

Untersuchungen zur Wirkungsweise des
pflanzenähnlichen Cryptochroms CryP im
Modellorganismus
Phaeodactylum tricornutum

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von Sarah König

aus Gelnhausen

Frankfurt am Main (2016)

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

.....

Datum der Disputation:

Der Gipfel der Ignoranz ist ein Mensch, der von einer Pflanze oder einem Tier sagt: »Wozu soll das gut sein?« Wenn Fauna und Flora im Lauf der Äonen etwas geschaffen haben, das wir lieben, aber nicht verstehen, wer außer einem Narren würde Teile wegwerfen, die nutzlos scheinen? Jedes Rädchen und Schraubchen aufzubewahren, ist die wichtigste Voraussetzung für intelligentes Tüfteln.

Aldo Leopold

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
1 Einleitung.....	1
1.1 Diatomeen	1
1.2 Photorezeptoren	3
1.3 Cryptochrom-Photolyase-Familie.....	5
Photolyasen	5
Cryptochrome	6
Tierische Cryptochrome	6
DASH-Cryptochrome	9
Pflanzliche Cryptochrome	10
1.4 Photorezeptoren in der Diatomee <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	13
Aureochrome	14
Cryptochrome-Photolyase-Superfamilie in der Diatomee <i>P. tricornutum</i>	14
Einfluss verschiedener Lichtqualitäten auf <i>P. tricornutum</i>	16
1.5 Zielsetzung.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Chemikalien	19
2.2 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	19
Kultivierung	20
Zellanzucht für Transkriptomanalyse	20
Stresskulturen	20
Zellernte	21
Wachstumskurven.....	21
Photometrische Detektion der Neutrallipide.....	21
Mikroskopie.....	21
2.3 Methoden für <i>Escherichia coli</i>	22
Verwendete <i>E. coli</i> Stämme	22

Transformation in <i>E. coli</i>	22
Heterologe Proteinexpression	22
2.4 Molekularbiologische Methoden	23
RNA Isolation	23
Reverse Transkription	23
Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	23
Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	25
Isolation DNA aus Agarosegelen	25
DNA-Ligation	25
Restriktion	26
Sequenzierreaktionen	26
2.5 Biochemische Methoden.....	26
Proteinextrakt <i>P. tricornutum</i>	26
Proteinkonzentrationsbestimmung	26
Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen	26
Protein-DNA Bindungstest	27
Identifikation von Interaktionspartnern	27
Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE)	28
Phosphat Affinität SDS-PAGE	29
Immunologische Analyse.....	30
Protein-Protein-Bindungstest	31
Massenspektrometrie-Analyse	32
Blau- und Rotlicht-Spektroskopie.....	32
2.6 Bioinformatische Methoden	32
Transkriptomanalyse.....	32
Qualitätskontrolle Rohdaten	33
Adapter und Oligonukleotide.....	33
Sequenz-Zuordnung	33
Statistische Auswertung der differentiellen Expression	33
Datenbanken	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Charakterisierung CryP	35

Spektroskopie CryP	35
Lokalisation des CryPs innerhalb der <i>P. tricornutum</i> Zelle.....	36
DNA-Bindung CryP.....	40
3.2 Protein-Protein-Interaktionen.....	41
Expression Interaktionspartner	46
Protein-Protein-Interaktion.....	48
Umgekehrter <i>Pulldown</i>	49
Phosphorylierung des Cryptochroms.....	51
3.3 Transkriptom-Analyse in <i>P. tricornutum</i> CryP- <i>Knockdown</i> -Mutanten.....	53
Qualitätskontrolle des NGS-Datensatzes	53
Das <i>P. tricornutum</i> Transkriptom	57
Blaulichregulierte Genexpression des <i>P. tricornutum</i> Wildtyps	59
Blaulichreaktion der CryP- <i>Knockdown</i> -Mutanten	61
Blaulichrezeptoren in <i>P. tricornutum</i>	68
3.4 Stresstest	70
4 Diskussion.....	73
4.1 Das Cryptochrom CryP in <i>P. tricornutum</i>	73
4.2 Wirkungsweise des Cryptochroms CryP.....	75
CryP als potentieller Transkriptionsfaktor	75
Protein-Protein-Interaktionen und Regulative Netzwerke	76
Der CryP-Interaktionspartner AAA.....	77
Charakterisierung und Funktion des CryP-Interaktionspartners Bola.....	78
Der CryP-Interaktionspartner CSDP	80
Signalweiterleitung des durch Blaulicht aktivierten Cryptochroms CryP	82
Ein regulatorisches Netzwerk der Lichtsensorproteine	83
4.3 Auswirkungen des CryP-Proteins auf das Transkriptom der Zelle	87
Blaulichreaktion der Diatomee <i>P. tricornutum</i> und der regulative Effekt des CryP-Proteins	87
Funktion eines Lichtrezeptors im Dunkeln.....	89
4.4 Modell zur Wirkungsweise des Cryptochroms CryP	90
5 Zusammenfassung.....	92
6 Literaturangaben	94
Anhang	113

Abkürzungsverzeichnis

8-HDF	8-Hydroxy-5-Deazaflavin	CRHSP1	Kalzium-reguliertes hitzestabiles Protein 1
AAA	ATPase assoziiert mit verschiedenen zellulären Aktivitäten	Cry	Cryptochrom
AA-PDA	Piperazindiacrylamid	Cry-DASH	<i>Drosophila Arabidopsis Synechocystis Homo</i>
aCry	Tierisches Cryptochrom	CSDP	Kälteschock-Domänen Protein
Amp	Ampere	CYC	CYCLE
AP	Alkalische Phosphatase	dCry	<i>Drosophila melanogaster</i> Cryptochrom
APS	Ammoniumperoxodisulfat	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AS	Aminosäure	DPH	Phytochrom <i>Phaeodactylum tricornutum</i>
aureo	Aureochrom	dsDNA	doppelsträngige DNA
BL	Blaulicht	eGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein
bp	Basenpaare	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
BSA	Bovine Serum Albumin	EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
bzip	<i>Basic leucine zipper</i>	EV	Ausgangsvektor-Kontrolle
CCT	C-terminale Erweiterung der Cryptochrome	FABFa	Beta-ketoacyl Synthase II
cDNA	komplementäre DNA	FAD	Flavinadenindinukleotid
CF	Coomassiefärbung	FCP	Fucoxanthin-Chlorophyll a/c-Bindeprotein
Chl a	Chlorophyll a	FKF1	<i>Flavin-binding Kelch repeat F-Box1</i>
Chp	Chaperon	FMN	Flavinmononukleotid
CIB	Cryptochrom-interagierendes <i>basic-helix-loop-helix</i> -Protein	FR	Langwelliges Rotlicht >700 nm
CLK	CLOCK	Fx	Fucoxanthin
CO	CONSTANS	Gen ID	Gen-Identifikationsnummer
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1	GUS	Beta-Glucuronidase
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer	h	Stunde
CPF	Cryptochrom-Photolyase-Superfamilie	hCry	<i>Homo sapiens</i> Cryptochrom

Abkürzungsverzeichnis

HFR1	<i>long hypocotyl in far red 1</i>	psi	Pfund-Kraft pro Quadratzoll
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	PVDF	Polyvinylidenfluorid
HSF	Hitzeschockfaktor	PYP	<i>Photoactive yellow protein</i>
HY5	Langes Hypokotyl 5	qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
IDA	Iminodiessigsäure	RL	Rotlicht < 700 nm
JGI	Joint Genome Institute	RNA	Ribonukleinsäure
Lhc	Lichtsammelkomplex	RPKM	<i>Read per Kilobase per Million mapped Reads</i>
LKP	LOV Kelch Protein	RT	Raumtemperatur
LOV	Licht-Sauerstoff-Spannung	SDS	Natriumdodecylsulfat
MS	Massenspektrometrie	SF	Silberfärbung
MTHF	5-Methyltetrahydrofolat	SPA1	Supressor Phytochrom A
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	ssDNA	Einzelsträngige DNA
Mut	Zusammenfassung CryP <i>Knockdown</i> -Mutanten	SV	Säulenvolumen
Na1	<i>CryP Knockdown</i> -Mutante <i>P. tricornutum</i>	Ta3	<i>CryP Knockdown</i> -Mutante <i>P. tricornutum</i>
NAB1	Nukleinsäure-bindendes Protein 1	TAIR10	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>	TBP	TATA-Box bindendes Protein
NK	Negativkontrolle	TEMED	Tetramethylethylendiamin
NPQ	<i>Non-Photochemical Quenching</i>	TF	Transkriptionsfaktor
NT	N-terminale Erweiterung des CryP-Proteins	TIM	TIMELESS
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
PCR	Polymerasekettenreaktion	TubA	Tubulin A
pCry	pflanzliches Cryptochrom	UTEX	Sammlung der Algenkulturen der Universität Texas
PD	<i>Pulldown</i>	UV	Ultraviolett
PER	PERIOD	UVR8	Ultraviolett Resistenzlokus 8
PHR	Photolyase homologe Region	v/v	Volumen pro Volumen
PHY	Phytochrom	vCry	Vertebraten Cryptochrom
PIF	Phytochrom-interagierendes Protein	WT	Wildtyp
PK	Positivkontrolle	w/v	Gewicht pro Volumen
PPdK	Pyruvat-Phosphat Dikinase	XCorr	Kreuzkorrelation
psb	Photosystem II-bindendes Protein	ZTL	Zeitlupe

1 Einleitung

1.1 Diatomeen

Das Sonnenlicht ist als primäre Energiequelle essentiell für das Leben auf der Erde. Für Pflanzen ist Licht und seine Wahrnehmung so wichtig wie das visuelle Sehen für die meisten Tiere. Für das Überleben und das Bestehen gegen Konkurrenz ist sowohl die Lichtquantität als auch die Qualität, sowie das Erkennen von beidem, essentiell. In aquatischen Habitaten sind freischwebende photosynthetische Organismen durch Strömungen, wie die Gezeiten, oft sehr wechselhaften Lichtbedingungen ausgesetzt. Diese Organismen müssen in der Lage sein, innerhalb kurzer Zeit ihre Photosynthese und den restlichen Stoffwechsel an die gegebenen Lichtbedingungen anzupassen. Eine weit verbreitete diverse Gruppe dieser Organismen sind die Diatomeen (Kieselalgen, Bacillariophyceae), die sowohl in Süß- als auch in Salzwasserhabitaten zu finden sind (Bowler *et al.*, 2010). Gerade Kieselalgen sind in hohem Maße in der Lage, sich effizient an wechselnde Lichtbedingungen anzupassen (Grouneva *et al.*, 2009; Depauw *et al.*, 2012), was durch ihren Erfolg in Masse und Diversität sichtbar wird (Nelson *et al.*, 1995; Falkowski *et al.*, 1998). Sie sind in der Lage, sowohl auf sich verändernde Lichtintensitäten (Wagner *et al.*, 2006) als auch auf schwankende Lichtqualitäten zu reagieren (Jungandreas *et al.*, 2014; Abbildung 1 B). Es wird angenommen, dass Diatomeen durch sekundäre Endosymbiose entstanden sind. Im ersten endosymbiontischen Schritt wurde ein Vorfahre der heutigen Cyanobakterien von einem heterotrophen eukaryotischen Wirt aufgenommen (Abbildung 1 A; McFadden, 2001). Das zweite endosymbiontische Ereignis erfolgte zwischen einem Rhodophyta und einem nicht photosynthetischen eukaryotischen Wirt (Abbildung 1A; Bhattacharya und Medlin, 1998; Archibald und Keeling, 2002). Durch diese Abstammung weisen Diatomeen vier Membranen um den Chloroplasten auf, was eine besondere Herausforderung bei Proteintransport und Signalweiterleitung darstellt (Chaal und Green *et al.*, 2007). Eine weitere Besonderheit der Diatomeen liegt in den Lichtsammelkomplexen (Lhc) der Photosynthese. Die Lhcs der Diatomeen gehören zwar der gleichen Proteinfamilie der in höheren Pflanzen bekannten Lhcs an, weichen jedoch in Struktur und Pigmentierung etwas ab (Durnford *et al.*, 1996; Papagianakis *et al.*, 2005; Premvardhan *et al.*, 2010; Gelzinis *et al.*, 2015). Eine Gemeinsamkeit stellt das in beiden Proteinarten enthaltene Pigment Chlorophyll a (Chl a) dar. Das in pflanzlichen Lhcs gebundene Chlorophyll b ist in Diatomeen durch Chlorophyll c ersetzt, und an Stelle des in Pflanzen gebundenen Luteins ist in Diatomeen Fucoxanthin (Fx) das am meisten vorhandene Carotinoid. Auf Grund der Pigmentierung werden die Proteine Fucoxanthin-Chlorophyll a/c-Bindeproteine (FCP; Owns und Wold, 1986; Bhaya und Grossman,

1993) genannt und zeigen ein zu den Lhcs der Pflanzen erhöhtes Carotinoid-zu-Chlorophyll-Verhältnis (Papagianakis *et al.*, 2005). Fucoxanthin ist in Kieselalgen das farbgebende Pigment, und durch die Bindung an FCPs ist eine Absorption bis zu 565 nm möglich (Premvardhan *et al.*, 2009). Dies erlaubt den Algen, auch in grünen bis hin zu gelben Wellenlängen zu absorbieren und so ein breites Lichtspektrum für die Photosynthese zu nutzen (Abbildung 1 B). Eingeteilt werden die FCPs in drei funktionell unterschiedliche Untergruppen (LhcR, LhcF und LhcX; Bhaya und Grossmann, 1993; Eppard *et al.*, 2000; Armbrust *et al.*, 2004; Bowler *et al.*, 2008; Büchel, 2015), welche den Diatomeen eine Anpassung an unterschiedliche Lichtbedingungen ermöglichen (Richard *et al.*, 2000; Beer *et al.*, 2006). Dies befähigt sie zu der Besiedlung unterschiedlichster Habitats (Abbildung 1 B).

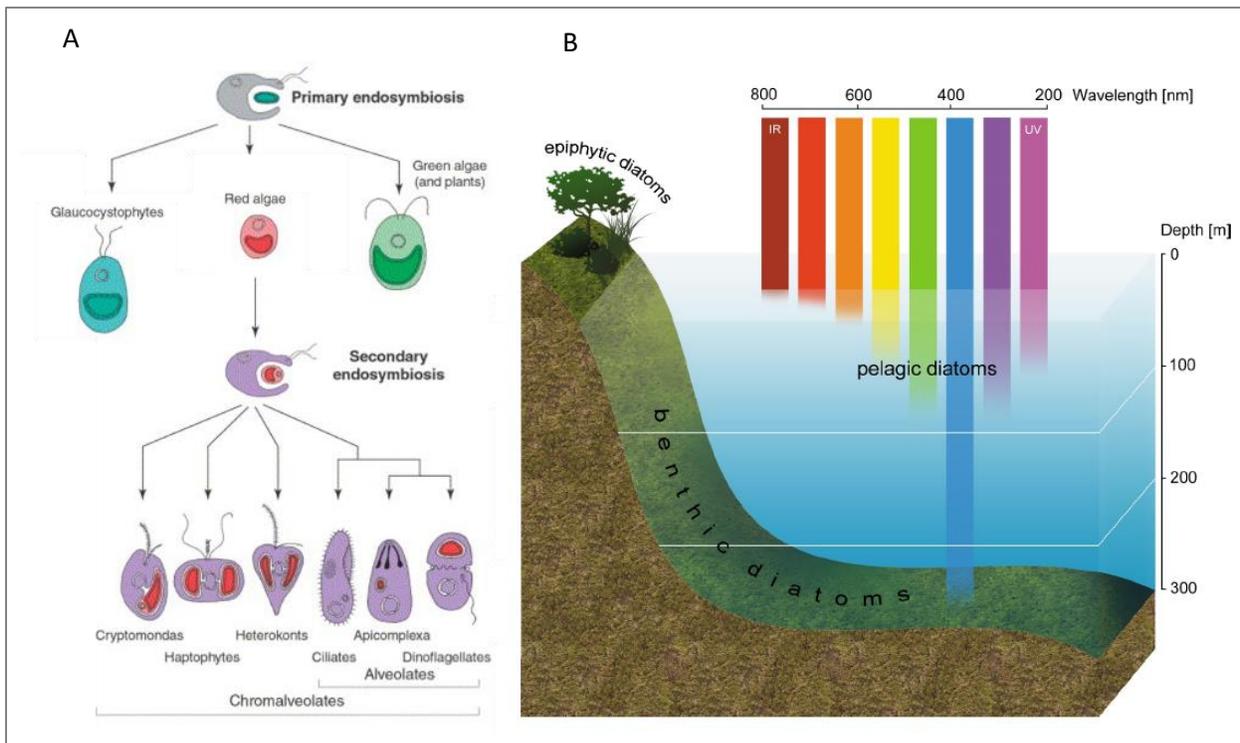


Abbildung 1: Entstehungsweise und Lebensraum der Diatomeen. A zeigt die Entstehungsweise der Chloroplasten in einer primären und sekundären Endosymbiose. In dem primären endosymbiontischen Ereignis entstanden Rotalgen, Grünalgen und Pflanzen sowie Glaucophyta. Die Aufnahme einer Rotalge durch einen nicht-photosynthetischen, eukaryotischen Wirt, stellt das sekundäre endosymbiontische Ereignis dar. Hierbei entstanden unter anderem die Heterokontophyta, zu welchen die Diatomeen zugeordnet sind (modifiziert von Archibald und Keeling, 2002). In B dargestellt sind die möglichen Lebensräume der Diatomeen, am Grund eines Gewässers (benthisch), freischwebend in der Wassersäule (pelagial) oder an Land exponiert auf organischen und nicht-organischen Oberflächen (epiphytisch). Es wird die spektrale Zusammensetzung des Lichtes unter Wasser in Abhängigkeit der Tiefe dargestellt. Während Strahlung zwischen 800 und 500 nm nur wenige Meter in das Wasser eindringt, ist Strahlung zwischen 500 und 200 nm in bis zu 100 m Wassertiefe nachweisbar. In tiefergelegenen Regionen unter 100 m ist ausschließlich blaues Licht (ca 400 nm – 470 nm) vorhanden (Kuczynska *et al.*, 2015).

An Land können Kieselalgen unter anderem auf Pflanzen und nicht organischen Oberflächen gefunden werden. Im Wasser findet man sie sowohl am Grund, benthisch wachsend, als auch frei in der Wassersäule (pelagial; Abbildung 1 B; Johansen, 1991; Spaulding *et al.*, 2010). Vor allem die pelagial lebenden Kieselalgen sind durch Strömungen und Gezeiten stetig wechselnden Lichtbedingungen ausgesetzt, was sich in der Anpassung des Photosynthese-Apparates und des Metabolismus widerspiegelt. Hierbei ist es möglich das Diatomeen über längere Zeiträume in Habitaten mit Lichtlimitierung wachsen (Abbildung 1 B; Smetacek, 1985). Insgesamt rücken Kieselalgen vermehrt in das Interesse der Forschung, da sie für industrielle Anwendungen wie die Produktion von Lipiden, Pharmazeutika sowie die Entgiftung kontaminierter Ökosysteme genutzt werden können (Barclay *et al.*, 1994; Dunahay *et al.*, 1996; Bozarth *et al.*, 2009).

1.2 Photorezeptoren

Durch das Licht werden diverse molekulare Prozesse in Zellen gesteuert; es dient photosynthetischen Organismen sowohl als Energiequelle als auch als regulatives Signal (Chen *et al.*, 2004). Für regulative Abläufe wird das Licht über zwei Hauptmechanismen detektiert (Nott *et al.*, 2006). Die Expression plastidärer Proteine kann über eine lichtabhängige Änderung des Elektronentransportes der Photosynthese gesteuert werden. Vermutlich werden Organellen über diesen Mechanismus an variierende Lichtbedingungen angepasst (Pfannschmidt, 2010). Sowohl die Stöchiometrie der Photosysteme als auch der Pigmentmetabolismus werden über diesen Signalweg reguliert (Maxwell *et al.*, 1995; Lepetit *et al.*, 2012). Die zweite Möglichkeit der lichtgesteuerten Genregulation sind Photorezeptoren (Möglich *et al.*, 2010). Es handelt sich um Proteine, die Licht über Chromophoren detektieren können. Der Chromophor absorbiert Licht innerhalb eines definierten Wellenlängenbereichs und überträgt Energie auf das Protein-Rückgrat. 1920 wurden erstmals Lichtrezeptoren erkannt, die nicht im direkten Zusammenhang mit der Photosynthese standen: Phytochrome (Phy), welche im Rotlicht und langwelligen Rotlicht absorbieren (600 nm – 700 nm RL und 700 -750 nm FR; Garner und Allard, 1920; Brothwick *et al.*, 1952). Sie sind sowohl in Pflanzen, Algen, Bakterien als auch Cyanobakterien und Pilzen zu finden (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010; Auldrige und Forest, 2011; Fortunato *et al.*, 2016). Je nach Organismus weisen die Proteine unterschiedliche Chromophore wie Biliverdin IX α , Phytochromobilin, oder Phycocyanobilin auf (Bhoo *et al.*, 2001; Lamparter *et al.*, 2002; Frankenberg und Lagarias, 2003). Es handelt sich hierbei um regulative Proteine, die als Sensoren zur Differenzierung zwischen kurz- und langwelligem Rotlicht (RL und FR) dienen. Sie werden unter anderem mit der Pigmentsynthese und

Photomorphogenese in Verbindung gebracht (Davis *et al.*, 1999; Giraud *et al.*, 2002; Wilde *et al.*, 2002; Rockwell *et al.*, 2006, Fortunato *et al.*, 2016).

Eine weitere Gruppe der Photorezeptoren sind die Rhodopsine, die von Gelb- bis hin zum Blaulicht absorbieren können (Wald, 1968; Spudich und Bogomolni, 1988). Sie haben Retinal als Kofaktor gebunden (Wald, 1968; Oesterhelt und Stoekeniu, 1971). Durch Lichtaktivierung kann die dunkeladaptierte trans-Form in die cis-Isoform überführt werden (Akita *et al.*, 1980; Yan *et al.*, 1990). Bekannt sind Rhodopsine vom visuellen Sehen (Ottolenghi, 1980; Birge, 1981). In pflanzlichen Organismen sind sie wie in *Chlamydomonas reinhardtii* für die Steuerung der Phototaxis zuständig (Bosco und Feinleib, 1979). Zusätzlich zur Sensorfunktion können sie ebenfalls enzymatische Funktionen übernehmen wie in *Osteococcus tauri*. Hier konnten Histidin-Kinase-Rhodopsine identifiziert werden (Hwang und Sheen, 2001).

Eine weitere Untergruppe der Photosensoren stellen die Blau- und UV-Lichtrezeptoren dar. Zu ihnen gehören die LOV-Proteine (*Light-oxygen-voltage*), BLUF-Proteine (*Blue light sensors using FAD*) sowie Cryptochrome. Durch eine Bindung von Flavinderivaten wie Flavinadenindinukleotid (FAD) oder Flavinmononukleotid (FMN) sind diese Proteine in der Lage, im UV- und Blaulicht zu absorbieren. Zu den LOV-Sensorproteinen gehören Phototropine, ZTL- (Zeitlupe), FKF1- (*Flavin-bindung Kelch repeat F-Box1*), LKP-Proteine (LOV Kelch Protein) und Aureochrome. Der Chromophor dieser Proteine ist an der LOV-Sensordomäne lokalisiert und die Blaulichtabsorption führt zur Bildung eines reversiblen Flavin-Cystein-Addukts. Dies hat eine Änderung der Konformation in der Tertiärstruktur des Proteins zur Folge und ermöglicht eine Signalweiterleitung (Crosson *et al.*, 2003; Harper *et al.*, 2003). Phototropine konnten bisher nur in Pflanzen und Grünalgen identifiziert werden und steuern das Wachstum und die Entwicklung sowie die Organellenbewegungen (Ohgishi *et al.*, 2004; Christie, 2007; Banas' *et al.*, 2012). Die Proteinfamilie ZTL, FKF1 und LKP sind aus Landpflanzen bekannt und sind involviert in die Periodik der circadianen Oszillation, der Elongation des Hypokotyls sowie die Einleitung der lichtabhängigen Blüte (Kiyouse und Wada, 2000; Nelson *et al.*, 2000; Sommers *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 2001). Die Proteinklasse der Aureochrome konnten bisher nur in heterokonten Algen nachgewiesen werden (Takahashi *et al.*, 2007; Ishikawa *et al.*, 2009). Eine detaillierte Beschreibung erfolgt unter dem Abschnitt 1.4 „Photorezeptoren in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*“.

Weitere Blaulichtrezeptoren stellen die PYP (*Photoactive Yellow Protein*; Xanthopsin) dar; sie haben p-Coumarinsäure als absorbierenden Chromophor gebunden und ähneln in ihrer Kinetik den Rhodopsinen (Kort *et al.*, 1996; Haker *et al.*, 2000). Zusätzlich zu Photorezeptoren im Bereich des sichtbaren Lichts sind

die *Ultraviolet Resistance locus 8* (UVR8) Proteine in der Lage, UV-Licht zu detektieren. UVR8-Proteine zeigen eine Absorption zwischen 280 – 325 nm ohne ein hierfür gebundenes Chromophor (Kliebenstein *et al.*, 2002; Rizzini *et al.*, 2011). Eine Sensorfunktion für UV-B Licht wird hier vermutlich durch Tryptophane ermöglicht, die einen Ring aus den aromatischen Resten bilden, wobei der genaue Reaktionsmechanismus bisher nicht aufgeklärt ist (Jenkins 2014).

1.3 Cryptochrom-Photolyase-Familie

Die Cryptochrom-Photolyase-Familie (CPF) ist eine Zusammenfassung von Blaulichtrezeptoren, die sowohl die regulativen Cryptochrome als auch die DNA reparierenden Photolyasen umfasst. Das gemeinsame Charakteristikum der Proteinfamilie ist die Photolyase-Homologe-Region (PHR), welche streng konserviert vorliegt. An das konservierte PHR-Motiv können bis zu zwei absorbierende Chromophore nicht kovalent binden (Müller und Carell, 2009). Alle bisher identifizierten Proteine der CPF zeigen FAD als erstes katalytisches Chromophor, welches eine lichtabhängige Reduktion durch intramolekularen Elektronentransfer durchlaufen kann (Aubert *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). Zusätzlich zu dem katalytischen FAD kann ein weiteres Chromophor als Kofaktor an die PHR gebunden sein. Es dient hierbei als Lichtsammler und leitet die Anregungsenergie zu dem katalytisch aktiven FAD weiter (Worthington *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2005). Als zusätzliche lichtsammelnde Chromophore können ein weiteres FAD, 5-Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder 8-Hydroxy-5-Deazaflavin (8-HDF) gebunden sein (Jorns *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1988; Eker *et al.*, 1981).

Photolyasen

Photolyasen teilen strukturell die PHR-Domäne mit den Cryptochromen und haben darüber hinaus, anders als Cryptochrome, keine C-terminalen Erweiterungen. Sie reparieren UV-induzierte Schäden der DNA und binden ihre Substrate mit hoher Affinität (Sancar *et al.* 1987; Todo *et al.*, 1993). Eine Substratbindung erfolgt bereits im Dunkeln (Sancar *et al.* 1985), was durch eine positiv geladene Oberfläche des Proteins gewährleistet wird. Für den Reparaturmechanismus benötigen Photolyasen UV-nahes Licht zwischen 350 nm und 450 nm (Sancar, 2003; Brettel und Byrdin, 2010). Durch UV-Einwirkung können in der DNA Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) oder Pyridin-Pyrimidin-(6-4)-Dimere entstehen. Diese Schäden werden von spezifischen CPD (I-III) und (6-4)-Photolyasen repariert, die auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sind (Todo, 1999). Alle bisher bekannten Photolyasen zeigen eine Bindung von zwei Chromophoren, ein N-terminales Chromophor nahe der Proteinoberfläche und ein FAD, welches

C-terminal lokalisiert ist. Bei diesem handelt es sich um den katalytischen Chromophor, welcher in der aktiven Form als anionisches, vollständig reduziertes FADH⁻ vorliegt (anionisches Flavohydrochinon; Kim *et al.*, 1993). Das dunkeladaptierte oxidierte FAD stellt die katalytisch inaktive Form dar (Payne *et al.*, 1990) welche durch Lichtanregung in die aktive Form FADH⁻ überführt wird. Diese weist eine sehr geringe Absorption auf, so dass das Licht hauptsächlich durch den N-terminalen Kofaktor absorbiert wird und via Resonanz-Transfer auf das FAD übertragen werden. Für den Reparaturmechanismus wird von dem angeregten FADH⁻ ein Elektron auf die Pyrimidin-Dimere der DNA übertragen (Kim und Sancar, 1993). Durch die Spaltung der Pyrimidine in Monomere wird die DNA repariert, wobei das Elektron zurückgeführt und ein semireduziertes neutralradikal FADH[•] geformt wird. Die Rückführung in den Ursprungszustand des anionischen FADH⁻ erfolgt über ein 15 Å nahes Tryptophan, welches Teil einer Tryptophan-Triade ist (Li *et al.*, 1991; Cheung *et al.*, 1999).

Cryptochrome

Cryptochrome zeigen große strukturelle Homologien zu den Photolyasen, was die Unterscheidung auf Grund der Sequenz sehr schwierig macht. Beide Proteinarten weisen die konservierte PHR-Domäne auf und zusätzlich können Cryptochrome eine variable C-terminale Erweiterung (CCT) aufzeigen. Im Gegensatz zu den Photolyasen zeigen Cryptochrome im allgemeinen keine DNA-Reparaturfähigkeit, sondern sind in der transkriptionellen Regulation als Photorezeptoren beteiligt (Sancar, 2008). Innerhalb der Cryptochrome kann man zwischen pflanzlichen (pCry) und tierischen Cryptochromen (aCry) sowie der Gruppe der Cry-DASH Cryptochrome unterscheiden (Chaves *et al.*, 2011). Während pCrys in phylogenetischen Studien Homologien zu CPD II-Photolyasen zeigen, sind aCrys bei den (6-4)-Photolyasen einzuordnen (Juhas *et al.*, 2014; Oliveri *et al.*, 2014; Scheer *et al.*, 2015). Für DASH-Cryptochrome wird wie auch für pflanzliche Cryptochrome eine Abstammung von CPD-Photolyasen angenommen (Öztürk *et al.*, 2008a).

Tierische Cryptochrome

Die Funktion der aCrys liegt in der Steuerung der circadianen Uhr, die für den periodischen 24-Stunden-Rhythmus innerhalb eines Organismus zuständig ist. Innerhalb der tierischen Cryptochrome können entsprechend der Funktionsweise der Proteine, zwei Gruppen unterschieden werden: Typ I und Typ II. Die lichtsensitiven Cryptochrome wie dCry (*Drosophila melanogaster* und weitere Insekten) werden als Typ I zusammengefasst, während die nicht-lichtgesteuerten Cryptochrome wie vCry (Vertebraten, Maus und

Mensch) als Typ II tierische Cryptochrome beschrieben werden (Okamura *et al.*, 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass einige Spezies beide Typen tierischer Cryptochrome aufweisen, wie zum Beispiel der Zebrafisch oder der Monarchfalter (Kobayashi *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2008).

In *D. melanogaster* ist die circadiane Uhr durch eine negative Rückkopplungsschleife der Transkriptionsfaktoren CLOCK (CLK) und CYCLE (CYC) reguliert, in der eine Aktivierung der PERIOD (PER) und TIMELESS (TIM) Proteine eine Repression der CLOCK/CYCLE Gene zu Folge hat (Abbildung 2A; Stanewsky, 2002). Die Expression des Typ I dCryptochroms wird ebenfalls durch CLOCK und CYCLE gesteuert. Durch eine lichtabhängige Interaktion des Crys mit dem TIM Protein wird die Degradation desselben initiiert, was eine Aufhebung der negativen Regulation zur Folge hat (Abbildung 2A; Stanewsky, 2002). Eine Mutation des dCrys hat eine fehlende Sensitivität der circadianen Uhr auf den Licht-Dunkel-Rhythmus sowie eine insgesamt abgeschwächte Antwort in der Genregulation zur Folge (Emery *et al.*, 1998; Stanewsky *et al.*, 1998). Strukturell wird für das Cryptochrom angenommen, dass der Kern (PHR) die Lichtaufnahme übernimmt, während die Interaktion mit TIM über den C-Terminus zustande kommt. Über die beschriebene Funktion des Typ I Cryptochroms hinaus ist es an weiteren Prozessen wie der Wahrnehmung magnetischer Felder beteiligt (Gegear *et al.*, 2010).

Die Typ II Cryptochrome wurden zuerst in Vertebraten identifiziert (Miyamoto und Sancar, 1998; Todo, 1999). Wie auch Typ I tierische Cryptochrome weisen sie eine C-terminale Erweiterung auf und haben keine DNA-Reparaturfähigkeit. Untersuchungen an Säugetieren zeigten, dass die Typ II tierischen Cryptochrome eine zentrale Rolle bei der Steuerung und dem Antrieb des circadianen Rhythmus haben (van der Horst *et al.*, 1999; Vitaterna *et al.*, 1999). Vergleichbar mit Typ I tierischer Cryptochrome erfolgt die Regulation des circadianen Rhythmus über eine negative Rückkopplung (Abbildung 2 B). Der CLOCK/Bmal Dimer wirkt aktivierend auf die Transkription der PERIOD-Gene. Die Typ II tierischen Cryptochrome führen zusammen mit PER zu einer Repression der CLOCK und Bmal-Gene, was eine vom Licht unabhängige negative Regulation darstellt. Dies führt zu einer Unterdrückung der eigenen Expression (Abbildung 2 B). Die lichtabhängige Regulation des circadianen Rhythmus für den Typ II Cryptochrome wird über Melanopsin gesteuert (Lucas *et al.*, 2003; Semo *et al.*, 2003). Es nimmt Einfluss auf die PER-Cry-Menge und bildet so die lichtabhängige Steuerung des circadianen Rhythmus (Hattar *et al.*, 2002). Auch für die Typ II aCry wurde eine lichtinduzierte Funktion im Zusammenhang mit der Erkennung des Magnetfeldes beschrieben, vergleichbar mit den Typ I Cryptochromen (Gegear *et al.*, 2010).

Für die regulative Funktion der tierischen Cryptochrome ist die C-terminale Erweiterung (CCT) von großer Bedeutung. Ein Beispiel hierfür ist die lichtinduzierte Degradation des TIM-Proteins durch das Typ I

aCryptochrom für welche die CCT essentiell ist (Busza *et al.*, 2004). Bei Typ II tierischen Cryptochromen wird die Periodenlänge durch die CCT beeinflusst. Für eine vollständige Repression des CLOCK/Bmal Dimers wird allerdings auch der N-Terminale Teil des Crys benötigt. Es wird vermutet, dass eine Interaktion zwischen CCT und PHR nötig ist, um eine Konformationsänderung für die folgende Protein-Protein-Interaktion, herbeizuführen (Chaves *et al.*, 2006; Van der Schalie *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2012).

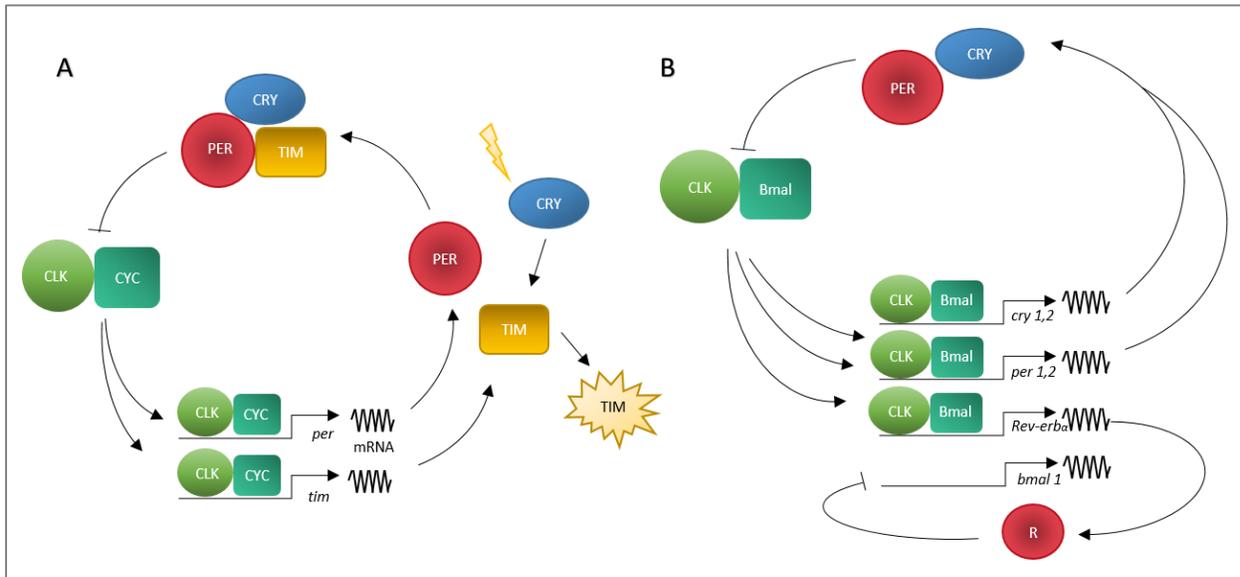


Abbildung 2: Model zum Wirkungsmechanismus Typ I und II tierischer Cryptochrome. A zeigt die Funktionsweise des Typ I tierischer Cryptochrome (CRY). CRY interagiert mit den Proteinen PERIOD (PER) und TIMELESS (TIM) und unterdrückt als Komplex mit PER und TIM die Funktion des Komplexes CLOCK (CLK) und CYCLE (CYC). CLK/CYC haben positiven Einfluss auf die Expression der Gene *per* und *tim*. Induziert durch Blaulicht kommt es zu einem CRY-medierten Abbau des TIM-Proteins. In B ist der Regulationsmechanismus Typ II tierischer Cryptochrome dargestellt. Durch die Interaktion zwischen CRY und PER wird der Komplex CLK/Bmal gehemmt und wirkt sich negativ auf die Expression der Gene *cry*, *per*, *Rev-erb α* , aus. Die Expression der Gene führt zu einer negativen Rückkopplung über bisher unbekannte Schritte R, welche die Expression von *bmal* hemmen (modifiziert nach Chaves *et al.*, 2011 und Ito und Tomioka, 2016).

Entgegengesetzt zu den für (6-4)-Photolyasen typischen zwei Kofaktoren FAD (Iwatsuki *et al.*, 1980) und 8-HDF oder MTHF (Eker *et al.*, 1981) weisen die phylogenetisch verwandten tierischen Cryptochrome nur den gemeinsamen ersten Chromophor FAD auf. Für dCry konnte eine Photoaktivierung gezeigt werden, bei der FAD vom oxidierten Zustand (FAD_{ox}) zu einem anionischen Flavinradikal (FAD^{•-}) übergeht (Berndt *et al.*, 2007). Durch eine mögliche Konformationsänderung kann es anschließend zu einer Signalweiterleitung kommen (Öztürk *et al.*, 2008; Hoang *et al.*, 2008a). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem oxidierten FAD um die dunkeladaptierte Form handelt (Hoang *et al.*, 2008). Ein weiterer

potentieller Funktionsmechanismus legt FAD^* als Grundzustand nahe. Nach Übergang in einen angeregten Zustand FAD^{*+} kann die Energie möglicherweise durch einen intramolekularen Elektronentransfer weitergeleitet werden (Berndt *et al.*, 2007; Kao *et al.*, 2008). Trotz der lichtunabhängigen Wirkungsweise der Typ II aCryptochrome konnte in Insektenzellen für hCry (*Homo sapiens* Cryptochrom) ein Lichtmechanismus entsprechend der Photoaktivierung pflanzlicher Cryptochrome gezeigt werden (Hoang *et al.*, 2008).

DASH-Cryptochrome

Eine Besonderheit unter den Cryptochromen stellen die DASH-Cryptochrome dar (Cry-DASH; Brudler *et al.*, 2003). Die von einem CPD-Vorläufer abstammenden Cryptochrome sind prinzipiell in der Lage, UV-induzierte DNA-Schäden zu reparieren. Durch bioinformatische Analysen wurden die DASH-Cryptochrome zunächst in den Organismen *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* und *Homo* identifiziert, wobei darauffolgende Studien DASH-Cryptochrome in *Arabidopsis* (Kleine *et al.*, 2003) und *Synechocystis* (Hitomi *et al.*, 2000) bestätigten konnten. Trotz der Reparaturfähigkeit sind Cry-DASH-Protein nicht in der Lage, Photolyasen zu ersetzen, wie am Beispiel der Komplementation mit Photolyase-defizienten *Escherichia coli* Stämmen gezeigt werden konnte (Assingil und Kavakli, 2012). Für viele DASH-Cryptochrome konnte keine oder eine sehr geringe Reparaturaktivität für CPD- oder (6-4)-Produkte an doppelsträngiger DNA (dsDNA; Hitomi *et al.*, 2000; Selby und Sancar, 2006) gezeigt werden. Trotz allem weisen sie eine Affinität zu CPD-Produkten auf, die zum Beispiel für Cry3 in *A. thaliana* (Selby und Sancar, 2006), oder Cry-DASH in *Xenopus laevis*, *Danio rerio* und *O. tauri* (Daiyasu *et al.*, 2004; Heijde *et al.*, 2010) gezeigt werden konnte. Es wird angenommen, dass die Reparaturfähigkeit der Cry-DASH Proteine hauptsächlich auf Einzelstrang-DNA und Schleifen innerhalb doppelsträngiger DNA spezialisiert ist (Selby und Sancar, 2006; Pokorny *et al.*, 2008), während neue Studien auch Hinweise auf Photolyase-ähnliche dsDNA-Reparaturfähigkeiten geben (Sokolowsky *et al.*, 2010; Tagua *et al.*, 2015). Des Weiteren konnte für DASH-Cryptochrome eine unspezifische RNA Bindung und eine Ko-Isolation von Cryptochrom-Protein und RNA festgestellt werden (Worthington *et al.*, 2003; Froehlich *et al.*, 2010; Heijde *et al.*, 2010).

Wie alle Proteine der Cryptochrom-Photolyase-Familie binden DASH-Cryptochrome FAD als ersten Kofaktor, und können MTHF als zweiten Kofaktor binden (Klar *et al.*, 2007). Durch Belichtung kann FAD als anionisches vollständig reduziertes FADH^- angereichert werden, was abhängig von der Belichtung über unterschiedliche Intermediate aus dem FAD_{ox} hervorgeht. Bei Langzeitbelichtungen ist FADH^* nachweisbar (Zikihara *et al.*, 2008), während eine kurzzeitige Starklicht-Inkubation vorübergehend zu FAD^* führt (Zirak

et al., 2009). Zusätzlich konnte FADH* bei dem Reoxidationsprozess in Dunkelheit nachgewiesen werden (Song *et al.*, 2006; Damiani *et al.*, 2009). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Photoaktivierung auch durch vorhandene Substrate beeinflusst werden kann. Durch das Vorhandensein von UV-Licht-geschädigter DNA wird das FAD im Zustand zwischen dem reduzierten FADH₂ und der neutral-radikalischen Form FADH* gehalten (Gindt *et al.*, 2015), was weitere Hinweise auf eine Nähe zu Photolyasen gibt.

Zusätzlich zu der Reparaturfähigkeit wird angenommen, dass DASH-Cryptochrome auch eine regulative Funktion haben. Bisher konnte ein Einfluss auf den circadianen Rhythmus und sekundären Metabolismus von *Fusarium fujikuroi* (Castrillo *et al.*, 2013), sowie den circadianen Rhythmus von *O. tauri* durch DASH-Cryptochrome gezeigt werden (Heijde *et al.*, 2010). Für Cry-DASH aus *Synechocystis* konnte ebenfalls ein regulativer Effekt auf die Genexpression gezeigt werden (Brunelle *et al.*, 2007), was eine zusätzliche regulative und somit mögliche duale Funktion nahelegt. Die Lokalisation der Cry-DASH Proteine scheint zwischen unterschiedlichen Organismen zu variieren. Für Cry3 von *A. thaliana* konnte sowohl ein Chloroplasten-Import als auch eine mitochondriale Lokalisation gezeigt werden (Kleine *et al.*, 2003) während Cry-DASH aus *Karenia brevis* nur im Chloroplasten nachgewiesen werden konnte (Brunelle *et al.*, 2007). Ein weiteres mitochondrial lokalisiertes Cry-DASH konnte hingegen in *Trypanosoma cruzi* identifiziert werden (Gabaldón *et al.*, 2010).

Pflanzliche Cryptochrome

Der Einfluss des Blaulichts auf Pflanzen, welcher sich unter anderem in Phototropismus oder gehemmter Hypokotylelongation äußert, wurde bereits 1881 von Charles Darwin beschrieben. Die Identifizierung eines pflanzlichen Cryptochroms gelang erstmals 1993 in *A. thaliana* (Ahmad und Cashmore, 1993). Es konnte der blaulichtabhängige Einfluss des Cry1 Cryptochroms auf die Hypocotylelongation gezeigt werden. Zusätzlich zu Cry1 besitzt *A. thaliana* noch ein weiteres pflanzliches Cryptochrom Cry2, für welches ebenfalls ein Einfluss in der Hypokotyl- und Keimblattentwicklung sowie ein lichtabhängiges Einleiten der Blüte festgestellt werden konnte (Lin *et al.*, 1998; Ahmad *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu Cry1, das unter Lichteinfluss stabil ist (Ahmand und Cashmor, 1993), kommt es bei Cry2 zu einem lichtabhängigen Abbau des Proteins (Ahmad *et al.*, 1998). Der Abbau des Cry2-Proteins erfolgt über eine lichtgesteuerte Ubiquitinierung (Zuo *et al.*, 2012). Es wird angenommen, dass die Aktivität des Cry2 hauptsächlich in Schwachlicht- und lichtlimitierenden Bedingungen liegt, während das Cry1 vermehrte Aktivität unter Starklichtbedingungen zeigt (Lin *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 2006; Vass *et al.*, 2013).

In konstanter Dunkelheit angezogene Pflanzen zeigen einen Rhythmus der circadianen Uhr von 36 Stunden, welcher durch natürlichen Lichteinfluss auf 24 Stunden verkürzt wird. Die pflanzlichen Cryptochrome, als Teil der Steuerung der circadianen Uhr, verkürzen diesen Rhythmus lichtabhängig (Somers *et al.*, 1998; Devlin und Kay, 2000). Auf molekularer Ebene konnte eine Interaktion der beiden Proteine Cry1 und Cry2 mit der E3-Ubiquitinligase COP1 gezeigt werden (Yang *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2011). Für Cry2, welches zusätzlich mit dem transkriptionellen Regulator CO (*Constans*) interagiert, wurde diese Interaktion als blaulichtabhängig beschrieben (Wang *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2011). Es wird vermutet, dass eine gemeinsame Interaktion des Cry2 mit CO und COP1 einen durch COP1 gesteuerten Abbau des CO-Proteins verhindert (Abbildung 3; Turck *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008). Durch die CO-Interaktion wird über Cry2 Einfluss auf die Blütenbildung der Pflanze genommen (Guo *et al.*, 1998; El-Assal *et al.*, 2003), welche unter anderem durch CO reguliert wird. Obwohl Cry1 nur einen geringen Effekt auf die Blütenbildung hat, konnte ebenfalls eine Interaktion mit COP1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Cry2 handelt es sich hierbei um eine blaulichtunabhängige Interaktion mit dem COP1-SPA1-Komplex, wobei für eine Aktivierung des Komplexes Blaulicht benötigt wird (Yang *et al.*, 2001). Die Interaktion resultiert in der Inaktivierung des COP1-SPA1-Komplexes, was eine hemmende Wirkung auf das Ubiquitin-abhängige Proteasom hat (Wang *et al.*, 2001; Abbildung 3). In Dunkelheit führt COP1-SPA1 zu einer Degradation verschiedener lichtinduzierter Transkriptionsfaktoren wie HY5 (Abbildung 3; *long hypocotyl 5*) oder HFR1 (*long hypocotyl in far red light 1*; Ang *et al.*, 1998; Lian *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2011). Durch die Bindung des Cry1 an den COP1-SPA1-Komplex werden diese Transkriptionsfaktoren in der Zelle akkumuliert. Das Cry2-Protein zeigt außerdem eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor CIB2, wobei eine N-terminale Interaktion mit Cry2 vermutet wird (Abbildung 3; Liu *et al.*, 2008). Zusätzlich zu der beschriebenen lichtabhängigen Funktion des Cry1-Proteines mit dem COP1-SPA1 Komplex werden auch lichtunabhängige Funktionen vermutet (Devlin und Kay, 2000; Yang *et al.*, 2008). Für die Funktion der pCrys ist der C-terminale Teil essentiell (Ahmad *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2000). Er weist eine hohe Diversität auf, so dass die Homologien der CCT zwischen Cry1 und Cry2 bei nur 15 % liegen. Trotzdem zeigen beide ein gemeinsames DAS-Motiv (DQXVP-*acidic*-STAES; Lin und Shalitin, 2003). Der Kofaktoren-bindende, N-terminale Teil der Proteine ist als Lichtsensor und für die Lichtaktivierung von Bedeutung. Studien mit einem Fusionsprotein aus C-Terminus und der Beta-Glucuronidase (GUS) zeigen einen konstitutiv aktivierten Phänotyp für Cry1 in *A. thaliana*. Das Protein ist dauerhaft aktiv, und es fehlt mit der PHR-Domäne auch die Lichtsteuerung des Proteins (Yang *et al.*, 2000).

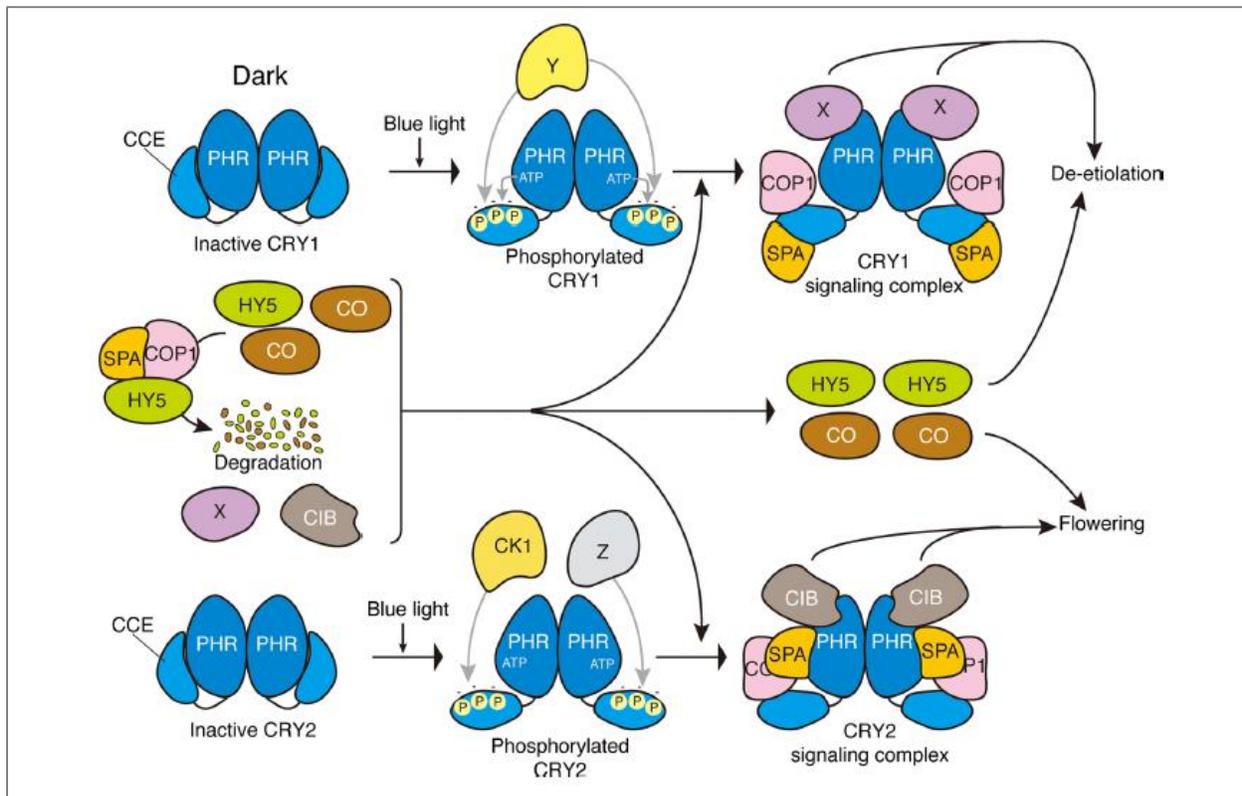


Abbildung 3: Model zum Mechanismus der Signaltransduktion von Cry1 und Cry2 in *A. thaliana*. Die pflanzlichen Cryptochrome (Cry1/Cry2) liegen im Dunkeln als inaktive Dimere vor. Blaulichtinkubation führt zu einer Aktivierung und zu einer Änderung der Konformation, was eine Phosphorylierung des CCT (CCE) durch eine unbekannte Kinase (Y) ermöglicht. Cry1 interagiert mit dem COP1-SPA (*Costitutive Photomorphogenic 1, Supressor Phy A*) Komplex, was einen Abbau des Transkriptionsfaktors HY5 (*Long Hypocotyl 5*) verhindert. Außerdem interagiert Cry1 mit einem unbekanntem Protein (X) und aktiviert so einen COP1 unabhängigen Signalmechanismus. Cry2 wird durch die Casein-Kinase 1 und eine unbekannte Kinase (Z) phosphoryliert und interagiert ebenfalls mit COP1-SPA, was zu einer Anreicherung des CO-Proteins (*Constans*) führt. Durch eine Interaktion des Cry2 mit CIB (*CRY-interacting basic-helix-loop-helix*) mit der PHR (Photolyase-homologe-Region) wird außerdem die Blütenbildung gesteuert (Liu *et al.*, 2016).

Wie bereits erwähnt binden alle Mitglieder der Cryptochrome-Photolyase-Proteinfamilie FAD als ersten Kofaktor, was ebenfalls für pflanzliche Cryptochrome gezeigt werden konnte. Strukturell konnte gezeigt werden, dass sich das FAD in einer hydrophoben U-förmigen Tasche der Alphahelix der PHR-Domäne befindet (Brautigam *et al.*, 2004). Bei der heterologen Expression und anschließenden Isolation der Cry1 und Cry2-Proteine aus *A. thaliana* konnten keine Kofaktoren zusätzlich zu dem FAD identifiziert werden. Es wird vermutet, dass diese bei der Isolation der Proteine verloren gehen (Malhotra *et al.*, 1995), da eine Hemmung der MTHF-Synthese einen Einfluss auf die UV-A Sensitivität des Cry1 aus *A. thaliana* nimmt (Hoang *et al.*, 2008). Dies deutet auf MTHF als lichtsammelndes Chromophor für Cry1 hin. Für Cry2 konnte dieser Einfluss nicht gezeigt werden; ein möglicher zweiter Kofaktor ist hier bisher unbekannt. Im

Vergleichbar mit den Photolyasen konnte die oxidierte Form des FADs pflanzlicher Cryptochrome als Ruhezustand und dunkeladaptierte Form identifiziert werden (Malhorta *et al.*, 1995). Durch Blaulicht erfolgt eine Aktivierung des Proteins und eine Umwandlung der oxidierten Form zum Neutralradikal FADH* (Giovani *et al.*, 2003). Diese Umwandlung erfolgt innerhalb weniger Millisekunden (Langenbacher *et al.*, 2009). Der Zustand des FADH* ist jedoch nicht stabil und im Dunkeln findet eine Reversion zur oxidierten Form statt. Die Stabilität des FADH*-Zustands kann jedoch von äußeren Einflüssen wie der Sauerstoffkonzentration, der Temperatur, reduzierenden Agenzien, oder der Gegenwart anderer Radikale beeinflusst werden (Chaves *et al.*, 2011; Hense *et al.*, 2015). Wie auch bei Photolyasen konnte ein Ablauf des Photozyklus über eine konservierte Trp-Triade gezeigt werden (Bouly *et al.*, 2007). Durch die Blaulichtaktivierung kommt es innerhalb des Cryptochroms zu einer Konformationsänderung (Abbildung 3; Partch *et al.*, 2005; Kottke *et al.*, 2006; Kondoh *et al.*, 2011), welche mit einer lichtabhängigen Phosphorylierung einhergeht (Shalitin *et al.*, 2002; Shalitin *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung erfolgt an der C-terminalen Erweiterung und ist unabhängig von der PHR-Domäne. Wie auch der neutral-radikalische Zustand des FADs geht die Phosphorylierung im Dunkeln verloren (Yu *et al.*, 2007a; Yu *et al.*, 2007b). Trotz fehlender Ähnlichkeiten zu ATP-bindenden Proteinen konnte sowohl eine ATP-Bindung (Brautigam *et al.*, 2004) als auch eine autophosphorylierende Aktivität für Cryptochrome aus *C. reinhardtii* und *A. thaliana* festgestellt werden (Bouly *et al.*, 2003; Shalitin *et al.*, 2003; Immeln *et al.*, 2007). Über die Autophosphorylierung hinausgehend konnte bisher keine klassische Kinaseaktivität für andere Substrate nachgewiesen werden (Bouly *et al.*, 2003). Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die ATP-Bindung sowohl Auswirkungen auf die Stabilität des FADH* Neutralradikals als auch auf die Konformationsänderung des Proteins hat. Dadurch nimmt die ATP-Bindung Einfluss auf die Aktivität und den Photozyklus des Proteins (Immeln *et al.*, 2007; Burney *et al.*, 2009). Die Stabilität des Cry2-Proteins ist außerdem von seinem Phosphorylierungszustand anhängig, da diese zu einer ubiquitinabhängigen Degradation des Cry2 durch die Casein-Kinase1 führt (Tan *et al.*, 2013).

1.4 Photorezeptoren in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum*

In der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* konnten verschiedene Klassen an Photorezeptoren identifiziert werden. Als Teil der Cryptochrome-Photolyase-Familie konnten sieben potentielle Gene identifiziert werden (Montsant *et al.*, 2007; Bowler *et al.*, 2008). Weitere Photorezeptoren stellen die Aureochrome dar, bei welchen es sich ebenfalls um Blaulichtrezeptoren handelt, die zu der LOV-Domänen-Proteinfamilie gehören. In *P. tricornutum* konnten vier verschiedene Aureochrome identifiziert werden: aureo1a, aureo1b, aureo1c und aureo2. Zusätzlich zu den Blaulichtrezeptoren weist die Diatomee

ebenfalls ein Phytochrom auf welches kürzlich als aktiver Rotlichtrezeptor in der lichtgesteuerten Regulation der Genexpression identifiziert wurde (Bowler *et al.*, 2008; De Riso *et al.*, 2009; Fortunato *et al.*, 2016). Wie bereits in Pflanzen und Bakterien identifiziert, handelt es sich um eine durch spezifische Wellenlängen des Rotlichts gesteuerte Kinase (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010; Auldrige und Forest, 2011; Fortunato *et al.*, 2016).

Aureochrome

Bei Aureochromen handelt es sich um Blaulichtrezeptoren, die ausschließlich in heterokonten Algen, wie Bacillariophyceae oder Xanthophyceae, vorkommen (Takahashi *et al.*, 2007; Ishikawa *et al.*, 2009; Schellenberger Costa *et al.*, 2013a). Als Transkriptionsfaktoren weisen sie eine DNA-bindende bZIP-Domäne, sowie einen lichtsensitiven Teil auf (LOV-Domäne). An der LOV-Domäne befindet sich der Licht absorbierende Chromophor Flavinmononukleotid (FMN; Halavaty und Moffat, 2007; Takahashi *et al.*, 2007). Vermutlich stehen Aureochrome im Zusammenhang mit der Regulation der Starklichtanpassung in der Zelle und werden auch mit Differenzierungsprozessen wie primordiale Verzweigungen in Verbindung gebracht (Takahashi *et al.*, 2007; Schellenberger Costa *et al.*, 2013a). Es konnte eine Blaulicht-abhängige Dimerisierung der LOV-Domäne gezeigt werden, was eine direkte DNA-Bindung ermöglicht (Herman *et al.*, 2013; Herman und Kottke, 2015; Banerjee *et al.*, 2016). Zusammen mit der in *P. tricornutum* gezeigten nukleären Lokalisation weist dies auf eine Funktion als Transkriptionsfaktor hin (Schellenberger Costa *et al.*, 2013). Speziell für aureo1a in *P. tricornutum* konnte eine DNA-Bindung an die Promotorregion des Cyclins dsCYC2 gezeigt werden, was zusammen mit den Transkriptionsfaktor TF bZIP10 zu einer Regulation des dsCYC2 und somit zu einer Kontrolle der Mitose führt (Herman *et al.*, 2013; Huysman *et al.*, 2013).

Cryptochrome-Photolyase-Superfamilie in der Diatomee *P. tricornutum*

Wie bereits beschrieben, besitzt *P. tricornutum* 7 Gene der CPF-Proteinfamilie (Montsant *et al.*, 2007; Bowler *et al.*, 2008). Eines der Gene wird der Klasse der (6-4)-Photolyasen zugeordnet (CPF1), während drei Gene zeigen Homologien zu CPD-Photolyasen zeigen (CPD1; CPD3 und CPD4). Außerdem konnten den Cry-DASH Cryptochromen zwei potentiellen Sequenzen zugeordnet werden (CPF2 und CPF4; Depauw *et al.*, 2012). Als pflanzenähnlichste Sequenz wurde das Protein CPD2 (ID 54342), welches im Folgenden CryP genannt wird, identifiziert (Juhas *et al.*, 2014). Es weist die typische C-terminale Erweiterung auf und wurde 2014 genauer charakterisiert (Juhas *et al.*, 2014). Als weiteres Mitglied der *P. tricornutum* CPF-Familie wurde CPF1 mehrfach untersucht (De Riso *et al.*, 2009; Coesel *et al.*, 2009). Es handelt sich bei dem

CPF1 Protein um eine (6-4)-Photolyase, die in der Lage ist, UV-induzierte Schäden in der DNA zu reparieren und zusätzlich eine weitere regulative Funktion innehat (De Riso *et al.*, 2009; Coesel *et al.*, 2009). CPF1 ist ein Protein tierischer Abstammung, welches nach heterologer Expression FAD als Chromophor gebunden hat und im blauen Wellenlängenbereich eine Absorption zeigt (Coesel *et al.*, 2009). Die Expression des Proteins und auch die regulative Funktion sind vornehmlich Blaulicht-gesteuert (Coesel *et al.*, 2009). Obwohl CPF1 auch eine von tierischen Cryptochromen bekannte Repression der CLOCK-Bmal1 gesteuerten Genen hervorrufen kann (Kume *et al.*, 2007), ist der regulative Effekt auf die Genexpression nicht mit der von tierischen Cryptochromen bekannten Repressoraktivität der circadianen Uhr vergleichbar (Coesel *et al.*, 2009). Für die durch CPF1 regulierten Gene ist eine Photorezeptor-gesteuerte Regulation aus Pflanzen bekannt. Die Gene scheinen einer generellen Blaulichtregulation zu unterliegen, die durch CPF1 beeinflusst wird (Casal und Yanovsky, 2005; Jiao *et al.*, 2007; Coesel *et al.*, 2009). Mit seiner dualen Funktion stellt CPF1 eine neue Art Blaulichtsensor dar und könnte eine Zwischenstufe von (6-4)-Photolyase zu regulativ aktiven Cryptochromen bilden (Coesel *et al.*, 2009).

Bei dem zweiten in *P. tricornutum* charakterisierten Mitglied der CPF-Proteinfamilie handelt es sich, wie bereits erwähnt, um den Photorezeptor CryP (Juhas *et al.*, 2014). Phylogenetisch ist das Protein zusätzlich zu seiner Nähe zu pflanzlichen Cryptochromen auch zwischen CPD III-Photolyasen und Cry-DASH Proteinen eingeordnet (Juhas *et al.*, 2014). CryP zeigt etwa 30 % Identität zu Cry1 aus *A. thaliana* innerhalb der ersten 500 Aminosäuren, welche auch Teil des PHR-Motivs sind (Juhas *et al.*, 2014). Für den Photorezeptor sind unterschiedliche Datenbankeinträge zu finden. Neben der etwa 1750 bp langen Sequenz des in Juhas *et al.* (2014, ID 54342) und dieser Arbeit charakterisierten CryP-Proteins ist ein weiterer Eintrag zu finden. Bei der zusätzlichen Sequenz handelt es sich um eine um etwa 1000 bp N-terminal erweiterte Sequenz (Juhas *et al.*, 2014, ID 34704). Diese N-terminale Erweiterung zeigt Ähnlichkeiten zu der potentiellen Sequenz einer Methylentetrahydrofolat-Reduktase aus *Osteococcus marinus* (Juhas *et al.*, 2014). Bisher konnte sowohl die Expression der verlängerten 34704-Sequenz als auch der kürzeren CryP-Sequenz gezeigt werden (Jäger, 2013). Auf Grund der beschriebenen Homologien und dem Fehlen vergleichbarer Erweiterungen für weitere pflanzliche Cryptochrome wurde die 54342-Sequenz als CryP-Protein charakterisiert (Juhas *et al.*, 2014).

Bei heterologer Expression des 67 kDa CryP-Proteins sind die Chromophore MTHF und FAD gebunden, welche bereits für Cry1 aus *A. thaliana* bekannt sind (Malhotra *et al.*, 1995; Hoang *et al.*, 2008; Juhas *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass eine Belichtung mit Blaulicht zu einer Akkumulation des Neutralradikals FADH^{*} führt, was auf einen pflanzlichen Photozyklus hindeutet (Giovani *et al.*, 2003; Juhas *et al.*, 2014). Eine Dunkeladaption des Proteins führt hingegen zu einer Akkumulation des oxidierten FADs,

was sich durch Belichtung mit Blaulicht erneut in FADH* überführen lässt. Dies deutet ebenfalls auf einen Photozyklus hin, der von pflanzlichen Cryptochromen bekannt ist. Durch das spezielle Absorptionsverhalten des Neutralradikals FADH* als aktive Form des Kofaktors (Kao *et al.*, 2008) wird das Licht in den Wellenlängen von 250 nm bis 450 nm und zusätzlich von 595 nm bis 650 nm absorbiert. Bei 637 nm kann ein Maximum im langwelligen Bereich der Absorption festgestellt werden, was charakteristisch eher für Cry-DASH Proteine als für pflanzliche Cryptochrome bekannt ist (Immeln *et al.*, 2010; Juhas *et al.*, 2014). Durch einen verringerten CryP-Gehalt in *P. tricornutum* konnte ein regulativer Einfluss auf die Proteinmenge der Lichtsammelkomplexe gezeigt werden (Juhas *et al.*, 2014). Während das CryP einen fördernden Einfluss auf die Gruppe der Lichtschutzproteine LhcX hat, wirkt es sich reduzierend auf die Gruppe der Lichtsammelproteine LhcF aus (Juhas *et al.*, 2014). Diese regulativen Effekte geben wiederum Hinweise auf die Zugehörigkeit des CryP-Proteins zur Gruppe der pflanzlichen oder pflanzenähnlichen Cryptochrome. Eine Untersuchung des Expressionsmusters der Photorezeptoren innerhalb der Diatomee *P. tricornutum* zeigte, dass alle Photorezeptoren außer CryP eine maximale mRNA Expression in der Lichtphase des Tages erreichen (Oliveri *et al.*, 2014). Die Zeitpunkte der Expressionsmaxima unterscheiden sich zwischen der frühen Lichtphase (1-5 Stunden, CPF1 und CPF2), der mittleren Phase (5-9 Stunden, CPD1, CPD3 und CPD4), sowie der späten Phase (9-16 Stunden, CPF4). *Cryp* hingegen zeigt ein Expressionsmaximum am Ende der Dunkelphase und eine deutliche Reduzierung der Expression in der frühen Lichtphase. Während der mittleren und späten Lichtphase zeigt es eine geringe Expression, welche sich in der Dunkelphase erneut erhöht (Oliveri *et al.*, 2014). Dieses CryP-mRNA-Expressionsprofil konnte ebenfalls für ein weiteres pflanzenähnliches Cryptochrome des Borstenwurmes *Platynereis dumerilii* beobachtet werden (Oliveri *et al.*, 2014). Die Funktionsmechanismen des bisher nur grundlegend charakterisierten CryP-Proteins werden im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht.

Einfluss verschiedener Lichtqualitäten auf *P. tricornutum*

Der Blaulichteffekt in der Diatomee *P. tricornutum* wurde bereits mehrfach untersucht. Generell bildet das Blaulicht den unter Wasser dominanten Wellenlängenbereich. Während das von der Sonne stammende Rotlicht nur in den obersten Bereich des Wassers eindringt (Mobley, 1994; Abbildung 1), ist Licht der grünen und gelben Wellenlängen bis zu 10 Meter unter Wasser vorhanden. Zusätzlich ist die Lichtqualität abhängig von der Tageszeit sowie organischen Schwebstoffen (Kirk, 1994). In tiefer gelegenen Schichten ist nur noch Blaulicht vorhanden (Kirk, 1994; Abbildung 1). Kürzlich veröffentlichte Studien geben jedoch Hinweise, dass auch in den tiefer gelegenen Regionen Rotlicht vorhanden ist, welches durch Raman-Streuung und Chlorophyll-Fluoreszenz entsteht (Fortunato *et al.*, 2016). Für die Diatomee *P. tricornutum*

konnte gezeigt werden, dass die Zellen bis zu sechs Wochen in tiefen Wasserschichten ohne Licht auskommen. Hierbei ist der Photosynthese-Apparat stets funktionell, um bei Änderungen der Lichtbedingungen nahtlos in die Energieproduktion überzugehen (Peters und Thomas, 1996; Peters, 1996). Bei der erneuten Belichtung der Zellen zeigt sich besonders die Expression der *lhcx*-Gene aus der Gruppe der Schutzproteine (Nymark *et al.*, 2013), was auf eine Stresssituation in der Zelle hindeutet. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Lichtqualität einen entscheidenden Einfluss auf die Reaktion der Zelle hat. So ist ein Starklichtphänotyp in *P. tricornutum* ausschließlich mit Blaulicht hervorruftbar, während starkes Rotlicht zu keiner entsprechenden Reaktion in der Zelle führt (Schellenberger Costa *et al.*, 2013a). Besonders die Expression der Gene für die Reparatur des Photosystems II (PSII) sind lichtabhängig durch Blaulichtrezeptoren reguliert (Valle *et al.*, 2014). Des Weiteren werden speziell Stress-regulierte Gene explizit im Blaulicht angesprochen, während Rotlicht die mitochondriale Atmung beeinflusst (Schellenberger Costa *et al.*, 2013a). Zusätzlich führt Rotlicht zu einer verringerten Toleranz gegenüber Lichtstress, was sich in einer reduzierten Menge Xanthophyllzyklus-Pigmente und verringertem NPQ (*Non-Photochemical Quenching*) niederschlägt (Schellenberger Costa *et al.*, 2013a). Im Schwachlicht sind die Photosynthese-Raten zwischen Rot- und Blaulicht vergleichbar. Ein Wechsel der Lichtqualitäten zeigt allerdings auch im Schwachlicht unterschiedliche Einflüsse auf die Zellen (Jungandreas *et al.*, 2014). Während der Übergang von Rot- zu Blaulicht zu einer erhöhten Proteinproduktion führt, nimmt der Wechsel von Blau- zu Rotlicht Einfluss auf die Akkumulation von Kohlenhydraten (Jungandreas *et al.*, 2014). Die Unterschiede in der Lichtqualität-abhängigen Genregulation sind besonders in kurzen Zeiträumen von Bedeutung, so dass nach 6 - 24 Stunden kaum noch ein qualitätsabhängiger Unterschied vorhanden ist (Valle *et al.*, 2014). Wie bereits beschrieben konnten in Diatomeen verschiedene Blau- und Rotlichtrezeptoren identifiziert werden, auf welche die beschriebenen Effekte zurückzuführen sind. Lediglich für Grünlicht konnte bisher kein spezifischer Rezeptor gefunden werden (Armbrust *et al.*, 2004; Bowler *et al.*, 2008), obwohl auch eine Grünlicht-spezifische Reaktion beschrieben ist (Valle *et al.*, 2014).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des pflanzenähnlichen Cryptochroms CryP und die Aufklärung des Wirkmechanismus des Proteins innerhalb der Zelle von *P. tricornutum*.

Für die Untersuchung der Wirkungsweise von CryP in der Diatomee *P. tricornutum* wurden zwei mögliche Hypothesen aufgestellt:

CryP wirkt als DNA-bindender Transkriptionsfaktor und nimmt direkten regulativen Einfluss auf die Expression von Genen.

CryP ist als Photorezeptor durch Protein-Protein-Interaktionen Teil einer regulativen Proteinkaskade und nimmt so Einfluss auf die Expression von Genen.

Für die erste Hypothese sollte die Lokalisation und die DNA-Bindfähigkeit des CryP Proteins untersucht werden. Um die zweite Hypothese zu testen, sollten hingegen Interaktionspartner von CryP mit einem heterolog in *E. coli* exprimierten Protein (CryP-his) identifiziert werden. Die Verifikation der Interaktion war ebenfalls Teil der Zielsetzung, sowie die Untersuchung einer möglichen Signalweiterleitung von CryP auf weitere Proteine. Neben den Wirkmechanismen sollte ebenfalls aufgeklärt werden, welche Gene einer CryP-spezifischen Regulation unterliegen, um so einen Einblick in die regulatorischen Effekte in der Zelle von *P. tricornutum* zu bekommen. Dazu sollten CryP-Knockdown-Mutanten mit einer genomweiten Analyse (NGS, *Next Generation Sequencing*) charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien der Firma Roth genutzt.

2.2 *Phaeodactylum tricornutum*

Für diese Arbeit wurde die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* (Heterokonta, Bacillariophyceae, Naviculales) genutzt.

Tabelle 1: Verwendete *P. tricornutum* Stämme.

Stamm	Quelle	Charakteristika	Vermerk
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 646	UTEX Kultursammlung	Wildtyp (WT)	
Ta3	Universität Frankfurt A.v. Zadow	<i>Knockdown</i> CryP	Juhas <i>et al.</i> , 2014
Na1	Universität Frankfurt A.v. Zadow	<i>Knockdown</i> CryP	Juhas <i>et al.</i> , 2014
eGFP	Universität Frankfurt M. Fauth, S. Jäger	Cytoplasmatisches eGFP	
Short-GFP3	Universität Frankfurt S. Jäger	N-Terminus CryP-GFP Fusion	26 AS CryP
Short-GFP4	Universität Frankfurt S. Jäger	N-Terminus CryP-GFP Fusion	26 AS CryP
CryP-GFP2	Universität Frankfurt S. Jäger	CryP-GFP Fusion	
CryP-GFP5	Universität Frankfurt S. Jäger	CryP-GFP Fusion	
NT-GFP3	Universität Frankfurt S. Jäger	N-terminaler Teil des 34704-Proteins +GFP	Potentielle MTHF- Reduktase
NT-GFP5	Universität Frankfurt S. Jäger	N-terminaler Teil des 34704-Proteins +GFP	Potentielle MTHF- Reduktase
34704-GFP4	Universität Frankfurt S. Jäger	Protein 34704-GFP Fusion	
34704-GFP8	Universität Frankfurt S. Jäger	Protein 34704-GFP Fusion	

Kultivierung

Die Zellen wurden schüttelnd, (120 rpm Orbital Schüttler) im Batch-Verfahren, in ASP-Medium (modifiziert von Provasoli *et al.*, 1975) bei einer Raumtemperatur zwischen 15 und 18 °C kultiviert. Die Kulturen wurden für 7 Tage bei einer Lichtintensität von $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in einem 16/ 8 h Tag/ Nacht-Rhythmus angezogen. Die Zelldichte der Startkultur lag stets bei 1 Millionen Zellen/ ml.

ASP-Medium pH 7.7	Anschließend wurde es mit steril filtrierten
86,0 mM NaCl	Lösungen wie folgt komplementiert:
4,0 mM Tris	2,72 mM CaCl ₂
21,0 mM KCl	0,092 mM EDTA
8,1 mM MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,012 mM FeCl ₃
11,8 mM NaNO ₃	0,02 mM MnCl ₂
0,58 mM K ₂ HPO ₄	0,002 mM ZnCl ₂
0,16 mM H ₃ BO ₃	50 pM CoCl ₂
Nach Einstellen des pHs wurde das Medium	25 pM Na ₂ MoO ₄
autoklaviert.	22,5 pM CuCl ₂

Zellanzucht für Transkriptomanalyse

Für Experimente des *Next Generation Sequencing* (NGS) wurden die Zellen unter den beschriebenen Bedingungen angezogen. Nach 4 Tagen Standardkultivierung wurden die Zellen für 72 h im Dunkeln schüttelnd angezogen (18 °C). Die Hälfte der Kulturen wurde nach 72 h geerntet (4.500 g, 10 min, 4°C), während der zweite Teil für 1 h mit Blaulicht (465 nm , $10 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, Superflux LED-Leisten, Lumitronix®) inkubiert wurde. Anschließend wurden auch diese Zellen geerntet, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Stresskulturen

Um die Sensitivität der Kulturen für Stressbedingungen zu untersuchen, wurden folgende Veränderungen am Kulturmedium vorgenommen: Für Salzstress wurde die Gesamtmenge Salz durch die Zugabe von zusätzlich 20 g NaCl in 1 l ASP-Medium von 110 mM auf 430 mM verdreifacht. Um einen Stickstoffmangel in den Kulturen hervorzurufen, wurden die Menge des Stickstoffs im Medium von 11,8 mM auf 1,5 mM NaNO₃ reduziert. Für einen Temperaturstress wurde die Temperatur während der Zellanzucht von 18 °C auf 8 °C verringert.

Zellernte

Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Zellen nach 7 Tagen Kultivierung 1 h nach Lichtaktivierung geerntet. Hierfür wurden die Zellen bei 4.500 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (HiCen 21C Herolab). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 2 ml Wasser suspendiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Je nach Verwendung wurden die Zellen bei -20 oder -80 °C gelagert.

Wachstumskurven

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Kultur 1 ml entnommen und die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Als weitere Möglichkeit, die Zellzahl zu bestimmen, wurde die Optische Dichte bei 735 nm gemessen (Spektral-Photometer JASCO V-550, Messbreite 1 nm, Lichtweg 1 cm). Mit Hilfe des Werts der OD_{735nm} wurde die Zellzahl nach Barka *et al.* (2016) mit der folgenden Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl [Mio/ml]} = OD_{735nm} / 0.125$$

Formel 2: Kalkulierung der Zellzahl mittels optischer Dichte (Barka *et al.*, 2016).

Photometrische Detektion der Neutrallipide

Neutrallipide der Zellen wurden durch Färbung mit Nilered detektiert (Lee *et al.*, 1998). Hierfür wurde die Zellzahl mit Hilfe der OD_{735nm} auf 0,3 eingestellt und Nilered (Sigma Aldrich, 1 mg/l in Aceton) zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Fluoreszenz bei 585 nm detektiert. Die Anregung erfolgte bei 490 nm (Jasco FP3500 Fluorometer, Messbreite 1 nm).

Mikroskopie

Die Mikroskopaufnahmen der *P. tricorutum* Zellen wurden an einem Leica TCS SP5 Mikroskop vorgenommen (DMI6000 CS invertiert, *Frankfurt Center for Advanced Microscopy*). Die Anregung des fluoreszierenden eGFPs wurde mittels eines Argon-Lasers bei 488 nm vorgenommen. Der Messbereich wurde auf 505 – 530 nm beschränkt. Zur Messung der Autofluoreszenz wurden die Proben ebenfalls bei 488 nm angeregt und ein Filter zwischen 540 – 600 nm gewählt. Des Weiteren wurden die Proben mit dem Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt (50 ng /ml; Latt *et al.*, 1975). Mit Hoechst 33342 behandeltes Zellmaterial wurde zusätzlich bei 405 nm mit einem Dioden-Laser angeregt. Die Detektion erfolgte zwischen 470 und 500 nm.

2.3 Methoden für *Escherichia coli*

Verwendete *E. coli* Stämme

Tabelle 2: Verwendete und hergestellte *E. coli* Kulturen des Stammes BL21 Codon+.

Stamm	Quelle	Charakteristika	Vermerk
Cry Phis C2/3	Juhas <i>et al.</i> , 2014	Expression CryP-his	BL21 Codon+
BL21 AAA-his	D Radev Goethe Universität	Expression AAA-his	BL21 Codon+
BL21 BolA-his	Diese Arbeit Goethe Universität	Expression BolA-his	BL21 Codon+
BL21 CSDP-his	Diese Arbeit Goethe Universität	Expression CSDP-his	BL21 Codon+

Transformation in *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* XL1 BLUE und BL21 Codon+ Zellen erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989. Für die Transformation der Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte ein Hitzeschock. Hierfür wurden die XL1-Zellen mit dem gleichen Volumen Transformationspuffer verdünnt und 30 min auf Eis mit dem zu transformierenden Plasmid inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C und anschließend auf entsprechendem LB-Selektionsmedium über Nacht inkubiert. Der Hitzeschock der BL21 Rosetta-Zellen erfolgte für 30 sec bei 42 °C, während die Reperation mit 500 µl SOC-Medium bei 37 °C, 1 h vorgenommen wurde.

LB-Medium	SOC-Medium	Nach dem Autoklavieren	Transformationspuffer
10 g/l Trypton	20 g/l Trypton	wurde das SOC Medium mit	100 mM CaCl ₂
5 g/l Hefeextrakt	5 g/l Hefeextrakt	2,5 mM KCl und 50 mM	50 mM MgCl ₂
10 g/l NaCl	0,5 g/l NaCl	Glukose komplementiert.	

Heterologe Proteinexpression

Die Expression der mit sechsfach Histidin-Motiv versehenen Proteine in *E. coli* BL21 Codon+ erfolgte nach Juhas *et al.* (2014) im Expressionsvektor Champion™ pET303/CT-His (Invitrogen™). Für die Isolation der Interaktionspartner (CSDP-his, BolA-his, AAA-his) wurden folgende Abweichungen vorgenommen:

Der Waschpuffer der BolA- und AAA-Isolation wurde mit 70 mM Imidazol verwendet, während der Waschpuffer des CSDP-Proteins 50 mM Imidazol enthielt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

RNA Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte nach Sturm *et al.* (2013) mit den folgenden Änderungen. Die *P. tricornutum* Zellen wurden mit Stickstoff durch Mörsern aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Zelltrümmer in 8 ml TRIzol Reagenz aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Auf 1 ml TRIzol wurden je 200 µl Chloroform gegeben und gründlich durchmischt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation bei RT wurden Zelltrümmer von Nucleinsäuren durch Zentrifugation getrennt, 16.000 g, 20 min, 4 °C. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens Ethanol 70 % wurden die Proben 10 Minuten auf Eis inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (16.000 g, 25 min, 4 °C) wurden die Nucleinsäuren sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment bei RT für 15 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 59 µl H₂O gelöst und ein DNase-Verdau entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt (DNaseI, New England Biolabs GmbH). Zur weiteren Reinigung der RNA wurde diese nach der DNase Behandlung mit 630 µl Ethanol 70 % verdünnt und mit dem RNeasy Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben weiter behandelt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Spektralphotometer ND-1000, NanoDrop). Die Qualitätskontrolle der RNA wurde mit einem 2100 Bioanalyzer (Agilent) durchgeführt.

TRIzol-Reagenz

38 % Phenol
0,4 M Ammoniumthiocyanat
0,8 M Guanidiniumthiocyanat
0,1 M Natrium Acetat
5 % Glycerin

Reverse Transkription

Die Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mittels reverse Transkriptase (ThermoFischer Scientific) nach Herstellerangaben.

Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA mittels PCR wurden der Taq Mastermix (2x PCR Super Master Mix, Biotool) oder die Phusion Polymerase (ThermoFischer Scientific) jeweils nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukletide. Angegeben sind die Benennung, die Sequenz, der Verwendungszweck und die Gen Identifikationsnummer (ID) der in dieser Arbeit genutzten Oligonukleotide. Die mit * markierten Oligonukleotide wurden nach Saut *et al.* (2007) verwendet.

Oligonukletide	Sequenz	Verwendung	Gen ID
pfcB_fw	CTCATGGTGCACGAACAGTTG	EMSA Promoter DNA	25172
pfcB_rv	CGCGCTGATGAACAGGGTC	EMSA Promoter DNA	25172
pfcA1_fw	CGGCATCAGAGCAGATTG	EMSA Promoter DNA	18049
pfcA1_rv	CCGAGTACAGTCGTAGATTC	EMSA Promoter DNA	18049
pfcA2_fw	CGGATCTGGGAAATGAATTG	EMSA Promoter DNA	18049
pfcA2_rv	AGTTCGATAGCACGCTTCTG	EMSA Promoter DNA	18049
CSDPhis_fw2	CGTCTAGAATGGCCGACGGTCC	Expression/ Sequenzierung	15211
CSDPhis_rv2	GCTCGAGATAAGAATCGTAGTCGTTGGAAG	Expression/ Sequenzierung	15211
BolAhis_fw2	GTCTAGAATGAGTACGACGACTGCTACTGC	Expression/ Sequenzierung	14849
BolAhis_rv2	ACTCGAGCGTTCGGGTGGCAAAG	Expression/ Sequenzierung	14849
AAHis_fw	GCTCGAGAGAACTCTTGATGC	Expression/ Sequenzierung	42612
AAHis_rv	CGTCTAGAATGAAGATTTCCAGTGTTG	Expression/ Sequenzierung	42612
pJetseq fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Sequenzierung pJet	
pJetseq rv	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	Sequenzierung pJet	
TubA fw	GACTCCTCAACACTTTCTTCAG	qRT-PCR	54534
TubA rv	CTTGCCAGTGGTGTAGTGTC	qRT-PCR	54534
Chp fw	TCACGGAGAACTACGATAGCA	qRT-PCR	32099
Chp rv	TGTCTACCATCTCATTCTCGCT	qRT-PCR	32099
FABFa fw	TTCCAACGATCGCTTTACGC	qRT-PCR	37367
FABFa rv	TAAAGGGTGAGACCTTGGGT	qRT-PCR	37367
PPdk fw	AGGTCTTTCAAGAGAACGGC	qRT-PCR	21989
PPdk rv	TGTTCAATCCCACATTGAGGAC	qRT-PCR	21989
H4 fw*	TGGTGGTGTGAAACGTATCTC	qRT-PCR	34971
H4 rv*	TTAACCTCCGAATCCGTAGAG	qRT-PCR	34971
rtpr2_TBP_fwd*	TACGAGCCAGAGCTATTTCC	qRT-PCR	10199
rtpr2_TBP_rev*	CCGGGTACCGTAGTTATATGTG	qRT-PCR	10199
rtpr2_CRYp_fwd	GCGTTCTTGCAATGAGAAGG	qRT-PCR	54342
rtpr2_CRYp_rev	GAGGTTATGCGAGACTTGATGG	qRT-PCR	54342
RPS fw*	CGAAGTCAACAAGGAAACCAA	qRT-PCR	10847
RPS rv*	GTGCAAGAGACCGGACATACC	qRT-PCR	10847
CPF1 fw	AAGACAAGCCCAAATGATGC	qRT-PCR	27429
CPF1 rv	AAAGTTGGAGTGCTGTATCC	qRT-PCR	27429

DPH fw	CATATGAGCCACGAACTACG	qRT-PCR	54330
DPH rv	TGAGACAAGTGTGGTTCTTCG	qRT-PCR	54330
aureo1c fw	TATTCGGATCCAACCTTCCC	qRT-PCR	51933
aureo1c rv	GGCTTTGTAATTCAGCAAACAC	qRT-PCR	51933

Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Zur Überprüfung der relativen Expression wurden ausgewählte Gene mittels qRT-PCR amplifiziert. Für die Detektion wurde ein Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies) verwendet. Die Proben wurden nach Herstellerangaben mit dem 2x SYBR low ROX Mastermix (Biotool) vorbereitet. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe des Programmes MxPro (Agilent Technologies) nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Hierfür wurden die relativen Expressionen auf die Mittelwerte der dunkel adaptieren Wildtyp-Probe normiert, welche als Basis auf den absoluten Wert 1 festgelegt wurde. Die Effizienz der genutzten Oligonukleotide wurde mittels Verdünnungsreihe, bestehend aus fünf 2-fach Verdünnungsschritten der cDNA Matrize, überprüft. Hierbei wurde die Linearität der Standardkurven kontrolliert und mittels Schmelzkurven konnte die Spezifität der Oligonukleotide sichergestellt werden (Effizienzen; Anhang Tabelle A 1). Für das Programm wurden die folgenden Parameter gewählt: 95 °C, 5 min und in 40 Zyklen 95 °C, 30 sec, 54 °C, 30 sec, 72 °C, 30 sec. Zusätzlich wurde am Ende der Amplifikation der Zyklus mit identischen Parametern wiederholt und eine Schmelzkurve aufgezeichnet.

Isolation DNA aus Agarosegelen

Die Isolation von DNA auf Agarosegelen erfolgte entsprechend des Protokolls: *Preparative and analytical purification of DNA from Agarose* (Vogelstein und Gillespie, 1979).

DNA-Ligation

Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase (ThermoFischer Scientific) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Restriktion

DNA-Restriktionen wurden mit *Fast Digest* Enzymen der Firma ThermoFischer Scientific entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend von den Vorgaben wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Sequenzierreaktionen

Die Sequenzierung der DNA-Proben erfolgte durch die Firma GATC Biotech.

2.5 Biochemische Methoden

Proteinextrakt *P. tricornutum*

Für die Isolation von Proteinextrakt wurden Zellvolumina bis 50 ml nach dem Ernten (4.500 g, 10 min, 4 °C) mit Glasperlen (0,1/0,3 mm Mischverhältnis 1:1) versetzt und bei 50 Hz 20 min im TissueLyser LT (Quiagen) aufgeschlossen. Zellvolumina über 50 ml wurden nach dem Ernten mit Hilfe des *French-Press Cell Disruptor* (Polytec/Thermo) bei 1280 psi in 4 Durchgängen aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden Zelltrümmer entfernt (16.000 g, 15 min, 4 °C) und der Überstand für weitere Analysen genutzt.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinproben wurden entsprechend den Herstellerangaben mit Roti[®]-Quant (Carl Roth GmbH+Co) photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand einer BSA-Eichgerade (Bovine Serum Albumin) von 2 bis 10 µg kalkuliert.

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen

Um Phosphorylierungen von Proteinen zu entfernen, wurde die Fast Alkaline Phosphatase (ThermoFischer Scientific, FastAP) nach Herstellerangaben genutzt.

Um eine Phosphorylierung zu erhalten, wurden die Proben mit 40 mM Natriumfluorid und 2 mM Orthovanadat (Vanadyl Ribonucleoside Complex, New England BioLabs) versetzt.

Protein-DNA Bindungstest

Um eine Bindung von Proteinen an Ziel-DNA nachzuweisen, wurde ein Bindungstest durchgeführt. 250 ng DNA wurden mit 0,1- 2,5 µg Protein im Bindungspuffer im Dunkeln (20 min, RT) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

Bindungspuffer pH 7,8	Probenpuffer 6x
17,5 mM Tris-HCl	600 mM Tris-HCl
52,5 mM NaCl	50 % Glycerin
0,35 mM EDTA	0,02 % Bromphenolblau
5 mM DTT	
17,5 % Glycerin (v/v)	

Identifikation von Interaktionspartnern

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern wurden *Pulldown*-Experimente durchgeführt. Das zuvor heterolog isolierte CryP-his (Juhas *et al.*, 2014) wurde an das Säulenmaterial UltraLink® Biosupport (ThermoFischer Scientific, 1 ml Säulenvolumen SV) gebunden. Die Bindung wurde durch Azlacton-Amid-Bindungen hervorgerufen. Hierfür wurden 300 µg Protein mit dem gleichen Volumen Bindepuffer und dem Säulenmaterial (100 mg) inkubiert (1 h, RT, schüttelnd, dunkel). Im nächsten Schritt wurde das Säulenmaterial sedimentiert (1.200 g, 10 min, RT, dunkel). Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Säulenmaterial mit 10 SV Sättigungspuffer inkubiert (2,5 h, RT, schüttelnd, dunkel). In Anschluss wurde das Säulenmaterial zunächst mit 10 SV Waschpuffer inkubiert (15 min, RT, schüttelnd, dunkel) und anschließend mit 20 SV Waschpuffer gewaschen. Die Lagerung der fertigen Säulen erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C für maximal 3 Tage. Für die Isolation der Interaktionspartner wurde das vorbereitete Säulenmaterial mit Proteinextrakt aus *P. tricornutum* (Ausgangsvolumen Kultur 900 ml, 7 Tage kultiviert, 1 h vor Lichtaktivierung geerntet, siehe Abschnitt Proteinextrakt *P. tricornutum*) für 1 h bei 4 °C, im Dunkeln inkubiert. Nach Durchlauf des Proteinextraktes wurde das Säulenmaterial mit 200 SV Waschpuffer gewaschen, und anschließend erfolgte die Elution. Hierfür wurden je 5 x 2 ml Elutionspuffer über das Säulenmaterial gegeben und aufgefangen. Der pH-Wert der Elutionsproben wurden mit 100 µl Neutralisationslösung auf etwa pH 7 – 8 eingestellt.

Bindepuffer pH 8,0	Sättigungspuffer pH 8	Waschpuffer pH 7,8
0,8 M Natriumzitat $C_6H_5Na_3O_7$	1 M Tris	0,5 mM Natrium-Phosphat
0,1 M MOPS		100 mM NaCl
		20 % Glycerin (v/v)

Elutionspuffer pH 2,3

0,1 M Glycin

Neutralisationslösung pH 9

0,1 M Tris-HCl

Als weitere Option, Interaktionspartner zu identifizieren, wurde Histidin-affines Säulenmaterial genutzt (Ni-IDA Sepharose Gel, Biotool). Hierbei wurde das CryP-his Protein (300 µg) eine Stunde mit dem Säulenmaterial (SV = 1ml) im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit Proteinextrakt aus *P. tricornutum* (isoliert wie beschrieben) für eine Stunde im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Der Proteinextrakt wurde in 3 Waschschritten von der Säule entfernt (30 ml Waschpuffer, 30 ml Waschpuffer mit 40 mM Imidazol, 30 ml Waschpuffer mit 80 mM Imidazol) und die Elution erfolgte mit 5 mal 2 ml Elutionspuffer.

Waschpuffer pH 7,8 (PD-Ni)

50 mM Natriumphosphat

100 mM NaCl

20 % Glycerin

Elutionspuffer pH 7,8 (PD-Ni)

50 mM Natriumphosphat

100 mM NaCl

20 % Glycerin

300 mM Imidazol

Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (PAGE)

Die isolierten Proteine wurden in einem Acrylamid-Gelsystem nach Lämmli (Lämmli, 1970) aufgetrennt. Für eine Proteinanalyse mittels Massenspektrometrie wurden Piperazindiacrylamid (AA-PDA)-Gelsysteme genutzt.

Tabelle 4: AA-PDA PAGE. Zusammensetzung des AA-PDA-Gels.

	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O	4,95 ml	6,8 ml
AA-PDA	4,15 ml	1,7 ml
Tris Puffer pH 8,8	3,15 ml	-
Tris Puffer pH 6,8	-	1,25 ml
SDS 10 %	0,125 ml	0,1 ml
TEMED	5 µl	10 µl
APS 10 %	250 µl	100 µl

AA-PDA Lösung	Laufpuffer pH 8,3	Tris-Puffer pH 8,8 (HCl)
375 ml Acrylamid Lösung (40 % Biorad)	0,1 % SDS 0,05M Tris	1,5 M Tris
4 g PDA (Biorad)	0,38 M Glycerin	
Ad 500 ml H ₂ O		

Tris-Puffer pH 6,8 (HCl)

1.5 M Tris

Die Silberfärbung der Gele wurde nach Heukeshoven und Dernick (1986) durchgeführt. Für eine Coomassie-Färbung wurden die Gele für 1- 2 Stunden in Färbelösung inkubiert und anschließend in 10 % Essigsäure entfärbt.

Färbelösung

0,25 % Serva Blue G

10 % Essigsäure (v/v)

Phosphat Affinität SDS-PAGE

Um die Phosphorylierung von Proteinen zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE mit Phos-tag™ Acrylamid AAL-107 (NARD Institute, MANAC Incorporated, Kinoshita *et al.*, 2009) komplementiert. Hierfür wurde der auftrennende Bereich des Gels nach Longoni *et al.* 2015 in zwei Teile unterteilt, ein schweres Trenn- und ein leichtes Trenngel. Zunächst wurde das schwere Trenngel gegossen und mit dem leichten überschichtet. Nach Aushärten wurde ein Sammelgel auf die zwei Teile des Trenngels gegossen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit 20 mAmp pro Gel; der anschließende Transfer der Proteine aus der Phosphat Affinität SDS-PAGE auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran erfolgte mittels Phos-tag™ Transferpuffer mit 2,5 mAmp*cm⁻² für 2,5 h. Die immunologische Analyse erfolgte wie im Folgenden beschrieben (Abschnitt Immunologische Analyse).

Phos-tag™ Laufpuffer	Phos-tag™ Transferpuffer pH 8,3
0,1 M Tris	25 mM Tris
0,1 M MOPS	192 mM Glycin
0,1 % SDS	1 mM EDTA
5 mM NaHSO ₃	20 % Methanol

Schweres Trenngel	Leichtes Trenngel	Sammelgel
357 mM Bis-Tris pH 6,8	375 mM Bis-Tris pH 6,8	375 mM Bis-Tris pH 6,8
30 % Glycerin	8% Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)	4 % Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)
9 % Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)	50 µM Phos-tag™	
0,05 % TEMED	10 mM ZnCl ₂	0,1 % TEMED
0,025 % APS	0,01 % Coomassie	0,05 % APS
	0,05 % TEMED	
	0,05 % APS	

Immunologische Analyse

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (Roth) übertragen. Für den Transfer wurde die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert und auf drei Filterpapieren platziert. Das erste Filterpapier wurde in Anodenpuffer 1 getränkt, während das zweite und dritte Filterpapier mit Anodenpuffer 2 inkubiert wurde. Auf der PVDF-Membran wurde das SDS-Proteingel platziert, nachdem es für 1 h in Transferpuffer inkubiert wurde. Auf das SDS-Proteingel wurden drei weiteren Filterpapieren, die in Kathodenpuffer getränkt wurden, gestapelt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 1,5 Amp*cm⁻², für 55 min. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit Blockierlösung inkubiert (1 h, RT, schüttelnd). Auf das Blockieren folgten drei Waschschrte mit PBS-Puffer (10 min, RT, schüttelnd). Die Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit PBS-Puffer (10 min, RT, schüttelnd) folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1 h, RT, schüttelnd). Für die Detektion der Proteine wurde die Membran für 1 min in ECL-Lösung inkubiert und die Chemilumineszenz mittels Röntgenfilm detektiert.

Anodenpuffer 1 pH 10,4	Anodenpuffer 2 pH 10,0	Kathodenpuffer pH 9,0	Transferpuffer
0,3 M Tris	25 mM Tris	25 mM Tris	25 mM Tris
20 % Methanol (v/v)	10 % Methanol (v/v)	40 mM Glycin	150 mM Glycin
		10 % Methanol (v/v)	20 % Methanol (v/v)

PBS-Puffer pH 7,4	Blockierlösung	ECL-Lösung	In 20 ml:
137 mM NaCl	5 % Milchpulver in PBS	A: 250 mM Luminol (DMSO)	200 µl A, 89 µl B,
2,7 mM KCl		B: 90 mM p-Coumarsäure (DMSO)	2 ml C, 6,1 µl D
1,4 mM KH ₂ PO ₄		C: 1 M Tris pH 8,5	Ad 20 ml H ₂ O
4,3 mM Na ₂ HPO ₄		D: 30 % H ₂ O ₂ -Lösung	

Tabelle 5: Verwendete Antikörper mit Hersteller und Anwendungsvermerk.

Name	Herkunft	Art	Anmerkung	Anwendung
CryP	Juhas <i>et al.</i> , 2014 Eurigenetec	Primär Antikörper	Polyklonal	1: 1.000
Lhcb1	Agrisera	Primär Antikörper	Polyklonal	1:1.000
Anti-polyHistidin	Sigma-Aldrich	Horseradish Peroxidase konjugiert Primär Antikörper	Monoklonal	1:2.000
Anti-GFP	Rockland™	Primärer Antikörper	Polyklonal	1: 5.000
Goat Anti-Rabbit IgG	Calbiochem	Horseradish Peroxidase konjugiert Sekundärer Antikörper	H- & L-Ketten spezifisch, Polyklonal	1:10.000

Protein-Protein-Bindungstest

Um Protein-Protein-Interaktionen mit CryP zu zeigen, wurde ein Bindungstest durchgeführt. Hierfür wurden 0,5 µg des zu untersuchenden potentiellen Interaktionspartners auf eine Nitrozellulose-Membran aufgebracht. Die Membran wurde mit Blockierlösung für 2 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit Na-Phosphatpuffer (Juhas *et al.*, 2014) für 10 min bei 4 °C im Dunkeln. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit 50 µg/ ml CryP in Na-Phosphatpuffer (Juhas *et al.*, 2014) für 2 h im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach der unter Abschnitt „Immunologische Analyse“ beschriebenen Methode. Als erster Antikörper wurde hier der CryP spezifische Antikörper ausgewählt.

Blockierlösung pH 7,8

50 mM Natriumphosphat

100 mM NaCl

20 % Glyzerin (v/v)

5 % Milchpulver

Massenspektrometrie-Analyse

Für massenspektrometrische Analysen (MS-Analyse) wurden die mit Silber gefärbten Proteine aus dem AA-PDA-Gel ausgeschnitten und mit Entfärbelösung für 8 min bei RT entfärbt und vier Mal mit HPLC-Wasser (VWR Chemicals) gewaschen. Die Proteine wurden im Gel tryptisch verdaut und mit nano LC-ESI-MS/MS (UltiMate 3000 nano HPLC (Dionex) und linearem Ionenfallen ESI Massenspektrometer (Finnigan LTQ, Thermo Electron) untersucht (Veith und Büchel, 2007). Die MS-Analysen wurden von W Weisheit (Universität Jena, Allgemeine Botanik, Prof. Dr. M Mittag) durchgeführt.

Entfärbelösung

15 mM $K_3[Fe(CN)_6]$

50 mM NaS_2O_3

Blau- und Rotlicht-Spektroskopie

Um die Auswirkung spezifischer Wellenlängen auf das Absorptionsverhalten des CryP-Proteins zu untersuchen, wurde 1 mg des Proteins mit Blaulicht (SuperFlux LED, Lumitronix, $\lambda_{MAX} = 465$ nm, $4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) bei 4 °C für 30 – 60 sec adaptiert. Des Weiteren wurde eine Rotlichtinkubation (RG 610 Filter, Schott, Ausschluss Wellenlängen ≤ 560 nm) vorgenommen. Die Detektion der Absorption erfolgte mit einem Spektral-Photometer (V-550, JASCO, Messbreite 1 nm, Lichtweg 1 cm) zwischen 300 und 700 nm.

2.6 Bioinformatische Methoden

Transkriptomanalyse

Die Transkriptomanalyse wurde in Kooperation mit Dr. M Eisenhut (Universität Düsseldorf, Biochemie der Pflanzen, Prof. Dr. A Weber) durchgeführt. Die Zellanzucht und Isolation der RNA-Proben erfolgte wie beschrieben. Die Qualitätskontrolle, Herstellung der cDNA-Bibliothek und Sequenzierreaktion wurde von den Kooperationspartnern übernommen. Mit TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) wurden cDNA-Bibliotheken hergestellt, und die Quantifizierung erfolgte mit einem Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Anschließend erfolgte eine gemeinsame Auswertung der Daten.

Qualitätskontrolle Rohdaten

Die erste Qualitätskontrolle der Transkriptomdaten erfolgte mit Hilfe des Programmes FastQC (FastQC High Throughput Sequence QC Report, Version 0.10.1, Babraham Bioinformatics, 2011). Mittels FastQC konnte die Qualität der Sequenzierreaktionen durch Überprüfung des GC-Gehaltes, der Länge und Gleichmäßigkeit der Sequenzierreaktionen sowie dem Vorhandensein überrepräsentierter Sequenzen nachvollzogen werden.

Adapter und Oligonukleotide

Mit Hilfe des Programms Trimmomatic-0.32 (Bolger *et al.*, 2014) wurden Adapter- und Oligonukleotid-Sequenzen der Sequenzierreaktion aus den Daten entfernt. Des Weiteren wurden mit Hilfe des Trimmomatic-0.32 zu kurze oder qualitativ schlechte Sequenzen mit weniger als 36 Nukleotiden entfernt.

Sequenz-Zuordnung

Die Zuordnung der amplifizierten Sequenzen erfolgte in einer Kombination der Programme Bowtie2 (Langmead und Salzberg, 2012), TopHat2 (Kim *et al.*, 2013) und Cufflinks (Trapnell *et al.*, 2012). Für die Zuordnung wurde zunächst eine Referenz-Indexdatei mit Bowtie2 erstellt. Als Referenz-Datenbank wurde hierfür die *Phaeodactylum_tricornutum*.ASM15095v2.32.gtf Datei von EnsemblProtist genutzt. Anschließend wurde TopHat2 genutzt, um die Sequenzen über *Splice*-Stellen hinweg zuzuordnen. Um die Qualität der Zuordnung zu erhöhen, wurde eine weitere Referenz-Genomdatei mit in die Auswertung einbezogen (*Phaeodactylum_tricornutum*.ASM15095v2.cdna.all.fa, EnsemblProtist). Im nächsten Schritt wurde Cufflinks genutzt, um die zugeordneten Sequenzen in absoluten Mengen wiederzugeben (RPKM, *Reads per kilo base per million mapped reads*).

Statistische Auswertung der differentiellen Expression

Die statistische Auswertung der Transkriptomdaten im Hinblick auf die differentielle Expression zwischen *Knockdown*-Mutanten und Wildtyp wurde von Dr. M Eisenhut (Prof. Dr. A Weber, Biochemie der Pflanzen, Universität Düsseldorf) durchgeführt. Hierfür wurde die Anwendung EdgeR genutzt (Robinson *et al.*, 2010) in R (*R Development Core Team*, 2011) und ein Schwellenwert der Signifikanz von $q \leq 0,01$ festgelegt.

Datenbanken

Die Zuordnung der in der NGS identifizierten Gene zu funktionellen Gruppen erfolgte mit Hilfe der Datenbanken Joint Genome Institute (JGI; *P. tricornutum*, Bowler *et al.*, 2008), EnsemblProtist, Mercator Mapman (Thimm *et al.*, 2004; Lohse *et al.*, 2013) Blast2Go und The Arabidopsis Information Resource (TAIR10). Auf Grund der Sequenzunterschiede zwischen *A. thaliana* und *P. tricornutum* führte eine automatische Zuordnung mit Mercator Mapman zu einer Klassifizierung von nur 30 % der Gesamtsequenzen, so dass diese manuell erweitert wurde. Für eine möglichst korrekte Zuordnung wurden die Datenbanken JGI und EnsemblProtist bevorzugt für die Klassifizierung der Gene genutzt. Die Prioritäten wurden wie folgt gesetzt: JGI > EnsemblProtist > Mercator Mapman > Blast2Go > TAIR10. Die Anteile der einzelnen Datenbanken an der Zuordnung der Gene ist in Teil 3.3 Das *P. tricornutum* Transkriptom dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung CryP

Spektroskopie CryP

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des kürzlich identifizierten Blaulichtrezeptors CryP sowie die Untersuchung seiner Rolle innerhalb der Zelle. Um Informationen über die Funktion des CryP-Proteins zu erhalten, wurden zunächst die spektroskopischen Eigenschaften des Proteins und der Einfluss von Licht verschiedener Wellenlängen untersucht. Wie in Juhas *et al.*, 2014 beschrieben, zeigt das Protein eine Hauptabsorption zwischen 350 und 500 nm. Diese stammt von dem Antennen-Chromophor MTHF und dem katalytisch aktiven FAD. Zusätzlich ist eine Absorption zwischen 580 nm und 650 nm erkennbar, welche aus dem neutral radikalischen FADH^{*} resultiert. Für das in Abbildung 4 A heterolog aus *E. coli* isolierte Protein wurde ein Absorptionsspektrum ohne vorherige Belichtung aufgezeichnet, um eine Referenz abzubilden. Die Dunkelreferenz zeigt ein Absorptionsmaximum bei 385 nm sowie Schultern bei 430 nm und 460 nm. Zusätzlich ist eine geringe Absorption bei 595 nm und 650 nm erkennbar.

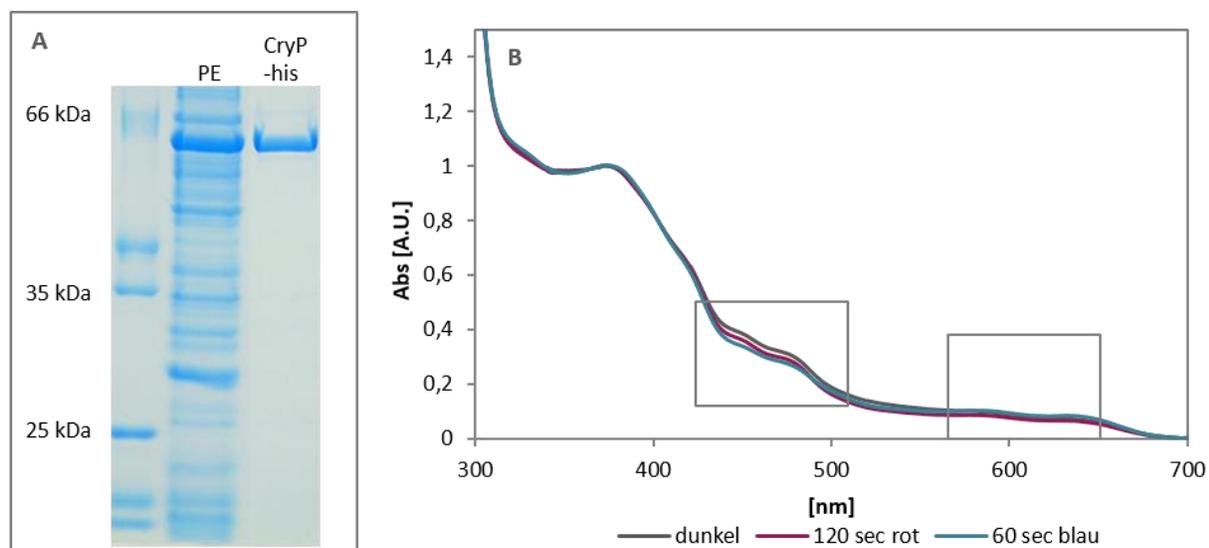


Abbildung 4: Absorptionsverhalten des CryP-Proteins unter wechselnden Lichtbedingungen. In A ist das heterolog exprimierte CryP aus *E. coli* im Proteinextrakt (PE) und nach der Isolation (CryP-his) gezeigt. 1 mg des Proteins wurde für die Spektroskopie in B eingesetzt. Absorptionsspektren wurden direkt nach der Isolation ohne Belichtung (dunkel), nach Rotbelichtung (120 sec, 560 nm - 750 nm, 6 μ E) und anschließender Blaubeleuchtung (60 sec, 465 nm, 4 μ E) aufgezeichnet. Die Messung erfolgte in dem Bereich zwischen 300 nm und 700 nm und wurden auf die maximale Absorption des MTHFs normiert.

Die Belichtung mit Rot- und anschließend Blaulicht zeigt geringe Veränderungen in der Absorption des Proteins in den Bereichen zwischen 420 nm und 500 nm sowie 550 nm bis 670 nm. Um diese geringen Unterschiede deutlicher hervorzuheben, wurden die genannten Ausschnitte der Abbildung 4 in Abbildung 5 vergrößert dargestellt. Die vergrößerte Darstellung der Ausschnitte zeigt den Effekt der Belichtung auf das Absorptionsverhalten des Proteins. Im Bereich 420 nm bis 500 nm (Abbildung 5 A) wird die Absorption durch die Rotlichtinkubation verringert. Durch die anschließende Blaulichtinkubation wird der Effekt weiter verstärkt. Im Wellenlängenbereich zwischen 550 nm und 670 nm wird die Absorption ebenfalls durch das Rotlicht gegenüber der Dunkelreferenz reduziert. Die folgende Belichtung mit Blaulicht führt zu einer stärkeren Absorption bei 595 und 650 nm, die in ihrer Intensität über der Absorption der Dunkelreferenz liegt.

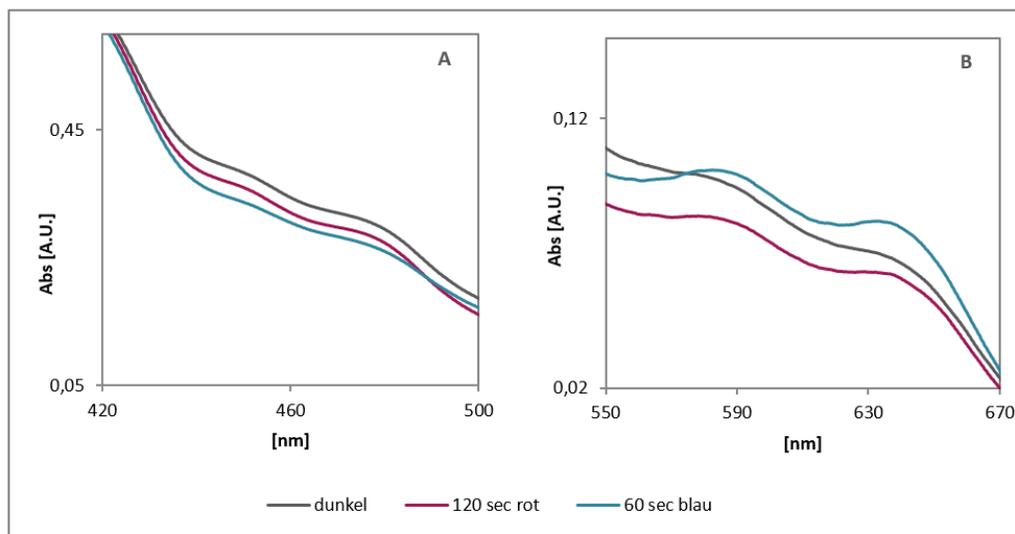


Abbildung 5: Absorptionsverhalten des CryP-Proteins unter wechselnden Lichtbedingungen im Detail. A zeigt den Ausschnitt 420 nm – 500 nm aus Abbildung 4, während in B der Bereich 550 nm – 670 nm gezeigt ist. Das CryP Protein (1 mg) wurde nach der Isolation (dunkel) zunächst Rotlicht (120 sec, 560 nm – 750 nm, 6 μ E) ausgesetzt und anschließend in Blaulicht inkubiert (60 sec, 465 nm, 4 μ E).

Lokalisation des CryPs innerhalb der *P. tricornutum* Zelle

Durch die Inkubation mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen konnte gezeigt werden, dass dies zu einer veränderten Absorption des Proteins führt. Um genauer die Funktion des lichtsensitiven Proteins zu untersuchen, sollte zunächst die Lokalisation geklärt werden. Für pflanzliche Cryptochrome anderer Arten konnten bisher Lokalisationen in unterschiedlichen Organellen der Zelle identifiziert werden, die jeweils einen Hinweis auf die Funktionen geben (Guo *et al.*, 1998; Kleine *et al.*, 2003; Brunelle *et al.*, 2007). Die Lokalisation des Proteins wurde mit Hilfe einer CryP-GFP Fusionierung untersucht. Hierfür wurden fünf

GFP-Konstrukte im Rahmen einer Masterarbeit hergestellt und *P. tricornutum* entsprechend transformiert (Abbildung 6 A, Stefanie Jäger, 2013). Da eine C-terminal gelegene potentielle Kernimportsequenz identifiziert werden konnte wurde das CryP-Protein in zwei unterschiedlichen Varianten mit GFP fusioniert. CryP-GFP zeigt das vollständige Protein mit GFP, während für Short-GFP ausgehend vom Startcodon nur die ersten 24 Aminosäuren mit GFP fusioniert wurden. Wie bereits erwähnt, ist eine N-terminal erweiterte Sequenz des CryP-Proteins vorhanden (ID 34704). Um dies weiter zu untersuchen wurde auch diese Sequenz mit GFP fusioniert (34704-GFP; Abbildung 6). Zudem wurde auch der in der Sequenz 34704 zusätzliche N-terminale Teil mit GFP fusioniert (NT-GFP). Die GFP-Fusionsproteine wurden in den transformierten Zellen von *P. tricornutum* auf Proteinebene mittels Western Blot nachgewiesen (Abbildung 6 B). Das 34704-GFP-Protein hat eine kalkulierte Größe von 120 kDa und konnte oberhalb der 120 kDa Marker-Bande detektiert werden. CryP-GFP, das vollständige Protein der ID 54342, konnte bei einer kalkulierten Größe von etwa 85 kDa detektiert werden. Die N-terminale Erweiterung des Proteins 34704 (NT-GFP) konnte bei etwa 50 kDa identifiziert werden. Die verkürzte Version des CryPs mit GFP fusioniert (Short-GFP) konnte bei 35 kDa nachgewiesen werden. Für die mikroskopische Zuordnung der Organellen innerhalb der Zellen wurde *P. tricornutum* mit einer cytosolischen GFP-Kontrolle transformiert (PK), welche unterhalb der 35 kDa Marker-Bande detektiert werden konnte.

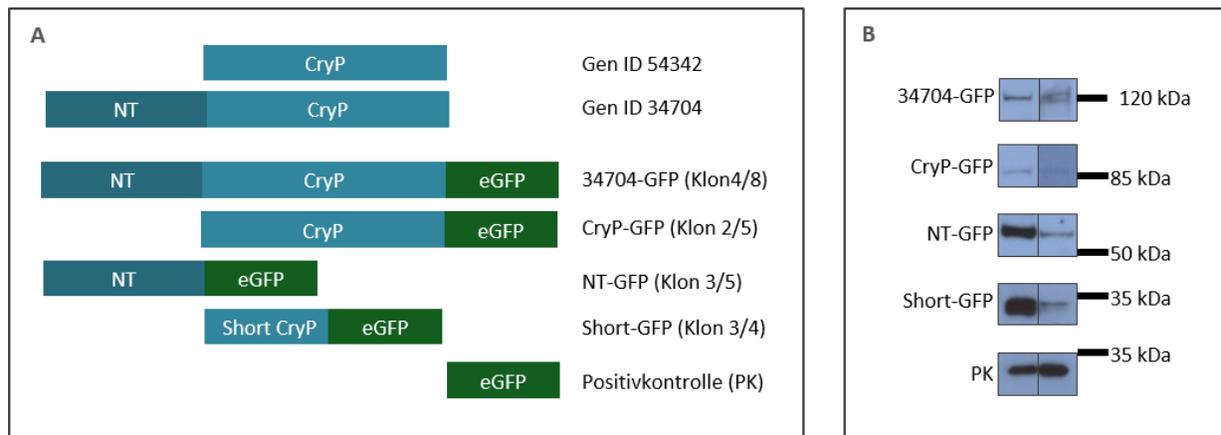


Abbildung 6: Cryptochrom-GFP Fusionsproteine zu Identifizierung der Lokalisation. In **A** ist die schematische Darstellung der Fusionsproteine gezeigt. Die Übersicht zeigt das CryP Gen (ID 54342) und die N-terminal erweiterte Sequenz (ID 34704). Für das Konstrukt Short-GFP wurden 30 Aminosäuren ab dem Startcodon des CryP-Proteins gewählt und mit GFP fusioniert. CryP-GFP zeigt das vollständige Protein mit GFP, NT-GFP die N-terminale Erweiterung ohne CryP und 34704-GFP das Konstrukt aus CryP, der N-terminaler Erweiterung und GFP. PK zeigt die Positivkontrolle, die sich im Cytosol der Zelle befindet. Angegeben sind die Stammmummern der unabhängigen Klone die immunologisch und mikroskopisch untersucht wurden. **B** zeigt die immunologische Detektion der in *P. tricornutum* eingebrachten Fusionsproteine mittels α -GFP Antikörper.

Nachdem die Expression der GFP-Fusionsproteine mittels α -GFP-Antikörper gezeigt werden konnte, wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. Diese Analysen sind in Abbildung 7 A dargestellt. Bei der cytosolischen Positivkontrolle ist das GFP in Grün dargestellt und über das gesamte Zellplasma verteilt. Der Chloroplast, welcher anhand der Chlorophyll Autofluoreszenz identifiziert werden kann, ist in Rot dargestellt (Abbildung 7; Chlorophyll Autofluoreszenz). Die blaue Färbung stellt die mit Hoechst 33342 angefärbte DNA dar und gibt Aufschluss über die Lokalisation des Zellkerns.

Die Untersuchung des Short-Konstruktes zeigt ein über das Cytoplasma verteiltes Signal, vergleichbar mit der cytosolischen Positivkontrolle (PK). Ein Signal im Zellkern kann hier nicht ausgeschlossen werden, während in den Chloroplasten kein GFP nachweisbar ist. Das Signal des CryP-GFP-Konstruktes zeigt eine Überlagerung mit der gefärbten DNA (Abbildung 7). Im Gegensatz zu dem Signal des Short-GFP-Konstruktes breitet es sich nicht über die gesamte Fläche des Zellkerns aus, sondern ist auf einen Teilbereich begrenzt. Zu einem vergleichbaren Ergebnis führte auch die Untersuchung des 34704-GFP Konstrukts, welches ebenfalls mit einem begrenzten Teilbereich des Zellkerns Überschneidungen zeigt. Die Aufnahmen des NT-GFP Proteins zeigen ein deutliches Signal im Bereich des Zellkerns und zusätzlich ist ein schwächeres Signal des GFPs im Cytosol der Zelle erkennbar (Abbildung 7).

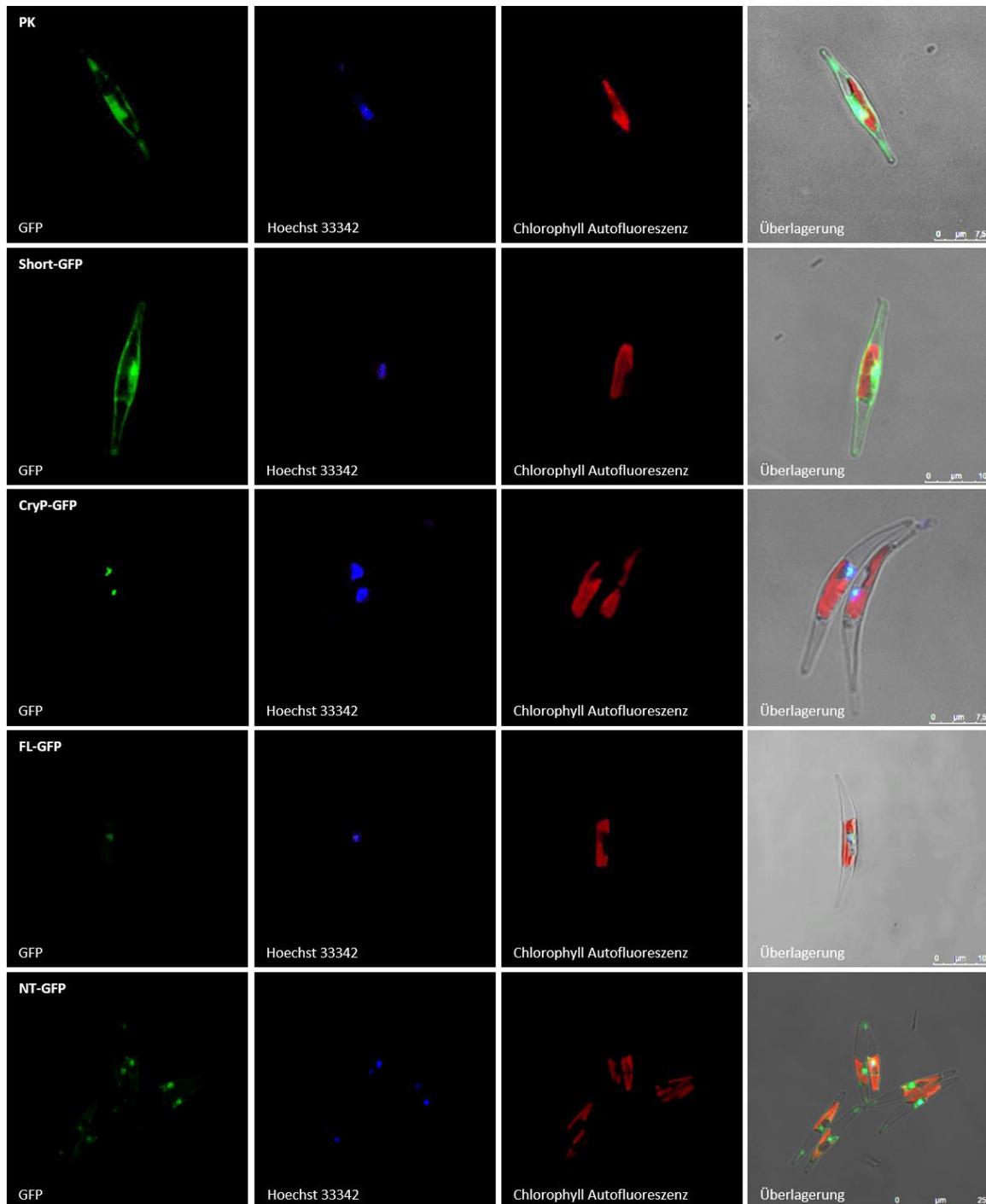


Abbildung 7: Lokalisation der CryP-GFP Fusionsproteine in *P. tricornutum*. Von links nach rechts werden GFP-Fluoreszenz (grün), DNA Färbung mit Hoechst 33342 (blau), Chlorophyll Autofluoreszenz (rot) und Überlagerung der Fluoreszenzkanäle mit einer Durchlichtaufnahme der Zellen gezeigt. Für die Positivkontrolle (PK) wurde eGFP (verbessertes grün fluoreszierendes Protein, GenBank Nummer AAB08060.1) ohne Target-Signal genutzt, welches zu einer cytoplasmatischen Anreicherung führt. Short stellt die ersten 24 Aminosäuren des CryPs ausgehend vom Startcodon dar, während CryP-GFP das vollständige CryP-Protein fusioniert mit GFP zeigt. In Reihe 4 ist das 34704-GFP aus CryP, der N-terminalen Erweiterung und GFP gezeigt, während in Reihe 5 nur die N-terminale Erweiterung (NT) mit dem GFP fusioniert wurde.

DNA-Bindung CryP

Wie bereits erwähnt konnte 2014 ein regulativer Effekt des CryPs auf das Proteinlevel verschiedener Lhcs gezeigt werden (Juhas *et al.*, 2014). Die beschriebene Lokalisation des CryP-Proteins im Zellkern von *P. tricornutum* führt zu mehreren Möglichkeiten für hypothetische Abläufe dieser Regulation. Zum einen könnte CryP als potentieller Transkriptionsfaktor durch eine direkte Interaktion mit der DNA Einfluss auf die Expression weiterer Proteine nehmen. Des Weiteren wäre es möglich, dass eine Interaktion mit weiteren Proteinen über eine Reaktionskaskade die Expression der Gene beeinflusst. Um die erste Möglichkeit der direkten Interaktion mit DNA weiter zu analysieren, wurde die DNA-Bindfähigkeit des Cryptochroms untersucht. Hierfür wurde die Promoter-DNA des *fcpa* Gen (ID 18049) amplifiziert und die DNA-Bindungen in einer Affinitätselktrophorese (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) analysiert. In Abbildung 8 wurde das Protein-DNA-Gemisch nach gemeinsamer Inkubation mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und zunächst die DNA angefärbt (Abbildung 8 A und C). Die Ziel-DNA ist ohne das CryP-Protein unterhalb von 500 bp erkennbar (T, Abbildung 8 A, Spur 1). Durch Zugabe steigender Proteinkonzentrationen (P1 und P2) wird das DNA-Signal bei 500 bp verringert. Zusätzlich ist ein Signal am oberen Rand der Abbildung sichtbar. Als Negativkontrolle wurde BSA mit der Ziel-DNA inkubiert und aufgetrennt, wobei hier nur ein DNA-Signal unterhalb von 500 bp erkennbar ist. An die Färbung der DNA schloss sich eine Detektion der Proteine an (Abbildung 8 C), welche CryP am oberen Rand des Gels zeigt. BSA hingegen führt zu einem Signal in der Mitte des Gels. Ein Vergleich der DNA- und Proteinfärbung zeigt eine Überlagerung der DNA mit dem CryP-Protein in den Spuren P1 und P2, während für BSA keine Überlagerung mit der DNA erkennbar ist. Die Spezifität der möglichen Protein-DNA-Bindung sollte durch die Zugabe genomischer DNA überprüft werden, so dass weitere potentielle Bindemotive für das Protein zur Verfügung stehen. Die Zugabe der genomischen DNA kann bei einer unspezifischen Protein-DNA-Bindung zur Verdrängung der Promotor-DNA (Ziel-DNA) führen. In Abbildung 8 B erkennt man mit zunehmender Konzentration der genomischen DNA ein verstärktes Signal der Ziel-DNA bei ca 500 bp, während eine CryP Ziel-DNA Mischung ohne genomische DNA zu einem reduzierten Signal bei 500 bp führt (P1, Abbildung 8 C). Nach Zugabe genomischer DNA ist das Proteinsignal von CryP in der Mitte des Gels erkennbar und zeigt eine Überlagerung mit genomischer DNA, während die eigentliche Ziel-DNA bei 500 bp erkennbar ist.

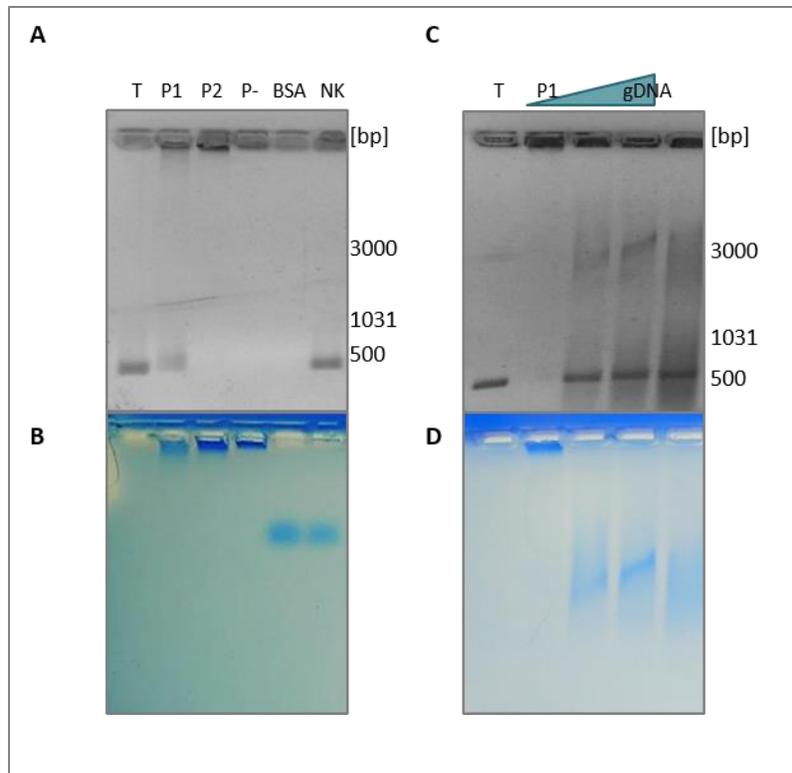


Abbildung 8: DNA-Bindefähigkeit des CryP-Proteins. A und C zeigen die DNA-Färbung (Ethidiumbromid) der Affinitätsselektrophorese, während B und D den Proteinnachweis (Coomassie Serva Blue G) zeigen. Als Ziel-DNA (Target, T, 100 ng) wurde für A und B ein Teilbereich der *fcpa* Promotorregion gewählt, während für C und D die vollständige Promotorregion genutzt wurde. In P1 wurde 1 µg CryP mit 100 ng der Ziel-DNA inkubiert, während in P2 die Menge des CryPs auf 2 µg erhöht wurde. Für die genomische DNA wurde ein Gradient von 1 – 3 µg DNA gewählt, welcher zu 1 µg CryP und 100 ng Ziel-DNA zugegeben wurde. BSA zeigt den Interaktionstest mit Bovine Serum Albumin (BSA) anstelle des CryP-Proteins. In der Negativkontrolle (NK) ist ein CryP zugegeben.

3.2 Protein-Protein-Interaktionen

Die Untersuchung der DNA-Bindefähigkeit des CryP-Proteins konnte keine spezifische Bindung des Proteins an die angebotene Ziel-DNA zeigen. Dies könnte auf eine Signalweiterleitung durch eine Reaktionskaskade mit weiteren Proteinen hinweisen. Um einen potentiellen Reaktionsmechanismus und mögliche Interaktionspartner zu identifizieren, wurde ein *Pulldown*-Verfahren angewendet. Hierfür wurde das heterolog in *E. coli* exprimierte und isolierte CryP (Abbildung 9) kovalent an eine Matrix gebunden und mit Proteinextrakt aus *P. tricornutum* inkubiert. Durch eine Wechselwirkung mit CryP sollten die entsprechenden Interaktionspartner bei Waschkvorgängen zurückgehalten werden, während nicht wechselwirkende Proteine von der Matrix entfernt wurden.

Die Suche nach Interaktionspartnern führte zu zwei reproduzierbaren Proteinsignalen (Abbildung 9, *Pulldown* PD 1-3) bei etwa 22 und 12 kDa. Ein weiteres Proteinsignal zwischen 72 und 95 kDa konnte nicht reproduziert werden, während das in PD2 auftretende 72 kDa Signal vermutlich auf nicht vollständig gebundenes CryP zurückzuführen ist.

Als Negativkontrolle wurde die Suche nach Interaktionspartnern mit Albumin an der Stelle des CryPs wiederholt. Hier konnten die charakteristischen Banden bei 22 und 12 kDa nicht identifiziert werden. Mit einem Wechsel der Säulenmatrix konnten zusätzliche Proteinsignale in dem Bereich zwischen 94 und 45 kDa angereichert werden (Abbildung 9; Ni, Ni-IDA Sepharose). Um die potentiellen Interaktionspartner zu identifizieren, wurde die gesamte Probe in 16 Teile aufgetrennt und die Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert.

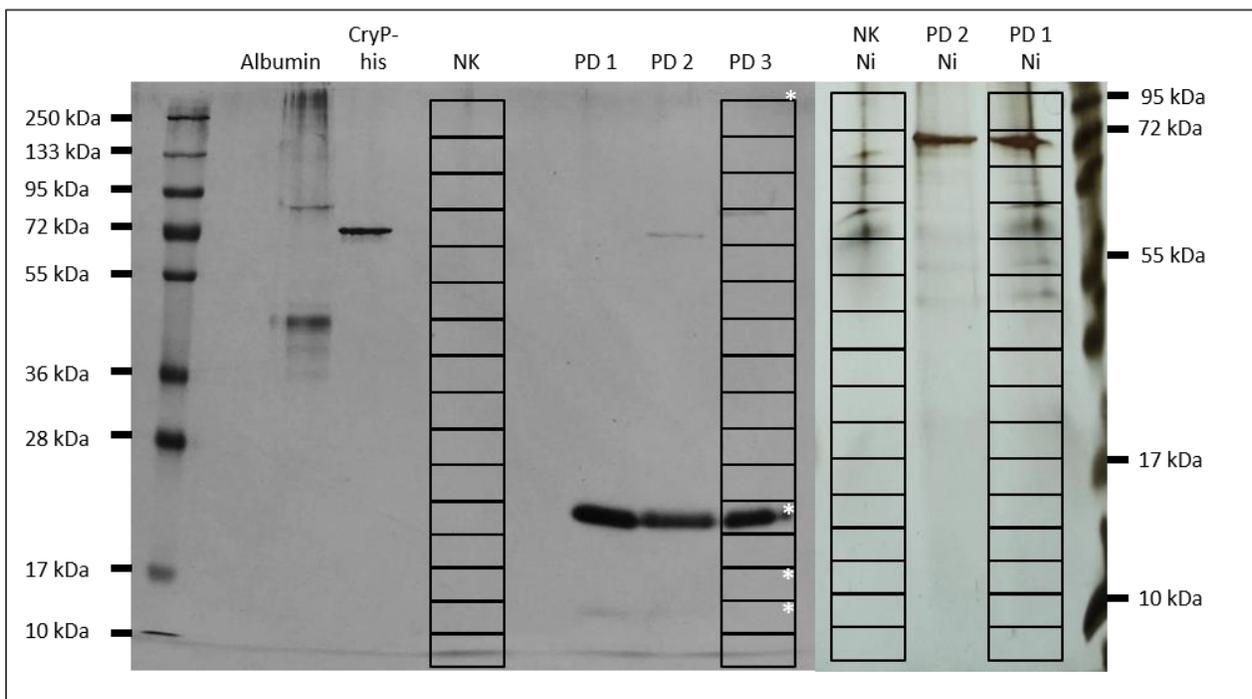


Abbildung 9: Potentielle Interaktionspartner des CryP-Proteins, identifiziert mittels *Pulldown*. Die mit Ni markierten Proben wurden mittels *Pulldown* (PD) isoliert, in welchem das Säulenmaterial Ni-IDA Sepharose verwendet wurde. Für die weiteren Proben wurde UltraLink® Biosupport als Säulenmaterial verwendet. PD1-3 zeigen unabhängige Isolationen potentieller Interaktionspartner. Die PD-Isolationen wurden im Dunkeln ohne Belichtung durchgeführt. NK zeigt die Negativkontrollen, in der CryP durch Albumin ersetzt wurde. CryP-his zeigt das für die Interaktionsstudien verwendete Cryptochrom-Protein. Albumin zeigt das in der NK eingesetzte Protein Albumin. Die schwarzen Rahmen markieren die in der Massenspektrometrie untersuchten Proben. In den mit * markierten Feldern konnten die weiter untersuchten potentiellen Interaktionspartner identifiziert werden.

Die massenspektrometrische Auswertung der im *Pulldown* identifizierten Proteine führte zu einer Reihe potentieller Interaktionspartner, die in Tabelle 6 dargestellt sind. Gezeigt sind die ausschließlich in den *Pulldown*-Experimenten identifizierten Proteine. Falsch positiv identifizierte Proteine, die ebenfalls in der Negativkontrolle nachweisbar sind, wurden nicht weiter berücksichtigt. Der größte Teil der isolierten Proteine ist den Ribosomen (rot, Tabelle 6) und somit der Translation zuzuordnen. Weiterhin wurden acht Proteine unterschiedlicher Funktion identifiziert, wie die DNA bindenden Proteine Histon4 und Chromatin remodellierendes Protein SWI-SNF. Außerdem konnte der potentielle Translationsfaktor CSDP (*Cold shock DNA binding protein*, Gen ID 15211, gelb) und der mögliche Transkriptionsfaktor Bola (Gen ID 14849, gelb) isoliert werden. Zusätzlich wurde das Protein AAA (Gen ID 42612, grau) mit bisher unbekannter Funktion identifiziert.

Tabelle 6: Potentielle Interaktionspartner des CryP-Proteins. Die dargestellten Proteine konnten in den beschriebenen *Pulldown*-Verfahren mittels Massenspektrometrie (W Weisheit, Prof. Dr. M Mittag, Universität Jena) identifiziert werden. Die rot hinterlegten Zeilen markieren Proteine der Translation, grüne Zeilen zeigen Proteine des Energiemetabolismus. Violette Zeilen stehen im Zusammenhang mit dem Vitaminmetabolismus. Gelbe Zeilen markieren Proteine im Zusammenhang mit DNA und Regulation, während grau hinterlegte Zeilen für funktionell unbekannte Proteine stehen. Wiederholungen in den Sequenzen zeigen eine mehrfache Identifikation der Sequenz in unterschiedlichen MS-Analysen. „Unique“ gibt die Anzahl der identifizierten Sequenzen des Proteins an, während die Spalte „Peptide“ die Häufigkeit der einzelnen Sequenzen wiedergibt. „XCorr“ (*Cross correlation*) gibt die Qualität des identifizierten Peptidspektrums und Gen ID die Identifikationsnummer wieder.

Name	Gen ID	Unique	Peptide	XCorr	Identifizierte Sequenz
RP L3	10617	6	1	4.42	DGYDSIQIGYGNVLSK
			5	5.27	IGmTQIFDESGNIIPVTILK
				4.66	DGYDSIQIGYGNVLSK
				3.80	IIQINSEENILVIK
			5	5.42	DGYDSIQIGYGNVLSK
				5.41	IGmTQIFDESGNIIPVTILK
				3.88	IIQINSEENILVIK
RP L5 60S	23324	1	3	4.38	VLEQLTGQQPVFSK
RP L6E	34146	2	3	4.63	SITPGTVLILAGR
				3.43	VDAASITDEYFSR
RP L7 60S	22774	2	2	3.33	VAGGFYVPAEPK
				3.05	QAQTYQDEYAAAEK
RP L7A	23079	4	9	3.65	TAAAVALTGVDK
				3.21	YNDNPELLR
				3.02	HITTLVEEK
				4.40	NEAmTVFTLLNK
RPL10a	28359	1	2	3.54	FPTLLSGSDDmQEK
RP L15e 60S	25714	3	6	3.43	YYEVILVDPNHPK
				3.67	VLNSYVWNQDATMK

Ergebnisse

			1	3.39	YYEVILVDPNHPK
RP L18AE	36226	2	5	4.36	LTGAVSQLYDEmAGR
				3.53	LTGAVSQLYDEMAGR
RP L20	16511	1	2	3.09	mLSQIAVLDTVAFK
RP L27	17846	2	4	3.66	AVDEADLVDAER
			1	3.39	AVDEADLVDAER
Pyridoxal 5'-phosphat	4413	4	4	5.00	AGAVTQDEYLAAKPDAVSEFGPK
Vitamin B6 Metabolismus				3.15	GIGFLPQSFK
			5	5.15	AGAVTQDEYLAAKPDAVSEFGPK
				3.21	GIGFLPQSFK
psbA D1 Photosystem II	1184110	1	1	3.28	VINTWADIINR
Elf1 alpha	28737/ 18475	1	2	3.37	IGGIGTVPVGR
Histon H4	26896	4	2	3.37	ISGLIYEETR
			8	3.76	ISGLIYEETR
				3.09	TVTAmDVVYALK
				3.01	DNIQGITKPAIR
SWI-SNF Chromatin remodelierendes Protein	49414	1	1	2.93	NGKFDTAKEmSELSQmDR
Transkriptionsinitiations Faktor	50377	1	2	3.14	FKRCPTCGNNDQANFILDR
AAA	42612	2	2	3.44	mDGDVPDIVQAVSK
				3.38	AQDSLQGTLDK
		3	9	4.23	TGIQIYNYFATLDEK
				3.82	mDGDVPDIVQAVSK
				3.37	AQDSLQGTLDK
		4	9	4.20	TGIQIYNYFATLDEK
				4.10	mDGDVPDIVQAVSK
				3.64	AQDSLQGTLDK
				3.41	APVSSSALVPIK
CSDP	15211	2	3	5.63	SLADGEAVEYVVEEDSNGR
				3.75	AVQVTGPGGEEVQGAPFRPSNDYDSY
BolA	14849	1	1	3.02	LVNEALAPQLAGPVHALSIVAK

In 3.1 (DNA-Bindung CryP) konnte bereits gezeigt werden, dass CryP in der Lage ist, DNA zu binden. Um eine Kontamination der Interaktionsstudien durch eine unspezifische DNA-Bindung der potentiellen Interaktionspartner auszuschließen, wurde CryP im Folgenden durch das Protein CPD II aus *Methanosarcina mazei* ersetzt. Die heterologe Expression und Isolation wurde von E Ignatz (Prof. Dr. LO Essen, Universität Marburg) durchgeführt. Bei CPD II handelt es sich um eine CPD-Photolyase, von der eine DNA-Bindung bekannt ist (Kiontke *et al.*, 2011). Die Interaktionsstudie mit CPD II und dem *P. tricornutum* Proteinextrakt zeigte ein Signal unterhalb von 25 kDa. Das Signal liegt direkt unterhalb der Bande, die durch die CryP-Interaktionsstudien identifiziert werden konnte. Um mögliche falsch positiv identifizierte Interaktionspartner auszuschließen, wurden die gefunden Proteinsignale der CPD II Interaktionsstudie mittels MS identifiziert.

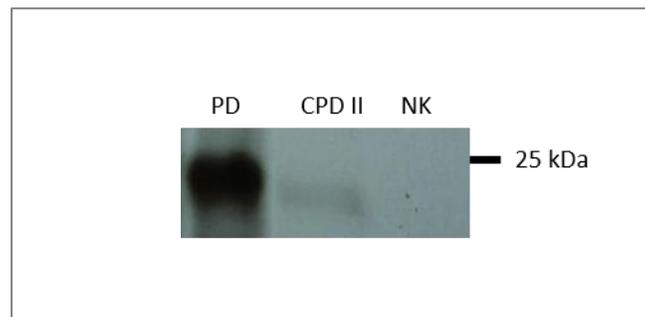


Abbildung 10: Interaktionsstudien mit CPD II Photolyase *M. mazei* mit Proteinextrakt der Diatomee *P. tricornutum*. PD (*Pulldown*) zeigt das prominente Proteinsignal bei etwa 25 kDa, welches in den CryP-Interaktionsstudien identifiziert werden konnte. CPD II zeigt ein Proteinsignal etwas unterhalb von 25 kDa. Es geht auf eine Interaktionsstudie zurück, in der CryP durch CPD II ersetzt wurde. In NK (Negativkontrolle) ist CryP durch Albumin bovine (Serva) ersetzt.

Durch eine MS-Analyse (W Weisheit, Prof. Dr. M Mittag, Universität Jena) konnten die folgenden sechs Peptide in der CPD II Interaktionsstudie identifiziert werden (Tabelle 7). Zwischen den identifizierten Proteinen des CPD II und des CryP *Pulldowns* konnten jedoch keine Übereinstimmungen festgestellt werden. Zu den identifizierten Proteinen gehören mehrerer DNA bindende Proteine wie HSF-Proteine (*Heat Shock Factor*) sowie der Rotlichtrezeptor Phytochrom DPH.

Tabelle 7: MS-Analyse der CPD II (*M. mazei*) Interaktionsstudie. Die Peptide konnten in dem Bereich zwischen 17 und 28 kDa identifiziert werden. „Unique“ gibt die Anzahl der identifizierten Sequenzen des Proteins an, während die Spalte „Peptide“ die Häufigkeit der einzelnen Sequenzen wiedergibt. „XCorr“ (*Cross correlation*) gibt die Qualität des identifizierten Peptidspektrums an. Gen ID zeigt die Identifikationsnummer der entsprechenden Gene.

Name	Gen ID	Unique Peptide	Peptide Gesamt	XCorr	Identifizierte Sequenz
Potentielle Serin-Endopeptidase	41359	1	2	2.99	VTALTVAVDNDLLVR
Hitzeschock-Protein Hsp 90	18793	1	2	2.97	LNDILVCVVNGAK
DNA bindender Hitzeschock Faktor HSF	31764	1	1	4.15	GEYHGFTAERSGGYTYR
Phytochrom DPH	54330	1	1	2.97	IVLGDPLLVPK
potentielle Helikase	44767	1	1	2.83	LEQAPKIAPTVDLQSRDAIK
potentielles Myosin Klasse II, schwere Kette	37734	1	1	2.8	EDLLSGILEEIGGPR

Wie bereits in Teil 1.3 (Cryptochrome-Photolyase-Familie) für die pflanzliche und tierische Cryptochrome beschrieben, sind diese Teil regulativer Mechanismen, welche die Expression verschiedener Gene unter anderem über Transkriptionsfaktoren steuern. Nach diesem Kriterium wurden die potentiellen Interaktionspartner für eine weitere Charakterisierung ausgewählt. Die Proteine BOLA (ID 14849) und CSDP (ID 15211) sind bereits als Transkriptions- und Translationsfaktoren beschrieben (Tabelle 6; Juntawong *et al.*, 2013; Dressaire *et al.*, 2015) und kommen für einen regulatorischen Mechanismus in Frage. Das Protein AAA (ID 42612) bildet in den *Pulldown*-Experimenten das dominante Proteinsignal (Abbildung 9) und ist als am stärksten vertretenes und bisher funktionell unbekanntes Protein von Interesse. Um für diese Proteine eine Interaktion mit CryP zu verifizieren und eine weitere Charakterisierung zu ermöglichen, wurden sie heterolog in *E. coli* exprimiert und isoliert.

Expression Interaktionspartner

Als Expressions-System für die Interaktionspartner wurde das in Juhas *et al.*, 2014 beschriebene pET303-CT Plasmid mit induzierbarem T7-Promoter gewählt. Es ermöglicht eine Isolation der Proteine mittels sechsfach Histidin-Motiv. In Abbildung 11 ist die Kontrolle der Expressions-Plasmide (A) sowie die heterologe Expression und Isolation aus *E. coli* dargestellt (B). Die Kontrolle der Expressionsvektoren erfolgte mittels PCR (Abbildung 11 A) und Sequenzierung (Abbildung A 1; Abbildung A 2). Die Untersuchung der Expression-Vektoren mittels PCR bestätigt die erwarteten Konstrukt-Größen von 432 bp für CSDP-his, 544 bp für BOLA-his und 886 bp für AAA-his. Zusätzlich ist die Negativkontrolle mit Ausgangsvektor gezeigt

(257 bp), welche als Kontrolle für die folgenden Experimente genutzt wurde. Die Expression und Isolation der Proteine zeigt das für CryP-his bekannte Signal bei 70 - 85 kDa nach Coomassie-Färbung (Abbildung 11 B; Juhas *et al.*, 2014). Auf der gleichen Höhe ist ebenfalls mit den α -His und α -CryP Antikörpern ein Signal erkennbar. Für die Interaktionspartner konnten in der Coomassie-Färbung (CF, Abbildung 11 B) Proteinsignale bei 35 kDa für AAA-his, 20 kDa für Bola-his und 18 kDa für CSDP-his gezeigt werden. Diese Signale weichen zwischen 5 kDa und 10 kDa von den mittels ExPASy kalkulierten Proteingrößen ab, was auf das zusätzliche Histidin-Motiv zurückzuführen ist (25 kDa AAA, 14 kDa Bola und 10 kDa CSDP). Mittels immunologischer Detektion wurden für die Proteine AAA-his, Bola-his und CSDP-his Signale auf Höhe der Coomassie-Färbungen für den α -His-Antikörper nachgewiesen (α -His, Abbildung 11 B). Eine weitere Detektion der Proteine mit dem α -CryP-Antikörper, welche durchgeführt wurde, um eine Kontamination der Proteinproben in Interaktionsstudien auszuschließen, zeigt nur Signale für das isolierte CryP-his. Für die weiteren Proteine sind hierfür keine Signale erkennbar.

Um eine Interaktion zwischen CryP und den mittels MS identifizierten Proteinen zu überprüfen, wurden im folgenden *in vitro*-Interaktionstests durchgeführt. Dafür wurden zusätzlich zu dem leeren Ausgangsvektor das mit sechsfach Histidin-Motiv versehene Protein Psb27-his (*A. thaliana*, F Flügge, Prof. Dr. C Büchel, Universität Frankfurt) und die Photolyase CPD II (*M. mazei*, E Ignatz, Prof. Dr. LO Essen, Universität Marburg) sowie Albumin als Kontrollen des *in vitro*-Interaktionstests genutzt. Für die Proteine konnten die erwarteten Größen (Psb27-his: 20 kDa, persönliche Kommunikation F Flügge, CPDII: 50 kDa, persönliche Absprache E Ignatz, Albumin: 45 kDa) durch Silberfärbung gezeigt werden (SF, Abbildung 11 C). Die immunologische Kontrolle der Proteine zeigt ein 20 kDa Signal für Psb27-his mit dem α -His-Antikörper. Für die Proteine CPD II und Albumin sind keine immunologischen Signale nachweisbar.

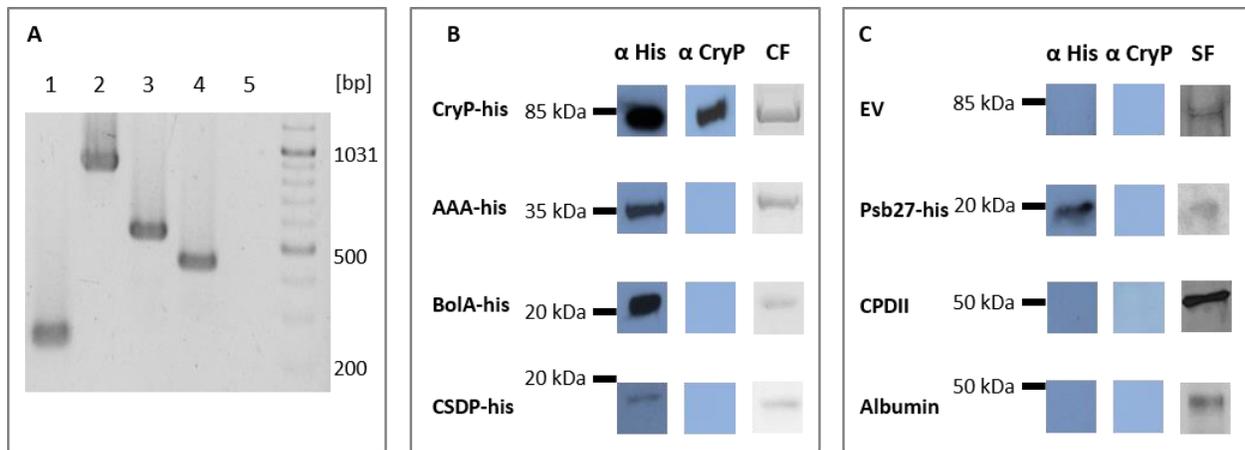


Abbildung 11: Heterologe Expression und Isolation der identifizierten Interaktionspartner. **A** zeigt die Kontrolle der Expressionsvektoren der potentiellen Interaktionspartner mittels PCR. Als Kontrolle (1) dient der Ausgangsvektor pET303_CThis (190 kDa), zusätzlich sind pET303_AAHis (2; D Radev, Prof. Dr. C Büchel, Universität Frankfurt; 886 bp), pET303_BolAHis (3; 544 bp), pET303_CSDPHis (4; 436 bp) gezeigt. Spur 5 zeigt die Negativkontrolle. In **B** ist die Detektion der in *E. coli* (BL21 Codon+) heterolog exprimierten Interaktionspartner gezeigt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels α -Histidin Antikörper (je 0,5 μ g Protein). Mit der α -CryP Detektion wurde das Cryptochrom überprüft (je 1 μ g Protein). CF zeigt die Coomassie-Färbung der entsprechenden Proteine (je 1 μ g Protein). **C** zeigt die Kontroll-Proteine. Für EV (*Empty Vector*) wurde der Proteinextrakt aus den mit Ausgangsvektor transformierten Zellen isoliert (*E. coli*, BL21 Codon+). Außerdem wurden Psb27-his (*A. thaliana*, F Flügge, Prof. Dr. C Büchel, Universität Frankfurt), CPD II (*M. mazei*, E Ignatz, Prof Dr. LO Essen, Universität Marburg) und Albumin genutzt. SE zeigt den Nachweis der Proteine mittels Silberfärbung; es wurden je 0,5 μ g Protein aufgetragen.

Protein-Protein-Interaktion

Um die identifizierten potentiellen Interaktionspartner zu verifizieren, wurden die in Abbildung 11 dargestellten Proteine für einen *in vitro*-Interaktionstest genutzt. Hierfür wurden die zu testenden Proteine im nativen Zustand auf einer Nitrocellulose-Membran aufgebracht und nach Blockierung der freien Bindestellen mit gelöstem CryP-his inkubiert. Bei einer Interaktion des CryPs mit den angebotenen Interaktionspartnern verbleibt es auf der Membran und kann so mittels spezifischem α -CryP-Antikörper detektiert werden. In Abbildung 12 ist die Interaktion des CryP-Proteins mit den Proteinen AAA-his, BolA-his und CSDP-his dargestellt. Das CryP wurde als Positivkontrolle zusätzlich auf die Membran aufgebracht (PK). Um die Spezifität der Protein-Protein-Interaktion zu verifizieren wurde Proteinextrakt der Leerkontrolle (EV), das Protein Psb27-his, die Photolyase CPD II und Albumin als Negativkontrolle genutzt. Die erste Reihe zeigt die Kontrolle der aufgetragenen Proteine mittels α -His Antikörper. Hierbei sind deutliche Signale für CryP, die potentiellen Interaktionspartner und Psb27-his erkennbar. Reihe zwei zeigt die Detektion des CryPs nach dem Interaktionstest mit einer CryP-his-Lösung. Hier sind α -CryP Signale für die Positivkontrolle sowie für die Proteine AAA-his, BolA-his und CSDP-his nachweisbar. Als Kontrolle

des *in vitro*-Interaktionstests wurde die CryP-his-Lösung durch eine Puffer-Lösung ersetzt. Nach Durchführung des Interaktionstests und der Detektion des α -CryP-Antikörpers (Abbildung 12, Reihe 3) ist für das direkt aufgetragene CryP (PK) ein Signal erkennbar. Für die weiteren getesteten Proteine sind hingegen keine Signale nachweisbar.

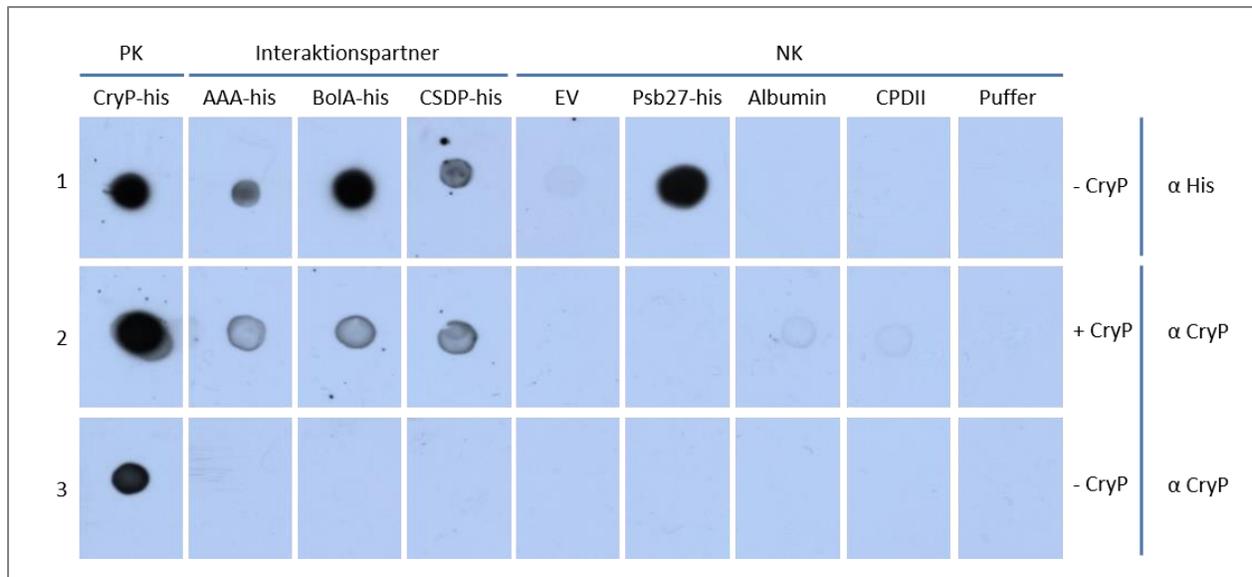


Abbildung 12: *In vitro* Interaktion des CryPs mit heterolog exprimierten Interaktionspartnern. Reihe 1 zeigt die Kontrolle der auf die Membran aufgetragenen Proteine mittels α -His Antikörper. In Reihe 2 ist die Detektion des CryP Proteins durch den α -CryP Antikörper gezeigt. Die Membran wurde nach Blockierung der freien Bindestellen mit aus *E. coli* isoliertem CryP-his inkubiert (+ CryP, 50 μ g/ml). In Reihe 3 wurde die α -CryP-Detektion ohne die vorangestellte CryP-his-Inkubation durchgeführt (- CryP). Auf die Nitrozellulosemembran wurden je 0,5 μ g der Proteine CryP-his (Positivkontrolle PK), AAA-his, Bola-his und CSDP-his aufgetragen. Als Negativkontrolle NK dienten je 0,5 μ g des Gesamtproteinextrakts des EV-Konstruktes (Leerkontrolle Expressionsplasmid) und 0,5 μ g der Proteine Psb27-his, Albumin und CPDII.

Umgekehrter Pulldown

Um die Interaktion zwischen CryP und den potentiellen Interaktionspartnern nach der *In vitro*-Interaktion weiter zu verifizieren, wurde das in Abbildung 9 beschriebene *Pulldown*-Experiment umgekehrt. Die heterolog exprimierten Interaktionspartner AAA-his, Bola-his und CSDP-his wurden immobilisiert und genutzt, um CryP aus *P. tricornutum* zu isolieren und so eine Interaktion zwischen den Proteinen nachzuweisen. Die isolierten Proteine wurden immunologisch auf die Anwesenheit von CryP untersucht. Abbildung 13 A zeigt die Auftrennung der isolierten Proteine. Sowohl für die untersuchten Interaktionspartner als auch für die Kontrolle mit Proteinextrakt der Ausgangsvektor-Kontrolle sind zwei

Signale zwischen 50 und 85 kDa erkennbar. Hierbei entspricht das Signal bei 85 kDa in etwa der Größe des CryPs (PK). In den BoIA-Fractionen ist ein weiteres Signal bei etwa 20 kDa erkennbar.

Für eine weitere Identifikation wurde CryP immunologisch mit dem spezifischen Antikörper α -CryP nachgewiesen (Abbildung 13 B). Ein deutliches Signal ist für CryP (PK) erkennbar. Für die von AAA-his und CDSP-his stammenden Proben ist ebenfalls jeweils ein Signal für α -CryP zu sehen. Für BoIA ist ein sehr schwaches Signal nachweisbar, während für die Kontrolle des Ausgangsvektors (EV) kein Signal für α -CryP zu erkennen ist.

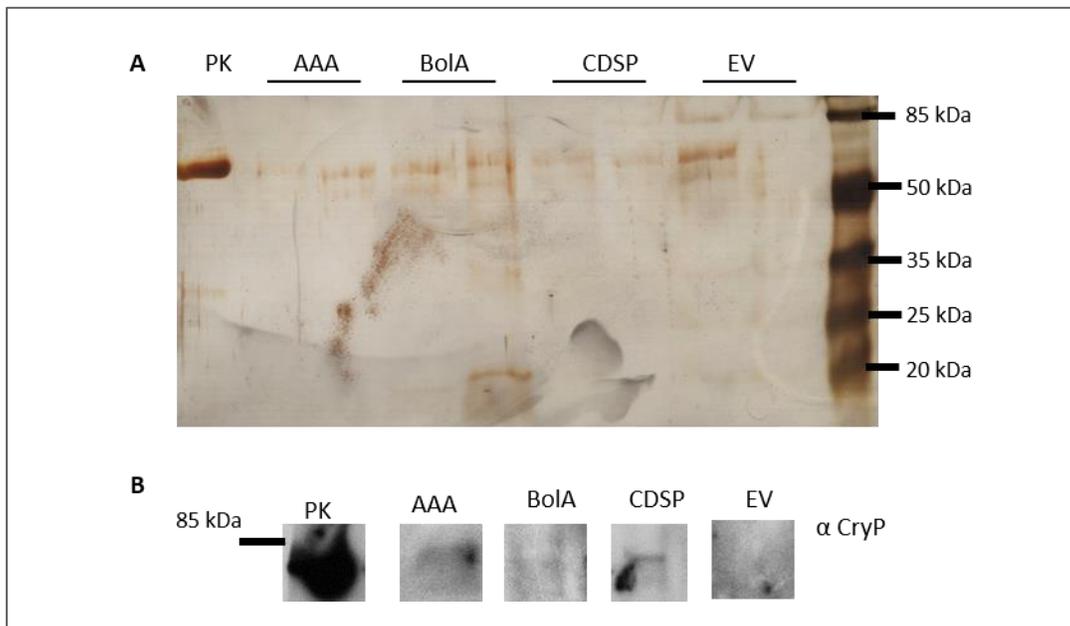


Abbildung 13: Umgekehrter *Pulldown* zur Verifikation der Interaktion zwischen CryP und den Proteinen AAA, BoIA und CSDP. Die in **A** gezeigten Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Als Positivkontrolle (PK) wurde CryP-his eingesetzt (0,2 μ g). Für den *Pulldown* wurden die Proteine AAA-his (AAA), BoIA-his (BoIA), CSDP-his (CSDP) sowie EV (Leerkontrolle Expressionsplasmid) an Säulenmaterial gekoppelt und mit Gesamt-Proteinextrakt (*P. tricornutum*) inkubiert. Der immunologische Nachweis des CryP-Proteins in **B** erfolgte mit dem α -CryP Antikörper.

Phosphorylierung des Cryptochroms

Nach der Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern wurde die Signalweiterleitung und mögliche Wirkmechanismen untersucht. Für *A. thaliana* konnte eine Phosphorylierung der C-terminalen Erweiterung des Cry1- und Cry2-Proteins im Zusammenhang mit Protein-Protein-Interaktionen gezeigt werden (Bouly *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2013). Für die weitere Untersuchung einer potentiellen Reaktionskaskade wurde CryP hinsichtlich möglicher Phosphorylierungen untersucht. Phosphorylierungsstellen für Proteine sind die Aminosäuren Serin (S), Threonin (T) und Tyrosin (Y). Die Sequenz des C-terminalen Teils des CryP-Proteins wurde in Abbildung 14 hinsichtlich dieser Aminosäuren untersucht. Serine und Threonine wurden durch schwarze Färbung gekennzeichnet. Die strukturellen Unterteilungen des Proteins mit den Bindestellen der Kofaktoren sind farblich abgesetzt. Der C-Terminus ist in Blau dargestellt. Hier sind fünf Serine an den Positionen 529, 559, 581, 582 und neun Threonine an den Positionen 533, 537, 556, 558, 560, 566, 569, 570 und 572 erkennbar. Sie bieten potentielle Phosphorylierungsstellen. Tyrosin ist dagegen nicht im C-terminalen Teil von CryP zu finden.

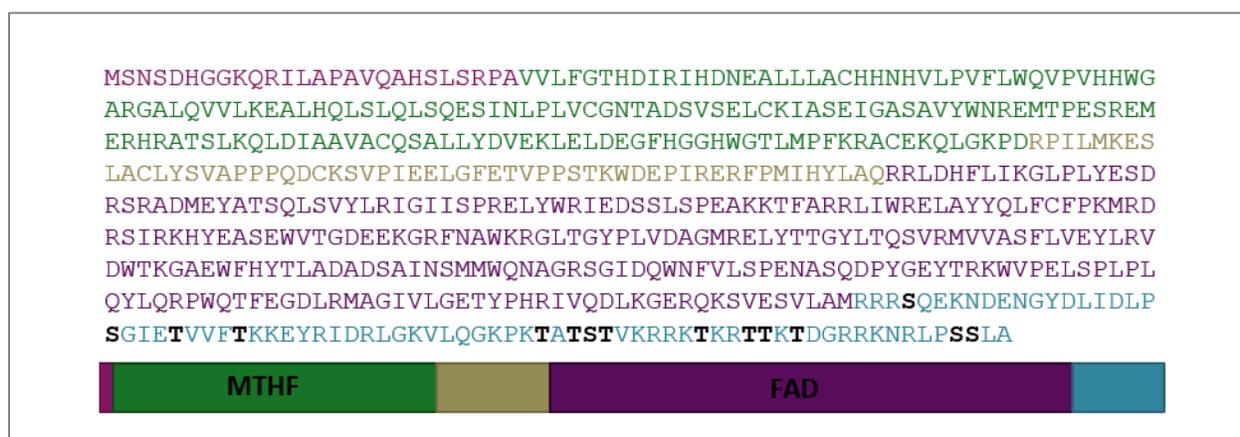


Abbildung 14: Sequenzanalyse des CryP-Proteins aus *P. tricornutum* zur Identifizierung möglicher Phosphorylierungsstellen. Die Einteilung der Proteinsequenz in die gekennzeichneten Bereiche erfolgte nach Juhas *et al.* (2014) und NCBI BLAST. Ausgehend von Cry1 *A. thaliana* wurden die C-terminalen Serine und Threonine schwarz gekennzeichnet. Diese stellen mögliche Phosphorylierungspositionen dar. Die PHR-Domäne mit Bindestellen der Kofaktoren MTHF und FAD ist in grün, braun und violett dargestellt. Der C-Terminus ist in Blau gekennzeichnet.

Um die Phosphorylierung des CryP-Proteins zu untersuchen, wurden Phos-tag™-Gele verwendet. Hierbei werden phosphorylierte Proteine bei der elektrophoretischen Auftrennung in dem SDS-Gel durch einen zugesetzten Metallkomplex nach Kinoshita *et al.* (2009) zurückgehalten. Entsprechend dem Grad der Phosphorylierung kann ein verändertes Laufverhalten beobachtet werden. Als Kontrolle wurde auch hier auf Thylakoide von *A. thaliana* zurückgegriffen. Hierbei wurde die bekannte Phosphorylierung des lhcb1-Proteins mit Hilfe eines spezifischen lhcb1-Antikörpers untersucht (Abbildung 15 B; Longoni *et al.*, 2015). Die Phosphorylierung des lhcb1 führt zu zwei mittels Antikörper nachweisbaren Signalen. Durch die Zugabe der alkalischen Phosphatase verbleibt nur das untere Signal (nicht phosphoryliert, N), während das größere Signal nicht mehr vorhanden ist (phosphoryliert, P). Für CryP konnten mittels immunologischer Detektion vier Signale in unterschiedlichen Höhen ausgemacht werden. Durch Zugabe der alkalischen Phosphatase verbleibt nur das niedrigste Signal (N), während die drei höheren Signale nicht mehr nachweisbar sind (P).

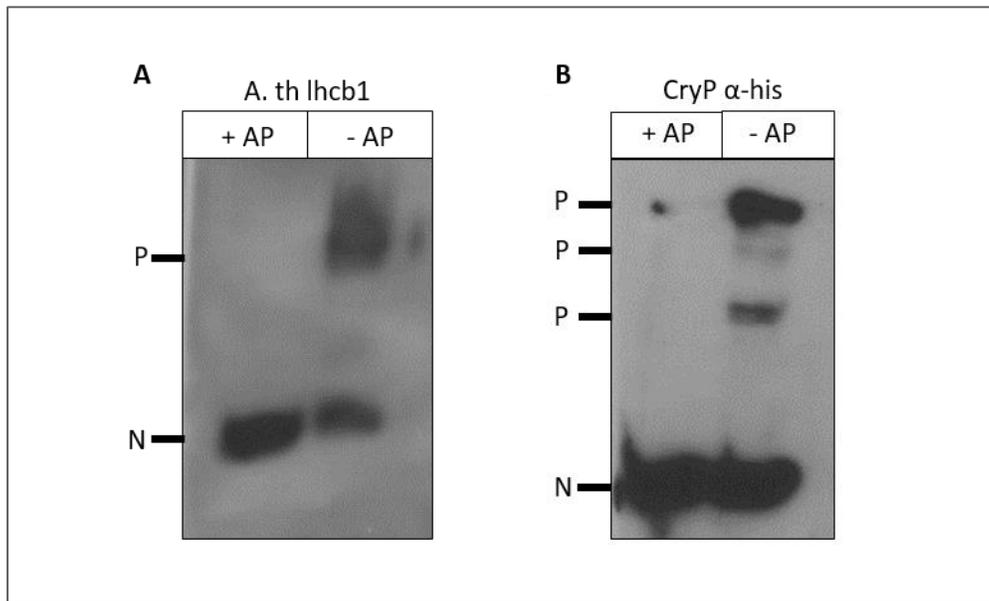


Abbildung 15: Grad der Phosphorylierung des CryP-Proteins. P markiert phosphorylierte Formen der jeweils detektierten Proteine, N markiert die entsprechenden nicht phosphorylierten Proteine. + AP zeigt die Protein nach einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase und - AP zeigt die unbehandelten Proteine. In **A** ist die Auftrennung des lhcb1 Proteins nach „phosphoryliert“ (P) und „nicht phosphoryliert“ (N) gezeigt. Es wurden Thylakoide von *A. thaliana* (F Flügge, Prof. Dr. C Büchel, Universität Frankfurt) mit Gesamt-Chl a-Gehalt von 1 μ g aufgetragen. **B** zeigt die Auftrennung des CryPs entsprechend der Anzahl an Phosphorylierungen (0.5 μ g Protein).

3.3 Transkriptom-Analyse in *P. tricornutum* CryP-Knockdown-Mutanten

Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine Interaktion des CryPs mit mehreren Proteinen und eine mögliche Signalweiterleitung mittels Phosphorylierung gezeigt werden. Um einen Überblick über die Effekte des Proteins und der möglichen Regulationskaskade sowie auf das regulatorische Netzwerk innerhalb der Zelle zu bekommen, wurde eine Transkriptom-Analyse durchgeführt. Die regulatorischen Effekte des CryPs wurden durch einen Vergleich der Blaulicht-abhängigen Expression des Wildtyps mit der Expression der CryP-Knockdown-Mutanten Na1 und Ta3 ermittelt (Juhas *et al.*, 2014). Das Cryptochrome wurde in den Knockdown-Mutanten mit Hilfe eines *Antisense*-Konstruktes herunterreguliert. Auf Proteinebene konnte eine Reduzierung des CryPs auf 50 % (Na1-Mutante) und 60 % (Ta3-Mutante) des WT-CryP-Gehalts gezeigt werden (Juhas *et al.*, 2014). Für die Transkriptomanalyse wurden die Zellen des Wildtyps und der Knockdown-Mutanten 72 Stunden dunkeladaptiert, um eine Basislinie in der Genexpression zu schaffen. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit Blaulicht inkubiert, um so den Effekt des verringerten Cryptochroms in den Knockdown-Mutanten zu detektieren. Für die Untersuchungen wurde sowohl von dunkel adaptierten als auch von in Blaulicht-inkubierten Zellen Gesamt-RNA isoliert und mittel NGS sequenziert.

Qualitätskontrolle des NGS-Datensatzes

Zur Verifizierung der in der Transkriptom-Analyse bestimmten Expressionsdaten wurden sechs Gene mit unterschiedlichem Expressionsmuster gewählt und mit quantitativer RT-PCR überprüft. Es wurden zum einen Gene mit einer geringen Beeinflussung der Expression durch Blaulicht wie das ribosomale Protein 30 (*Rps*) und das TATA-Box bindende Protein *Tbp* gewählt. Außerdem wurden deutlich durch Blaulicht beeinflusste Gene wie Tubulin A (*Tuba*) und ein Chaperon (*Chp*) untersucht. Des Weiteren wurden Gene gewählt, die in den Mutanten eine zum WT differentielle Expression zeigten (Pyruvat-Phosphat Dikinase, *Ppdk* und Beta-ketoacyl-ACP Synthase II, *Fabfa*). Die gemessene relative Expression des *Rps*-Genes entspricht sehr genau dem relativen Verhältnis der RPKM-Werte (*Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads*) aus der Transkriptomanalyse. Lediglich die Blaulichtprobe der Mutanten Ta3 zeigt eine deutliche Abweichung. Im Fall des *Tbp*-Gens zeigen sich nur sehr geringe Unterschiede im relativen Verhältnis der RPKM-Werte. Die maximale Abweichung liegt bei einer zweifachen Transkript-Menge. Die Werte der relativen Expression folgen dem Verlauf der RPKM-Werte. Eine geringe Abweichung ist hier für den mit Blaulicht inkubierten Wildtyp (WT b) zu erkennen, hier liegt die relative Expression unterhalb des RPKM-Verhältnisses. Für *Tuba* konnte ein gleichmäßiger Verlauf zwischen relativer Expression der qRT-PCR- und RPKM-Werte detektiert werden. Die Gene der mit Blaulicht inkubierten Proben liegen etwa

dreifach stärker exprimiert vor, als es in den dunkeladaptierten Proben der Fall ist. Hierbei zeigen die *Knockdown*-Mutanten ein mit dem WT vergleichbares Verhalten und die Werte der relativen Expression decken sich mit den RPKM-Werten. Für das *Chp*-Gen konnte in der NGS eine etwa zweifach erhöhte Expression für die dunkeladaptierten Proben der Mutanten gegenüber dem WT festgestellt werden. In der Analyse der relativen Expression konnte ebenfalls eine stärkere Expression in den Mutanten gezeigt werden; hier zeigte sich eine bis zu achtfache Erhöhung. Bei dem in den Mutanten differentiell exprimierten *Ppdk* konnte das Verhältnis der Expressionen mit Hilfe der qRT-PCR bestätigt werden. Nach Dunkeladaption ist die Expression des *Ppdk*-Gens insgesamt hoch und in den Mutanten gegenüber dem WT etwas verringert. Durch Blaulichtinkubation wird die relative Expression für alle Stämme deutlich reduziert. Für das *Fabfa*-Gen zeigt sich eine vergleichbare Tendenz. Die in den Mutanten im BL erhöhten Werte sind auch in der relativen Expression erkennbar, allerdings mit einer deutlich geringeren Intensität.

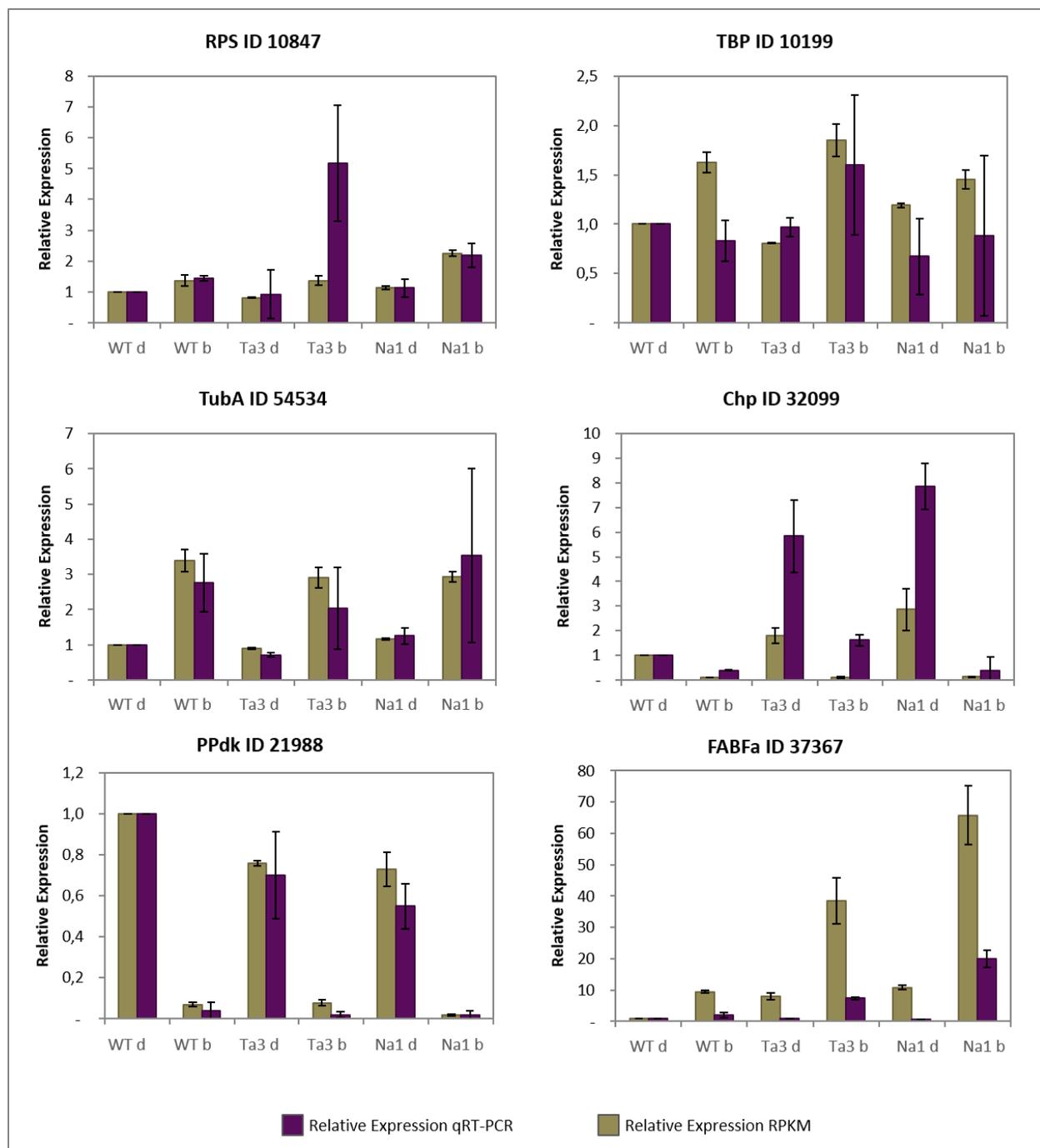


Abbildung 16: Quantitative Realtime-Analyse ausgewählter Gene. Zur Qualitätskontrolle der Transkriptomdaten wurde die Expression sechs ausgewählter Gene mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Analyse (qRT-PCR) überprüft. In Violett sind die gemessenen relativen Expressionen der qRT-PCR-Messungen gezeigt. In Braun sind die mittels NGS detektierten RPKM-Werte ebenfalls als relative Expression dargestellt. Die qRT-PCR Messungen wurden mit Hilfe des Referenzgens *Histon H4* (Siaut *et al.*, 2007) normiert. Die Expression des dunkeladaptierten Wildtyps (WT d) wurde als Basis 1 festgelegt. Verglichen wurden die dunkeladaptierten (d) und Blaulicht-inkubierten (b) Proben des Wildtyps und der Mutanten Na1 und Ta3. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Replikate mit n=3. Untersucht wurden die Gene ribosomales Protein 30 (*Rps*), Pyruvat-Phosphat-Dikinase (*PpdK*), Tubulin A (*Tuba*), Chaperon (*Chp*) und Beta-ketoacyl-ACP Synthase II (*Fabfa*).

Wie beschrieben wird der verringerte Cryptochrom-Gehalt der *P. tricornutum*-Stämme Na1 und Ta3 durch ein *Cryp-Antisense*-Konstrukt hervorgerufen (Juhas *et al.*, 2014). Dieses wird in der Auswertung der RPKM-Werte ebenfalls erfasst und um die tatsächliche Expression des Cryptochroms zu verifizieren wurde das *Cryp*-Gen ebenfalls mittels qRT-PCR überprüft (Abbildung 17). Für *Cryp* konnte eine dem WT gegenüber reduzierte Expression in den *Knockdown*-Mutanten festgestellt werden. Durch Blaulicht wird die Expression des Gens sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten deutlich verringert. Die *Knockdown*-Mutante Na1 zeigt das niedrigere Expressionsniveau

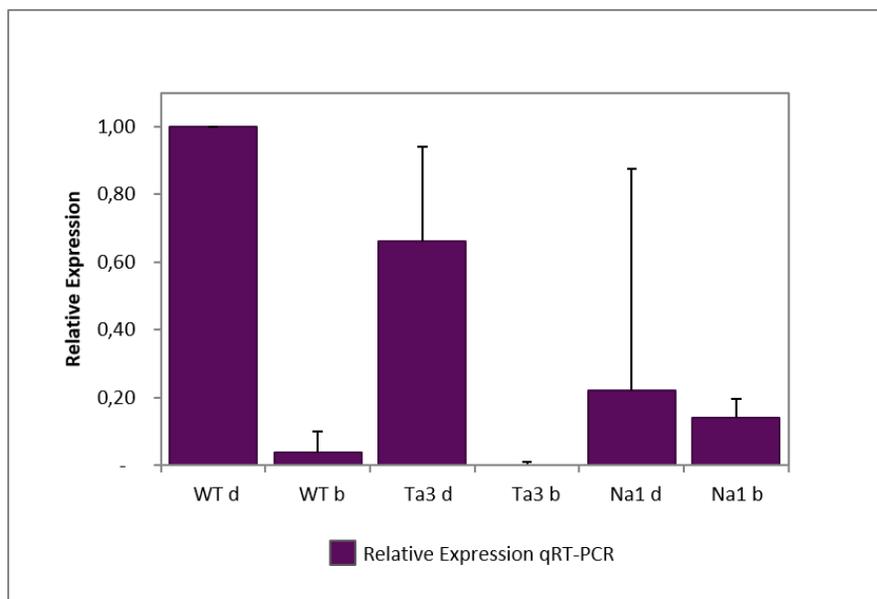


Abbildung 17: Relative Expression des CryP-Gens. Gezeigt ist die relative Expression des *Cryp*-Gens (ID 54342) im Wildtyp (WT) und den *Knockdown*-Mutanten (Na1, Ta3), im Dunkeln (d) und nach Blaulichtinkubation (b). Die Messungen wurden mit Hilfe des Referenzgens *Histon H4* (Siaut *et al.*, 2007) normiert. Die Expression des dunkeladaptierten Wildtyps (WT d) wurde als Basis 1 festgelegt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Replikate (n=3).

Insgesamt bestätigt die Analyse der relativen Expression mit Hilfe der qRT-PCR qualitativ die Daten der NGS-Analyse. Es zeigt allerdings auch, dass die absoluten Werte abweichen können und dies in der Datenauswertung berücksichtigt werden muss. Die NGS-Datensätze umfassen je sequenzierter cDNA Bibliothek zwischen 11 und 14 Millionen *Reads*. Für die dunkeladaptierten Proben des Wildtyps und der Mutanten wurden je zwei cDNA-Bibliotheken sequenziert, was ebenfalls für die Blaulicht-inkubierte Ta3 Probe (Ta3 b) zutrifft. Für die Proben des Wildtyps und der Na1-Mutante wurden je drei cDNA-Bibliotheken nach Blaulichtinkubation sequenziert. 85 % der amplifizierten Sequenzen konnten der cDNA-Datenbank

(Phatr3 EnsemblProtist) zugeordnet werden, was zu einem Datensatz mit 12.298 exprimierten Genen führte. Um signifikante Änderungen in der Expression durch genetische Einflüsse und Versuchsbedingungen zu identifizieren wurde eine statistische Auswertung mit Hilfe des Programmes EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) durchgeführt. Hierbei wurde ein Signifikanz-Schwellenwert von $q \leq 0,01$ gewählt.

Das *P. tricornutum* Transkriptom

Das 12.298 Gene umfassende Transkriptom wurde unter Nutzung mehrerer Datenbanken spezifischen Stoffwechselwegen zugeordnet (Abbildung 18 A). Für die Zuordnung des größten Anteils (38 %) wurde die *P. tricornutum* Datenbank des Joint Genome Institute (JGI) genutzt und durch Annotationen der Datenbank EnsemblProtists (3,5 %) ergänzt. Weitere artübergreifende Annotationen erfolgten mit Blast2Go (23 %), MercatorMapman (6,1 %; Thimm *et al.*, 2004) und The Arabidopsis Information Resource (TAIR10 1,9 %). Ein Anteil von etwa 30 % der exprimierten Gene konnte nicht zugeordnet werden. Sie sind in der Rubrik „Unbekannt“ zusammengefasst.

In Abbildung 18 B ist die Zuordnung der exprimierten Gene zu Stoffwechselwegen und funktionellen Gruppen gezeigt. 21 % der Gene konnten dem Metabolismus zugeordnet werden, hierbei kann zwischen Aminosäure-, Lipid-, Sekundär-, Vitamin-, Kohlenhydrat- sowie Nukleotidstoffwechsel unterschieden werden (blau in Abstufungen). 11 % der exprimierten Gene fallen auf den Proteinumsatz der Zelle und fassen Proteinaufbau und den Abbau sowie die Modifikation von Proteinen zusammen (rot in Abstufungen). Im Energiestoffwechsel sind Photosynthese-spezifische und nicht Photosynthese-spezifische energiegewinnende Prozesse zusammengefasst und bilden 5 % der exprimierten Gene (grün in Abstufungen). DNA- und RNA-modifizierende Funktionen, die Regulation der Transkription sowie Prozesse der Signalweiterleitung sind zu regulativen Prozessen zusammengefasst (orange in Abstufungen, 24 %). Weitere verbleibende Prozesse der Zelle bilden die allgemeine Gruppe. Diese beinhaltet Zellzyklus und Zellorganisation, Abwehr und Stressantwort, Transportproteine, virale GAG-Proteine sowie die Homöostase betreffende Gene (violett in Abstufungen, 11 %).

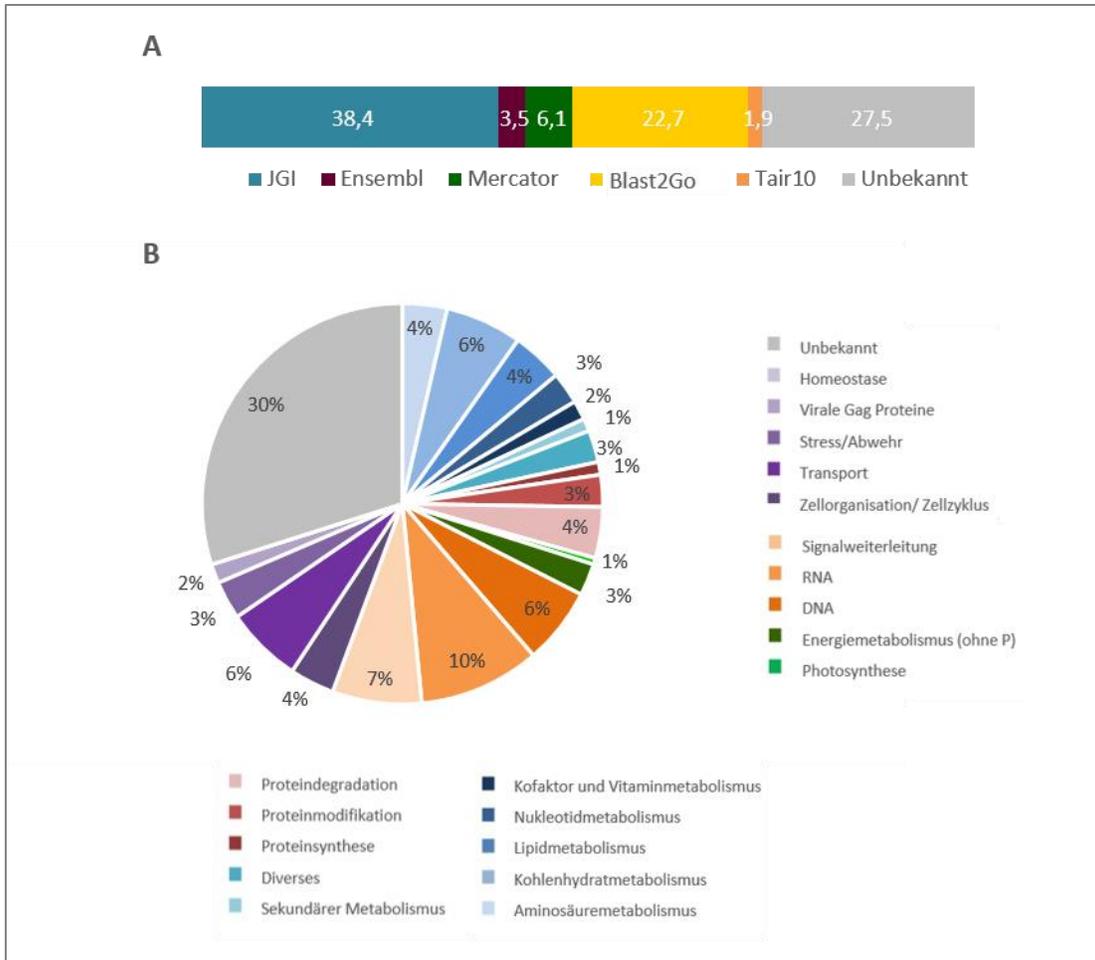


Abbildung 18: Zuordnung aller exprimierten Gene in *P. tricornutum*. A zeigt die Anteile der für die Annotation genutzten Datenbanken in [%]. Es wurden die Datenbanken Joint Genome Institute (JGI), EnsemblProtists (Ensembl), Blast2Go, MercatorMapman (Mercator) und The Arabidopsis Information Resource (TAIR10) genutzt. In B ist die Zuordnung der exprimierten Gene zu funktionellen Gruppen gezeigt. Die Basis bilden die 12.298 identifizierten Gene. Diese sind in die Gruppen Metabolismus (blau in Abstufungen), Proteinumsatz (rot in Abstufungen), Energiestoffwechsel (grün in Abstufungen), regulative Prozesse (orange in Abstufungen) und diverse Prozesse (violett in Abstufungen) unterteilt. Gene unbekannter Funktion sind in der Gruppe „Unbekannt“ zusammengefasst (grau).

Blaulichtregulierte Genexpression des *P. tricornutum* Wildtyps

Um die Funktion des Blaulichtrezeptors CryP weiter zu untersuchen, wurde zunächst der allgemeine Blaulichteffekt des *P. tricornutum* Wildtyps analysiert. In Abbildung 19 sind die relativen Transkript-Mengen der funktionellen Gruppen im Vergleich zwischen Dunkeladaptation und Blaulichtinkubation dargestellt. Erkennbar ist der Anteil der Transkript-Menge der funktionellen Gruppen an der gesamten Transkript-Menge. Sie sind unterteilt in die Expression der dunkeladaptierten Zellen (WT d) und die Expression nach Blaulichtinkubation (WT b). Die Abbildung 19 zeigt die Verteilung der Transkript-Mengen innerhalb der Funktionellen Gruppen sowohl für das gesamte Transkriptom (12.298 Gene) als auch nur für die signifikant durch Blaulicht regulierten Gene (4.721 Gene). Bei der Untersuchung der Transkript-Mengen des Gesamt-Transkriptoms zeigen sich für die Kategorien Photosynthese, Proteinsynthese und Kohlenstoffwechsel erhöhte Transkript-Mengen. In Gegensatz dazu zeigt die Kategorie Stress und Abwehr eine reduzierte relative Transkription. Bezogen auf alle 12.298 Gene zeigt der überwiegende Teil der funktionellen Gruppen keine Veränderung in der relativen Transkript-Menge nach der Blaulichtinkubation. Zur genaueren Untersuchung des Blaulichteffektes wurden die relativen Transkript-Mengen der signifikant durch Blaulicht regulierten Gene dargestellt (Abbildung 19, 4.721 Gene, $q \leq 0,01$). Hierbei zeigt sich in der Kategorie Metabolismus, dass Blaulicht für den Kohlenhydrat-, Lipid- und Aminosäurestoffwechsel zu einer erhöhten Transkript-Menge führt, während die Expression der weiteren Metabolismus-Untergruppen nicht beeinflusst wird. Im Proteinumsatz werden Gene der Proteinsynthese und Proteinmodifikation in der Expression hochreguliert, während der transkriptionelle Anteil regulierter Gene in der Proteindegradation reduziert wird. Für den Energiemetabolismus zeigt sich, dass besonders die der Photosynthese zugeordneten Gene eine verstärkte Expression zeigen. Sonstige energieproduzierende Prozesse werden hingegen nur geringfügig hochreguliert. In der regulativen Gruppe (Orange) zeigen RNA-zugeordnete Gene eine erhöhte relative Transkript-Menge, während für DNA und Signalweiterleitung keine Unterschiede zwischen Dunkeladaptation und Blaulichtinkubation zu sehen sind. In der Gruppierung der diversen Prozesse bleiben Zellzyklus und Organisation sowie die den Transport betreffende Gene in der Transkript-Menge unverändert. Im Gegensatz dazu werden die Gene der Kategorie Stress und Abwehr durch Blaulicht in der Expression reduziert. Außerdem sind die Transkript-Mengen der funktionell unbekanntenen Gene nach Blaulichtinkubation reduziert.

Ein Vergleich zwischen der Anzahl der Gene innerhalb der funktionellen Gruppen (Abbildung 18) und dem Anteil der entsprechenden Gruppe an der Gesamtmenge der Transkription (Abbildung 19) zeigt einige Unterschiede zwischen Gen- und Transkript-Zahl. Die Gruppe der Photosynthese-spezifischen Gene hat eine geringe Anzahl (1 %, Abbildung 18), ist auf der Transkript-Ebene jedoch besonders nach

Blaulichtinkubation stark vertreten (5 %, Abbildung 19). Dieser Effekt ist ebenfalls für die Proteinsynthese erkennbar. Ein Anteil von 1 % der exprimierten Gene (Abbildung 18) führt hier zu 10 % der Gesamt-Transkripte (Abbildung 19). Für Virale GAG-Gene und Gene des Nukleotidmetabolismus ist ein gegenteiliger Effekt erkennbar. Trotz einer hohen Anzahl exprimierter Gene (Abbildung 18) liegt nur ein sehr geringer Anteil an den Gesamt-Transkripten vor (Abbildung 19). Insbesondere für die Gene der Gruppe Metabolismus (blau) liegt eine lichtabhängige Schwankung bezüglich des Verhältnisses Gen-Zahl und Transkript-Menge vor. Während im Dunkeln die Transkript-Mengen der Gruppe Metabolismus trotz hoher Genzahlen sehr gering ist, erhöhen sich die Transkript-Mengen durch die Blaulichtinkubation deutlich.

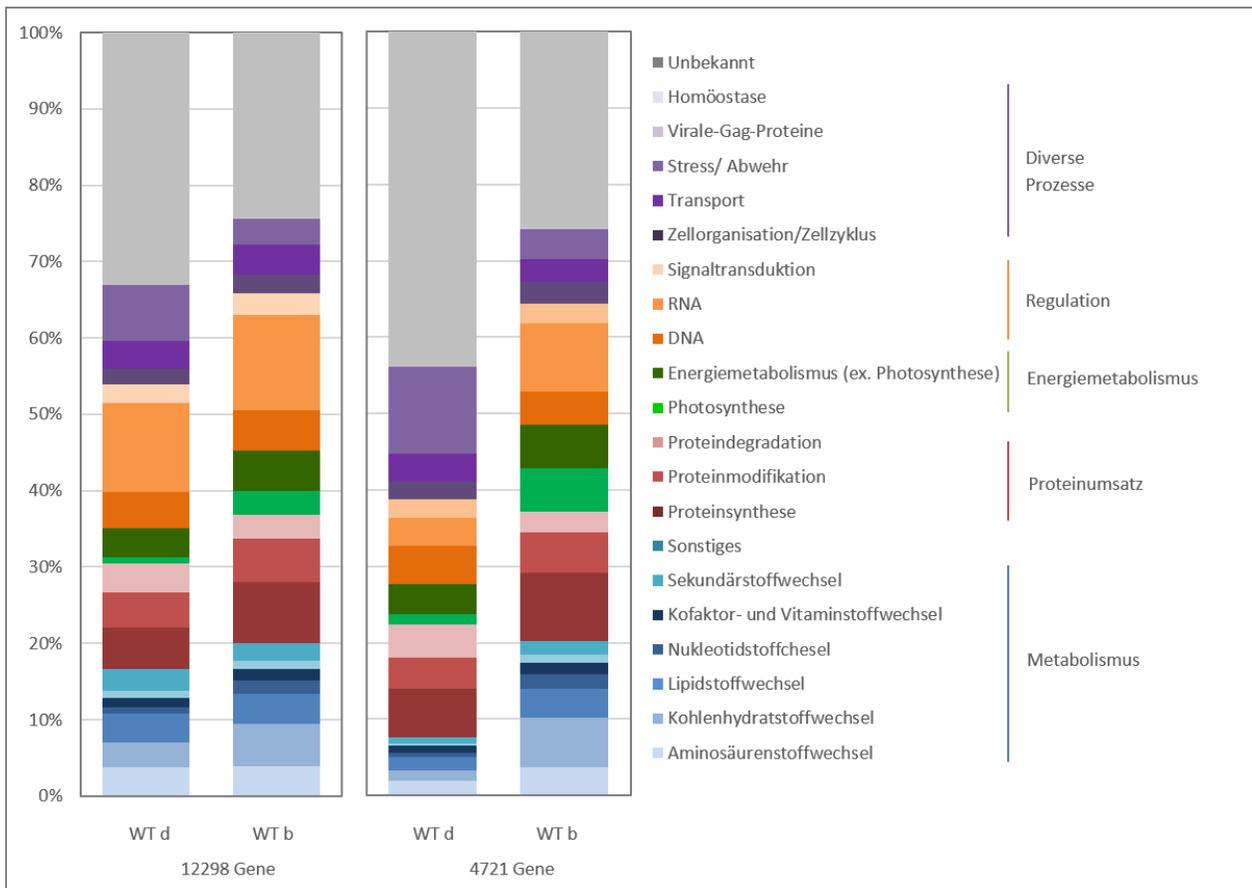


Abbildung 19: Relative Transkript-Mengen des *P. tricornutum* Wildtyps nach Dunkeladaption und Blaulichtinkubation. Dargestellt ist die relative Transkript-Menge der funktionellen Gruppen nach Dunkeladaption (WT d) und Blaulichtinkubation (WT b) für das gesamte Transkriptom (12.298 Gene) und die signifikant durch Blaulicht regulierten Gene (4.721 Gene; $q \leq 0,01$). Die funktionelle Einteilung der Gene erfolgte in die folgenden Gruppen: Metabolismus (blau in Abstufungen), Proteinumsatz (rot in Abstufungen), Energiestoffwechsel (grün in Abstufungen), regulative Prozesse (orange in Abstufungen), diverse Prozesse (violett in Abstufungen) und unbekannte Gene (grau).

Blaulichtreaktion der CryP-*Knockdown*-Mutanten

Bei dem Vergleich der blaulichtinduzierten Regulation der Transkript-Mengen innerhalb der einzelnen Kategorien zeigen sich stoffwechsel- und gruppierungsspezifische Unterschiede in der Aktivierung und Deaktivierung der Genexpression. Um einen CryP-*Knockdown*-spezifischen Blaulichtphänotyp zu identifizieren, wurde der regulative Effekt des Blaulichts mit Bezug auf Hoch- und Runterregulation untersucht (Abbildung 20). In Abbildung 20 A ist die Änderung der Expression aller 12.298 Gene dargestellt, sortiert nach der Regulation im WT (+ hochreguliert, rot; - herunterreguliert, blau). Der Vergleich der *Knockdown*-Mutanten zeigt deutliche Unterschiede in der Blaulichtreaktion. Für beide *Knockdown*-Mutanten sind vergleichbare Unterschiede in der Regulation durch Blaulicht erkennbar, die simultan von der Regulation im WT abweichen. Des Weiteren ist besonders für die Na1-Mutante erkennbar, dass insgesamt weniger Gene hochreguliert werden und somit in einem weniger intensiven Rot dargestellt sind. Zusätzlich erkennt man einen erhöhten Anteil herunterregulierter Gene in intensiverer Blaufärbung. In Abbildung 20 B sind die absoluten Zahlen der durch den Blaulichtimpuls in ihrer Expression verringerten oder verstärkten Gene gezeigt. Der Vergleich der *Knockdown*-Mutanten mit dem WT bestätigt, dass die Anzahl der durch Blaulicht herunterregulierten Gene in den Mutanten gegenüber dem WT erhöht ist. Die Anzahl der hochregulierten Gene in der Na1-Mutante ist gegenüber dem WT verringert, während hier für die Ta3-Mutante keine Veränderung erkennbar ist. Insgesamt zeigen beide *Knockdown*-Mutanten gleich verlaufende Abweichungen vom Wildtyp. Diese sind in der der NA1-Mutante jedoch stärker ausgeprägt.

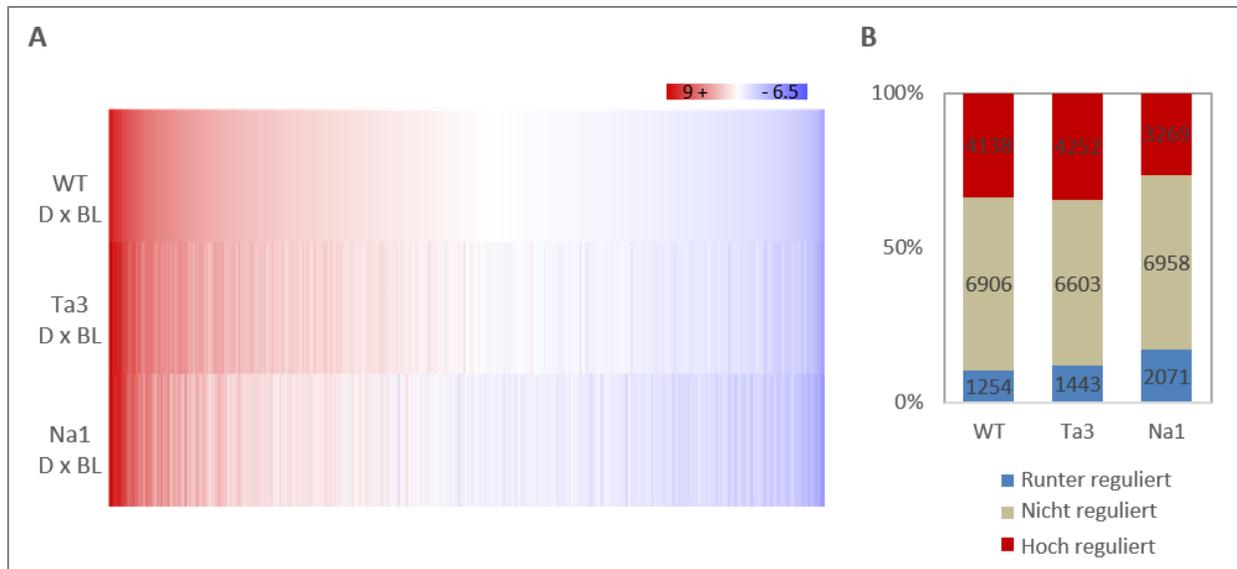


Abbildung 20: Blaulichtreaktion der CryP-Knockdown Mutanten. **A** zeigt die Regulation aller 12.298 Gene im Blaulicht. Basis der Regulation sind die RPKM-Werte der für 72 h dunkeladaptierten Zellen. Die Gene wurden entsprechend dem regulatorischen Effekt im WT sortiert. Die Änderung der Genexpression ist logarithmisch (\log_2) dargestellt (+9 bis -6,5). Rot zeigt eine Hochregulation durch BL, während eine BL-induzierte Runterregulation in blau dargestellt ist. In **B** sind die absoluten Zahlen hoch- (rot) und herunterregulierter (blau) Gene für die untersuchten *P. tricornutum* Stämme dargestellt. Für die Grafik wurden nur Gene mit einer Änderung der Expression $\log_2 \geq 1$ und $\log_2 \leq -1$ berücksichtigt.

Zur weiteren Charakterisierung der CryP-gesteuerten Prozesse wurden ausschließlich die signifikant differentiell regulierten Gene untersucht. Tabelle 8 zeigt die Zusammenfassung der Anzahl regulierter Gene mit einem Signifikanzniveau $q \leq 0,01$. Spalte 1 vergleicht die Anzahl der durch Blaulicht regulierten Gene in den drei untersuchten Stämmen. Es ist erkennbar, dass die Anzahl signifikant regulierter Gene in den Mutanten gegenüber dem WT erhöht ist, wobei Na1 den stärkeren Effekt der beiden Mutanten zeigt. Der Vergleich der Expression zwischen Mutanten und WT nach Dunkeladaptation (Tabelle 8, Spalte 2) zeigt, dass bereits ohne Lichteinfluss Unterschiede in der Expression vorliegen. Die Anzahl der zum WT unterschiedlich exprimierten Gene ist in der Na1-Mutante größer, verglichen mit Ta1 (Tabelle 8, Spalte 3). Dieser Effekt ist ebenfalls für den Vergleich der Expressionslevel zwischen Mutanten und Wildtyp nach Blaulichtinkubation zu erkennen. Die Anzahl differentiell exprimierter Gene liegt für Ta3 nach Lichteinfluss bei 420, während für Na1 1.315 Gene signifikant zum WT reguliert sind. Die Zusammenfassung der Gene, die eine differentielle Expression in beiden Mutanten (Mut d, Mut b) zeigen, liegt bei 185 Genen nach Dunkeladaptation und 194 Gene nach Blaulichtinkubation.

Tabelle 8: Zusammenfassung der regulierten Gene in den NGS-Datensätzen. Verglichen wurde der Wildtyp (WT) mit den *CryP-Knockdown*-Mutanten Na1 und Ta3 nach Dunkeladaption (d) und Blaulichtinkubation (b). Die regulierten Gene zeigen in den Mutanten abweichende Expressionsmuster zum WT und haben ein Signifikanzniveau mit $q \leq 0,01$. Mut fasst die beiden Mutanten zusammen und beschreibt die Gene, die sowohl für Na1 als auch Ta3 signifikant reguliert sind.

Blaulichteffect		CryP-bedingter Effekt Dunkel		Cry-bedingter Effekt BL	
WT d - WT b	4.721 Gene	WT d - Ta3 d	539 Gene	WTb - Ta3 b	420 Gene
Ta3 d - Ta3 b	4.984 Gene	WT d - Na1 d	600 Gene	WTb - Na1 b	1.315 Gene
Na1 d - Na1 b	5.088 Gene	WT d - Mut d	185 Gene	WT b - Mut b	194 Gene

Die Zusammenfassung der in beiden Mutanten signifikant differentiellen Gene (Tabelle 8; Mut d, Mut b) führt zu 185 im Dunkeln und 194 im Blaulicht regulierten Genen. Für 69 der Gene ist eine Überschneidung festzustellen, sie zeigen sowohl unter BL als auch im Dunkeln eine signifikante Änderung. Insgesamt ergeben sich dadurch 310 Gene, die in beiden Mutanten eine signifikante Änderung zeigen. Wie in Abbildung 21 A gezeigt, sind 125 dieser Gene ausschließlich nach Blaulichtinkubation reguliert. Sie werden zu Genen der Kategorie 1 zusammengefasst. Die 69 Gene, für die unter beiden Bedingungen signifikante Unterschiede festgestellt werden konnten, bilden Kategorie 2 der *CryP*-regulierten Gene (Abbildung 21 A). Weitere 116 Gene zeigten signifikante Unterschiede zum WT ausschließlich in der Dunkeladaption und wurden Kategorie 3 zugeordnet (Abbildung 21 A). In Abbildung 21 B sind die Gene der drei Kategorien nach der Art ihrer Regulation zum WT in hoch- (rot) oder herunterregulierte (blau) Gene unterteilt. Die Gene der Kategorie 1 zeigen eine überwiegende Runterregulation im Vergleich zum WT. Besonders in den funktionellen Gruppen Proteindegradation und Kohlenstoffmetabolismus kommt es ausschließlich zu einer Runterregulation in den Mutanten. Die stärkste Runterregulation ist in den Gruppen RNA und Zellorganisation/ Zellzyklus zu sehen, während für Stress/ Abwehr und Lipidstoffwechsel der größte Anteil an Hochregulationen gegenüber dem WT zu sehen ist. Für die Kategorie 2 zeigt sich, dass die Gene sowohl unter Blaulicht als auch in Dunkeladaption die gleiche Veränderung gegenüber dem WT aufweisen. Es gibt lediglich Unterschiede in der Stärke, nicht aber in der Richtung der Regulation, wie es in den funktionellen Gruppen RNA und Proteindegradation zu sehen ist (Abbildung 21 B). Insgesamt ist die Expression der Kategorie 2-Gene ebenfalls in den Mutanten überwiegend verringert im Vergleich zum WT, was insbesondere an den Gruppen Proteindegradation, Proteinsynthese und Aminosäuremetabolismus sichtbar wird. Die stärkste Änderung in der Expression gegenüber dem WT ist in Kategorie 2 für die Gruppe RNA und Unbekannt gegeben. Wie auch in Kategorie 1 zeigt die Gruppe Stress und Abwehr eine erhöhte Expression. Abweichend von Kategorie 1 ist ebenfalls für die Gruppe des Kohlenhydratstoffwechsels eine

Hochregulation sichtbar. In Kategorie 3 überwiegt die Anzahl der Gene, die eine Hochregulation in der Expression der *Knockdown*-Mutanten verglichen mit dem WT zeigen. Die Gruppen Signalweiterleitung, Proteinmodifikation und Unbekannt zeigen die stärksten Regulationen. Zu Aminosäurestoffwechsel, Kohlenhydratstoffwechsel und Transport gehörige Gene sind in der Expression reduziert.

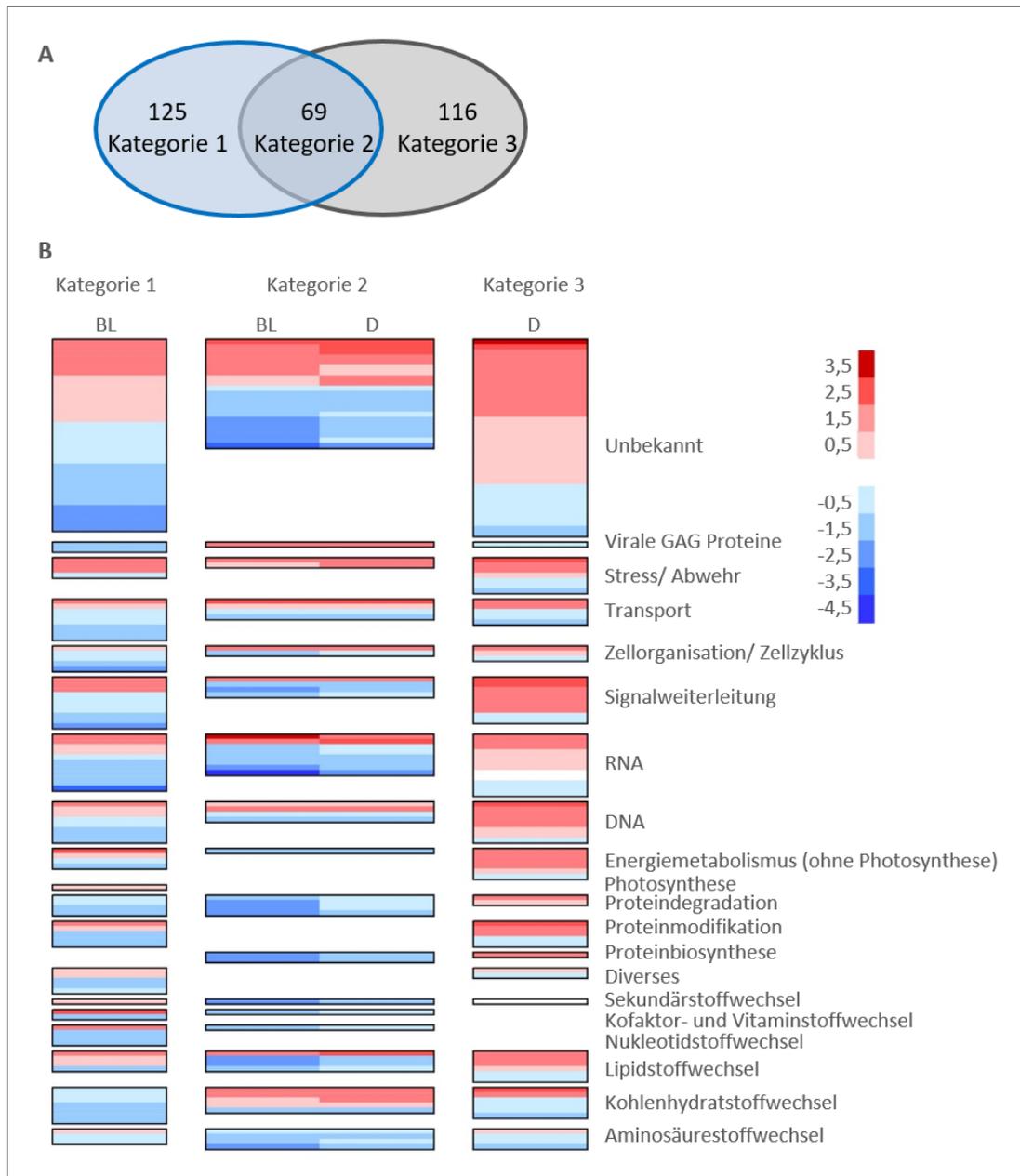


Abbildung 21: Differenzielle Regulation der drei CryP-spezifischen Gen-Kategorien. Als Signifikanzniveau für die Untersuchungen wurde $q \leq 0.01$ gewählt und die untersuchten Gene zeigen in beiden Mutanten ein simultanes signifikantes Verhalten gegenüber dem WT. Die in **A** gezeigte Unterteilung der insgesamt 310 identifizierten Gene erfolgte nach den Lichtbedingungen. 125 Gene sind in beiden Mutanten ausschließlich unter Blaulicht signifikant differentiell exprimiert (Kategorie 1). 69 Gene zeigen eine differentielle Regulation sowohl unter BL als auch nach der Dunkeladaption, sie stellen Kategorie 2 dar. Kategorie 3 beinhaltet 116 Gene, welche nur nach der Dunkeladaption ein von dem WT signifikant differentielles Expressionsmuster zeigen. In **B** sind die Gene der Kategorien 1 – 3 nach Hoch- und Runterregulation gegenüber dem WT eingeteilt. Die differentielle Regulation der *Knockdown*-Mutanten (Na1, Ta3) zum WT ist logarithmisch (\log_2) dargestellt. Außerdem ist eine Einteilung in funktionelle Gruppen gezeigt. Für die Gene der Kategorie 2 ist sowohl die Blaulichtreaktion (BL) als auch die Expression im Dunkeln (D) gezeigt. Die lichtabhängige Hochregulation ist in rot dargestellt, während die Runterregulation blau gefärbt ist.

Abbildung 21 zeigt die Anzahl der Gene der CryP-regulierten Gruppen sowie die Art und Stärke der Regulation. Da sich bereits in der generellen Betrachtung der Blaulichtreaktion des Wildtyps eine Varianz zwischen Genzahlen und den Transkript-Mengen gezeigt hat (Abbildung 18, Abbildung 19), werden die relativen Transkript-Mengen der CryP-regulierten Gen-Kategorien im Folgenden untersucht. Dargestellt sind die Anteile der funktionellen Gruppen an der Gesamttranskript-Menge der Kategorien 1-3.

Der Vergleich des Wildtyps mit den CryP-*Knockdown*-Mutanten in Kategorie 1 zeigt, dass hier die Unterschiede vor allem in den RNA- und Kohlenstoffwechsel zugeordneten Bereichen liegen. In den Mutanten ist für beides die Transkript-Menge deutlich verringert. Im Gegensatz dazu sind den Energiestoffwechsel betreffende Gene in der Transkript-Menge in den Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht. Ebenfalls verringert in der relativen Transkription sind Proteindegradation-betreffende Gene.

In der Kategorie 2 sind die Gene, die sowohl im Dunkeln als auch im Blaulicht reguliert sind, zusammengefasst. Trotz der unter beiden Bedingungen gleichen Richtung der Regulation (Abbildung 21) sind in der Zusammensetzung der Transkript-Mengen klare Unterschiede zwischen Dunkeladaptation und Blaulichtinkubation zu sehen (Abbildung 22). Im Blaulicht liegt der Anteil der Kohlenhydratmetabolismus-zugehörigen Transkripte für die Mutanten bei etwa 45 % und ist somit dem WT gegenüber deutlich erhöht. Im Dunkeln ist im Gegensatz dazu der Anteil des Kohlenhydratmetabolismus auf unter 5 % reduziert, und es sind keine Unterschiede in der relativen Menge zwischen WT und *Knockdown*-Mutanten zu sehen. Weitere Unterschiede zwischen Dunkel- und Blaulichtinkubation sind in der Kategorie 2 für die funktionellen Gruppen Transport sowie Stress und Abwehr zu erkennen. Die Transkript-Mengen dieser Gruppen sind im Dunkeln deutlich erhöht gegenüber der Blaulichtinkubation. Man erkennt jedoch unter beiden Bedingungen eine vergleichbare Tendenz: Die Expression innerhalb dieser Gruppen ist in den Mutanten gegenüber dem Wildtyp erhöht. Für Gene der funktionellen Gruppen Signalweiterleitung, RNA, Proteinumsatz und Aminosäuremetabolismus sind unter beiden Lichtbedingungen gleichbleibende Transkript-Mengen erkennbar. Trotzdem ist der relative Transkript-Anteil dieser Gruppen ist in den Mutanten gegenüber dem Wildtyp verringert.

In Kategorie 3 ist die Gruppe der Unbekannten Gene mit 50 % relative Transkript-Menge im WT und einer Erhöhung auf 60 % in den Mutanten am stärksten vertreten. Außerdem ist erkennbar, dass Stress und Abwehr zugeordnete Gene eine Verringerung in der relativen Transkript-Menge der Mutanten zeigen. Die weiteren Stoffwechselwege und Gen-Gruppen zeigen hier keine deutliche Änderung zwischen WT und den CryP-*Knockdown*-Mutanten.

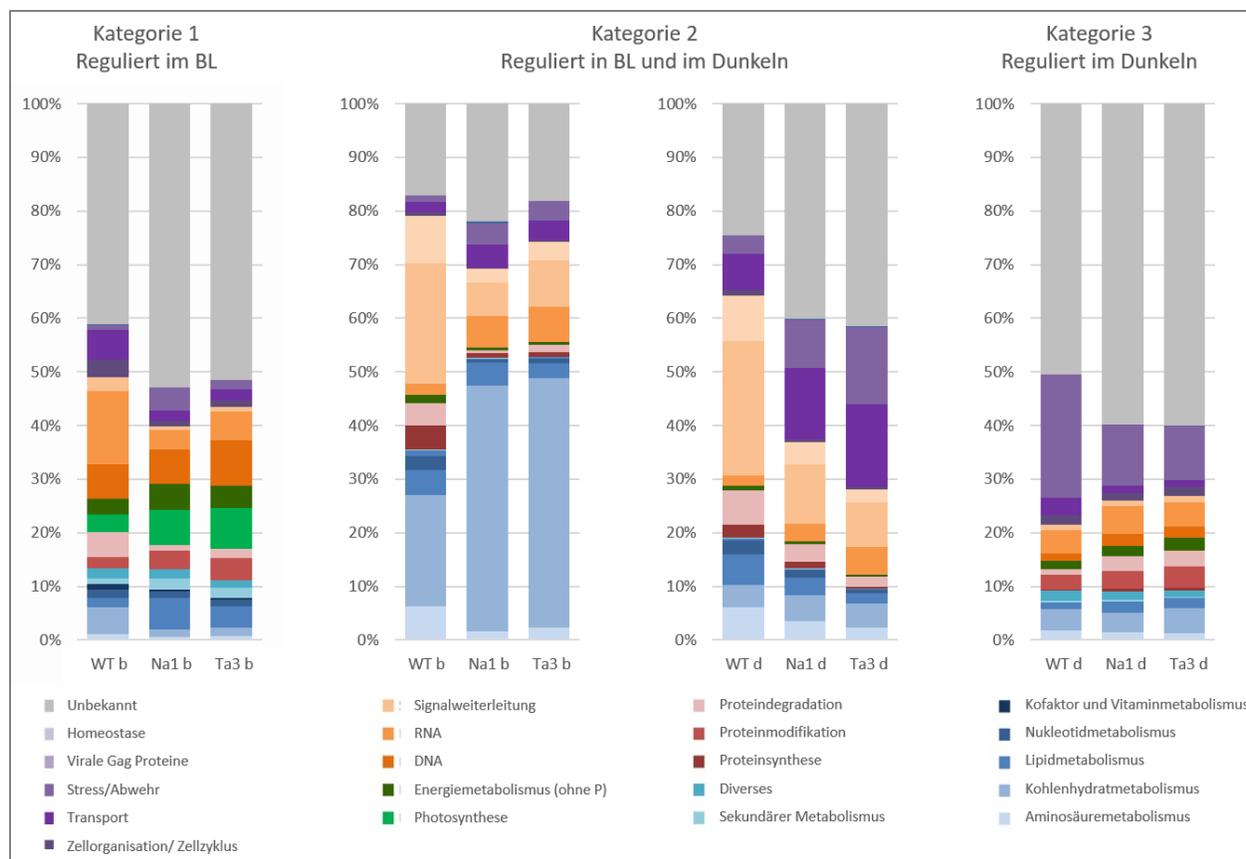


Abbildung 22: Transkriptionelle Unterschiede der durch CryP regulierten Gengruppen. Dargestellt ist der Anteil der Transkript-Menge der funktionellen Gruppen, bezogen auf die Gesamtexpression der Gene der Kategorien 1-3. Verglichen werden die relativen Transkript-Mengen in dunkeladaptierten Zellen des Wildtyps (WT d) und der *Knockdown*-Mutanten (Ta3 d, Na1 d), mit den entsprechenden in Blaulicht inkubierten Zellen (WT b, Ta3 b, Na1 b). Die Gene sind eingeteilt in Kategorie 1 (125 Gene), reguliert ausschließlich im Blaulicht (BL), Kategorie 2 (69 Gene), reguliert unter BL und Dunkeladaption, sowie Kategorie 3 (116 Gene), reguliert ausschließlich bei Dunkeladaption. Alle dargestellten Gene zeigen in der differentiellen Expression beider *Knockdown*-Mutanten zum WT ein Signifikanzniveau von $q \leq 0,01$.

Blaulichtrezeptoren in *P. tricornutum*

Unter den 310 CryP-regulierten Genen konnte der bereits charakterisierte Blaulichtrezeptor CPF1 (Coesel *et al.*, 2009; Anhang Tabelle A 4, ID 27429) als Kategorie 2-Gen identifiziert werden. Da für *A. thaliana* ein regulatives Netzwerk verschiedener Lichtrezeptoren beschrieben ist (Fraser *et al.*, 2016), wurde die Expression weiterer Lichtrezeptoren untersucht. Der Einfluss des CryPs innerhalb eines solchen potentiellen Netzwerkes sollte mit Hilfe der CryP-*Knockdown*-Mutanten untersucht werden. Abbildung 23 zeigt die Expressionslevel verschiedener Lichtrezeptoren in dunkeladaptierten Zellen und nach einer Stunde Blaulichtinkubation. Gezeigt sind die Blaulichtrezeptoren *Cpf1* und *Aureo1c* (*aureo1c*; ID 51933; Schellenberger Costa *et al.*, 2013a) sowie der Rotlichtrezeptor Phytochrom (*Dph*; ID 54300; Fortunato *et al.*, 2016). Die weiteren Blaulichtrezeptoren von *P. tricornutum* zeigen keine signifikante Änderung in der Expression weder durch Blaulichtinkubation noch durch eine veränderte Menge des CryP-Proteins und wurden nicht weiter untersucht. Für den Blaulichtrezeptor CPF1 zeigt sich, dass bereits nach der Dunkeladaption ein signifikanter Unterschied im Expressionslevel zwischen Wildtyp und *Knockdown*-Mutanten besteht. Es ist eine Hochregulation für Na1 und Ta3 erkennbar. Durch Blaulicht wird das Expressionslevel sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten signifikant erhöht, so dass weiterhin ein signifikant höheres Expressionsniveau in den Mutanten vorhanden ist. Wie es bereits für die Gene der Kategorie 2 identifiziert werden konnte, zeigt *Cpf1* eine CryP-abhängige Regulation sowohl unter Blaulichteinfluss als auch im Dunkeln. Wie für *Cpf1* zeigen die *Knockdown*-Mutanten eine signifikant hochregulierte Expression auch für den Rotlichtrezeptor Phytochrom *Dph* nach der Dunkeladaption. Durch den Blaulicht-Impuls wird die Expression des *DPH* im Wildtyp nicht verändert, während sie in den Mutanten signifikant herunterreguliert ist. Dies führt zu einer Angleichung des Expressionsniveaus der Mutanten an den Wildtyp. Bei dem Phytochrom handelt es sich um ein Kategorie 3-Gen, welches einen CryP-spezifischen Effekt nur nach Dunkelinkubation zeigt. Für das Aureochrom *Aureo1c* ist eine gleichmäßige Expression nach Dunkeladaption für den Wildtyp und die Mutanten zu sehen. Das Blaulicht führt zu einer signifikanten Hochregulation der Expression. Hierbei verhalten sich Wildtyp und *Knockdown*-Mutanten homolog und zeigen keine Unterschiede im Expressionsmuster. Die Kontrolle der in der NGS-Analyse identifizierten Expressionsmuster der gezeigten Gene *Cpf1* und *Dph* erfolgte mittels quantitativer Messung der relativen Expression und ist in Anhang Abbildung A 3 gezeigt.

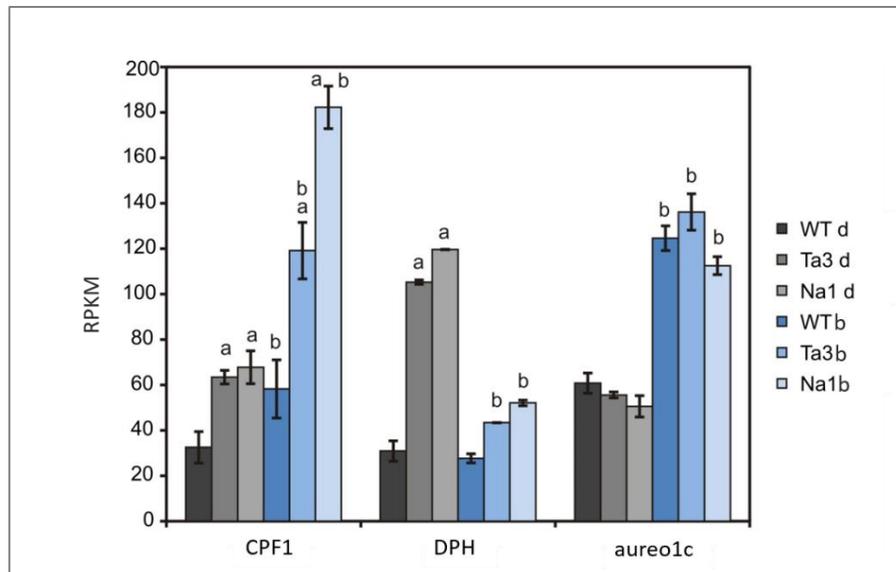


Abbildung 23: Blaulichabhängige Expression der Lichtrezeptoren in *P. tricornutum*. Gezeigt sind die RPKM-Werte der Gene *Cpf1* (ID 27429), *Dph* (ID 54300) und *Aureo1c* (ID 51933). Dargestellt sind die Expressionslevel im Wildtyp (WT) und den *CryP-Knockdown*-Mutanten (Ta3, Na1) nach Dunkeladaption (d) und Blaulichtinkubation (b). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der RPKM-Werte. Mit a gekennzeichnete Balken markieren einen signifikanten Unterschied zwischen WT und den Mutanten ($q < 0,01$), b markiert signifikante Unterschiede zwischen Dunkeladaption und Blaulichtinkubation ($q < 0,01$).

Zusätzlich zu der blaulichtregulierten Expression der Photorezeptoren wurde auch die blaulichtabhängige Expression der Interaktionspartner in den *Knockdown*-Mutanten untersucht. In Abbildung 24 ist die Genexpression der Interaktionspartner *Aaa*, *Csdp* und *Bola* im Wildtyp und den *CryP-Knockdown*-Mutanten dargestellt. Gezeigt sind die RPKM-Werte nach Dunkeladaption und Blaulichtinkubation. Die Gene *Aaa* und *Csdp* zeigen sowohl im Wildtyp, als auch in den *Knockdown*-Mutanten eine signifikant erhöhte Expression nach der Blaulichtinkubation (Abbildung 24). Hierbei können keine für beide Mutanten signifikanten Unterschiede zwischen der Expression des Wildtyps und der *CryP-Knockdown*-Mutanten identifiziert werden. Im Gegensatz zu *Aaa* und *Csdp* ist für *Bola* keine durch Blaulicht regulierte Expression zu sehen. Des Weiteren ist kein Unterschied in der *Bola*-Expression zwischen WT und den *Knockdown*-Mutanten erkennbar. Auch für die weiteren Interaktionspartner kommt es zu keiner Veränderung in der Expression in den *CryP Knockdown*-Mutanten verglichen mit dem WT. Die Gene *Aaa* und *Csdp* sind jedoch durch Blaulicht reguliert.

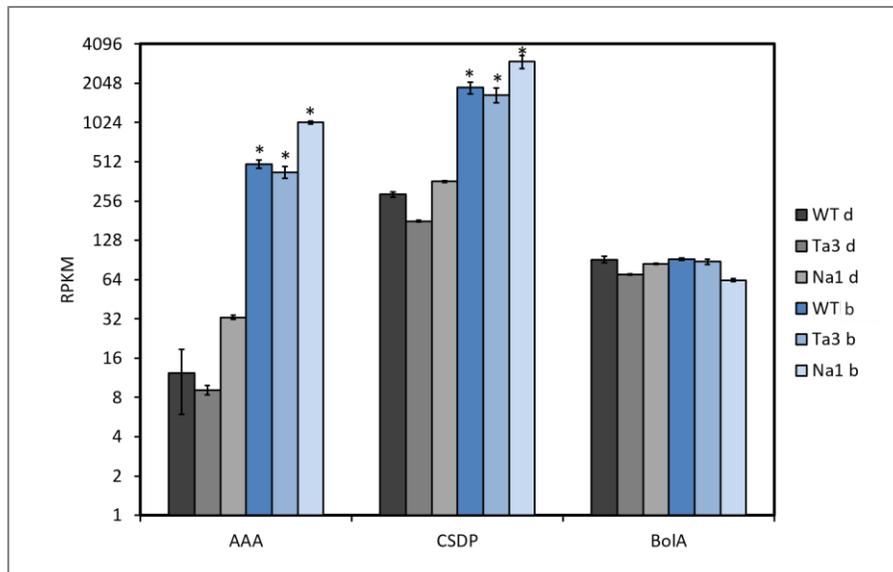


Abbildung 24: Blaulichabhängige Expression der CryP-Interaktionspartner. Gezeigt sind die RPKM-Werte der Gene *Aaa* (ID 42612), *Csdp* (ID 15211) und *Bola* (ID 14849). Dargestellt sind die Expressionslevel im Wildtyp (WT) und den CryP-*Knockdown*-Mutanten (Ta3, Na1) nach Dunkeladaptation (d) und Blaulichinkubation (b). Die RPKM-Werte sind logarithmisch \log_2 dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der RPKM-Werte. Mit * gekennzeichnete Balken markieren einen signifikanten Unterschied zwischen Dunkeladaptation und Blaulichinkubation ($q < 0,01$).

3.4 Stresstest

Mit Hilfe der Transkriptom-Analyse konnte ein genomweiter Einfluss des CryP Proteins auf die Expression innerhalb der Zelle untersucht werden. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp und CryP-*Knockdown*-Mutanten. Diese konnten unter anderem auch in Genen der Stressantwort in den CryP-regulierten Kategorien 1-3 festgestellt werden (Abbildung 22 A). Auch die identifizierten Interaktionspartner können in ihrer Funktion mit der Stressantwort von Zellen in Verbindung gebracht werden (Tabelle 6). Um dies genauer zu untersuchen, wurden die CryP *Knockdown*-Zelllinien physiologisch charakterisiert. Für *BoIA* ist ein Zusammenhang mit Salzstress in *E. coli* (Santos *et al.*, 1999) bekannt, weshalb die Sensitivität der *Knockdown*-Zellen für eine erhöhte Salzkonzentration untersucht wurde. Als weitere Stressbedingung wurde Kälte gewählt, da der Interaktionspartner *CSDP* mit Kältestress in Verbindung gebracht werden kann (Goldstein *et al.*, 1990). Als Stressbedingung, die bisher nicht in Verbindung zu den Interaktionspartnern steht, wurde das Stickstoffangebot der Zellen verringert, um die Stressantwort der *P. tricornutum Knockdown*-Zellen zu untersuchen. Als Maß für das Stresslevel der Zellen wurde die Produktion der Neutrallipide detektiert. Befindet sich eine Diatomeen-Zelle in Stresssituationen, werden diese Lipide in steigender Menge produziert (Alonso *et al.*, 2000). Mit Hilfe des

Farbstoffes NileRed wurden die Neutrallipide angefärbt und die Emission bei 585 nm detektiert (Abbildung 25). Als Referenz und um auszuschließen, dass die *Knockdown*-Mutanten auf Grund des eingebrachten Konstruktes ein erhöhtes Stressniveau haben, wurden die Zellen ebenfalls unter den Standard-Anzuchtbedingungen kultiviert und hinsichtlich ihrer Neutrallipidproduktion untersucht (Abbildung 25 A-C, Kontrolle). Zu Beginn der Standard-Kultivierung zeigen die *Knockdown*-Kulturen eine leichte Erhöhung der Fluoreszenz ohne signifikante Unterschiede. Im Verlauf der Kultivierung bis Tag 16 ist die Produktion der Neutrallipide in den Kontrollkulturen der Mutanten leicht erhöht gegenüber dem Wildtyp. Wird die Temperatur der Zellen von 18 °C auf 8 °C abgesenkt (Abbildung 25 A, grün), kann für die Fluoreszenz in Mutanten und Wildtyp gleichermaßen ein Anstieg zu Beginn der Kultivierung festgestellt werden. Im Verlauf der Untersuchung bleibt die Produktion im Wildtyp unverändert, während die der Mutanten an Tag 11 und 16 deutlich steigt. Ein vergleichbarer Verlauf ist auch für eine dreifach erhöhte Salzkonzentration erkennbar (Abbildung 25 B, violett). Der Wildtyp zeigt eine geringfügig erhöhte Menge Neutrallipide, die sich über den Verlauf der Kultivierung nicht verändert, während die Mutanten ab Tag 7 ein deutlich erhöhtes Niveau an Neutrallipiden zeigen. Die Anzucht unter verringertem Stickstoffgehalt zeigt für den WT keine veränderte Menge an Neutrallipiden, während in den Mutanten die Emission bei 585 nm ab Tag 4 erhöht ist. Im Gegensatz zu den temperatur- und salzabhängigen Untersuchungen ist hier kein anhaltender Anstieg bei den Messungen erkennbar. In den Mutanten ist die Menge an Neutrallipiden an Tag 16 gegenüber Tag 11 vergleichbar bzw. verringert. Im Vergleich zwischen WT und *Knockdown*-Mutanten ist trotzdem eine erhöhte Menge Lipide in den Mutanten festzustellen.

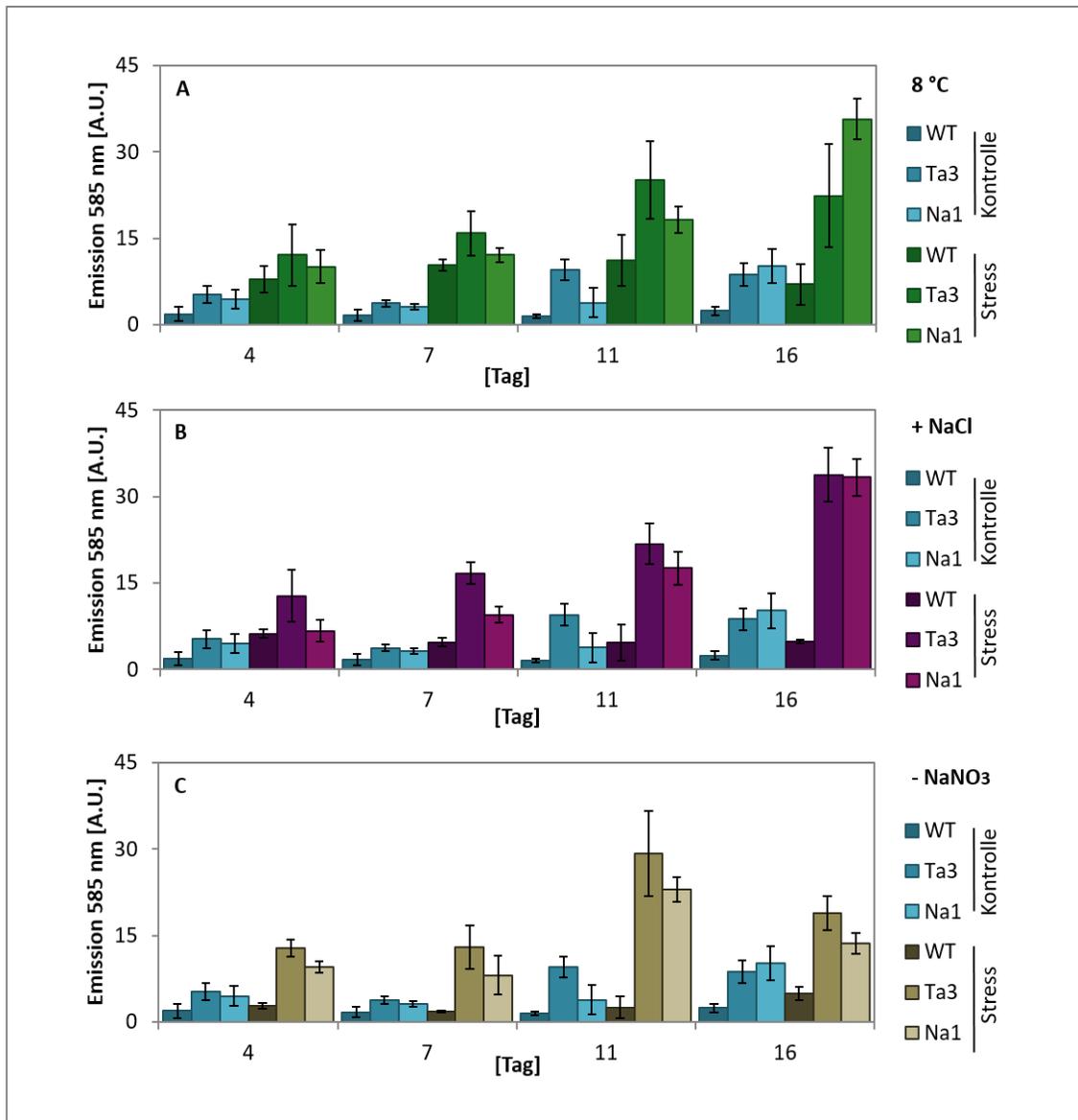


Abbildung 25: Gehalt Neutrallipide der *CryP-Knockdown*-Mutanten Ta3 und Na1 und des Wildtyps in variierenden Anzuchtbedingungen. Die Kulturen wurden im Tag/ Nacht-Rhythmus nicht verändert. Gemessen wurde die Nilered-spezifische Emission bei 585 nm. **A** zeigt die Kultivierung der Zellen bei 8 °C (grün). In **B** wurde der Salzgehalt im Medium verdreifacht (violett) und in **C** wurde die Menge der Stickstoffquelle auf 33 % des Standard-Mediums verringert (braun). Als Kontrolle wurde der Lipidgehalt ebenfalls unter den Standardbedingungen der Zellkultivierung gemessen (blau). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung mit einer Stichprobengröße von n=6.

4 Diskussion

4.1 Das Cryptochrom CryP in *P. tricornutum*

Das pflanzenähnliche Cryptochrom CryP aus *P. tricornutum* wurde 2014 erstmals beschrieben (Juhas *et al.*, 2014; Oliveri *et al.*, 2014). Phylogenetisch zeigt es Ähnlichkeiten zu Cry-DASH Proteinen und CPD III-Photolyasen. Es wird allerdings einer eigenen Gruppe der pflanzenähnlichen Cryptochrome zugeordnet (pCry-like; Oliveri *et al.*, 2014). Weitere Proteine dieser Gruppe stammen unter anderem aus dem Zebrafisch *Danio rerio* und dem Vielborster *Platynereis dumerilii* (Oliveri *et al.*, 2014). Auf Grund fehlender Untersuchungen sind gemeinsame funktionelle Charakteristika bisher nicht beschrieben. Die weite Verbreitung der Proteingruppe deutet jedoch auf eine frühe Entstehung noch zur Zeit des letzten gemeinsamen eukaryotischen Vorfahrens hin (Oliveri *et al.*, 2014). CryP weist Sequenzhomologien von 30 % zu Cry1 aus *A. thaliana* auf und ist der pflanzenähnlichste Vertreter der Cryptochrome-Photolyase-Proteinfamilie in der Diatomee *P. tricornutum* (Juhas *et al.*, 2014).

Nach heterologer Expression und Isolation aus *E. coli* zeigt das Protein die Bindung von zwei Chromophoren. Neben dem katalytisch aktiven FAD konnte die Bindung des lichtsammelnden Chromophors MTHF gezeigt werden (Juhas *et al.*, 2014). Wie von Cry1 bekannt, zeigt es einen durch Blaulicht induzierbaren Photozyklus (Juhas *et al.*, 2014). Nach der Isolation liegt das FAD des CryP-Proteins größtenteils als Neutralradikal FADH^{\bullet} vor. Dies führt zu einer charakteristischen Absorption bei 595 und 635 nm (Juhas *et al.*, 2014), was eine zusätzliche Absorption im Rotlicht darstellt. Durch Blaulichtinkubation kann der verbliebene Anteil oxidierten FADs in den neutral-radikalischen Zustand überführt werden, während eine lange Dunkelinkubation zu einer Anreicherung des oxidierten FADs führt (Juhas *et al.*, 2014). Die Anreicherung des oxidierten FADs führt zu einem Verlust der Absorption im Rotlicht (595 – 650 nm) und einer zusätzlichen Absorption im Blaulicht zwischen 420 und 500 nm. Es wird vermutet, dass FADH^{\bullet} homolog zu pflanzlichen Cryptochromen die aktive angeregte Form des Proteins darstellt (Bouly *et al.*, 2007). Für Cry1 aus *A. thaliana* wird das oxidierte FAD ebenfalls als Grundzustand des Proteins vermutet, während eine Aktivierung durch Blaulicht zu einer Anreicherung des Neutralradikals führt (Banerjee *et al.*, 2007; Bouly *et al.*, 2007). Hier wird durch Rot- oder Grünlicht das FADH^{\bullet} Neutralradikal wahrscheinlich in ein anionisches vollständig reduziertes FADH^{-} oder ein neutrales vollständig reduziertes FADH_2 überführt (Lin *et al.*, 1995; Saxena *et al.*, 2005). Der Übergang von FADH^{\bullet} zu der vollständig reduzierten Form führt zu einem Verlust der Absorption im Rotlichtbereich (595 nm – 650 nm). Das vollständig reduzierte FAD ($\text{FADH}^{-}/\text{FADH}_2$) zeigt eine Absorption zwischen 340 nm und

400 nm (Müller, 1983), welche sich mit der Absorption des zweiten Kofaktors MTHF überlagert. Eine Rotlichtinkubation des CryP-Proteins führt sowohl zu einer Reduktion des oxidierten FADs als auch des Neutralradikals (Abbildung 4). Vom Absorptionsverhalten des CryPs nach Rotlichtinkubation ist somit eine Anreicherung des vollständig reduzierten FADs möglich (Abbildung 5). Dies würde sich in der Reduzierung der Absorption zwischen 400 nm und 700 nm zeigen, während bei 350 nm eine Zunahme der Absorption möglich wäre (Müller, 1983). Diese Merkmale sind für das Absorptionsverhalten des CryPs zu erkennen (Abbildung 4) und deuten auf einen dem Cry1 von *A. thaliana* ähnlichen FAD-abhängigen Photozyklus hin. Das kann einen Hinweis auf die Zugehörigkeit des Proteins zur Gruppe der pflanzenähnlichen Cryptochrome und somit auch auf mögliche Funktionen geben.

Von den pflanzlichen Cryptochromen sind unterschiedliche Lokalisationen bekannt. Cry2 aus *A. thaliana* ist kernlokalisiert (Guo *et al.*, 1998; Kleiner *et al.*, 1999), was auch für CryP gezeigt werden konnte (Abbildung 7). Die Lokalisation im Zellkern wurde vorab vermutet, da eine C-terminal gelegene Importsequenz vorhergesagt werden konnte. Diese wurde mit Hilfe statistischer Auswertung identifiziert (Jäger, 2013) und bestätigte sich durch die Anreicherung eines verkürzten N-terminalen Teils des Proteins im Cytoplasma (Abbildung 7). Das vollständige CryP-GFP-Protein ist in seiner Ausbreitung auf einen Teilbereich des Zellkerns begrenzt (Abbildung 7). Ein ähnliches Verhalten konnte für Cry2 gezeigt werden, wobei das Protein sich an mehreren Stellen im Zellkern konzentriert. Diese Beobachtung wird im Zusammenhang mit einem Abbau des Cry2-Proteins in *A. thaliana* gesehen (Yu *et al.*, 2009). Außer der Nähe zu pflanzlichen Cryptochromen weist die phylogenetische Einordnung des CryP-Proteins auch auf eine Nähe zu DASH-Cryptochromen hin, was ebenfalls durch die spektralen Eigenschaften bestätigt werden kann (Juhás *et al.*, 2014). Von DASH-Cryptochromen sind unterschiedliche Lokalisationen bekannt und wurden bisher sowohl im Chloroplasten als auch im Mitochondrium nachgewiesen (Kleine *et al.*, 2003; Brunelle *et al.*, 2007). Diese Lokalisation konnte für CryP ausgeschlossen werden, es zeigt eine ausschließliche Lokalisation im Zellkern (Abbildung 7), was die Nähe zu pflanzlichen Cryptochromen unterstützt.

Durch Sequenzanalysen konnte eine N-terminal verlängerte Version des CryP-Proteins gezeigt werden, für die ebenfalls eine Expression bestätigt werden konnte (Jäger, 2013; Juhás *et al.*, 2014; ID 45095 und ID 34704). In der Transkriptomanalyse konnte das entsprechende Gen jedoch nicht zugeordnet werden und ist nicht unter den exprimierten Genen zu finden. Auf Proteinebene konnte kein CryP-Signal für die entsprechende Größe nachgewiesen werden (Juhás, 2015). Dies und die Lokalisation homolog zu CryP-GFP können darauf hindeuten, dass es sich bei der gezeigten Expression der mRNA um ein Artefakt handelt (Abbildung 7; Jäger, 2013).

4.2 Wirkungsweise des Cryptochroms CryP

CryP als potentieller Transkriptionsfaktor

Die kürzlich beschriebene Gruppe der dualen CPF-Proteine fasst Proteine zusammen, die sowohl DNA-Reparaturfähigkeit als auch regulative Funktionen besitzen. Die Reparaturfähigkeit entspricht einer Photolyase und geht über die beschriebene Photolyase-Funktion der DASH-Cryptochrome hinaus (Assimgil und Kavakli, 2012). Exemplare dieser Proteingruppe wurden unter anderem in *Trichoderma atroviride* (Berrocal-Tito *et al.*, 2007), *P. tricornutum* (Coesel *et al.*, 2009) und *O. tauri* gefunden (Heijde *et al.*, 2010). Auf Grund der spektroskopischen Ähnlichkeiten zu Cry-DASH Proteinen ist eine duale Funktion auch für CryP denkbar. Hieraus ergibt sich eine mögliche regulative Wirkungsweise des CryPs durch eine direkte Bindung an DNA, vergleichbar mit einem Transkriptionsfaktor. Dieses Verhalten wird bereits von anderen Blaulichtrezeptoren, den ebenfalls kernlokalisierten Aureochromen, vermutet (Schellenberger Costa *et al.*, 2013b). Durch Lichteinwirkung kommt es zu einer Dimerisierung der LOV-Domäne was vermutlich zu einer Bindung an DNA führt und so einen regulatorischen Einfluss ermöglicht (Herman *et al.*, 2013; Herman und Kottke, 2015; Banerjee *et al.*, 2016). Wie Aureochrome zeigt auch CryP eine nukleäre Lokalisation (Abbildung 7; Guo *et al.*, 1998; Schellenberger Costa *et al.*, 2013), was für die Möglichkeit eines direkten Regulationsmechanismus spricht. Es konnte gezeigt werden, dass CryP DNA binden kann, wobei bisher keine spezifische Bindesequenz identifiziert werden konnte (Abbildung 8). 2014 zeigte Juhas *et al.*, dass CryP einen regulatorischen Einfluss auf sowohl LhcX- als auch LhcF-Proteine hat. Die Aktivität des *lhcf1*-Gens wird durch den *fcpa*-Promoter reguliert. Da CryP einen regulativen Einfluss auf LhcF-Proteine nimmt (Juhas *et al.*, 2014), wurde diese Promotorsequenz zur Untersuchung der DNA-Bindfähigkeit des CryP-Proteins genutzt, wobei keine spezifische Bindung für CryP an die Promoter-Sequenz bestätigt werden konnte (Abbildung 8). Durch das Fehlen einer spezifischen Bindung ergeben sich Hinweise auf ein regulatorisches System über weitere Proteine und mögliche Transkriptionsfaktoren.

Eine CryP-spezifische DNA-Bindesequenz ist trotz allem möglich, da eine generelle CryP-DNA-Bindung an genomische DNA von *P. tricornutum* gezeigt werden konnte (Abbildung 8). Diese DNA-Bindfähigkeit kann einen Hinweis auf die mögliche Abstammung der Cryptochrome von Photolyasen sein und ein Abstammungsartefakt in der Funktion des Proteins darstellen (Öztürk *et al.*, 2008a). Denkbar wäre jedoch auch eine durch weitere Proteine stabilisierte DNA-Bindung des CryPs. Die identifizierten Interaktionspartner BOLA und CSDP sind möglicherweise Transkriptionsfaktoren (Abbildung 12; Didier *et al.*, 1988; Dressaire *et al.*, 2015) und könnten eine Bindung des CryPs an DNA spezifizieren. Eine weitere Möglichkeit stellt eine RNA-Bindung dar, die hohe Zahl angereicherter ribosomaler Proteine kann hierauf einen Hinweis geben (Tabelle 6). Möglicherweise kommt es durch einen Nukleinsäure-bindenden Komplex

zu einer Regulation der Translation (Phadtare und Inouye, 1999). Da bisher aber für kein weiteres Cryptochrom eine Funktion als aktiver Transkriptions- oder Translationsfaktor gezeigt werden konnte, ist eine Signalweiterleitung über Protein-Protein-Interaktion wahrscheinlicher. Diese Mechanismen konnten sowohl für pflanzliche als auch für tierische Cryptochrome gezeigt werden (Stanewsky, 2002; Yang *et al.*, 2001).

Protein-Protein-Interaktionen und Regulative Netzwerke

Durch die bereits erwähnten Protein-Protein-Interaktionen pflanzlicher und tierischer Cryptochrome können sehr diverse Prozesse gesteuert werden, wie die Oszillation der inneren Uhr oder die Elongation des Hypokotyls (Ahmad und Cashmore, 1993; Stanewsky *et al.*, 1998). Für CryP konnte bisher kein Einfluss auf die Oszillation oder die innere Uhr festgestellt werden. Stattdessen konnten die drei Interaktionspartner AAA, CSDP und BoIA identifiziert werden. Diese wurden durch ein heterolog exprimiertes CryP-his angereichert (Abbildung 4 A, Abbildung 9) und eine Interaktion wurde *in vitro* verifiziert (Abbildung 12). Durch eine umgekehrte Anreicherung des Cryptochroms durch die heterolog exprimierten Interaktionspartnern konnte die Interaktion weiter bestätigt werden (Abbildung 13). Die Proteine AAA, BoIA und CSDP zeigen keine Homologien zu den bisher bekannten Interaktionspartnern pflanzlicher und tierischer Cryptochrome (Vitaterna *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2011; Bowler *et al.*, 2008). Umgekehrte Sequenzvergleiche der aus *A. thaliana* bekannten Interaktionspartner wie COP1, SPA1 oder *Constants* zeigen wiederum keine Übereinstimmungen mit Sequenzen im Genom der Diatomee (Sequenzvergleich mit Phatr2, NCBI BLAST, Altschul *et al.*, 1990). Da *P. tricornutum* als einzellige Kieselalge keine Blütenbildung und Hypokotylelongation betreibt, ist ein Fehlen der entsprechenden Gen-Sequenzen aus *A. thaliana* nachvollziehbar. Bei COP1 handelt es sich allerdings um eine E3 Ubiquitin-Ligase, welche Proteine für das 26S Proteasom markiert (Wang *et al.*, 2001). Trotz der nicht pflanzenspezifischen Funktion konnten auch hier keine in *P. tricornutum* homologen Sequenzen identifiziert werden (Bowler *et al.*, 2008).

Die Hemmung des 26S Proteasoms durch Cry1 in *A. thaliana* führt zu einer positiven Regulation und Akkumulation diverser Transkriptionsfaktoren (Ang *et al.*, 1998; Lian *et al.*, 2011). Für CryP hingegen konnte vornehmlich eine aktivierende Wirkung auf Proteindegradation-betreffende Gene festgestellt werden (Abbildung 22). Unter Blaulicht kommt es hingegen zu einer Hemmung, was auf eine lichtabhängige Regulation des CryP-Proteins auf Gene der Proteindegradation hindeutet. Hierbei handelt es sich allerdings nur um Gene, die eine Funktion in der Proteindegradation aufweisen. Der tatsächliche Einfluss des CryPs auf die Stabilität weiterer Proteine, wie das für Cry1 (*A. thaliana*) und den

Transkriptionsfaktor HY5 gezeigt werden konnte, wurde bisher nicht untersucht. Die strukturell und funktionell verschiedenen Interaktionspartner, die für Cry1 (*A. thaliana*) und CryP (*P. tricornutum*) identifiziert werden konnten, weisen auf unterschiedliche Funktionen der Cryptochrome hin. Tierische Cryptochrome zeigen durch eine negative Rückkopplung einen hemmenden Einfluss auf die Expression ihrer Interaktionspartner (PER, TIM; Vitaterna *et al.*, 1999). Dies konnte für CryP und die identifizierten Interaktionspartner AAA, BOLA und CSDP nicht gezeigt werden, was wiederum die Nähe zu pflanzliche Cryptochromen deutlich macht (Abbildung 24).

Der CryP-Interaktionspartner AAA

Eines der als Interaktionspartner identifizierten Proteine ist das AAA-Protein (ID 42612, Abbildung 12). Es hat eine bisher unbekannte Funktion und wurde noch nicht beschrieben oder charakterisiert. AAA weist eine „ATPase associated with various cellular activities“-Domäne (AAA-Domäne) auf und ist ein etwa 35 kDa großes Protein (Abbildung 11). Diese Domäne weist unter anderem auf eine Funktion in der DNA-Replikation oder dem Proteinabbau hin (Neuwald *et al.*, 1999). Typischerweise ist eine AAA-Domäne ein zwischen 200 – 250 Aminosäuren langes Motiv, bestehend aus α -Helices und fünf β -Faltblättern (Confalonieri und Duguet, 1995; Patel und Latterich, 1998). Die AAA-Sequenz kann verschiedene konservierte Domänen wie Sensor- und Walker-Motive aufzeigen (Iyer *et al.*, 2004; Neuwald *et al.*, 1999). Das AAA-Motiv des CryP-Interaktionspartners zeigt jedoch nur Teile einer AAA-Domäne mit einer Länge von etwa 60 Aminosäuren (AS 135 – AS 195, NCBI *Conserved Domains*). Bei der strukturellen Analyse des *P. tricornutum* Proteins AAA werden 6 α -Helices und keine β -Faltblätter vorhergesagt (Grigoriev *et al.*, 2012; Nordberg *et al.*, 2014; Abbildung 26), was einen Einfluss auf die Funktionalität der Domäne haben kann und die Abweichungen von bisher bekannten Proteinsequenzen hervorhebt. Ein Vergleich des AAA-Proteins aus *P. tricornutum* mit Proteinsequenzen diverser anderer Arten zeigt die größte Homologie für ein unbekanntes Protein aus *T. pseudonana* (NCBI ID 224014104, Sequenzidentität: 57 %). Weitere Homologien gibt es zu Proteinen der Arten *T. oceanica*, *Nannochloropsis gaditana* und *Ectocarpus siliculosus* (NBCI Blast; Altschul *et al.*, 1990). *N. gaditana* (Eustigmatophyceae) und *E. siliculosus* (Phaeophyceae) gehören zusammen mit den Kieselalgen zu den Heterokontophyta, was das Vorkommen des AAA-Proteins sehr eingrenzt. Es scheint sich dabei um ein Heterokontophyta-spezifisches Protein zu handeln.

Zur AAA-Proteinfamilie gehören unter anderem die ATP-abhängigen AAA-Proteasen (Langer *et al.*, 2000). Eine mögliche ATP-abhängige Proteasefunktion des AAA Proteins könnte eine Parallele zwischen CryP-AAA

und dem Einfluss des Cry1 auf das 26S Proteasom über eine COP1-Interaktion darstellen (Wang *et al.*, 2001). Außerdem wäre auch eine lichtabhängige Degradation des CryPs, wie dies für Cry2 *A. thaliana* der Fall ist, denkbar (Ahmad *et al.*, 1998). Wie auch für Cry2 konnte für CryP ein lichtabhängiger Abbau in *P. tricornutum* gezeigt werden, was auf einen CryP spezifischen Mechanismus vergleichbar mit Cry2 hindeutet (D Radev, Prof. Dr. C Büchel, Universität Frankfurt, nicht publizierte Daten). Dies erfolgt für Cry2 aus *A. thaliana* blaulichtabhängig durch das 26S Proteasom (Yu *et al.*, 2007b). Untereinheiten dieses Proteasoms sind ebenfalls in *T. pseudonana* (Gen ID 24475) und *P. tricornutum* (Gen ID 11735) zu finden, was einen vergleichbaren Mechanismus ermöglichen würde. Beide Proteine weisen homolog zum AAA-Protein ein AAA-Motiv auf, so dass auch das AAA-Protein mit dem lichtinduzierten Abbau des CryP-Proteins in Zusammenhang gebracht werden könnte. Allerdings gibt es strukturell bisher keine Hinweise auf eine Protease-Aktivität des AAA-Proteins in *P. tricornutum*.

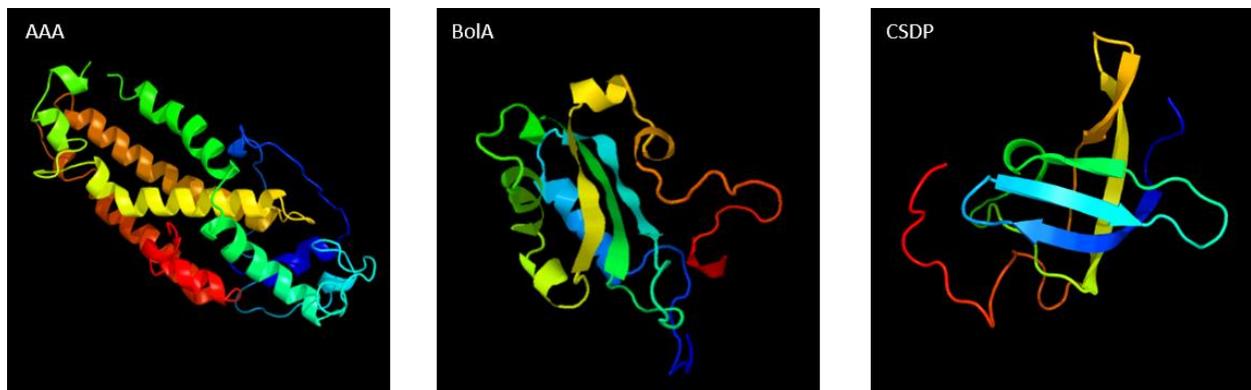


Abbildung 26: Modellierung der CryP-Interaktionspartner AAA, BoIA und CSDP. Die Proteinsequenzen (Phatr2; Joint Genome Institute, Bowler *et al.*, 2008) wurden mit dem Programm Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) modelliert. Für AAA wurde das Protein Mediator der RNA Polymerase II (Transkriptionsuntereinheit 11) und das Metall-bindende Protein Stm4172 (*Salmonella enterica*; Vertrauenswürdigkeit 55%) als Vorlage genutzt. Für den Interaktionspartner BoIA wurde ein Modell mit dem BoIA1-Protein aus *Mus Musculus* (Vertrauenswürdigkeit 100 %) kalkuliert. Die potentielle Struktur des CSDP wurde anhand des Crhsp-24-Proteins aus *Homo sapiens*, CSP1 von *Thermus thermophilus*, CSP-like von *Rickettsia rickettsii*, CRHSP1 von *Neisseria meningitidis* und lin28a-Protein aus der Maus berechnet (Vertrauenswürdigkeit 99 %).

Charakterisierung und Funktion des CryP-Interaktionspartners BoIA

Ein weiteres Protein, das als Interaktionspartner für CryP identifiziert werden konnte, gehört zur Proteinfamilie der *BoIA-like* Proteine (BoIA, ID 14849, Tabelle 6, Abbildung 12), welche zuerst in *E. coli* identifiziert wurde (Aldea *et al.*, 1998). Es handelt sich um eine in Pro- und Eukaryoten weit verbreitete Proteinfamilie. Insgesamt weist *P. tricornutum* fünf Sequenzen für Proteine dieser Familie auf (ID 30667, ID 11230, ID 14849, ID 33016 und ID 13028; Bowler *et al.*, 2008). BoIA-Proteine können eine Rolle im

Zellzyklus oder der Regulation der Homöostase haben (Santos *et al.*, 1999; Kumánovics *et al.*, 2008). Exprimiert werden sie überwiegend in der stationären Wachstumsphase und zusätzlich auch unter Stressbedingungen wie osmotischem oder oxidativem Stress (Santos *et al.*, 1999). Des Weiteren sind *BolA-like* Proteine auch durch UV-Licht induzierbar, was in *Schizosaccharomyces pombe* gezeigt werden konnte (Lee *et al.*, 1994). Dies könnte auf einen gemeinsamen regulativen Mechanismus mit CryP hindeuten, wobei durch Blaulicht bei 465 nm jedoch keine gesteigerte Expression für BolA in *P. tricornutum* festgestellt werden konnte (Abbildung 24). Die heterologe Überexpression eines BolA-Proteins aus *C. reinhardtii* in *E. coli* führt dazu, dass *E. coli* beginnt, Biofilme zu bilden (Khona *et al.*, 2013). Dies erhöht in der Regel die Toleranz gegenüber Stress und für den Organismus schädlichen Substanzen (Freire *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine verringerte Menge CryP in *P. tricornutum* einer erhöhte Sensibilität der Zellen gegenüber Stress zur Folge hat (Abbildung 25). Insbesondere für eine erhöhte Salzkonzentration und eine verringerte Temperatur ist ein CryP-abhängiger Effekt zu sehen. Dies wiederum kann einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen einer verringerten Interaktion des CryP-Proteins mit BolA auf Grund des verringerten CryP-Gehalts und einer veränderten Stressantwort geben. Da weniger Cryptochrom in den Zellen vorhanden ist, kann auch die Interaktion zwischen BolA und CryP geringer ausfallen, was wiederum die Stresstoleranz der Zellen beeinflusst.

Kürzlich wurden BolA-Proteine auch als direkte Transkriptionsfaktoren, die eine hohe Affinität zu DNA zeigen, identifiziert (Dressaire *et al.*, 2015). In *E. coli* dienen sie so als transkriptioneller Schalter, welche die Bildung von Biofilmen über eine große Anzahl von Genen regulieren (Freire *et al.*, 2009; Guinote, *et al.*, 2011; Dressaire *et al.*, 2015). Auch in CryP-Knockdown-Mutanten von *P. tricornutum* konnte ein sehr weitreichender Einfluss des Cryptochroms auf diverse Prozesse innerhalb der Zelle gezeigt werden (Abbildung 22). Allerdings wurden die *BolA-like*-Proteine in *P. tricornutum* bisher noch nicht näher charakterisiert. Trotzdem ist es möglich, dass eine Interaktion des CryPs mit dem potentiellen Transkriptionsfaktor BolA sich in den weitreichenden Effekten des Cryptochroms auf unterschiedliche Stoffwechselwege zeigt (Abbildung 22). In *E. coli* werden unter anderem der Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel sowie Gene des Zitratzyklus durch BolA gesteuert (Dressaire *et al.*, 2015). Für CryP-Knockdown-Mutanten ist ebenfalls ein Einfluss auf diese Bereiche des Metabolismus erkennbar (Abbildung 21; Abbildung 22). Es ist möglich, dass der mittels Transkriptomanalyse identifizierte regulatorische Effekt aus einer veränderten Interaktion zwischen CryP und BolA resultiert. Da in den *Knockdown*-Mutanten eine verringerte Menge CryP vorhanden ist, könnte eine Signalweiterleitung über den potentiellen Transkriptionsfaktor BolA gestört sein.

Der CryP-Interaktionspartner CSDP

Der dritte für CryP identifizierte Interaktionspartner gehört zur Gruppe der *Cold-Shock-Domain*-Proteine (CSD-Proteine). Dies sind etwa 70 Aminosäuren lange Proteine die zwei konservierte DNA-Bindemotive aufweisen. Sie sind sowohl in der Lage, RNA (Phadtare und Inouye, 1999) als auch DNA (Didier *et al.*, 1988; Brand *et al.*, 1994) zu binden, und weisen sehr artspezifische Funktionen auf. In *E. coli* haben CSD-Proteine zum Beispiel einen breiten Einfluss auf die Transkription in Abhängigkeit von der Temperatur (Jones *et al.*, 1987; Gualerzi *et al.*, 2003). In Pflanzen weisen die CSD-Proteine zusätzlich zu dem *Cold-Shock*-Motiv auch eine C-terminale, Glycin-reiche Domäne und variable Zink-Finger-Motive auf (Karlson und Imai, 2003; Sasaki und Imai, 2012). In *A. thaliana* konnte ein Zusammenhang zwischen CSD-Proteinen und der Sensitivität gegenüber Kälte und Trockenheit festgestellt werden (Kim *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009). Wie bereits erwähnt, zeigte die Untersuchung der CryP-*Knockdown*-Mutanten eine veränderte Stressresistenz in Abhängigkeit von der Cryptochrom-Menge (Abbildung 25). Diese kann zum einen durch die CryP-BolA-Interaktion beeinflusst werden, aber auch eine CSDP-CryP-Interaktion kommt für eine Regulation der Stressantwort nach einem Kälteimpuls in Frage (Abbildung 12; Abbildung 22).

Vergleichbar mit Chaperonen und der Stabilität von Proteinen können CSD-Proteine in *A. thaliana* die Stabilität der mRNA-Moleküle beeinflussen und nehmen so regulativen Einfluss auf die Translation von Genen (Juntawong *et al.*, 2013). In *P. tricornutum* sind fünf Gene der CSD-Proteinfamilie annotiert, die bisher nicht näher charakterisiert sind. Die hohe Anzahl an ribosomalen Proteinen, die in den Interaktionsstudien identifiziert werden konnten, können einen Hinweis auf eine Funktion des CSDP als regulativer Faktor für die Stabilität der mRNA und somit der Translation geben. (Tabelle 6). Durch die spezifische Bindung des CSDP an mRNA kann es zu einer Ko-Isolation und Anreicherung ribosomaler Komplexe kommen (Tabelle 6). Eine weitere Funktion der CSD-Proteine ist die Regulation der Embryonalentwicklung und der Blütenbildung, in *A. thaliana* (Fusaro *et al.*, 2007; Yang und Karlson, 2011) und *Oriza sativa* (Chaikam und Karlson, 2008). Eine Funktion in der Regulation des Zellzyklus wie in *A. thaliana* ist auch für *P. tricornutum* möglich. Gene der Entwicklung und des Zellzyklus sind Teil der CryP-spezifischen, blaulichtinduzierten Gene der Kategorie 1 (Abbildung 22). Sie sind in Abhängigkeit von der CryP-Menge unterschiedlich in ihrer Expression reguliert, was möglicherweise auf einen Effekt der CryP-CSDP Interaktion zurückzuführen ist (Abbildung 12).

Wie bereits erwähnt hat eine Verringerung des CryP-Gehaltes in den Zellen von *P. tricornutum* einen Einfluss auf die Protein-Mengen der Lichtsammelproteine der LhcX- und LhcF-Gruppen (Juhás *et al.*, 2014). In *C. reinhardtii* wird die Expression des *lhcll*-Gens, welches homolog zu höheren Pflanzen ist (Teramoto *et al.*, 2002), durch das NAB1-Protein (*Nucleic-acid-binding*-Protein 1) reguliert. Diese Regulation erfolgt

posttranslational durch das RNA bindende Protein für die Isoformen des *lhcll*-Gens (Stauber *et al.*, 2003; Mussnug *et al.*, 2005). Das NAB1-Protein aus *C. reinhardtii* weist wie auch das CSDP aus *P. tricornutum* ein *Cold Shock*-Motiv auf und beide Proteine zeigen eine Sequenzidentität von 62 % (BLAST, NCBI; Altschul *et al.*, 1990). Die NAB1-abhängige Regulation des LhcII gibt einen Hinweis auf den Zusammenhang der CryP-abhängigen Regulation der Lhcs und den CryP-Interaktionspartnern. Es ist möglich, dass CSDP in *P. tricornutum* einen vergleichbaren Einfluss auf die posttranslationale Modifikation verschiedener Lhcs nimmt. Durch eine verringerte Menge CryP könnte es zu einer verringerten Interaktion zwischen CSDP und CryP kommen, was wiederum einen Effekt auf die Regulation der Lhc-Proteine hat. In *C. reinhardtii* ist das LhcII-Protein PSII assoziiert. Für *P. tricornutum* konnten bisher nur PSI assoziierte Lhc-Proteine identifiziert werden, unter welchen sich auch LhcX und LhcF-Proteine befinden (Grouneva *et al.*, 2011). Weitere Proteine dieser Gruppen sind in FCP-Trimeren zu finden, deren Lokalisation bisher nicht eindeutig geklärt ist (Joshi-Deo *et al.*, 2010; Grouneva *et al.*, 2011; Gundermann *et al.*, 2013). Die Homologien zwischen NAB1 und CSDP geben einen Hinweis für eine mögliche Rolle des CSDP als Verbindungsglied zwischen CryP und der CryP-abhängigen Regulation der Lhc-Proteine. In den Untersuchungen der Transkription der CryP-*Knockdown*-Mutanten konnten nur sehr geringe regulative Einflüsse des CryPs auf die Expression der Lhcs gezeigt werden (Gruppe Photosynthese, Abbildung 21, Abbildung 22). Der in Juhas *et al.* (2014) gezeigte Effekt des CryPs auf die Lichtsammelproteine, scheint somit durch eine Regulation auf translationaler Ebene zu entstehen, was eine Funktion des CSDP als mRNA modifizierendes Chaperon unterstützt.

Die beschriebenen Funktionen der identifizierten Interaktionspartner BolA und CSDP in anderen Organismen sind angelehnt an für Cryptochrome bekannte Effekte. Dies betrifft Stressreaktionen wie die Anpassung an Veränderungen der äußeren Einflüsse (Jones *et al.*, 1987; Santos *et al.*, 1999; Gualerzi *et al.*, 2003) und spiegelt sich in der CryP-anhängigen Transkriptomanalyse wieder (Abbildung 20 - Abbildung 22). Zusätzlich sind CryP-spezifische Auswirkungen auf RNA-Ebene deutlich geworden, die bisher keinem der identifizierten Interaktionspartner zugeordnet werden können. Die Proteindegradation wird durch CryP beeinflusst und konnte in *A. thaliana* über die blaulichtabhängige COP1-Interaktion mit dem Cryptochrom in Verbindung gebracht werden (Yang *et al.*, 2001). Einen möglichen Zusammenhang kann hier der bisher nicht charakterisierte Interaktionspartner AAA darstellen. Wie erwähnt kann die identifizierte Domäne auf eine mögliche Proteaseaktivität hindeuten (Langer *et al.*, 2000). Zusätzlich besteht die Möglichkeit weiterer CryP-Interaktionspartner, die bisher nicht identifiziert wurden. Die Proteine AAA, BolA und CSDP zeigen bereits während der Dunkeladaptation eine Interaktion mit CryP (Abbildung 9, Tabelle 6). Es könnten vergleichbar mit Cry2 in *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2011), weitere blaulichtabhängige Interaktionen vorliegen, die bisher nicht untersucht wurden. Während

für CSDP eine direkte DNA- oder RNA-Bindung vermutet wird (Didier *et al.*, 1988; Brand *et al.*, 1994; Mussnug *et al.*, 2005) gibt es für BOLA, welches ebenfalls DNA binden kann (Dressaire *et al.*, 2015), auch Hinweise auf weitere Protein-Protein-Interaktionen (Li und Outten, 2012). Auch in den erweiterten Interaktionsstudien konnten Hinweise auf ein weiteres regulatorisches Netzwerk für BOLA, in Form von weiteren angereicherten Proteinen, gefunden werden (Abbildung 13). Dies spiegelt sich in dem weit gefächertem Einfluss des CryP-Knockdowns auf das Transkriptom von *P. tricornutum* wieder (Abbildung 20-Abbildung 22). Bisher wurde die Lokalisation der gezeigten Interaktionen am CryP-Protein nicht untersucht. Cryptochrome können eine spezifische N- oder C-terminale Interaktion zeigen (Wang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2001; Zuo *et al.*, 2011). Das für die Interaktionsstudien verwendete CryP-his war mit einem Sechsfach-Histidin-Motiv versehen, was mögliche C-terminale Protein-Protein-Interaktion einschränken kann. Diese Markierung des CryP-Proteins könnte auf N-terminale Protein-Protein-Interaktionen zwischen CryP und AAA, BOLA und CSDP hindeuten.

Signalweiterleitung des durch Blaulicht aktivierten Cryptochroms CryP

CryP zeigt eine Blaulichtabsorption durch den lichtsammelnden Chromophor MTHF (Juhas *et al.*, 2014). Dieser kann die Energie an das katalytisch aktive FAD weitergeben (Eker *et al.*, 1981; Jorns *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1988), das in den Zustand des Neutralradikals überführt wird (Juhas *et al.*, 2014). Es wird vermutet, dass es durch die Anregung des FADs innerhalb des Cryptochroms zu einer Änderung der Konformation zwischen PHR und CCT kommt (Partch *et al.*, 2005; Kondoh *et al.*, 2011). Dies könnte zu einer Exposition der C-terminalen Erweiterung führen, was eine Interaktion mit weiteren Proteinen ermöglicht. In Folge einer Anregung des FADs konnten lichtabhängige Phosphorylierungen an pflanzlichen Cryptochromen beobachtet werden (Shalitin *et al.* 2002; Shalitin *et al.*, 2003). Von Cry2 in *A. thaliana* ist eine lichtabhängige Phosphorylierung durch die Casein Kinase1 bekannt (Tan *et al.*, 2013). Die Untersuchungen des CryP-Proteins geben Hinweise auf eine Phosphorylierung an bis zu drei Stellen (Abbildung 15). Dies stimmt mit den für Cry2 in *A. thaliana* identifizierten Phosphorylierungen überein. An drei bekannten Serinen der C-terminalen Erweiterung findet eine Phosphorylierung statt. Die phosphorylierten Serine sind S598, S599 und S605 (Wang *et al.*, 2015). Die Sequenzanalyse des CryP zeigt vier potentielle Serine in der CCT, wobei eine Phosphorylierung der außen gelegenen und möglichst exponierten Aminosäuren am wahrscheinlichsten ist (Abbildung 14). In Cry2 (*A. thaliana*) sind zwei direkt nebeneinander gelegene Serine und zusätzlich ein sechs Positionen entferntes Serin phosphoryliert. Die Sequenz des CryPs weist ebenfalls zwei direkt nebeneinander gelegene Serine auf (S581 und S582; Abbildung 14), welche potentielle Kandidaten für eine Phosphorylierung sind. Das nächstgelegene Serin

hat einen Abstand von 25 Aminosäuren und liegt damit weiter entfernt als die vergleichbaren Serine des Cry2-Proteins aus *A. thaliana* (Abbildung 14). In tierischen Cryptochromen wie dem Cry1 und Cry2 aus der Maus konnte ebenfalls eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Dies steht jedoch nicht im Zusammenhang mit der Aktivierung der Proteine, es dient vielmehr als Signal für die Degradation der Cryptochrome (Harada *et al.*, 2008; Lamia *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2013). Eine Funktion der Phosphorylierung des CryPs als Signal für eine Degradation ist ebenfalls denkbar. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription von CryP durch Lichtinkubation deutlich verringert wird (Abbildung 16; Oliveri *et al.*, 2014). Auch gibt es, wie bereits erwähnt, Hinweise für einen lichtabhängigen Abbau des CryP Proteins vergleichbar mit Cry2 (D Radev, Prof. Dr. C Büchel, Universität Frankfurt, nicht publiziert; Ahmad *et al.*, 1998).

Das CryP-his Protein, welches für eine Untersuchung der Phosphorylierung genutzt wurde, weist zwar eine zu Cry2 vergleichbare Zahl an Phosphorylierungen auf, ist jedoch heterolog in *E. coli* exprimiert und isoliert. Für Prokaryoten sind bisher nur Cry-DASH Proteine wie in *Synechocystis* PCC6803 und *Vibrio cholerae* bekannt (Hitomi *et al.*, 2000; Worthington *et al.*, 2003). Die vorliegende Phosphorylierung deutet zwar auf einen potentiellen Mechanismus für Signalweiterleitung oder Degradation hin, ist jedoch möglicherweise unspezifisch an die exponierten Serine durch Kinasen aus *E. coli* hinzugefügt worden. Für einen sicheren Hinweis einer CryP-Phosphorylierung ist ein *in vivo* Nachweis nötig. Die Nähe des Cryptochroms CryP zu pflanzlichen Vertretern der CPF und die Homologien zu Cry2 (*A. thaliana*) deutet jedoch auch auf eine korrekte Phosphorylierung des CryP-his durch *E. coli* hin. Das CryP-his-Protein wurde zudem erfolgreich für Interaktionsstudien genutzt (Abbildung 9). Von dem Reaktionsmechanismus der Proteine Cry1 und Cry2 aus *A. thaliana* ist bekannt, dass eine Phosphorylierung der Proteine wichtig für eine Interaktion ist (Shalitin *et al.* 2003; Wang *et al.*, 2015). Dies kann ein Hinweis für eine potentiell korrekte Phosphorylierung des CryP-his-Proteins sein.

Ein regulatorisches Netzwerk der Lichtsensorproteine

In *P. tricornutum* sind neben dem beschriebenen Cryptochrom CryP sechs weitere Mitglieder der CPF-Proteinfamilie zugeordnet (Bowler *et al.*, 2008; Depauw *et al.*, 2012). Das einzige, ebenfalls untersuchte Protein ist CPF1. Es konnte eine duale Funktion als (6-4)-Photolyase und regulativer Lichtsensor festgestellt werden (Coesel *et al.*, 2009). Der regulative Einfluss des CPF1 wurde durch eine Überexpression des *Cpf1*-Gens in *P. tricornutum* untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von 32 potentiell durch CPF1-regulierten Genen analysiert (Coesel *et al.*, 2009).

In den *CryP-Knockdown*-Mutanten zeigte sich, dass ebenfalls eine Überexpression des *Cpf1*-Gens vorhanden ist (Abbildung 23). Bereits im Dunkeln ist *Cpf1* bei reduzierter *CryP*-Menge erhöht und durch Blaulicht wird die Expression des *Cpf1*-Gens zusätzlich induziert. Diese Blaulicht-abhängige Erhöhung verstärkt den Unterschied in der Expression des CPF1 zwischen Wildtyp und *CryP-Knockdown*-Mutanten (Abbildung 23). Dies gibt Hinweise auf eine gegenseitige Regulation des *CryP*- und CPF1-Proteins. Die Untersuchung der durch CPF1 beeinflussten Gene in *CryP-Knockdown*-Mutanten zeigt spezifische Effekte. Ein Teil der in Coesel *et al.* (2009) untersuchten Gene ist ausschließlich entweder durch das CPF1 oder *CryP* reguliert, was auf unabhängige Funktionen der Lichtrezeptoren hindeutet (Vergleich der 32 Gene, Anhang Tabelle A 2). 41 % der Gene hingegen zeigen durch einen *CryP-Knockdown* und eine CPF1-Überexpression jeweils eine Regulation in die gleiche Richtung. Dies kann auf eine Regulation durch nur je einen der Lichtrezeptoren hindeuten. Es ist aber ebenfalls möglich, dass die Gene durch beide Photorezeptoren in die gleiche Richtung reguliert werden, was auf ein gemeinsames regulatorisches Netzwerk hindeuten kann. Dies ist ähnlich beschrieben für *A. thaliana*; hierbei sind regulatorische Prozesse der Blütenbildung sowohl über *Cry1* als auch *Cry2* gesteuert (Guo *et al.*, 1998; Goto *et al.*, 1991; El-Assal *et al.*, 2003). Der letzte Teil der untersuchten Gene zeigt in der Regulation durch CPF1 und *CryP* ein gegenläufiges Verhalten. Dies scheint weitere Hinweise auf Funktionen außerhalb eines regulativen Netzwerkes zu geben. Denkbar wäre eine Doppelfunktion der Proteine mit einem Teil gemeinsamer Signalwege und zusätzlichen Rezeptor-spezifischen Regulationen. Der Vergleich der Absorptionsspektren der Proteine *CryP* und CPF1 (Coesel *et al.*, 2009; Juhas *et al.*, 2014) zeigt eine Überschneidung der Absorptionen zwischen 350 und 450 nm. Die bei *CryP* darüber hinausreichende Absorption bis 650 nm (Juhas *et al.*, 2014) deutet dagegen auf zusätzliche spezifische und CPF1-unabhängige Funktionen hin. Eine Verbindung zwischen *CryP* und CPF1 stellen die LhcX-Proteine dar, die durch beide Proteine reguliert werden (Coesel *et al.*, 2009; Juhas *et al.*, 2014). Hier wäre eine gemeinsame Regulation über den Interaktionspartner CSDP, vergleichbar mit COP1, *Cry1* und *Cry2* aus *A. thaliana* möglich (Guo *et al.*, 1998; Goto *et al.*, 1991; El-Assal *et al.*, 2003). Für die spezifisch in heterokonten Algen vorkommende Gruppe der Aureochrome (Takahashi *et al.*, 2007; Ishikawa *et al.*, 2009) konnte bisher kein Zusammenhang zu *CryP* oder einem anderen Protein der CPF-Gruppe festgestellt werden. Die potentiell als Transkriptionsfaktoren wirkenden Aureochrome zeigen bisher keine Beeinflussung durch eine verringerte *CryP*-Menge in der Zelle (Abbildung 23; Huysman *et al.*, 2013).

Außer den Blaulichtrezeptoren ist auch ein Rotlichtrezeptor in *P. tricornutum* vorhanden (Bowler *et al.*, 2008; De Riso *et al.*, 2009; Fortunato *et al.*, 2016). Das Phytochrom (DPH) ist der zweite Lichtrezeptor, der durch den *CryP-Knockdown* in seiner Expression beeinflusst ist (Abbildung 23). Ohne Licht führt ein

verringertes CryP-Gehalt zu einer verstärkten Expression des Phytochroms. Der Blaulichtimpuls führt hingegen zu einer Reduzierung des *Dph*-Transkriptes und einer Anpassung der Expression an den Wildtyp (Abbildung 23). Bei einem normalen CryP-Gehalt zeigt sich hingegen kein Einfluss durch Blaulicht in der Expression des Phytochroms. Das fehlende CryP führt zu einer blaulichtsensitiven Expression des Proteins. Die durch DPH in *P. tricornutum* regulierten Gene sind der Transkription sowie der Signalweiterleitung zugeordnet (Fortunato *et al.*, 2016) und zeigen eine Hochregulation unter Rotlicht gegenüber der Dunkeladaption. Durch einen Lichtimpuls bei 735 nm wird die Expression Phytochrom-spezifisch reguliert (Fortunato *et al.*, 2016). Licht bei 735 nm kann nicht durch das CryP absorbiert werden (Juhas *et al.*, 2014) so dass es zu keiner Überschneidung in der Signalwahrnehmung der Protein CryP und DPH kommt. Außerdem zeigen DPH-spezifische Gene keine Regulation für kürzere Wellenlängen (Fortunato *et al.*, 2016), so dass diese nicht mit den blaulichtinduzierten CryP-spezifisch regulierten Genen vergleichbar sind (Abbildung 20 - Abbildung 22). Mit CryP vergleichbare Unterschiede in der Genexpression der DPH-*Knockout*-Mutanten nach Dunkeladaption sind bisher nicht beschrieben. In *A. thaliana* sind mehrere funktionelle Zusammenhänge zwischen Cryptochromen und Phytochromen bekannt, die dabei einen antagonistischen Einfluss haben (Guo *et al.*, 1998). Die Hochregulation des Phytochroms in Abhängigkeit einer CryP-Runterregulation deutet auf einen ähnlichen Mechanismus hin (Abbildung 23). Phytochrom A und B zeigen eine Interaktion mit dem COP1-SPA1-Komplex (Sheerin *et al.*, 2015) und regulieren die Schattenvermeidung der Pflanzen (Rolauffs *et al.*, 2012). Außerdem kommt es durch PIF-Proteine (Phytochrom-interagierendes Protein) zu einer Verbindung zwischen den Photorezeptoren. Diese Proteine zeigen sowohl eine Interaktion mit den Cryptochromen Cry1 und Cry2 (Ma *et al.*, 2016; Pedmale *et al.*, 2016) als auch mit Phytochromen (Huq und Quail, 2002). In *P. tricornutum* konnten bisher keine Sequenzähnlichkeiten zu den PIF-Proteinen oder dem COP1-SPA1-Komplex identifiziert werden (NCBI BLAST; Altschul *et al.*, 1990; Bowler *et al.*, 2008). Dies deutet auf einen von höheren Pflanzen abweichenden Reaktionsmechanismus hin. Trotz einer fehlenden direkten Interaktion des CryPs mit DPH (Tabelle 6) scheint es einen regulativen Zusammenhang der Photorezeptoren zu geben (Abbildung 23). Hinweise auf eine Interaktion des Phytochroms mit der CPD II Photolyase aus *M. mazei* (Abbildung 10, Tabelle 7; Kiontke *et al.*, 2011) lassen eine Interaktion des Phytochroms mit einem anderen Vertreter der CPF-Proteinfamilie in *P. tricornutum* vermuten. CPD3 ist auf Grund seiner Sequenz einer CPD II-Photolyase zugeordnet (Oliveri *et al.*, 2014) und kommt für eine Interaktion mit dem Phytochrom DPH in Frage. Für CPF1 hingegen gibt es keine gegenseitigen Effekte in der Regulation zwischen CPF1 und DPH (De Riso *et al.*, 2009). Im Gegensatz hierzu beeinflusst CPF1 die Expression des Cry-DASH zugeordneten CPF2-Proteins, was auf ein sehr spezifisches Netzwerk hindeutet (Coesel *et al.*, 2009; Oliveri *et al.*, 2014). Phytochrom A aus *A. thaliana* ist in der Lage, Cry1 zu phosphorylieren und so direkt als Kinase mit dem Cryptochrom zu

interagieren (Ahmad *et al.*, 1998a; Ahmad *et al.*, 1998b). Da für CryP eine Phosphorylierung gezeigt werden konnte (Abbildung 15), ist eine Interaktion mit der Kinase DPH möglich (Fortunato *et al.*, 2016). Eine CryP-DPH-Interaktion konnte durch die durchgeführten Interaktionsstudien allerdings nicht gezeigt werden. Das kann auf eine Interaktion des Phytochroms DPH mit einem anderen Mitglied der CPF-Proteinfamilie in *P. tricornutum* hindeuten.

Die Betrachtung der Expressionsprofile der Gene *Cpf1*, *Dph* und *Cryp* zeigt, dass die maximalen Expressionen versetzt sind und es nur wenige Überschneidungen gibt (Oliveri *et al.*, 2014; Fortunato *et al.*, 2016). Das Gen *Dph* des Phytochroms hat seine maximale Expression am Ende der Lichtphase und zu Beginn der Dunkelphase, während seine Expression im weiteren Verlauf der Dunkelphase und zu Beginn der Lichtphase absinkt (Fortunato *et al.*, 2016). Der Vergleich mit dem CryP-Expressionsprofil zeigt, dass die Expression des Phytochroms sinkt, wenn CryP am Ende der Dunkelphase die maximale Expression erreicht, was auf eine Hemmung des Phytochroms durch CryP hindeutet (Abbildung 23). Die Expression des *Cryp*-Gens wird zu Beginn der Lichtphase deutlich reduziert und steigt erst wieder zu Beginn der Dunkelphase (Oliveri *et al.*, 2014). *Cpf1* hat seine maximale Expression in den ersten fünf Stunden der Lichtphase, was sich mit dem Minimum der *Cryp*-Expression überschneidet. Dass die Expression des *Cpf1* ansteigt, wenn die des *Cryp*-Gens reduziert ist, deutet ebenfalls auf eine Hemmung des *Cpf1* durch das CryP-Protein hin (Abbildung 23). Auf Proteinebene sind die maximalen Proteinmengen für DPH und CPF1 zeitlich versetzt zu den mRNA Expressionsprofilen (Coesel *et al.*, 2009; Oliveri *et al.*, 2014; Fortunato *et al.*, 2016). Das Phytochrom DPH zeigt zu Beginn der Lichtphase die maximale Proteinmenge, während die maximale Expression am Beginn der Dunkelphase liegt. Die größte Menge CPF1 tritt drei bis fünf Stunden nach Lichtinkubation auf und ist nur geringfügig verschoben gegenüber der Expression des entsprechenden Transkripts. Der Tagesrhythmus des CryP-Proteins ist bisher nicht untersucht worden. Es konnten jedoch Hinweise auf einen lichtabhängigen Abbau gezeigt werden (D Radev, Prof. Dr. C Büchel, Universität Frankfurt, nicht publiziert), was eine maximale CryP-Proteinmenge am Ende der Dunkelphase und zu Beginn der Lichtphase nahelegt. Dieses Expressionsprofil würde auf eine Überlagerung des CryP-Proteins mit dem Phytochrom DPH hindeuten, während es möglicherweise zu keiner Überlagerung mit dem CPF1-Protein kommt. Da der hemmende Einfluss des CryP-Proteins auf das Phytochrom DPH nur in Dunkelheit vorhanden ist (Kategorie 3, Abbildung 23; Tabelle A 5) ist eine Überlagerung der beiden Proteine in der Lichtphase möglich. Im Gegensatz hierzu wird *Cpf1* als Kategorie 2 Gen sowohl unter Blaulicht, als auch nach Dunkeladaption gehemmt (Abbildung 23; Tabelle A 4), so dass es möglicherweise zu keiner Überschneidung auf Proteinebene kommt.

Wie bereits erwähnt, konnte für CPF1 eine duale Funktion auch als regulatives Protein festgestellt werden (Coesel *et al.*, 2009). Dies zeigt sich ebenfalls in weitreichenden regulativen Effekte des CryPs, die sich in allen funktionellen Gengruppen widerspiegeln (Abbildung 21; Abbildung 22). Diese Regulation ist möglicherweise nicht nur auf einen direkten Effekt des Cryptochroms zurückzuführen, sondern deutet ebenfalls auf weitere, ebenfalls regulative Proteine wie CPF1 und DPH hin. Der Einfluss der Proteine CryP und CPF1 auf weitere Photorezeptoren (Abbildung 23; Coesel *et al.*, 2009), deutet auf ein mit *A. thaliana* vergleichbares regulatives Netzwerk der Lichtsensorproteine hin (Fraser *et al.*, 2016), dessen Auswirkungen in *P. tricornutum* bisher nicht vollständig untersucht sind.

4.3 Auswirkungen des CryP-Proteins auf das Transkriptom der Zelle

Blaulichtreaktion der Diatomee *P. tricornutum* und der regulative Effekt des CryP-Proteins

Da Blaulicht (350 – 500 nm) unter Wasser den dominanten Wellenlängenbereich darstellt, hat es einen großen regulatorischen Einfluss auf aquatisch lebende Organismen (Kirk, 1994). Es wird unter anderem als Signal für Lichtstress genutzt (Nymark *et al.*, 2013), so dass besonders im Oberflächenwasser bei hohen Lichtintensitäten Photolyasen stark exprimiert sind (Frias-Lopez *et al.*, 2008). Für *P. tricornutum* konnten bisher eine Reihe lichtabhängiger Effekte gezeigt werden. Ein Wechsel von Rot- zu Blaulicht führt zu einem Abbau von Kohlenwasserstoffen und einer Anreicherung von Aminosäuren und Lipiden (Jungandreas *et al.*, 2014). In den Transkriptomdaten zeigt sich eine verstärkte Expression der Gene des Kohlenhydratmetabolismus (Abbildung 19), was einen Abbau der Kohlenwasserstoffe bedeuten kann (Jungandreas *et al.*, 2014). Dies weist auf eine vermehrte Aktivität des Stoffwechsels hin. Ein Starklichtsignal durch Blaulicht führt zu einer vergleichbaren Reaktion des Kohlenhydratstoffwechsels unabhängig von der vorherigen Belichtung der Zellen (Dunkel - Abbildung 19; Rotlicht- Jungandreas *et al.*, 2014). Für die Proteinsynthese ist ein vergleichbarer Effekt zu sehen. Durch einen Blaulichtimpuls nach Rotlichtinkubation steigt die Proteinmenge in der Zelle (Jungandreas *et al.*, 2014), während nach einer Dunkeladaption und Blaulichtimpuls die Proteinsynthese und -modifikation hochreguliert wird (Abbildung 19). Unabhängig von der vorangegangenen Adaption der Zellen scheint sich Blaulicht in beiden Fällen in einem vergleichbaren regulativen Effekt auszuwirken.

Bisher konnte eine Runterregulation der Lhc-Proteine nach einem Weißlicht- oder Blaulichtimpuls als Schutzmechanismus für Lichtstress beobachtet werden (Nymark *et al.*, 2013; Valle *et al.*, 2014). Insgesamt wird jedoch deutlich, dass bei einem Blaulichtimpuls Gene der Photosynthese und des Energiemetabolismus verstärkt exprimiert werden (Abbildung 19). Dies deutet darauf hin, dass zusätzlich

zu den bisher beobachteten Schutzmechanismen vor Lichtstress auch die Energiegewinnung angepasst wird. Eine verringerte Expression der Gengruppe die Stress und der Abwehr zugeordnet sind, gibt hingegen Hinweise darauf, dass eine längere Dunkelphase eine Stresssituation für die Kieselalge darstellt (Abbildung 19). Bei einer Dunkeladaption über sechs Stunden hinaus kommt es zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in *P. tricornutum* und die Zelle verbleibt in der G1-Phase (Brzezinski *et al.*, 1990; Huysman *et al.*, 2010). Nach 72 Stunden Dunkeladaption und einer Stunde Blaulichtimpuls kommt es zu einer Hochregulation der Gene des Zellzyklus und der Zellorganisation sowie des Nukleotidmetabolismus (Abbildung 19). Dies gibt Hinweise auf einen Beginn des Zellzyklus und einem Übergang in die S-Phase durch einen einstündigen Blaulichtimpuls.

Insgesamt zeigt CryP einen aktivierenden Einfluss auf die Genexpression durch Blaulicht und damit auf die Blaulichtreaktion der Zelle (Abbildung 20). Für die regulativen Funktionen scheint ein mengenabhängiger Effekt erkennbar. Es gibt möglicherweise Schwellenwerte für einzelne Regulationswege, da der regulative Effekt des Blaulichtimpulses mit sinkender CryP-Menge stärker wird und eine größere Anzahl an Genen betroffen ist (Tabelle 8, Abbildung 20). Der Einfluss des CryPs ist weit verteilt und nicht auf einen Teilbereich des Stoffwechsels beschränkt. Dies deutet auf ein großes regulatives Netzwerk hin, in dem eine Signalweiterleitung über die identifizierten Interaktionspartner oder weitere Photorezeptoren stattfinden kann. Auch in *A. thaliana* konnte ein breiter Einfluss des regulatorischen Netzwerkes der Photorezeptoren auf die lichtinduzierte Genexpression gezeigt werden. Von 992 starklichtinduzierten Genen sind 77 durch Cryptochrome reguliert (Kleine *et al.*, 2007). 65 weitere Gene zeigen einen Einfluss durch HY5, dem durch Cry1 stabilisierten Transkriptionsfaktor, und geben einen Einblick auf die Ausdehnung des regulatorischen Netzwerkes (Kleine *et al.*, 2007).

Zwar kommt es zu einer überwiegend positiven Regulation durch CryP (Abbildung 20), jedoch zeigt die lichtabhängige Klassifizierung der CryP-regulierten Gene auch hier Unterschiede. Während die durch Blaulicht angesprochenen Genkategorien 1 und 2 eine CryP-spezifische Hochregulation zeigen, werden Gene der lichtunabhängig regulierten Kategorie 3 CryP-spezifisch überwiegend herunterreguliert (Abbildung 21). Einen Hinweis dafür, dass CryP Teil eines regulatorischen Netzwerkes ist, stellt auch der hohe Anteil DNA- und RNA-modifizierender Gene unter den CryP-regulierten Kategorien dar (Abbildung 21). Zusätzlich sind weitere signalweiterleitende Prozesse durch CryP reguliert (Abbildung 21), die eventuell Teil anderer Reaktionskaskaden sind. Eine überwiegend aktivierende Regulation zeigt die Nähe des CryP-Proteins zu pflanzlichen Cryptochromen. Diese sind wie Cry1 aus *A. thaliana* überwiegend für eine aktivierende Regulation bekannt. Im Falle des Cry1 geschieht dies über eine Hemmung des COP1-SPA1-Komplexes und des 26S Proteasoms, was zu einer Anreicherung diverser Transkriptionsfaktoren

führt (Ang *et al.*, 1998). Tierische Cryptochrome wie Cry1 und Cry2 aus der Maus sind überwiegend als starke Regressoren aktiv und wirken somit CryP entgegengesetzt (Kume *et al.*, 1999).

Funktion eines Lichtrezeptors im Dunkeln

Das Expressionsprofil des Cryptochroms CryP zeigt ein Maximum am Ende der Dunkelphase und eine starke Runterregulation am Beginn der Lichtphase. Erst am Ende der Lichtphase zeigt sich eine erneute Steigung der CryP-Expression. Damit zeigt CryP eine von den anderen CPF-Proteinen in *P. tricornutum* abweichende Expression (Oliveri *et al.*, 2014). Für einen Photorezeptor erscheint eine maximale Expression in der Dunkelphase ungewöhnlich. Einerseits könnte dies auf eine besondere Funktion im Übergang von Dunkel- zur Lichtphase hinweisen, es könnte jedoch auch auf eine lichtunabhängige Funktion des Proteins hindeuten, wie es von tierischen Cryptochromen Typ II bekannt ist (Okamura *et al.*, 1999). Durch die Transkriptomanalyse zeigen sich CryP-spezifische Gene, die eine Regulation ausschließlich unter Dunkeladaptation zeigen. Diese Gene werden zur Kategorie 3 CryP-spezifisch regulierter Gene zusammengefasst (Abbildung 21) und können einen Einblick in eine lichtunabhängige Funktion des Photosensors geben. Die Expression einiger dieser Gene wird durch CryP im Dunkeln unterdrückt. Eine Repressorfunktion deutet ebenfalls auf eine Funktionsweise der tierischen Cryptochrome hin (Kume *et al.*, 2007). Der größte Anteil dieser Gene hat eine bisher unbekannte Funktion. Die stärkste Unterdrückung ist für Gene der Signalweiterleitung zu sehen (Abbildung 21); dies könnte lichtunabhängigen Einfluss auf weitere regulatorische Mechanismen darstellen. Von der Transkript-Menge ist besonders die Gruppe der Gene für Stressreaktion und Abwehr stark exprimiert, was wiederum einen Hinweis auf eine mögliche Funktion im Übergang zwischen Licht und Dunkelphase ist. Hierbei ist wichtig, dass durch das eintreffende Licht keine oder möglichst geringe Schäden am photosynthetischen Apparat entstehen. Es ist möglich, dass CryP in den Zellen nicht nur als Sensor für wechselnde Lichtbedingungen, sondern speziell für den Übergang zwischen Licht- und Dunkelphase genutzt wird.

Die Kategorie 2 der CryP regulierten Gene zeigt eine Regulation sowohl unter Blaulicht als auch in der Dunkeladaptation. Die Art der Regulation ist für die Gene stets gleich, so dass ein Gen, welches im Dunkeln unterdrückt wird, auch im Blaulicht durch CryP herunterreguliert ist (Abbildung 20). Dieses Verhalten deutet auf eine konstitutive Regulation des CryPs unabhängig von den Lichtbedingungen hin, wie es für Typ II tierischer Cryptochrome bekannt ist (Kume *et al.*, 2007). Die Betrachtung der Transkript-Mengen der entsprechenden Kategorie 2 Gene zeigt hier jedoch deutliche Unterschiede zwischen der Expression der Gene im Dunkeln und nach Blaulichtimpuls, was gegen eine konstitutive Regulation durch CryP spricht.

Vielmehr deutet dies auf eine Kombination zwischen der lichtunabhängigen mit der lichtgesteuerten Regulation hin, was sowohl Teile tierischer als auch pflanzlicher Mechanismen darstellt (Lin et al, 1998; Ahmad *et al.*, 1998; Kume *et al.*, 2007). Diatomeen, welche wahrscheinlich durch sekundäre Endosymbiose entstanden sind, zeigen eine hohe Anzahl Gene tierischer Abstammung (Bowler *et al.*, 2008). Nach der Hypothese der Endosymbiose sind Diatomeen auf einem bisher unbekanntem eukaryotischen Wirt und einem Vorfahren der heutigen Rotalgen zurückzuführen (McFadden, 2001), was einen Hinweis auf die Herkunft der Gene tierischer Abstammung gibt. Die Gene der Kategorie 1, welche durch das Cryptochrom ausschließlich im Blaulicht reguliert werden, deuten im Gegensatz zu den Kategorie 2 Genen auf eine Ähnlichkeit zu pflanzlichen Cryptochromen hin. Eine vergleichbare Anzahl regulierter Gene durch einen Starklichtimpuls konnte für Cry1 aus *A. thaliana* identifiziert werden (Kleine *et al.*, 2007).

4.4 Modell zur Wirkungsweise des Cryptochroms CryP

Abbildung 27 fasst die Wirkungsweise des CryP-Proteins zusammen. Es konnten drei Kategorien CryP-regulierter Gene identifiziert werden. Diese unterscheiden sich in der Art der lichtabhängigen Regulation durch das CryP-Protein. Während die Gene der Kategorie 1 nur unter Blaulicht und Kategorie 3 nur nach Dunkeladaption reguliert werden, zeigen die Gene der Kategorie 3 einen regulativen Effekt sowohl nach Blaulicht, als auch nach Dunkeladaption. Hierbei bleibt die Art der Regulation für beide Lichtbedingungen gleich, nur die Intensität des Effektes und die daraus resultierenden relativen Transkript-Mengen werden beeinflusst. Für die Gene der Kategorie 1 konnte besonders ein aktivierender Effekt für die Gruppen Signalweiterleitung, RNA und Proteindegradation festgestellt werden, während die funktionelle Gruppe Stress und Abwehr einen hemmenden Effekt zeigt. In Kategorie 2 ist ein hemmender Effekt besonders für Gene des Kohlenhydratstoffwechsels zu sehen, während Proteindegradation und Proteinsynthese eine Hochregulation zeigen. In der Kategorie 3 werden ausschließlich Gene des Aminosäurestoffwechsels gehemmt, während die funktionellen Gruppen DNA, RNA, Signalweiterleitung und Proteinmodifikation einen aktivierenden Effekt aufweisen.

Der zweite Teil des Modells (Abbildung 27 B) stellt die Interaktion des Cryptochroms mit den identifizierten Proteinen da. Eine Zuordnung möglicher weiterführende regulative Effekte auf die Transkription oder Translation konnten bisher nicht für die Interaktionspartner in *P. tricornutum* erfolgen. Auf Grund der Erkenntnisse aus anderen Organismen wurde eine hypothetische Zuordnung durchgeführt. Ob es zwischen den Interaktionspartnern AAA, BOLA und CSDP ebenfalls zu einer Protein-Protein-Interaktion kommt, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Durch die Verringerung des CryP-Proteingehalts in

P. tricornutum konnte ein regulativer Effekt auf weitere Photorezeptoren gezeigt werden (Abbildung 27 B). Hierbei wird die Expression des Phytochroms DPH im Dunkeln durch CryP gehemmt, während die Expression des dualen Blaulichtrezeptors CPF1 sowohl im Blaulicht, als auch nach Dunkeladaption gehemmt wird. CryP scheint Teil eines Photorezeptor-Netzwerkes zu sein, das vermutlich sowohl für die generelle Wahrnehmung des Lichtes, als auch für die Erkennung der Lichtqualität eine Rolle spielt. Funktionell nimmt CryP mit seinen weitreichenden Effekten in An- und Abwesenheit von Licht eine bisher einzigartige Stellung ein.

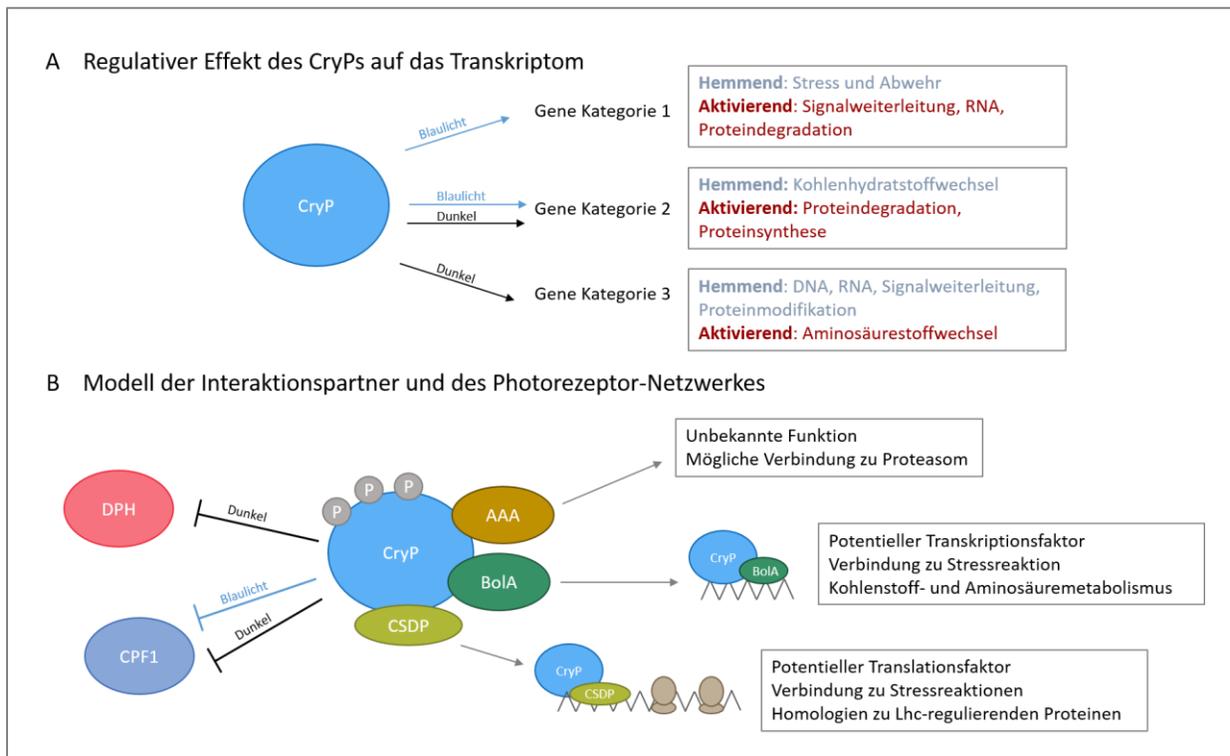


Abbildung 27: Modell des Wirkmechanismus des CryP-Proteins. Der Wirkmechanismus des Proteins ist in zwei Teile unterteilt. **A** zeigt denn allgemeinen Effekt des Proteins auf die drei Kategorien der CryP-regulierten Gene. Kategorie 1 wird ausschließlich unter Blaulicht reguliert. Gene der Kategorie 2 werden sowohl im Blaulicht, als auch nach Dunkeladaption reguliert, während Gene der Kategorie 3 eine Regulation nur nach Dunkeladaption aufweisen. **B** zeigt das Modell der CryP-Interaktionspartner AAA (ID 42612), BoIA (ID 14849) und CSDP (ID 15211) mit potentiellen weiterführenden Wirkmechanismen. CryP (ID 54342) ist phosphoryliert (P) und hat einen hemmenden Einfluss auf die Expression der Gene der Photorezeptoren DPH (ID 54300) und CPF1 (ID 27429).

5 Zusammenfassung

Bei Cryptochromen handelt es sich um Blaulichtrezeptoren der Cryptochrom-Photolyase-Proteinfamilie (CPF). Mitglieder dieser Proteinfamilie sind in allen Domänen des Lebens zu finden und haben eine essentielle Rolle in der Reparatur der DNA sowie der lichtgesteuerten Regulation der Expression. Cryptochrome sind in der Regel keine DNA-reparierenden Proteine. Sie sind regulativ an der Steuerung der inneren Uhr und des Zellzyklus der Organismen beteiligt. In der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* konnten bisher sechs phylogenetisch unterschiedliche Mitglieder der CPF identifiziert werden. Bei CryP handelt es sich um das einzige pflanzenähnliche Cryptochrom der photoautotrophen Diatomee. Für das Protein CryP konnte bereits ein blaulichtinduzierter Photozyklus durch die Absorption der Chromophore 5-Methenyltetrahydrofolat (MTHF) und Flavinadenindinukleotid (FAD) gezeigt werden. Außerdem ist eine regulative Wirkung des Proteins auf die Lichtsammelkomplexe (Lhc) der Diatomee bekannt. Für eine weitere Charakterisierung des CryPs wurde in dieser Arbeit zunächst das Absorptionsverhalten unter verschiedenen Wellenlängen beobachtet, um so einen Einblick in eine mögliche Aktivierung und Deaktivierung des Proteins durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen zu erlangen. Es zeigte sich hierbei eine mit pflanzlichen Cryptochromen vergleichbare Anreicherung verschiedener Redoxzustände des FADs in Abhängigkeit von der Wellenlänge.

Für eine Aufklärung der Wirkungsweise des CryP-Proteins wurden verschiedene Hypothesen untersucht: Die phylogenetische Nähe und ein ähnliches Absorptionsverhalten des CryPs zu Cryptochromen mit Reparaturfähigkeit für einzelsträngige DNA (Cry-DASH) führte zu einer Untersuchung des Proteins als möglicher Transkriptionsfaktor. Hierfür konnte eine Kernlokalisierung des Proteins nachgewiesen werden, was Rückschlüsse auf eine potentielle Regulation der Expression mittels DNA-Bindung zulässt. Außerdem wurde gezeigt, dass CryP DNA-Bindfähigkeit besitzt. Die bisher nachgewiesenen Bindungen waren jedoch unspezifischer Art. Dies konnte auch für die Promotersequenz eines der durch CryP regulierten Gene *lhcf1* festgestellt werden. Auf Grund der unspezifischen DNA-Bindung wurde eine zweite Hypothese für CryP untersucht: CryP wirkt regulativ auf die Expression verschiedener Gene durch Protein-Protein-Interaktionen und ist Teil einer Reaktionskaskade zur Signalweiterleitung in *P. tricornutum*.

Durch die Untersuchung der zweiten Hypothese konnten drei Interaktionspartner für CryP identifiziert und eine Interaktion verifiziert werden. Hierbei handelt es sich um das Protein AAA mit einer bisher unbekanntem Funktion und das Protein BolA, welches Teil der zuerst in *Escherichia coli* identifizierten BolA-like-Proteinfamilie ist. Außerdem konnte eine Interaktion mit dem Cold-Shock-Domänen-Protein CSDP gezeigt werden. Bei den Proteinen BolA und CSDP handelt es sich um potentiell regulierende Faktoren der

Transkription und Translation, was Teil einer Reaktionskaskade sein kann. Die aus anderen Organismen bekannten Funktionen des BolA-Proteins überschneiden sich mit den in *CryP-Knockdown*-Mutanten beobachteten Effekten. Sie zeigen eine erhöhte Sensitivität für Stresssituationen wie abweichende Nährstoffkonzentration, Osmolaritäten und Temperaturen. Diese Beobachtungen stellen einen Zusammenhang der durch einen *CryP-Knockdown* beobachteten Effekte und der *CryP*-*BolA*-Interaktion her. Durch Homologien zu *Cold-Shock*-Proteinen aus *Chlamydomonas reinhardtii* gibt die *CryP*-Interaktion mit dem Protein CSDP Hinweise auf einen potentiellen Mechanismus zur Regulation der Lhc-Proteine, für welche zuvor ein *CryP*-abhängiger Effekt beschrieben war.

Über die Protein-Protein-Interaktionen hinaus wurde die Phosphorylierung des *CryPs* als Möglichkeit der Signalweiterleitung untersucht. Es konnte eine reversible Phosphorylierung des heterolog aus *E. coli* isolierten *CryPs* gezeigt werden. Diese zeigt Ähnlichkeiten zu bekannten Phosphorylierungen pflanzlicher Cryptochrome und gibt Hinweise auf einen Mechanismus der Signalweiterleitung.

Durch die Untersuchung der *CryP*-regulierten Transkription mit *P. tricornutum* *CryP-Knockdown*-Mutanten durch *Next-Generation-Sequencing* (NGS) konnte die Hypothese der regulativen Proteinkaskade und der Signalweiterleitung weiter bestätigt werden. Die Auswirkungen des *CryPs* auf die Transkription erwiesen sich als nicht auf einen Teilbereich des Metabolismus begrenzt, sondern sind in einem großen Teil der funktionellen Gengruppen in *P. tricornutum* zu sehen. Außerdem konnten drei Klassen *CryP*-regulierter Gene festgestellt werden. Kategorie 1: die ausschließlich unter Blaulicht regulierten Gene; Kategorie 2: die sowohl unter Blaulicht als auch im Dunkeln regulierten Gene und Kategorie 3: die ausschließlich im Dunkeln regulierten Gene. Ein im Dunkeln und unter Blaulicht jeweils unterschiedlicher regulativer Effekt deutet auf eine Doppelfunktion des *CryPs* hin. Möglicherweise hat das Cryptochrom unterschiedliche lichtabhängige und lichtunabhängige Funktionen.

Durch die Analyse der *CryP*-regulierten Genexpression konnte außerdem ein Zusammenhang zwischen *CryP* und weiteren Photorezeptoren gezeigt werden. Der *CryP*-Proteingehalt in der Zelle hat einen regulativen Einfluss auf das CPF1-Protein, eine Photolyase mit dualer Funktion aus der gleichen Proteinfamilie. Zusätzlich konnte auch ein Einfluss auf die Lichtsensitivität der Genexpression des Rotlichtrezeptors Phytochrom (DPH) durch *CryP* gezeigt werden. Vergleichbar mit höheren Pflanzen scheint ein regulatives Netzwerk der Photorezeptoren auch in der Diatomee *P. tricornutum* vorhanden zu sein.

6 Literaturangaben

- Ahmad M, Cashmore AR (1993).** Hy4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366(6451):162-66
- Ahmad M, Jarillo JA, Cashmore AR (1998).** Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *The Plant Cell* 10(2):197-207
- Ahmad M, Lin C, Cashmore AR (1995).** Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *The Plant Journal* 8:653-658
- Akita H, Tanis SP, Adams M, Balogh-Nair V, Nakanishi K (1980).** Nonbleachable rhodopsins retaining the full natural chromophore. *Journal of the American Chemical Society* 102(20):6370-6372
- Aldea M, Hernández-Chico C, de la Campa AG, Kushner SR, Vicente M (1988).** Identification, cloning, and expression of bolA, an ftsZ-dependent morphology of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 170(11):5169-5176
- Alonso DL, Belarbi EH, Fernández-Sevilla JM, Rodríguez-Ruiz J, Molina Grima E (2000).** Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry* 54(5):461-471
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3):403-410
- Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR (1996).** Stable Nuclear Transformation of the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Molecular Genetics and Genomics* 252(5):572-579
- Archibald JM, Keeling PJ (2002).** Recycled Plastides: a 'green movement' in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics* 18(11):577-584
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kröger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS (2004).** The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306(5693):79-86
- Asimgil H, Kavakli IH (2012).** Purification and characterization of five members of photolyase/cryptochrome family from *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Science* 185-186:190-198
- Aubert C, Vos MH, Mathis P, Eker AP, Brettel K (2000).** Intra protein radical transfer during photo activation of DNA photolyase. *Nature* 405(6786):586-590
- Auldridge ME, Forest KT (2011).** Bacterial phytochromes: more than meets the light. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 46(1):67-88
- Banaś AK, Aggarwal C, Łabuz J, Sztatelman O, Gabryś H (2012).** Blue light signalling in chloroplast movements. *Journal of Experimental Botany* 63(4):1559-1574

- Banerjee A, Herman E, Serif M, Maestre-Reyna M, Hepp S, Pokorny R, Kroth PG, Essen LO, Kottke T (2016).** Allosteric communication between DNA-binding and light-responsive domains of diatom class I aureochromes. *Nucleic Acids Research* 44(12):5957-70
- Banerjee R, Schleicher E, Meier S, Viana RM, Pokorny R, Ahmad M, Bittl R, Batschauer A (2007).** The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *The Journal of Biological Chemistry* 282(20):14916-14922
- Barclay WR, Meager KM, Abril JR (1994).** Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganism. *Journal of Applied Phycology* 6(2):123-129
- Barka F, Angstenberger M, Ahrendt T, Lorenzen W, Bode HB, Büchel C (2016).** Identification of a triacylglycerol lipase in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1861(3):239-48
- Beer A, Gundermann K, Beckmann J, Büchel C (2006).** Subunit composition and pigmentation of fucoxanthin-chlorophyll proteins in diatoms: evidence for a subunit involved in diadinoxanthin and diatoxanthin binding. *Biochemistry* 45(43):13046-13053
- Berndt A, Kottke T, Breitzkreuz H, Dvorsky R, Hennig S, Alexander M, Wolf E (2007).** A novel photoreaction mechanism for the circadian blue light photoreceptor *Drosophila* cryptochrome. *The Journal of Biological Chemistry* 282:13011-1321
- Bhattacharya D, Medlin L (1998).** Algal phylogeny and the origin of land plants. *Photosynthesis Research* 116(1):9-15
- Bhaya D, Grossman AR (1993).** Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nucleic Acids Research* 21(19):4458-4466
- Bhoo SH, Davis SJ, Walker J, Karniol B, Vierstra RD (2001).** Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* 414(6865):776-779
- Birge RR (1981).** Photophysics of light transduction in rhodopsin and bacteriorhodopsin. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 10:315-354
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014).** Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30(15):2114-2120
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK (1952).** A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 38(8):662-666
- Boscov JS, Feinleib ME (1979).** Phototactic response of *Chlamydomonas* to flashes of light. II. Response of individual cells. *Photochemistry and Photobiology* 30(4):499-505
- Bouly JP, Giovani B, Djamei A, Mueller M, Zeugner A, Dudkin EA, 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 JP, Schleicher E, Dionisio-Sese M, Vandebussche 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. *The Journal of Biological Chemistry* 282(13):9383-939
- Bowler C, Vardi A, Allen AE (2010).** Oceanographic and Biogeochemical Insights from Diatom Genomes. *Annual Review of Marine Science* 2:333-365
- Bowler C, Allen AE, Badger JH, Grimwood J, Jabbari K, Kuo A, Maheswari U, Martens C, Maumus F, Otiillar RP, Rayko E, Salamov A, Vandepoele K, Beszteri B, Gruber A, Heijde M, Katinka M, Mock**

- T, Valentin K, Verret F, Berges JA, Brownlee C, Cadoret JP, Chiovitti A, Choi CJ, Coesel S, De Martino A, Detter JC, Durkin C, Falciatore A, Fournet J, Haruta M, Huysman MJ, Jenkins BD, Jiroutova K, Jorgensen RE, Joubert Y, Kaplan A, Kröger N, Kroth PG, La Roche J, Lindquist E, Lommer M, Martin-Jézéquel V, Lopez PJ, Lucas S, Mangogna M, McGinnis K, Medlin LK, Montsant A, Oudot-Le Secq MP, Napoli C, Obornik M, Parker MS, Petit JL, Porcel BM, Poulsen N, Robison M, Rychlewski L, Rynearson TA, Schmutz J, Shapiro H, Siaux M, Stanley M, Sussman MR, Taylor AR, Vardi A, von Dassow P, Vyverman W, Willis A, Wyrwicz LS, Rokhsar DS, Weissenbach J, Armbrust EV, Green BR, Van de Peer Y, Grigoriev IV (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456(7219):239-244
- Bozarth A, Maier UG, Zauner S (2009). Diatoms in biotechnology: Modern tools and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(2):195-201
- Brandi A, Pon CL, Gualerzi CO (1994). Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of *hns*. *Biochimie* 76(10-11):1090-1098
- Brautigam CA, Smith BS, Ma Z, Palnitkar M, Tomchick DR, 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
- Brettel K, Byrdin M (2010). Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Current Opinion in Structural Biology* 20(6):693-701
- Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, Toh H, Kucho K, Ishiura M, Kanehisa M, Roberts VA, Todo T, Tainer JA, Getzoff ED (2003). Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. *Molecular Cell* 11(1):59-67
- Brunelle SA, Hazard ES, Sotka EE, van Dolah FM (2007). Characterization of a dinoflagellate cryptochrome blue-light receptor with a possible role in circadian control of the cell cycle. *Journal of Phycology* 43(3):509-518
- Brzezinski MA, Olson RJ, Chisholm SW (1990). Silicon availability and cell-cycle progression in marine diatoms. *Marine Ecology Progress Series* 67:83-96
- Büchel C (2015). Evolution and function of light harvesting proteins. *Journal of Plant Physiology* 172:62-75
- Busza A, Emery-Le M, Rosbash M, Emery P (2004). Roles of the two *Drosophila* CRYPTOCHROME structural domains in circadian photoreception. *Science* 304(5676):1503-1506
- Casal JJ, Yanovsky MJ (2005). Regulation of gene expression by light. *The International Journal of Developmental Biology* 49(5-6):501-511
- Castrillo M, Garcia-Martinez J, Avalos J (2013). Light-dependent functions of the *Fusarium fujikuroi* CryD DASH cryptochrome in development and secondary metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 79(8):2777-2788
- Chaal BK, Green BR (2007). Protein targeting in "secondary" or "complex" chloroplasts. *Methods in Molecular Biology* 390:207-217
- Chaikam V, Karlson D (2008). Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant Cell and Environment* 31(7):995-1006
- Chaves I, Pokorný R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen LO, van der Horst GT, Batschauer A, Ahmad M (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology* 62:335-364

- Chaves I, Yagita K, Barnhoorn S, Okamura H, van der Horst GT, Tamanini F (2006).** Functional evolution of the photolyase/cryptochrome protein family: importance of the C terminus of mammalian CRY1 for circadian core oscillator performance. *Molecular and Cellular Biology* 26(5):1743-1753
- Chen M, Chory J, Fankhauser C (2004).** Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics* 38:87-117
- Cheung MS, Daizadeh I, Stuchebrukhov AA, Heelis PF (1999).** Pathways of electron transfer in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp306 to FADH. *Biophysical Journal* 76(3):1241-1249
- Christie JM (2007).** Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* 58:21-45
- Coesel S, Mangogna M, Ishikawa T, Heijde M, Rogato A, Finazzi G, Todo T, Bowler C, Falciatore A (2009).** Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity. *European Molecular Biology Organization Reports* 10(6):655-661
- Confalonieri F, Duguet M (1995).** A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *BioEssays* 17(7):639-650
- Crosson S, Rajagopal S, Moffat K (2003).** The LOV domain family: Photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42(1):2-10
- Daiyasu H, Ishikawa T, Kuma K, Iwai S, Todo T, Toh H (2004).** Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes to Cells* 9(5):479-495
- Damiani MJ, Yalloway GN, Lu J, McLeod NR, O'Neill MA (2009).** Kinetic stability of the Flavin semiquinone in photolyase and cryptochrome-DASH. *Biochemistry* 48(48):11399-11411
- Darwin C (1881).** The power of movement in plants. assisted by Darwin F. D Appleton & Company, Bond street, New York
- Davis SJ, Vener AV, Vierstra RD (1999).** Bacteriophytochromes: Phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* 286(5449):2517-2520
- De Riso V, Raniello R, Maumus F, Rogato A, Bowler C, Falciatore A (2009).** Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Research* 37(14):e96
- Depauw FA, Rogato A, Ribera d'Alcalà M, Falciatore A (2012).** Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms. *Journal of Experimental Botany* 63(4):1575-1591
- Devlin PF, Kay SA (2000).** Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *The Plant Cell* 12(12):2499-2509
- Didier DK, Schiffenbauer J, Woulfe SL, Zacheis M, Schwartz BD (1988).** Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 85(19):7322-7326
- Dressaire C, Moreira RN, Barahona S, Alves de Matos AP, Arraiano CM (2015).** BolA is a transcriptional switch that turns off motility and turns on biofilm development. *MBio* 6(1):e02352-14
- Dunahay T, Jarvis E, Dais S, Roessler PG (1996).** Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57-58:223-231
- Durnford DG, Aebersold R, Green BR (1996).** The fucoxanthin-chlorophyll proteins from a chromophyte alga are part of a large multigene family: structural and evolutionary relationships to other light harvesting antennae. *Molecular Genetics and Genomics* 253(3):377-386

- Eker APM, Dekker RH, Berends W (1981).** Photoreactivating enzyme from *Streptomyces griseus*-IV. On the nature of the chromophoric cofactor in *Streptomyces griseus* photoreactivating enzyme. *Photochemistry and Photobiology* 33(1):65-72
- El-Assal SED, Alonso-Blanco C, Peeters AJM, Wagemaker C, Weller JL, Koornneef M (2003).** The role of cryptochrome 2 in flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133(4):1504-1516
- Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M (1998).** CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95(5):669-679
- Eppard M, Krumbein WE, von Haesler A, Rhiel E (2000).** Characterization of fcp4 and fcp12, two additional genes encoding light harvesting proteins of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) and phylogenetic analysis of this complex gene family. *Plant Biology* 2(3):283-289
- Falkowski PG, Barber RT, Smetacek V (1998).** Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* 281(5374):200-206
- Fortunato AE, Jaubert M, Enomoto G, Bouly JP, Raniello R, Thaler M, Malviya S, Bernardes JS, Rappaport F, Gentili B, Carbone A, Bowler C, Ribera d'Alcalà M, Ikeuchi M, Falciatore A (2016).** Diatom phytochromes reveal the existence of far-red-light-based sensing in the ocean. *The Plant Cell* 28(3):616-628
- Frankenberg N, Lagarias JC (2003).** Phycocyanobilin: ferredoxin oxidoreductase of *Anabaena* sp. PCC 7120. Biochemical and spectroscopic characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 278(11):9219-9226
- Freire P, Moreira RN, Arraiano CM (2009).** BolA inhibits cell elongation and regulates MreB expression levels. *Journal of Molecular Biology* 385(5):1345-1351
- Freire P, Vieira HL, Furtado AR, de Pedro MA, Arraiano CM (2006).** Effect of the morphogene bolA on the permeability of the *Escherichia coli* outer membrane. *FEMS Microbiology Letters* 260(1):106-111
- Froehlich AC, Chen CH, Belden WJ, Madeti C, Roenneberg T, Mellow M, Loros JJ, Dunlap JC (2010).** Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 9(5):738-750
- Fusaro AF, Bocca SN, Ramos RL, Barrôco RM, Magioli C, Jorge VC, Coutinho TC, Rangel-Lima CM, De Rycke R, Inzé D, Engler G, Sachetto-Martins G (2007).** AtGRP2, a cold-induced nucleocytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development. *Planta* 225(6):1339-1351
- Gabaldón MC, Labrador L, Arraiz G, Concepción JL, Avilan L (2010).** *Trypanosoma cruzi*: a kinetoplast associated protein of the photolyase/cryptochrome family. *Experimental Parasitology* 124(3):350-356
- Gao P, Yoo SH, Lee KJ, Rosensweig C, Takahashi JS, Chen BP, Green CB (2013).** Phosphorylation of the cryptochrome 1 C-terminal tail regulates circadian period length. *The Journal of Biological Chemistry* 288(49):35277-35286.
- Garner WW, Allard HA (1920).** Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *Journal of Agricultural Research* 18:553-606
- Gegear RJ, Foley LE, Casselman A, Reppert SM (2010).** Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature* 463(7282):804-807

- Gindt YM, Messyas A, Jumbo PI (2015).** May Binding of Substrate Locks the Electrochemistry of CRY-DASH into DNA Repair. *Biochemistry* 54(18):2802-2805
- 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
- Giraud E, Fardoux J, Fourrier N, Hannibal L, Genty B, Bouyer P, Dreyfus B, Verméglio A (2002).** Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* 417(6885):202-205
- Glenzins A, Butkus V, Songaila E, Augulis R, Gall A, Büchel C, Robert B, Abramavicius D, Zigmantas D, Valkunas L (2015).** Mapping energy transfer channels in fucoxanthin-chlorophyll proteins complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1847(2):241-247
- Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M (1990).** Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 87(1):283-287
- Goto N, Kumagai T, Koornneef M (1991).** Flowering responses to light-breaks in photomorphogenic mutants of *Arabidopsis thaliana*, a long-day plant. *Physiologia Plantarum* 83(2):209-215
- Grigoriev IV, Nordberg H, Shabalov I, Aerts A, Cantor M, Goodstein D, Kuo A, Minovitsky S, Nikitin R, Ohm RA, Otilar R, Poliakov A, Ratnere I, Riley R, Smirnova T, Rokhsar D, Dubchak I (2012).** The Genome Portal of the Department of Energy Joint Genome Institute. *Nucleic Acids Research* 40(Database issue):D26-D32
- Grouneva I, Jakob T, Wilhelm C, Goss R (2009).** The regulation of xanthophyll cycle activity and of non photochemical fluorescence quenching by two alternative electron flows in the diatoms *Phaeodactylum tricorutum* and *Cyclotella meneghiniana*. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* 1787(7):929-938
- Grouneva I, Rokka A, Aro EM (2011).** The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *Journal of Proteome Research* 10(12):5338-5353
- Gualerzi CO, Giuliadori AM, Pon CL (2003).** Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *Journal of Molecular Biology* 331(3):527-539
- Guinote IB, Matos RG, Freire P, Arraiano CM (2011).** BolA affects cell growth, and binds to the promoters of penicillin-binding proteins 5 and 6 and regulates their expression. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(3):243-251
- Gundermann K, Schmidt M, Weisheit W, Mittag M, Büchel C (2013).** Identification of several sub-populations in the pool of light harvesting proteins in the pennate diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* 1827(3):303-310
- Guo H, Yang H, Mockler TC, Lin C (1998).** Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science* 279(5355):1360-1363
- Haker A, Hendriks J, Gensch T, Hellingwerf KJ, Crielgaard W (2000).** Isolation, reconstitution and functional characterization of the *Rhodobacter sphaeroides* photoactive yellow protein. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 486(1):52-56
- Halavaty AS, Moffat K (2007).** N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from *Avena sativa*. *Biochemistry* 46(49):14001-14009

- Harada Y, Sakai M, Kurabayashi N, Hirota T, Fukada Y (2005).** Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. *The Journal of Biological Chemistry* 280(36):31714-31721
- Harper SM, Neil LC, Gardner KH (2003).** Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 301(5639):1541-1544
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW (2002).** Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295(5557):1065-1070
- Giraud E, Fardoux J, Fourrier N, Hannibal L, Genty B, Bouyer P, Dreyfus B, Verméglio A (2010).** Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes. *Plant Cell and Environment* 33(10):1614-1626
- Hense A, Herman E, Oldemeyer S, Kottke T (2015).** Proton transfer to flavin stabilizes the signaling state of the blue light receptor plant cryptochrome. *The Journal of Biological Chemistry* 290(3):1743-1751
- Herman E, Kottke T (2015).** Allosterically regulated unfolding of the A'α helix exposes the dimerization site of the blue-light-sensing aureochrome-LOV domain. *Biochemistry* 54(7):1484-1492
- Herman E, Sachse M, Kroth PG, Kottke T (2013).** Blue-light-induced unfolding of the Jα helix allows for the dimerization of aureochrome-LOV from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochemistry* 52(18):3094-3101
- Heukeshoven J, Dernick R (1988).** Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using PhastSystem Development Unit. *Electrophoresis* 9(1):60-61
- Hirose F, Shinomura T, Tanabata T, Shimada H, Takano M (2006).** Involvement of rice cryptochromes in de-etiolation responses and flowering. *Plant and Cell Physiology* 47(7):915-925
- Hitomi K, Okamoto K, Daiyasu H, Miyashita H, Iwai S, Toh H, Ishiura M, Todo T (2000).** Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Research* 28(12):2353-2362
- Hoang N, Bouly JP, Ahmad M (2008).** Evidence of a light-sensing role for folate in *Arabidopsis* cryptochrome blue-light receptors. *Molecular Plant* 1(1):68-74
- Hoang N, Schleicher E, Kacprzak S, Bouly JP, Picot M, Wu W, Berndt A, Wolf E, Bittl R, Ahmad M (2008).** Human and *Drosophila* cryptochromes are light activated by flavin photoreduction in living cells. *Public Library of Science Biology* 6(7):e160
- Huq E, Quail PH (2002).** PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *The European Molecular Biology Organization Journal* 21(10):2441-2450
- Huysman MJ, Martens C, Vandepoele K, Gillard J, Rayko E, Heijde M, Bowler C, Inzé D, Van de Peer Y, De Veylder L, Vyverman W (2010).** Genome-wide analysis of the diatom cell cycle unveils a novel type of cyclins involved in environmental signaling. *Genome Biology* 11(2):R17
- Huysman MJ1, Fortunato AE, Matthijs M, Costa BS, Vanderhaeghen R, Van den Daele H, Sachse M, Inzé D, Bowler C, Kroth PG, Wilhelm C, Falciatore A, Vyverman W, De Veylder L (2013).** AUREOCHROME1a-mediated induction of the diatom-specific cyclin *dsCYC2* controls the onset of cell division in diatoms (*Phaeodactylum tricornutum*). *The Plant Cell* 25(1):215-228
- Hwang I, Sheen J (2001).** Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413(6854):383-389

- Immeln D, Pokorny R, Herman E, Moldt J, Batschauer A, Kottke T (2010).** Photoreaction of plant and DASH cryptochromes probed by infrared spectroscopy: the neutral radical state of flavoproteins. *The Journal of Physical Chemistry B* 114(51):17155-61
- Immeln D, Schlesinger R, Heberle J, Kottke T (2007).** Blue light induces radical formation and autophosphorylation in the light-sensitive domain of *Chlamydomonas* cryptochrome. *The Journal of Biological Chemistry* 282(30):21720-21728
- Ishikawa M, Takahashi F, Nozaki H, Nagasato C, Motomura T, Kataoka H (2009).** Distribution and phylogeny of the blue light receptors aureochromes in eukaryotes. *Planta* 230(3):543-552
- Ito C, Tomioka K (2016).** Heterogeneity of the Peripheral Circadian Systems in *Drosophila melanogaster*: A Review. *Frontiers in Physiology* 7:8
- Iwata T, Zhang Y, Hitomi K, Getzoff ED, Kandori H (2010).** Key dynamics of conserved asparagine in a cryptochrome/photolyase family protein by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 49(41):8882-8891
- Iwatsuki N, Joe CO, Werbin H (1980).** Evidence that deoxyribonucleic acid photolyase from baker's yeast is a flavoprotein. *Biochemistry* 19(6):1172-1176
- Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L (2004).** Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology* 146(1-2):11-31
- Jäger S (2013).** Localisation of Cryptochrome P in *Phaeodactylum tricornutum*. Masterarbeit, Goethe Universität Frankfurt am Main
- Jenkins GI (2014).** The UV-B Photoreceptor UVR8: From Structure to Physiology. *The Plant Cell* 26(1):21-37
- Jiao Y, Lau OS, Deng XW (2007).** Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews Genetics* 8(3):217-230
- Johnson JL, Hamm-Alvarez S, Payne G, Sancar GB, Rajagopalan KV, 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
- Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC (1987).** Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 169(5):2092-2095
- Jorns MS, Sancar GB, Sancar A (1984).** Identification of a neutral flavin radical and characterization of a second chromophore in *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry* 23(12):2673-2679
- Joshi-Deo J, Schmidt M, Gruber A, Weisheit W, Mittag M, Kroth PG, Büchel C (2010).** Characterization of a trimeric light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* built of FcpA and FcpE proteins. *Journal of Experimental Botany* 61(11):3079-3087
- Juhas M (2015).** Der Einfluss eines potentiellen Cryptochroms auf die lichtabhängige Expressionsregulation der Lichtsammelproteine in *Phaeodactylum tricornutum*. Dissertation, Goethe Universität Frankfurt am Main
- Juhas M, von Zadow A, Spexard M, Schmidt M, Kottke T, Büchel C (2014).** A novel cryptochrome in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* influences the regulation of light harvesting protein levels. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 281(9):2299-2311
- Jungandreas A, Schellenberger Costa B, Jakob T, von Bergen M, Baumann S, Wilhelm C (2014).** The acclimation of *Phaeodactylum tricornutum* to blue and red light does not influence the

- photosynthetic light reaction but strongly disturbs the carbon allocation pattern. *Public Library of Science ONE* 9(8):e99727
- Juntawong P, Sorenson R, Bailey-Serres J (2013).** Cold shock protein 1 chaperones mRNAs during translation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 74(6):1016-1028
- Kao YT, Tan C, Song SH, Öztürk N, Li J, Wang L, Sancar A, Zhong D (2008).** Ultrafast dynamics and anionic active states of the flavin cofactor in cryptochrome and photolyase. *Journal Of The American Chemical Society* 130(24):7695-7701
- Karlson D, Imai R (2003).** Conservation of the cold shock domain protein family in plants. *Plant Physiology* 131(1):12-15
- Kehoe DM, Grossman AR (1996).** Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273(5280):1409-1412
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015).** The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10(6):845-858
- Khan SK, Xu H, Ukai-Tadenuma M, Burton B, Wang Y, Ueda HR, Liu AC (2012).** Identification of a novel cryptochrome differentiating domain required for feedback repression in circadian clock function. *The Journal of Biological Chemistry* 287(31):25917-25926
- Khona DK, Dongre SS, Arraiano CM, D'Souza JS (2013).** A BOLA-like morphogene from the alga *Chlamydomonas reinhardtii* changes morphology and induces biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 339(1):39-47
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013).** TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 14(4):R36
- Kim MH, Sasaki K, Imai R (2009).** Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 284(35):23454-23460
- Kim ST, Sancar A (1993).** Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Photochemistry and Photobiology* 57(5):895-904
- Kim ST, Sancar A, Essenmacher C, Babcock GT (1993).** Time-resolved EPR studies with DNA photolyase: excited-state FADH⁰ abstracts an electron from Trp-306 to generate FADH⁻, the catalytically active form of the cofactor. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 90(17):8023-8027
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T (2009).** Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature Protocols* 4(10):1513-1521
- Kiontke S, Geisselbrecht Y, Pokorny R, Carell T, Batschauer A, Essen LO (2011).** Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA. *The European Molecular Biology Organization Journal* 30(21):4437-5549
- Kirk JTO (1994).** Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. 2nd edn, RC Zimmerman, Cambridge University Press, Cambridge
- Kiyosue T, Wada M (2000).** LKP1 (LOV kelch protein 1): a factor involved in the regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 23(6):807-815
- Klar T, Pokorny R, Moldt J, Batschauer A, Essen LO (2007).** Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *Journal of Molecular Biology* 366(3):954-964

- Kleine T, Lockhart P, Batschauer A (2003).** An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *The Plant Journal* 35(1):93-103
- Kleiner O, Kircher S, Harter K, and Batschauer A (1999).** Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *The Plant Journal* 19(3):289-296
- Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, Last RL (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
- Kobayashi Y, Ishikawa T, Hirayama J, Daiyasu H, Kanai S, Toh H, Fukuda I, Tsujimura T, Terada N, Kamei Y, Yuba S, Iwai S, Todo T (2000).** Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes to Cells* 5(9):725-738
- Kondoh M, Shiraishi C, Müller P, Ahmad M, Hitomi K, Getzoff ED, Terazima M (2011).** Light-induced conformational changes in full-length *Arabidopsis thaliana* cryptochrome. *Journal of Molecular Biology* 413(1):128-137
- Kort R, Hoff WD, van West M, Kroon AR, Hoffer SM, Vlieg KH, Crielaard W, van Beeumen JJ, Hellingwerf KJ (1996).** The xanthopsins: a new family of eubacterial blue-light photoreceptors. *The European Molecular Biology Organization Journal* 15(13):3209-3218
- 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
- Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K (2015).** Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine Drugs* 13(9):5847-5881
- Kumánovics A, Chen OS, Li L, Bagley D, Adkins EM, Lin H, Dingra NN, Outten CE, Keller G, Winge D, Ward DM, Kaplan J (2008).** Identification of FRA1 and FRA2 as genes involved in regulating the yeast iron regulon in response to decreased mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 283(16):10276-10286
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM (1999).** mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98(2):193-205
- Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685
- Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM (2009).** AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 326(5951):437-440
- Lamparter T, Michael N, Mittmann F, Esteban B (2002).** Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 99(18):11628-11633
- Langenbacher T, Immeln D, Dick B, Kottke T (2009).** Microsecond light-induced proton transfer to flavin in the blue light sensor plant cryptochrome. *Journal of the American Chemical Society* 131(40):14274-14280
- Langer T (2000).** AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 25(5):247-251
- Langmead B, Salzberg S (2012).** Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9(4):357-359

- Latt SA, Stetten G, Juergens LA, Willard HF, Scher CD (1975).** Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 23(7):493-505
- Lee JK, Park EJ, Chung HK, Hong SH, Joe CO, Park SD (1994).** Isolation of UV-inducible transcripts from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 202(2):1113-1119
- Lee SJ, Yoon BD, Oh HM (1998).** Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology Techniques* 12(7):553-556
- Lepetit B, Goss R, Jakob T, Wilhelm C (2012).** Molecular dynamics of the diatom thylakoid membrane under different light conditions. *Photosynthesis Research* 111(1-2):245-257
- Li H, Outten CE (2012).** Monothiol CGFS glutaredoxins and BoIA-like proteins: [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis. *Biochemistry* 51(22):4377-4389
- Li YF, Heelis PF, 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
- Lian HL, He SB, Zhang YC, Zhu DM, Zhang JY, Jia KP, Sun SX, Li L, Yang HQ (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 DE, Ahmad M, Raibekas AA, Jorns MS, Dutton PL, Cashmore AR (1995).** Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science* 269(5226):968-970
- Lin C, Shalitin D (2003).** Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 54:469-496
- Lin CT, Yang HY, Guo HW, Mockler T, Chen J, Cashmore AR (1998).** Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 95(5):2686-2690
- Liu B, Yang Z, Gomez A, Liu B, Lin C, Oka Y (2016).** Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 129(2):137-148
- Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C (2011).** The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science* 16(12):684-691
- Liu LJ, Zhang YC, Li QH, Sang Y, Mao J, Lian HL, Wang L, Yang HQ (2008).** COP1-mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20(2):292-306
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25(4):402-408
- Lohse M, Nagel A, Herter T, May P, Schroda M, Zrenner R, Tohge T, Fernie AR, Stitt M, Usadel B (2014).** Mercator: A fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant Cell and Environment* 37(5):1250-1258
- Longoni P, Douchi D, Cariti F, Fucile G, Goldschmidt-Clermont M (2015)** Phosphorylation of the Light-Harvesting Complex II isoform Lhcb2 is central to state transitions. *Plant Physiology* 169(4):2874-2883
- Lucas RJ, Hattar S, Takao M, Berson DM, Foster RG, Yau KW (2003).** Diminished pupillary light reflex at high irradiances in melanopsin-knockout mice. *Science* 299(5604):245-247

- Ma D, Li X, Guo Y, Chu J, Fang S, Yan C, Noel JP, Liu H (2016).** Cryptochrome 1 interacts with PIF4 to regulate high temperature-mediated hypocotyl elongation in response to blue light. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 113(1):224-229
- Malhotra K, Kim ST, 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
- Maxwell DP, Laudenbach DE, Huner NPA (1995).** Redox regulation of light-harvesting complex II and cab mRNA abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiology* 109(3):787-795
- McFadden GI (2001).** Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology* 37(6):951-959
- Miyamoto Y, Sancar A (1998).** Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoreactive pigments for setting the circadian clock in mammals. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 95(11):6097-6102
- Mobley CD (1994).** Light and water: Radiative transfer in natural waters. Academic Press, San Diego, 592 pp
- Möglich A, Yang X, Ayers RA, Moffat K (2010).** Structure and function of plant photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology* 61:21-47
- Montsant A, Jabbari K, Maheswari U, Bowler C (2005).** Comparative genomics of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology* 137(2):500-513
- Müller F (1983).** The Flavin Redox-System and its Biological Function. *Topics in Current Chemistry*. 108:71-107
- Müller M, Carell T (2009).** Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes. *Current Opinion in Structural Biology* 19(3):277-285
- Mussnug JH, Wobbe L, Elles I, Claus C, Hamilton M, Fink A, Kahmann U, Kapazoglou A, Mullineaux CW, Hippler M, Nickelsen J, Nixon PJ, Kruse O (2005).** NAB1 is an RNA binding protein involved in the light-regulated differential expression of the light-harvesting antenna of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell* 17(12):3409-3421
- Neff MM, Fankhauser C, Chory J (2000).** Light: an indicator of time and place. *Genes and Development* 14(3):257-271
- Nelson DM, Tréguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Quéguiner B (1995).** Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles* 9(3):359-372
- Nelson DC, Lasswell J, Rogg LE, Cohen MA, Bartel B (2000).** FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 101(3):331-340
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV (1999).** AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research* 9(1):27-43
- Nordberg H, Cantor M, Dusheyko S, Hua S, Poliakov A, Shabalov I, Smirnova T, Grigoriev IV, Dubchak I (2014).** The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic Acids Research* 42(Database issue):D26-D31

- Nott A, Jung HS, Koussevitzky S, Chory J (2006).** Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annual Review of Plant Biology* 57:739-759
- Nymark M, Valle KC, Hancke K, Winge P, Andresen K, Johnsen G, Bones AM, Brembu T (2013).** Molecular and photosynthetic responses to prolonged darkness and subsequent acclimation to re-illumination in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Public Library of Science ONE* 8(3):e58722
- Oesterhelt D, Stoerkenius W (1971).** Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biology* 233(39):149-152
- 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 Science United States of America* 101(8):2223-2228
- Okamura H, Miyake S, Sumi Y, Yamaguchi S, Yasui A, Muijtjens M, Hoeijmakers JH, van der Horst GT (1999).** Photic induction of mPer1 and mPer2 in Cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science* 286(5449):2531-2534
- Oliveri P, Fortunato AE, Petrone L, Ishikawa-Fujiwara T, Kobayashi Y, Todo T, Antonova O, Arboleda E, Zantke J, Tessmar-Raible K, Falciatore A (2014).** The Cryptochrome/Photolyase Family in aquatic organisms. *Marine Genomics* 14:23-37
- Ottolenghi M (1980).** The photochemistry of rhodopsins. *Advances in Photochemistry* 12:97-200
- Owens TG, Wold ER (1986).** Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: I. Isolation and characterization of pigment-protein complexes. *Plant Physiology* 80(3):732-738
- Öztürk N, Kao Y-T, Selby CP, Kavakli IH, Partch CL, Zhong D, Sancar A (2008a).** Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*. *Biochemistry* 47(39):10255-10261
- Öztürk N, Song SH, Selby CP, Sancar A (2008b).** Animal type 1 cryptochromes: analysis of the redox state of the flavin cofactor by site-directed mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 283(6):3256-3263
- Papagiannakis A, van Stokkum I, Fey H, Büchel C, van Grondelle R (2005).** Spectroscopic characterization of the excitation energy transfer in the fucoxanthin-chlorophyll protein of diatoms. *Photosynthesis Research* 86(1-2):241-250
- Park SJ, Kwak KJ, Oh TR, Kim YO, Kang H (2009).** Cold shock domain proteins affect seed germination and growth of *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology* 50(4):869-878
- Partch CL, Clarkson MW, Ozgür S, Lee AL, Sancar A (2005).** Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry* 44(10):3795-3805
- Patel S, Latterich M (1998).** The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends in Cell Biology* 8(2):65-71
- Payne G, Wills M, Walsh C, Sancar A (1990).** Reconstitution of *Escherichia coli* photolyase with flavins and flavin analogues. *Biochemistry* 29(24):5706-5711
- Pedmale UV, Huang SS, Zander M, Cole BJ, Hetzel J, Ljung K, Reis PA, Sridevi P, Nito K, Nery JR, Ecker JR, Chory J (20016).** Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. *Cell* 164(1-2):233-245
- Peters E (1996).** Prolonged darkness and diatom mortality: II. Marine temperate species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 207(1-2):43-58

- Pfannschmidt T (2010).** Plastidial retrograde signalling - a true "plastid factor" or just metabolite signatures? *Trends in Plant Science* 15(8):427-435
- Phadtare S, Inouye M (1999).** Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 33(5):1004-1014
- Pokorny R, Klar T, Hennecke U, Carell T, Batschauer A, Essen LO (2008).** Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 105(52):21023–1027
- Premvardhan L, Bordes L, Beer A, Büchel C, Robert B (2009).** Carotenoids structures and environments in trimeric and oligomeric fucoxanthin chlorophyll a/c₂ proteins from resonance Raman spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 113(37):12565-12574
- Premvardhan L, Robert B, Beer A, Büchel C (2010).** Pigment organization in fucoxanthin chlorophyll a/c₂ proteins (FCP) based on resonance Raman spectroscopy and sequence analysis. *Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics* 1797(9):1647-1656
- Provasoli L, McLaughlin JJA, Droop MR (1957).** The development of artificial media for marine algae. *Achieves of Microbiology* 25(4):392-428
- Qin L, Wang M, Zuo J, Feng X, Liang X, Wu Z, Ye H (2015).** Cytosolic BolA Plays a Repressive Role in the Tolerance against Excess Iron and MV-Induced Oxidative Stress in Plants. *Public Library of Science ONE* 10(4):e0124887
- R Development Core Team (2011).** R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria : the R Foundation for Statistical Computing
- Richard C, Ouellet H, Guertin M (2000).** Characterization of the LI818 polypeptide from the green unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology* 42(2):303-316
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R (2011).** Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science* 332(6025):103-106
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010).** edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1):139-140
- Rodriguez-Romero J, Hedtke M, Kastner C, Muller S, Fischer R (2010).** Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annual Review of Microbiology* 64:585-610
- Rolauffs S, Fackendahl P, Sahm J, Fiene G, Hoecker U (2012).** *Arabidopsis* COP1 and SPA genes are essential for plant elongation but not for acceleration of flowering time in response to a low red light to far-red light ratio. *Plant Physiology* 160(9):2015-2027
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Sancar A (2003).** Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical Reviews* 103(6):2203-2237
- Sancar A (2008).** Structure and function of photolyase and *in vivo* enzymology: 50th anniversary. *The Journal of Biological Chemistry* 283(47):32153–32157
- Sancar GB, Smith FW, Sancar A (1985).** Binding of *Escherichia coli* DNA photolyase to UV-irradiated DNA. *Biochemistry* 24(8):1849-1855
- Santos JM, Freire P, Vicente M, Arraiano CM (1999).** The stationary-phase morphogene bolA from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. *Molecular Microbiology* 32(4):789-798

- Sasaki K, Imai R (2012).** Pleiotropic roles of cold shock domain proteins in plants. *Frontiers in Plant Science* 2:116
- Saxena C, Wang H, Kavakli IH, Sancar A, Zhong D (2005).** Ultrafast dynamics of resonance energy transfer in cryptochrome. *Journal of the American Chemical Society* 127(22):7984-7985
- Schellenberger Costa B, Jungandreas A, Jakob T, Weisheit W, Mittag M, Wilhelm C (2013a).** Blue light is essential for high light acclimation and photoprotection in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Experimental Botany* 64(2):483-493
- Schellenberger Costa B, Sachse M, Jungandreas A, Bartulos CR, Gruber A, Jakob T, Kroth PG, Wilhelm C (2013b).** Aureochrome 1a is involved in the photoacclimation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Public Library of Science ONE* 8(9):e74451
- Schultz TF, Kiyosue T, Yanovsky M, Wada M, Kay SA (2001).** A role for LKP2 in the circadian clock of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13(12):2659-2670
- Selby CP, Sancar A (2006).** A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA specific photolyase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(47):17696-17700
- Semo M, Peirson S, Lupi D, Lucas RJ, Jeffery G, Foster RG (2003).** Melanopsin retinal ganglion cells and the maintenance of circadian and pupillary responses to light in aged rodless/coneless (*rd/rd cl*) mice. *European Journal of Neuroscience* 17(9):1793-1801
- Shalitin D, Yang H, Mockler TC, Maymon M, Guo H, Whitelam GC, Lin C (2002).** Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* 417(6890):763-767
- Shalitin D, Yu X, Maymon M, Mockler T, Lin C (2003).** Blue light-dependent *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1. *The Plant Cell* 15(10):2421-2429
- Shcherbakova DM, Shemetov AA, Kaberniuk AA, Verkhusha VV (2015).** Natural photoreceptors as a source of fluorescent proteins, biosensors, and optogenetic tools. *Annual Review of Biochemistry* 84:519-550
- Sheerin DJ, Menon C, zur Oven-Krockhaus S, Enderle B, Zhu L, Johnen P, Schleifenbaum F, Stierhof YD, Huq E, Hiltbrunner A (2015).** Light-activated phytochrome A and B interact with members of the SPA family to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis* by reorganizing the COP1/SPA complex. *The Plant Cell* 27(1):189-201
- Siaut M, Heijde M, Mangogna M, Montsant A, Coesel S, Allen A, Manfredonia A, Falciatore A, Bowler C (2007).** Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricornutum*. *Gene* 406(1-2):23-35
- Smetacek VS (1985).** Role of sinking in diatom life-history cycles: ecological, evolutionary and geological significance. *Marine Biology* 84(3):239-251
- Sokolowsky K, Newton M, Lucero C, Wertheim B, Freedman J, Cortazar F, Czochor J, Schelvis JP, Gindt YM (2010).** Spectroscopic and thermodynamic comparisons of *Escherichia coli* DNA photolyase and *Vibrio cholerae* cryptochrome 1. *Journal of Physical Chemistry B* 114(20):7121-7130
- Somers DE, Devlin PF, Kay SA (1998).** Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science* 282(5393):1488-1490
- Somers DE, Schultz TF, Milnamow M, Kay SA (2000).** ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101(3):319-329

- Song SH, Dick B, Penzkofer A, Pokorny R, Batschauer A, Essen LO (2006).** Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 85(1):1-16
- Spaulding, SA, Lubinski DJ, Potapova M (2010).** Diatoms of the United States. <http://westerndiatoms.colorado.edu> (*Web-Publikation*)
- Spexard M, Thoing C, Beel B, Mittag M, Kottke T (2014).** Response of the sensory animal-like cryptochrome aCRY to blue and red light as revealed by infrared difference spectroscopy. *Biochemistry* 53(6):1041-1050
- Spudich JL, Bogomolni RA (1988).** Sensory rhodopsins of halobacteria. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 17:193-215
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC (1998).** The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95(5):681-692
- Stanewsky R (2002).** Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell and Tissue Research* 309(1):11-26
- Stauber EJ, Fink A, Markert C, Kruse O, Johanningmeier U, Hippler M (2003).** Proteomics of *Chlamydomonas reinhardtii* light-harvesting proteins. *Eukaryotic Cell* 2(5):978-994
- Sturm S, Engelken J, Gruber A, Vugrinec S, Kroth PG, Adamska I, Lavaud J (2013).** A novel type of light-harvesting antenna protein of red algal origin in algae with secondary plastids. *BioMed Central Evolutionary Biology* 13:159
- Tagua VG, Pausch M, Eckel M, Gutiérrez G, Miralles-Durán A, Sanz C, Eslava AP, Pokorny R, Corrochano LM, Batschauer A (2015).** Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution. *Proceedings of the National Academy of Science United States of America* 112(49):15130-15135
- Takahashi F, Yamagata D, Ishikawa M, Fukamatsu Y, Ogura Y, Kasahara M, Kiyosue T, Kikuyama M, Wada M, Kataoka H (2007).** AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(49):19625-19630
- Tan ST, Dai C, Liu HT, Xue HW (2013).** *Arabidopsis* casein kinase1 proteins CK1.3 and CK1.4 phosphorylate cryptochrome2 to regulate blue light signaling. *The Plant Cell* 25(7):2618-2632
- Teramoto H, Nakamori A, Minagawa J, Ono TA (2002).** Light-intensity-dependent expression of Lhc gene family encoding light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 130(1):325-333
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M (2004).** MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal* 37(6):914-939
- Todo T, Takemori H, Ryo H, Ihara M, Matsunaga T, Nikaido O, Sato K, Nomura T (1993).** A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4)photoproducts. *Nature* 361(6410):371-374
- Todo T (1999).** Functional diversity of the DNA photolyase /blue light receptor family. *Mutation Research* 434(2):89-97
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L (2012).** Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocol* 7(3):562-578

- Turck F, Fornara F, Coupland G (2008).** Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annual Review of Plant Biology* 59:573-594
- Valle KC, Nymark M, Aamot I, Hancke K, Winge P, Andresen K, Johnsen G, Brembu T, Bones AM (2014).** System responses to equal doses of photosynthetically usable radiation of blue, green, and red light in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Public Library of Science ONE*. 9(12):e114211
- van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker APM, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JHJ, Yasui A (1999).** Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398(6728):627-630
- van der Schalie EA, Conte FE, Marz KE, Green CB (2007).** Structure/function analysis of *Xenopus* cryptochromes 1 and 2 reveals differential nuclear localization mechanisms and functional domains important for interaction with and repression of CLOCK-BMAL1. *Molecular and Cellular Biology* 27(6):2120-2129
- Vass IZ, Kós PB, Sass L, Nagy CI, Vass I (2013).** The ability of cyanobacterial cells to restore UV-B radiation induced damage to Photosystem II is influenced by photolyase dependent DNA repair. *Photochemistry and Photobiology* 89(2):384-390
- Veith T, Büchel C (2007).** The monomeric photosystem I-complex of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* binds specific fucoxanthin chlorophyll proteins (FCPs) as light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1767(12):1428-1435
- Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, Hitomi K, Thresher RJ, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi JS, Sancar A (1999).** Differential regulation of mammalian *Period* genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(21):12114-12119
- Vogelstein B, Gillespie D (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(2):615-619
- Wagner H, Jakob T, Wilhelm C (2006).** Balancing the energy flow from captures light to biomass under fluctuating light conditions. *New Phytologist* 169(1):95-108
- Wald G (1968).** The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219(5156):800-807
- Wang H, Ma LG, Li JM, Zhao HY, Deng XW (2001).** Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control development. *Science* 294(5540):154-158
- Wang Q, Barshop WD, Bian M, Vashisht AA, He R, Yu X, Liu B, Nguyen P, Liu X, Zhao X, Wohlschlegel JA, Lin C (2015).** The blue light-dependent phosphorylation of the CCE domain determines the photosensitivity of *Arabidopsis* CRY2. *Molecular Plant* 8(4):631-643
- Wilde A, Fiedler B, Borner T (2002).** The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Molecular Microbiology* 44(4):981-988
- Worthington EN, Kavakli IH, Berrocal-Tito G, Bondo BE, Sancar A (2003).** Purification and characterization of three members of the photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors from *Vibrio cholerae*. *The Journal of Biological Chemistry* 278(40):39143-39154
- Yan B, Takahashi T, Johnson R, Derguini F, Nakanishi K, Spudich JL (1990).** All-trans/13-cis isomerization of retinal is required for phototaxis signaling by sensory rhodopsins in *Halobacterium halobium*. *Biophysical Journal* 57(4):807-814

- Yang HQ, Tang RH, Cashmore AR (2001).** The signaling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *The Plant Cell* 13(12):2573-2587
- Yang HQ, Wu YJ, Tang RH, Liu DM, Liu Y, Cashmore AR (2000).** The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell* 103(5):815-827
- Yang Y, Karlson DT (2011).** Overexpression of *AtCSP4* affects late stages of embryo development in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 62(6):2079-2091
- Yang YJ, Zuo ZC, Zhao XY, Li X, Klejnot J, Li Y, Chen P, Liang SP, Yu XH, Liu XM, Lin CT (2008).** Blue-light-independent activity of *Arabidopsis* cryptochromes in the regulation of steady-state levels of protein and mRNA expression. *Molecular Plant* 1(1):167-177
- Yu X, Klejnot J, Zhao X, Shalitin D, Maymon M, Yang H, Lee J, Liu X, Lopez J, Lin C (2007).** *Arabidopsis* cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *The Plant Cell* 19(10):3146-3156
- 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 X, Shalitin D, Liu X, Maymon M, Klejnot J, Yang H, Lopez J, Zhao X, Bendehakkalu KT, Lin C (2007a).** Derepression of the NC80 motif is critical for the photoactivation of *Arabidopsis* CRY2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(17):7289-7294
- Yu X, Klejnot J, Zhao X, Shalitin D, Maymon M, Yang H, Lee J, Liu X, Lopez J, Lin C (2007b).** *Arabidopsis* cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nucleus. *The Plant Cell* 19(10):3146-3156
- Zhang XN, Wu Y, Tobias JW, Brunk BP, Deitzer GF, Liu D (2008).** HFR1 is crucial for transcriptome regulation in the cryptochrome 1-mediated early response to blue light in *Arabidopsis thaliana*. *Public Library of Science ONE* 3(10):e3563
- Zhu H, Sauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P, Reppert SM (2008).** Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *Public Library of Science Biology* 6:e4
- Zikihara K, Ishikawa T, Todo T, Tokutomi S (2008).** Involvement of electron transfer in the photoreaction of zebrafish cryptochrome-DASH. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 84(4):1016-1023
- Zirak P, Penzkofer A, Moldt J, Pokorny R, Batschauer A, Essen LO (2009).** Photocycle dynamics of the E149A mutant of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 97(2):94-108
- 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

EnsembleProtist-Phatr3 <http://protists.ensembl.org/index.html> [30.10.2015]

EnsembleProtist FASTA-Referenzdatei ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-32/protists/fasta/phaeodactylum_tricornutum/cdna/ [30.10.2015]

EnsembleProtist GTF-Referenzdatei ftp://ftp.ensemblgenomes.org/pub/release-32/protists/gtf/phaeodactylum_tricornutum/ [30.10.2015]

ExPASy http://web.expasy.org/compute_pi/ [09.05.2016]

Fastqc <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> [30.10.2015]

JGI-Thaps3 <http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/Thaps3.home.html> [16.05.2016]

JGI-Phatr2 <http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html> [16.05.2016]

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [16.08.2016]

NCBI Blast http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome [16.08.2016]

Anhang

Tabelle A 1: Effizienzen der in der quantitativen RT-PCR verwendeter Oligonukleotide. Angegeben ist das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression R^2 der Oligonukleotid-Effizienzen und die Gen Identifikationsnummer (ID).

Gen ID	Name	Effizienz	R^2
34971	Histon H4	0,84	0,998
10847	RPS	0,641	0,996
10199	TBP	0,994	0,997
54534	TubA	0,91	0,993
21988	PPdk	1,05	0,995
32099	Chp	0,76	1
37367	FABFa	0,85	0,998
54342	CryP	1,02	0,989
27429	CPF1	1,1	0,94
54330	DPH	0,94	1
51933	aureo1c	0,96	0,997

CSDP Phatr2 **ATGGCCGACGGTCCCCAAAAGGGTGTCTCAAGTGGTTCGACACCATGAAGGGATGGCCGACG**
 CSDP Seq **ATGGCCGACGGTCCCCAAAAGGGTGTCTCAAGTGGTTCGACACCATGAAGGGATGGCCGACG**

GTCCCCAAAAGGGTGTCTCAAGTGGTTCGACACCATGAAGGGATTCGGCTTCATCATGCCTG
 GTCCCCAAAAGGGTGTCTCAAGTGGTTCGACACCATGAAGGGATTCGGCTTCATCATGCCTG

ACGACGGAAGCACTGATGTCTTTGTGCATCAGACGGCCATCCAAACGGAAGGATTCGGTCTT
 ACGACGGAAGCACTGATGTCTTTGTGCATCAGACGGCCATCCAAACGGAAGGATTCGGTCTT

TGGCCGATGGCGAAGCCGTCGAGTACGTCTGGAAGAAGACTCCAACGGCCGCAAAAAGGCCG
 TGGCCGATGGCGAAGCCGTCGAGTACGTCTGGAAGAAGACTCCAACGGCCGCAAAAAGGCCG

TCCAGGTTACCGGACCCGGCGGGGAAGAAGTTCAGGGAGCTCCCTTCCGCCCTTCCAACGACT
 TCCAGGTTACCGGACCCGGCGGGGAAGAAGTTCAGGGAGCTCCCTTCCGCCCTTCCAACGACT

ACGATTCTTATTAA
 ACGATTCTTATTAA

Bola Phat2 **ATGAGTACGACGACTGCTACTGCTACCCACCCGACACCGGTCGCCGACGCCATTGTCC**
 Bola Seq **ATGAGTACGACGACTGCTACTGCTACCCACCCGACACCGGTCGCCGACGCCATTGTCC**

AAAAC TTGCATCGCGGT TCTCACCCTGTGCATTTGGAAATCCGGAACGAATCGCACCGACA
 AAAAC TTGCATCGCGGT TCTCACCCTGTGCATTTGGAAATCCGGAACGAATCGCACCGACA

CAACGTTCCACCCCATTCGGAAACGCACTTTCAAGTCGTCGTCGTTGCCGAACGTTTCAACGAC
 CAACGTTCCACCCCATTCGGAAACGCACTTTCAAGTCGTCGTCGTTGCCGAACGTTTCAACGAC

GTCCCGTCACTCGTACAGCGACACCGACTGGTCAACGAAGCACTCGCCCCGCAACTCGCCGGAC
 GTCCCGTCACTCGTACAGCGACACCGACTGGTCAACGAAGCACTCGCCCCGCAACTCGCCGGAC

```

CGGTCCACGCTCTTTCCATCGTTGCCAAAAACACCGGCCAGTGGCAAGCCATGGGGGAACAGGG
CGGTCCACGCTCTTTCCATCGTTGCCAAAAACACCGGCCAGTGGCAAGCCATGGGGGAACAGGG

ACAGGCTGTTCCCGCCACTCCCAAACGTGTCGGGGTGGGGATGGAACTTTTGCCACCCGAACGTAG
ACAGGCTGTTCCCGCCACTCCCAAACGTGTCGGGGTGGGGATGGAACTTTTGCCACCCGAACGTAG
  
```

Abbildung A 1: Sequenzabgleich der klonierten Gene der CryP-Interaktionspartner CSDP und Bola mit der Datenbank. Bola-Seq und CSDP-Seq geben die Daten der Sequenzierreaktionen wieder, während Bola Phatr2 und CSDP Phatr2 die Datenbankeinträge (JGI) darstellt. In blau markiert sind nicht übereinstimmende Sequenzen. Das Startcodon der Sequenz ist in grün dargestellt.

```

AAA Phatr2 ATGAAGATTTCCAGTGTGCTTGCCCTTTTCATGGCGACATCGGCCTCCGCCTTTGTACCTTTC
AAA Seq   ATGAAGATTTCCAGTGTGCTTGCCCTTTTCATGGCGACATCGGCCTCCGCCTTTGTACCTTTC

CACGGAACCGCGTGCCTTCGCCTCGGCTCCGGCGCGGCCACTCTTTGCGGAGGGTGAACCGCT
CACGGAACCGCGTGCCTTCGCCTCGGCTCCGGCGCGGCCACTCTTTGCGGAGGGTGAACCGCT

CCGCCGGCAACCGCAGCCGCCGCCCGGCTGTCAACAAGGCCAAGGCGCCGGTATCGTCCAGTG
CCGCCGGCAACCGCAGCCGCCGCCCGGCTGTCAACAAGGCCAAGGCGCCGGTATCGTCCAGTG

CGCTGGTCCCCATCAAGGAAGAAAACCGTCGAATTCACCGCAGGGATCCTGGGAGGTGCCGCTGG
CGCTGGTCCCCATCAAGGAAGAAAACCGTCGAATTCACCGCAGGGATCCTGGGAGGTGCCGCTGG

CTTCTCGTTGGAGGACCCGTCGTTGGAGCCATCACCGCGGCAGCCGCTAACTACGCATCCAAG
CTTCTCGTTGGAGGACCCGTCGTTGGAGCCATCACCGCGGCAGCCGCTAACTACGCATCCAAG

ATGGATGGGGACGTTCCGGATATCGTCCAGGCTGTCTCCAAGACAGGAATCCAGATCTACAAC
ATGGATGGGGACGTTCCGGATATCGTCCAGGCTGTCTCCAAGACAGGAATCCAGATCTACAAC

ACTTTGCGACGCTCGACGAAAAGTACGAAAATCCTTAAAAAGGCCAAGATTCTCTCCAGGGGAC
ACTTTGCGACGCTCGACGAAAAGTACGAAAATCCTTAAAAAGGCCAAGATTCTCTCCAGGGGAC

CCTGGATAAACTCAAGGCTCAAGAAAACCGTGGACAAGGAGGCTATTGCCAAAGTGGAAAAGGCT
CCTGGATAAACTCAAGGCTCAAGAAAACCGTGGACAAGGAGGCTATTGCCAAAGTGGAAAAGGCT

CTATCCAACACCAAGTCCAAAATCGAGGAAATCAACGACGAATACGATCTGGTTGGTGGAGGTC
CTATCCAACACCAAGTCCAAAATCGAGGAAATCAACGACGAATACGATCTGGTTGGTGGAGGTC

TAACGGCACTCGGAGTCGTTGGAGATTTAGTGGAAAAAACCATCAAGAAAACCGGCCGAATTGAA
TCACGGCACTCGGAGTCGTTGGAGATTTAGTGGAAAAAACCATCAAGAAAACCGGCCGAATTGAA

TGAAGAGTACAAGCTCACCGATAAGGCTATGGCGTCCATTAACAGTGCAGTCACCAAGGCCAAG
TGAAGAGTACAAGCTCACCGATAAGGCTATGGCGTCCATTAACAGTGCAGTCACCAAGGCCAAG

GAAGCATCCAAGAGTTCTTAG
GAAGCATCCAAGAGTTCTTAG
  
```

Abbildung A 2: Sequenzabgleich des klonierten Gens des CryP-Interaktionspartners AAA mit der Datenbank. AAA-Seq1 und AAA-Seq2 gibt die Daten der Sequenzierreaktionen wieder, während AAA Phatr2 den Datenbankeintrag (JGI) darstellt. In blau markiert sind nicht übereinstimmende Sequenzen. Das Startcodon der Sequenz ist in grün dargestellt.

Tabelle A 2: Vergleich der Expression von 32 Genen für CPF1-Überexpression und CryP-Knockdown. Die Gene wurden auf eine CPF1- und CryP-abhängige Regulation untersucht. Gezeigt sind die Gen Identifikationsnummer (Gen ID) der Datenbank JGI, der Name und der regulative Effekt der Blaulichtrezeptoren. Die CPF1 abhängige Regulation der Gene wurde übernommen aus Coesel *et al.* (2009).

Name	Gen ID	Regulation	Name	Gen ID	Regulation
LhcX1	27278	gleich reguliert	NRT	10970	gleich reguliert
LhcX2	54065	gleich reguliert	NR	26029	gleich reguliert
LhcX3	44733	gleich reguliert	GLNAII	54983	gleich reguliert
LhcX4	44733	nicht reguliert	DSCYC2	51092	gegenläufig reguliert
Lhc	38720	gleich reguliert	Sigma70	34956	gleich reguliert
FCPa/c	18180	gegenläufig reguliert	RFC	9312	gleich reguliert
FCPb	9799	nur CryP reguliert	CPF2	49374	gleich reguliert
HemA	25172	nur CryP reguliert	RPE	34592	gleich reguliert
HemB	54134	gegenläufig reguliert	FBP	23247	gleich reguliert
HemC	41746	nur CPF1 reguliert	FBA3	29014	gegenläufig reguliert
Psy	51811	nur CPF1 reguliert	CA-V	45443	nur CPF1 reguliert
PPO	56481	gegenläufig reguliert	FAB-I	10068	gegenläufig reguliert
PDS1	3110	gleich reguliert	PORA	12155	nur CryP reguliert
CRTISO2	35509	gegenläufig reguliert	SKP3	55037	nicht reguliert
VDE	54826	nur CryP reguliert	HSF1	49594	nur CryP reguliert
ZEP2	44635	nur CPF1 reguliert	HSF2	49596	nur CryP reguliert

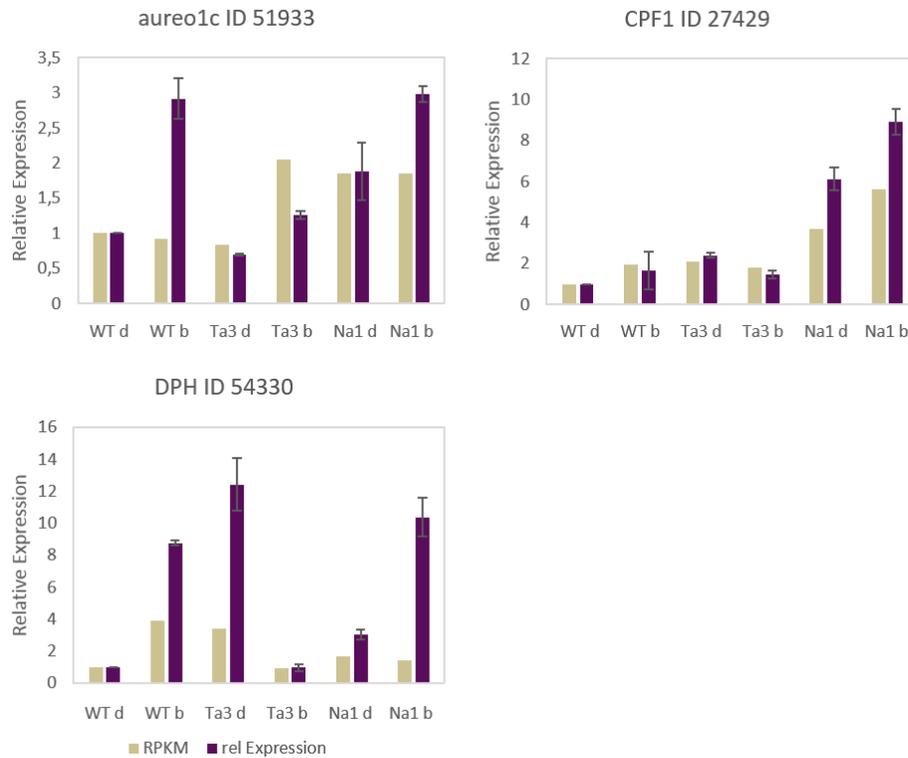


Abbildung A 3: Analyse der relativen Expression der Lichtrezeptor-Gene *Cpf1*, *Dph* und *Aureo1c* mittels qRT-PCR.

Zur Qualitätskontrolle der Lichtrezeptordaten wurde die Expression der drei Gene *Cpf1*, *Dph* und *Aureo1c* mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-Analyse (qRT-PCR) überprüft. In violett sind die gemessenen relativen Expressionen der qRT-PCR-Messungen gezeigt. In braun sind die mittels NGS detektierten RPKM-Werte ebenfalls als relative Expression dargestellt. Die qRT-PCR Messungen wurden mit Hilfe des Referenzgens *Histon H4* (Siaut *et al.*, 2007) normiert. Die Expression des dunkeladaptierten Wildtyps (WT d) wurde als Basis 1 festgelegt. Verglichen wurden die dunkeladaptierten (d) und Blaulicht-inkubierten (b) Proben des Wildtyps und der Mutanten Na1 und Ta3. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Replikate (n=3).

Tabelle A 3: Zusammenfassung der Kategorie 1 CryP-spezifisch regulierte Gene. Die Gene werden nur unter Blaulichteinfluss reguliert. Gezeigt sind die Gen Identifikationsnummer (Gen ID) der Datenbank EnsemblProtist und die Funktion oder der Name des Gens.

Gen ID	Funktion/Name	Gen ID	Funktion/Name
EG00259	Inosin Xanthosin Triphosphatase	40023	Metabolismus der komplexen Kohlenhydrate
EG00273	Unbekannt	40186	<i>Xin Actin-binding Repeat-containing Protein 1</i>
EG00282	Einzelstrang DNA-Bindeprotein	40329	Unbekannt
EG00322	<i>Heat Shock Factor 1</i>	40462	Serin Endopeptidase Aktivität Proteolyse
EG00379	Unbekannt	40644	Metabolismus
EG00682	Signalweiterleitung	41365	Signalweiterleitung
EG00745	Virales GAG Polyprotein	42882	Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase
EG00749	Unbekannt	43087	Translokase Komponente

EG00765	Unbekannt	43466	Lipid-Metabolismus
EG00775	Virales GAG Polyprotein	44088	<i>Heat Shock Factor</i>
EG00776	Unbekannt	44124	Unbekannt
EG00885	Unbekannt	44694	Metalloprotease
EG00945	Cytochrome C Oxidase Biogenese Protein	44711	Unbekannt
EG01424	Unbekannt	45280	Unbekannt
EG01447	Unbekannt	45310	Nukleotid-Metabolismus
EG01626	Rezeptor Kinase	45331	Protein-Lysin Methyltransferase
EG01722	Unbekannt	45514	Unbekannt
EG01798	Unbekannt	45515	NAD(P)-bindendes Protein
EG01939	Unbekannt	45662	Regulation
EG01955	Acetyl-CoA Carboxylase	45677	Lipid-Metabolismus
EG01956	Unbekannt	45800	Oxidoreduktase,
EG02044	Diphosphokinase	45968	Transkriptionsfaktor
EG02080	Unbekannt	46344	RNA
EG02127	Unbekannt	46363	Entwicklung
EG02270	Peroxiredoxin	46444	Elektronentransport Protein
EG02365	Polyaminsynthese	46563	Glykosylbinde-Protein
EG02373	Myosin E	46580	Unbekannt
EG02374	alpha-1,2-Mannosidase	46586	Unbekannt
EG02432	Gluko- Galakto- und Mannosidase	47103	Unbekannt
EG02625	Multisensor Signaltransduktion	47337	Unbekannt
10508	Unbekannt	47593	Sekundärmetabolismus
12887	Transkriptionsfaktor	47694	Stress
12963	Transkriptionsfaktor	47751	Unbekannt
13001	Kofaktor- und Vitaminmetabolismus	47754	Aminosäuremetabolismus
13034	Eisentransport	48047	Transport
14242	Fucoxanthin Chlorophyll a/c Protein	48172	Unbekannt
15922	Einzelstrang DNA-Bindeprotein	48187	Proteinglykosylierung
15968	Nukleotidmetabolismus	48314	Unbekannt
16120	RNA	48463	Protein des Golgi-Apparates
20124	Unbekannt	48972	Unbekannt
23292	Kohlenhydratmetabolismus	49188	Unbekannt
25840	Kofaktor- und Vitaminmetabolismus	49314	Oxidoreduktase
32559	Transkriptionsfaktor	49507	Kondensin-2 Komplex Untereinheit D3
33874	Transport	49527	Transkriptionsfaktor
34469	Regulation der Transkription	49534	Transport
34586	Unbekannt	49563	Proteinglykosylierung
34633	DNA Integration	49594	Transkriptionsfaktor
34868	Unbekannt	49613	Unbekannt
35250	Transport	50522	Unbekannt
35587	Unbekannt	50961	Signalweiterleitung

Literaturangaben

35627	Unbekannt	51876	DNA-Bindeprotein
35702	Postranslationale Modifikation von Proteinen	51916	DNA-Bindeprotein
36270	Nukleotidmetabolismus	54342	CryP
36555	Unbekannt	54465	Stress
36582	Signalweiterleitung	54998	Nukleotidmetabolismus
36590	Unbekannt	Jdraft1127	Unbekannt
37268	Signalweiterleitung	Jdraft1387	Metabolismus
37404	Virales GAG Polyprotein	Jdraft1392	Metalloprotease
37514	Unbekannt	Jdraft1393	Sulfatase-modifizierender Faktor 2
37652	Lipid Metabolism	Jdraft1431	GDP Frukokinase
38559	Signalweiterleitung G-Protein	Jdraft1723	Unbekannt
38879	Regulation	Jdraft561	Methionin Aminopeptidase
39465	DNA-Bindeprotein		

Tabelle A 4: Zusammenfassung der Kategorie 2 CryP-spezifisch regulierte Gene. Die Gene werden sowohl unter Blaulichteinfluss als auch im Dunkeln reguliert. Gezeigt sind die Gen Identifikationsnummer (Gen ID) der Datenbank EnsemblProtist und die Funktion oder der Name des Gens.

Gen ID	Funktion/Name	Gen ID	Funktion/Name
EG00210	Aktin-Bindeprotein	41478	Galaktosid 2-alpha-L-Frukosyltransferase
EG00714	Nukleinsäure-Bindeprotein	42538	Transport
EG00718	Lipidstoffwechsel	43621	Unbekannt
EG00724	Unbekannt	44517	Symporter
EG00760	Unbekannt	45403	Unbekannt
EG00779	Protein Degradation Ubiquitin E3	45413	Translation Elongationsfaktor
EG01067	Unbekannt	46239	Unbekannt
EG01072	3',5'-cyclische-Nukleotide-Phosphodiesterase	46341	Kaliumkanal Protein
EG01769	Virales GAG Polyprotein	46562	Protease
EG01995	Unbekannt	46565	Protease
EG01996	Protein Degradation Autophagie	46568	Transkriptionsfaktor
EG02529	Unbekannt	46570	Phospholipase
EG02530	Unbekannt	46571	Signalweiterleitung
12990	Kohlenhydratmetabolismus	46573	Zellorganisation
13057	Regulation	46577	Pseudouridin-Synthase
13192	Regulation der Transkription	46578	Signalweiterleitung
13975	Unbekannt	46579	Kofaktor- und Vitaminmetabolismus
20893	Nukleotidmetabolismus	46588	Proteinsynthese
20899	Transport	46593	Transkriptionsfaktor
20905	Energiemetabolismus	47748	Unbekannt
21519	Stress	48071	Unbekannt
27429	Deoxyribodipyrimidin Photolyase	48171	Unbekannt
3131	Serin-Hydrolase	49150	Nukleotide-Diphospho-Transferase

33054	Transkriptionsfaktor	49182	Unbekannt
36566	Methyltransferase	49557	Transkriptionsfaktor
36569	Regulation	50298	Unbekannt
36570	Serin-Hydrolase	50610	Unbekannt
36578	Unbekannt	54197	Transport
36586	Unbekannt	5769	Proteinsynthese
36589	Unbekannt	9962	Stress
37367	Oxoacyl-Synthase	Jdraft1684	E3 Ubiquitin-Proteinligase
38409	Rezeptorkinase	Jdraft1757	Sekundärmetabolismus
38426	Unbekannt	Jdraft375	Fruktose-Bisphosphate-Aldolase
38427	Oxygenase	Jdraft542	Cystein-Synthase
40280	Unbekannt		

Tabelle A 5: Zusammenfassung der Kategorie 3 CryP-spezifisch regulierte Gene. Die Gene werden nur im Dunkeln reguliert. Gezeigt sind die Gen Identifikationsnummer (Gen ID) der Datenbank EnsemblProtist und die Funktion oder der Name des Gens.

Gen ID	Funktion/Name	Gen ID	Funktion/Name
EG00121	Unbekannt	43347	Transport
EG00132	Rezeptorkinase	43494	Stress/Abwehr
EG00180	Rezeptorkinase	44029	Transkriptionsfaktor
EG00238	Unbekannt	44376	Unbekannt
EG00340	MER3 Helikase	44770	Energie Metabolismus
EG00511	Golgin Kandidat 6	44979	l-Rhamnose 1-Epimerase
EG00688	Unbekannt	45325	Sulfattransporter
EG00761	Unbekannt	45392	Transkriptionsfaktor
EG00788	Rezeptorkinase	45393	Transkriptionsfaktor
EG00800	Unbekannt	45400	Stress
EG00805	Metabolismus	45404	ABC-Transporter
EG00965	Rezeptorkinase	45423	Unbekannt
EG01086	Unbekannt	45432	Unbekannt
EG01107	Unbekannt	45614	Hydrogen-Ionen-Transporter
EG01140	Unbekannt	45821	Unbekannt
EG01231	Nukleinsäure-bindendes Protein	45850	Regulatorprotein
EG01249	Transkriptionsfaktor	46172	Stress und Abwehr
EG01254	Regulation der Transkription	46343	Telluritresistenz-Protein
EG01266	Rezeptorkinase	46445	Unbekannt
EG01275	Unbekannt	46511	Unbekannt
EG01403	Unbekannt	46842	Dephosphatase
EG01436	Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase	47350	Regulation
EG01451	Unbekannt	47400	Unbekannt
EG01467	Metabolismus	47698	Proteinkinase

Literaturangaben

EG01524	Unbekannt	47806	Kaliumtransporter
EG01701	Unbekannt	48068	Unbekannt
EG01725	Proteinkinase	48824	Unbekannt
EG02213	Transkriptioneller Aktivator	49133	Unbekannt
EG02308	Regulation der Transkription	49147	Transkriptionsfaktor
EG02495	Unbekannt	49162	Transkriptionsfaktor
EG02521	Entwicklung	49202	Unbekannt
EG02670	DNA-bindendes Protein Photoperiodismus	49312	Proteinkinase
11401	Unbekannt	49564	Kohlenhydratmetabolismus
11634	Zellzyklus	49574	Unbekannt
13073	Lipidmetabolismus	49595	Aminosäuremetabolismus
13078	Metabolismus	49728	Unbekannt
14983	Transkriptionsfaktor	50021	Unbekannt
15917	Aminosäuremetabolismus	50105	Unbekannt
31257	Alkoholdehydrogenase	50462	Unbekannt
33867	Proteindegradation	50486	Unbekannt
35971	DNAJ Chaperon	52174	DNA-Topoisomerase
36473	Virales GAG Polyprotein	52648	Lipidmetabolismus
37237	Unbekannt	5271	Fettsäuredesaturase A
38445	Transport	54330	Phytochrom DPH
38508	Unbekannt	54574	Unbekannt
38534	Stress und Abwehr	54982	Eisenreduktase
38665	DNA-bindendes Protein	Jdraft1396	Transport
38668	Regulation	Jdraft1640	3',5'-cyclic-Nukleotid-Phosphodiesterase
39066	Peptidylprolyl-Isomerase	Jdraft1691	Stress und Abwehr
39474	Virales GAG Polyprotein	Jdraft1692	Kohlenhydratmetabolismus
40300	Peptidylprolyl-Isomerase	Jdraft1717	Unbekannt
41031	Transport	Jdraft1725	Proteinmodifikation
41413	Sekundärmetabolismus	Jdraft1731	Signalweiterleitung
42474	Transport	Jdraft174	Phospholipase D Isoform X3
42494	Unbekannt	Jdraft1812	Signalweiterleitung G-Protein
42528	Unbekannt	Jdraft308	Peroxisomales Membranprotein
42887	Hydrogen-Ionen Transporter	Jdraft741	Transkriptionsfaktor
42975	Proteindegradation	Jdraft825	Fructose-bisphosphate Aldolase
