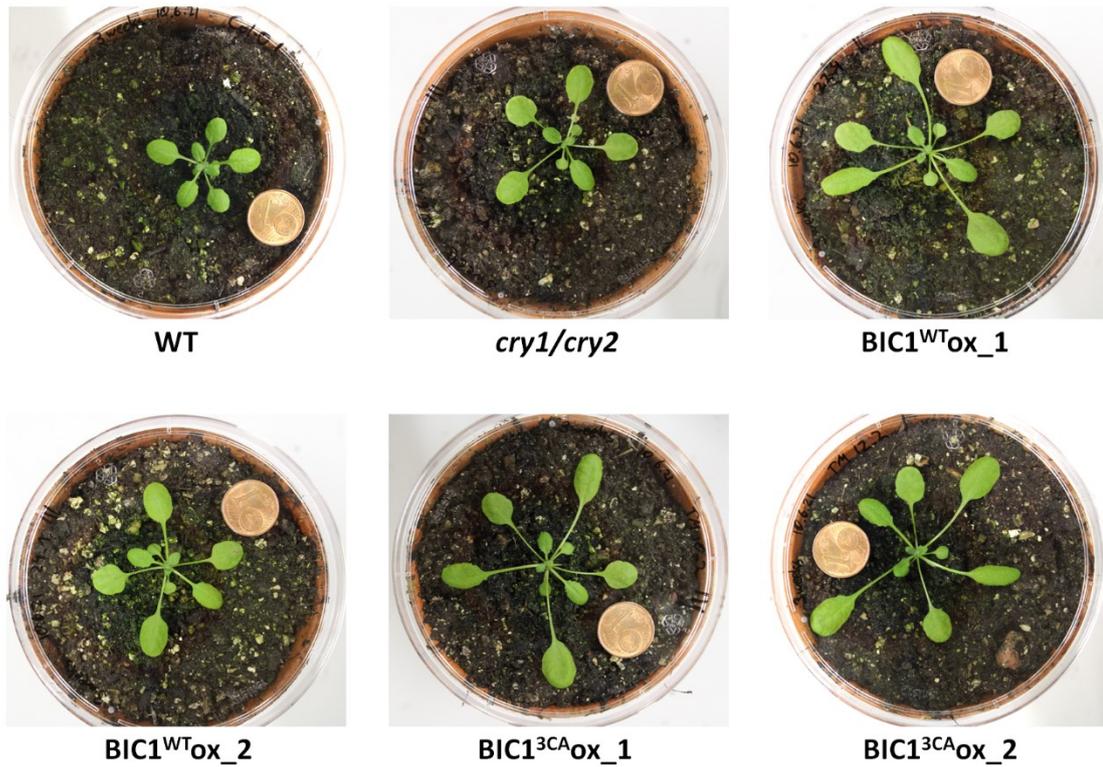
### 5.3.3 Weitere Effekte der Überexpression von BIC1 in *Arabidopsis thaliana*

Das Expressions-Level von BIC1 wird durch äußere Bedingungen wie Temperatur und Licht reguliert (Wang *et al.*, 2017b) und könnte z.B. Einflüsse auf die Wechselwirkungen zwischen BIC1 und Cryptochromen haben und ausschlaggebend sein, ob eine vollständige oder partielle Inhibierung der Cryptochrome stattfindet.

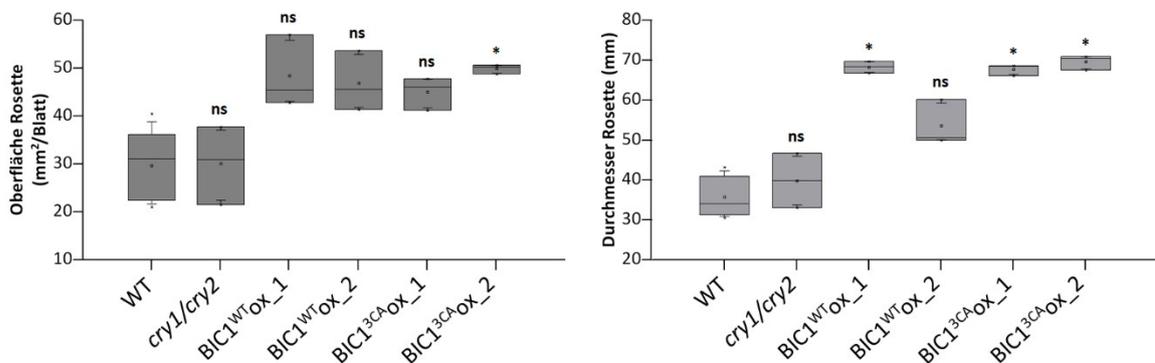
Neben den oben beschriebenen Prozessen wurde auch Blatt-Rosetten Durchmessers und Rosetten Oberfläche analysiert mit der Frage, ob die Überexpression von BIC1 diese beeinflusst. Hierfür wurden die Pflanzen ebenfalls im Weißlicht in LED-Kammern (16 h bei 115-120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 22 °C tagsüber, 18 °C nachts, 50% Luftfeuchtigkeit) angezogen. Verwendet wurden Linien der F3-Generation. 3 Wochen nach Aussaat wurden die Rosetten der Pflanzen mit einer Petrischale plattgedrückt und von oben fotografiert (**Abb. 30 A**). Die Fläche aller Rosettenblätter und der Durchmesser der Rosetten wurden über die Software *ImageJ* ausgewertet (**Abb. 30 B**). Diese Dokumentation zeigte auch, dass die Überexpressionslinien von BIC1<sup>WT</sup>ox und BIC1<sup>3CA</sup>ox stark verlängerte Petiolen hatten und einige von diesen nach oben und zur Seite gebogen waren, so wie dies für eine *shade-avoidance-response (SAR)* beschrieben ist (Keller *et al.*, 2011). Signifikant größer war der Durchmesser der Rosetten der BIC1<sup>WT</sup>ox und BIC1<sup>3CA</sup>ox-Linien im Vergleich zum WT und der Cryptochrom Doppel-*Knockout*-Mutante *cry1/cry2*, mit Ausnahme von BIC1<sup>WT</sup>ox\_2. Augenscheinlich korrelierte die Fläche der Rosettenblätter mit dem Durchmesser der Gesamtrosette. Statistische Tests bestätigten aber keinen Unterschied zwischen Wildtyp, *cry1/cry2* und den BIC1

Überexpressionslinien mit Ausnahme von BIC1<sup>3CA</sup><sub>ox\_2</sub>. Die, wenn auch nicht signifikant, vergrößerte Fläche der Rosettenblätter könnte Teil eines *shade-avoidance-response* sein. Es ist bekannt, dass Pflanzen durch eine partielle Inhibierung von Cryptochromen unter schwachem Blaulicht mit *shade-avoidance-response* reagieren (Pedmale *et al.*, 2016). Da die Cryptochrom Doppel-*Knockout*-Mutante und der WT sich nicht unterschieden, konnte man davon ausgehen, dass für den beobachteten Effekt Cryptochrome nur teilweise inhibiert sein dürften, oder dass die BICs hier eine von Cryptochromen unabhängige Funktion hatten. Wie schon bei anderen Prozessen weiter oben beschrieben, zeigte auch hier die Überexpression der BIC1<sup>3CA</sup> Mutante keinen Unterschied zu BIC1<sup>WT</sup>.

A



B



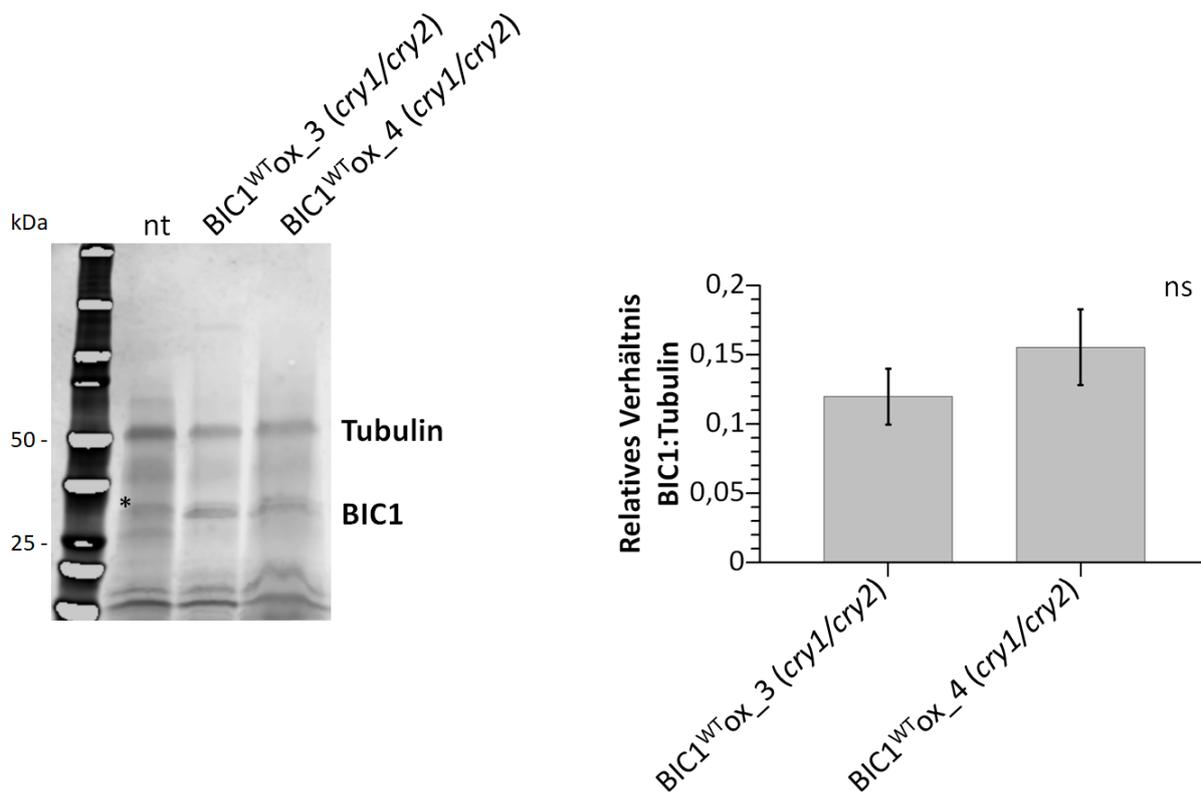
**Abb. 30: Partielle Inhibierung von Cryptochromen, nicht aber deren völliger Ausfall, induziert eine *shade-avoidance-response*.** (A) Fotografien einzelner Pflanzen der entsprechenden Genotypen verwendet für die Auswertung gezeigt in B. Die Rosetten wurden vorsichtig mit einer Plastik-Petrischale plattgedrückt. Als Größenstandard diente eine ein Cent-Münze, welche mit jeder Pflanzenrosette mitfotografiert wurde (Durchmesser 16 mm). Bilder der Pflanzen wurden mit einer digitalen Kamera aufgenommen und die Bilder in der Software *ImageJ* ausgewertet. (B) Linkes Diagramm zeigt die Messung der Rosetten-Oberfläche in mm<sup>2</sup> pro Blatt. Rechtes Diagramm zeigt die Messung der Rosetten-Durchmesser gezeigter Genotypen. Ausgewertet wurden n = 3-5 verschiedene Einzelpflanzen. Durchgeführte t-Tests signifikant nach Bonferroni-Korrektur bei \*P < 0,01. t-Tests wurden gegen den WT durchgeführt. Boxplots mit angegebenem Median, Mittelwert, Minimum und Maximum und Whiskers im Bereich 95-5.

## 5.4 Blaulicht-Effekt auf transkriptioneller Ebene

Pflanzen reagieren durch Änderungen der Genexpression auf die Exposition von Blaulicht. In Wang *et al.* (2016) wurde gezeigt, dass über 1200 Gene in *A. thaliana* Blaulicht-abhängig durch Cryptochrome reguliert werden. Zusätzlich zeigten die Autoren, dass knapp 1000 Gene von Cryptochromen und BICs zusammen reguliert werden und weitere 400 Gene exklusiv von BICs. Im Rahmen dieser Arbeit sollten publizierte Daten von Wang *et al.* (2016) bestätigt werden.

### 5.4.1 Transformation von HA-BIC1 in *cry1/cry2* Doppel-Knockout-Mutante

Zusätzlich wurde die Frage adressiert, ob und wenn ja welche Gene exklusiv von BIC1 und somit in Abwesenheit von Cryptochromen reguliert werden. Hierzu wurden neben den bestehenden Linien BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 und \_2 in Col-0-Hintergrund, den Kontrollen WT und der *cry1/cry2* Mutante noch zwei weitere unabhängige Linien generiert, die BIC1<sup>WT</sup> im *cry1/cry2*-Hintergrund (Col) überexprimierten. Hierbei wurde wie in 5.3.1 das Transgen auf dem Vektor pUBV341 (PUBQ10::3xHA-BIC1<sup>WT</sup>) über *A. tumefaciens* in *cry1/cry2*-Pflanzen eingebracht. BIC1<sup>WT</sup>ox\_3 (*cry1/cry2*) und BIC1<sup>WT</sup>ox\_4 (*cry1/cry2*) wurden bis in die F3-Generation gezüchtet und mittels *Western Blot* Analyse wurde die Proteinmenge von HA-BIC1 bestimmt. Ziel war es, Linien zu identifizieren, die eine ähnliche Proteinmenge an transgenem BIC1 untereinander überexprimierten und eine ähnliche Proteinmenge besäßen wie BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 und \_2 im Col-0-Hintergrund (**Abb. 31**).

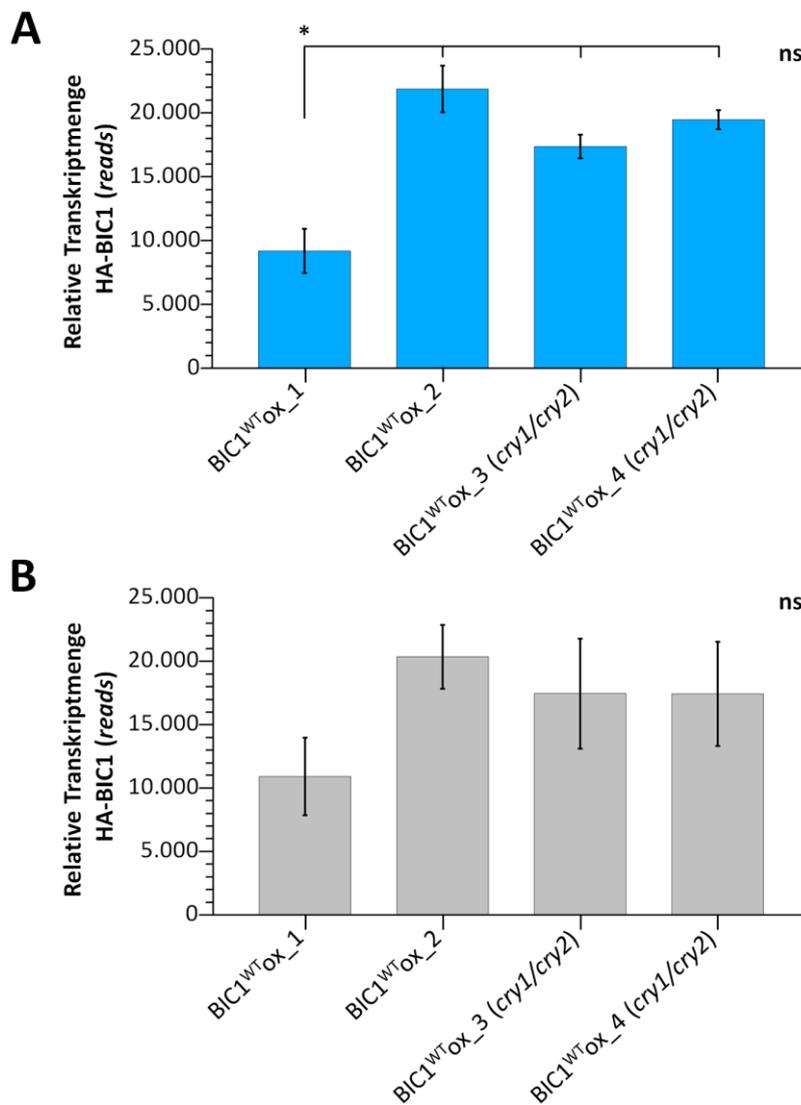


**Abb. 31: HA-BIC1 Quantifizierung in Pflanzen mit *cry1/cry2*-Hintergrund.** *Western Blot* mit dem LiCOR-System zur Quantifizierung der Proteinmenge von transgenem BIC1<sup>WT</sup> aus Gesamtproteinextrakt von *A. thaliana* Keimlingen der F3-Generation. Antikörper gegen  $\alpha$ HA-tag und gegen  $\alpha$ Tubulin wurden verwendet. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet, um die BIC1-Intensitäten ins Verhältnis zu setzen. Als Negativkontrolle wurden nicht transformierte WT *A. thaliana* Col-0 verwendet (nt). Die Quantifizierung wurde mit 3 technischen Replikaten durchgeführt. Durchgeführte t-Tests signifikant bei \* $P < 0,05$ . ns steht für nicht signifikant. Standardabweichung als Fehlerbalken wiedergegeben. \* zeigt artifizielles Signal.

Die ermittelten Mengen an HA-BIC1 in den F3-Linien der BIC1<sup>WT</sup>ox-Pflanzen im *cry1/cry2*-Hintergrund waren nicht signifikant unterschiedlich. Die für die RNA-Sequenzierung verwendeten und getesteten Linien BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 zeigten ein Verhältnis von BIC1 zu Tubulin in der F4 von 0,05 und BIC1<sup>WT</sup>ox\_2 in der F4 von 0,09 (**Abb. 27 D**). Die zusätzlichen Linien (beide in der F3) zeigten eine stärkere Expression. BIC1<sup>WT</sup>ox\_3 (*cry1/cry2*) zeigte ein Verhältnis von BIC1 zu Tubulin von 0,12 und BIC1<sup>WT</sup>ox\_4 (*cry1/cry2*) von 0,16 (**Abb. 31**). Die Linien BIC1<sup>WT</sup>ox\_3 (*cry1/cry2*) und BIC1<sup>WT</sup>ox\_4 (*cry1/cry2*) wurden nachfolgend auf ihre Homozygotie des Transgens getestet, indem die Keimlinge der F3-Generation erneut mit dem Herbizid Basta, gegen das sie eine mittransformierte Resistenz haben sollten, behandelt wurden (**Abb. Anhang 2**). Beide Linien zeigten nur eine Überlebensrate von ca. 85%, was auf eine mögliche Heterozygotie hinwies.

### 5.4.2 Biologische Replikate zeigen hohe Varianz

Untersucht wurden die transkriptionellen Veränderungen nach 2-stündiger Blaulichtbestrahlung ( $20 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ). Die Linien WT (Col-0), die *cry1/cry2* Doppel-Knockout-Mutante, die BIC1-Überexpressions Linien im Col-0-Hintergrund (BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 und \_2), und die BIC1-Überexpressions Linien im *cry1/cry2*-Hintergrund (BIC1<sup>WT</sup>ox\_3 und \_4) wurden untersucht. 5 d alte Keimlinge, aufgezogen in Dunkelheit, wurden entweder für 2 h in Blaulicht bestrahlt oder in Dunkelheit belassen. Im Anschluss wurden die Hypokotyle und Keimblätter der Keimlinge geerntet und in flüssigem N<sub>2</sub> weggefroren. Durchgeführt wurde das Experiment mit 3 biologischen Replikaten. Die RNAs der Proben wurden aufgereinigt, deren Integrität in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Becker bestimmt und die mRNA wurde im *Cologne Center for Genomics* sequenziert. In Kooperation mit Paul Klemm aus der Arbeitsgruppe Lechner wurden die Daten bioinformatisch ausgewertet. Die relative Transkriptmenge des HA-BIC1 Transgens in den transgenen Linien konnte anhand der Sequenzierungs-Daten bestimmt werden (**Abb. 32 A, B**). Die Menge an Transkripten von HA-BIC1 war aufgrund des konstitutiven UBQ10-Promoters lichtunabhängig. Außerdem konnte bei den Transkriptmengen von HA-BIC1 derselbe Trend wie bei den Proteinmenge beobachtet werden. Die Menge der Transkripte war in allen Linien vergleichbar, bis auf die Linie BIC1<sup>WT</sup>ox\_1, in der die Menge signifikant niedriger war.



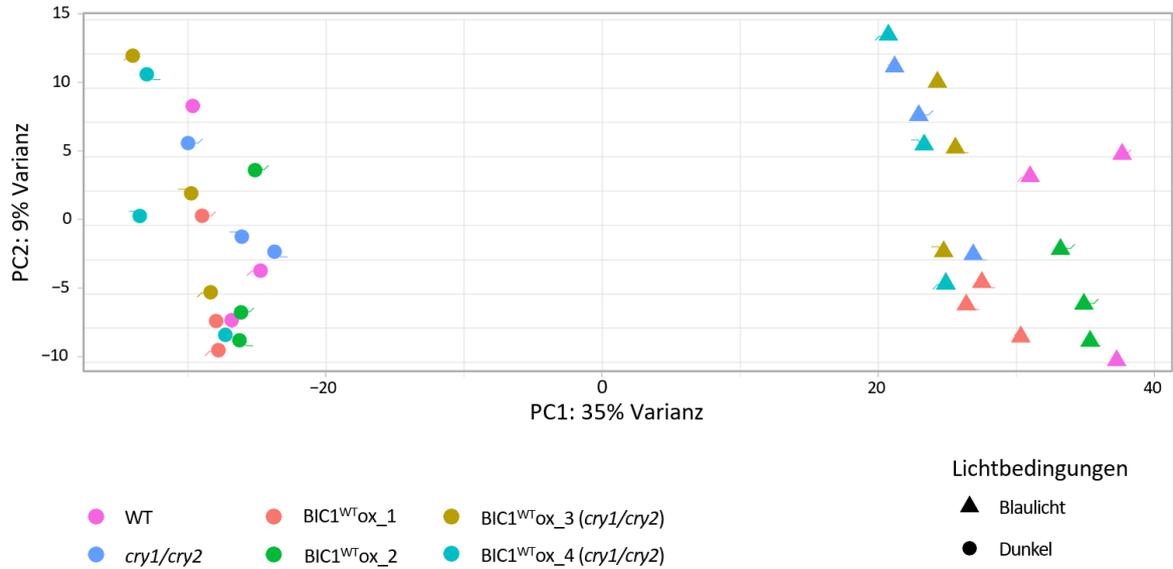
**Abbildung 32: Relative Transkriptmenge des heterologen HA-BIC1 wurde in allen transgenen Linien detektiert.** (A) Transkriptmenge von Keimlingen nach Blaulicht-Bestrahlung. (B) Transkriptmenge von Keimlingen im Dunklen inkubiert. Ergebnisse entstammten der RNA-Sequenzierung. Fragment-*mapping* der Transkripte erfolgte mit der Software *bowtie* gegen die DNA-Sequenz des Transgens. Jede Linie wurde mit 3 biologischen Replikaten getestet. Durchgeführte t-Tests signifikant nach Bonferroni-Korrektur bei  $*P < 0,008333$ . Bei den t-tests wurden alle Gruppen miteinander verglichen. ns steht für nicht signifikant. Standardabweichung als Fehlerbalken wiedergegeben.

Bei der Betrachtung einer generellen Transkriptom-Veränderung wurden alle Linien miteinander verglichen (**Abb. 33 A**). Alle Linien, sowohl Überexpressions-Linien, als auch die Kontrollen zeigten einen Einfluss von Blaulicht auf die allgemeinen Veränderungen in der Genexpression. So zeigten WT-Pflanzen, die im Dunkel gewachsen waren, einen Unterschied im Transkriptom mit einer Varianz von ca. 44% im Vergleich zu WT-Pflanzen, die 2 h mit Blaulicht bestrahlt worden waren. Ein ähnlich starker Effekt wurde überraschenderweise bei

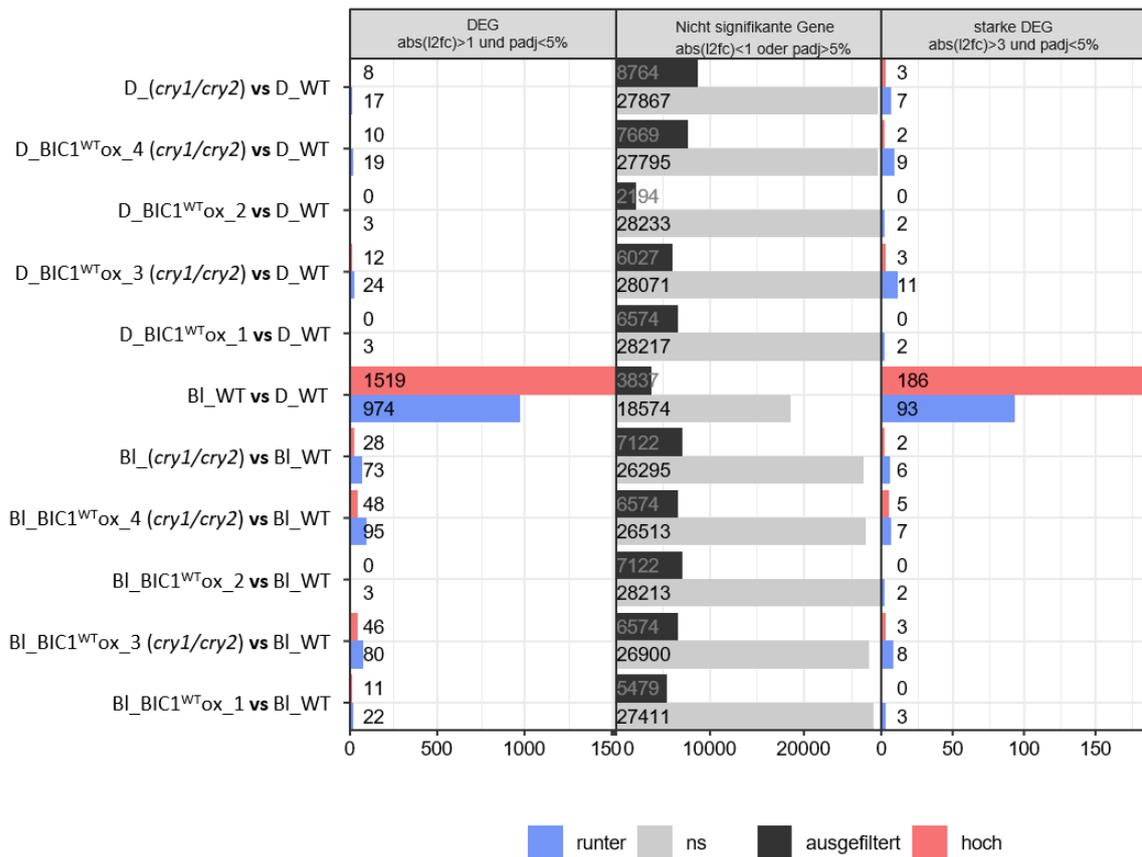
*cry1/cry2*-Pflanzen beobachtet. Somit kann geschlossen werden, dass dieser Effekt Blaulicht unabhängig von Cryptochromen ist. Alle Linien schienen eine ähnliche Änderung der Genexpression durch Blaulichtbestrahlung aufzuweisen. Auffällig war, dass die jeweils drei biologischen Replikate einer Linie eine hohe Varianz untereinander aufzeigten. Die beobachteten Veränderungen im Transkriptom einiger WT-Dunkelproben ähnelten eher den Veränderungen in anderen Linien, als denen anderer WT-Dunkelproben. Aufgrund dieses Problems, ergab sich eine große Erschwernis in der Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten.

Die WT-Proben dienten als Kontrolle, sprich die transkriptionellen Veränderungen der anderen Linien wurden mit der Genexpression der WT-Proben verglichen. Hierzu wurden alle drei biologischen Replikate zusammengenommen. Weil die Varianz der Proben so hoch war, ergaben sich allerdings nur wenige signifikante Veränderungen in der Genexpression (hoch-, runterreguliert bei  $\log_2\text{-foldchange} > 1$ ) (**Abb. 33 B**).

**A**



**B**



**Abb. 33: Analyse der RNA-Sequenzierung.** (A) *Variance-stabilizing transformation (vsd)-Principal component analysis (PCA)*. Die berechnete Varianz der Genexpressionen zwischen RNA-Sequenzierungs-Proben und den zugehörigen Genotypen und Lichtbedingungen sind mathematisch als PC1 und PC2 berechnet und dargestellt. In der Berechnung berücksichtigt wurden die 1000 am meisten variablen Gene bzw. Transkripte (HVGs). (B) Überblick aufgezeigter, unterschiedlich exprimierter Gene (DEG). Verglichen wurden jeweils zwei Proben miteinander. Signifikanz eines hoch- oder runterregulierten Gens wurde bei  $\log_2\text{-foldchange} > 1$  und einem *adjusted p-value* von 0,05 angesetzt. Stark regulierte Gene wurden bei einem  $\log_2\text{-foldchange} > 3$  dargestellt.

Nicht signifikante Genexpression ( $\log_2\text{-foldchange} < 1$ ) oder solche, die mathematisch nicht zugeordnet werden konnten, wurden in der mittleren Spalte aufgezeigt. ns steht für nicht signifikant.

Im Durchschnitt wurden pro Genotyp mehr als 30000 Gene bzw. unterschiedliche Transkripte gefunden. Im Dunkeln zeigten alle Linien nur wenige transkriptionelle Veränderungen untereinander. Die größte Änderung der Genexpression war durch Blaulicht-Bestrahlung ausgelöst, exemplarisch zu sehen bei WT-Pflanzen gewachsen in Dunkelheit oder für 2 Stunden mit Blaulicht bestrahlt. Hier wurden 1705 Gene identifiziert, die Blaulicht-abhängig hochreguliert wurden, wovon 186 davon stark hochreguliert wurden ( $\log_2\text{-foldchange} > 1$ , oder  $> 3$ ). Weiterhin wurden 1067 Gene Blaulicht-abhängig runterreguliert, davon 93 stark. Um den Effekt der Cryptochrome zu studieren, wurden *cry1/cry2*-Pflanzen mit WT-Pflanzen verglichen, die beide mit Blaulicht bestrahlt worden waren. Es wurde davon ausgegangen, dass *cry1/cry2*-Pflanzen, die unter Blaulicht inkubiert wurden, ein vergleichbares Transkriptom hätten wie WT-Pflanzen, die in Dunkelheit aufgewachsen waren. Jedoch zeigte der Vergleich von *cry1/cry2*-Pflanzen und WT-Pflanzen inkubiert unter Blaulicht Unterschiede in *cry1/cry2*-Pflanzen in nur 30 Genen, die im Blaulicht hochreguliert und in 79 Genen, die im Blaulicht reprimiert waren. Somit wurde kein großer Unterschied in der Blaulicht-Lichtregulation zwischen Wildtyp und *cry1/cry2* Mutante gefunden.

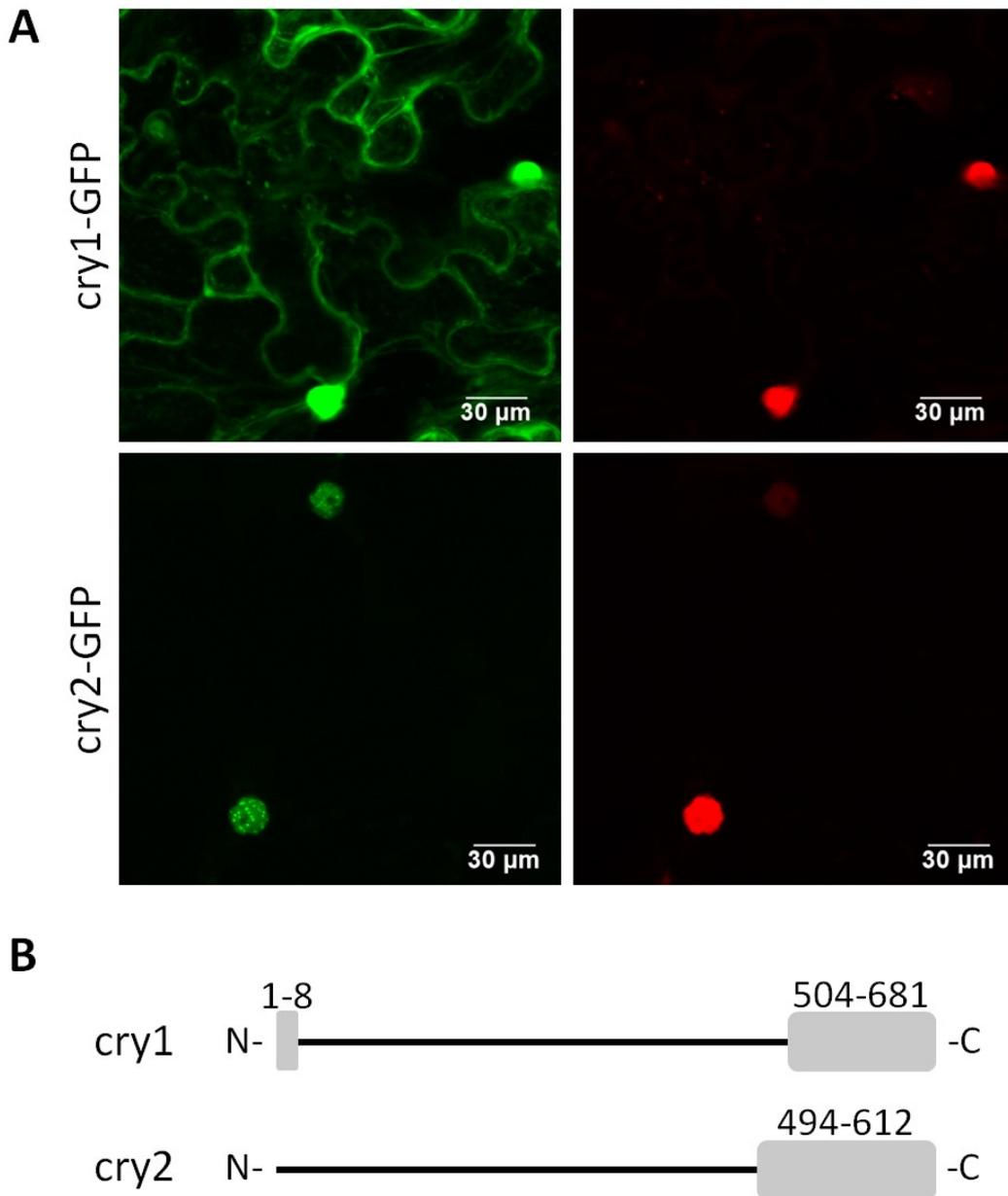
Das Gleiche trifft auf alle BIC1-Überexpressions Linien zu, sowohl im Col-0-Hintergrund, als auch im *cry1/cry2*-Hintergrund. Beide BIC1<sup>WT</sup>ox-Linien im *cry1/cry2*-Hintergrund verglichen mit WT-Pflanzen und *cry1/cry2*-Pflanzen, die unter Blaulicht inkubiert worden waren, zeigten nur marginale Veränderungen, sodass kein deutlicher Effekt durch BIC1 Überexpression erkennbar war. Bei BIC1<sup>WT</sup>ox\_4 (*cry1/cry2*) waren ca. 50 Gene hochreguliert und knapp 100 Gene runterreguliert. Unter Blaulichtbedingungen wurden bei den *cry1/cry2*-Pflanzen 30 Gene hochreguliert und 79 runterreguliert. Bei einem Vergleich von beiden BIC1<sup>WT</sup>ox-Linien (Col-0-Hintergrund) mit WT-Pflanzen identifizierte man maximal 11 Gene die Blaulicht-abhängig hochreguliert wurden und 25 Gene, die herunterreguliert wurden.

## 5.5 *Photobodies* von Cryptochrom 1 und Inhibierung durch BIC1

Trotz hoher struktureller Ähnlichkeiten und überschneidenden Funktionen der *A. thaliana* Cryptochrome 1 und 2 waren bisher sogenannte *photobodies* nur bei cry2 beobachtet worden (Ahmad *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2016). In jüngster Zeit wurden cry1 *photobodies* beschrieben (Liu *et al.*, 2022), waren aber zu Beginn dieser Arbeit unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Frage adressiert, ob unter Lichteinfluss cry1 *photobodies* entstehen, oder diese spezifisch für cry2 sind.

### 5.5.1 Intrazelluläre Lokalisation von Cryptochrom 1 und 2

Vorläufige Untersuchungen von in *N. benthamiana* transient exprimierten cry1- und cry2-GFP (beide Proteine als Vollängen-Konstrukte in Plasmid pUGT1 Dest.) zeigten, dass cry1-GFP unter den gewählten Lichtbedingungen (Anregung mit Laser bei 488 nm) und ohne zusätzlicher Vorbestrahlung bis auf die Anzucht der Pflanzen im Langtag (ca. 130  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  16 h Licht, 8 h Dunkel, tagsüber 24,5 °C und nachts 19,5 °C, Luftfeuchtigkeit 50%), keine *photobodies* zeigte (**Abb. 34 A**). Die Aufnahmen wurden direkt aufgenommen, d.h. das Laserlicht des Mikroskops wirkte nur kurz auf die Probe.



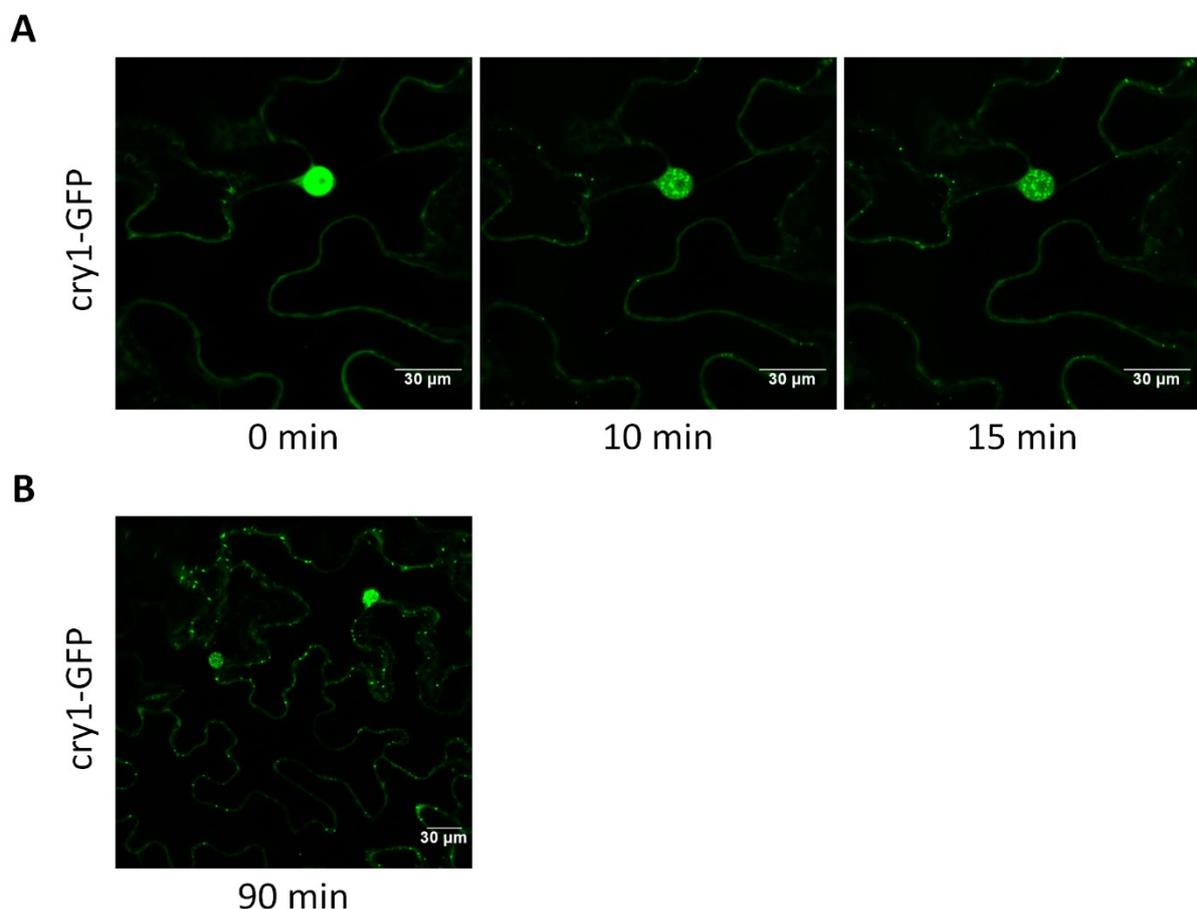
**Abb. 34: Photobody Bildung von cry2, aber nicht von cry1 unter moderaten Lichtbedingungen.** (A) Vergleich von cry1-GFP mit cry2-GFP unter einem Konfokalen Laserscan Mikroskop (KLSM-SP2). Die Aufnahme von cry1-GFP ist eine *OrthoSereoMax* Projektion aus 20 Einzelbildern. Die Aufnahme von cry2-GFP ist eine Einzelaufnahme. Das RFP mCherryNLS wurde co-exprimiert, um als Kontrollprotein die mögliche Lokalisation der GFP-Fusionen im Zellkern nachweisen zu können (rechte Reihe). Die Blattproben wurden *N. benthamiana* Pflanzen, die unter Langtagbedingungen in der Anzuchtammer angezogen worden waren, direkt entnommen. Die Proben wurden ohne weitere Behandlung direkt unter dem KLSM-SP2 gemessen. Dabei wurde mit 488 nm das GFP angeregt und die Emission bei 505-515 nm gemessen (grüner Kanal) und RFP bei 543 nm angeregt und Emission bei 600-625 nm gemessen (roter Kanal). Die genauen Intensitäten der verschiedenen Laser eines zwischenzeitlich ausgedienten KLSM (SP2) lassen sich nicht mehr genau ermitteln. Unter diesen Bedingungen wurden nur bei cry2-GFP *photobodies* beobachtet, bei cry1-GFP hingegen nicht. (B) Vereinfachtes Schema der Proteinstruktur von cry1 und cry2. In Grau von den Softwares *Alphafold-disorder* über *MobiDB* ermittelte intrinsisch, ungeordnete Regionen oder auch IDRs (Piovesan *et al.*, 2022).

Das cry1-GFP Signal war deutlich im Zellkern zu erkennen, in dem das Signal stark akkumuliert, aber auch im Cytosol. mCherry-NLS wurde mit den cry-GFP Konstrukten co-exprimiert, um als Kontrollprotein die mögliche Lokalisation der cry-GFP Fusionen im Zellkern nachweisen zu können. cry2-GFP, welches eine klar definierte Kernlokalisationssequenz besitzt (Kleiner *et al.*, 1999), wurde ausschließlich im Zellkern lokalisiert. cry2 bildete bereits nach kurzer Zeit während der Bestrahlung mit 488 nm Laserlicht unter dem Mikroskop kleine, punktierte GFP-Signale im Zellkern. Diese sogenannten *photobodies* von cry2 entstanden schnell nach moderater Blaulichtbestrahlung und verschwanden nach wenigen Minuten vollständig (nicht gezeigt). Anhand von Berechnungen durch *MobiDB* wurden sowohl bei cry1, als auch bei cry2 intrinsisch, ungeordnete Regionen (IDRs) ermittelt (**Abb. 34 B**). cry1 hat sowohl am N- als auch am C-Terminus IDRs. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass IDRs eine wichtige Rolle in der Ausbildung von *photobodies* haben (Billault-Chaumartin *et al.*, 2022). Proteine mit IDRs zeigen eine höhere Bereitschaft mehrwertige, schwach haftende, intermolekulare Interaktionen über diese einzugehen (Banani *et al.*, 2017). Da beide Cryptochrome IDRs unter anderem am regulatorisch wichtigen C-Terminus besitzen, kann vermutet werden, dass nicht nur cry2 *photobodies* bildet, sondern auch cry1.

### 5.5.2 cry1 bildet *photobodies* unter starken Lichtbedingungen

Es gibt zahlreiche Befunde, dass cry2 bereits durch schwaches Blaulicht angeregt und aktiviert wird (Lin *et al.*, 1998). Im Vergleich zu cry2 ist cry1 bei höheren Photonen-Fluenzraten aktiv und wird nur unter Starklicht und dann auch nur teilweise degradiert (Miao *et al.*, 2022). Deshalb wurde in folgenden KLSM-Ansätzen versucht, cry1 *photobodies* zu erzeugen, indem stärkeres Licht über eine längere Zeitdauer auf die Blattprobe eingestrahlt wurde (für Vorversuche siehe **Abb. Anhang 4**). Dies wurde durch Bestrahlung mit dem Laser im KLSM (SP5) erreicht. Hierfür wurden von den cry1-GFP transient exprimierenden Pflanzen Blattproben präpariert. Diese wurden tagsüber aus Langtagbedingungen entnommen und in folgenden Experimenten bis zu 15 Minuten lang mit stärkerer Intensität und unterschiedlichen Wellenlängen bestrahlt als bei vorherigen Ansätzen (siehe Kapitel 3.8.3). Hierbei wurden neben dem 488 nm Laser auch ein UV-Laser 405 nm, ein 458 nm und 633 nm Laser dazugeschaltet. Die meisten Laser wurden so ausgewählt, dass sie im Bereich der Absorption von FAD liegen (Schwinn *et al.*, 2020).

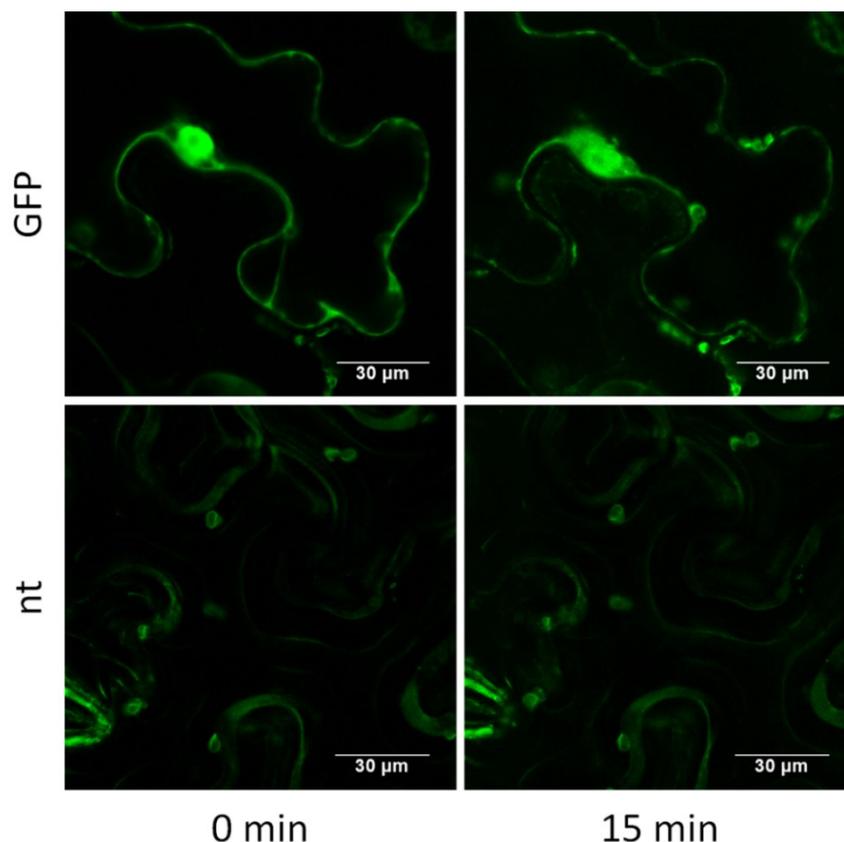
Die Entstehung von *cry1 photobodies* konnte unter diesen Bedingungen bereits nach 10 Minuten beobachtet werden (**Abb. 35 A**). Zu sehen waren deutliche Akkumulationen von GFP-Signal im Zellkern einhergehend mit einer partiellen Abnahme des Signals in anderen Bereichen des Zellkerns. Da man in diesen Aufnahmen den Nucleolus deutlich erkennen konnte, konnte man sicher davon ausgehen, dass es sich um den Zellkern handelte, in dem die Entstehung der *photobodies* beobachtet werden konnte. Zusätzlich war auffällig, dass partiell kleine Punkte im Cytosol nach 10 Minuten Laserbestrahlung auftauchten. Somit deutete dies darauf hin, dass *cry1* auch im Cytosol *photobodies* bildete. Ob es sich im Zellkern und Cytosol um die gleichen Strukturen handelte, blieb aber bislang unbeantwortet.



**Abb. 35: Entstehung von *cry1 photobodies* nach starker Laserbestrahlung.** (A) Blattproben von *cry1-GFP* transient überexprimiert in *N. benthamiana* unter einem KLSM (SP5). Blattproben wurden direkt von der Pflanze präpariert, nachdem diese aus der Anzuchtammer unter Langtag-Belichtung entnommen wurden. Aufnahmen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten während der Bestrahlung gemacht. Die Bestrahlung erfolgte 15 Minuten lang durchgehend auf dem Objektträger unter dem Mikroskop (Bestrahlung und GFP-Anregung bei 405, 458, 488 und 633 nm und GFP-Emission Messung bei 500-550 nm). (B) Nach 15 Minuten Bestrahlung der Proben aus (A) und 90-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT wurde erneut ein Bild aufgenommen, um die Stabilität der *photobodies* zu untersuchen. Nach der Inkubation im Dunkeln waren die *photobodies* vor allem im Cytoplasma deutlich stärker und zahlreicher.

Zur Untersuchung der Stabilität der beobachteten *photobodies* wurde die Blattprobe nach 15-minütiger Bestrahlung mit starkem Laserlicht auf dem selbigen Objektträger 90 Minuten in eine dunkle Box bei Raumtemperatur gelegt. Danach sah man immer noch die vorher gebildeten *photobodies* (Abb. 35 B). Auffällig war, dass die *photobodies* bzw. die GFP-Signale vor allem im Cytoplasma zahlreicher und stärker waren. Das Signal im Zellkern wirkte gleichbleibend.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den beobachteten Signalen um spezifische Eigenschaften von cry1-GFP handelte und nicht um die von GFP, wurden Kontrollen gemacht. Zum einen wurde GFP alleine, also nicht mit cry1 als Fusionsprotein, unter den gleichen Lichtbedingungen getestet (pUBN-GFP). Hier konnte ausgeschlossen werden, dass die *photobody* Entstehung ein Merkmal von GFP war (Abb. 36). Selbst nach 15 Minuten Bestrahlung konnten keine *photobodies* gefunden werden, sodass man von einer spezifischen Eigenschaft des cry1-GFP Fusionsproteins ausgehen konnte.

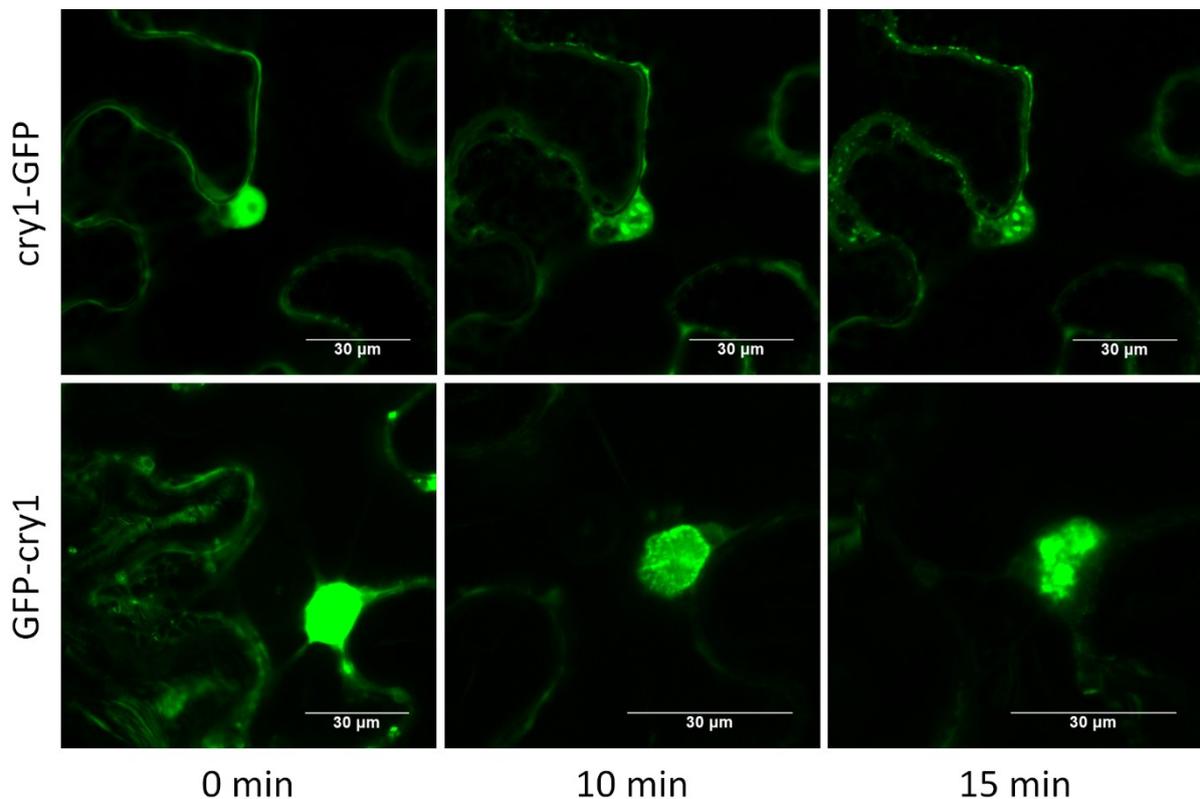


**Abb. 36: GFP ohne Fusionsprotein erzeugt unter gewählten Bedingungen keine *photobodies*.** In der oberen Reihe wurden GFP-Signale nach 0 und 15 Minuten Bestrahlung aufgenommen (Bestrahlung und GFP-Anregung bei 405, 458, 488 und 633 nm und GFP-Emission Messung bei 500-550 nm). In der unteren Reihe probte man eine Blattprobe ohne Expression eines Transgens (nt) unter selbigen Bedingungen. Sichtbares Signal deutete auf Autofluoreszenz hin, hauptsächlich durch Chlorophyll.

Ebenso wurde eine Blattprobe von *N. benthamiana* ohne Transgen unter den gleichen Bedingungen untersucht. Hier sollte ausgeschlossen werden, dass unter den gewählten, detektierten Emissionen (500-550 nm) keine Autofluoreszenz z.B. von Chlorophyllen ein falsch-positives Ergebnis erzeugten (Donaldson, 2020). Selbst nach 15-minütiger Inkubation unter den KLSM-Lasern konnten keine Signale detektiert werden. Somit kommen die beobachteten *photobodies* spezifisch von dem cry1-GFP Fusionsprotein in Verbindung mit den gewählten Lichtbedingungen.

### 5.5.3 Einfluss der Position des GFP-tags im cry1-GFP Konstrukt

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Position des GFP-tags am N-Terminus oder C-Terminus von cry1 einen Einfluss auf die Entstehung der cry1 *photobodies* hat. Deshalb wurden cry1-Konstrukte sowohl mit N- (pUGT2 Dest.) als auch mit C-terminal (pUGT1 Dest.) *getagtem* GFP transient exprimiert und untersucht (Abb. 37).

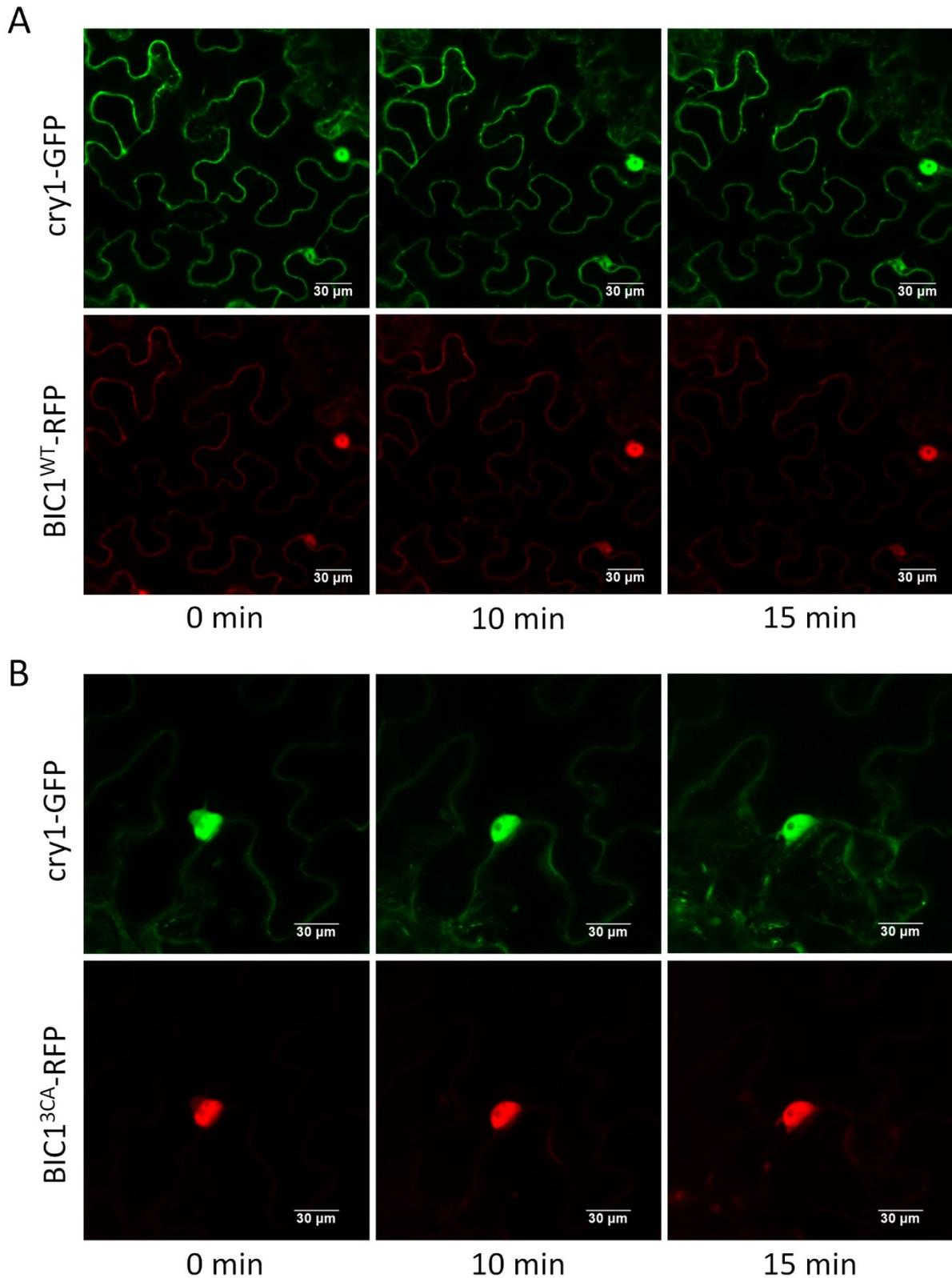


**Abb. 37: Die Orientierung des GFP-tags beeinflusst die *photobody* Entstehung von cry1.** Die Proben wurden unter gleichen Bedingungen untersucht (Bestrahlung und GFP-Anregung bei 405, 458, 488 und 633 nm und GFP-Emission Messung bei 500-550 nm). Aufnahmen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten während der Bestrahlung genommen. Die Bestrahlung erfolgte 15 Minuten lang durchgehend auf dem Objektträger unter dem Mikroskop.

Beide Fusionsproteine zeigten eine ähnliche Kinetik der *photobody* Entstehung, jedoch wurde sich in allen weitererten Experimenten für das C-terminal *getagte* cry1-GFP entschieden, weil das Signal des Fusionsproteins GFP-cry1 (N-terminales *Tag*) in einigen Proben Aggregate im Zellkern und keine punktuellen *photobodies* zeigte. Ebenso blieben bei GFP-cry1 die *photobody*-ähnlichen Strukturen im Cytoplasma aus.

#### **5.5.4 BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> inhibieren die Entstehung der cry1 *photobodies***

In den folgenden Arbeiten wurde die Frage adressiert, ob BIC1 in der Lage ist, die Entstehung der cry1 *photobodies* zu inhibieren. Bei einer transienten Co-Expression von cry1-GFP (pUGT1 Dest.) und BIC1<sup>WT</sup>-RFP (pUBC-RFP-Dest) Fusionsproteinen in *N. benthamiana* konnte gezeigt werden, dass unter den starken Lichtbedingungen, in denen zuvor cry1-GFP *photobodies* beobachtet wurden, keine *photobodies* mehr entstanden (**Abb. 38 A**).



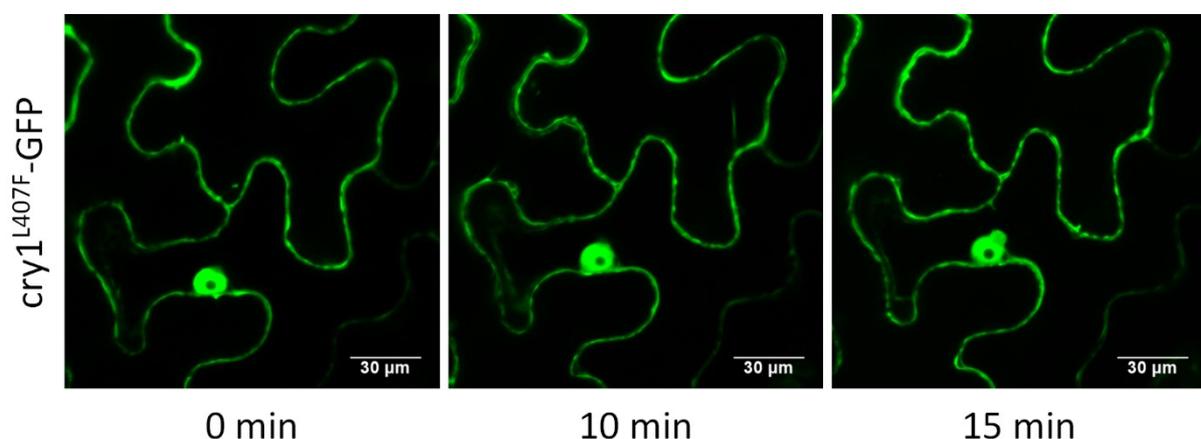
**Abb. 38: Inhibition von cry1-GFP photobodies durch Co-Expression mit BIC1<sup>WT</sup>-RFP und BIC1<sup>3CA</sup>-RFP.** cry1-GFP wurde entweder mit BIC1<sup>WT</sup>-RFP (A) oder BIC1<sup>3CA</sup>-RFP (B) co-exprimiert. Aufnahmen erfolgten nach 0, 10 und 15 min Bestrahlung (405, 458, 488 und 633 nm). cry1-GFP wurde im grünen GFP-Kanal detektiert (500-550 nm) und BIC1<sup>WT</sup>-RFP und BIC1<sup>3CA</sup>-RFP im roten RFP-Kanal (RFP-Anregung bei 561 nm und Emission bei 580-600 nm).

Selbst nach 15-minütiger Bestrahlung wurden keine *cry1*-GFP *photobodies* beobachtet. Zusätzlich erkannte man, dass BIC1<sup>WT</sup> und *cry1* zusammen im Zellkern und im Cytosol der Pflanzenzelle lokalisiert waren, was essentiell für eine direkte Bindung bzw. Inhibierung wäre. Hier konnte somit von einer direkten Wirkung von BIC1<sup>WT</sup> auf *cry1* ausgegangen werden, welche letztendlich die lichtinduzierte Entstehung von *cry1*-GFP *photobodies* verhinderte.

Ebenso wurde die Dreifach-Cystein Mutante BIC1<sup>3CA</sup>-RFP mit *cry1*-GFP co-exprimiert (**Abb. 38 B**). Hier sollte untersucht werden, ob die Austausch der Cysteine einen Einfluss auf die *cry1 photobody* Inhibierung haben. Selbst nach 15-minütiger Bestrahlung mit starkem Laserlicht entstanden keine *cry1 photobodies* bei Co-Expression von BIC1<sup>3CA</sup>-RFP.

### 5.5.5 Die hyperaktive Mutante *cry1*<sup>L407F</sup> bildet keine *photobodies*

Die hyperaktive Mutante *cry1*<sup>L497F</sup>-GFP (pUGT1 Dest.) wurde unter selbigen Lichtbedingungen getestet. Untersucht werden sollte, ob diese *cry1* Mutante, welche schneller und effizienter als Wildtyp *cry1 in vitro* den FAD photoreduziert und biologisch aktiver ist (Exner *et al.*, 2010; Araguirang *et al.*, 2020), auch schneller als Wildtyp *cry1 photobodies* bilden kann. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass die *photobodies* direkt mit der biologischen Aktivität von *cry1* im Zusammenhang stehen würden bzw. für diese erforderlich sind. Anders als vermutet, wurden jedoch gar keine *photobodies* von *cry1*<sup>L407F</sup>-GFP beobachtet, weder als die Blattprobe direkt aus der Anzuchtammer (siehe 3.1.2) entnommen wurde, noch nach 15-minütiger starker Laserbestrahlung (**Abb. 39**).



**Abb. 39:** *cry1*<sup>L407F</sup>-GFP Mutante zeigt nach Bestrahlung mit starkem Laserlicht keine *photobodies*. Blattproben von *cry1*<sup>L407F</sup>-GFP transient überexprimiert in *N. benthamiana* unter einem KLSM (SP5). Blattproben wurden direkt von der Pflanze präpariert, nachdem diese aus einer Anzuchtammer mit Langtag-Belichtung

entnommen wurden. Aufnahmen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten während der Bestrahlung genommen. Die Bestrahlung (Bestrahlung und GFP-Anregung bei 405, 458, 488 und 633 nm und GFP-Emission Messung bei 500-550 nm) erfolgte 15 Minuten lang durchgehend auf dem Objektträger unter dem Mikroskop.

Anhand der KLSM-Aufnahmen war zu erkennen, dass *cryI*<sup>L407F</sup> ebenso wie der Wildtyp sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert war (Zellkern erkennbar durch Nucleolus). Das GFP-Signal im Zellkern unterschied sich nach 15-minütiger Bestrahlung nicht von der Aufnahme zum Bestrahlungsbeginn. Ein erkennbarer Unterschied der GFP-Signale im Vergleich zum WT *cryI*-GFP war allerdings, dass die Intensität des GFP-Signals im Cytosol (nahe der Plasmamembran) variierte und nicht homogen vorlag. In wenigen Versuchen konnten Aggregat-ähnliche Strukturen nach noch stärkerer Bestrahlung gefunden werden (nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, dass eine Photoreduktion des Kofaktors Flavin nicht die einzige Voraussetzung für die Entstehung von *cryI photobodies* ist und diese Strukturen nicht direkt mit der biologischen Aktivität von *cryI* korrelieren.

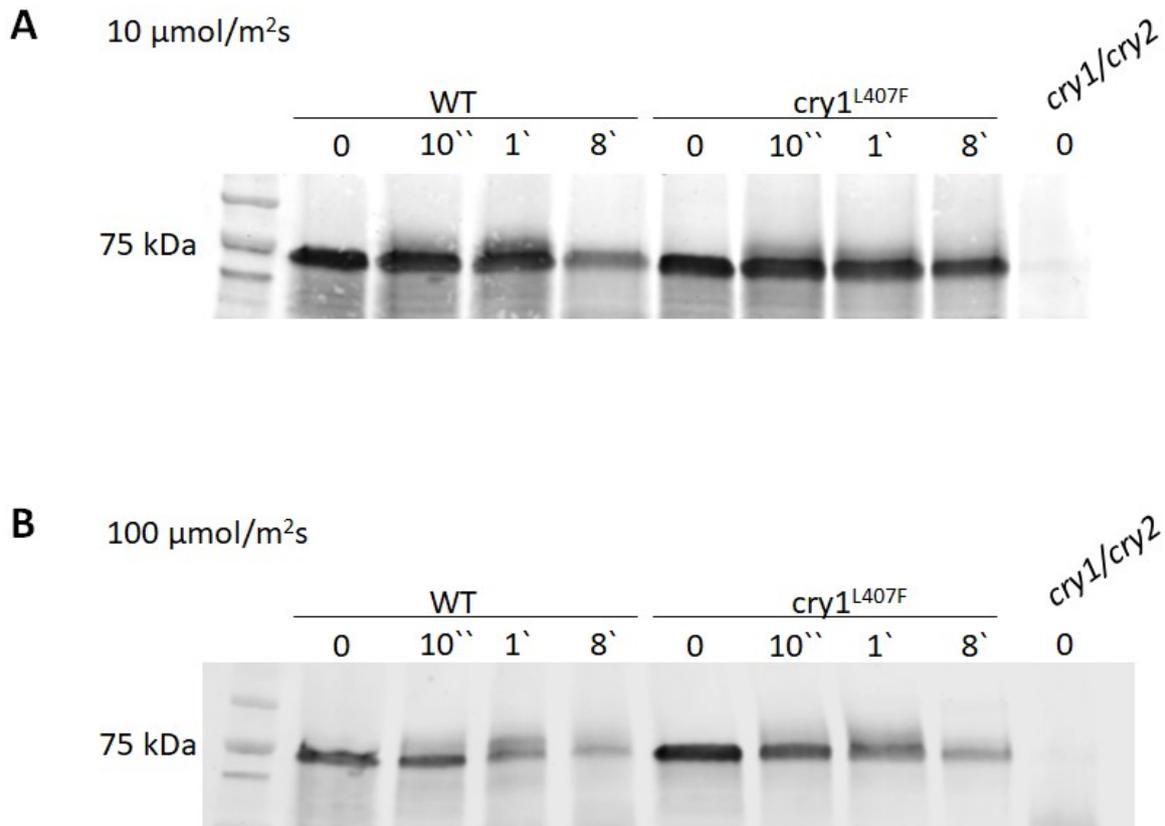
### **5.5.6 Die hyperaktive Mutante *cryI*<sup>L407F</sup> ist unter starkem Blaulicht ähnlich stabil wie WT *cryI***

Nicht bekannt ist, ob die *cryI*-GFP *photobodies* Orte des Abbaus von *cryI* sind und ob der Prozess der *photobody* Entstehung reversibel ist. Daher wurde die Stabilität von *cryI* und der hyperaktiven Mutante *cryI*<sup>L407F</sup> unter Blaulichtbestrahlung überprüft.

Insbesondere sollte überprüft werden, ob die *cryI*<sup>L407F</sup> Mutante unter starkem Blaulicht (100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , bis zu 8 h) stabiler ist bzw. weniger schnell degradiert wird als WT *cryI*. Da die hyperaktive Mutante, anders als der WT, unter denselben Bedingungen keine *photobodies* bildete, war davon auszugehen, dass *cryI*<sup>L407F</sup> auch stabiler unter starkem Blaulicht ist, falls *photobodies* der Ort des Abbaus von *cryI* wären. Es wurden Wildtyp *cryI* und *cryI*<sup>L407F</sup> vergleichend und parallel untersucht. Es wurden Keimlinge, die entweder WT *cryI* oder *cryI*<sup>L407F</sup> exprimieren auf *Whatman*-Filterpapier ausgesät und unter angegebenem Blaulicht angezogen. Danach wurden die Keimlinge geerntet und der Gesamtproteinextrakt über *Western Blot* analysiert. Dabei wurde geschaut, ob es qualitative Unterschiede in den Proteinmengen beider Cryptochrom-Varianten zwischen schwacher Blaulichtbestrahlung (10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), vergleichbar mit moderater Laserbestrahlung, und starker Blaulichtbestrahlung (100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), vergleichbar mit *photobody*-induzierenden Lichtbedingungen, gibt (Liu *et al.*, 2022; Miao *et al.*, 2022). Unter moderaten Blaulichtbedingungen war zu erkennen, dass

beide Proteine über eine Zeitdauer von 8 Stunden sehr stabil waren (**Abb. 40 A**). Nur WT cry1 zeigte nach 8 Stunden eine leicht schwächere Bande, welche auf beginnende Degradation des Proteins zurückzuführen sein könnte. Ebenso zeigten beide Proteine bereits nach 10 Minuten eine schwache Bande oberhalb der cry1 Bande, welche auf lichtinduzierte Phosphorylierung der Cryptochrome hinwies (Shalitin *et al.*, 2003). Als Negativkontrolle wurde eine Doppel-*Knockout*-Mutante *cry1/cry2* getestet.

Die Degradation und Abbau beider Protein-Varianten erfolgten unter starkem Blaulicht deutlich schneller (**Abb. 40 B**). Bereits nach 10 Minuten konnte man eine Abnahme der Intensität der Bande bei 75 kDa (Cryptochrom 1) erkennen. Gleichermäßen sah man die nach oben verschobenen Banden mit phosphoryliertem cry1, die ebenfalls nach bereits 10 Minuten zu erkennen war. Zu beachten war, dass die Gesamtproteinmenge von den WT-Proben und den *cry1*<sup>L407F</sup> Proben leicht unterschiedlich waren und somit die Proben innerhalb des eigenen Genotyps vergleichbar waren, nicht aber zwischen WT und *cry1*<sup>L407F</sup>. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es keinen deutlichen Unterschied in der Stabilität von WT cry1 und *cry1*<sup>L407F</sup> gab.



**Abb. 40: *cry1* und *cry1*<sup>L407F</sup> sind ähnlich stabil unter verschiedenen Blaulicht-Intensitäten.** (A) *Western Blot* von Gesamtproteinextrakten aus *A. thaliana* Keimlingen mit den Protein-Varianten WT *cry1*, *cry1*<sup>L407F</sup> oder der Doppel-*Knockout*-Mutante *cry1/cry2*. Anzucht für 3 Tage im Dunkeln, danach bei 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  Blaulicht für die Zeitpunkte 0, 10 Minuten und 1, 8 Stunden. Detektion von *cry1* mit polyklonalem Antikörper (siehe Abb. Anhang 5). Detektierte Größe von *cry1* bei ca. 75 kDa. Geladene Menge des Gesamtextraktes betrug 25  $\mu\text{g}$  bei WT und *cry1*<sup>L407F</sup> und 17  $\mu\text{g}$  bei der Negativkontrolle. (B) *Western Blot* von Gesamtproteinextrakten von *A. thaliana* Keimlingen, welche bei 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  Blaulicht angezogen wurden. Gleiche Durchführung wie bei (A). Geladene Menge des Gesamtextraktes betrug bei den WT-Proben 25  $\mu\text{g}$  und bei *cry1*<sup>L407F</sup> und bei *cry1/cry2* 27  $\mu\text{g}$ . Geerntet wurden  $n > 20$  Keimlinge pro Zeitpunkt. Blaulicht-Intensität wurde bei 474 nm bestimmt.

Somit hat die ausbleibende Bildung von *photobodies* bei *cry1*<sup>L407F</sup> keinen Einfluss auf dessen Abbau im starken Blaulicht. *Photobodies* sind somit keine Voraussetzung für den Abbau von *cry1*.

## 6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Verständnis über die Aktivierung und Deaktivierung von pflanzlichen Cryptochromen zu verbessern. Hierbei wurde sich hauptsächlich auf die Inhibierung von cry1 und cry2 durch BIC1 fokussiert. Analysiert wurden die entsprechenden Proteine von *A. thaliana*. Bereits in der ersten Arbeit zur Entdeckung von BICs wurde gezeigt, dass BIC1 und BIC2 aus *A. thaliana* spezifisch Cryptochrome inhibieren (Wang *et al.*, 2016). Einige dieser inhibitorischen Wirkungsweisen wurden in dieser Arbeit bestätigt. Für die hier beschriebenen Ergebnisse wurden unterschiedlichste proteinbiologische und pflanzenphysiologische Methoden verwendet.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit die Untersuchungen hinsichtlich der Bindung von Häm an BIC1 *in vitro* fortgeführt. Erste Beobachtungen hierzu und einer Peroxidaseaktivität von BIC1 wurden bereits gezeigt (Nils Niemann, Dissertation Philipps-Universität Marburg, 2021).

Die erst kürzlich beschriebene Entstehung von cry1 *photobodies* (Liu *et al.*, 2022) konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Bedingungen unter denen cry1 diese Strukturen bildet, sind ein weiteres Puzzleteil zum weiteren Verständnis der Wirkung von starkem Blaulicht auf diesen Blaulichtrezeptor.

### 6.1 BIC1 zeigt spezifische Häm-Bindung ohne spezifische Peroxidaseaktivität

#### 6.1.1 Die BIC1<sup>3CA</sup> Mutante zeigt keine spezifische Häm-Bindung

In *E. coli* exprimiertes BIC1<sup>WT</sup> bindet kovalent einen Häm-Kofaktor. Dies wurde mittels Massenspektrometrie nachgewiesen (Nils Niemann, Dissertation Philipps-Universität Marburg, 2021). Dabei bindet das C99 ein Häm *c*. Zur weiteren Klärung dieser Beobachtung wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene BIC1-Proteinvarianten hergestellt. Hierbei wurden alle drei Cysteine in BIC1 (alle befinden sich in dem konservierten Bereich der CID) zu Alaninen ausgetauscht. Es war zu vermuten, dass BIC1<sup>3CA</sup> Häm *c* nicht mehr kovalent binden sollte.

Sowohl BIC1<sup>WT</sup>, als auch BIC1<sup>3CA</sup> wurden heterolog in *E. coli* exprimiert, um nachfolgend den Häm-Gehalt und mehrere enzymatische Tests auf Peroxidaseaktivität durchzuführen. Bekannt ist, dass *E. coli* Häm nur in geringen Mengen produziert und somit ein in *E. coli* heterolog exprimiertes Protein auch nicht vollständig mit Häm besetzt sein sollte (Chouchane *et al.*, 2000;

Varnado und Goodwin, 2004; Fiege *et al.*, 2018). Um diesem Umstand entgegenzuwirken, wurden die Bakterien-Kulturen mit Aminolävulinsäure als Vorstufe des Häms in der Porphyrinsynthese und Eisensulfat versetzt. In der Literatur wurden viele erfolgreiche Untersuchungen an in *E. coli* exprimierten Häm-Proteinen durchgeführt (Beck von Bodman *et al.*, 1986; Ghosh *et al.*, 2005). Die Aufreinigung beider mit His-tag versehenen BIC1 Protein-Varianten über Affinitätschromatographie zeigte, dass genug lösliches Protein aufgereinigt werden konnte. Die Analyse der aufgereinigten Proteine zeigte eine ausreichende Reinheit der Proteine für nachfolgende Protein-Assays. Nach der Aufreinigung von BIC1<sup>WT</sup> wurde dessen Anwesenheit mittels Massenspektrometrie nachgewiesen und Proteinkontaminationen wurden ebenfalls analysiert. Mittels Massenspektrometrie konnten die Chaperone GroEL und DnaK nachgewiesen werden, die mit BIC1<sup>WT</sup> co-aufgereinigt wurden. Dies deutete auf eine möglicherweise unvollständige Faltung der Proteine hin, was erwartbar wäre, weil BIC1 zu einem Großteil aus ungeordneten Bereichen besteht. Bei der Analyse von Proteinen die zusammen mit BIC1 aufgereinigt wurden, war zusätzlich auffällig, dass Fur, ein Protein zur Regulation der Eisenaufnahme, prominent vertreten war, besonders bei BIC1<sup>WT</sup>. Fur vermittelt eine eisenabhängige Regulation der Genexpression und somit auch die Biosynthese von Hämen (Hamza *et al.*, 2000; Benov und Sequeira, 2013). Das prominente Auftauchen von Fur deutet auf vermehrte Eisenaufnahme hin und es ist in der Lage, freies Eisen zu binden. Da sämtliche Expressionen und Aufreinigungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, wurden geringe Proteinkontaminationen bei späteren Protein-Assays nicht als problematisch erachtet. Eine mögliche veränderte Zusammensetzung der Proteinkontaminationen aufgrund verschiedener BIC1-Varianten kann weder ausgeschlossen noch bestätigt werden.

Bei der anschließenden Analyse auf einem SDS-Gel der aufgereinigten BIC1-Varianten wurde beobachtet, dass trotz Hitze-Denaturierung BIC1<sup>WT</sup> neben einer Monomer Bande bei ca. 25 kDa auch eine Dimer Bande und weitere Oligomere aufwies. Erst durch die Zugabe von Reduktionsmitteln wurde primär die monomere Form erhalten. Die Analyse von BIC1<sup>3CA</sup> zeigte ein Ausbleiben dieser oligomeren Strukturen auf dem SDS-Gel. Die Austausch der Cysteine und die Verhinderung der Oligomerisierung von BIC1<sup>WT</sup> durch Reduktionsmittel zeigten deutlich, dass BIC1 intermolekulare Disulfidbrücken ausbildete. Diese könnten durch Aussetzung von Oxidationsmitteln in *E. coli* als Nebenprodukt entstanden sein (Berkmen, 2012). Dies hängt von der Lokalisation von BIC1 ab und dem Milieu der jeweiligen Kompartimente in dem diese lokalisiert sind.

Die UV/VIS-Spektren von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> deuteten immer noch auf eine Affinität von BIC1<sup>3CA</sup> zu Häm hin. Erwartet worden war ein völliges Ausbleiben eines typischen Absorptionsspektrums von Häm bzw. eine andere Absorption nach Zugabe von Hämin bei BIC1<sup>3CA</sup> im Vergleich zu BIC1<sup>WT</sup> vor allem im 500-700 nm Bereich (Butt und Keilin, 1962; Owens *et al.*, 2012). Es konnte aber nur ein minimaler *Shift* des Absorptionsmaximums von 411 nm bei BIC1<sup>WT</sup> zu 408 nm bei BIC1<sup>3CA</sup> detektiert werden. Dieser *Shift* könnte aufgrund von geringfügig unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen in den Eluat-Lösungen zustande kommen, da Imidazol das Häm chelatieren kann (Lal *et al.*, 2018) und auch das Absorptionsverhalten beeinflussen kann, oder aufgrund von unterschiedlichen Wechselwirkungen zwischen BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> mit Häm. Mutationen, die zu einem Verlust der Häm-Bindung führen, resultieren hauptsächlich in einer veränderten Absorption im Bereich der Q-Banden (ca. 500-700 nm). Eine immer noch vorhandene *Soret*-Bande (ca. 400 nm), oder sogar eine höhere Intensität dieser, könnte auf eine schwache oder unspezifische Bindung hinweisen (Owens *et al.*, 2012). Die Mutante BIC1<sup>3CA</sup> zeigte im Bereich 500-700 nm keine Absorption. Dies könnte darauf hinweisen, dass keine spezifische, kovalente Bindung von Häm an diese Mutante mehr besteht. BIC1<sup>3CA</sup> zeigte generell weniger Häm nach der Aufreinigung und damit geringere Affinität zu Häm als BIC1<sup>WT</sup>. Einen Unterschied in den UV-VIS-Spektren von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> nach Zugabe von Hämin war nicht zu erkennen. Die beobachteten Veränderungen der UV/VIS-Spektren nach Zugabe von Hämin könnten durch eine artifizielle Interaktion des *His-tags* mit Hämin erklärt werden. So konnte bei bakteriellen, Häm-bindenden Proteinen gezeigt werden, dass ein *His-tag* eine artifizielle Häm-Bindung eingehen kann und für ein verändertes Absorptionsverhalten sorgen kann (Owens *et al.*, 2012).

BIC1<sup>WT</sup> zeigte nach Quantifizierung des Häm-Gehalts einen Besetzungsgrad von 1,8%. Dieser geringe Wert lässt sich durch die geringe Konzentration an verfügbarem Häm in *E. coli* erklären. Eine schnelle und starke Expression des BIC1 Proteins bei gleichzeitig geringer Häm Konzentration könnte somit zusammen den schlechten Besetzungsgrad erklären. In der Literatur wurden solche Probleme durch langsamere Expression oder Supplementation entgegengewirkt (Jung *et al.*, 2001; Varnado und Goodwin, 2004). Entsprechend wurde davon ausgegangen, dass die Zugabe von 5-Aminolävulinsäure und Eisensulfat für einen guten Besetzungsgrad von BIC1<sup>WT</sup> sorgen könnte (Woodard und Dailey, 1995). Dies hat sich aber nicht bestätigt. Die Mutante BIC1<sup>3CA</sup> zeigte nur einen Besetzungsgrad von 0,2% mit Häm und somit ungefähr 10-fach weniger als der Wildtyp. Zusammen mit den Beobachtungen eines Ausbleibens der

charakteristischen Häm-Banden im Bereich 500-700 nm kann man davon ausgehen, dass BIC1<sup>3CA</sup> nicht mehr in der Lage ist, spezifisch Häm zu binden.

Sowohl BIC1, als auch BIC2 aus *A. thaliana* besitzen eine in allen BICs konservierte Cryptochrom-interagierende Domäne (CID) (Ma *et al.*, 2020b). BIC2 besitzt nicht wie BIC1 drei Cysteine innerhalb der CID, sondern nur ein nicht konserviertes Cystein in der Nähe des N-Terminus und ein Cystein am C-Terminus. Beide Cysteine sind dabei an anderen Positionen wie bei BIC1. In der publizierten Co-Kristallstruktur von cry2 (PHR) und BIC2 (CID) kann eine Bindung beider Proteine über die CID beobachtet werden (Ma *et al.*, 2020b). Dies deutet auf eine möglicherweise wichtige Bedeutung der Cysteine für die Funktion von BIC1 hin. Für eine Häm *c* Bindung sind wenige, dafür spezifische Aminosäuresequenzen bekannt. So bindet das Protein Cytochrom C meist über zwei Thioether-Bindungen über das Aminosäuremotiv CXXCH Häm *c* (Kranz *et al.*, 2009). Dass sich keines der klassischen Häm-Bindemotive bei BIC1<sup>WT</sup> finden lässt, deutet eher auf eine artifizielle Häm Bindung über diese Cysteine hin. Auch eine Bindung eines Häm-Moleküls über zwei BIC1-Proteine ist sehr unwahrscheinlich, weil nach Zugabe von Reduktionsmittel nur ein Monomer auf einem SDS-Gel beobachtbar war. Eine Thioether-Bindung, zwischen Cysteinen und der Vinyl-Gruppe des Häms, ließe sich nicht so leicht durch Reduktion aufbrechen, wie beispielsweise eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen (Heras *et al.*, 2007). Die berechnete Struktur von AlphaFold zeigte, dass BIC1<sup>WT</sup> zu großen Teilen unstrukturiert ist. Möglich wäre eine Umstrukturierung von BIC1 nach Bindung von Häm *c*. *In vitro* wurde beobachtet, dass einige Proteine die Häm *c* binden, sich meist erst nach Ligation des Kofaktors korrekt falten oder erst wenn der Kofaktor einen spezifischen Redoxzustand eingenommen hat (Tezcan *et al.*, 1998; Barker und Ferguson, 1999).

Um zu klären, ob BIC1 auch im homologen System, also in der Pflanze, Häm bindet, wurde BIC1-GFP transient in *N. benthamiana* exprimiert. Nach Aufreinigung über Nano-Beads wurden ausreichende Mengen von BIC1-GFP erhalten und massenspektrometrisch analysiert (Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg). Die Identität von BIC1-GFP konnte durch SDS-PAGE Auftrennung und zusätzlich über die Massenspektrometrie bestätigt werden. Bei der Massenspektrometrie wurde an einem Peptid eine zusätzliche Masse von 616 g/mol detektiert. Diese zusätzliche Masse stimmte mit der Masse von nicht kovalentem Häm-b überein. Überraschend war, dass dieses Häm kovalent an H13 gebunden gefunden wurde und nicht als Häm *c* an C99 wie in Vorarbeiten an dem in *E. coli* produziertem BIC1 (Nils Niemann, Dissertation Philipps-Universität Marburg, 2021). Während der Massenspektrometrie werden die Proteine reduziert, alkyliert und mit Trypsin verdaut, sodass nur kovalent verknüpfte

Kofaktoren überhaupt detektierbar sein sollten. Somit kann ein nicht kovalent verknüpftes Häm ausgeschlossen werden und angenommen werden, dass die Masse von 616 g/mol zu einem über Histidin kovalent verknüpften Häm passt (Rice *et al.*, 2014). Somit lässt sich sagen, dass in *N. benthamiana* Pflanzen exprimiertes BIC1 ein Häm an H13 gebunden hat. Der Umstand, dass an C99 kein Häm *c* gefunden wurde, bedeutet nicht, dass in Pflanzen exprimiertes BIC1 an dieser Position kein Häm gebunden hat, weil es nicht möglich ist, mit Massenspektrometrie einen negativen Nachweis zu erbringen.

Das H13 von BIC1<sup>WT</sup> scheint nur in BIC1 Proteinen der *Brassicales* strikt konserviert zu sein. Dass sich eine Aminosäure, die für Häm-Bindung und enzymatischer Funktion als Peroxidase wichtig ist, nur in der Ordnung der *Brassicales* evolviert hat, ist sehr unwahrscheinlich, aber nicht gänzlich auszuschließen. H13 befindet sich am nicht strukturierten N-Terminus mit bisher unbekannter Funktion. Eine kovalente Bindung von Häm an einem Histidin ist dazu noch recht selten und konnte bisher nur bei einigen Proteinen beobachtet werden. Darunter lassen sich jedoch keine Peroxidasen finden. So gibt es Chaperone in *E. coli* (CcmE), die Häm kovalent an Histidin binden und dieses zu Cytochromen transportieren (Enggist *et al.*, 2003). Die Bindung verläuft ähnlich wie bei Häm *c* über die Ethenylgruppe von Häm und einem Stickstoff des Histidin-Imidazol Ringes. Dies konnte bei einem Hämoglobin (GlbN) von *Synechocystis* sp. beobachtet werden (Nothnagel *et al.*, 2011). Dieses Hämoglobin sorgt neben der Bindung von molekularem Sauerstoff unter anderem für einen Schutz gegen reaktive Stickstoffspezies, nicht aber gegen ROS (Scott *et al.*, 2010). Methoden wie Elektronenspinresonanz (EPR), zur Untersuchung des magnetischen Moments des Eisen-Ions, oder *Magnetic circular dichroism*-Spektroskopie (MCD) zur Untersuchung von Lichtabsorptionen in einem starken Magnetfeld, könnten Aufschlüsse über koordinierende Aminosäuren geben, sodass erkennbar wäre, ob BIC1 wirklich in der Lage ist, effektiv Häm zu binden und ob es diesbezüglich Ähnlichkeiten zu anderen Häm-haltigen Proteinen hat (Pond *et al.*, 1999; Ghosh *et al.*, 2005).

Neben dem Nachweis von Häm in pflanzlich exprimierten BIC1-GFP über Massenspektrometrie zeigte auch eine Co-Lokalisierung von GFP-BIC1 mit Pd-mP in *N. benthamiana* eine Affinität von BIC1 zu einem Häm-ähnlichen Porphyrin-Derivat (Severance und Hamza, 2009; Vanhee *et al.*, 2011). Weiterhin deutete eine zusätzliche Erhöhung der Absorption von BIC1<sup>WT</sup> nach Zugabe mit Pd-mP (Lara *et al.*, 2005) im Bereich von 385 nm und 550 nm auf eine Affinität von BIC1 zu Häm hin. Die Co-Lokalisation von Pd-mP mit BIC1 konnte vor allem im Zellkern beobachtet werden. Cryptochrom 1 wurde als negativ Kontrolle ebenfalls transient in *N. benthamiana* exprimiert und die Proben mit Pd-mP

inkubiert. Jedoch zeigte sich im Gegensatz zu GFP-BIC1 keine Akkumulation von Pd-mP im Zellkern. Für eine bessere Aussagekraft der hier erzielten Befunde wäre die Expression eines Proteins, welches sicher Pd-mP oder Häm binden kann, als positiv Kontrolle sinnvoll gewesen. Ebenso strahlte die Emission von GFP minimal in den Detektionskanal von Pd-mP hinein, sodass einzig die Akkumulation des Pd-mP Signals im Zellkern der beobachtete Unterschied zwischen cry1 und BIC1 war. Neben einer positiv-Kontrolle wäre somit auch die Fusion von BIC1 oder cry1 mit einem anderen fluoreszierenden Protein sinnvoll gewesen, welches nicht in den Detektionskanal von Pd-mP hineinstrahlt.

Durch eine nachfolgende Analyse von in *E. coli* heterolog exprimiertem BIC1<sup>H13A3CA</sup> sollten weitere Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob der zusätzliche Austausch von H13 zu Alanin, neben den bereits vorhandenen Cystein-Austauschen, einen Einfluss auf die Bindung von Häm und eine mögliche Peroxidaseaktivität von BIC1 hat. Trotz schlechterer Expression der Mutante ließ sich diese mit den gleichen Verfahren wie BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> untersuchen. BIC1<sup>H13A3CA</sup> zeigte im Vergleich zu BIC1<sup>3CA</sup> keinen Unterschied in der Menge an gebundenem Häm. Somit scheint zumindest in *E. coli* H13 keinen Einfluss auf die Häm-Bindung zu haben. Für weitere Untersuchungen, ob H13 essentiell für eine Häm-Bindung von BIC1 *in planta* ist, oder auch für eine enzymatische oder gar weitere biologische Aktivität, könnten BIC1<sup>H13A</sup> oder BIC1<sup>H13A3CA</sup> Mutanten in *A. thaliana* exprimiert werden, optimal im *bic1/bic2* Hintergrund.

BIC1 besitzt somit eine Affinität zu Häm. Sowohl an in *E. coli*, als auch in *N. benthamiana* produziertem BIC1 konnte kovalent verknüpftes Häm nachgewiesen werden, jedoch an unterschiedlichen Positionen im Protein. Ob die Häm-Bindung eher artifiziell ist bleibt unbeantwortet und Bedarf weiterer Analysen.

### 6.1.2 BIC1 zeigt keine enzymatische Peroxidaseaktivität

Unter der Annahme, dass BIC1<sup>WT</sup> als Peroxidase fungiert und Ähnlichkeiten im UV/VIS-Bereich mit der *Horseradish-Peroxidase* (HRP) aufweist, wäre BIC1<sup>WT</sup> bzw. der Kofaktor Häm nach der Aufreinigung aus *E. coli* bereits im *Compound I* Zustand, der neben der *Soret*-Bande durch die Absorptionsmaxima bei ca. 530 nm und einer kleineren Schulter bei 560 nm erkennbar ist (Ravanfar und Abbaspourrad, 2021). Der Reaktionsmechanismus von Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid ist an besten an der pflanzlichen HRP verstanden. Hierbei reagiert der Grundzustand von HRP und des Kofaktors Häm (Fe<sup>3+</sup>) durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid zu dem oxidierten *Compound I* (Kation-Radikal). *Compound I* reagiert mit

dem Substrat (Reduktionsmittel) durch Elektronentransfer zu *Compound 2* und mit einem weiteren Substrat-Molekül zurück zu dem Grundzustand (Rodríguez-López *et al.*, 2001; Berglund *et al.*, 2002; Casadei *et al.*, 2014; Campomanes *et al.*, 2015). Durch die Reaktionen mit dem Reduktionsmittel wird die Reversibilität der Peroxidasen gesichert. Eine genauere Aussage über den Redox-Zustand des Häms in BIC1, nämlich ob es sich um den Grundzustand oder um *Compound 1* handelt, lässt sich nicht genau treffen. Hierfür wären Methoden wie z.B. Elektronenspinresonanz (ESR) hilfreich, um die spezifischen Redox-Intermediate von Häm zu ermitteln (Kwon *et al.*, 2016). Bei ESR werden Informationen über die Oxidationszustände und molekularen Strukturen der Intermediate nach Absorption von Mikrowellen in einem magnetischen Feld erhalten (Dent *et al.*, 2019).

Bei dem Peroxidaseaktivität-*Assay* sah man bei BIC1<sup>WT</sup> eine deutliche Umsetzung von *Amplex Red* (Substrat) zu dem Produkt Resorufin. Sowohl der Grundzustand des Häm-Kofaktors, welcher durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid *Amplex Red* oxidieren kann, als auch bereits oxidiertes Häm als *Compound 1* könnten theoretisch in der Lage sein, Resorufin zu erzeugen (Wang *et al.*, 2017a). Dies wäre in den Enzym-*Assays* nicht beobachtbar, da die Konzentration von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht detektiert wurde. Auch zeigte BIC1<sup>WT</sup> eine signifikant stärkere Produktion von Resorufin als BIC1<sup>3CA</sup>. BIC1<sup>WT</sup> hatte mehr Häm gebunden als BIC1<sup>3CA</sup>, sprich die Produktion von Resorufin war alleinig auf die gebundene Menge an Häm zurückzuführen. Der Austausch von Cysteinen gegen Alanine in BIC1 sorgte schlussendlich für eine reduzierte Häm-Bindung und einer daraus resultierenden schlechteren Umsetzung von *Amplex Red* zu Resorufin. Hämin alleine ohne Protein zeigte in diesem Assay ebenfalls die Umsetzung von *Amplex Red* zu Resorufin. Es ist bekannt, dass Hämin alleine durch Wasserstoffperoxid oxidiert und von Reduktionsmitteln oder Substraten ähnlich wie bei HRP reduziert werden kann (Hui *et al.*, 2022). Hämin zeigte sogar eine doppelt so schnelle Umsetzung von *Amplex Red* (**Abb. 22 B**). Dies könnte durch eine bessere Zugänglichkeit für das Substrat an das Eisen-Atom erklärbar sein. Eine andere Erklärung für die vermeintlich bessere Umsetzung von *Amplex Red* durch freies Hämin könnte damit erklärt werden, dass die Konzentrationsbestimmung von BIC1 über Bradford mangelhaft war, weil zusätzliche Proteinkontaminationen hierbei nicht berücksichtigt wurden. Als Folge wäre die BIC1 Konzentration als zu hoch berechnet. Letztendlich lässt sich sagen, dass für eine Umsetzung von *Amplex Red* in diesem Assay keine proteinabhängige Enzym-Aktivität nötig war, da bereits Hämin alleine für eine Umsetzung sorgte.

Auch die Mutante BIC1<sup>H13A3CA</sup> zeigte im Vergleich zu BIC1<sup>3CA</sup> keinen Unterschied in der Peroxidaseaktivität im *Amplex Red Assay*.

Um eine Peroxidase-Aktivität von BIC1 weiter zu klären, wurde in einem zusätzlichen Versuch Chloronaphthol als Substrat verwendet, da dieses ebenfalls durch Peroxidasen wie HRP zu einem sichtbaren Präzipitat oxidiert werden kann (Hawkes *et al.*, 1982). In einer *Native-PAGE* wanderte BIC1<sup>WT</sup> im Gel, ließ jedoch keine Reaktion mit Chloronaphthol erkennen. Als negativ Kontrolle wurde Cytochrom C verwendet (Bushnell *et al.*, 1990). Cytochrom C, welches Häm *c* als Kofaktor gebunden hat, fungiert als Elektronentransporter in der Atmungskette, zeigte in der Literatur auch leichte Peroxidaseaktivität bei der Oxidation von organischen Substanzen mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (Yin *et al.*, 2017). Denaturiertes Cytochrom C hingegen zeigte keine Peroxidaseaktivität in dem nativen Gel, sodass man davon ausgehen kann, dass der Kofaktor Häm *c* alleine nicht für eine Aktivität in diesem *Assay* ausreicht, sondern dass das intakte Protein für enzymatische Aktivität notwendig ist. Da BIC1<sup>WT</sup> keine Reaktion zeigte, kann man entweder davon ausgehen, dass BIC1 Chloronaphthol nicht als Substrat verwenden kann oder keine Peroxidaseaktivität besitzt. Viele Peroxidasen haben eine hohe Spezifität zu ihren Substraten, wie bspw. Ascorbat-Peroxidasen zu Ascorbat (Caverzan *et al.*, 2012), sodass das Reduktionsmittel bzw. Substrat von BIC1 möglicherweise noch nicht gefunden wurde. Normiert auf die gleiche Häm-Menge, zeigte Cytochrom C im nativen Zustand eine leichte Peroxidaseaktivität, nicht jedoch BIC1<sup>WT</sup>. Dies bekräftigt die Aussage, dass Häm alleine in diesem *Assay* mit Chloronaphthol nicht reagieren kann und eine enzymatische Aktivität von Nöten ist, die BIC1<sup>WT</sup> nicht besitzt.

Bemerkenswerterweise zeigte BIC1<sup>WT</sup> im UV/VIS-Spektrum eine deutliche Ähnlichkeit mit dem Spektrum von Cytochrom C. Cytochrom C übernimmt in der oxidierten Form des Häms ein Elektron von einer Cytochrom Reduktase und überträgt dieses dann auf den Cytochrom-Oxidase-Komplex. Sowohl das eingesetzte Cytochrom C als Kontrolle, als auch BIC1<sup>WT</sup> lägen laut UV/VIS-Spektren in der oxidierten Form vor (Fe<sup>3+</sup>), erkennbar anhand der Q-Banden im Bereich 500-600 nm (Owens *et al.*, 2012). Bei reduziertem Eisen (Fe<sup>2+</sup>) ist die zweite Schulter der Q-Banden deutlich stärker als die erste (Beck von Bodman *et al.*, 1986). Dies war bei BIC1<sup>WT</sup> nicht der Fall. Die Reduktion von BIC1 mit 10 mM Dithiothreitol (DTT) führte zu einem Rot-*shift* der *Soret*-Bande und einer Steigerung der zweiten Schulter der Q-Banden nach Zugabe von 10 µM Hämin (nicht gezeigt). Die oxidierte Form des Kofaktors Häm (Fe<sup>3+</sup>) entspricht spektroskopisch auch dem Grundzustand von Peroxidasen wie HRP (Berglund *et al.*, 2002). Jedoch würde für die Annahme, dass BIC1<sup>WT</sup> eine Peroxidase ist, das UV/VIS-

Spektrum von BIC1<sup>WT</sup> zu *Compound 1* passen, also dem oxidierten Redox-Zustand (Ravanfar und Abbaspourrad, 2021). In diesem Fall würde BIC1<sup>WT</sup> bzw. der Kofaktor Häm *c* nicht mehr mit Wasserstoffperoxid reagieren, sondern mit dem Reduktionsmittel (Substrat wie *Amplex Red*).

Somit konnte keine spezifische Peroxidaseaktivität für BIC1 gezeigt werden. Die Funktion der Häm-Bindung bleibt ungeklärt und Bedarf weiterer Analysen. Ebenso Bedarf der tatsächliche Redox-Zustand von Häm an BIC1 weiterer Aufklärung.

## 6.2 BIC1 inhibiert Cryptochrom Funktionen

Neben der Analyse der Funktion der Cysteine auf Häm-Bindung *in vitro* wurde untersucht, ob die Möglichkeit zur Bildung von Disulfidbrücken auch einen weiteren Einfluss auf die biologische Aktivität von BIC1 hat. Insbesondere wurde analysiert, ob ein Verhindern der Ausbildung von Disulfidbrücken durch Austausch der Cysteine mit Alanin in der konservierten CID einen Einfluss auf die Hemmung von Cryptochrom durch BIC1 hat, erkennbar durch veränderte, Blaulicht-abhängige Singalantworten von Cryptochromen. Es gibt zahlreiche Beispiele dafür, dass intermolekulare Disulfidbrücken die Aktivität von Proteinen regulieren (Nagahara, 2011).

### 6.2.1 Etablierung von *A. thaliana* BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> Überexpressions-Linien

Überexpressions-Linien von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> als Fusionen mit dem HA-tag wurden im *A. thaliana* Col-0 Wildtyp-Hintergrund generiert. Hierbei wurde eines von zwei Methionin in der Aminosäuresequenz von BIC1 durch Klonierung in allen Protein-Varianten und allen Linien entfernt. Das Ausbleiben eines von zwei Methionin machte keinen Unterschied in der Wirkung von BIC1. Über *Western Blot* Analyse konnte in den Generation F3 und F4 das Proteinlevel der BIC1-Varianten über deren HA-tags bestimmt werden. Der Gesamtproteinextrakt wurde aus etiolierten Keimlingen isoliert, weil Chlorophyll-haltige Proteine die Quantifizierung über das *LiCOR* Odyssey-System durch deren Fluoreszenz gestört hatten. Somit ist die Menge an BIC1-Protein nur in Keimlingen bekannt, nicht aber in adulten Pflanzen. Jeweils zwei unabhängige transgene Linien der BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> Überexprimierer in der F3-Generation mit ähnlichem Proteinlevel wurden für nachfolgende Analysen ausgewählt. In der F4-Generation konnte eine leicht geringere Menge an BIC1-Proteinen im Vergleich zur F3 detektiert werden, was auf *Gene-silencing* hindeutet. Hierbei wird das Transgen in fortschreitenden Generationen stufenweise weniger exprimiert (Schubert *et al.*, 2004). Der hier verwendete, konstitutive Ubiquitin-10 Promotor ist durch seine moderate Promotor-Aktivität jedoch für seine gute Stabilität gegenüber *Gene-silencing* bekannt (Grefen *et al.*, 2010). Somit kann für die generierten BIC1-Überexpressionslinien von einer nur geringfügigen Beeinflussung durch *Gene-silencing* ausgegangen werden. Transgene Pflanzen, die den Reporter GUS unter UBQ-10-Promotor Kontrolle exprimierten, zeigten ebenfalls nur leicht schwankende Expressionslevel zwischen unabhängigen Linien (Schubert *et al.*, 2004). In allen Linien ist neben dem BIC1, welches durch das Transgen exprimiert wird, noch das endogene BIC1

vorhanden. Versuche, die Proteinmenge von endogenem BIC1 zu bestimmen, schlugen fehl. Hierfür wurde ein polyklonaler Antikörper gegen in *E. coli* heterolog exprimiertem, BIC1 hergestellt. Dieser konnte allerdings das BIC1 in pflanzlichem Proteinextrakt nicht eindeutig detektieren. Das Scheitern des Nachweises von endogenem BIC1 durch diese Antikörper könnte auf Proteinkontaminationen der Proteinlösung zurückzuführen sein, die für die Antikörperherstellung verwendet wurde. Generell wäre es besser gewesen, die Überexpressionen von BIC1 in einer *bic1/bic2* Mutante durchzuführen, weil hierbei auch die Komplementation des *bic*-Mutanten Phänotyps hätte getestet werden können. Diese Mutantenlinie stand aber leider nicht zur Verfügung.

SDS-Gel-Analysen der Gesamtproteinextrakte aus den *A. thaliana* Überexpressions-Linien zeigten keinen Unterschied zwischen BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup>. In allen beobachteten Fällen war die Monomer Bande nach Zugabe von Reduktionsmitteln die prominenteste. Ohne Reduktionsmittel war die Detektion von BIC1 Protein in den Überexpressions-Linien nicht beobachtbar, was für eine Oligomerisierung sprechen könnte, weil sich die Proteine auf mehrere Banden im *Western Blot* mit geringerer, nicht detektierbarer Konzentration verteilen (nicht gezeigt).

### **6.2.2 BIC1 Überexpression hemmt die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums durch cry1**

Die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums wird durch Blaulicht und Rotlicht im Wesentlichen durch Cryptochrome bzw. Phytochrome reguliert. In der vorliegenden Arbeit und in der Literatur (Ahmad *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 2002) wurde gezeigt, dass unter den gewählten Blaulicht-Bedingungen (10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) hauptsächlich *cry1* die Inhibierung des Hypokotyllängenwachstum regulierte. Das kann man daraus schließen, dass sich die *cry1* Mutante von der *cry1/cry2* Doppel-Mutante nicht unterschied, wohingegen die *cry2* Mutante dem WT ähnelte. Im Rotlicht reguliert *phyB* das Hypokotyllängenwachstums, im Dauer-Dunkelrot *phyA*. Auch dies stimmt mit publizierten Befunden anderer überein (Koornneef *et al.*, 1980; Parks und Quail, 1993). Die Überexpression von BIC1<sup>WT</sup> (ausgenommen BIC1<sup>WTox\_2</sup>) und der BIC1<sup>3CA</sup> Mutante führte im Blaulicht zu einem ähnlichen Phänotyp wie die *cry1/cry2* Doppel-*Knockout*-Mutante, nämlich langen Hypokotylen, was somit auf eine vollständige Inhibierung von *cry1* durch BIC1-Überexpression vermuten ließe, unabhängig davon, ob es sich um BIC1<sup>WT</sup> oder BIC1<sup>3CA</sup> handelte. Der gleiche Effekt wurde für BIC1<sup>WT</sup>

bereits zuvor gezeigt (Wang *et al.*, 2016). Da sich die Linien, die BIC1<sup>3CA</sup> überexprimierten, gleich verhielten wie die BIC1<sup>WT</sup> Überexprimierer, zeigt, dass die Austausch der Cysteine in BIC1 keinen Einfluss auf die Inhibierung von Cryptochromen zumindest in dem Prozess der Inhibierung des Hypokotyls haben.

Auffällig ist, dass die Linien BIC1<sup>WTox\_1</sup> und BIC1<sup>WTox\_2</sup> trotz ähnlicher Mengen an BIC1<sup>WT</sup> nicht die gleichen Hypokotyllängen unter Blaulicht aufwiesen (BIC1<sup>WTox\_1</sup> mit längeren Hypokotylen). Für jedes Konstrukt wurden zwei unabhängige Linien ausgewählt, um einen Positionseffekt auf die Expression des Transgens auszuschließen (Gelvin, 2003). Die Lokalisation der Transgene in den generierten Linien ist unbekannt. Nicht auszuschließen ist, dass die *Western Blots* gleiche Proteinlevel suggerierten, diese aber nicht korrekt waren. Ein anderer Grund könnte sein, dass nicht beide Linien homozygot sind. Dies wäre dann möglicherweise für die Linie BIC1<sup>WTox\_2</sup> der Fall. Im Widerspruch dazu steht jedoch, dass bei der Quantifizierung gleiche Proteinlevel an BIC1 detektiert wurden. Die beiden BIC1<sup>3CAox</sup>-Linien zeigten eine ähnliche Sterblichkeit, als die BIC1<sup>WTox</sup>-Linien, bei einer nachträglichen Basta-Behandlung und suggerierten somit eine Homozygotie (**Abb. Anhang 2**). Zusätzlich wurden die Hypokotyllängen aller analysierten Linien auf Normalverteilung getestet. Alle Linien, bis auf den WT (hier war wahrscheinlich die getestete Anzahl an Keimlingen zu gering) waren normalverteilt (**Abb. Anhang 3**). Bei Analysen von transgenen Pflanzen ist es wichtig, diese mit dem WT zu vergleichen, in den das Transgen eingebracht wurde. Hierauf wurde in dieser Arbeit geachtet. Was allerdings nicht erfolgte war die gleichzeitige Anzucht der Pflanzen für die Saatgut Gewinnung und es wurden verschiedene WT Nachzuchten als Kontrolle und Transformation von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> verwendet. Es gibt Befunde darüber, dass BIC1 eine Rolle in der Regulation der Stressantwort spielt. BIC1 interagiert zusammen mit BZR1 und PIF4, um Gene zu regulieren, die in Antworten von Auxin und Brassinosteroiden involviert sind und die Zell-Elongation fördern (Yang *et al.*, 2021). Auxin und Brassinosteroide sorgen unter anderem als Phytohormone für Hypokotylstreckungswachstum, indem bspw. Auxin für eine Zellkern Akkumulation von BZR1 sorgt (Yu *et al.*, 2023). Der Brassinosteroid-Signalweg sorgt zusätzlich für einige Stressantworten, wie der Produktion von Wasserstoffperoxid (Nolan *et al.*, 2020). Hier könnte es einen Schwellwert für BIC1 geben, der für unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen sorgt, wenn die Menge an BIC1 Protein über, oder unterhalb dieses Schwellenwertes liegt.

Die Überexpressionen von BIC1<sup>WTox</sup> hatte keinen Einfluss auf die durch phyB regulierte Deetiolierung unter Rotlicht. Im Gegensatz dazu hatten beide BIC1<sup>3CAox</sup>-Linien im

Dauerrotlicht ein signifikant kürzeres Hypokotyl als der WT. Somit scheint die Mutante im Gegensatz zu BIC1<sup>WT</sup> in der Lage zu sein, das Wachstum des Hypokotyls unter Rotlicht zu inhibieren und somit eine zu Blaulichtbedingungen gegensätzliche Wirkung zu haben. Phytochrome stimulieren die Genexpression von BICs über Hemmung des COP1/SPA Komplexes (Wang *et al.*, 2017b). Unbekannt ist jedoch, ob BICs auch in die Signaltransduktionskette von Phytochromen eingreifen. Möglich wäre eine artifizielle verstärkte Interaktion von BIC1<sup>3CA</sup> durch die Aminosäure-Austausche mit Phytochromen (hier phyB) oder anderen Proteinen in der Phytochrom-Signaltransduktionskette, die deren Wirkung verstärkt, sodass eine gesteigerte Inhibierung des Hypokotyllängenwachstums auftritt. Dies wäre aber eine artifizielle Wirkung dieser BIC1 Mutante, weil die BIC1<sup>WTox</sup>-Linien einen ähnlichen Phänotyp wie der WT aufwiesen. Somit könnten die kürzeren Hypokotyle der BIC1<sup>3CA</sup> Linien andere unbekannte Gründe haben.

Unter Dunkelrotlicht waren die Hypokotyllängen von BIC1<sup>WTox</sup>- und BIC1<sup>3CAox</sup>-Linien nicht unterschiedlich zum WT, sodass davon ausgegangen werden kann, dass BIC1 nicht in den phyA-Signaltransduktionsweg eingreift.

### 6.2.3 BIC1 Überexpression hemmt die Blaulicht-abhängige Blühinduktion

Neben der oben beschriebenen Inhibierung der Wirkung von cry1 bei der Deetiolerung wurde auch beobachtet, dass die Überexpressionen von BIC1<sup>WT</sup> und von BIC1<sup>3CA</sup> einen Einfluss auf den Blühzeitpunkt hatten. Die Blühinduktion ist maßgeblich durch cry2 reguliert, auch wenn es einen gewissen Einfluss von cry1 auf diesen Prozess gibt. Dies zeigt sich darin, dass die Doppel-Knockout-Mutante *cry1/cry2* bis zur Blütenbildung länger braucht als Einzelmutanten von Cryptochromen (Mockler *et al.*, 1999). Unter den gewählten Langtagbedingungen in dieser Arbeit blühten *A. thaliana* WT-Pflanzen nach  $35 \pm 1$  d. Die Doppel-Knockout-Mutante *cry1/cry2* blühte mit  $63 \pm 3$  d signifikant später als der WT. Der photoperiodische Weg der Blühinduktion benötigt die Transkriptionsfaktoren CO und FT. CO induziert die Expression von FT, einem im Phloem transportierten Protein, welches im Apikalmeristem die Blütenbildung initiiert. Photoaktivierte Cryptochrome und phyA stabilisieren das CO Protein durch Hemmung von COP1/SPA (Valverde *et al.*, 2004; Hoecker, 2017; Jaudal *et al.*, 2020). Cryptochrom 2 interagiert zusätzlich mit CIB1, wodurch FT mRNA Expression gefördert wird (Liu *et al.*, 2008). Die Überexpressionen von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup> sorgten für eine signifikant längere Zeit bis zur Blütenbildung (BIC1<sup>WTox\_2</sup> mit  $41 \pm 3$  d; BIC1<sup>3CAox\_1</sup> mit  $43 \pm 2$  d;

BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2 mit  $42 \pm 2$  d) im Vergleich zum WT ( $35 \pm 1$  d), jedoch nicht so lange wie *cry1/cry2*-Pflanzen ( $63 \pm 3$  d). Auch bei diesem Prozess hatte der Austausch der Cysteine in BIC1 keine Wirkung auf dessen biologische Aktivität. Somit konnten bisherige Daten zur Wirkung der BIC1-Überexpressionen auf den Blühbeginn bestätigt werden (Wang *et al.*, 2016). Die zwischen der hier gezeigten Studie und der von Wang *et al.* (2016) unterschiedlichen Blühzeitpunkte könnten dadurch erklärt werden, dass die Autoren 2 h länger Licht pro Tag einstrahlten (18 h), als in der vorliegenden Arbeit (16 h). Bemerkenswert war, dass bei der Inhibierung des Hypokotylängenwachstums unter Blaulicht die Linie BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 und beide BIC1<sup>3CA</sup> Linien keinen Unterschied zu *cry1/cry2*-Pflanzen zeigten, und somit eine nahezu vollständige Inhibierung von Cryptochromen suggerierten. Bei der photoperiodischen Blühinduktion zeigten alle BIC1ox-Linien einen unterschiedlichen Phänotyp zu *cry1/cry2*-Pflanzen. Die Linie BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 blühte mit  $34 \pm 1$  d sogar geringfügig früher als der WT ( $35 \pm 1$  d). Diese hier beobachtete fördernde Wirkung von BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 auf die Blütenbildung steht jedoch im Widerspruch zu publizierten Daten und bleibt unbeantwortet. Anhand der Daten lässt sich somit von einer partiellen Inhibierung von Cryptochromen durch die BIC1-Überexpression ausgehen.

Sogenannte *Cantiles* werden an der ersten Blüte des Blütenstandes von *A. thaliana* beobachtet, wenn die typische Dauer bis zur Blüte stark beeinträchtigt werden (Gookin und Assmann, 2021). Die Autoren zeigten einen auf molekularer Ebene unbekanntem Einfluss von *FT* auf die Bildung von *Cantiles*. Die Bildung von *Cantiles* der BIC1ox-Linien spiegelte die Beobachtungen der Dauer bis zur Blüte und der Blattanzahl und dem somit verzögerten Blühbeginn der BIC1ox-Linien wider.

#### **6.2.4 BIC1-Überexpression initiiert Blaulicht-abhängige SAR durch partielle *cry* Inhibierung**

Ein weiterer Effekt der Inhibierung von Cryptochromen durch BIC1 ist die beobachtete und noch nicht vollständig verstandene, Cryptochrom-regulierte Schattenvermeidungsreaktion unter schwachen Blaulicht-Bedingungen. Pflanzen der Überexpressions-Linien, gewachsen unter Langtagbedingungen, zeigten deutlich größere Rosetten als der WT und die *cry1/cry2* Mutante. Der vollständige Ausfall der Cryptochrome hatte keinen Einfluss auf die Rosettengröße. Bei einer möglichen partiellen Inhibierung von Cryptochromen jedoch, durch die Überexpression von BIC1<sup>WT</sup> und BIC1<sup>3CA</sup>, hatten die Pflanzen einen signifikant größeren

Durchmesser der Rosetten (außer BIC1<sup>WT</sup>ox\_2). Auch die für SAR typische Hyponastie (Casal, 2012) war nur bei den BIC1 Überexpressions-Linien zu beobachten. Somit konnte bestätigt werden, dass eine durch Cryptochrom-regulierte SAR nur dann auftritt, wenn Cryptochrome nur partiell aktiv sind. Die durch Cryptochrome vermittelte SAR basiert auf der Interaktion von cry1 und cry2 mit PIF4/5 und der Regulation der Expression von Proteinen, die unter anderem das Hypokotyllängenwachstum regulieren (Pedmale *et al.*, 2016). Bei Ausfall von Cryptochromen kann keine Interaktion mit PIF4/5 stattfinden, ebenso nicht unter starkem Blaulicht, wenn cry2 und auch PIF5 degradiert werden. BIC1 könnte somit für eine SAR sorgen, indem es die Degradation von Cryptochromen blockiert. Hier müsste überprüft werden, ob ein BIC1-cry-Komplex noch in der Lage wäre, mit PIF4/5 zu interagieren. Zusätzlich sorgt BIC1 als Co-Aktivatoren mit BZR1 und PIF4 für eine verstärkte Expression von PIF4 selbst (Yang *et al.*, 2021). Diese verstärkte Expression von PIF4 könnte für einen stärkeren Effekt der SAR sorgen. Eine zusätzliche Erklärung der Blaulicht-abhängigen SAR wäre die partielle Inhibierung von Cryptochromen durch die BIC1 Überexpression und der damit abgeschwächten Interaktion von cry mit COP1. COP1 scheint eine wichtige Rolle in der SAR zu spielen. COP1 lokalisiert im Dunkeln im Zellkern, wo es für den Abbau von Transkriptionsfaktoren, die wichtig für die Photomorphogenese sind, zuständig ist (Osterlund *et al.*, 2000). COP1 wird im Licht unter anderem von Cryptochromen inaktiviert und zusätzlich aus dem Zellkern exportiert, sodass die Deetiologisierung initiiert wird (Osterlund und Deng, 1998). Im Dunkeln und auch unter schwachen Lichtbedingungen akkumuliert COP1 erneut im Zellkern (Pacín *et al.*, 2013). Eine Blaulicht-abhängige SAR scheint somit stark abhängig davon zu sein, dass nur ein Teil von cry aktiv ist. Die Überexpression von BIC1 führt somit vermutlich auch unter den hier gewählten Langtag-Bedingungen zu dem gleichen Effekt und nur ein Teil von COP1 Molekülen im Zellkern könnte inhibiert werden.

Ob die ermittelte Blatt-Oberfläche in der Blaulicht-vermittelnden Schattenvermeidungsreaktion ebenso zunimmt, wie die durch Hyponastie erklärende Zunahme des Rosettendurchmessers wurde ebenfalls untersucht. Es konnte eine Tendenz hin zu größeren Blättern und somit größerer Oberfläche der BIC1ox-Linien beobachtet werden, jedoch ließen sich keine statistischen, signifikanten Aussagen treffen, da unter anderem die Varianzen der beobachteten Proben zu stark waren.

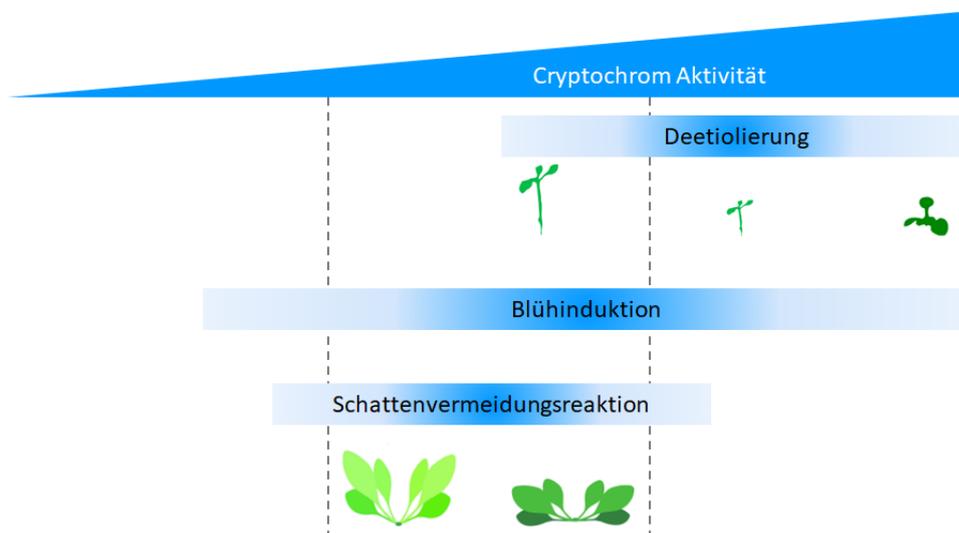
### 6.2.5 Partielle Inhibierung von cry durch BIC1 sorgt für cry-Dosiseffekte

Zusammenfassend wurde der Einfluss von BIC1 Überexpression auf mehrere Prozesse studiert, die entweder auf eine totale, oder auf eine partielle Inhibierung von Cryptochromen hinweisen. Jedoch gibt es keinen Grund anzunehmen, dass Cryptochrome in den Überexpressions-Linien zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedlich stark inhibiert sind. Für manche cry-kontrollierte Prozesse sind möglicherweise mehr aktive Cryptochrome erforderlich, als bei anderen. Dies würde in einem unterschiedlichen Dosis-Effekt für unterschiedliche dieser Prozesse resultieren (**Abb. 41**). Unter der Annahme, dass in den BIC1ox-Linien nicht alle Cryptochrom-Moleküle inhibiert sind, würde bei der Hypokotyllängen-Inhibierung ein kleiner, aktiver Anteil von cry1 nicht ausreichen das Hypokotyl-Wachstum unter Blaulicht zu hemmen. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus dem Umstand, dass die BIC1ox-Linien dem der *cry1/cry2* Mutante ähneln. Dies macht biologisch betrachtet sogar Sinn, da das Hypokotyl solange wachsen sollte, bis der Keimling vollständig exponiert im Sonnenlicht vorliegt und nicht bereits ein Stopp des Hypokotylwachstums unter schwachen, nicht optimalen Lichtbedingungen.

Für die Induktion der Blütenbildung scheinen hingegen geringere Menge an aktiven Cryptochromen ausreichend zu sein. Trotz leicht verzögerten Blühbeginns der meisten BIC1ox-Linien, ähnelten diese mehr dem WT, als den *cry1/cry2*-Pflanzen. Möglicherweise ist in den BIC1ox-Linien die noch verbleibende Menge an aktivem Cryptochrom ausreichend, CO zu stabilisieren und die Expression von FT zu ermöglichen. Somit könnten die Pflanzen auch dann blühen, wenn sie im schwachen Licht bzw. Schatten andere Pflanzen aufwachsen. Zusätzlich spielen noch weitere Faktoren eine wichtige Rolle bei der Blühinduktion, wie die Temperatur und andere Photorezeptoren. Frühes Blühen ist auch Teil der SAR unter schwachem Rotlicht und wird durch Phytochrome und erhöhte Temperatur reguliert (Halliday *et al.*, 2003). Dies zeigt den komplexen Einfluss verschiedener Photorezeptoren auf die Regulation der Blühinduktion.

Bemerkenswert war, dass eine partielle Inhibierung der Cryptochrome die Blaulicht-induzierte Schattenvermeidungsreaktion initiierte, ein Ausbleiben von Cryptochromen (*cry1/cry2*-Pflanzen) jedoch zu keiner phänotypischen Änderung führte. Bereits in der Literatur wurde gezeigt, dass eine Schattenvermeidungsreaktion unter schwachem Blaulicht initiiert wird (Pedmale *et al.*, 2016). Die SAR wird auch von Phytochromen reguliert, die das Verhältnis von Rotlicht zu Dunkelrotlicht wahrnehmen können. Bei einem niedrigen Verhältnis sorgt phyB für

die Dephosphorylierung von PIF7 und interagiert mit diesem (Li *et al.*, 2012). PIF7 bindet an Promotoren von *YUCCA* Genen, die für die Biosynthese von Auxin wichtig sind und im Endeffekt eine SAR auslösen (Tao *et al.*, 2008). Ob BIC1 in den Signalweg von Phytochromen und in die Regulierung von Rotlicht-abhängiger SAR eingreift, bleibt unbeantwortet. Eine weitere Erklärung der beobachteten Schattenvermeidungsreaktion in den BIC1-Überexpressions-Linien wäre ein cry-unabhängiger Regulationsweg durch BIC1. Weitere Versuche könnten diese Fragen klären, indem beispielweise BIC1 in *cry1/cry2* Doppel-*Knockout* und *phyB* Mutanten überexprimiert werden würden, sodass auch eine Rotlicht-gesteuerte Schattenvermeidungsreaktion ausgeschaltet wäre, da bislang nicht auszuschließen ist, dass BIC1 mit dem Phytochromen-Signalweg wechselwirkt.

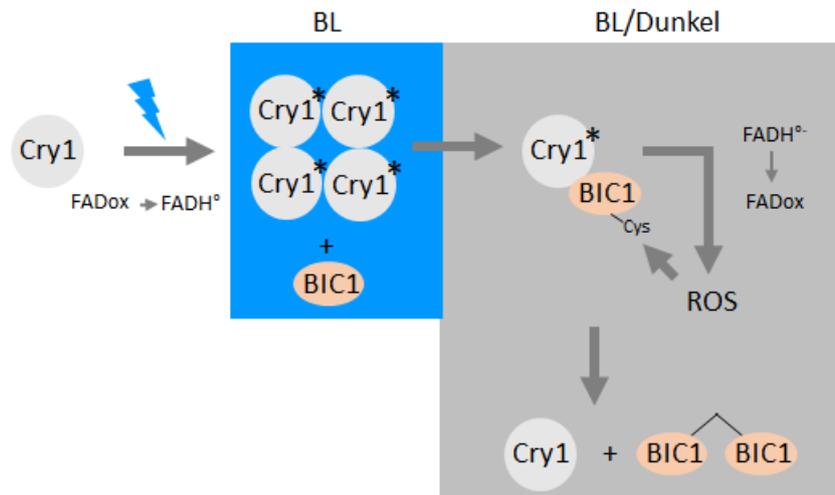


**Abb. 41: Schematische Darstellung eines Cryptochrom Dosiseffekts.** Die drei Blaulicht-induzierten, Cryptochrom-abhängigen Prozesse der Hypokotyllängen-Inhibierung, der Blühinduktion und der Schattenvermeidungsreaktion sind nach benötigter Menge an Cryptochrom Aktivität aufgezeigt. Darstellungen modifiziert nach Pedmale *et al.*, 2016; Ma und Li, 2019.

### 6.3 Mögliche Modifikationen von BIC1 durch Cryptochrome

BIC1 hemmt die Aktivität von Cryptochromen, indem es direkt an sie bindet und dadurch deren Oligomerisierung verhindert. Bisher konnte dies eindeutig für BIC2 und cry2 über die Ko-Kristallstruktur gezeigt werden (Ma *et al.*, 2020b). In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage adressiert, ob Cryptochrome nicht auch Einflüsse auf BIC1 haben könnten. Nach Lichtanregung von cry1 wird dessen Flavin Kofaktor zu FADH<sup>o</sup> (neutrales Semichinon) reduziert (Banerjee *et al.*, 2007; Bouly *et al.*, 2007). Die Rückreaktion zu FADox unter aeroben Bedingungen geht einher mit der Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff, sodass Reaktive-Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (Müller und Ahmad, 2011). Für das gebildete ROS wurden verschiedene biologische Funktionen postuliert (Consentino *et al.*, 2015). Hier wurde die Frage adressiert, ob BIC1 irreversibel Cryptochrome inhibiert, oder dafür sorgt, den dunkeladaptierten Zustand von Cryptochromen wiederherzustellen. Somit wäre dieser Photorezeptor für eine erneute Blaulicht-Wahrnehmung verfügbar. Publierte Daten lassen es unwahrscheinlich erscheinen, dass BIC1 für eine endgültige Inhibierung von cry sorgt, weil BICs die Degradation von Cryptochromen inhibieren (Wang *et al.*, 2016). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass oligomeres Cryptochrom biologisch aktiv ist und auch nur photoaktivierte Cryptochrome phosphoryliert und abgebaut werden (Liu *et al.*, 2020; Rosenfeldt *et al.*, 2008; Shatn *et al.*, 2002). Könnte somit die Re-Oxidierung des Flavin-Kofaktors von Cryptochromen und die damit verbundene Entstehung von ROS dafür sorgen, dass das gebundene BIC1 modifiziert und dadurch seine inhibitorische Wirkung auf cry aufgehoben wird?

Die Cysteine in BIC1 könnten durch die entstandenen ROS oxidiert werden, sodass sich die zumindest von in *E. coli* exprimierten BIC1 beobachteten intermolekularen Disulfidbrücken bilden (**Abb. 18 A**) Die Oligomere von BIC1 könnten durch strukturelle Veränderungen und aus sterischen Gründen von den Cryptochromen abgelöst werden und somit diese freigeben. Mit Hilfe der *in planta* Daten über die Hypokotyllängenbestimmung konnte das in **Abb. 42** gezeigte Modell und die anfängliche Arbeitshypothese jedoch widerlegt werden.



**Abb. 42: Modell der Modifikation von BIC1 über ein Disulfidbrücken-Inhibitions-Mechanismus.** Der Kofaktor von Cryptochrom 1 wird durch Blaulicht-Bestrahlung vom dunkeladaptierten FADox Zustand in das aktive FADH° und in geringem Umfang zu dem vollreduzierten FADH<sup>-</sup> photoreduziert (Lin *et al.*, 1995; Bouly *et al.*, 2007). Cryptochrom 1 bildet im aktiven Zustand unter Blaulicht ein Tetramer und reguliert die Expression von BIC1 hoch (Wang *et al.*, 2017b; Palayam *et al.*, 2021). Die wahrscheinlich lichtunabhängige Bindung von BIC1 an cry1 sorgt für die Monomerisierung von cry1, ähnlich wie bei cry2 gezeigt (Ma *et al.*, 2020b). Die ebenfalls lichtunabhängige Re-Oxidierung von FADH° oder FADH<sup>-</sup> (gezeigt durch FADH<sup>-</sup>) zurück zu oxidiertem FAD sorgt für die Entstehung von ROS (Consentino *et al.*, 2015). Diese könnten durch die räumliche Nähe von BIC mit der FAD-Bindetasche mit BIC reagieren (Ma *et al.*, 2020b), sodass die Cysteine in BIC1 oxidiert werden und intermolekulare Disulfidbrücken mit anderen BIC1 Molekülen bilden. Dies könnte letztendlich für eine Deaktivierung von BIC1 sorgen und eine Freigabe der zuvor gebundenen Cryptochrome.

Wenn das Modell korrekt wäre, dann müssten die Hypokotyllängen der BIC1<sup>WT</sup>ox-Linien kürzer als die der BIC1<sup>3CA</sup>ox-Linien sein. BIC1<sup>WT</sup> würden durch die Generierung von ROS inhibiert werden, sodass die Cryptochrome der BIC1<sup>WT</sup>ox-Pflanzen erneut Blaulicht-abhängige Antworten vermitteln könnten. Die Inhibierung der Hypokotyllängen in BIC1<sup>WT</sup>ox Keimlingen sollte also eher der WT-Pflanzen entsprechen. Da BIC1<sup>3CA</sup> keine Cysteine mehr besitzt, die für eine Oligomerisierung von BIC1 durch die Reaktion mit ROS sorgen könnten, sollten die Hypokotyllängen länger sein, als die der BIC1<sup>WT</sup>ox-Pflanzen. BIC1<sup>3CA</sup> könnte nicht mehr durch ROS inhibiert werden und würde Cryptochrome effektiver und länger inhibieren. Jedoch wurde kein deutlicher Unterschied der beiden Überexpressions-Varianten beobachtet. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass die Cysteine von BIC1 nicht durch Cryptochrome modifiziert werden. Zusätzlich lässt sich sagen, dass die Cysteine keinen Einfluss auf die Effektivität der Inhibierung von Cryptochromen haben.

*In vitro* könnte untersucht werden, ob cry1 die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken bei BIC1 beeinflusst, indem Cryptochrome mit BIC1 inkubiert und mit

Blaulicht bestrahlt werden. Analyse über SDS-Gele oder andere Techniken könnten dann die Zunahme von BIC1 Oligomeren zeigen, die durch ROS gebildet werden würden.

#### 6.4 Blaulicht-abhängige, aber Cryptochrom-unabhängige Transkriptom-Veränderungen

Entgegen den Beobachtungen wurde erwartet, dass es zu keinen Blaulicht-abhängigen Änderungen im Transkriptom bei der *cry1/cry2* Doppel-*Knockout*-Mutante kommen würde. Auch wurde erwartet, dass man einen deutlicheren Unterschied zwischen den BIC1<sup>WT</sup>ox-Linien im Col-0-Hintergrund verglichen mit WT-Pflanzen erkennen würde, da hier Cryptochrome partiell inhibiert sein sollten. Bei den BIC1<sup>WT</sup>-Überexpressions Linien im *cry1/cry2*-Hintergrund wurden mindestens ähnliche Muster des Transkriptoms wie bei der *cry1/cry2* Doppel-*Knockout*-Mutante erwartet, neben einigen Genen, die exklusiv durch BIC1 reguliert werden. Dass BIC1 Gene reguliert wurde in Arbeiten von Wang *et al.* (2016) und Yang *et al.* (2021) gezeigt. Meist waren diese Gene auch Cryptochrom kontrolliert.

Wie gezeigt, wurden in allen transgenen Linien das Transkript des BIC1-Transgens gefunden, wodurch bestätigt werden konnte, dass das Transgen erfolgreich eingebracht und auch exprimiert wurde. Die Linie BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 zeigt eine geringere Transkriptmenge als die anderen Linien, was die These stützt, dass die BIC1-Menge auf den *Western Blots* nicht genau quantifiziert werden konnte. Auch konnte das Fehlen von *cry1* und *cry2* mRNAs in der *cry1/cry2* Doppel-*Knockout*-Mutante zeigen, dass es sich tatsächlich um die Mutanten-Linie handelte (nicht gezeigt). Das Problem bei der hier gezeigten Studie lag darin, dass es hohe Varianzen zwischen den biologischen Replikaten eines Genotyps gab. Normalerweise sollten alle Replikate eines Genotyps unter den gleichen Bedingungen ein relativ ähnliches Transkriptom haben. Dies war aber nicht der Fall. Dadurch wurde die Auswertung der Daten aufgrund geringer Signifikanzen erschwert. Ein möglicher Grund für die hohen Varianzen könnte die Heterozygotie der einzelnen Transgenen in den transgenen Linien sein und der damit einhergehenden Schwankungen der BIC1 Proteinmenge. Pro biologisches Replikat wurde mRNA von bis zu 100 Keimlingen geerntet und aufgereinigt. Bei einer Heterozygotie und beobachtetem Verlust des Fremdgens bei bis zu 15 % der Pflanzen (bei BIC1<sup>WT</sup>ox\_3 (*cry1/cry2*-Hintergrund) und BIC1<sup>WT</sup>ox\_4 (*cry1/cry2*-Hintergrund)) könnte man von starken Schwankungen auf transkriptioneller Ebene ausgehen. Dies würde allerdings nicht die beobachtete, hohe Varianz bei den WT-Pflanzen erklären. Ein anderer Grund für die hohen Varianzen könnte in der Dauer der Ernte liegen. Alle unter Blaulicht-Bedingungen gewachsenen Pflanzen wurden gleichzeitig für 2 h inkubiert. Die Dauer der Ernte betrug bis zu 30 min, sodass manche Pflanzen 2 h bestrahlt wurden, andere bis zu 2,5 h. Die Genexpressionen könnten sich in diesen 30 Minuten stark verändert haben, was zu den beobachteten Effekten

beitragen könnte. Ähnliche Änderungen konnten in vorherigen Studien beobachtet werden (Zhang *et al.*, 2008).

Trotz hoher Varianzen der biologischen Replikate, konnte ein starker Einfluss von Blaulicht auf die Genexpression beobachtet werden. Bemerkenswert war jedoch, dass sich hierbei *cry1/cry2*-Pflanzen kaum von WT-Pflanzen unterschieden. Somit könnte gefolgert werden, dass Cryptochrome hier nicht beteiligt sind, was aber den Erwartungen widerspricht. In bisherigen Versuchen konnten teilweise über 1000 durch Cryptochrome regulierte Gene gezeigt werden (Ma *et al.*, 2001). Wang *et al.* (2016) zeigte, dass *cry1/cry2*-Pflanzen kaum eine Blaulicht-induzierte Veränderung der Genexpression haben. Andere Blaulicht-Photorezeptoren wie Phototropine haben keinen großen Einfluss auf Blaulicht-induzierte Veränderungen der Genexpression (Ohgishi *et al.*, 2004). Auch für Phytochrome, speziell für phyA, ist bekannt, dass diese in gewissem Umfang Blaulicht-abhängige Prozesse regulieren. So zeigt die *phyA*-Mutante eine geringere Transkript-Menge von Chloroplasten Genen unter Blaulichtbedingungen (Chun *et al.*, 2001).

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen hohen Wirksamkeit der Cryptochrome auf die Änderungen von Genexpression unter Blaulicht und dem hier beobachtbaren Effekt von Blaulicht in *cry1/cry2*-Pflanzen, müssen die hier gemachten Befunde mit Vorsicht betrachtet werden. Das grundsätzliche Problem der hier gezeigten Studie ist die hohe Varianz von Replikaten des gleichen Genotyps unter gleichen Anzuchtbedingungen. Somit muss in zukünftigen Studien zunächst dieses Problem angegangen werden, bevor eventuell Gene identifiziert werden können, die ausschließlich durch BIC1 nicht aber durch Cryptochrome kontrolliert werden.

## 6.5 Cryptochrom 1 bildet *photobodies* unter starkem Blaulicht

### 6.5.1 Die Bildung von cry1 *photobodies* ist Abhängig von der Positionierung des fusionierten GFP

*Photobodies* von *A. thaliana* cry1 wurden erst kürzlich entdeckt (Liu *et al.*, 2022), während cry2 *photobodies* schon lange bekannt sind (Mas *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2009). Ein entscheidender Unterschied zwischen cry1 und cry2 ist deren Wirkungsweise unter verschiedenen Lichtbedingungen. cry2 oligomerisiert schneller unter schwachen Fluenzraten und wird schneller degradiert, als das Licht-stabilere cry1, welches unter höheren Fluenzraten von Blaulicht oligomerisiert (Liu *et al.*, 2020; Miao *et al.*, 2022). In dieser Arbeit konnten unter moderaten Lichtbedingungen unter dem KLSM (Anregung mit Laser bei 488 nm) *photobodies* nur von cry2-GFP, nicht jedoch von cry1-GFP beobachtet werden. *Photobodies* von cry1 wurden erst beobachtet, als die Blattproben von Pflanzen, die unter Langtagbedingungen gewachsen waren, bis zu 15 Minuten mit starker Intensität der KLSM-Laser bestrahlt wurden (Anregung bei 405, 458, 488 und 633 nm). Die *photobodies* bildeten sich im Zellkern, jedoch auch partiell im Cytoplasma. Ob es sich dabei um die gleichen Strukturen handelte, bleibt unbeantwortet. Die *photobodies* im Zellkern bildeten größere Strukturen aus, als *photobodies* die im Cytoplasma lokalisiert waren. Die genaue Intensität der eingestrahlten Laser lässt sich an dem KLSM nicht genau ermitteln, jedoch wurden unterschiedliche Wellenlängen, sowie höhere Laser-Leistung auf die Probe eingestrahlt, als bei den Versuchen mit cry2 *photobodies*, sodass unter diesen „Starklicht“-Bedingungen nach 10 Minuten die ersten cry1 *photobodies* zu sehen waren.

Es wurde untersucht, ob der Ort der Fusion von cry1 mit GFP (N-terminal, oder C-terminal) einen Einfluss auf die *photobody* Bildung hat. Eine Fusion von GFP am N-terminus von cry1 führte nach Bestrahlung zu Aggregaten im Zellkern, aber zu keinen punktuellen *photobodies*. Auch in der Literatur ist beschrieben, dass GFP-cry1 im Gegensatz zu cry1-GFP keine *photobodies in planta* bildet (Liu *et al.*, 2022). *Photobodies*, durch Licht induzierte Akkumulierung von fluoreszierenden-Fusionsproteinen, können durch *liquid phase separation* entstehen, oder durch *non-liquid phase aggregation*, bei der Protein-Aggregate entstehen. Bei der *phase separation* bilden Proteine isolierte, membranlose, „flüssige“ Kondensate (Hyman *et al.*, 2014).

Ein Unterschied zwischen cry1 und cry2 könnte in den *intrinsically disordered regions* (IDR) liegen, die bei cry1 sowohl im N-Terminus, als auch im C-Terminus (CCE) vorhanden sind,

während sie bei cry2 nur im C-Terminus vorkommen. Weil GFP-cry1 keine *photobodies* bildet, könnte argumentiert werden, dass die N-terminale IDR bei cry1 eine wichtige Rolle bei der Bildung von *photobodies* spielt. Es kann nicht vollends ausgeschlossen werden, dass die im N-Terminus lokalisierte IDR nicht wichtig für die *photobody* Entstehung von cry1 ist. Jedoch bilden die Fusionsproteine GFP-cry2 ebenfalls wie GFP-cry1 keine *photobodies* (Yu *et al.*, 2009). Das Ausbleiben von GFP-cry2 *photobodies* wird allerdings mit der zu schnellen Degradation von cry2 begründet, die bei cry2-GFP langsamer abläuft. Zusätzlich könnte eine C-terminale Fusion mit GFP die Aktivität von Cryptochromen fördern, denn die CCE wird durch Fusion eines Proteins am C-Terminus sterisch vom Apoprotein abgelöst und liegt exponierter vor. Durch diese gesteigerte Aktivität könnten einfacher *photobodies* entstehen. So kann die CCE bereits phosphoryliert und aktiviert werden, obwohl keine Photoaktivierung stattgefunden hat (Yu *et al.*, 2009). Die CCE von cry1 und cry2 sind ohne die PHR-Domäne konstitutiv aktiv (Yang *et al.*, 2000). Wie in anderen Beispielen gezeigt, sind IDR teilweise essentiell für die *phase separation* von Proteinen. So verliert das pilzliche Proteine FUS1, welches wichtig für den Zusammenbau von Aktin-Strukturen während der Gameten Fusion ist, nach Mutation der IDR die Fähigkeit, sich zu Kondensaten zu konzentrieren. (Billault-Chaumartin *et al.*, 2022). Auch cry2 kann ohne CCE nicht mehr in eine „flüssige“ *phase separation* übergehen, jedoch noch *photobody*-ähnliche Strukturen bilden (Wang *et al.*, 2021). Ob die IDR bei cry1 essentiell für die Entstehung von *photobodies* sind, muss noch abschließend geklärt werden.

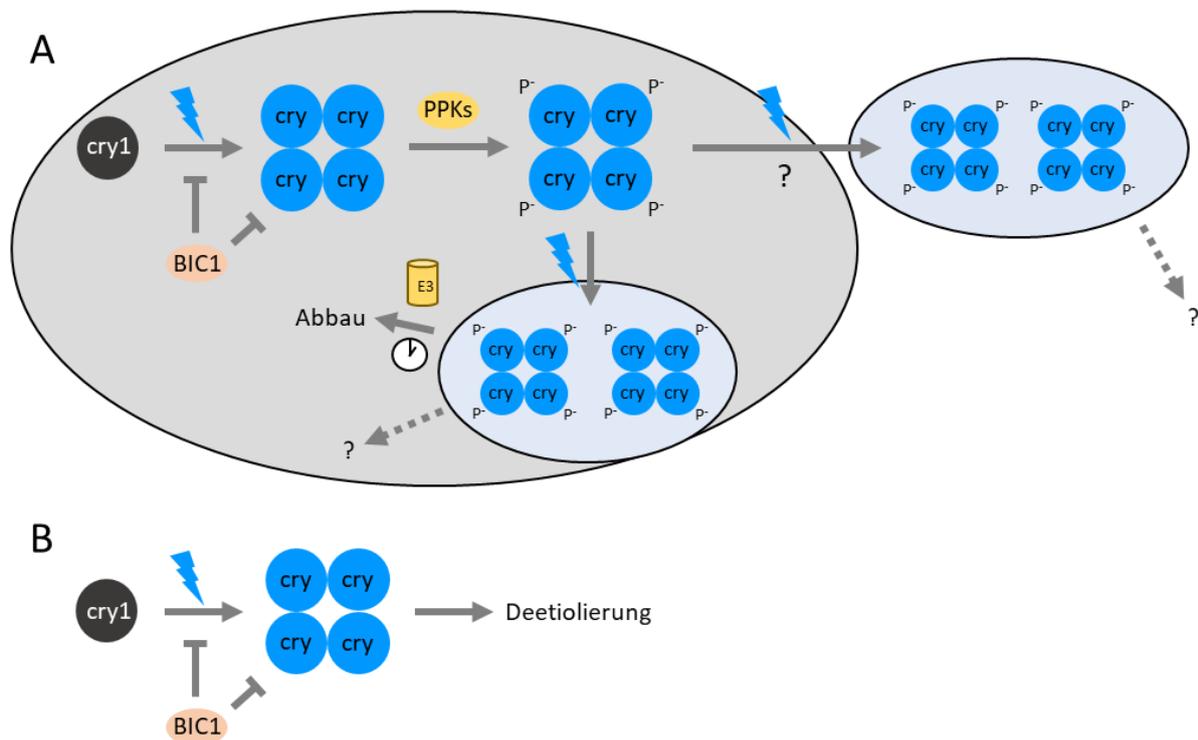
### 6.5.2 cry1 *photobodies* im Zellkern und Cytoplasma

In der Literatur sah man nach Bestrahlung mit starkem Blaulicht ( $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) in *A. thaliana* Protoplasten und HEK293T Zellen die Entstehung von cry1 *photobodies* im Zellkern (Liu *et al.*, 2022). Cryptochrom 1 ist sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma lokalisiert. Somit stellte sich die Frage, warum *photobodies* bei Liu *et al.* (2022) nur im Zellkern beobachtet wurden. Eine Hypothese ist, dass die Phosphorylierung nach Photoaktivierung essentiell für die Entstehung von *photobodies* sein könnte, und die bekannten cry1 PPKs nur im Zellkern lokalisiert sind, sodass auch nur dort cry1 phosphoryliert wird und auch nur dort *photobodies* entstehen könnten (Liu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2022). Die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch, dass *photobodies* sowohl im Zellkern von *N. benthamiana* Blattproben, als auch im Cytoplasma entstanden. Eine Erklärung könnte sein, dass cry1 im Zellkern phosphoryliert wird und dann über unbekannte Prozesse in das Cytoplasma transportiert wird

(Abb. 43 A). Die Obergrenze der Größe von Proteinen, die durch die Poren des pflanzlichen Zellkerns diffundieren können ist noch nicht abschließend geklärt, jedoch wurden in HEK293 Zellen Proteine bis zu 110 kDa beobachtet, die passiv in den Zellkern diffundieren können (Wang und Brattain, 2007). Nach Photoaktivierung könnten Cryptochrome im Zellkern als Tetramere (ca. 300 kDa) vorliegen, sodass es sich höchstwahrscheinlich um einen aktiven Export handeln müsste, oder um passiven Export von phosphorylierten Monomeren. Ein Hinweis dafür zeigten die Fusionsproteine GUS mit CCT1 (CCE von cry1), die in dunkel gewachsenen *A. thaliana* Keimlingen hauptsächlich im Zellkern lokalisiert waren, Keimlinge gewachsen unter Weißlicht zeigten hingegen eine mehrheitliche Lokalisation von GUS-CCT1 im Cytoplasma (Yang *et al.*, 2000). Auch COP1 wird unter Blaulicht-Bedingungen aus dem Zellkern exportiert, wobei die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch unbekannt sind (Osterlund und Deng, 1998). Die Proteine COP1 und cry1 co-lokalisieren im Zellkern (Liu *et al.*, 2022). Die *photobodies* im Zellkern und im Cytoplasma könnten unterschiedliche Funktionen besitzen. Bereits bekannt ist, dass cry1 in diesen Kompartimenten unterschiedliche Funktionen hat, und dass cry1 sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma oligomerisiert (Wu und Spalding, 2007; Liu *et al.*, 2022). Cryptochrome, die nicht phosphoryliert werden, sind möglicherweise nicht in der Lage *liquid phase separation* zu durchlaufen (Abb. 43 B). cry2 ist in der Lage Kondensate auch in HEK293T Zellen zu bilden, die kein PPK1 co-exprimieren und auch cry2 Moleküle ohne CCE kann Kondensate bilden (Wang *et al.*, 2021). Jedoch zeigten in der genannten Arbeit nur phosphorylierte cry2 Moleküle die typische Mobilität von Cryptochrom *photobodies*, gezeigt in einem *fluorescence recovery after photobleaching assay* (FRAP). Hierbei werden *photobodies* bzw. das Fusionsprotein mit starker Bestrahlung gebleicht und nur bei einer Erholung der Fluoreszenz kann von einer „flüssigen“ Phase der Proteine ausgegangen werden (*liquid phase separation*). Bei keiner Erholung der Fluoreszenz kann von *non-liquid phase aggregation* ausgegangen werden. cry1 Varianten, die ausschließlich durch Kern-Exportsequenzen (NES) im Cytoplasma lokalisiert waren, blieben unphosphoryliert und bildeten keine *photobodies* (Liu *et al.*, 2022). Somit scheint die Phosphorylierung essentiell für die Entstehung von *photobodies* zu sein.

Die Funktion von cry1 *photobodies* ist nicht abschließend geklärt. Es ist möglich, dass die Bildung von *photobodies* nicht für die cry1 Signalantwort erforderlich sind, sondern ein essentieller Schritt für dessen Abbau. Bemerkenswert ist auch, dass die *photobodies* von cry1 sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma nach Bestrahlung bis zu 90 min bei nachfolgender Inkubation im Dunkeln intakt waren. Dies spricht eher dafür, dass cry1 in *photobodies* nicht

oder nur sehr langsam abgebaut wird. Die Degradation von cry1 konnte bisher nur im Zellkern gezeigt werden (Liu *et al.*, 2022). Die *photobodies* von cry2 entstehen relativ schnell auch unter schwächeren Lichtbedingungen und verschwinden innerhalb weniger Minuten bei weiterführender Blaulicht-Bestrahlung (eigene Beobachtungen).



**Abb. 43: Modell zur *photobody* Entstehung im (A) Zellkern inklusive cry1 Export und (B) keine *photobody* Entstehung bei cry1 lokalisiert nur im Cytosol.** Nach Anregung durch Blaulicht mit starker Intensität bildet cry1 Oligomere im Zellkern und Cytosol (Liu *et al.*, 2022). Die Oligomerisierung könnte durch BIC1 inhibiert werden, durch die Inhibierung der Photoreduktion und durch sterische Blockierung der Oligomerisierung, wie bei BIC2 und cry2 gezeigt (Ma *et al.*, 2020b). Ebenso kann BIC1 die Rückreaktion von cry2 Tetrameren hinzu Monomeren beschleunigen (Ma *et al.*, 2020b). Tetramere bzw. photoaktiviertes cry1 erfüllen in beiden Kompartimenten unterschiedliche Aufgaben (Wu und Spalding, 2007). Ausschließlich Moleküle im Zellkern werden durch PPKs an der C-terminalen Verlängerung (CCE) phosphoryliert (P<sup>-</sup>) (Liu *et al.*, 2022). Durch weitere Blaulicht Bestrahlung mit starker Intensität (100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) entstehen *photobodies* im Zellkern, die neue Signalantworten geben und letztendlich degradiert und abgebaut werden. Einige phosphorylierte Oligomere gelangen ins Cytoplasma und bilden dort *photobodies*, die unbekannte Funktionen aufweisen. Angeregte aber nicht phosphorylierte cry1 Moleküle im Cytosol bilden keine *photobodies*. Modifiziert nach Batschauer, 2022.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass cry1 *photobodies* bilden kann, nachdem es starker Bestrahlung ausgesetzt wurde, ähnlich wie in der Studie von Liu *et al.* (2022). Dies ist ein weiteres Argument dafür, dass cry1 eine biologische Rolle unter starken Lichtbedingungen spielt.

### 6.5.3 BIC1 unterdrückt die Entstehung von cry1 photobodies

Die Blaulicht-induzierte Entstehung von cry2 photobodies kann durch eine Co-Expression von BIC1 und BIC2 inhibiert werden (Wang *et al.*, 2016). Auch die cry1 photobodies werden durch eine Überexpression von BIC1 in *A. thaliana* Protoplasten inhibiert (Liu *et al.*, 2022). Die Co-Expression von BIC1<sup>WT</sup>-RFP und cry1-GFP in der vorliegenden Arbeit konnte diese Befunde bestätigen. Unter denselben Lichtbedingungen, unter denen cry1 photobodies beobachtet wurden, konnten nach Co-Expression mit BIC1 keine photobodies mehr beobachtet werden. Die Frage die sich aus diesem Befund stellte ist, ob BIC1 im Wildtyp die photobody Entstehung inhibiert, weil die Oligomerisierung von Cryptochromen verhindert wird, oder ob BIC1 bestehende photobodies auflöst. Durch Co-Expression von BICs und crys konnte diese Frage bisher nicht beantwortet werden. Hier konnte nur eine Inhibierung im Vorhinein gezeigt werden, sodass erst gar keine photobodies entstehen konnten. Bekannt ist, dass durch einen negativen feedback-loop die Expression von BIC1 erst durch aktive Cryptochrome (und durch Phytochrome) hochreguliert wird (Wang *et al.*, 2017b). Somit ist es wahrscheinlich, dass bereits cry photobodies entstanden sind, bevor eine ausreichende Menge an BIC1 vorhanden ist, um diesen Prozess bzw. die Oligomerisierung zu unterdrücken. Um zu testen, ob BIC1 in der Lage wäre photobodies von cry1 nach Entstehung aufzulösen, wäre ein optogenetischer Ansatz sinnvoll, bei dem die Expression von BIC1 nach Blaulicht-Inkubation hochreguliert wird und photobodies bereits entstanden wären.

Es wurden auch keine cry1 photobodies nach Co-Expression von cry1-GFP mit BIC1<sup>3CA</sup>-RFP beobachtet. Dies bestätigt die zuvor beobachtete biologische Aktivität dieser BIC1 Mutante.

### 6.5.4 Hyperaktive Mutante cry1<sup>L407F</sup> bildet keine photobodies

Untersucht wurde, ob die hyperaktive Mutante cry1<sup>L407F</sup> ebenfalls photobodies unter den gewählten Bedingungen bilden kann. Diese Mutante lässt sich schneller *in vitro* photoreduzieren als WT cry1 und ist biologisch aktiver als diese *in planta* (Exner *et al.*, 2010; Araguirang *et al.*, 2020). Anhand dieser Beobachtung wurde angenommen, dass cry1<sup>L407F</sup> deutlich schneller und effizienter photobodies bilden kann, sofern photobodies direkt mit der biologischen Aktivität von cry1 in Zusammenhang ständen. Da jedoch keine photobodies von cry1<sup>L407F</sup> unter den selbigen Bedingungen beobachtet wurden, weder im Zellkern noch im Cytoplasma, kann davon ausgegangen werden, dass die effizientere Photoreduktion alleine

nicht ausreicht, damit *photobodies* entstehen. Auch die Entstehung von *photobodies* scheint somit nicht mit der Aktivität von *cry1* zu korrelieren.

Das Ausbleiben von *cry1<sup>L407F</sup>* *photobodies* hat keinen Einfluss auf die Stabilität von *cry1<sup>L407F</sup>*. Wenn *photobodies* ein Ort des Abbaus von *cry1* wären, dann sollte die Mutante *cry1<sup>L407F</sup>* stabiler als WT *cry1* sein, da die Mutante unter gleichen Bedingungen keine *photobodies* bildete. Jedoch gab es nur marginale Unterschiede in der Stabilität zwischen WT *cry1* und *cry1<sup>L407F</sup>* (**Abb. 40**). Die Stabilität von *cry1<sup>L407F</sup>* wurde unter schwachen Blaulichtbedingungen (10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), die für die Entstehung von *cry1* *photobodies* nicht ausreicht, und unter starken Blaulichtbedingungen (100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), einer für *cry1* *photobody* Entstehung ausreichenden Fluenzrate (Liu *et al.*, 2022), untersucht. Jedoch konnte, wie bereits erwähnt, die Intensität des verwendeten KLSM-Laserlichts nicht bestimmt werden. Diese ist abhängig vom Zoomfaktor der Objektivs, der Scangeschwindigkeit während der Proben-Bestrahlung, der Numerischen-Apertur der Objektivs, sowie der Nutzungszeit der verwendeten Laser. Möglich wäre eine Messung der Intensitäten über ein spezielles Optometer. Trotz Ausbleiben der Bildung von *cry1<sup>L407F</sup>* *photobodies* konnte eine deutliche Degradation unter 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  Blaulicht detektiert werden (wie auch bei WT *cry1*). Der Abbau von Cryptochromen erfolgt nach Ubiquitinierung von zwei bekannten E3 Ligasen, Cul4<sup>COPI/SPAs</sup> und Cul3<sup>LRBs</sup> (*light-response Bric-a-Brack/Tramtrack/Broad*), durch das Proteasom (Hoecker, 2017; Chen *et al.*, 2021). Auch konnte auf dem *Western Blot* (**Abb. 40**) eine zweite Protein-Bande oberhalb der ursprünglichen Bande nach Inkubation der Pflanzen im Blaulicht detektiert werden. Diese zusätzliche Bande zeigte phosphoryliertes *cry1*. Die Phosphorylierung ist wichtig für dessen biologische Aktivität (Shatn *et al.*, 2002; Bouly *et al.*, 2003). Diese war stärker nach Inkubation unter 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  als unter 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  sowohl bei WT *cry1* als auch *cry1<sup>L407F</sup>*. In vorausgehenden Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass die hyperaktive Mutante schneller und effizienter phosphoryliert wird als WT *cry1*, dieser Effekt sich allerdings bei 80  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  umkehrt (Exner *et al.*, 2010). Bei 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  scheint rein qualitativ kein Unterschied zwischen beiden *cry1*-Varianten zu bestehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *photobodies* für den Abbau von *cry1* nicht erforderlich sind. Somit ist anzunehmen, dass *cry1* *photobodies* für eine bisher unbekannte Signalantwort verantwortlich sind. Für die generelle Aktivität von *cry1* sind *photobodies* nicht essentiell, da *cry1* auch unter schwachen Fluenzraten wie 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  aktiv ist, ohne dass unter diesen Bedingungen *photobodies* gefunden werden.

Die Forschung an *cry2 photobodies* ist weiter fortgeschritten. *cry2 photobodies* sind mit Enzymen für die Methylierung von mRNA assoziiert und regulieren so die circadiane Uhr (Wang *et al.*, 2021). Bei den *cry1 photobodies* muss auch geklärt werden, ob sich die deren Strukturen im Zellkern und Cytoplasma unterscheiden. Über die Detektion von charakteristischen Mobilitäts-Eigenschaften einer *liquid-liquid-phase-separation* (LLPS) könnte untersucht werden, ob es sich um lösliche, membranlose Strukturen mit hoher Mobilität handelt, oder um artifizielle immobile Protein-Aggregate (*non-liquid phase aggregation*), die in Folge von intensiver Bestrahlung ( $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) entstanden sind. So könnte beispielsweise über die Zugabe von Chemikalien wie 1,6-Hexandiol, welches hydrophobe Interaktionen erschwert und LLPS verhindert, die Eigenschaften von *cry1 photobodies* untersucht werden (Mo *et al.*, 2022).

Möglicherweise ist die Beobachtung von *photobodies* auch nur ein Phänomen der Überexpression von *cry1* bzw. konzentrationsabhängig. Diese Hypothese würden auch die Beobachtungen erklären, warum in Liu *et al.* (2022) nur bei *cry1* mit Kernlokalisationssequenz *photobodies* gefunden wurden, da im Zellkern die Konzentration an *cry1* höher sein sollte, als im Cytoplasma und somit eine *photobody* Entstehung gefördert würde. Zusätzlich wurden *cry1 photobodies* nicht bei jedem durchgeführten Experiment in dieser Arbeit beobachtet, was dafürsprechen würde, dass es noch andere zusätzliche Faktoren für die Bildung von *photobodies* gibt. Einer dieser Faktoren könnte die Temperatur sein, die in keinem der beschriebenen Experimente kontrolliert oder gemessen wurde, bei höheren Bestrahlungsintensitäten aber ansteigt.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahmad, M. (2016). Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 108–115.
- Ahmad, M. und Cashmore, A. R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366(6451), 162–166.
- 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 Physiology*, 129(2), 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(2), 197–207.
- Ahmad, M., Lin, C., Cashmore, A. R. (1995). Mutations throughout an Arabidopsis blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 8(5), 653–658.
- Allen, R. D. (1995). Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants. *Plant Physiology*, 107(4), 1049.
- Apel, K. und Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*, 55, 373–399.
- Araguirang, G. E., Niemann, N., Kiontke, S., Eckel, M., Dionisio-Sese, M. L., Batschauer, A. (2020). The Arabidopsis cryptochrome 2 I404F mutant is hypersensitive and shows flavin reduction even in the absence of light. *Planta*, 251(1), 1–11.
- Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., Rosen, M. K. (2017). Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(5), 285–298.
- Banerjee, R., Schleicher, E., Meier, S., Muñ Oz Viana, R., Pokorny, R., Ahmad, M., Bittl, R., Batschauer, A. (2007). The Signaling State of Arabidopsis Cryptochrome 2 Contains Flavin Semiquinone. *J Biol Chem*, 282(20), 14916–22.

- Barker, P. D. und Ferguson, S. J. (1999). Still a puzzle: why is haem covalently attached in c-type cytochromes? *Structure*, 7(12), R281–R290.
- Batschauer, A. (1993). A plant gene for photolyase: An enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DMA damage. *Plant Journal*, 4(4), 705–709.
- Batschauer, A. (2022). New insights into the regulation of Arabidopsis cryptochrome 1. *New Phytologist*, 234(4), 1109–1111.
- Beck von Bodman, S., Schuler, M. A., Jollie, D. R., Sligar, S. G. (1986). Synthesis, bacterial expression, and mutagenesis of the gene coding for mammalian cytochrome b5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(24), 9443–9447.
- Benov, L. und Sequeira, F. (2013). *Escherichia coli*  $\Delta$ fur mutant displays low HPII catalase activity in stationary phase. *Redox Report*, 8:6, 379-383.
- Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* 2002 417:6887, 417(6887), 463–468.
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 82(1), 240–251.
- Bernard, P. und Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology*, 226(3), 735–745.
- Bernard, P., Gabarit, P., Bahassi, E. M., Couturier, M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene*, 148(1), 71–74.
- Billault-Chaumartin, I., Muriel, O., Michon, L., Martin, S. G. (2022). Condensation of the fusion focus by the intrinsically disordered region of the formin Fus1 is essential for cell-cell fusion. *Current Biology*. 7;32(21), 4752-4761.e10.
- Bland, J. M. und Altman, D. G. (1995). Multiple significance tests: The Bonferroni method. *BMJ*, 310(6973), 170.
- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H., Toole, V. K. (1952). A

- Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 38(8), 662–666.
- 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. *European Journal of Biochemistry*, 270(14), 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. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9383–9391.
- Bowman, S. E. J. und Bren, K. L. (2008). The Chemistry and Biochemistry of Heme c: Functional Bases for Covalent Attachment. *Natural Product Reports*, 25(6), 1118.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P., Lamb, C. J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, 70(1), 21–30.
- Brangwynne, C. P., Tompa, P., Pappu, R. V. (2015). Polymer physics of intracellular phase transitions. *Nature Physics*, 11(11), 899–904.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), 12142–12147.
- Brazard, J., Ley, C., Lacomat, F., Plaza, P., Mony, L., Heijde, M., Zabulon, G., Bowler, C. (2012). Photoantenna in two cryptochrome–photolyase proteins from *O. tauri*: Presence, nature and ultrafast photoinduced dynamics. “*Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry*,” 234, 135–145.
- Brettel, K., Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. M. (2000). Intraprotein radical

- transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature*, 405(6786), 586–590.
- Briggs, W. R. und Christie, J. M. (2002). Phototropins 1 and 2: Versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci*, 7(5), 204-10.
- Britt, A. B. (2004). Repair of DNA damage induced by solar UV. *Photosynthesis Research* 81, 105–112.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K.-I., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A., Getzoff, E. D. (2003). Identification of a New Cryptochrome Class: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Cell*, 11, 59–67.
- Bushnell, G. W., Louie, G. V., Brayer, G. D. (1990). High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *Journal of Molecular Biology*, 214(2), 585–595.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 45(12), 1703–1708.
- Butt, W. D. und Keilin, D. (1962). Absorption spectra and some other properties of cytochrome c and of its compounds with ligands. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 156, 429–458.
- Campomanes, P., Rothlisberger, U., Alfonso-Prieto, M., Rovira, C. (2015). The Molecular Mechanism of the Catalase-like Activity in Horseradish Peroxidase. *Journal of the American Chemical Society*, 137(34), 11170–11178.
- Candeias, L. P., Folkes, L. K., Wardman, P. (1997). Factors controlling the substrate specificity of peroxidases: Kinetics and thermodynamics of the reaction of horseradish peroxidase compound I with phenols and indole-3-acetic acids. *Biochemistry*, 36(23), 7081–7085.
- 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 . *Journal of Virology*, 80(18), 9064–9072.
- Casadei, C. M., Gumiero, A., Metcalfe, C. L., Murphy, E. J., Basran, J., Concilio, M. G., Teixeira, S. C., Schrader, T. E., Fielding, A. J., Ostermann, A., Blakeley, M. P., Raven, E. L., Moody, P. C. E. (2014). Heme enzymes. Neutron cryo-crystallography captures the

- protonation state of ferryl heme in a peroxidase. *Science*, 345(6193), 193–197.
- Casal, J. J. (2012). Shade Avoidance. *The Arabidopsis Book*, 10, e0157.
- Casal, J. J. und Boccalandro, H. (1995). Co-action between phytochrome B and HY4 in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 197(2), 213–218.
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 Suppl), 1011.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., van der Horst, G. T., Batschauer, A., Ahmad, M. (2011). The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. *Annu. Rev. Plant Biol*, 62, 335–364.
- Chen, Y., Hu, X., Liu, S., Su, T., Huang, H., Ren, H., Gao, Z., Wang, X., Lin, D., Wohlschlegel, J. A., Wang, Q., Lin, C. (2021). Regulation of *Arabidopsis* photoreceptor CRY2 by two distinct E3 ubiquitin ligases. *Nature Communications*, 12(1), 1–14; 12, 2155.
- Chentao Lin. (2000). Plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science*, 5(8), 337-342.
- Chmielnicka, J., Ohlsson, P. I., Paul, K. G., Stigbrand, T. (1971). Substrate specificity of plant peroxidases. *FEBS Letters*, 17(2), 181–184.
- Chouchane, S., Lippai, I., Magliozzo, R. S. (2000). Catalase-peroxidase (*Mycobacterium tuberculosis* KatG) catalysis and isoniazid activation. *Biochemistry*, 39(32), 9975–9983.
- Christie, J. M. (2007). Phototropin Blue-Light Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 21–45.
- 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(5394), 1698–1701.
- Chun, L., Kawakami, A., Christopher, D. A. (2001). Phytochrome a mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiology*, 125(4).
- 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 Molecular Biology*, 25(3), 413–427.

Claxton, N. S., Fellers, T. J., Davidson, M. W. (2006). Microscopy, Confocal. In *Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Clezy, P. S. und Morell, D. B. (1963). A spectroscopic study of haematin compounds in the Soret region. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 71(C), 165–171.

Clough, S. J. und Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6), 735–743.

Consentino, L., Lambert, S., Martino, C., Jourdan, N., Bouchet, P., Witezak, J., Castello, O., 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 Phytologist*, 206(4), 1450–1462.

Cowan, J. A. und Gray, H. B. (1989). Q-Band Splitting in the Spectra of Heme Proteins. *Inorganic Chemistry*, 28 (25), 4554-4556.

Dent, M. R., Milbauer, M. W., Hunt, A. P., Aristov, M. M., Guzei, I. A., Lehnert, N., Burstyn, J. N. (2019). Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy as a Probe of Hydrogen Bonding in Heme-Thiolate Proteins. *Inorganic Chemistry*, 58(23), 16011–16027.

Desikan, R., Neill, S. J., Hancock, J. T. (2000). Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(5), 773–778.

Donaldson, L. (2020). Autofluorescence in plants. *Molecules*, 25(10), 2393.

Dunn, O. J. (1961). Multiple Comparisons among Means. *Journal of the American Statistical Association*, 56(293), 52–64.

Eckel, M., Steinchen, W., Batschauer, A. (2018). ATP boosts lit state formation and activity of *Arabidopsis* cryptochrome 2. *The Plant Journal*, 96(2), 389–403.

Eker, A. P. M., Eker Hessels, J. K. C., Van De Velde, J. (1988). Photoreactivating Enzyme from the Green Alga *Scenedesmus acutus*. Evidence for the Presence of Two Different Flavin Chromophores. *Biochemistry*, 27(5), 1758–1765.

Engelhard, C., Wang, X., Robles, D., Moldt, J., Moldt, J., Batschauer, A., Bittl, R., Ahmad, M.

- (2014). Cellular Metabolites Enhance the Light Sensitivity of *Arabidopsis* Cryptochrome through Alternate Electron Transfer Pathways. *The Plant Cell*, 26(11), 4519–4531.
- Enggist, E., Schneider, M. J., Schulz, H., Thöny-Meyer, L. (2003). Biochemical and mutational characterization of the heme chaperone CcmE reveals a heme binding site. *Journal of Bacteriology*, 185(1), 175–183.
- 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 Physiology*, 154(4), 1633–1645.
- Fankhauser, C. und Ulm, R. (2011). Light-regulated interactions with SPA proteins underlie cryptochrome-mediated gene expression. *Genes & Development*, 25(10), 1004.
- Farka, Z., Juřík, T., Pastucha, M., Skládal, P. (2016). Enzymatic precipitation enhanced surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella in powdered milk. *Analytical Chemistry*, 88(23), 11830–11836.
- 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 Journal*, 28(5), 591–601.
- Fiege, K., Querebillo, C. J., Hildebrandt, P., Frankenberg-Dinkel, N. (2018). Improved Method for the Incorporation of Heme Cofactors into Recombinant Proteins Using *Escherichia coli* Nissle 1917. *Biochemistry*, 57(19), 2747–2755.
- Forman, H. J., Maiorino, M., Ursini, F. (2010). Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry*, 49(5), 835.
- Foyer, C. H. und Hanke, G. (2022). ROS production and signalling in chloroplasts: cornerstones and evolving concepts. *The Plant Journal*, 111(3), 642.
- Franklin, K. A. und Quail, P. H. (2010). Phytochrome functions in Arabidopsis development. *Journal of Experimental Botany*, 61(1), 11-24.
- Franklin, K. A. und Whitelam, G. C. (2005). Phytochromes and Shade-avoidance Responses in Plants. *Annals of Botany*, 96(2), 169–175.

- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(29), 9135–9140.
- Gecchele, E., Merlin, M., Brozzetti, A., Falorni, A., Pezzotti, M., Avesani, L. (2015). A comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: Bacteria, insect cells and plant systems. *Journal of Visualized Experiments*, *2015*(97).
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(1), 16.
- Genoud, T., Schweizer, F., Tscheuschler, A., Debrieux, D., Casal, J. J., Schäfer, E., Hiltbrunner, A., Fankhauser, C. (2008). FHY1 mediates nuclear import of the light-activated phytochrome A photoreceptor. *PLoS Genetics*, *4*(8), e1000143.
- Ghosh, K., Thompson, A. M., Oh, E., Shi, X., Goldbeck, R. A., Zhiwu, Z., Vulpe, C., Holman, T. R. (2005). Spectroscopic and Biochemical Characterization of Heme Binding to Yeast Dap1p and Mouse PGRMC1p. *Biochemistry*, *44*(50), 16729–16736.
- Giovani, B., Byrdin, M., Ahmad, M., Brettel, K. (2003). Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nature Structural Biology*, *10*(6), 489–490.
- Girotti, A. W. (2001). Photosensitized oxidation of membrane lipids: Reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *63*(1–3), 103–113.
- Goett-Zink, L., Toschke, A. L., Petersen, J., Mittag, M., Kottke, T. (2021). C-Terminal Extension of a Plant Cryptochrome Dissociates from the  $\beta$ -Sheet of the Flavin-Binding Domain. *Journal of Physical Chemistry Letters*, *12*(23), 5558–5563.
- Gookin, T. E. und Assmann, S. M. (2021). Cantil: A previously unreported organ in wild-type *Arabidopsis* regulated by FT, ERECTA and heterotrimeric G proteins. *Development (Cambridge)*, *148*(11).
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant*

*Journal*, 64(2), 355–365.

- Groden, D. und Beck, E. (1979). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 546(3), 426–435.
- Grossman, E., Medalia, O., Zwerger, M. (2012). Functional architecture of the nuclear pore complex. *Annual Review of Biophysics*, 41, 557-584.
- Halliday, K. J., Salter, M. G., Thingnaes, E., Whitelam, G. C. (2003). Phytochrome control of flowering is temperature sensitive and correlates with expression of the floral integrator FT. *The Plant Journal*, 33(5), 875–885.
- Hamza, I., Qi, Z., King, N. D., O'Brian, M. R. (2000). Fur-independent regulation of iron metabolism by Irr in *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology (Reading, England)*, 146 (Pt 3)(3), 669–676.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580.
- Hao, R., Adoligbe, C., Jiang, B., Zhao, X., Gui, L., Qu, K., Wu, S., Zan, L. (2015). An optimized trichloroacetic acid/acetone precipitation method for two-dimensional gel electrophoresis analysis of Qinchuan cattle longissimus dorsi muscle containing high proportion of marbling. *PLoS ONE*, 10(4), e0124723.
- Hawkes, R., Niday, E., Gordon, J. (1982). A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical Biochemistry*, 119(1), 142–147.
- Heijde, M. und Ulm, R. (2012). UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in Plant Science*, 17(4), 230-237.
- Hellens, R., Mullineaux, P., Klee, H. (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446-451.
- Hense, A., Herman, E., Oldemeyer, S., Kottke, T. (2015). Proton transfer to flavin stabilizes the signaling state of the blue light receptor plant cryptochrome. *Journal of Biological Chemistry*, 290(3), 1743–1751.
- Heras, B., Kurz, M., Shouldice, S. R., Martin, J. L. (2007). The name's bond.....disulfide bond. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(6), 691–698.

- Hitomi, K., DiTacchio, L., Arvai, A. S., Yamamoto, J., Kim, S. T., Todo, T., Trainer, J. A., Iwai, S., Panda, S., Getzoff, E. D. (2009). Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(17), 6962–6967.
- Hoang, N., Bouly, J. P., Ahmad, M. (2008). Evidence of a Light-Sensing Role for Folate in *Arabidopsis* Cryptochrome Blue-Light Receptors. *Molecular Plant*, 1(1), 68–74.
- Hoecker, U. (2017). The activities of the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA, a key repressor in light signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 37, 63–69.
- 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. *Molecular & General Genetics : MGG*, 253(1–2), 259–265.
- 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 . *Journal of Virology*, 83(5), 2188–2200.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D. X., Yi, M., Zhao, Y. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 800.
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzländer, M., Belt, K., Millar, A. H. (2016). The Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Signaling and Stress Response in Plants. *Plant Physiology*, 171(3), 1551.
- Hubner, N. C., Bird, A. W., Cox, J., Splettstoesser, B., Bandilla, P., Poser, I., Hyman, A., Mann, M. (2010). Quantitative proteomics combined with BAC TransgeneOmics reveals in vivo protein interactions. *Journal of Cell Biology*, 189(4), 739–754.
- Hui, W., Yang, Z., Fang, K., Wu, M., Mu, W., Zhao, C., Xue, D., Zhu, T., Li, X., Gao, M., Lu, Y., Yan, K. (2022). Hemin with Peroxidase Activity Can Inhibit the Oxidative Damage Induced by Ultraviolet A. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(6), 2683–2694.
- Hyman, A. A., Weber, C. A., Jülicher, F. (2014). Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annurev-Cellbio*, 30, 39–58.

- Ichikawa, T., Nakazawa, M., Kawashima, M., Iizumi, H., Kuroda, H., Kondou, Y., Tsuchida, Y., Suzuki, K., Ishikawa, A., Seki, M., Fujita, M., Motohashi, R., Nagata, N., Takagi, T., Shinozaki, K., Matsui, M. (2006). The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *The Plant Journal*, 48(6), 974–985.
- Imaizumi, T., Schultz, T. F., Harmon, F. G., Ho, L. A., Kay, S. A. (2005). Plant science: FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. *Science*, 309(5732), 293–297.
- Imaizumi, T., Tran, H. G., Swartz, T. E., Briggs, W. R., Kay, S. A. (2003). FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in Arabidopsis. *Nature*, 426(6964), 302–306.
- Immeln, D., Weigel, A., Kottke, T., Pérez Lustres, J. L. (2012). Primary events in the blue light sensor plant cryptochrome: Intraprotein electron and proton transfer revealed by femtosecond spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 134(30), 12536–12546.
- Ito, S., Song, Y. H., Imaizumi, T. (2012). LOV domain-containing F-box proteins: Light-dependent protein degradation modules in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 5(3), 573–582.
- Jaudal, M., Wen, J., Mysore, K. S., Putterill, J. (2020). Medicago PHYA promotes flowering, primary stem elongation and expression of flowering time genes in long days. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1–16.
- Jiang, H., Wang, S., Huang, Y., He, X., Cui, H., Zhu, X., Zheng, Y. (2015). Phase Transition of Spindle-Associated Protein Regulate Spindle Apparatus Assembly. *Cell*, 163(1), 108–122.
- Johnson, J. L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G. B., Rajagopalan, K. V., Sancar, A. (1988). Identification of the second chromophore of Escherichia coli and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(7), 2046–2050.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., et al. Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589.
- Jung, Y., Kwak, J., Lee, Y. (2001). High-level production of heme-containing holoproteins in Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(2), 187–191.

- Kaiserli, E. und 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. *The Plant Cell*, 19(8), 2662–2673.
- Karakuzu, O., Cruz, M., Liu, Y., Garsin, D. (2019). Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from *Caenorhabditis elegans*. *BIO-PROTOCOL*, 9(21).
- Keller, M. M., Jaillais, Y., Pedmale, U. V., Moreno, J. E., Chory, J., Ballaré, C. L. (2011). Cryptochrome 1 and phytochrome B control shade-avoidance responses in *Arabidopsis* via partially independent hormonal cascades. *Plant Journal*, 67(2), 195–207.
- Kennedy, M. J., Hughes, R. M., Peteya, L. A., Schwartz, J. W., Ehlers, M. D., Tucker, C. L. (2010). Rapid blue light induction of protein interactions in living cells. *Nature Methods*, 7(12), 973.
- Kepler, L. D., Baker, C. J., Atkinson, M. M. (1989). Active Oxygen Production During a Bacteria-Induced Hypersensitive Reaction in Tobacco Suspension Cells. *Physiology and Biochemistry; Phytopathology* 79:974-978.
- Keuskamp, D. H., Keller, M. M., Ballaré, C. L., Pierik, R. (2012). Blue light regulated shade avoidance. *Plant Signaling and Behavior*, 7(4), 514–517.
- Kim, W. Y., Fujiwara, S., Suh, S. S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Gil Nam, H., Somers, D. E. (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature*, 449(7160), 356–360.
- Kleiner, O., Kircher, S., Harter, K., Batschauer, A. (1999). Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant Journal*, 19(3), 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 Physiology*, 130(1), 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 P(r) → P(fr) phototransformation of phytochrome: A resonance raman spectroscopic study. *Biochemistry*, 38(46), 15185–15192.

- Koncz, C. und Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *MGG Molecular & General Genetics*, 204(3), 383–396.
- Koornneef, M., Rolff, E., Spruit, C. J. P. (1980). Genetic Control of Light-inhibited Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 100(2), 147–160.
- Kopp, G. und Lean, J. L. (2011). A new, lower value of total solar irradiance: Evidence and climate significance. *Geophysical Research Letters*, 38(1).
- Kottke, T., Batschauer, A., Ahmad, M., Heberle, J. (2006). Blue-light-induced changes in *Arabidopsis* cryptochrome 1 probed by FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry*, 45(8), 2472–2479.
- Kranz, R. G., Richard-Fogal, C., Taylor, J.-S., Frawley, E. R. (2009). Cytochrome c Biogenesis: Mechanisms for Covalent Modifications and Trafficking of Heme and for Heme-Iron Redox Control . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(3), 510–528.
- Krysan, P. J., Young, J. C., Jester, P. J., Monson, S., Copenhaver, G., Preuss, D., Sussman, M. R. (2002). Characterization of T-DNA insertion sites in *Arabidopsis thaliana* and the implications for saturation mutagenesis. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 6(2), 163–174.
- Kunkel, T., Speth, V., Buche, C., Schafer, E. (1995). In vivo characterization of phytochrome-phytylcyanobilin adducts in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 270(34), 20193–20200.
- Kwon, H., Basran, J., Casadei, C. M., Fielding, A. J., Schrader, T. E., Ostermann, A., Devos, J. M., Aller, P., Blakeley, M. P., Moody, P. C. E., Raven, E. L. (2016). Direct visualization of a Fe(IV)–OH intermediate in a heme enzyme. *Nature Communications*, 7(1), 13445.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 227; 15;227(5259), 680-5.
- Lal, S., Comer, J. M., Konduri, P. C., Shah, A., Wang, T., Lewis, A., Shoffner, G., Guo, F., Zhang, L. (2018). Heme promotes transcriptional and demethylase activities of Gis1, a member of the histone demethylase JMJD2/KDM4 family. *Nucleic Acids Research*, 46(1),

215–228.

- Lamb, C. und Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 251–275.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of  $\lambda$  site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 58(1), 913–941.
- Lara, F. A., Lins, U., Bechara, G. H., Oliveira, P. L. (2005). Tracing heme in a living cell: Hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Experimental Biology*, 208(16), 3093–3101.
- Lau, K., Podolec, R., Chappuis, R., Ulm, R., Hothorn, M. (2019). Plant photoreceptors and their signaling components compete for COP1 binding via VP peptide motifs. *The EMBO Journal*, 38(18), e102140.
- Leffel, S. M., Mabon, S. A., Stewart, C. N. (1997). Applications of green fluorescent protein in plants. *BioTechniques*, 23(5), 912–918.
- Legris, M., Ince, Y. Ç., Fankhauser, C. (2019). Molecular mechanisms underlying phytochrome-controlled morphogenesis in plants. *Nature Communications*, 10(1), 1–15; 5219.
- Li, F. Y., 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*, 30(25), 6322–6329.
- Li, L., Ljung, K., Breton, G., Schmitz, R. J., Pruneda-Paz, J., Cowing-Zitron, C., Cole, B. J., Ivans, L. J., Pedmale, U. V., Jung, H.-S., Ecker, J. R., Kay, S. A., Chory, J. (2012). Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes & Development*, 26(8), 785–790.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51), 20844–20849.

- Lian, H. L., He, S. B., Zhang, Y. C., Zhu, D. M., Zhang, J. Y., Jia, K. P., Sun, S.-X., Li, S., Yang, H. Q. (2011). Blue-light-dependent interaction of cryptochrome 1 with SPA1 defines a dynamic signaling mechanism. *Genes and Development*, 25(10), 1023–1028.
- Lin, C., Robertson, D. E., Ahmad, M., Raibekas, A. A., Jorns, M. S., Dutton, P. L., Cashmore, A. R. (1995). Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science*, 269(5226), 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2686–2690.
- Liscum, E. und Briggs, W. R. (1995). Mutations in the NPH1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. *The Plant Cell*, 7(4), 473–485.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 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(5907), 1535–1539.
- Liu, Q., Su, T., He, W., Ren, H., Liu, S., Chen, Y., Gao, L., Hu, X., Lu, H., Cao, S., Huang, Y., Wang, X., Wang, Q., Lin, C. (2020). Photooligomerization Determines Photosensitivity and Photoreactivity of Plant Cryptochromes. *Molecular Plant*, 13(3), 398–413.
- 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. *Nature Communications*, 8, 15234.
- Liu, S., Zhang, L., Gao, L., Chen, Z., Bie, Y., Zhao, Q., Zhang, S., Hu, X., Liu, Q., Wang, X., Wang, Q. (2022). Differential photoregulation of the nuclear and cytoplasmic CRY1 in Arabidopsis. *New Phytologist*, 234(4), 1332–1346.

- Luther, D. C., Jeon, T., Goswami, R., Nagaraj, H., Kim, D., Lee, Y. W., Rotello, V. M. (2021). Protein Delivery: If Your GFP (or Other Small Protein) Is in the Cytosol, It Will Also Be in the Nucleus. *Bioconjugate Chemistry*, 32(5), 891-896.
- 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. *The Plant Cell*, 13(12), 2589–2607.
- Ma, L. und Li, G. (2019). Auxin-dependent cell elongation during the shade avoidance response. *Frontiers in Plant Science*, 10, 914.
- Ma, L., Guan, Z., Wang, Q., Yan, X., Wang, J., Wang, Z., Cao, J., Zhang, D., Gong, X., Yin, P. (2020a). Structural insights into the photoactivation of *Arabidopsis* CRY2. *Nature Plants*, 6(12), 1432–1438.
- Ma, L., Jia, H., Shen, A. lan, Ding, J., Wang, X., Wang, J., Wan, J., Yan, J., Zhang, D., Dong, X., Yin, P. (2023). Two determinants influence CRY2 photobody formation and function. *Plant Biotechnology Journal*, 21(3), 460–462.
- Ma, L., Wang, X., Guan, Z., Wang, L., Wang, Y., Zheng, L., Gong, Z., Shen, C., Wang, J., Zhang, D., Liu, Z., Yin, P. (2020b). Structural insights into BIC-mediated inactivation of *Arabidopsis* cryptochrome 2. *Nature Structural and Molecular Biology*, 27(5), 472–479.
- 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*, 34(20), 6892–6899.
- Maruri-López, I., Figueroa, N. E., Hernández-Sánchez, I. E., Chodasiewicz, M. (2021). Plant Stress Granules: Trends and Beyond. *Frontiers in Plant Science*, 12 :722643.
- Mas, P., Devlin, P. F., Panda, S., Kay, S. A. (2000). Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature*, 408(6809), 207–211.
- 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(6966), 567–570.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis*

- thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, 23;282(5389):662, 679-82.
- Michalski, C., (2017). Dissertation, Die Rolle von AGD12 bei phototroper und gravitroper Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana*. Philipps-Universität Marburg.
- Miao, L., Zhao, J., Yang, G., Xu, P., Cao, X., Du, S., Xu, F., Jiang, L., Zhang, S., Wei, X., Liu, Y., Chen, H., Mao, Z., Guo, T., Kou, S., Wang, W., Yang, H. Q. (2022). Arabidopsis cryptochrome 1 undergoes COP1 and LRBs-dependent degradation in response to high blue light. *New Phytologist*, 234(4), 1347–1362.
- Michael, A. K., Fribourgh, J. L., Van Gelder, R. N., Partch, C. L. (2017). Animal Cryptochromes: Divergent Roles in Light Perception, Circadian Timekeeping and Beyond. *Photochemistry and Photobiology*, 93(1), 128.
- Miki, D., Zhang, W., Zeng, W., Feng, Z., Zhu, J. K. (2018). CRISPR/Cas9-mediated gene targeting in *Arabidopsis* using sequential transformation. *Nature Communications*, 9(1), 1–9.
- Mo, W., Zhang, J., Zhang, L., Yang, Z., Yang, L., Yao, N., Xiao, Y., Li, T., Li, Y., Zhang, G., Bian, M., Du, X., Zuo, Z. (2022). *Arabidopsis* cryptochrome 2 forms photobodies with TCP22 under blue light and regulates the circadian clock. *Nature Communications*, 13(1), 2631, 1–15.
- 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. *Development*, 126(10), 2073–2082.
- Müller, P. und Ahmad, M. (2011). Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21033–21040.
- Müller, P., Ignatz, E., Kiontke, S., Brettel, K., Essen, L.-O. (2018). Sub-nanosecond tryptophan radical deprotonation mediated by a protein-bound water cluster in class II DNA photolyases. *Chemical Science*, 9(5), 1200-1212.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*, 155(C), 335–350.

- Nagahara, N. (2011). Intermolecular disulfide bond to modulate protein function as a redox-sensing switch. *Amino Acids*, 41(1), 59–72.
- Nakamura, S., Mano, S., Tanaka, Y., Ohnishi, M., Nakamori, C., Araki, M., Niwa, T., Nishimura, M., Kaminaka, H., Nakagawa, T., Sato, Y., Ishiguro, S. (2010). Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 74(6), 1315–1319.
- Neff, M. M. und Chory, J. (1998). Genetic Interactions between Phytochrome A, Phytochrome B, and Cryptochrome 1 during Arabidopsis Development. *Plant Physiology*, 118(1), 27–35.
- 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(3), 331–340.
- Ni, M., Tepperman, J. M., Quail, P. H. (1999). Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature*, 400(6746), 781–784.
- Ni, W., Xu, S. L., González-Grandío, E., Chalkley, R. J., Huhmer, A. F. R., Burlingame, A. L., Wang, Z.-Y., Quail, P. H. (2017). PPKs mediate direct signal transfer from phytochrome photoreceptors to transcription factor PIF3. *Nature Communications*, 8(1), 15236, 1–11.
- Niemann, N. (2021). Dissertation, Aktivierung und Deaktivierung von Cryptochrom 1 aus *Arabidopsis thaliana*. Philipps-Universität Marburg.
- Nolan, T. M., Vukasinović, N., Liu, D., Russinova, E., Yin, Y. (2020). Brassinosteroids: Multidimensional Regulators of Plant Growth, Development, and Stress Responses. *The Plant Cell*, 32(2), 295–318.
- Nothnagel, H. J., Preimesberger, M. R., Pond, M. P., Winer, B. Y., Adney, E. M., Lecomte, J. T. J. (2011). Chemical reactivity of Synechococcus sp. PCC 7002 and Synechocystis sp. PCC 6803 hemoglobins: Covalent heme attachment and bishistidine coordination. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16(4), 539–552.
- 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

*America*, 101(8), 2223–2228.

- Oravec, A., Baumann, A., Máté, Z., Brzezinska, A., Molinier, J., Oakeley, E. J., Adam, E., Schäfer, E., Nagy, F., Ulm, R. (2006). CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18(8), 1975–1990.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 292(31), 12906–12920.
- Osterlund, M. T. und Deng, X. W. (1998). Multiple photoreceptors mediate the light-induced reduction of GUS-COP1 from Arabidopsis hypocotyl nuclei. *The Plant Journal*, 16(2), 201–208.
- Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Ning, W., Deng, X. W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature*, 405(6785), 462–466.
- Owens, C. P., Du, J., Dawson, J. H., Goulding, C. W. (2012). Characterization of heme ligation properties of Rv0203, a secreted heme binding protein involved in Mycobacterium tuberculosis heme uptake. *NIH Public Access. Biochemistry*, 51(7), 1518–1531.
- Pacín, M., Legris, M., Casal, J. J. (2013). COP1 re-accumulates in the nucleus under shade. *The Plant Journal*, 75(4), 631–641.
- Palayam, M., Ganapathy, J., Guercio, A. M., Tal, L., Deck, S. L., Shabek, N. (2021). Structural insights into photoactivation of plant Cryptochrome-2. *Communications Biology*, 4(1), 1–11.
- Park, E., Kim, Y., Choi, G. (2018). Phytochrome B requires PIF degradation and sequestration to induce light responses across a wide range of light conditions. *Plant Cell*, 30(6), 1277–1292.
- Parks, B. M. und Quail, P. H. (1993). hy8, a new class of arabidopsis long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell*, 5(1), 39–48.
- Payne, G. und Sancar, A. (1990). Absolute action spectrum of E-FADH2 and E-FADH2-MTHF forms of Escherichia coli DNA photolyase. *Biochemistry*, 29(33), 7715–7727.
- Pedmale, U. V., Huang, S. S. C., Zander, M., Cole, B. J., Hetzel, J., Ljung, K., Reis, P. A. B.,

- Sridevi, P., Nito, K., Nery, J. R., Ecker, J. R., Chory, J. (2016). Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell*, 164(1–2), 233–245.
- Piovesan, D., Monzon, A. M., Tosatto, S. C. E. (2022). Intrinsic Protein Disorder, Conditional Folding and AlphaFold2. *BioRxiv*, 2022.03.03.482768.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 21023–21027.
- Pond, A. E., Roach, M. P., Sono, M., Rux, A. H., Franzen, S., Hu, R., Thomas, M. R., Wilks, A., Dou, Y., Ikeda-Saito, M., Ortiz de Montellano, P. R., Woodruff, W. H., Boxer, S. G., Dawson, J. H. (1999). Assignment of the heme axial ligand(s) for the ferric myoglobin (H93G) and heme oxygenase (H25A) cavity mutants as oxygen donors using magnetic circular dichroism. *Biochemistry*, 38(23), 7601–7608.
- Ponnu, J. und Hoecker, U. (2021). Illuminating the COP1/SPA Ubiquitin Ligase: Fresh Insights Into Its Structure and Functions During Plant Photomorphogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 12, 486; 12:662793.
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S., Matthies, H. (1975). A reliable micromethod for determining the protein content in tissue material. *Acta Biologica et Medica Germanica*, 34(9), 1441–1446.
- Poulos, T. L. (2014). Heme Enzyme Structure and Function. *Chemical Reviews*, 114(7), 3919.
- Qiu, Y., Pasoreck, E. K., Reddy, A. K., Nagatani, A., Ma, W., Chory, J., Chen, M. (2017). Mechanism of early light signaling by the carboxy-terminal output module of *Arabidopsis* phytochrome B. *Nature Communications*, 8(1), 1905, 1–17.
- Quail, P. H. (2010). Phytochromes. *Current Biology*, 20(12), 504-507.
- Quail, P. H. (1997). An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell and Environment*, 20(6), 657–665.
- Raices, M. und D’Angelo, M. A. (2012). Nuclear pore complex composition: A new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,

13, 687-699.

- Rasch, D. und Guiard, V. (2004). The robustness of parametric statistical methods. *Psychology Science*, 46(2), 175–208.
- Ravanfar, R. und Abbaspourrad, A. (2021). Monitoring the heme iron state in horseradish peroxidase to detect ultratrace amounts of hydrogen peroxide in alcohols. *RSC Advances*, 11(17), 9901–9910.
- Reed, J. W., Nagpal, P., Poole, D. S., Furuya, M., Chory, J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout Arabidopsis development. *The Plant Cell*, 5(2), 147–157.
- Rice, S. L., Preimesberger, M. R., Johnson, E. A., Lecomte, J. T. J. (2014). Introduction of a covalent histidine–heme linkage in a hemoglobin: A promising tool for heme protein engineering. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 141, 198.
- 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(6025), 103–106.
- Rödel, E. (1971). Fisher, R. A.: Statistical Methods for Research Workers, 14. Aufl., Oliver & Boyd, Edinburgh, London 1970. XIII, 362 S., 12 Abb., 74 Tab., 40 s. *Biometrical journal*, 13(6), 429–430.
- Rodríguez-López, N., J., Lowe, D. J., Hernández-Ruiz, J., Hiner, A. N. P., García-Cánovas, F., Thorneley, R. N. F. (2001). Mechanism of Reaction of Hydrogen Peroxide with Horseradish Peroxidase: Identification of Intermediates in the Catalytic Cycle. *Am. Chem. Soc*, 123, 48, 11838–11847.
- Rodríguez-Roldán, V., García-Heredia, J. M., Navarro, J. A., Hervás, M., la Cerda, B. De, Molina-Heredia, F. P., De la Rosa, M. A. (2006). A comparative kinetic analysis of the reactivity of plant, horse, and human respiratory cytochrome c towards cytochrome c oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(3), 1108–1113.
- Rosenfeldt, G., Viana, R. M., Mootz, H. D., Von Arnim, A. G., Batschauer, A. (2008). Chemically induced and light-independent cryptochrome photoreceptor activation. *Molecular Plant*, 1(1), 4–14.

- 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*, 39(31), 9401-9410.
- Sancar, A. (2003). Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors, *Chem. Rev*, 103(6), 2203-2238.
- 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. *The Plant Cell*, 17(5), 1569–1584.
- Sarid-Krebs, L., Panigrahi, K. C. S., Fornara, F., Takahashi, Y., Hayama, R., Jang, S., Tilmes, V., Valverde, F., Coupland, G. (2015). Phosphorylation of CONSTANS and its COP1-dependent degradation during photoperiodic flowering of Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 84(3), 451–463.
- 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(10), 2561–2572.
- Schwinn, K., Ferré, N., Huix-Rotllant, M. (2020). UV-visible absorption spectrum of FAD and its reduced forms embedded in a cryptochrome protein. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(22), 12447–12455.
- Scott, N. L., Xu, Y., Shen, G., Vuletich, D. A., Falzone, C. J., Li, Z., Ludwig, M., Pond, M. P., Reimesberger, M. R., Bryant, D. A., Lecomte, J. T. J. (2010). Functional and structural characterization of the 2/2 Hemoglobin from *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Biochemistry*, 49(33), 7000–7011.
- Selby, C. P. und Sancar, A. (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(47), 17696-17700.
- Serna, L. (2005). A simple method for discriminating between cell membrane and cytosolic proteins. *New Phytologist*, 165(3), 947–952.
- Severance, S. und Hamza, I. (2009). Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. *Chemical Reviews*, 109(10), 4596–4616.

- Shalitin, D., Yu, X., Maymon, M., Mockler, T., Lin, C. (2003). Blue Light-Dependent in Vivo and in Vitro Phosphorylation of Arabidopsis Cryptochrome 1. *Plant Cell*, 15(10), 2421–2429.
- Shao, K., Zhang, X., Li, X., Hao, Y., Huang, X., Ma, M., Zhang, M., Yu, F., Liu, H., Zhang, P. (2020). The oligomeric structures of plant cryptochromes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(5), 480–488.
- Sharma, P., Chatterjee, M., Burman, N., Khurana, J. P. (2014). Cryptochrome 1 regulates growth and development in Brassica through alteration in the expression of genes involved in light, phytohormone and stress signalling. *Plant, Cell & Environment*, 37(4), 961–977.
- Shatn, 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(6890), 763–767.
- Shaw, P. J. und Brown, J. W. (2004). Plant nuclear bodies. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(6), 614-620.
- Shinomura, T. (1997). Phytochrome regulation of seed germination. *Journal of Plant Research*, 110(1), 151–161.
- Sinclair, P. R., Gorman, N., Jacobs, J. M. (1999). Measurement of Heme Concentration. *Current Protocols in Toxicology*, 00(1); Chapter 8, Unit 8.3.
- Student. (1908). The Probable Error of a Mean. *Biometrika*, 6(1), 1.
- Su, J., Liu, B., Liao, J., Yang, Z., Lin, C., Oka, Y. (2017). Coordination of cryptochrome and phytochrome signals in the regulation of plant light responses. *Agronomy*, 7(1), 25.
- Sullivan, S., Thomson, C. E., Lamont, D. J., Jones, M. A., Christie, J. M. (2008). In Vivo Phosphorylation Site Mapping and Functional Characterization of Arabidopsis Phototropin 1. *Molecular Plant*, 1(1), 178–194.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(49), 15130–15135.

- Takemiya, A., Inoue, S. I., Doi, M., Kinoshita, T., Shimazaki, K. I. (2005). Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell*, *17*(4), 1120–1127.
- Talbott, L. D., Hammad, J. W., Harn, L. C., Nguyen, V. H., Patel, J., Zeiger, E. (2006). Reversal by Green Light of Blue Light-stimulated Stomatal Opening in Intact, Attached Leaves of Arabidopsis Operates Only in the Potassium-dependent, Morning Phase of Movement. *Plant and Cell Physiology*, *47*(3), 332–339.
- Tao, Y., Ferrer, J. L., Ljung, K., Pojer, F., Hong, F., Long, J. A., Li, L., Moreno, J. E., Bowman, M. E., Ivans, L. J., Cheng, Y., Lim, J., Zhao, Y., Ballarè, C. L., Sandberg, G., Noel, J. P., Chory, J. (2008). Rapid Synthesis of Auxin via a New Tryptophan-Dependent Pathway Is Required for Shade Avoidance in Plants. *Cell*, *133*(1), 164–176.
- Tezcan, F. A., Winkler, J. R., Gray, H. B. (1998). Effects of ligation and folding on reduction potentials of heme proteins. *Journal of the American Chemical Society*, *120*(51), 13383–13388.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, *408*(6814), 796–815.
- Torres, M. A., Jones, J. D. G., Dangl, J. L. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*, *141*(2), 373.
- Towbin, H., Staehelint, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Biochemistry*, *76*(9), 4350–4354.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., Coupland, G. (2004). Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science*, *303*(5660), 1003–1006.
- Van Buskirk, E. K., Reddy, A. K., Nagatani, A., Chen, M. (2014). Photobody Localization of Phytochrome B Is Tightly Correlated with Prolonged and Light-Dependent Inhibition of Hypocotyl Elongation in the Dark. *Plant Physiology*, *165*(2), 595–607.
- 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.
- Vanhee, C., Zapotoczny, G., Masquelier, D., Ghislain, M., Batoko, H. (2011). The *Arabidopsis* multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism. *Plant Cell*, 23(2), 785–805.
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., *et al.* (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444.
- Varnado, C. L. und Goodwin, D. C. (2004). System for the expression of recombinant hemoproteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 35(1), 76–83.
- Vidossich, P., Alfonso-Prieto, M., Rovira, C. (2012). Catalases versus peroxidases: DFT investigation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation in models systems and implications for heme protein engineering. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 292–297.
- Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 103(1), 157–167.
- 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 Journal*, 33(5), 949–956.
- Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T., Vierstra, R. D. (2005). A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature*, 438(7066), 325–331.
- Wagner, M. (1964). Eine Methode für den direkten Nachweis von Desoxyribonukleasen nach Elektrophorese in Agargel. *Journal of Chromatography A*, 15(C), 107–108.
- Wang, J., Du, X., Pan, W., Wang, X., Wu, W. (2015a). Photoactivation of the cryptochrome/photolyase superfamily. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 22, 84–102.
- Wang, N., Miller, C. J., Wang, P., Waite, T. D. (2017a). Quantitative determination of trace hydrogen peroxide in the presence of sulfide using the Amplex Red/horseradish

- peroxidase assay. *Analytica Chimica Acta*, 963, 61–67.
- 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. (2015b). The blue light-dependent phosphorylation of the CCE domain determines the photosensitivity of Arabidopsis CRY2. *Molecular Plant*, 8(4), 631–643.
- Wang, Q. und Lin, C. (2020a). A structural view of plant CRY2 photoactivation and inactivation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(5), 401–403.
- Wang, Q. und Lin, C. (2020b). Mechanisms of Cryptochrome-Mediated Photoresponses in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 71, 103-129.
- 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(6310), 343–347.
- Wang, R. und Brattain, M. G. (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS Letters*, 581(17), 3164-3170.
- Wang, X., Jiang, B., Gu, L., Chen, Y., Mora, M., Zhu, M., Noory, E., Wang, Q., Lin, C. (2021). A photoregulatory mechanism of the circadian clock in *Arabidopsis*. *Nature Plants*, 7(10), 1397–1408.
- Wang, X., Wang, Q., Han, Y.-J., Liu, Q., Gu, L., Yang, Z., Su, J., Liu, B., Zuo, Z., He, W., Wang, J., Liu, B., Matsui, M., Kim, J.-I., Oka, Y., Lin, C. (2017b). A CRY-BIC negative-feedback circuitry regulating blue light sensitivity of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 92(3), 426–436.
- Weidler, G., Oven-Krockhaus, S. Zur, 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. *The Plant Cell*, 24(6), 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. *The Plant Cell*, 5(7), 757–768.

- Whitmarsh, J. und Govindjee. (1999). The Photosynthetic Process. In *Concepts in Photobiology* (pp. 11–51). Springer Netherlands.
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 278–286.
- Woodard, S. I. und Dailey, H. A. (1995). Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 316(1), 110–115.
- Wu, G. und Spalding, E. P. (2007). Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18813–18818.
- 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(5), 815–827.
- Yang, Z., Yan, B., Dong, H., He, G., Zhou, Y., Sun, J. (2021). BIC 1 acts as a transcriptional coactivator to promote brassinosteroid signaling and plant growth. *The EMBO Journal*, 40(1), e104615.
- Yeh, K. C. und Lagarias, J. C. (1998). Eukaryotic phytochromes: Light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13976–13981.
- Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T., Lagarias, J. C. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*, 277(5331), 1505–1508.
- Yi, C. und Deng, X. W. (2005). COP1 - From plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends in Cell Biology*, 15(11), 618-625.
- Yin, V., Shaw, G. S., Konermann, L. (2017). Cytochrome c as a Peroxidase: Activation of the Precatalytic Native State by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Covalent Modifications. *Journal of the American Chemical Society*, 139(44), 15701–15709.
- Young, P. R. (1989). An improved method for the detection of peroxidase-conjugated antibodies on immunoblots. *Journal of Virological Methods*, 24(1–2), 227–235.
- 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. *The Plant Cell*, 21(1), 118–130.
- Yu, Z., Ma, J., Zhang, M., Li, X., Sun, Y., Zhang, M., Ding, Z. (2023). Auxin promotes hypocotyl elongation by enhancing BZR1 nuclear accumulation in *Arabidopsis*. *Science Advances*, 9(1), eade2493.
- Zhang, X. N., Wu, Y., Tobias, J. W., Brunk, B. P., Deitzer, G. F., Liu, D. (2008). HFR1 is crucial for transcriptome regulation in the cryptochrome 1-mediated early response to blue light in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 3(10), e3563.
- 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. *Current Biology*, 21(10), 841-847.

## 8 Anhang

### 8.1 Aminosäuresequenzen und DNA-Sequenzen verwendeter Konstrukte

Alle BIC1-Konstrukte wurden durch Test-Restriktionsverdaue und Sequenzierungen verifiziert. BIC1 in binären Vektoren für stabile Transformation von *A. thaliana*:

#### BIC1<sup>WT</sup> in pDONR221

```
atgccaaactttgtacaaaaaagcaggctccatgaatatcgacgacaccacctctccaatggctcatcctattggaccttc
tcagcctcctagcgatcagactaagcaagatcctccatcactccctcaagaggctgcttcttctgtgtctgctgataaga
aggatctcgccctccttgaagagaagccgaagcaatctcaagaagaggacagagttgataccggacgtgagagactcaag
aagcacagaagagagatcgctgggagagtttggattcctgagatttgggacaagaggaactcctcaaggattggatcga
ctgctctaccttcgatacttgcttgtgctgctgggatctcttctgctagaaactgctcttgttgaagaggctaggcgtg
ctgcttctgcttctggaggacttcataacagatgcctcatcctcagggacccagcttcttgtacaaagtggcattata
agaaagcattgcttatcaatttgttgaacgaacaggtcactatcagtcaaaaataaaatcattatttgcatccagctga
tatcccctatagtgagtcgtattacatgggtcatagctgtttcctggcagctctggcccgtgtctcaaaatctctga
```

#### Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> in pDONR221

```
MPTLYKKAGSMNIDDTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHR
REIAGRVIPEIWIWQEELLKDWIDCSTFDTCLVPAGISSARTALVEEARRAASASGGLHNRCLILRDP AFLYKVGIIIRKHCLS
ICCNEQVTISQNKIIICH PADIPYSESYYMVIASVSWQLWFPVSQL*
```

#### BIC1<sup>3CA</sup> in pDONR221

```
ATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGAATATCGACGACACCACCTCTCCAATGGCTCATCCTATTGGACCTTC
TCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAAGATCCTCCATCACTCCCTCAAGAGGCTGCTTCTTCTGTGTCTGCTGATAAGA
AGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCCGAAGCAATCTCAAGAAGAGGACAGAGTTGATACCGGACGTGAGAGACTCAAG
AAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAGTTTGGATTCTTGAGATTTGGGACAAGAGGAACTCCTCAAGGATTGGATCGA
CGTTCTACCTTCGATACTGCTCTTGTGCTGCTGGGATCTCTTCTGCTAGAACTGCTCTTGTGTTGAAGAGGCTAGGCGTG
CTGCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAACAGAGCTCTCATCCTCAGGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTATA
AGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGA
TATCCCCTATAGTGAGTCGTATTACATGGTCATAGCTGTTTCTGGCAGCTCTGGCCCGTGTCTCAAAATCTCTGA
```

#### Aminosäuresequenz von BIC1<sup>3CA</sup> in pDONR221

```
MPTLYKKAGSMNIDDTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHR
REIAGRVIPEIWIWQEELLKDWIDASTFDTALVPAGISSARTALVEEARRAASASGGLHNRALILRDP AFLYKVGIIIRKHCLS
ICCNEQVTISQNKIIICH PADIPYSESYYMVIASVSWQLWFPVSQL*
```

## BIC1<sup>WT</sup> in pGWB614

ATGAATATCGACGACACCACCTCTCCAATGGCTCATCCTATTGGACCTTCTCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAAGA  
TCCTCCATCACTCCCTCAAGAGGCTGCTTCTTCTGTGTCTGCTGATAAGAAGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCCGA  
AGCAATCTCAAGAAGAGGACAGAGTTGATAACCGGACGTGAGAGACTCAAGAAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAGTT  
TGGATTCTGAGATTTGGGGACAAGAGGAACCTCAAGGATTGGATCGACTGCTCTACCTTCGATACTTGCTTGTGCC  
TGCTGGGATCTTCTGCTAGAAGTCTCTTGTGAAGAGGCTAGGCGTGCTGCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAACA  
GATGCCTCATCCTCAGGGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTTGATAACAGCGGGTTAATTAACATCTTTTACCCATAC  
GATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGC  
TGCTCAGTGCAGCGCTTAG

## Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> in pGWB614

MNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHREIAGRVI  
PEI  
WQEEELLDKDWIDCSTFDTCLVPAGISSARTALVEEARRAASASGGLHNRCLILRDPAFLYKVVVNSGLINIFYPYDVPDYA  
GYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAAQCSA\*

## BIC1<sup>WT</sup> in pGBW615

ATGAGCGGGTTAATTAACATCTTTTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGC  
AGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCAGCGCTGTTATCACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT  
CCATGAATATCGACGACACCACCTCTCCAATGGCTCATCCTATTGGACCTTCTCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAA  
GATCCTCCATCACTCCCTCAAGAGGCTGCTTCTTCTGTGTCTGCTGATAAGAAGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCC  
GAAGCAATCTCAAGAAGAGGACAGAGTTGATAACCGGACGTGAGAGACTCAAGAAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAG  
TTTGGATTCTGAGATTTGGGGACAAGAGGAACCTCAAGGATTGGATCGACTGCTCTACCTTCGATACTTGCTTGTG  
CCTGCTGGGATCTTCTGCTAGAAGTCTTGTGAAGAGGCTAGGCGTGCTGCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAA  
CAGATGCCTCATCCTCAGGGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATAACCTAG

## Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> in pGBW615

MSGLINIFYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAAQCSAVITSLYKKGSMNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPP  
SLPQEAASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHREIAGRVI  
PEI  
WQEEELLDKDWIDCSTFDTCLVPAGISS  
ARTALVEEARRAASASGGLHNRCLILRDPAFLYKVVIT\*

## BIC1<sup>WT</sup> in pUBNV341

atgtaccatacagatgttctgactatgccccgctatccctatgacgtcccggactatgcaggatcctatccatagcgt  
tccagattacgctgctcagtgccaattgttaatcacaagtttgtacaaaaagcAGGCTCCATGAATATCGACGACACCA  
CCTCTCCAATGGCTCATCCTATTGGACCTTCTCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAAGATCCTCCATCACTCCCTCAA  
GAGGCTGCTTCTTCTGTGTCTGCTGATAAGAAGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCCGAAGCAATCTCAAGAAGAGGA  
CAGAGTTGATACCGGACGTGAGAGACTCAAGAAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAGTTTGGATTCTGAGATTTGGG  
GACAAGAGGAACCTCTCAAGGATTGGATCGACTGCTCTACCTTCGATACTTGCTTGTGCTGCTGGGATCTCTTCTGCT  
AGAAGTCTTGTGAAGAGGCTAGGCGTGCTGCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAACAGATGCCTCATCCTCAGGGA  
CCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATTAAGCGCCATGCTAG

## Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> in pUBNV341

MYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAAQCQLLITSLYKKGSMNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEA  
SSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHREIAGRVI  
PEI  
WQEEELLDKDWIDCSTFDTCLVPAGISSARTALVE  
EARRAASASGGLHNRCLILRDPAFLYKVVIKRPC\*

## BIC1<sup>WT</sup> in pUBCV386

ATGAATATCGACGACACCACCTCTCCAATGGCTCATCCTATTGGACCTTCTCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAAGA  
TCCTCCATCACTCCCTCAAGAGGCTGCTTCTTCTGTGTCTGCTGATAAGAAGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCCGA  
AGCAATCTCAAGAAGAGGACAGAGTTGATACCGGACGTGAGAGACTCAAGAAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAGTT  
TGGATTCTGAGATTTGGGGACAAGAGGAACCTCAAGGATTGGATCGACTGCTCTACCTTCGATACTTGCTTGTGCC  
TGCTGGGATCTTCTGCTAGAAGTCTTGTGTTGAAGAGGCTAGGCGTGCTGCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAACA  
GATGCCTCATCCTCAGGGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATGGGACGTCCGCGGAGATCTACGCGTGTGACTCG  
AGATATCCAAC TAGTATGTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATC  
CTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCTAA

## Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> in pUBCV386

MNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHRREIAGRVI  
PEI  
EWGQEELLKDWIDCSTFDTCLVPAGISSARTALVEEARRAASASGGLHNRCLILRDPAFLYKVVVMGRPRRSTRVDSRYPTSM  
YPYDVPDYAGYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAAQC\*

## BIC1<sup>3CA</sup> in pUBNV341

ATGTACCCATACGATGTTCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGACTATGCAGGATCCTATCCATATGACGT  
TCCAGATTACGCTGCTCAGTGCCAATTGTTAATCACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCATGAATATCGACGACACCA  
CCTCTCCAATGGCTCATCCTATTGGACCTTCTCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAAGATCCTCCATCACTCCCTCAA  
GAGGCTGCTTCTTCTGTGTCTGCTGATAAGAAGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCCGAAGCAATCTCAAGAAGAGGA  
CAGAGTTGATACCGGACGTGAGAGACTCAAGAAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAGTTTGGATTCTGAGATTTGGG  
GACAAGAGGAACCTCAAGGATTGGATCGACGCTTCTACCTTCGATACTGCTCTTGTGCCTGCTGGGATCTCTTCTGCT  
AGAACTGCTCTTGTGTTGAAGAGGCTAGGCGTGCTGCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAACAGAGCTCTCATCCTCAGGGA  
CCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATTAAGCGGCCATGCTAG

## Aminosäuresequenz von BIC1<sup>3CA</sup> in pUBNV341

MYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAAQCQLLITSLYKKAGSMNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEA  
ASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHRREIAGRVIPEI  
EWGQEELLKDWIDASTFDTALVPAGISSARTALVE  
EARRAASASGGLHNRALLILRDPAFLYKVVIKRPC\*

## BIC1 in binären Vektoren für transiente Proteinexpression:

### BIC1<sup>WT</sup> in pUBC-GFP-Dest V049

ATGAATATCGACGACACCACCTCTCCAATGGCTCATCCTATTGGACCTTCTCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAAGA  
TCCTCCATCACTCCCTCAAGAGGCTGCTTCTTCTGTGTCTGCTGATAAGAAGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCCGA  
AGCAATCTCAAGAAGAGGACAGAGTTGATAACCGGACGTGAGAGACTCAAGAAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAGTT  
TGGATTCTGAGATTGGGGACAAGAGGAACCTCAAGGATTGGATCGACTGCTCTACCTTCGATACTGCCTTGTGCC  
TGCTGGGATCTCTTCTGCTAGAACTGCTCTTGTGTAAGAGGCTAGGCGT  
GCTGCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAACAGATGCCTCATCCTCAGGGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATGGG  
ACGTCGCGGAGATCTACGCGTGTGACTCGAGATATCCAATAAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGG  
TGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC  
ACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCT  
GACCTACGGCGTGCAGTGCTTACGCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCGATGCCCGAAG  
GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC  
ACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA  
TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACA  
TCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC  
AACCCTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCMNTGGTCTGCTGGAGTTCGTG  
A

### Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> in pUBC-GFP-Dest V049

MNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHREIAGRVIWIP  
EIWQEQEELLKDWIDCSTFDTCCLVPAGISSARTALVEEARRAASASGGLHNRCLILRDPAFLYKVVMMGRPRRSTRVDSRYPTSM  
VSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGDATYGLKTLKFICTTGKLPVPWPVTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDF  
FKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEKEDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFK  
IRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDXWSCWSS\*

### BIC1<sup>WT</sup> in pUBN-GFP-Dest V055

ATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGG  
CAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA  
AGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAG  
AAGAACGGCATCAAGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCA  
GAACACCCCATCGCGCAGCGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC  
CCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTAC  
AAGCAATTGTTAATCAAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCATGAATATCGACGACACCACCTCTCCAATGGCTCATCC  
TATTGGACCTTCTCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAAGATCCTCCATCACTCCCTCAAGAGGCTGCTTCTTCTGTGT  
CTGCTGATAAGAAGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCCGAAGCAATCTCAAGAAGAGGACAGAGTTGATAACCGGACGT  
GAGAGACTCAAGAAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAGTTGGATTCTGAGATTGGGGACAAGAGGAACCTCCTCAA  
GGATTGGATCGACTGCTCTACCTTCGATACTTGCTTGTGCTGCTGGGATCTCTTCTGCTAGAACTGCTCTTGTGTAAG  
AGGCTAGGCGT  
GCTGCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAACAGATGCCTCATCCTCAGGGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATTA  
CGGCCATGCTAG

### Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> in pUBN-GFP-Dest V055

MKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEKEDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNG  
IKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGITLGMDELYKQLLIT  
SLYKAGSMNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHREI  
IAGRVIWPEIHWQEQEELLKDWIDCSTFDTCCLVPAGISSARTALVEEARRAASASGGLHNRCLILRDPAFLYKVVIKRPC\*

## BIC1<sup>WT</sup> in pUBC-RFP-Dest V050

ATGAATATCGACGACACCACCTCTCCAATGGCTCATCCTATTGGACCTTCTCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAAGA  
TCCTCCATCACTCCCTCAAGAGGCTGCTTCTTCTGTGTCTGCTGATAAGAAGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCCGA  
AGCAATCTCAAGAAGAGGACAGAGTTGATACCGGACGTGAGAGACTCAAGAAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAGTT  
TGGATTCTGAGATTTGGGGACAAGAGGAACCTCAAGGATTGGATCGACTGCTCTACCTTCGATACTTGCTTTGTGCC  
TGCTGGGATCTCTTCTGCTAGAAGTCTCTTGTGTAAGAGGCTAGGCGT  
GCTGCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAACAGATGCCTCATCCTCAGGGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATGGG  
ACGTCCGCGGAGATCTACGCGTGTGACTCGAGATATCCAAGTAGTATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCA  
TGGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTAC  
GAGGCACCCAGACCCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGCGGCCCTTCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTT  
CCAGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCGAGGGCTTCA  
AGTGGGAGCGCGTGATGAAGTTCGAGGACGGCGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTC  
ATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGC  
CTCCACCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGATGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCC  
ACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGACAGTGCCTCCGCGCCTACAAGACCGACATCAAG  
CTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAGCGCSCCGAGGGCCG  
-Rest unbekannt

## Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> in pUBC-RFP-Dest V050

MNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHRREIAGRVI  
EIWGQEELLKDWIDCSTFDTCLVPAGISSARTALVEEARRAASASGGLHNRCLILRDPFLYKVVMMGRPRRSTRVDSRYPTSM  
ASSEVDVIKEFMRFKVRMEGVSNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFYGSKAYVKHPADIPDYLK  
LSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPMQKKTMGWEASTERMYPEDGALKGEIKMRLKL  
KDGHHYDAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITSHNEDYTIVEQYERXEGR\*

-Rest unbekannt; durch Restriktionsverdau bestätigt

## BIC1<sup>3CA</sup> in pUBC-RFP-Dest V050

ATGAATATCGACGACACCACCTCTCCAATGGCTCATCCTATTGGACCTTCTCAGCCTCCTAGCGATCAGACTAAGCAAGA  
TCCTCCATCACTCCCTCAAGAGGCTGCTTCTTCTGTGTCTGCTGATAAGAAGGATCTCGCCCTCCTTGAAGAGAAGCCGA  
AGCAATCTCAAGAAGAGGACAGAGTTGATACCGGACGTGAGAGACTCAAGAAGCACAGAAGAGAGATCGCTGGGAGAGTT  
TGGATTCTGAGATTTGGGGACAAGAGGAACCTCAAGGATTGGATCGACGCTTCTACCTTCGATACTGCTCTTGTGCC  
TGCTGGGATCTCTTCTGCTAGAAGTCTCTTGTGTAAGAGGCTAGGCGTGTCTTCTGCTTCTGGTGGACTTCATAACA  
GAGCTCTCATCCTCAGGGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTGATGGGACGTCGCGGAGATCTACGCGTGTGACTCG  
AGATATCCAAGTAGTATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGT  
GAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCCCAAGCTGAAGGTGA  
CCAAGGGCGGCCCTTCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCAGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCAC  
CCCGCGACATCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAAGTTCGAGGACGG  
CGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACT  
TCCCCTCCGACGGCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGC  
GCCCTGAAGGGCGAGATCAAGATGAGGCTGAAGTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACCTACAT  
GGCCAAGAAGCCCGTGACGTGCCCGCGCCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACA  
CCATCGTGGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGCTAA

## Aminosäuresequenz von BIC1<sup>3CA</sup> in pUBC-RFP-Dest V050

MNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAASSVSADKKDLALLEEKPKQSQEEDRVDTGRERLKKHRREIAGRVI  
WIPEIWGQEELLKDWIDASTFDTALVPAGISSARTALVEEARRAASASGGLHNRALILRDPFLYKVVMMGRPRRSTRVDSRYPT  
TSMASSEVDVIKEFMRFKVRMEGVSNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFYGSKAYVKHPADIPD  
YLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPSDGPMQKKTMGWEASTERMYPEDGALKGEIKMR  
LKLKDGHHYDAEVKTTYMAKKPVQLPGAYKTDIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGA\*

## Cryptochrome in pUGT Dest. Vektoren:

### pUGT1 *cry1*<sup>L407F</sup>

MSGSVSGCGSGGCSIVWFRDLRVEDNPALAAAVRAGPVIALFVWAPEEEGHYHPGRVSRWWLKNLSLAQLDSSLRSLGTCLIT  
KRSTDSVASLLDVVKSTGASQIFFNHLYDPLSLVRDHRAKDVLTAAQGIAVRSFNADLLYEPWEVTDELGRPFMSMFAAFWERCL  
SMPYDPESPLLPPKKIISGDVSKCVADPLVFEDDSEKGSNALLARAWSPGWSNGDKALTTFFINGPALLEYSKNRRKADSATTSE  
LSPXLHFGEVSVRKVFHLVRIKQVAWANEGNEAGEESVNLFLKSIGLREYSRYISFNHPYSHERPLLGHKFFPWAVDENYFK  
AWRQGRGTGYPLVDAGMRELWATGWLHDIRVWVSSFFVKVLQLPWRWGMKYFWDTLDDADLES DALGWQYITGTFPDSREFDR  
IDNPQFEGYKFDPNGEYVRRWLPPELSRLPTDWIHHPNAPESVLQAAGIELGSNYPLPIVGLDEAKARLHEALSQMWQLEAAS  
RAAIENGSEEGLGDSAEVEEAPIEFPRDITMEETEPTRLNPNRRYEDQMVPISITSSLIRPEEDEESSLNRNSVGDRAEVPR  
NMVNTNQAQQRRAPASNQVTAMIEFNIRIVAESTEDSTAESSSSGRRERSGGIVPEWSPGYSEQFPSEENGIGGGSTSSY  
LQNHHEILNWRRLSQTG\*

### pUGT1 *cry1*

MSGSVSGCGSGGCSIVWFRDLRVEDNPALAAAVRAGPVIALFVWAPEEEGHYHPGRVSRWWLKNLSLAQLDSSLRSLGTCLIT  
KRSTDSVASLLDVVKSTGASQIFFNHLYDPLSLVRDHRAKDVLTAAQGIAVRSFNADLLYEPWEVTDELGRPFMSMFAAFWERCL  
SMPYDPESPLLPPKKIISGDVSKCVADPLVFEDDSEKGSNALLARAWSPGWSNGDKALTTFFINGPALLEYSKNRRKADSATTSE  
LSPHLHFGEVSVRKVFHLVRIKQVAWANEGNEAGEESVNLFLKSIGLREYSRYISFNHPYSHERPLLGHKFFPWAVDENYFK  
AWRQGRGTGYPLVDAGMRELWATGWLHDIRVWVSSFFVKVLQLPWRWGMKYFWDTLDDADLES DALGWQYITGTL PDSREFDR  
IDNPQFEGYKFDPNGEYVRRWLPPELSRLPTDWIHHPNAPESVLQAAGIELGSNYPLPIVGLDEAKARLHEALSQMWQLEAAS  
RAAIENGSEEGLGDSAEVEEAPIEFPRDITMEETEPTRLNPNRRYEDQMVPISITSSLIRPEEDEESSLNRNSVGDRAEVPR  
NMVNTNQAQQRRAPASNQVTAMIEFNIRIVAESTEDSTAESSSSGRRERSGGIVPEWSPGYSEQFPSEENGIGGGSTSSY  
LQNHHEILNWRRLSQTG\*

### pUGT1 *cry2*

MKMDKKTIVWFRDLRIEDNPALAAAHEGSVFPVFIWCPEEEGQFYFGRASRWWMKQSLAHLSQLKALGSDLTLIKHTNTI  
SAILDCIRVTGATKVVFNHLYDPVSLVRDHTVKEKLVVERGISVQSYNGDLLYEPWEIYCEKKGKPFSTFNSYWKCLDMSIESV  
MLPPPWRMLPITAAAEAIWACSIIEELGLENEAEKPSNALLTRAWSPGWSNADKLLNEFIEKQLIDYAKNSKKVVGNSTSLSP  
YLHFGEISVRHVFQCARMKQI IWARDKNSEGEESADFLRIGLREYSRYICFNFPFTHEQSLLSHLRFFPWDADVDKFKAWR  
QGRGTGYPLVDAGMRELWATGMMHNRIRIVSSFAVKFLLL PWKGMKYFWDTLDDADLECDILGWQYISGSI PDGHELDRLDN  
PALQGAKYDPEGEYIRQWLPELARLPTEWIHHPWDAPLTVLKASGVELGTNYAKPIVDIDTARELLAKAISRTREAQIMIGAA  
PDEIVADSFALGANTIKEPGLCPSSVSSNDQQVPSAVRYNGSKRVKPEEEEEERDMKKS RGFDERELFSTAESSSSSVFFVQS  
SCSLASEGKNLEGIQDSSDQITTS LGKNGC\*

### pUGT2 *cry1*

MSGSVSGCGSGGCSIVWFRDLRVEDNPALAAAVRAGPVIALFVWAPEEEGHYHPGRVSRWWLKNLSLAQLDSSLRSLGTCLIT  
KRSTDSVASLLDVVKSTGASQIFFNHLYDPLSLVRDHRAKDVLTAAQGIAVRSFNADLLYEPWEVTDELGRPFMSMFAAFWERCL  
SMPYDPESPLLPPKKIISGDVSKCVADPLVFEDDSEKGSNALLARAWSPGWSNGDKALTTFFINGPALLEYSKNRRKADSATTSE  
LSPHLHFGEVSVRKVFHLVRIKQVAWANEGNEAGEESVNLFLKSIGLREYSRYISFNHPYSHERPLLGHKFFPWAVDENYFK  
AWRQGRGTGYPLVDAGMRELWATGWLHDIRVWVSSFFVKVLQLPWRWGMKYFWDTLDDADLES DALGWQYITGTL PDSREFDR  
IDNPQFEGYKFDPNGEYVRRWLPPELSRLPTDWIHHPNAPESVLQAAGIELGSNYPLPIVGLDEAKARLHEALSQMWQLEAAS  
RAAIENGSEEGLGDSAEVEEAPIEFPRDITMEETEPTRLNPNRRYEDQMVPISITSSLIRPEEDEESSLNRNSVGDRAEVPR  
NMVNTNQAQQRRAPASNQVTAMIEFNIRIVAESTEDSTAESSSSGRRERSGGIVPEWSPGYSEQFPSEENGIGGGSTSSY  
LQNHHEILNWRRLSQTG\*

## BIC1-Sequenzen für heterologe Proteinexpression in *E. coli*:

### BIC1<sup>WT</sup> in pET-28a (+) von *BIOCAT*

```
atgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcctgggtgccgcgcccagccatattggctagcatgactgggtgg  
acagcaaatgggtcgcgatccatgatgaacatcgatgataccaccagtcggatggccatccgattggccgagtcagc  
cgccgagtgatcagaccaaaccagaccctccgagcctgccgcaggaagccgcaagcagcgttagcgcggataaaaaagat  
ctggcactgctggaagaaaaaccgaaacagagtcaggaagaagatcgtgtggataccggtcgcgaaactctgaaaaaca  
tcgccgtgaaattgccggtcgtgtgtggattccggaatttggggtcaggaagaactgctgaaagattggattgattgta  
gtacctttgatacctgtctgggtgccgcgagcattagcagcgcactaccgactggttgaagaagcagtcgcccgc  
agcgcagtggtggtttacataatcgttgcctgattctgcgctaa
```

### Aminosäuresequenz von BIC1<sup>WT</sup> in pET-28a (+)

```
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSMNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAAASSVSADKKDLAL  
LEEKPKQSQEEDRVDTRERLKKHRREIAGRVIWPEIWQEEELLDKDWIDCSTFDTCLVPAGISSARTALVEEARRAASASGGL  
HNRCLILR*
```

### BIC1<sup>3CA</sup> in pET-28a (+) von *BIOCAT*

```
atgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcctgggtgccgcgcccagccatattggctagcatgactgggtgg  
acagcaaatgggtcgcgatccatgatgaacatcgatgataccaccagtcggatggccatccgattggccgagtcagc  
cgccgagtgatcagaccaaaccagaccctccgagcctgccgcaggaagccgcaagcagcgttagcgcggataaaaaagat  
ctggccctgctggaagaaaaaccgaaacagagccaggaagaagatcgtgtggataccgcccgtgaaactgaaaaaca  
tcgctcgcaaatgccggtcgtgtttggattccggaatttggggtcaggaagaactgctgaaagattggattgatgcaa  
gcacctttgataccgactggtgccgcgaggtattagtagcggccgaccgactggttgaagaagcccgtcgtgccgc  
agcgcagcgggtggtttacataatcgcgactgattctgcgctaa
```

### Aminosäuresequenz von BIC1<sup>3CA</sup> in pET-28a (+)

```
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSMNIDDTTSPMAHPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAAASSVSADKKDLAL  
LEEKPKQSQEEDRVDTRERLKKHRREIAGRVIWPEIWQEEELLDKDWIDASTFDTALVPAGISSARTALVEEARRAASASGGL  
HNRALLILR*
```

### BIC1<sup>H13A3CA</sup> in pET-28a (+) von *BIOCAT*

```
atgggcagtagtcatcatcatcatcaccatagtagcggctcgtggtcgcgcccggtagtcatattggcaagcatgaccggtgg  
ccagcagatgggtcgtggttagcatgatgaatattgatgataccaccagtcggatggccgaccgattggcccagccagc  
cgcttagtgatcagaccaaaccaggtaccgagcctgccgcaggaagcagcaagtagtgtagtgagataaaaaagat  
ctggcactgctggaagaaaaaccgaaacagagtcaggaagaagatcgcgcttgataccgcccgtgaaactgaaaaaca  
tcgccgtgaaattgccggtcgcggtgtggattccggaatttggggccaggaagaactgctgaaagattggattgatgcaa  
gcaccttcgataccgactggttccggccggtattagtagcggccgaccgactggttgaagaagcccgtcgtgccgc  
agcgcagtggtggtctgcataatcgtgcccctgattctgcgctaa
```

### Aminosäuresequenz von BIC1<sup>H13A3CA</sup> in pET-28a (+)

```
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSMNIDDTTSPMAAPIGPSQPPSDQTKQDPPSLPQEAAASSVSADKKDLAL  
LEEKPKQSQEEDRVDTRERLKKHRREIAGRVIWPEIWQEEELLDKDWIDASTFDTALVPAGISSARTALVEEARRAASASGGL  
HNRALLILR*
```

## 8.2 Anhang Abbildungen

Nr.	Accession	Description
DQ_070_Bt_1	POA6F5	60 kDa chaperonin OS=Escherichia coli (strain K12) GN=groL PE=1 SV=2
DQ_070_Bt_1	POA6Y8	Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (strain K12) GN=dnaK PE=1 SV=2
DQ_070_Bt_3	BIC	Heme
DQ_070_Bt_3	POAFY8	Negative modulator of initiation of replication OS=Escherichia coli (strain K12) GN=seqA PE=1 SV=1
DQ_070_Bt_3	P64588	Transcriptional regulator YqjI OS=Escherichia coli (strain K12) GN=yqjI PE=1 SV=1
DQ_070_Bt_3	POA9A9	Ferric uptake regulation protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=fur PE=1 SV=1
DQ_070_Bt_3	POAFX4	Regulator of sigma D OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rsd PE=1 SV=1
Nr.	Accession	Description
DQ_067_Bt-1	BIC1-GFP	BIC1-GFP

Coverage [%]	# Peptides	# PSMs	# Unique Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Sequest HT	# Peptides (by Search Engine)	Sequest HT
91	246	2571	246	548	57,3	4,94		9478,22		246
40	19	45	19	638	69,1	4,97		157,62		19
80	52	460	52	196	21,4	8,15		1506,14		52
63	10	53	10	181	20,3	8,7		172,92		10
64	20	71	20	207	23,4	6,74		194,48		20
56	19	109	19	148	16,8	6,11		335,41		19
36	10	74	10	158	18,2	6,02		210,85		10
Coverage [%]	# Peptides	# PSMs	# Unique Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Sequest HT	# Peptides (by Search Engine)	Sequest HT
65	35	956	2	388	43,6	6,48		2458,23		35

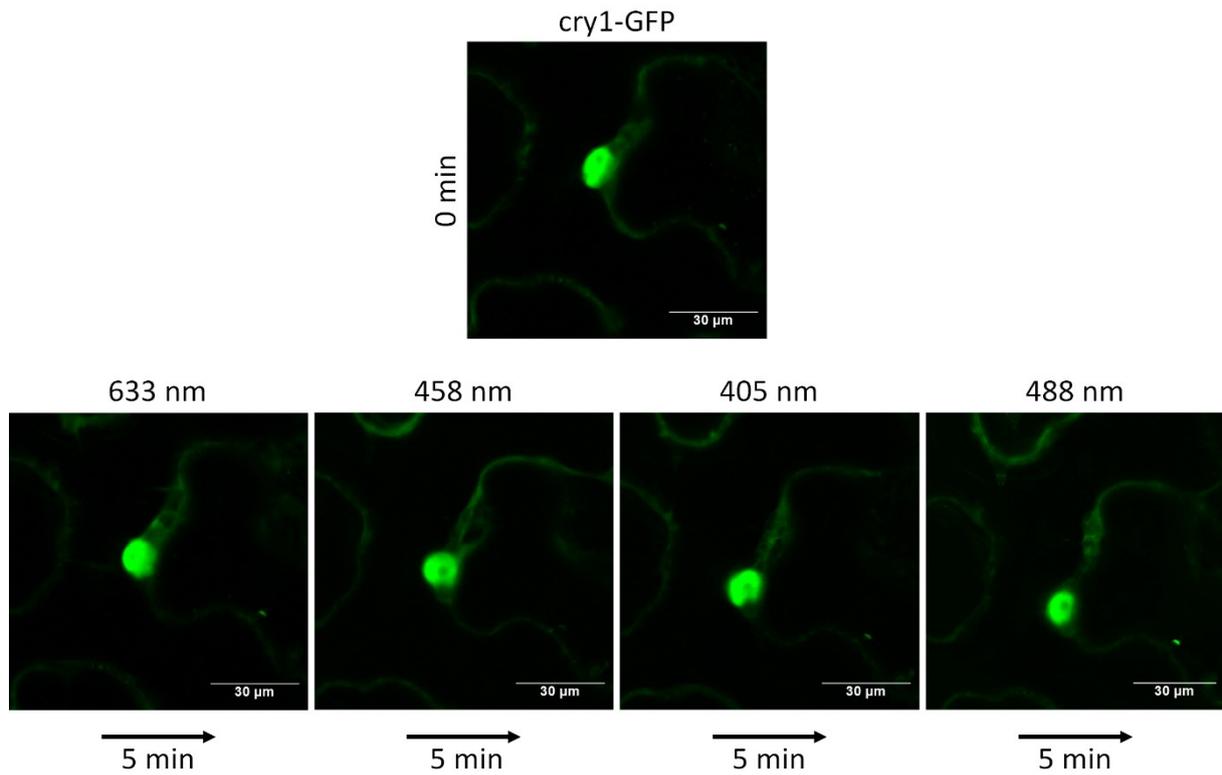
**Abb. Anhang 1: Ergebnisse Massenspektrometrie.** Vier Banden aus dem Coomassie gefärbten Gel der BIC1<sup>WT</sup> Aufreinigung (Abb. 17 B) wurden massenspektrometrisch untersucht (Fachbereich Chemie, Marburg). Die Banden wurden nach der Größe benannt, siehe erste Spalte. Die massenspektrometrischen Ergebnisse der BIC1<sup>WT</sup>-GFP Immunpräzipitation aus Abb. 20 sind in letzter Reihe angegeben.

Name	Datum Erzeugung	Generation	Anzahl Keimung Pfl.	Anzahl überlebende Pfl.	Überlebensrate (%)
Col-0	04.08.2014	Kontrolle	34	0	0,0
<i>cry1/cry2</i> (Col)	01.11.2016	Kontrolle	34	0	0,0
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>WT</sup> (2-140)	26.04.2019	F1	41	0	0,0
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>WT</sup> #22	22.07.2019	F2	45	42	93,3
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>WT</sup> #22.4	22.01.2020	F3	44	43	97,7
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>WT</sup> #22.4	14.05.2021	F4	43	43	100,0
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>WT</sup> #24	22.07.2019	F2	40	40	100,0
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>WT</sup> #24.1	23.01.2020	F3	42	40	95,2
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>WT</sup> #24.1	14.05.2021	F4	34	31	91,2
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>3CA</sup> #10	17.07.2020	F2	37	33	89,2
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>3CA</sup> #10.2	14.05.2021	F4	53	50	94,3
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>3CA</sup> #12.2	?	F3	49	42	85,7
Col-0 x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>3CA</sup> #12.2	14.05.2021	F4	48	47	97,9
<i>cry1/cry2</i> (Col) x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>WT</sup> #2.2	02.03.2022	F3	37	33	89,2
<i>cry1/cry2</i> (Col) x pUBV341->UBQ10::3x HA-BIC1 <sup>WT</sup> #3.1	02.03.2022	F3	32	26	81,3

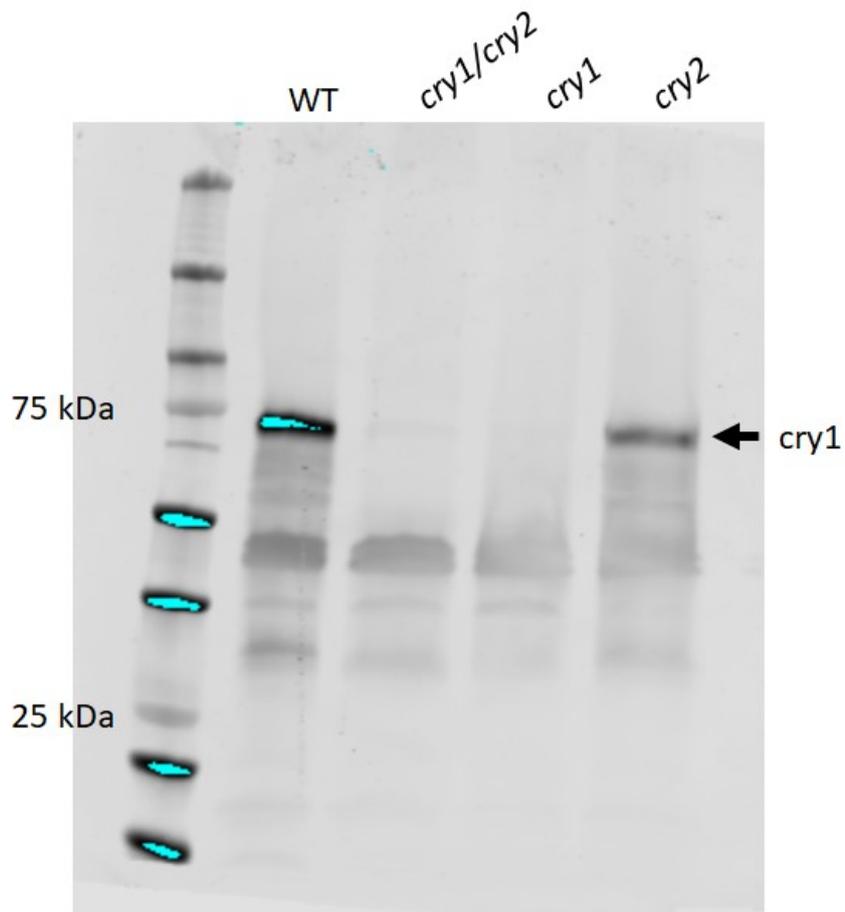
**Abb. Anhang 2: Test auf Homozygotie durch Basta-Behandlung.** Alle Transgene wurden mit einer Herbizid-Resistenz gegen Basta in *A. thaliana* als Selektionsmarker transformiert. Die Keimlinge wurden ca. 2 Wochen nach Aussaat für 4 d mit Basta behandelt. Insgesamt wurden die Keimlinge 3-mal mit Basta besprüht und dann die Überlebensrate ermittelt. Die BIC1<sup>WT</sup>-Linien 22.4 wurde umbenannt in BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 und 24.1 in BIC1<sup>WT</sup>ox\_2. Die BIC1<sup>3CA</sup>-Linien 10.2 in BIC1<sup>3CA</sup>ox\_1 und 12.2 in BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2. Die BIC1<sup>WT</sup>-Linien im *cry1/cry2* (Col)-Hintergrund 2.2 wurde umbenannt in BIC1<sup>WT</sup>ox\_3 (*cry1/cry2*) und 3.1 wurde umbenannt in BIC1<sup>WT</sup>ox\_4 (*cry1/cry2*).

Test auf Normalverteilung in der F3 Generation unter 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blaulicht				
Test erfolgt durch Anderson Darling Berechnung				
H0: Die Werte sind normalverteilt / HA: Die Werte sind nicht normalverteilt				
Die Nullhypothese H0 wird abgelehnt, wenn der p-Wert des Tests zu klein ist.				
Im Allgemeinen wird die Normalverteilungsannahme abgelehnt, wenn				
p < 0,05 = 5% ist.				
		p-wert		
WT	abgelehnt	< 0,05		
<i>cry1/cry2</i>	angenommen	0,093		
<i>phyA</i>	angenommen	0,206		
<i>phyB</i>	angenommen	0,548		
BIC1 <sup>WT</sup> ox_1	angenommen	0,141		
BIC1 <sup>WT</sup> ox_2	angenommen	0,390		
BIC1 <sup>3CA</sup> ox_1	angenommen	0,104		
BIC1 <sup>3CA</sup> ox_2	angenommen	0,389		

**Abb. Anhang 3: Test auf Normalverteilung durch Anderson Darling Berechnung.** Daten wurden bezogen von Hypokotyllängenbestimmung der F3-Generation. Untersuchung erfolgte im Blaulicht bei 10  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ . Berechnet wurde, ob die gemessenen Hypokotyllängen unter Blaulicht-Bedingungen normalverteilt sind, um mögliche Segregation der Mutanten hinzu WT-Phänotyp auszuschließen. Beprobte wurden WT, *cry1/cry2* Mutante, *phyA* und *phyB* Mutante, BIC1<sup>WT</sup>ox\_1 und BIC1<sup>WT</sup>ox\_2, BIC1<sup>3CA</sup>ox\_1 und BIC1<sup>3CA</sup>ox\_2.



**Abb. Anhang 4: Prüfung der optimalen Lichtbedingungen für die Entstehung von cry1 *photobodies*.** cry1-GFP Konstrukt aus pUGT1 Dest. überexprimiert in *N. benthamiana*. Obere Aufnahme zeigt GFP-Signal in Blattprobe bei einer Detektion bei 488 nm und einer Emission bei 500-550 nm. Die unteren Aufnahmen erfolgten nach einer Bestrahlung mit spezifischen Wellenlängen für 5 min bei unspezifischer Intensität. Die Bestrahlung erfolgte mit derselben Probe nacheinander.



**Abb. Anhang 5: Test auf Funktion eines polyklonalen Antikörpers gegen Cryptochrom 1.** Gesamtproteinextrakt aus *A. thaliana* dunkelgewachsenen Keimlingen. Einzel-*Knockout*-Mutanten *cry1* und *cry2* 3 d alt. WT (Col-0) und Doppel-*Knockout*-Mutante *cry1/cry2* 4 d alt. Als primär Antikörper wurde  $\alpha$ *cry1* (2009, AG Batschauer) und als sekundärer Antikörper  $\alpha$ *Rabbit-800* verwendet. *Western Blot* wurde mit dem LiCOR-System analysiert. *cry1* hat eine Größe von 77 kDa.

## Lebenslauf

**Name:** Dennis Kock  
**Geburtsdatum:** 29. November 1993  
**Geburtsort:** Marburg  
**Staatsangehörigkeit:** Deutsch

## Studium und Ausbildung

Philipps-Universität Marburg 2018- 2023

### **Molekulare Pflanzenphysiologie**

Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Promotion

Dissertation: “Aktivierung und Inaktivierung von *Arabidopsis thaliana*  
Cryptochromen durch BIC1”

Philipps-Universität Marburg 2016-2018

### **MSc, Molecular and Cellular Biology 1,3**

Thesis: “Funktionelle Analyse eines pilzlichen DASH-Cryptochroms aus  
Mucor”

Philipps-Universität/Max-Planck-Institut Marburg 2013-2016

### **BSc, Biologie 1,9**

Schwerpunkte: Molekularbiologie, Pflanze-Pathogen-Interaktion

Adolf-Reichwein-Schule Marburg 2010-2013

### **Allgemeine Hochschulreife 1,7**

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich in den letzten Jahren während meiner Promotionen begleitet und unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Alfred Batschauer danken. Die freundliche und kompetente Aufnahme in den Arbeitskreis und die Bereitstellung eines interessanten Forschungsthemas, welches ich selbständig mitgestalten konnte, weiß ich sehr zu schätzen. Auf deine umfassende fachliche Expertise, Geduld und wertvollen Ratschläge konnte ich jederzeit zählen.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Arbeitskreis Batschauer. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und stetige Unterstützung. Besondere und erwähnenswerte Unterstützer sind an dieser Stelle Agnes Damm und Jeanette Schermuly. Ohne eure Hilfe wären so manche stresserfüllten Arbeitstage nur schwer schaffbar gewesen. Ich möchte mich auch bei Stephan Kiontke, Carmen Hütsch, Birte Wagner, Bertram Kraus und allen anderen bedanken, die zu dieser schönen und lehrreichen Zeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich meinem Zweitgutachter und Mitbetreuer Prof. Dr. Lars Voll meinen Dank aussprechen. Die konstruktiven Ratschläge und ein anderer wissenschaftlicher Blickwinkel haben mir in meiner Forschungsarbeit sehr geholfen.

Besonders möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Ohne meine Eltern Petra und Hans-Georg und ihrer stetigen Unterstützung in allen Lebenslagen hätte ich mir meinen Traum, Wissenschaftler zu sein, nicht erfüllen können. Auch meinem Bruder Michael gebührt Dank, da ich immer zu ihm als Vorbild aufblicken konnte.

Ein großes Dankeschön geht auch an Veronique <3

Von ganzem Herzen danke ich euch allen für eure Unterstützung, die es mir ermöglicht hat, meine Promotion abzuschließen.

Mit großer Dankbarkeit.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „**Aktivierung und Inaktivierung von *Arabidopsis thaliana* Cryptochromen durch BIC1**“ selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 31.05.2023

Dennis Kock